

**UNIVERSITÉ TOULOUSE III – Paul SABATIER**  
**FACULTÉS DE SANTÉ**  
**DÉPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

---

Année 2024-2025

2024 TOU3 2082

# **THÈSE**

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement  
par

**PITTET Soline**

**RÔLE DE L'APOLIPOPROTÉINE M ADIPOCYTAIRE DANS  
L'INFLAMMATION DU TISSU ADIPEUX ASSOCIÉE À  
L'OBÉSITÉ**

Le 20 Septembre 2024

Directrice de thèse : Dr Laurie FRANCES

## **JURY**

Présidente : Céline COLACIOS  
1er assesseur : Geneviève TAVERNIER  
2ème assesseur : Laurie FRANCES

**PERSONNEL ENSEIGNANT**  
**du Département des Sciences Pharmaceutiques**  
**de la Faculté de santé**  
**au 08 mars 2023**

**Professeurs Emérites**

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

**Professeurs des Universités**

**Hospitalo-Universitaires**

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B. (Directrice-adjointe)	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COSTE A.	Parasitologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Doyen-directeur)	Physiologie
Mme DERA EVE C.	Chimie Thérapeutique
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
Mme WHITE-KONING M.	Mathématiques

## Maitres de Conférences des Universités

### Hospitolo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
Mme KELLER L.	Biochimie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

### Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie Analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C. (*)	Immunologie
Mme ECHINARD-DOUIN V. (*)	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S	Biochimie
M. PILLOUX L.	Microbiologie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie

(\*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

### Assistants Hospitolo-Universitaires

M. AL SAATI A	Biochimie
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie Clinique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie
Mme DINTILHAC A.	Droit Pharmaceutique
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
Mme RIGOLOT L.	Biologie Cellulaire, Immunologie
Mme STRUMIA M.	Pharmacie Clinique

### Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Mme HAMZA Eya	Biochimie
Mme MALLI Sophia	Pharmacie Galénique
M. TABTI Redouane	Chimie Thérapeutique

# REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

À Céline Colacios, merci de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

À Geneviève Tavernier, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

À Laurie Frances, merci de faire partie de mon jury mais également d'avoir dirigé cette thèse avec autant d'investissement.

À mes parents, merci de m'avoir permis de réaliser ces études et de m'avoir soutenue pendant toutes ces années.

À Laura, qui, depuis 18 ans, a toujours été présente, de près ou de loin. Merci pour tout.

À mes amies de fac, Camille et Théo, sans qui ces années n'auraient pas été aussi drôles. Merci pour ces après-midi BU (surtout Camille pour le coup), pour ces soirées et pour tout le reste. Je nous revois en P2, et j'ai l'impression que c'était hier. J'ai de la chance d'avoir partagé mes études avec de si belles personnes.

Camille, ma binôme, nos chemins se sont croisés un peu par hasard lors de la rentrée et depuis on ne s'est jamais quittées. Merci pour ces années à tes côtés, grâce à notre binôme, on a pu tout surmonter dans la joie et la bonne humeur ou presque.

À Raphaël, merci d'être à mes côtés depuis tant d'années et de m'avoir soutenue malgré mon mauvais caractère en période de stress.

Avec toute ma gratitude,

Soline

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>6</b>
<b>TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
Obésité	9
Définition	9
Epidémiologie	13
Facteurs de risque	17
Impact de l'obésité sur la santé	19
Tissu adipeux	22
Les principaux types cellulaires présents dans le tissu adipeux	22
Adipocytes	22
Pré-adipocytes	24
Cellules endothéliales	26
Cellules nerveuses	27
Cellules immunitaires	29
Fonctions du tissu adipeux	32
Rôle de barrière	32
Thermogenèse adaptative sans frisson	33
Homéostasie énergétique	35
Organe endocrine	37
Tissu adipeux et inflammation dans un contexte d'obésité	42
Apolipoprotéine M	47
Généralités	47
Fonctions	49
ApoM et inflammation	52
<b>CONTEXTE DE L'ÉTUDE</b>	<b>55</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>56</b>
<b>RÉSULTATS</b>	<b>59</b>
Effet d'une déficience en Apom chez la souris	59
Effet d'une surexpression locale du gène humain APOM chez la souris	63
<b>DISCUSSION</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>72</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>79</b>
<b>SERMENT DE GALIEN</b>	<b>83</b>
<b>ARTICLE</b>	<b>84</b>

# LISTE DES ABREVIATIONS

Adipoq : adiponectine

AGL : acides gras libres

ATGL (Adipose Triglyceride Lipase)

BAT : tissu adipeux brun

$\beta$ -AR : récepteurs  $\beta$ -adrénergiques

BMP4 : Bone morphogenetic protein 4

CD11c : Cluster de différenciation 11c

CD68 : Cluster de différenciation 68

C/EBP : CCAAT-enhancer-binding proteins

CEs : cellules endothéliales

DAG : diacylglycérol

DGAT : diacylglycérol acyltransférase

DNL : lipogenèse de novo

DT2 : diabète de type 2

HSL : Hormone Sensitive Lipase

IGF1 : Insulin-like Growth Factor 1

IL : interleukine

IM : macrophages inflammatoires

IMC : indice de masse corporelle

LAM : macrophages associés aux lipides

LPL : lipoprotéine lipase

MAG : monoacylglycérol

MCP1 : Monocyte chemoattractant protein 1

MGL (Monoacylglycerol Lipase)

NE : noradrénaline

OMS : organisation mondiale de la santé

PKA : protéine kinase A

PPAR $\gamma$  : peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$

PGAT : tissu adipeux péri-gonadique

PVM : macrophages périvasculaires

SAA3 : Serum amyloid A3

SVF : fraction vasculaire stromale

SCAT : tissu adipeux sous-cutané

SFRP5 : Secreted frizzled-related protein 5

SNC : système nerveux central

TAG : triacylglycérols

TDT : tour de taille

TLR4 : Toll-like receptor 4

TNF $\alpha$  : Tumor necrosis factor  $\alpha$

UCP-1 : Uncoupling Protein 1

VAM : macrophages associés aux vaisseaux

VAT : tissu adipeux viscéral

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

WAT : tissu adipeux blanc

Wnt : Wingless Type

# TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

## Figures :

Figure 1	Page 9
Figure 2	Page 11
Figure 3	Page 13
Figure 4	Page 14
Figure 5	Page 15
Figure 6	Page 19
Figure 7	Page 21
Figure 8	Page 23
Figure 9	Page 25
Figure 10	Page 28
Figure 11	Page 34
Figure 12	Page 36
Figure 13	Page 44
Figure 14	Page 46
Figure 15	Page 48
Figure 16	Page 59
Figure 17	Page 61/62
Figure 18	Page 63
Figure 19	Page 64

## Tableaux :

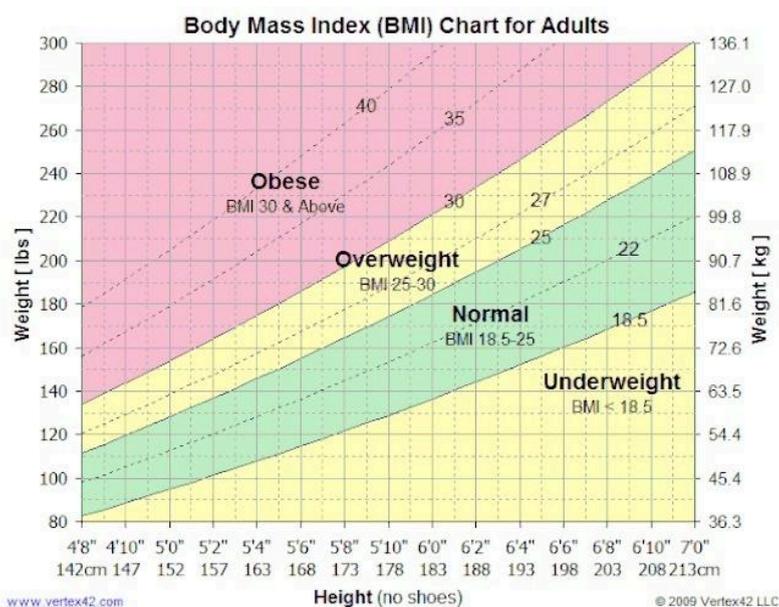
Tableau 1	Page 12
Tableau 2	Page 30/31
Tableau 3	Page 41

# INTRODUCTION

## Obésité

### Définition

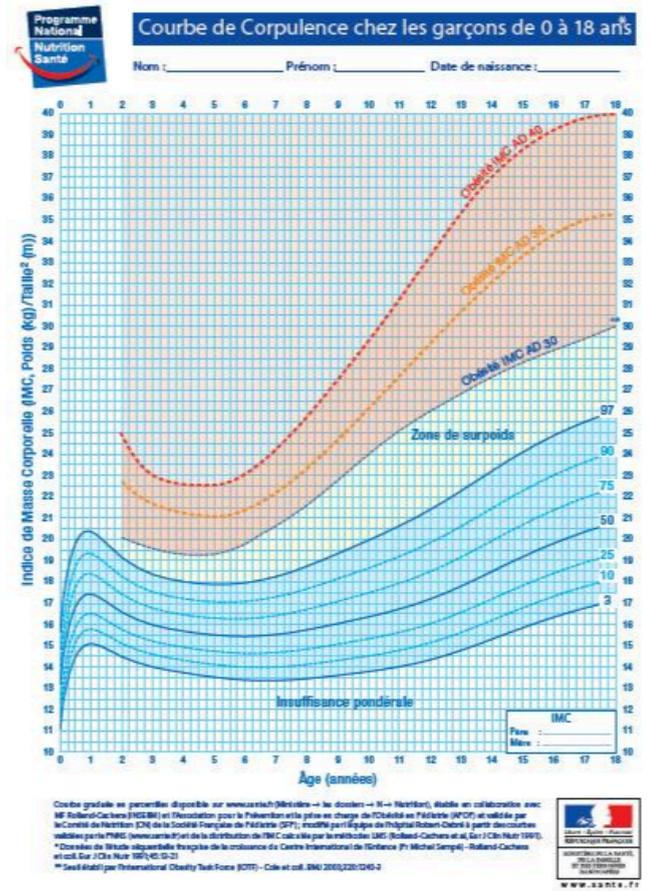
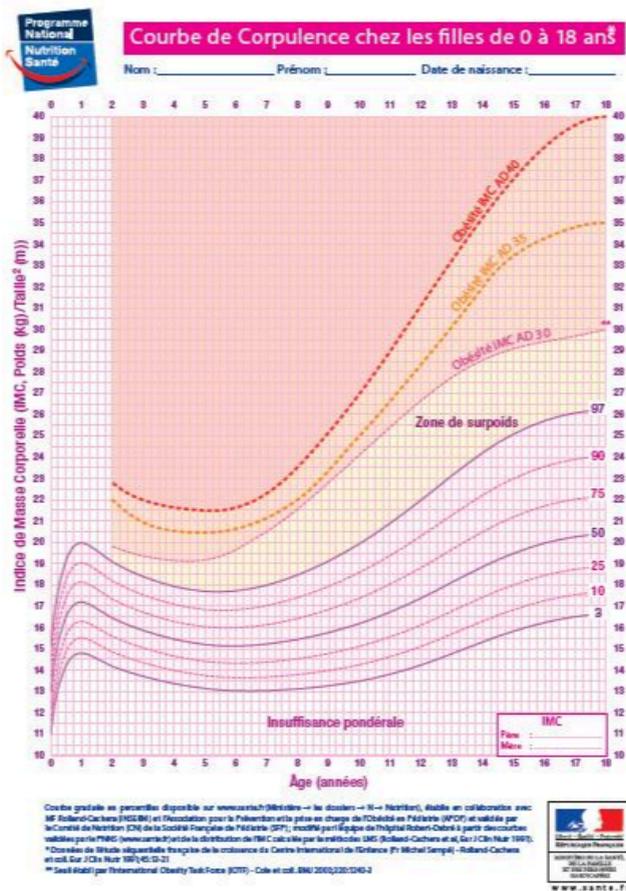
L'obésité est déterminée par le calcul de l'indice de masse corporelle (IMC) qui correspond au poids d'une personne en kilogramme divisé par le carré de sa taille en mètre. Selon l'OMS, une personne est considérée comme en surpoids ou en situation de pré-obésité quand son IMC est supérieur ou égal à 25 et en situation d'obésité si son IMC est supérieur ou égal à 30 kg/m<sup>2</sup> (1,2) (Fig. 1).



**Figure 1** : Table de l'indice de masse corporelle. L'axe des abscisses représente la taille, tandis que l'axe des ordonnées représente le poids. Reporter ces deux valeurs sur le graphique donne une valeur d'IMC. Selon le code couleur, cette valeur indique un sous-poids (jaune), un poids normal (vert), un surpoids (jaune) ou une obésité (rouge). Zierle-Ghosh A et Jan A. *Physiology, Body Mass Index*. 2022

L'IMC est utilisé depuis de nombreuses années pour évaluer l'obésité. L'obésité est classée en trois grades : l'obésité modérée avec un IMC entre 30 et 35 kg/m<sup>2</sup> (grade I), l'obésité sévère avec un IMC entre 35 et 40 kg/m<sup>2</sup> (grade II) et l'obésité morbide avec un IMC supérieur à 40 kg/m<sup>2</sup> (grade III). Cependant, son incapacité à estimer la distribution de la matière grasse limite son intérêt en tant que marqueur de santé (3,4).

Ainsi, la définition de l'obésité basée sur l'IMC, n'est pas applicable à toute la population comme chez les sportifs, les enfants, les personnes âgées ou les femmes enceintes. Dans ce sens, certains sportifs sont catégorisés comme atteints d'obésité par cette définition alors qu'ils ont simplement une masse musculaire importante et non un excès de masse grasse. De plus, s'agissant des enfants, compte tenu de leur croissance, une courbe différente de celle des adultes est utilisée pour définir les différents seuils d'IMC (Fig. 2). Chez les personnes âgées, la perte de masse musculaire (sarcopénie) et l'augmentation de la masse grasse ne sont pas distinguées par l'IMC, ce qui peut sous-estimer ou ne pas refléter correctement l'excès de graisse corporelle. Enfin, pendant la grossesse, l'IMC ne permet pas de différencier le poids dû à la croissance du fœtus d'une potentielle prise de masse grasse chez la femme enceinte.



**Figure 2 :** Courbe de corpulence chez les filles et les garçons de 0 à 18 ans. CINFO.

Une autre classification de l'obésité existe permettant de classer en quatre catégories l'obésité : l'obésité de poids normal, l'obésité métabolique de poids normal, l'obésité métaboliquement saine et l'obésité métaboliquement malsaine. Cette classification, comme le montre le tableau 1, se base sur l'IMC mais également sur d'autres repères tels que le pourcentage de masse grasse ou la sensibilité à l'insuline, ainsi que des biomarqueurs comme les cytokines pro-inflammatoires, permettant ainsi de tenir compte de la morbidité et de la mortalité au niveau de la population (3–5).

Type of obesity	Benchmarks	Biomarkers
Normal weight obese (NWO)	(A) BMI = 18.5–25 (normal weight) (B) Higher fasting glucose level (C) Did not have metabolic syndrome (D) High body fat percentage ✓ Men—23.5% ✓ Women—29.2%	Proinflammatory cytokines
Metabolically obese normal weight (MONW)	(A) BMI = 18.5–25 (normal weight) (B) High body fat percentage >30 (C) Low insulin sensitivity/hyperinsulinemia (D) Metabolic syndrome happen	Presence of steatosis, concentrations of high-density cholesterol, triglycerides, and inflammation biomarkers
Metabolically healthy obese (MHO)	(A) BMI >30 (obese) (B) High body fat percentage >30 (C) Proper sensitivity of insulin	Elevated high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and TG
Metabolically unhealthy obese (MUO)	(A) BMI >30 (obese) (B) High body fat percentage >30 (C) Insulin resistant, diabetes mellitus	Higher TG, FBG, TG/HDL-C levels, and lower levels of HDL

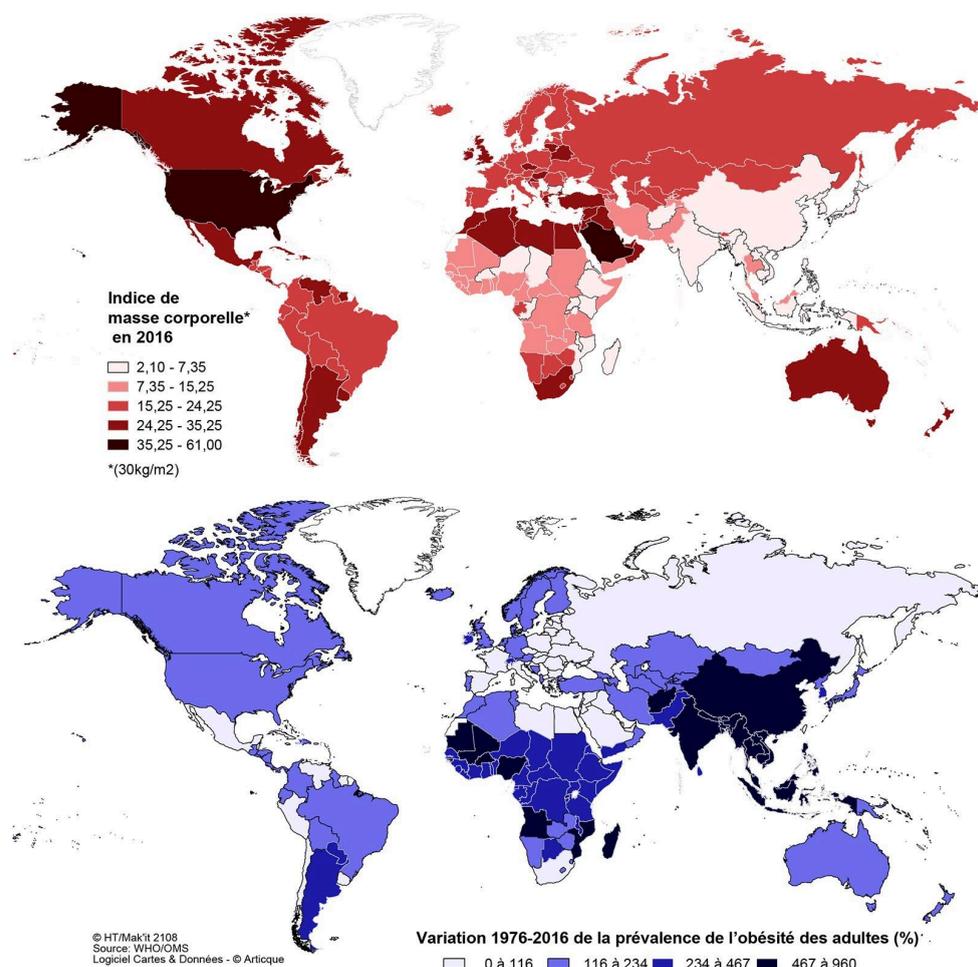
FBG: fasting glucose; TG: triglyceride; HDL: high-density lipoprotein.

**Tableau 1 : Classification de l'obésité selon des critères cliniques et biologiques.** *Endalifer ML et Diress G. Epidemiology. Predisposing Factors, Biomarkers, and Prevention Mechanism of Obesity: A Systematic Review. J Obes (2020).*

D'autres méthodes anthropométriques sont utilisées dans les études cliniques comme le tour de taille divisé par le tour de hanche, le poids divisé par la taille ou le tour de taille/taille. Le tour de taille (TDT) est la mesure de choix. En effet, dans les études cliniques, le TDT permet une meilleure estimation des risques pour la santé en raison de sa meilleure corrélation aux morbidités. Cependant, chez les enfants et les adolescents, en pleine croissance, le rapport TDT/taille pourrait être plus utile pour la classification de l'obésité abdominale que le seul TDT (3–5).

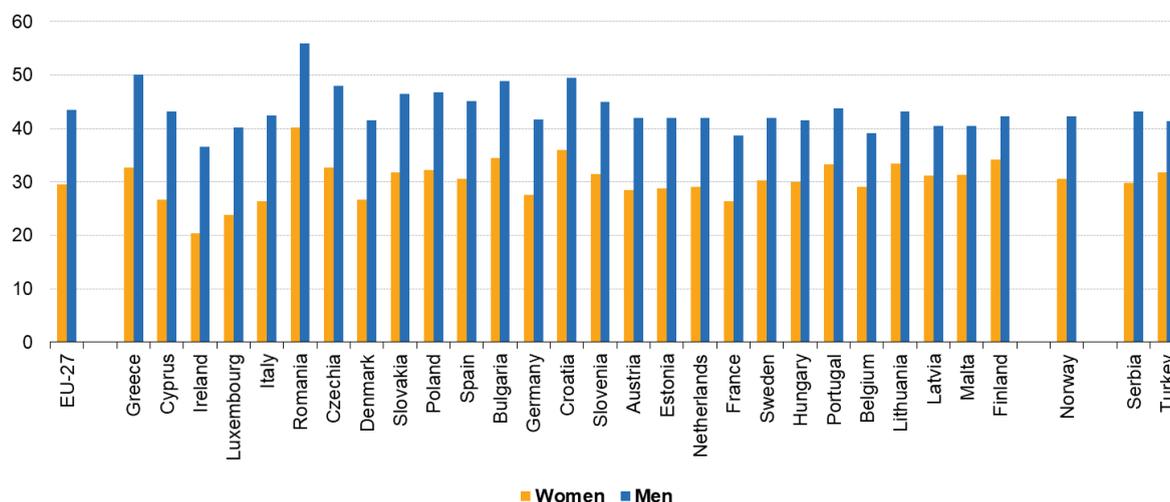
## Epidémiologie

L'obésité est une préoccupation mondiale (Fig. 3). En effet, d'après les estimations de l'OMS, le nombre de personnes adultes atteintes d'obésité a plus que doublé entre 1990 et 2022 à l'échelle mondiale. Huit cent quatre-vingt-dix millions d'adultes en situation d'obésité ont été recensés en 2022, soit environ 16 % de la population des 18 ans et plus dans le monde (6).



**Figure 3** : Planisphères de l'IMC en 2016 et de la variation 1976-2016 de la prévalence de l'obésité chez les adultes en pourcentage. Le premier panel correspond à la prévalence moyenne de l'obésité en 2016 chez les adultes basée sur l'IMC moyen des hommes et des femmes. Le second panel correspond à la variation de la prévalence de l'obésité entre 1976 et 2016 chez les hommes et les femmes adultes. Ces planisphères furent élaborés à partir des statistiques recensées et publiées par l'OMS. *Hervé Théry / Mak'it 2018.*

Parmi les 19 États membres pour lesquels les données de 2008/2009 sont disponibles, la proportion de personnes adultes atteintes d'obésité variait entre 8,0% et 23,9% chez les femmes et entre 7,6% et 24,7% chez les hommes. Entre 2008 et 2017/18, le taux d'obésité a augmenté dans presque tous les pays. La prévalence de l'obésité chez les femmes augmente avec l'âge (Annexe 1) mais varie également selon le niveau d'éducation, avec une prévalence diminuant lorsque le niveau d'éducation augmente (Annexe 2). En 2019 tout comme en 2008/2009, la proportion d'obésité entre les hommes et les femmes de 18 ans et plus varie différemment selon les pays (Annexes 1 et 3). Par exemple, en 2019, Malte comptait une proportion d'hommes en situation d'obésité supérieure à celle des femmes (3,9%), tandis qu'en Estonie, la proportion d'obésité était plus élevée chez les femmes (3,9%). En Grèce, les proportions étaient comparables entre hommes et femmes. Concernant le surpoids en 2019, les hommes sont davantage atteints que les femmes, dans tous les États membres de l'UE (Fig. 4) (7)

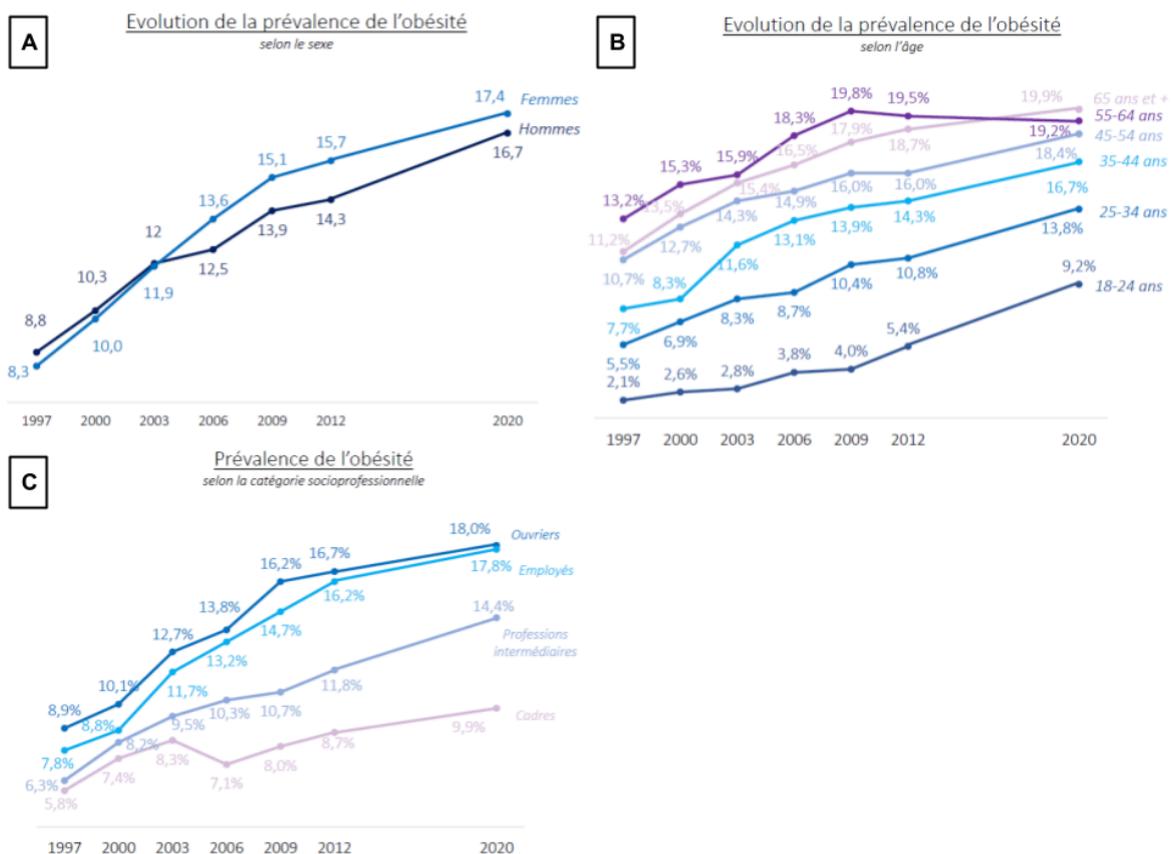


Note: population aged 18 and over. Ranked by difference in percentage points between men and women  
Source: Eurostat (online data code: hlth\_ehis\_bm1e)

eurostat

**Figure 4 : Proportion en pourcentage de femmes et d'hommes en situation de pré-obésité en Europe en 2019.** L'axe des ordonnées représente le pourcentage de femmes et d'hommes en situation de pré-obésité en Europe en 2019. Eurostat.

En France, les statistiques indiquent également que la prévalence de l'obésité continue de progresser, passant de 8,5% (8,8% des hommes et 8,3% des femmes) en 1997 à 17% (16,7% des hommes et 17,4% des femmes) en 2020 (Fig. 5A). La figure 5B montre qu'entre 1997 et 2012, la prévalence de l'obésité était la plus élevée chez les personnes de 55 à 64 ans. En 2020, la prévalence de l'obésité augmente de manière continue avec l'âge, culminant chez les 65 ans et plus, probablement en raison du vieillissement de la tranche d'âge 55-64 ans. La prévalence des personnes en situation d'obésité varie également selon le niveau d'éducation en France, passant de 9,9% pour les cadres à 18% pour les ouvriers en 2020 (Fig. 5C) (8).



**Figure 5 : Évolution de la prévalence de l'obésité en France de 1997 à 2020 selon le sexe (A), l'âge (B) et la catégorie socioprofessionnelle (C). Etude Obépi-Roche 2020.**

De plus, l'impact économique associé à l'obésité n'est pas négligeable. Okunogbe et *al.* ont étudié l'impact économique du surpoids et de l'obésité dans différents contextes géographiques et économiques et ont estimé à 2,19 % du PIB en moyenne dans les 161 pays de l'étude (9). D'après Lette et *al.*, le coût de la surcharge pondérale en Allemagne, aux Pays-Bas et en République tchèque, exprimé en pourcentage des dépenses relatives aux maladies principalement attribuables au surpoids, varient de 20 à 26 % % (10). Effertz et *al.* ont inclus les impacts sur la santé mentale de l'obésité et ont estimé que sur l'ensemble de la vie, chaque homme atteint d'obésité représente une charge supplémentaire de 166 911 euros et chaque femme de 206 526 euros pour le système de sécurité sociale en Allemagne (11). Errico et *al.* estiment que les coûts totaux attribuables à l'obésité en Italie s'élèvent à 13,34 milliards d'euros en 2020 (coûts directs 7,89 milliards d'euros et coûts indirects 5,45 milliards d'euros) (12). En conséquence, de nombreuses études ont associé les coûts de santé au facteur de l'obésité et malgré des méthodologies variées, leurs analyses se rejoignent sur le fait que l'obésité entraîne des coûts significatifs et non négligeables pour la société.

## Facteurs de risque

L'obésité est une pathologie multifactorielle, influencée par des facteurs de risque qui peuvent être regroupés en différentes catégories : les facteurs comportementaux, socio-économiques et génétiques.

Parmi les facteurs de risque comportementaux, l'alimentation déséquilibrée, l'état psychologique et le manque d'activité physique sont d'une importance capitale. En effet, une alimentation déséquilibrée ou des troubles alimentaires tels que la boulimie peuvent entraîner une consommation excessive de calories, en particulier issues d'aliments riches en matières grasses et en sucres ajoutés, favorisant ainsi la prise de poids et le développement de l'obésité. Par ailleurs, des états de stress, de dépression ou d'anxiété peuvent induire des comportements alimentaires émotionnels, accroissant ainsi le risque d'obésité. De même, un mode de vie sédentaire, caractérisé par une faible activité physique et un manque d'exercice régulier, représente un facteur de risque majeur pour l'obésité (5,13).

Les facteurs socio-économiques tels que le niveau de revenu et le niveau d'éducation ainsi que l'environnement dans lequel une personne évolue, peuvent exercer une influence significative sur ses habitudes alimentaires et son niveau d'activité physique, influençant ainsi sur le risque d'obésité. Les individus ayant peu de moyens peuvent rencontrer des difficultés pour accéder à une alimentation équilibrée, ce qui peut les conduire à adopter des habitudes alimentaires moins saines. En effet, les aliments transformés et la restauration rapide, riches en calories, sont souvent plus abordables et accessibles que les produits frais et sains.

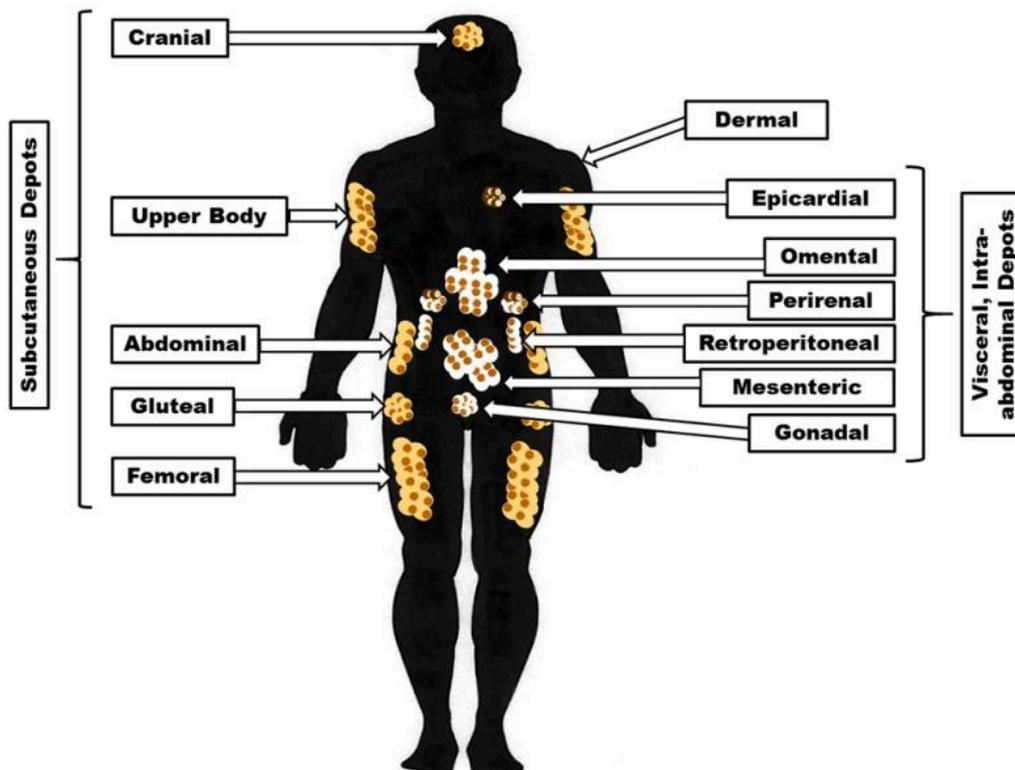
Dans cet environnement considéré comme obésogène, où la disponibilité de produits alimentaires riches en calories est élevée et où la sédentarité est omniprésente, les individus sont davantage susceptibles d'adopter des comportements favorisant la prise de poids ainsi que le développement de l'obésité. De plus, les personnes vivant dans des quartiers défavorisés peuvent avoir un accès limité à des espaces de loisirs et à des infrastructures sportives, limitant leurs opportunités d'avoir une activité physique régulière (5,14,15).

L'hérédité est également considérée comme un facteur de risque en raison de l'interaction entre les gènes et les facteurs de risque précédemment énoncés, prédisposant ainsi certains individus à l'obésité. De plus, des mutations monogéniques entraînant l'obésité seulement par leur présence existent mais sont plus rares (5,14,15).

Ces facteurs de risque peuvent agir de manière isolée ou combinée pour influencer le risque d'obésité chez un individu donné. La prise en compte de ces facteurs est essentielle afin de développer des stratégies efficaces de prévention et de gestion de l'obésité.

## Impact de l'obésité sur la santé

L'excès de masse grasse caractéristique de l'obésité est une expansion excessive du tissu adipeux. Ce tissu adipeux correspond à une multitude de dépôts graisseux retrouvés dans différentes localisations anatomiques. La figure 6 illustre les différentes localisations anatomiques des dépôts adipeux chez l'Homme. Les dépôts superficiels comme au niveau glutéal ou fémoral correspondent au tissu adipeux sous-cutané (SCAT) et les dépôts profonds situés dans la région abdominale comme le tissu adipeux omental, le tissu adipeux rétropéritonéal ou le tissu adipeux mésentérique correspondent au tissu adipeux viscéral (VAT).



**Figure 6** : Les différentes localisations des dépôts adipeux. Les dépôts sous-cutanés sont retrouvés en surface à différentes localisations comme au niveau du crâne et des bras mais également dans les régions abdominale, glutéale ou fémorale. Les dépôts viscéraux sont retrouvés en profondeur autour de certains organes comme le cœur, les gonades, le foie, le pancréas, les intestins, l'estomac ou les reins. Tiré de Richard AJ. et al. *Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction*. Endotext (2020).

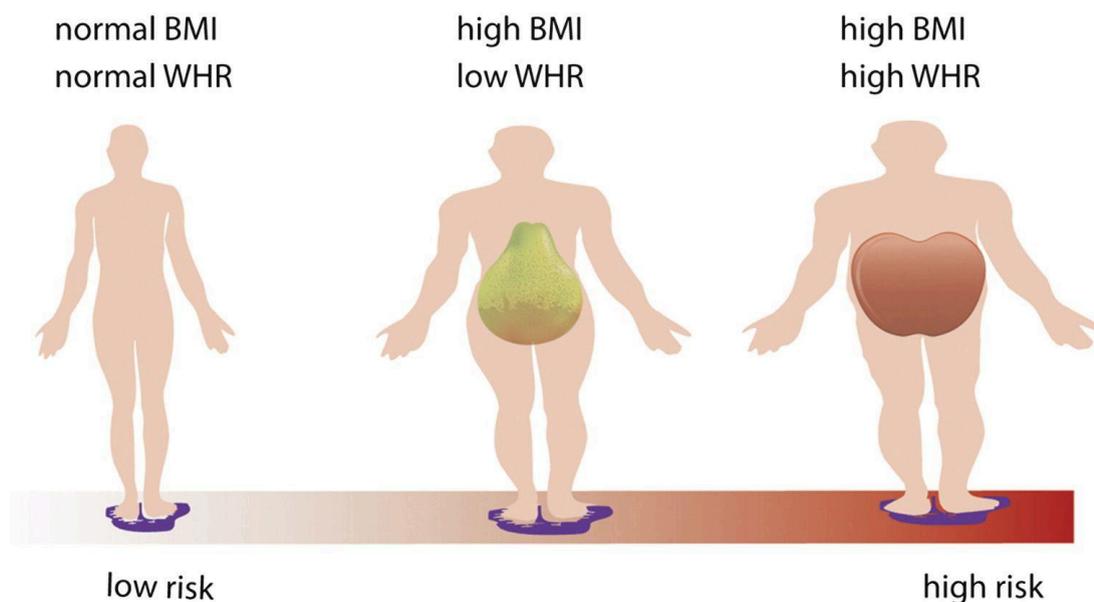
L'obésité suscite un grand intérêt en raison de ses répercussions sur la santé publique, en particulier concernant sa corrélation positive avec la mortalité. Il a été démontré que l'obésité à l'âge de 40 ans réduit l'espérance de vie de 7 ans chez les femmes et de 6 ans chez les hommes (16).

En effet, l'obésité est un facteur de risque pour de nombreuses maladies comme les dyslipidémies, l'hypertension, l'infarctus du myocarde, l'arthrose et le diabète de type 2 (DT2) (13,14,16,17). L'obésité a également un effet sur la reproduction chez les hommes et les femmes. Pour les femmes, cela se traduit par les irrégularités menstruelles, le syndrome des ovaires polykystiques, les complications liées à la grossesse et la stérilité due à l'anovulation ; chez les hommes, à la baisse de la testostérone et du nombre de spermatozoïdes (5,18). De plus, l'obésité augmente l'incidence de la dépression et de l'anxiété (19).

L'obésité est également liée à de nombreuses maladies inflammatoires, telles que la polyarthrite, la sclérose en plaques, le psoriasis, les maladies inflammatoires de l'intestin et différents types de cancers (20). Setti et *al.* montrent dans une étude prospective que l'augmentation de l'adiposité et la prise de poids sont des facteurs de risque importants pour le psoriasis chez les femmes (21). Rowan et *al.* mettent en évidence l'importance du VAT dans la maladie de Crohn avec certains éléments indiquant des formes plus complexes associées, c'est-à-dire à des phénotypes de maladies à sténose ou à fistule, ainsi que des taux de récurrence post-opératoire influencés par l'augmentation de l'adiposité mésentérique (22).

Cependant, tous les dépôts adipeux ne contribuent pas de la même manière au risque de maladie. En effet, des études ont montré que le VAT est le dépôt adipeux présentant le plus grand risque pour la santé (3,14,23).

Or, la répartition du tissu adipeux présente un dimorphisme sexuel découlant sur la forme androïde dite de “pomme” et la forme gynoïde dite de “poire” (Fig.7). En effet, généralement, les hommes présentent une prédominance de VAT au niveau abdominal, leur conférant une morphologie androïde, qui est associée à un risque cardiovasculaire plus élevé. Les femmes quant à elles, ont en général une prédominance de SCAT glutéo-fémoral avant la ménopause, ce qui leur donne la morphologie gynoïde, associée à un risque cardiovasculaire moindre (24–26).



**Figure 7 : Relation entre l'indice de masse corporelle, la morphologie et le risque pour la santé.** Les personnes ayant un IMC et un rapport tour de taille / tour de hanches normaux sont moins à risque que celles ayant une forme de pomme, caractérisée par un IMC et un rapport tour de taille / tour de hanches élevés. Les personnes avec un IMC élevé mais un rapport tour de taille / tour de hanches normal, conférant une forme en poire, ont un risque intermédiaire. BMI = IMC = Indice de masse corporelle, WHR = rapport tour de taille / tour de hanches. Fu J et al. *Cell Metab.* 2015.

## Tissu adipeux

Le tissu adipeux est un organe très diversifié tant sur le plan cellulaire que fonctionnel. Sur le plan cellulaire, le tissu adipeux contient une fraction adipocytaire et une fraction vasculaire stromale (SVF) dans laquelle une grande variété de types cellulaires, non adipocytaires, est observée.

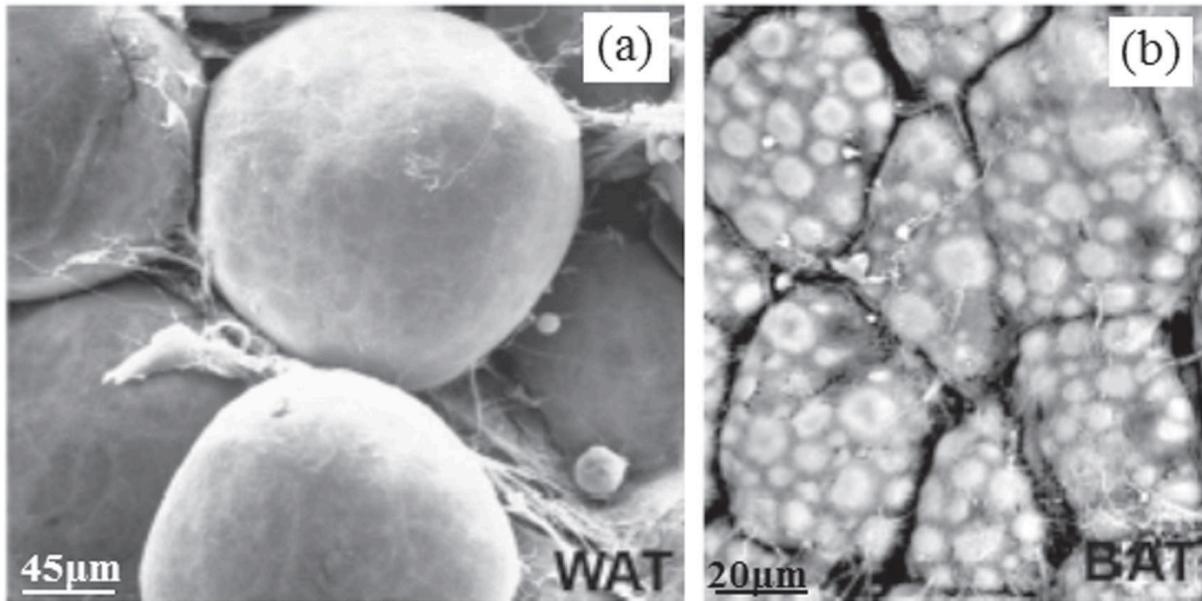
### Les principaux types cellulaires présents dans le tissu adipeux

#### Adipocytes

Les adipocytes sont les unités fonctionnelles du tissu adipeux permettant le stockage et la libération d'énergie. Parmi ces cellules, nous pouvons distinguer deux sous-types, les adipocytes blancs et les adipocytes bruns (27–32).

Les adipocytes blancs sont des cellules sphériques (Fig. 8) dont la principale fonction est de stocker les triglycérides sous forme de gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme. Ces adipocytes, caractérisés par une seule grande gouttelette lipidique leur donnant un aspect uniloculaire, sont de diamètre très variable, allant de 10 à plus de 200  $\mu\text{m}$ , selon la taille de cette gouttelette (27–33).

Contrairement aux adipocytes blancs, les adipocytes bruns, plus petits avec un diamètre variant de 15 à 50  $\mu\text{m}$ , contiennent plusieurs petites gouttelettes lipidiques (Fig. 8) et de nombreuses mitochondries riches en cytochrome c, leur donnant une couleur brune. Ils peuvent être trouvés dans des dépôts dédiés, tels que les dépôts interscapulaire, supraclaviculaire ou paravertébraux (27–32,34).

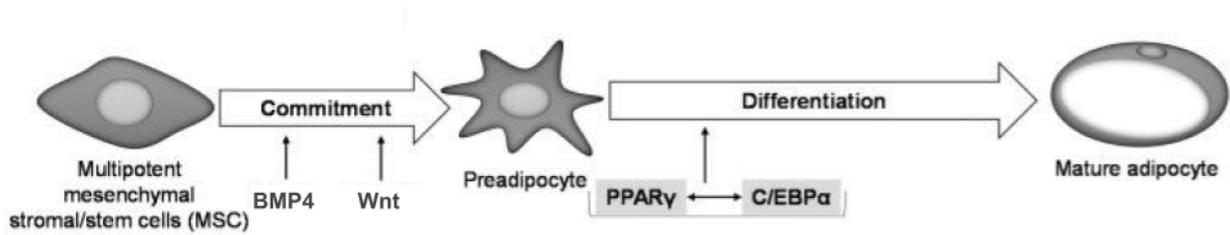


**Figure 8** : Microscopie électronique à balayage du tissu adipeux blanc (WAT ; à gauche) et brun (BAT ; à droite). Les adipocytes blancs sont sphériques avec un dépôt lipidique uniloculaire (a) et les adipocytes bruns sont polyédriques avec un dépôt lipidique multiloculaire (b). Barre : gauche = 45  $\mu\text{m}$  ; droite = 20  $\mu\text{m}$ . Cinti S. *Adipose tissues and obesity. Ital J Anat Embryol* (1999).

## Pré-adipocytes

Les préadipocytes sont les cellules progénitrices des adipocytes présentes dans la SVF et qui découlent des cellules souches mésenchymateuses. Ils se caractérisent par leur morphologie fibroblastique, avec un faible contenu en lipides intracellulaires par rapport aux adipocytes matures. Sous l'influence de signaux spécifiques, tels que des facteurs de croissance et des hormones, les préadipocytes peuvent se différencier en adipocytes matures capables de stocker des lipides (27,30,32,35).

Comme l'illustre la figure 9, l'adipogenèse se déroule en deux étapes sous l'effet de différents signaux. Premièrement, les progéniteurs s'engagent vers la voie adipocytaire, inhibant les voies ostéocytaire et chondrocytaire pour devenir des pré-adipocytes. BMP4 (*Bone morphogenetic protein 4*) et Wnt (*Wingless-type*) sont des facteurs de transcription engendrant l'engagement des cellules mésenchymateuses vers la voie adipocytaire. Deuxièmement, les pré-adipocytes se différencient en adipocytes matures. Parmi les signaux impliqués, IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*), C/EBP (*Ccaat-enhancer-binding proteins*) et PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$* ), sont des facteurs de transcription clés impliqués dans la différenciation des adipocytes (35,36).



**Figure 9 : Régulation transcriptionnelle de l'adipogenèse.** Des facteurs de transcription favorisent l'engagement des préadipocytes dans la lignée adipogénique tandis que d'autres inhibent ce processus. L'expression de PPAR $\gamma$  et de C/EBP $\alpha$ , régulée en aval par plusieurs autres facteurs de transcription, est essentielle à l'engagement pré-adipocytaire et à la différenciation terminale. Modifiée de Ambele MA et al. *Adipogenesis: A Complex Interplay of Multiple Molecular Determinants and Pathways*. *Int J Mol Sci* (2020).

## Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales (CEs) sont des cellules spécialisées qui jouent un rôle crucial dans plusieurs processus biologiques comme la régulation de la vascularisation, de la perméabilité vasculaire, de l'homéostasie adipeuse et l'inflammation.

Les CEs tapissent la paroi des vaisseaux sanguins, formant un réseau de capillaires sanguins qui assure l'approvisionnement en nutriments et en oxygène des adipocytes, ainsi que l'élimination des déchets métaboliques (27,32,37).

Les CEs tapissent également la paroi des vaisseaux lymphatiques qui sont plus abondants dans le VAT que le SCAT. Ce réseau lymphatique est impliqué dans le maintien de l'homéostasie des fluides, la régulation de la réponse inflammatoire, l'absorption des graisses et le transport inverse du cholestérol (38–41).

Les interactions entre les adipocytes, les cellules immunitaires et les CEs sont cruciales pour le fonctionnement normal du tissu adipeux et son implication dans les processus métaboliques et inflammatoires (37).

## Cellules nerveuses

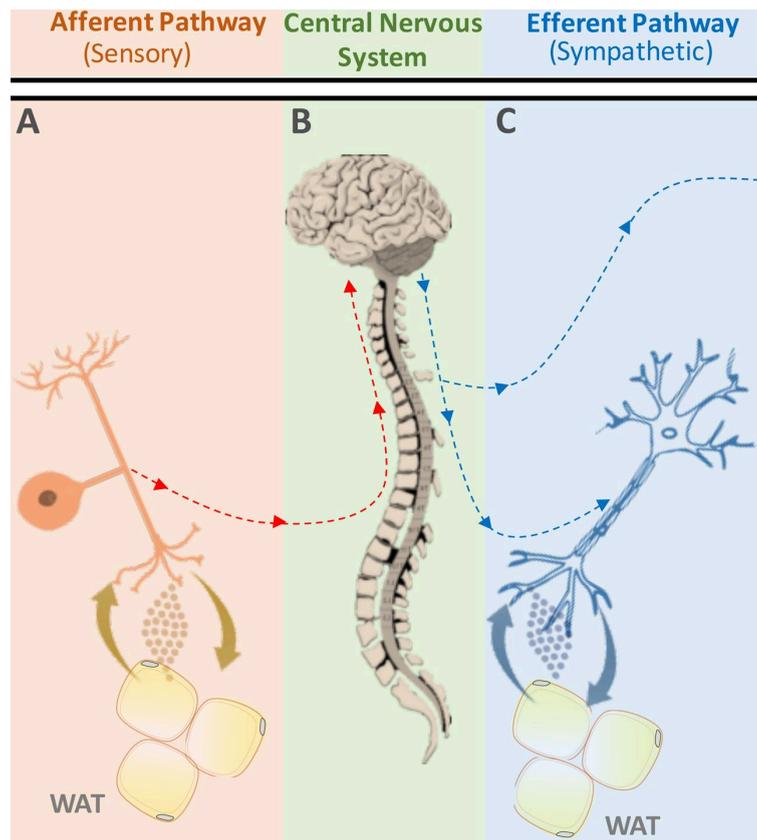
La communication entre le tissu adipeux et le système nerveux central (SNC) est un processus essentiel pour la régulation de l'homéostasie énergétique et métabolique du corps, médié par des fibres nerveuses sensorielles et sympathiques (Fig 10). L'innervation sympathique du tissu adipeux diffère entre les dépôts sous-cutanés et viscéraux (42,43).

Différents facteurs stimulent les fibres nerveuses afférentes sensorielles qui transmettent l'état métabolique au cerveau *via* les neurones sensoriels qui innervent le tissu adipeux. Cette innervation sensorielle afférente du tissu adipeux provient des neurones du ganglion de la racine dorsale (43–45).

Les nerfs sensoriels et sympathiques adipeux sont connectés, ils ont le potentiel de communiquer par le biais de relais hypothalamiques, ainsi que par des zones du cerveau postérieur et du cerveau moyen. (43)

Le SNC intègre ces informations périphériques et régule les fonctions du tissu adipeux par l'intermédiaire des fibres sympathiques efférentes sécrétant des neurotransmetteurs tels que la noradrénaline (NE). Par exemple, sous l'effet d'un stimulus du SNC, les fibres nerveuses sympathiques libèrent de la NE dans le tissu adipeux qui, en se liant aux récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -AR), module plusieurs processus métaboliques comme la lipolyse, la thermogénèse et le remodelage du tissu adipeux (40,43,45).

Les réseaux de signalisation complexes de l'innervation adipeuse permettent l'interaction entre les différents types de cellules du tissu adipeux. Cette interaction dynamique entre le tissu adipeux et le SNC est essentielle pour maintenir l'homéostasie énergétique et métabolique du corps (43).



**Figure 10 : Régulation nerveuse du tissu adipeux.** (A) Les nerfs sensoriels relaient les informations du micro-environnement du tissu adipeux vers le SNC. (B) Le SNC intègre les signaux du tissu adipeux et transmet une réponse au tissu adipeux par l'intermédiaire du flux sympathique. (C) Le nerf sympathique innervant le tissu adipeux libère des facteurs de signalisation qui influencent le microenvironnement de celui-ci. Modifiée de Guilherme A et al. *Molecular pathways linking adipose innervation to insulin action in obesity and diabetes mellitus. Nat Rev Endocrinol* (2019).

## Cellules immunitaires

Le tissu adipeux contient également des cellules immunitaires qui interviennent dans la réponse inflammatoire et la régulation de l'homéostasie métabolique, telles que des cellules dendritiques, des lymphocytes, des monocytes et des macrophages (27,32).

Les macrophages jouent un rôle clé dans la réponse inflammatoire avec des fonctions telles que la phagocytose, la sécrétion de cytokines ou la présentation d'antigènes pour initier le recrutement d'autres cellules immunitaires. De plus, ils ont également un rôle important dans l'homéostasie et le remodelage du tissu adipeux (32,46,47).

Le tissu adipeux contient une population mixte de macrophages, c'est-à-dire des macrophages du tissu adipeux d'origine embryonnaire qui ont survécu par auto-renouvellement et des macrophages du tissu adipeux dérivés du recrutement et de l'activation des monocytes circulants (27,32,47).

Pendant longtemps, il était admis que les macrophages du tissu adipeux passaient d'un phénotype M2 anti-inflammatoire à un phénotype M1 pro-inflammatoire avec l'obésité. Cependant, il est désormais reconnu que ces macrophages n'ont pas une classification dichotomique M2 ou M1 mais présentent une hétérogénéité reflétant différents niveaux de polarisation (tableau 2), où certains sont plutôt pro-inflammatoires et d'autres plus actifs sur le plan métabolique (27,32,47).

Species	Gender	Depot	Subpopulation <sup>a</sup>	Markers	Pathways/polarization
Mouse (C57BL/6J)	males	WAT (epididymal)	CD11b+ Ly6c+	<i>Ly6c, Cd74, Dab2, Mgl2</i>	vascular development and organization
			Ly6c- CD9- CD206+	<i>CD206</i>	perivascular-like
			Ly6c- CD9+	<i>Cd9, Lpl, Plin2, Lamp2</i>	proinflammatory pathway + lysosomal pathways + lipid handling
			Mac1	<i>Cd163, Lyve1, Cd209f</i>	perivascular
			Mac2	<i>Cd9, Nceh1</i>	not reported
			Mac3	<i>Cd9, Spp1, Trem2, Lipa, Lpl</i>	lipid-associated
			LAM	<i>Trem2, Cd9, Lpl</i>	phagocytosis + lipid handling+ chemokine signaling
			PVM	<i>Lyve1, Cd163</i>	statin pathway + EGFR signaling + oxidative stress and redox
			NPVM	<i>Cd74, Fcrls, Ear5</i>	phagocytosis + chemokine signaling + PPAR signaling
			CEM	<i>Col5a2, Tgfb3, Col3a1</i>	focal adhesion + PI3K-Akt-mTOR signaling
			P-LAM	<i>Pola1, Kif11, Kif15</i>	proliferative pathways + statin pathway
			RM	<i>Prg4, Tgfb2, Ltbp1</i>	eicosanoid synthesis + chemokine signaling
			TRM	<i>Klf4, Cbr2, and Stab1, Selenop</i>	perivascular-like
			LAM	<i>Trem2, Cd9, Lpl</i>	lipid handling
CM	<i>Stmn1, Pclaf</i>	cell cycling			
	males + females	WAT (inguinal + perigonadal)	IS3	<i>Cxcl2, Cxcl3, CCL3</i>	proinflammatory macrophages
			IS9	<i>FOLR2, Klf4</i>	M2-like
			mMac1	<i>Fgf13</i>	not reported
			mMac2	<i>Plekhg5</i>	
			mMac3	<i>Trem2</i>	
			mMac4	<i>Prg4</i>	
Human	men + women	WAT (subcutaneous + abdominal)	macrophage (M1-like)	<i>CD68, TREM2</i>	not reported
			macrophage (M2-like)	<i>FOLR2, CD163</i>	
			hMac1	<i>PLEKHG5</i>	not reported
			hMac2	<i>TREM2</i>	
	women	WAT (subcutaneous)	hMac3	<i>PROS1, CLEC10A</i>	
			LAM	<i>TREM2, CD9, LPL</i>	lipid-associated
			PVM	<i>LYVE1, SELENOP, C1Q</i>	perivascular
			IM	<i>CCL3L1, TNF, CXCL3</i>	inflammatory

Adipose tissue macrophage (ATM) subpopulations in mouse and human WAT and BAT depots. Proposed nomenclature and expression of specific marker genes, enriched pathways, and/or polarization are indicated. Association with obesity, wherever reported, is depicted as + (positive correlation), ++ (strong positive correlation), - (negative correlation), or "no correlation." Mac1-3, mMac1-4 (mouse), and hMac1-3 (human) are macrophage subpopulations identified in Emont et al.<sup>121</sup> IS2/3/9 are immune subpopulations defined as macrophages in Vijay et al.<sup>207</sup> LAM, lipid-associated macrophage; PVM, perivascular macrophage<sup>123</sup>; NPVM, non-perivascular macrophage; CM, collagen-expressing macrophage; P-LAM, proliferating LAM; RM, regulatory macrophage<sup>123</sup>; TRM, tissue resident macrophage<sup>61</sup>; IM, inflammatory macrophage.<sup>206</sup>

<sup>a</sup>The subpopulations that seem to have similar markers and gene programs identified across different studies can be grouped as CD11b+ Ly6c+, Ly6c-CD9-CD206+, Mac1, PVM, TRM, macrophages M2-like, macrophage(M2-like), hMac3; Ly6c- CD9+, mac3, LAM, P-LAM, macrophages Lpl<sup>h</sup>, macrophages Plin2<sup>h</sup>, IS2, mMac3, macrophage(M1-like), hMac2; CEM, matrix macrophages; IS3, IM.

**Tableau 2 : Rôle des sous-populations de macrophages dans le tissu adipeux et marqueurs membranaires.** LAM : Lipid-associated macrophages ; PVM :

perivascular macrophages ; NPVM : non-perivascular macrophages ; CEM : collagen-expressing macrophages ; P-LAM : proliferating lipid-associated macrophages ; RM : regulatory macrophages ; TRM : tissue resident macrophages ; CM : cycling macrophages ; IM : inflammatory macrophages. Modifié de Maniyadath B et al. *Adipose tissue at single-cell resolution. Cell Metab* (2023).

Des analyses de tissu adipeux murins et humains ont révélé que l'obésité conduit à l'émergence d'une population de macrophages associés aux lipides (LAM), identifiables par l'expression de *CD9* (cluster of differentiation 9) et *TREM2* (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) et de gènes liés au métabolisme des lipides tels que *LPL* (lipoprotein lipase) et *PLIN2* (perilipin 2). En parallèle, une autre sous-population caractérisée par une forte expression de gènes inflammatoires, les macrophages inflammatoires (IM), est aussi associée à l'obésité.

Diverses études sur le tissu adipeux désignent comme macrophages résidents les macrophages associés aux vaisseaux (VAM) et les macrophages périvasculaires (PVM), exprimant Lyve1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1) et des marqueurs de macrophages anti-inflammatoires tel que Cd206 (mannose receptor). Les VAM et PVM expriment des gènes pour le développement vasculaire et/ou le remodelage de la matrice. Les VAM sont divisés en fonction de l'expression de Tim4 (T Cell Immunoglobulin And Mucin Domain Containing 4), en VAM1 (Tim4-) et VAM2 (Tim4+). Les VAM, en particulier les VAM2, sont plutôt des macrophages embryonnaires auto-renouvelés exprimant des gènes anti-inflammatoires et relatifs à la sensibilité à l'insuline (27,32,47).

## Fonctions du tissu adipeux

Cette hétérogénéité cellulaire est à l'origine de la diversité fonctionnelle de ce tissu avec un rôle de barrière, de thermogénèse et énergétique, mais également une fonction endocrine.

### Rôle de barrière

Le tissu adipeux remplit plusieurs fonctions importantes, dont celle de barrière mécanique, fonction essentielle dans le corps humain en protégeant les organes internes et en isolant thermiquement le corps.

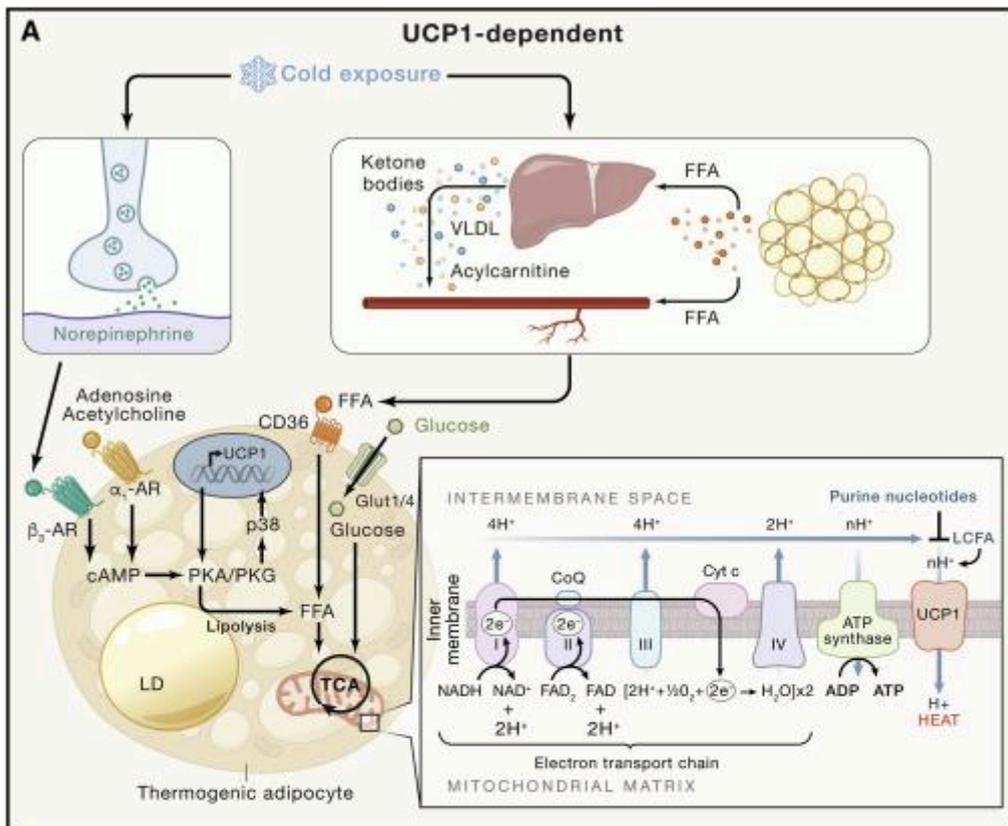
Ce tissu protège les organes internes en agissant comme un coussin protecteur pour les organes vitaux tels que le cœur, les reins et le foie. En enveloppant ces organes, il les isole et les protège contre les chocs et les traumatismes externes (28,48).

Le tissu adipeux contribue également à l'isolation thermique du corps en le protégeant contre les variations de température extérieure. Les couches de graisse sous-cutanée fournissent une isolation qui aide à maintenir la température corporelle interne dans des limites étroites entre 35,5°C et 37,5°C, ce qui est crucial pour le maintien de l'homéostasie (28,48).

## Thermogenèse adaptative sans frisson

Les adipocytes bruns jouent un rôle crucial dans la thermogenèse, un processus utilisant l'énergie stockée sous forme de triacylglycérols (TAG) pour produire de la chaleur. Riches en mitochondries, les adipocytes bruns se spécialisent dans la thermogenèse plutôt que la production d'ATP, de par l'expression élevée d'UCP-1 (Uncoupling Protein 1), une protéine localisée à la membrane interne mitochondriale (27,29,31,49).

La thermogenèse du tissu adipeux est déclenchée par des stimulus tels que l'exposition au froid, ce qui entraîne la libération de NE. Cela active la voie  $\beta$ -AR-cAMP-PKA, qui à son tour active UCP1 et la lipolyse dans les adipocytes. La lipolyse permet la génération de substrat pour la phosphorylation oxydative de par la mobilisation d'acides gras libres (AGL) et leur  $\beta$ -oxydation. Après activation, UCP1 dissipe le gradient de protons issu de la chaîne respiratoire dans la membrane mitochondriale interne libérant ainsi de l'énergie potentielle sous forme de chaleur (Fig. 11) (28,31,33,50).



**Figure 11 : Thermogenèse UCP1-dépendante.** Lorsque UCP1 est activée, elle découple le gradient de protons produit par la respiration mitochondriale de la synthèse de l'ATP, ce qui entraîne une dissipation de l'énergie sous forme de chaleur. Sakers A et al. *Adipose-tissue plasticity in health and disease. Cell* (2022).

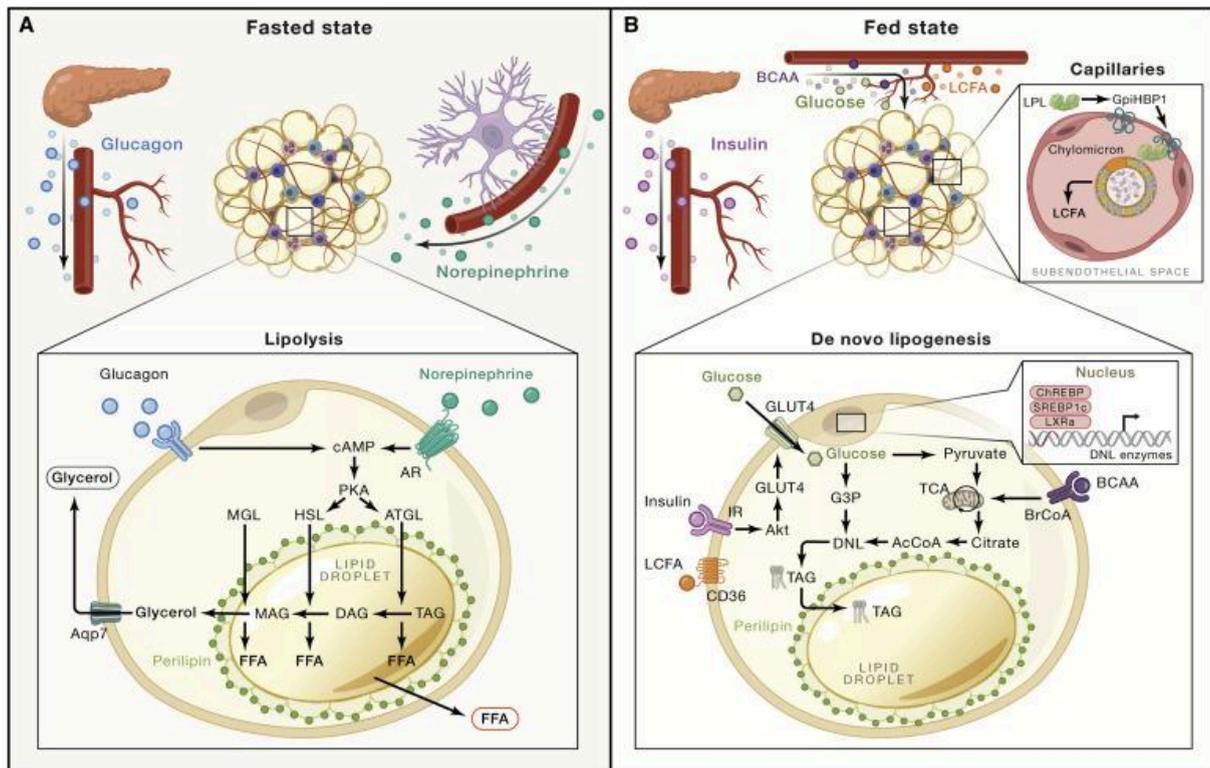
La thermogenèse dans les adipocytes bruns est essentielle pour le maintien de la température corporelle, en particulier chez les nouveau-nés et les mammifères marins ou hibernants. De plus, elle contribue à augmenter la dépense énergétique de l'organisme, ce qui peut avoir des effets bénéfiques sur le métabolisme. Enfin la thermogenèse est associée à une meilleure sensibilité à l'insuline (28,31,48–50).

## Homéostasie énergétique

Le tissu adipeux est un régulateur primordial de l'homéostasie énergétique de l'organisme en stockant et en libérant de l'énergie, rôle clé principalement médié par les adipocytes blancs (Fig. 12).

Pendant les périodes de prise alimentaire, les adipocytes blancs absorbent les AGL et transforment d'autres nutriments en lipides par lipogenèse de novo (DNL) pour les stocker sous forme de TAG dans leur cytoplasme. Les adipocytes absorbent les AGL *via* l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme localisée à la membrane apicale des capillaires adipocytaires, hydrolysant les TAG des chylomicrons circulants et des VLDL (Very Low Density Lipoprotein) en AGL et monoacylglycérol (MAG). La dernière étape de la synthèse des TAG réunit un acyl-CoA et le diacylglycérol (DAG) sous l'action des enzymes diacylglycérol acyltransférase 1 et 2 (DGAT1 et DGAT2). La DNL utilise notamment l'excès de glucose pour synthétiser des AGL qui seront estérifiés en TAG (28,33,48).

Pendant les périodes de jeûne ou d'exercice, les adipocytes libèrent des AGL et du glycérol par lipolyse en réponse à une stimulation externe telle que la NE ou le glucagon. Après libération par les fibres nerveuses sympathiques, la NE se lie aux  $\beta$ -AR entraînant l'activation de l'AMPc et de la protéine kinase A (PKA). La PKA stimule l'hydrolyse des TAG, du DAG, puis du MAG, par l'activation des lipases endogènes ATGL (*Adipose Triglyceride Lipase*), HSL (*Hormone Sensitive Lipase*) et MGL (*Monoacylglycerol Lipase*), libérant dans la circulation sanguine trois AGL et un glycérol par TAG (28,33,48).



**Figure 12 : Plasticité métabolique du tissu adipeux blanc.** (A) A jeun : les adipocytes libèrent des AGL et du glycérol par lipolyse en réponse à une stimulation externe. (B) Prise alimentaire : les adipocytes absorbent les nutriments de la circulation sanguine et les stockent sous forme de lipides soit par l'absorption d'acides gras soit par lipogenèse de novo. Sakers A et al. *Adipose-tissue plasticity in health and disease. Cell* (2022).

De plus, un tissu adipeux sain et fonctionnel contribue à protéger contre l'obésité métabolique. Un déséquilibre dans le stockage et la libération d'énergie par le tissu adipeux peut conduire à un excès de poids, une résistance à l'insuline et d'autres complications métaboliques associées à l'obésité (17,28).

## Organe endocrine

Le tissu adipeux agit également comme un organe endocrinien actif. Il sécrète une variété de substances bioactives notamment des peptides, communément appelées adipokines, agissant sur différentes fonctions de l'organisme comme l'appétit, le métabolisme du glucose et des lipides, la sensibilité à l'insuline ou l'inflammation. Une dysfonction du tissu adipeux ou des déséquilibres dans sa fonction endocrine peuvent contribuer au développement de nombreuses maladies (28,51).

Ces adipokines peuvent être sécrétées par un ou plusieurs types cellulaires présents dans le tissu adipeux (tableau 3), donnant des adipokines plutôt immunitaires telles que TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) et la résistine ou plutôt adipocytaires, telles que la leptine, l'adiponectine ou SFRP5 (Secreted frizzled-related protein 5) et d'autres d'expression ubiquitaire comme l'omentine ou MCP1 (*monocyte chemoattractant protein 1*).

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire principalement produite par les monocytes et les macrophages. Les taux de TNF $\alpha$  sont augmentés dans le tissu adipeux et le plasma des individus atteints d'obésité et sont positivement corrélés avec les marqueurs de la résistance à l'insuline. Le TNF $\alpha$  altère la sécrétion et la signalisation de l'insuline et contribue également à une altération de l'homéostasie du glucose chez l'Homme (51–53).

La résistine est une adipokine sécrétée principalement par les adipocytes blancs chez la Souris et les cellules inflammatoires chez l'Homme. Elle est impliquée dans

l'insulinorésistance chez la Souris, et la promotion de l'inflammation chez l'Homme. Chez la Souris, elle accélère la résistance à l'insuline ainsi que le développement de maladies métaboliques inflammatoires. De plus, sa concentration plasmatique est augmentée avec l'obésité chez la Souris et l'Homme (51,52,54,55).

La leptine, première adipokine découverte, est sécrétée principalement par les adipocytes. Elle régule le comportement alimentaire en agissant sur la satiété par l'intermédiaire du système nerveux central. Parmi les 6 isoformes identifiées du récepteur à la leptine (LepRs), l'isoforme LepRb est fortement exprimée dans l'hypothalamus et permet la signalisation intracellulaire de la leptine. Une concentration élevée de leptine indique que les réserves énergétiques de l'organisme sont pleines, se traduisant par un état de satiété de par l'effet anorexigène de la leptine, tandis qu'une concentration faible lève cet effet anorexigène, se traduisant par une envie accrue de nourriture. Les taux de leptine dans le sang sont positivement corrélés avec le tissu adipeux cependant, chez les sujets en situation d'obésité, les niveaux élevés de leptine sont sans réponse anorexigène révélant la survenue d'une résistance à la leptine due à la désensibilisation du LepRb. Cette adipokine a également une activité pro-inflammatoire sur les monocytes et macrophages, en augmentant la production de cytokines et de chimiokines ainsi qu'en favorisant les réponses migratoires (51–55).

L'adiponectine est une adipokine avec une propriété insulino-sensibilisante et un rôle important dans la régulation du métabolisme du glucose et des lipides. Elle exerce ses actions pléiotropes *via* ses deux principaux récepteurs, AdipoR1 et AdipoR2.

Les taux plasmatiques d'adiponectine sont diminués chez les sujets en situation d'obésité et chez les patients atteints de DT2 et les taux élevés d'adiponectine sont associés à un risque plus faible de DT2. En plus de ses fonctions métaboliques, l'adiponectine est une adipokine qui, contrairement à la plupart des adipokines, est anti-inflammatoire. Les taux plasmatiques d'adiponectine sont négativement corrélés aux taux de CRP et de cytokines inflammatoires chez les patients atteints d'obésité ou diabétiques. Sa production est réduite par des facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF $\alpha$  et l'IL-6. L'adiponectine stimule la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par les macrophages, oriente la polarisation des macrophages d'un phénotype plutôt pro-inflammatoire vers un phénotype plutôt anti-inflammatoire, atténuant ainsi l'inflammation (51–55).

SFRP5 a été identifiée en tant qu'adipokine en 2010 comme étant sécrétée par les adipocytes. Son expression est diminuée dans le VAT des individus atteints d'obésité présentant une inflammation du tissu adipeux et une résistance à l'insuline. Elle pourrait exercer des propriétés anti-inflammatoires *via* la voie de signalisation WNT. En effet, dans un modèle murin déficient en Sfrp5, le régime HFD induit une résistance à l'insuline plus grave ainsi qu'une inflammation du tissu adipeux avec l'accumulation de macrophages pro-inflammatoires plus importante par rapport aux souris sauvages, en raison d'une activité WNT5A non restreinte. De plus, l'administration d'un adénovirus Sfrp5 à des souris ob/ob a réduit l'inflammation du tissu adipeux et amélioré la sensibilité à l'insuline. Cependant, il n'y pas de consensus quant-au lien entre les taux plasmatiques circulants de SFRP5 et la résistance à l'insuline (52,55,56).

L'omentine, produite par les cellules endothéliales et d'autres cellules de la SVF, est également une adipokine anti-inflammatoire avec une propriété insulino-sensibilisante. Chez l'Homme, les taux plasmatiques d'omentine sont faibles en cas d'obésité, de trouble métabolique y compris la résistance à l'insuline ou de maladie cardiovasculaire athérosclérotique. La production d'omentine par le tissu adipeux est inhibée par l'insuline, ce qui explique la diminution des taux d'omentine circulants dans les cas de résistance à l'insuline hyperinsulinémique (54,55).

MCP1 (ou CCL2) est une chimiokine sécrétée notamment par les adipocytes qui favorise le recrutement de macrophages et l'inflammation dans le tissu adipeux. Son expression est augmentée dans le tissu adipeux de sujets en situation d'obésité (51,52).

Adipokine	Primary source(s)	Binding partner or receptor	Function
Leptin	Adipocytes	Leptin receptor	Appetite control through the central nervous system
Resistin	Peripheral blood mononuclear cells (human), adipocytes (rodent)	Unknown	Promotes insulin resistance and inflammation through IL-6 and TNF secretion from macrophages
RBP4	Liver, adipocytes, macrophages	Retinol (vitamin A), transthyretin	Implicated in systemic insulin resistance
Lipocalin 2	Adipocytes, macrophages	Unknown	Promotes insulin resistance and inflammation through TNF secretion from adipocytes
ANGPTL2	Adipocytes, other cells	Unknown	Local and vascular inflammation
TNF	Stromal vascular fraction cells, adipocytes	TNF receptor	Inflammation, antagonism of insulin signalling
IL-6	Adipocytes, stromal vascular fraction cells, liver, muscle	IL-6 receptor	Changes with source and target tissue
IL-18	Stromal vascular fraction cells	IL-18 receptor, IL-18 binding protein	Broad-spectrum inflammation
CCL2	Adipocytes, stromal vascular fraction cells	CCR2	Monocyte recruitment
CXCL5	Stromal vascular fraction cells (macrophages)	CXCR2	Antagonism of insulin signalling through the JAK-STAT pathway
NAMPT	Adipocytes, macrophages, other cells	Unknown	Monocyte chemotactic activity
Adiponectin	Adipocytes	Adiponectin receptors 1 and 2, T-cadherin, calreticulin-CD91	Insulin sensitizer, anti-inflammatory
SFRP5	Adipocytes	WNT5a	Suppression of pro-inflammatory WNT signalling

ANGPTL2, angiopoietin-like protein 2; CCL2, CC-chemokine ligand 2; CXCL5, CXC-chemokine ligand 5; IL, interleukin; JAK, Janus kinase; NAMPT, nicotinamide phosphoribosyltransferase; RBP4, retinol-binding protein 4; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; STAT, signal transducer and activator of transcription; TNF, tumour necrosis factor.

**Tableau 3 : Sources et fonctions de quelques adipokines.** Ouchi N et al. *Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat Rev Immunol. 2011.*

## Tissu adipeux et inflammation dans un contexte d'obésité

L'inflammation dans le tissu adipeux est un processus complexe impliquant une interaction entre les adipocytes, les CEs et les cellules immunitaires *via* la signalisation par les adipokines.

La plasticité du tissu adipeux permet son expansion *via* une augmentation de la taille des adipocytes existants, phénomène appelé hypertrophie, et/ou par une augmentation du nombre total d'adipocytes, phénomène appelé hyperplasie. Cependant, l'obésité induit des altérations dans l'expansion et le remodelage du tissu adipeux. Progressivement, l'excès de nutriments entraîne une expansion pathologique du tissu adipeux avec une altération du métabolisme lipidique comme une lipolyse basale augmentée dans les adipocytes hypertrophiques, une adipogénèse altérée ainsi qu'une hypoxie locale du tissu adipeux en raison d'une déficience de vascularisation (33,36,49,57).

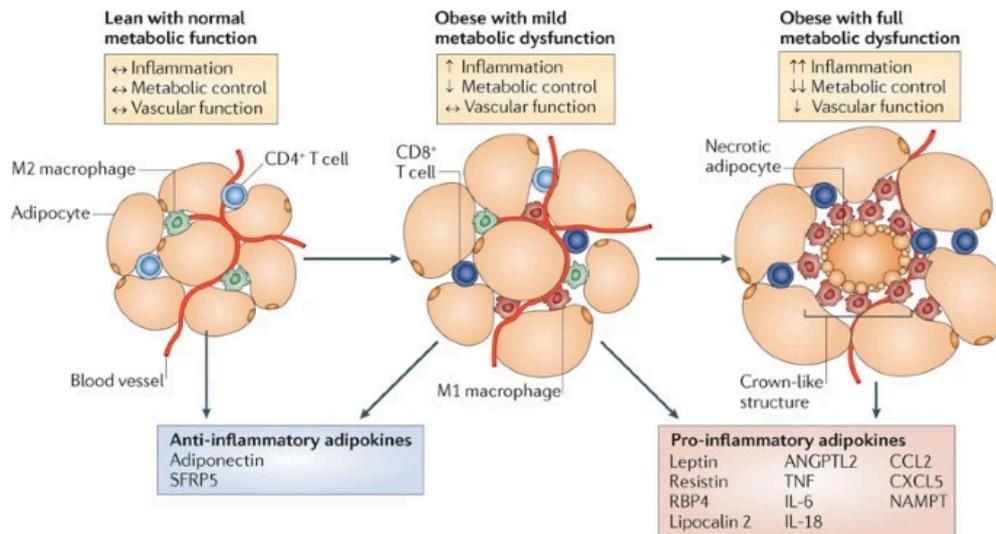
L'obésité entraîne également un recrutement de cellules immunitaires non résidentes, notamment de macrophages, *via* une sécrétion de signaux chimiotactiques dans le tissu adipeux. De plus, les macrophages résidents et ceux issus des monocytes circulants seront polarisés dans le tissu adipeux, passant d'un phénotype plutôt anti-inflammatoire à un phénotype plutôt pro-inflammatoire. La proportion de VAM et PVM diminue avec l'obésité pouvant expliquer l'hypoxie locale du tissu adipeux. Cette diminution pourrait être due à une conversion accrue des PVM en IM ou à la forte augmentation des populations de LAM et d'IM. Les macrophages phagocytent les adipocytes apoptotiques et les agrégats de lipides,

formant ainsi des structures en couronnes autour des adipocytes en apoptose, une caractéristique histologique de l'inflammation dans le tissu adipeux (46,47,53,58,59) (Fig. 13).

Les CEs participent à la réponse inflammatoire associée à l'obésité en réponse à des signaux inflammatoires. Elles expriment des molécules d'adhésion cellulaire et des récepteurs pour les cytokines, facilitant ainsi le recrutement et la migration des cellules immunitaires vers les sites d'inflammation (46,60).

De par ces adipocytes hypertrophiés ainsi que le recrutement et la polarisation des macrophages, le profil sécrétoire du tissu adipeux est modifié. Certaines adipokines pro-inflammatoires comme la leptine, la résistine ou TNF- $\alpha$  voient leurs sécrétions augmenter alors que d'autres, des adipokines anti-inflammatoires, comme l'adiponectine ou l'omentine, ont un taux plasmatique diminué. Ces modifications dans le tissu adipeux entraînent une dysfonction de celui-ci ainsi qu'une inflammation chronique perturbant la signalisation afférente ce qui a pour conséquence les désordres métaboliques associés à l'obésité comme l'insulinorésistance, le DT2 et les maladies cardiovasculaires (43,45,46,52–54,61).

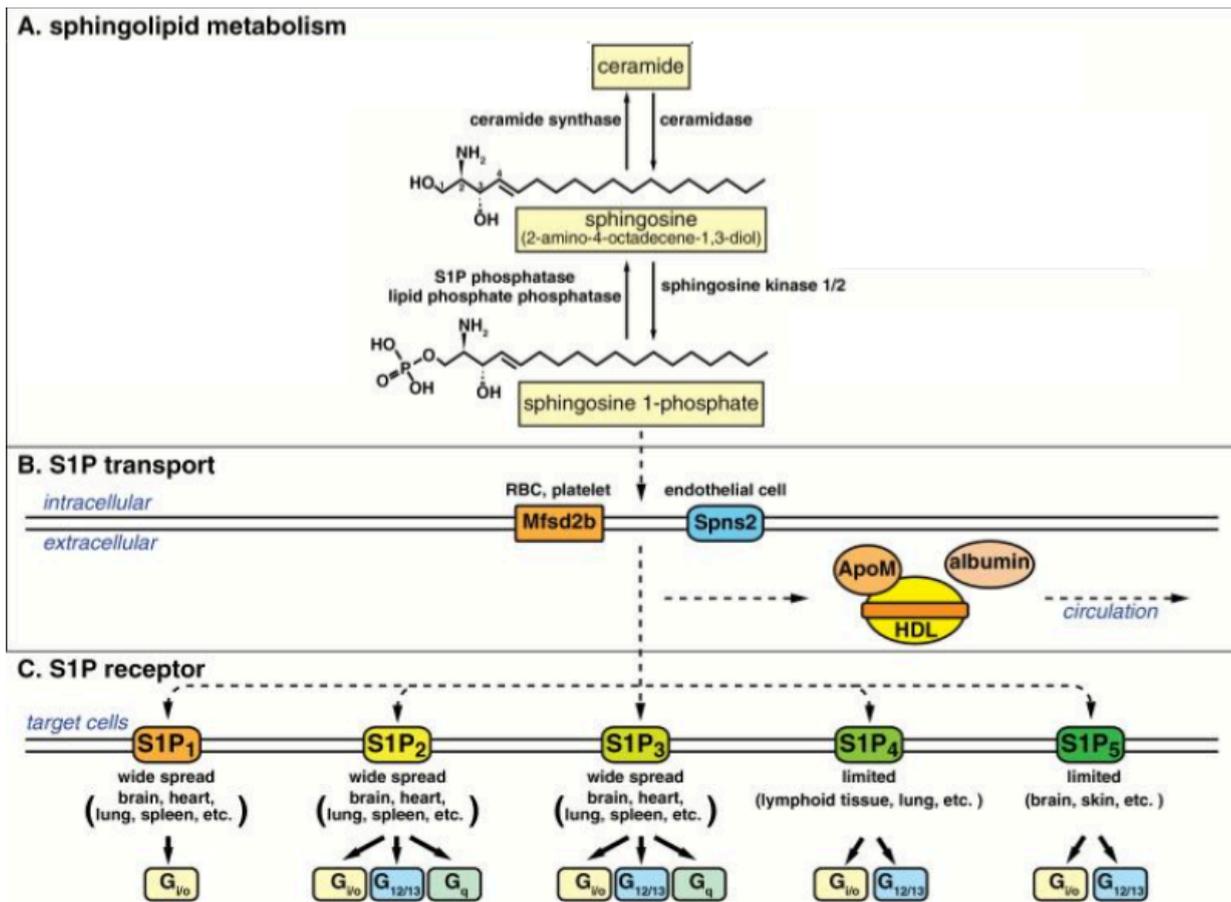
L'inflammation associée à l'obésité est un état inflammatoire dit de bas grade, caractérisé par une sécrétion chronique de médiateurs inflammatoires dans des taux supérieurs à une situation normale mais inférieurs à une inflammation aiguë. Cette inflammation permanente est locale dans un premier temps puis devient systémique (46,62).



**Figure 13 :** Représentation de tissu adipeux d'individus normo-pondérés ou atteints d'obésité et sécrétions endocrines. Les adipocytes sont représentés en beige, les macrophages anti-inflammatoires (M2) en bleu, les macrophages pro-inflammatoires (M1) en rouge et les vaisseaux en trait rouge. Le tissu adipeux des individus normo-pondérés ont des macrophages M2 et des cytokines anti-inflammatoires alors que celui des individus en situation d'obésité présentant un désordre métabolique ont des macrophages M1, des cytokines pro-inflammatoires et des adipocytes hypertrophiés. *Ouchi, N., Parker, J., Lugus, J. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat Rev Immunol 11, 85–97 (2011).*

Lorsque le tissu adipeux atteint sa capacité maximale de stockage lipidique, les taux augmentés d'AGL dans la circulation sanguine sont absorbées par d'autres tissus, tels que le foie et les muscles, aboutissant à la formation de dépôts adipeux ectopiques, perturbant ainsi le métabolisme cellulaire et engendrant un phénomène de lipotoxicité. Plusieurs voies métaboliques permettent de produire des céramides dont la voie de synthèse de *novo* à partir d'AG, voie principalement activée dans l'obésité. Un taux intracellulaire élevé de céramides est accompagné de complications métaboliques comme la résistance à l'insuline (63–67).

Les céramides sont les précurseurs de synthèse de la sphingosine 1-phosphate (S1P) *via* l'action de céramidases et de sphingosine kinases (SphK) (Fig. 14A). La S1P est un lipide bioactif impliqué dans la régulation de divers processus cellulaires y compris le métabolisme et l'inflammation. Les différents effets de la S1P seront médiés par ces cinq récepteurs couplés aux protéines G, appelés S1P1-5. Comme l'illustre la figure 14C, les S1P1-3 sont largement répandus et leurs niveaux d'expression sont particulièrement élevés dans le cœur et le système immunitaire. Les S1P4 et S1P5 présentent une expression limitée dans les systèmes lymphatique et nerveux, respectivement, avec des niveaux d'expression plus faibles par rapport aux niveaux d'expression des S1P1-3. La S1P entraîne de multiples effets sur différents processus cellulaires et cela est sûrement dû à la diversité et spécificité de ses récepteurs et des protéines G. En effet, S1P1 se couple exclusivement avec la sous-unité Gi/o, tandis que S1P4 et S1P5 se couplent à Gi/o et G12/13 et que S1P2 et S1P3 se couplent avec Gi/o, Gq et G12/13. Dans la circulation sanguine, environ  $\frac{2}{3}$  de la S1P sont transportés par l'apolipoprotéine M (ApoM) et  $\frac{1}{3}$  par l'albumine (63–69) (Fig.14B).



**Figure 14 : Vue d'ensemble de la signalisation S1P- Récepteur.** (A) Le céramide est dégradé par la céramidase en sphingosine, suivie d'une phosphorylation par la sphingosine kinase 1/2 pour produire du S1P. (B) La S1P produit par voie intracellulaire est transporté par des transporteurs spécifiques tels que Mfsd2b (érythrocytes et plaquettes) et Spns2 (cellules endothéliales) et transporté par ApoM, la protéine chaperonne spécifique de la S1P associée aux HDL ou l'albumine. (C) S1P active les récepteurs à la S1P, S1P1-5, qui transmettent divers signaux intracellulaires en fonction des sous-unités G couplées de la protéine G hétérotrimérique et du profil d'expression de chaque récepteur dans un type de cellule donné. Modifié de *Obina H et Hla T. Sphingosine 1-phosphate and inflammation. Int Immunol. (2019).*

# Apolipoprotéine M

## Généralités

L'ApoM est une apolipoprotéine retrouvée en majorité dans les HDL (High Density Lipoproteins), elle est également présente dans les LDL (Low Density Lipoprotein), les VLDL et les chylomicrons (69–72).

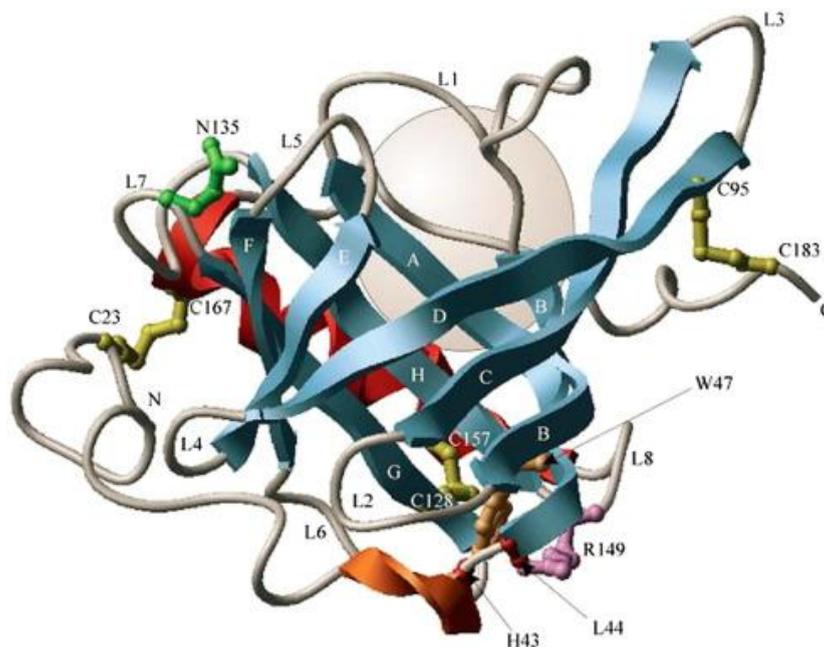
L'ApoM humaine est une glycoprotéine composée de 188 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 26 kDa. Le gène humain de l'ApoM, *APOM*, présente plus de 80% de similitude avec le gène murin. *APOM*, dont la séquence comprend 6 exons et 5 introns, est situé sur le chromosome 6p21.3 dans la région du complexe majeur d'histocompatibilité de classe III (CMH-III) (70,71).

La protéine est principalement synthétisée par le foie, bien que des niveaux plus faibles de synthèse aient été observés dans les reins et le cerveau. L'analyse de l'expression génique et des sécrétions protéiques de cellules du tissu adipeux ainsi que l'analyse transcriptomique de tissu adipeux d'individus avec des IMC différents ont permis d'identifier l'ApoM comme une adipokine qui est positivement corrélée à la sensibilité à l'insuline et négativement corrélée au poids et au pourcentage de masse grasse (69,73).

L'ApoM est régulée à différents niveaux par des récepteurs nucléaires, des adipokines et des cytokines inflammatoires. La transcription d'*APOM* est contrôlée par divers facteurs de transcription comme les LXR (récepteurs des oxystérols ou

liver X receptors), des récepteurs nucléaires régulant le métabolisme des lipides et du cholestérol ainsi que la réponse inflammatoire, ainsi que HNF-1 $\alpha$  et -4 $\alpha$  (facteur nucléaire hépatocytaire), des récepteurs nucléaires impliqués dans les métabolismes lipidique et glucidique. De plus, des études ont montré que l'expression d'*APOM* peut être modulée par des cytokines inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL1 et IL-6 (71,74,75).

L'ApoM est un membre de la famille des lipocalines de par sa structure secondaire caractéristique. En effet, l'ApoM humaine est composée de huit feuillets  $\beta$  antiparallèles (Fig. 15), un agencement leur donnant une cavité pour lier de petits ligands hydrophobes tels que l'acide rétinolique et la S1P. De façon intéressante, l'ApoM murine n'est composée que de sept feuillets  $\beta$  antiparallèles (71–73,76,77).



**Figure 15 : Structure tridimensionnelle de l'apolipoprotéine M.** Les huit feuillets  $\beta$  antiparallèles caractéristiques des lipocalines sont représentés par les lettres A à H. La sphère représente la cavité permettant de lier les petits ligands hydrophobes. J. Duan et al. *Proposed lipocalin fold for apolipoprotein M based on bioinformatics and site-directed mutagenesis. FEBS Lett* (2001).

En 2007, Ahnström J. et *al.* ont testé la capacité de l'ApoM à lier différentes substances hydrophobes dans *Escherichia coli* et des cellules HEK 293. Elle s'est avérée capable de lier le rétinol et l'acide rétinoïque, alors que la vitamine K, le cholestérol et l'acide arachidonique ne s'associaient pas à l'ApoM (78). En 2011, Elsøe S. et *al.* ont obtenu des résultats montrant que l'ApoM est également capable de lier des phospholipides oxydés (79). Les ligands de l'ApoM sont peu nombreux et peu étudiés jusqu'à aujourd'hui hormis la S1P, le ligand principal de l'ApoM.

## Fonctions

L'ApoM intervient dans différents processus biologiques comme le métabolisme du cholestérol avec la formation des lipoprotéines ou bien la perméabilité vasculaire.

Concernant son rôle dans le métabolisme du cholestérol, l'ApoM stimule la formation de pré $\beta$ -HDL. En effet, des modèles murins déficients en ApoM présentent une réduction de l'efflux de cholestérol avec une altération de la formation des pré $\beta$ -HDL et une accumulation de cholestérol dans de larges HDL (80–82). De plus, la surexpression du gène murin *Apom* augmente les taux plasmatiques de cholestérol, tandis que les souris déficientes en *Apom* montrent une réduction de ces taux (80). De part cette action sur l'efflux de cholestérol, l'ApoM est proposée comme anti-athérosclérotique comme le montre une étude où la surexpression d'*Apom* chez des souris déficientes pour le récepteur des LDL protège contre l'athérosclérose sous régime enrichi en cholestérol (83). Également, l'ApoM favorise l'effet anti-oxydant des HDL en liant des phospholipides oxydés, mécanisme pouvant expliquer en partie l'effet anti-athérogénique de l'ApoM (79). Chez l'Homme le lien entre l'ApoM et cholestérol existe aussi avec par exemple une forte corrélation entre les niveaux d'ApoM et de cholestérol (84).

L'ApoM joue également un rôle dans la perméabilité vasculaire *via* la S1P et son récepteur S1P1 au niveau des cellules endothéliales, contribuant ainsi au maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale vasculaire (85,86). Des études révèlent que le complexe HDL-S1P est indispensable pour préserver l'homéostasie de cette barrière et pourrait même protéger contre la perte de fonction endothéliale (87). La

S1P et le S1P1 agissent au niveau des jonctions serrées entre les cellules endothéliales, assurant ainsi l'intégrité de la barrière endothéliale (88). L'absence d'ApoM dans des modèles murins entraîne une augmentation de la perméabilité endothéliale, comme observé notamment dans les poumons de souris déficientes en ApoM par rapport aux souris sauvages (88). Cette augmentation de perméabilité est corrigée après l'administration de plasma enrichi en ApoM/S1P ou l'activation de la signalisation S1P/S1P1 (88). De plus, les souris déficientes en ApoM présentent une perméabilité accrue de la barrière hémato-encéphalique aux petites molécules ainsi qu'une augmentation du transport transcellulaire, des phénomènes qui sont atténués par la stimulation de la voie de signalisation S1P1 (89).

## ApoM et inflammation

Au niveau génétique, le gène humain de l'ApoM est situé dans la région du CMH-III, comprenant des gènes codant pour des protéines inflammatoires dont les lymphotoxines  $\alpha$  et  $\beta$  et des membres de la famille du TNF (55,56). De plus, la transcription d'*APOM* est régulée par divers acteurs de l'inflammation (71,74,75).

Dans une étude visant à explorer le lien entre le niveau plasmatique d'ApoM et les facteurs inflammatoires, les patients atteints d'obésité présentaient des niveaux d'ApoM plasmatique significativement plus faibles que les personnes ayant un poids corporel normal. Le niveau plasmatique d'ApoM présentait une corrélation négative avec les niveaux de CRP, TNF- $\alpha$  et IL-6 circulants (90).

Les patients atteints de septicémie et du syndrome de réponse inflammatoire systémique ont un faible taux d'ApoM plasmatique et le degré de diminution de l'ApoM plasmatique est associé à la sévérité de ces maladies. La diminution de la S1P puis de l'ApoM pourrait contribuer à la diminution de la fonction de barrière endothéliale et donc à la perméabilité vasculaire accrue au cours du sepsis. Également, dans un modèle murin de sepsis induit par le lipopolysaccharide, les niveaux des marqueurs de la NETose, un processus cellulaire immunitaire qui touche les cellules polynucléaires neutrophiles, étaient élevés chez les souris déficientes en *Apom* et atténués chez les souris surexprimant *Apom*. De plus, l'axe ApoM/S1P protège contre la NETose par l'atténuation de l'activation de la PKC par S1P1 et S1P4 (91–93).

Chez l'Homme, des études établissent un lien entre des polymorphismes du gène *APOM* et la polyarthrite rhumatoïde (PR). En effet, plusieurs variants du gène *APOM*, tels que C-1065A et T-778C, sont associés à un risque accru de PR. De plus, les patients atteints de PR présentent une fréquence plus élevée du variant G-1065T et des taux plasmatiques d'ApoM plus élevés que les témoins. L'implication de l'ApoM et de la S1P dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde reste encore à étudier (94–98).

Le rôle de l'ApoM dans l'athérosclérose, un processus inflammatoire chronique, a été investigué de plusieurs manières. Dans un modèle inflammatoire d'athérosclérose induit par des LDL oxydés, le complexe ApoM-S1P inhibe l'inflammation induite par les LDL oxydés dans les HUVEC *via* la phosphorylation de PI3K/Akt médiée par S1PR2. Dans un autre modèle utilisant le TNF- $\alpha$  pour induire une inflammation dans les HUVECs, le complexe ApoM-S1P pourrait atténuer les lésions et la réponse inflammatoire induites par le TNF- $\alpha$  en se liant à S1PR2 pour activer la voie PI3K/AKT (99,100).

Plusieurs auteurs se sont également intéressés au lien entre des maladies auto-immunes et les concentrations plasmatiques d'ApoM. Par exemple, dans le lupus érythémateux disséminé (LED), les patients atteints de LED ont des taux d'ApoM plus faibles par rapport aux témoins et les taux d'ApoM sont négativement corrélés avec les taux de CRP (101). Dans un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune (EAE) ressemblant à la sclérose en plaques, les souris EAE

déficientes en *Apom* développent des pathologies du SNC plus graves que les animaux sauvages et les souris surexprimant *Apom* présentent une manifestation plus légère (102). Enfin, dans un modèle murin de néphropathie à IgA, modèle de la maladie de Berger, la surexpression de l'*Apom* réduit le degré de l'atteinte par l'intermédiaire du S1P1 et du S1P3, et l'absence d'ApoM semble accélérer encore la maladie (103).

Toutes ces études montrent un intérêt pour l'ApoM dans différentes formes d'inflammation mais l'étude du rôle de cette apolipoprotéine dans l'inflammation de bas grade associée à l'obésité n'a pas encore été faite.

## CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Compte tenu de ces données, en s'appuyant sur le fait que i) ApoM est la protéine chaperonne de la S1P et du rétinol (68) tous deux impliqués dans les processus inflammatoires (104,105), ii) *APOM* est moins exprimé dans le tissu adipeux d'individus atteints d'obésité, un état associé à une inflammation de bas grade (73), iii) le niveau d'ApoM plasmatique présente une forte corrélation négative avec la CRP (90) et iv) *APOM* est localisé dans le locus du CMH-III à proximité de gènes codant des protéines de l'inflammation (71). De plus, la restriction calorique chez les personnes en situation d'obésité induit une augmentation de l'*APOM* adipocytaire (73). De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que l'ApoM pourrait avoir un rôle dans l'inflammation du tissu adipeux associée à l'obésité.

Des résultats préliminaires de l'équipe utilisant des adénovirus ont montré qu'une surexpression du gène humain *APOM* dans le tissu adipeux chez la Souris semble prévenir le développement de l'inflammation du tissu adipeux suite à un régime gras. Dans le but de valider l'hypothèse d'un rôle préventif de l'ApoM dans l'inflammation du tissu adipeux, un modèle murin déficient en *Apom* a été utilisé. De plus, un modèle murin de surexpression locale du gène humain *APOM* a été réalisé *in vivo* par transduction d'AAV ; les adénovirus ayant été remplacés car ils entraînaient une réponse inflammatoire (106).

# MATERIELS ET METHODES

## AAV

Les AAV codant pour *APOM* ou *mCherry* ont servi pour la surexpression locale d'*APOM* chez les souris et ont été conçus et produits par la plateforme de vectorologie du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (Inserm UMR 1037). L'AAV *mCherry* codant pour la protéine fluorescente mCherry a été utilisé comme contrôle. Pour les expériences *in vivo*, les AAV-*mCherry* ont été utilisés au titre de  $8 \cdot 10^{12}$  vg/mL et les AAV-*APOM* ont été utilisés au titre de  $2 \cdot 10^{12}$  vg/mL afin d'obtenir le même niveau d'expression entre les deux gènes transduits. Chaque souris a reçu  $5 \cdot 10^{10}$  Vg/dépôt et ce quel que soit l'AAV.

## Animaux

Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par un comité local d'éthique en expérimentation animale (n°CEEA-122) puis par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, conformément à la directive européenne 2010/63/UE. Les animaux ont été hébergés dans un service de zootechnie (Inserm UMS 006 CREFRE, Toulouse). Deux modèles de souris ont été utilisés dans le cadre de cette étude : un modèle de déficience en *Apom* (KO) et un modèle de surexpression locale du gène humain *APOM*.

Le modèle de souris déficientes en *Apom* a été fourni par le Dr Christina Christoffersen de l'Université de Copenhague au Danemark. Ces animaux KO ont été croisés avec des souris C57BL6-J sauvages (WT) pour obtenir une lignée de reproducteurs hétérozygotes. Des couples reproducteurs hétérozygotes ont été

croisés afin d'obtenir des souris d'intérêt KO et des souris contrôles WT de même fratrie. Vingt-neuf souris mâles et femelles (15 WT et 14 KO venant de même fratrie) ont été nourries avec un régime enrichi en lipides (60%, Ssniff n°EF D12492) pendant 3 mois pour déclencher une inflammation dans le tissu adipeux. Les souris ont été pesées une fois par semaine pendant ces 3 mois de régime et leur composition corporelle a été mesurée par un analyseur RMN (Minispec, Bruker) tous les mois jusqu'à la nécropsie.

Quarante souris mâles C57BL/6J WT âgées de 8 semaines (Janvier) ont été localement transduites sous anesthésie avec les AAV (Adeno Associated Virus) codant pour *APOM* ou *mCherry*, le gène témoin servant de contrôle, dans le tissu adipeux péri-gonadique (PGAT). Après chirurgie, les souris ont été nourries avec un régime enrichi en lipides (60%, Ssniff n°EF D12492) pendant 1 mois pour déclencher une inflammation dans le tissu adipeux.

Après nécropsie, les tissus adipeux péri-gonadique, sous-cutané inguinal (SCAT) et brun interscapulaire (BAT) ont été prélevés et congelés immédiatement à l'azote liquide puis stockés à -80°C avant analyses d'expression génique.

#### Extraction d'ARN et RT-qPCR

Les tissus (20 mg de foie et 200 mg de TA) ont été homogénéisés au Precellys Evolution (Bertin Technologies) dans du QIAzol (Qiagen). Après ajout de chloroforme puis d'une centrifugation (4°C, 15 min, 10000 g), les acides nucléiques présents dans la phase aqueuse ont été récupérés et mélangés à de l'éthanol 100% (vol 1/1.5). Les ARN ont ensuite été purifiés à l'aide du kit RNeasy Mini (Qiagen)

puis dosés avec le Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). L'intégrité des ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% et les ARN dont l'intégrité n'a pas été démontrée sur le gel d'agarose n'ont pas été utilisés.

Pour la synthèse d'ADNc, 1 µg d'ARN a été utilisé pour faire une transcription inverse de 20 µL à l'aide du kit High capacity cDNA Reverse Transcriptase (Biosystems) dans un thermocycleur (Applied Biosystems).

La qPCR a été réalisée en utilisant la chimie SybrGreen et la chimie TaqMan ainsi qu'à l'aide de l'automate QuantStudio 5 (Life Technologies). Les échantillons ont été analysés en duplicats dans un format de plaque à 384 puits. L'expression du gène humain *APOM* et des gènes murins *Apom*, *Tnfa*, *Il1b*, *IL6*, *Mcp1*, *Saa3*, *Cd68*, *Cd11c* et *Adipoq* ont été mesurées.

La *Tbp* (TATA-binding protein) et *Hprt* (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase) ont été utilisés comme gène de référence.

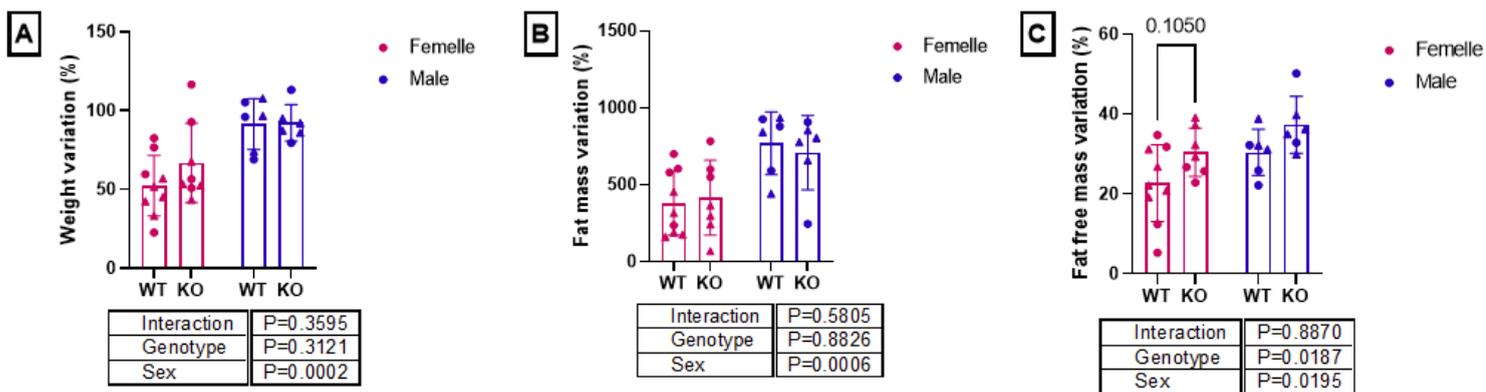
### Statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism 9.3 pour Windows. Le test de Mann-Whitney a été réalisé pour la comparaison de moyenne de deux séries d'échantillons. Une ANOVA à deux facteurs avec ajustement de Sidak a été appliquée pour déterminer l'influence de deux conditions sur un groupe et évaluer leur interaction. Toutes les valeurs dans les figures sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type. Les p-values sont indiquées comme suit : \* p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001.

# RÉSULTATS

## Effet d'une déficience en *Apom* chez la souris

Dans le but d'étudier le rôle de l'ApoM dans l'inflammation de bas grade associée à l'obésité, des souris KO ont été nourries pendant 3 mois avec un régime enrichi en graisse. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'impact de cette déficience sur la composition corporelle de nos souris puis sur la signature inflammatoire induite par le régime enrichi en lipides.

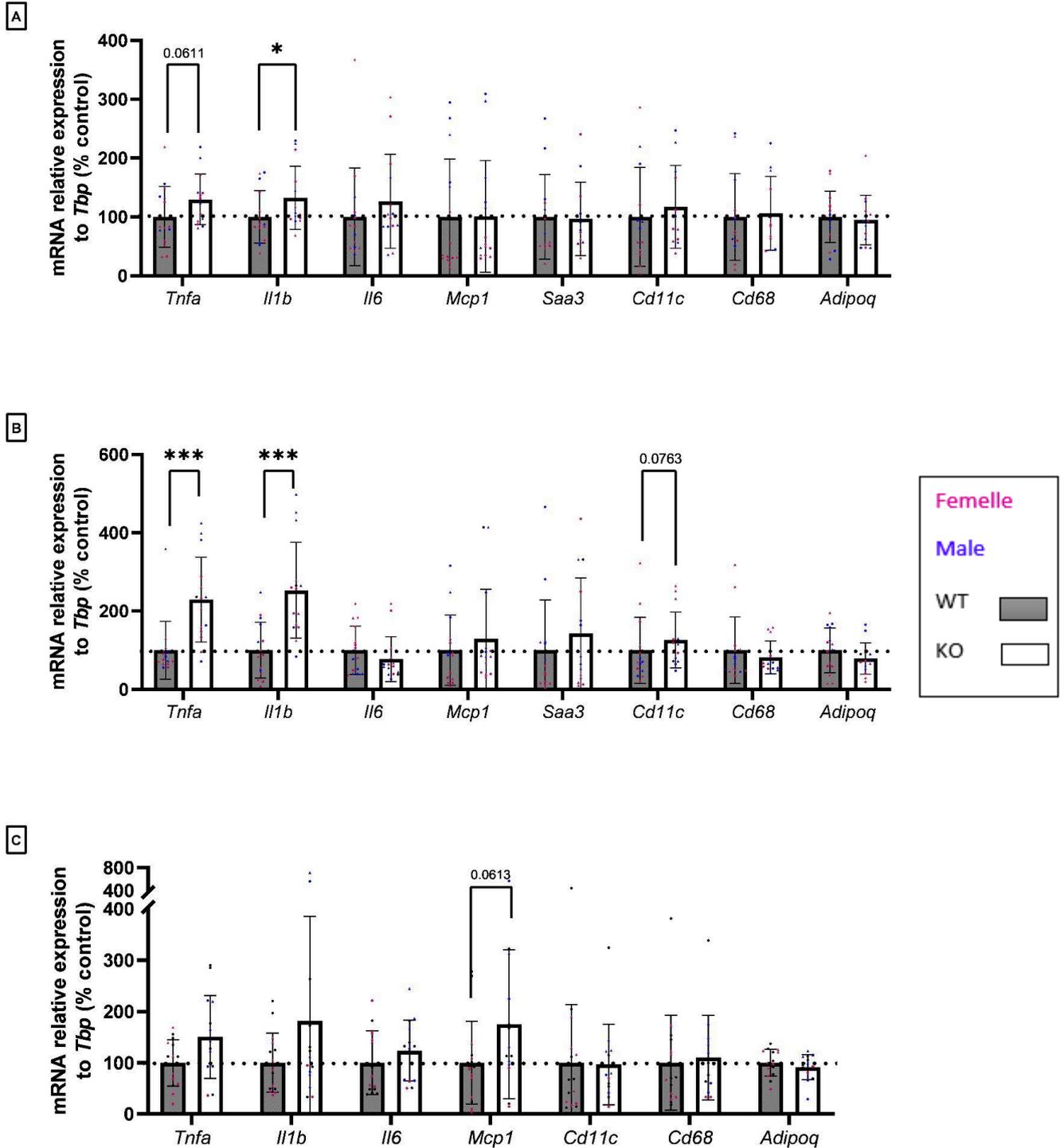


**Figure 16 : Effet d'une déficience en *Apom* sur l'évolution de la composition corporelle au cours d'un régime enrichi en lipides.** (A) Variation du poids des souris WT (n=15) et des souris KO (n = 14) après 3 mois de HFD 60%. (B) Variation de la masse grasse des souris WT (n=15) et des souris KO (n = 14) après 3 mois de HFD 60%. (C) Variation de la masse non grasse des souris WT (n=15) et des souris KO (n = 14) après 3 mois de HFD 60%. La normalisation des données de composition corporelle obtenues par Minispec a été faite par la formule (Après régime - avant régime / Avant régime) x 100. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type. Des ANOVAs à deux facteurs avec ajustement de Sidak ont été effectuées. HFD : régime enrichi en lipides ; KO : déficiente en *Apom* ; WT : sauvage.

Les souris mâles et femelles présentent une prise de poids, de masse grasse et de masse non grasse après 3 mois de régime enrichi en lipides, et ce indépendamment

du génotype. Les variations de composition corporelle sont différentes entre les mâles et les femelles mais la déficience en *Apom* n'entraîne pas de différence entre les souris WT et les souris KO. La variation de la masse non grasse chez les souris femelles KO tend à être plus importante que chez les souris femelles WT (Figure 16).

La signature inflammatoire des dépôts adipeux a ensuite été étudiée en mesurant le niveau d'expression de marqueurs pro-inflammatoire (*Tnfa*, *Il-1 $\beta$* , *Il-6*, *Saa3*, *Cd11c*, *Mcp-1*, *Cd68*) et de marqueurs anti-inflammatoires (*Adipoq*).



**Figure 17** : Effet d'une déficience en *Apom* sur l'expression des gènes de l'inflammation dans les dépôts adipeux après un régime enrichi en lipides. Expression génique de *Tnfa*, *Il-1 $\beta$* , *Il-6*, *Mcp-1*, *Saa3*, *Cd11c*, *Cd68* et *Adipoq* des souris WT (n= 15) et des souris KO (n=14) après 3 mois de HFD 60% (A) dans le PGAT, (B) dans le SCAT et (C) dans le BAT. L'expression de *Tbp* a été utilisée pour la normalisation. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type. La ligne en pointillée représente le 100% du contrôle (WT). Les résultats ont été analysés par des tests de Mann-Whitney entre les KO et les WT. \*P<0,05, \*\*\*P<0,001. *Adipoq* : Adiponectine ; BAT : Tissu

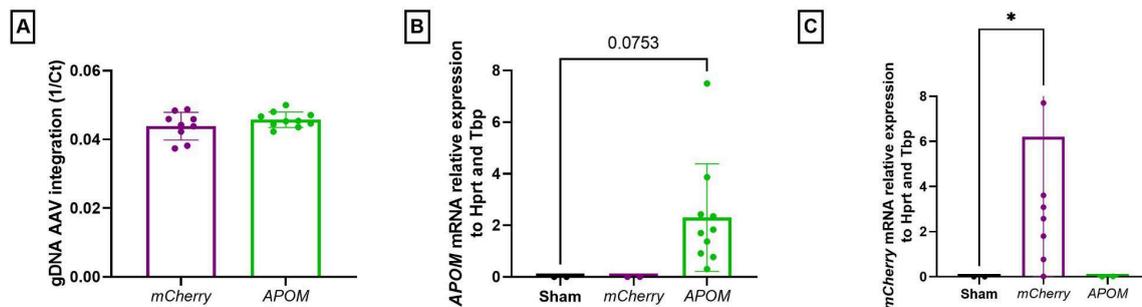
adipeux brun ; *Cd11c* : Cluster de différenciation 11c ; *Cd68* : Cluster de différenciation 68 ; *Il-1 $\beta$*  : Interleukin 1 B ; *Il-6* : Interleukin 6 ; KO : déficiente en *Apom* ; *Mcp-1* : Monocyte chemoattractant protein 1 ; PGAT : Tissu adipeux péri-gonadique ; *Saa3* : Serum amyloid A3 ; SCAT : Tissu adipeux sous-cutané ; *Tbp* : TATA-binding protein ; *Tnfa* : Tumor necrosis factor  $\alpha$  ; WT : sauvage.

Dans les dépôts blancs, la déficience en *Apom* entraîne une augmentation de l'expression d'*Il-1 $\beta$*  (Figure 17A et 17B). Dans le SCAT, la déficience en *Apom* entraîne une augmentation de l'expression de *Tnfa* (Figure 17B). Une tendance à l'augmentation de l'expression de *Tnfa* (p-value = 0,0611) est observée dans le PGAT (Figure 17A), ainsi que celle de *Cd11c* (p-value = 0,0763) dans le SCAT (Figure 17B). Les niveaux d'expression de *Il-6*, *Mcp-1*, *Saa3*, *Cd68* et *Adipoq* ne sont pas différents entre les WT et les KO dans les PGAT et le SCAT (Figure 17A et 17B). L'expression de *Cd11c* ne diffère pas entre les WT et les KO dans le PGAT (Figure 17A).

Dans le BAT, les niveaux d'expression de *Tnfa*, *Il-1 $\beta$* , *Il-6*, *Mcp-1*, *Cd11c*, *Cd68* et *Adipoq* ne sont pas différents entre les WT et les KO. La déficience en *Apom* ne semble pas modifier la signature inflammatoire dans ce tissu hormis une augmentation non significative de l'expression de *Mcp-1* (p-value = 0,0613) (Figure 17C).

Effet d'une surexpression locale du gène humain *APOM* chez la souris

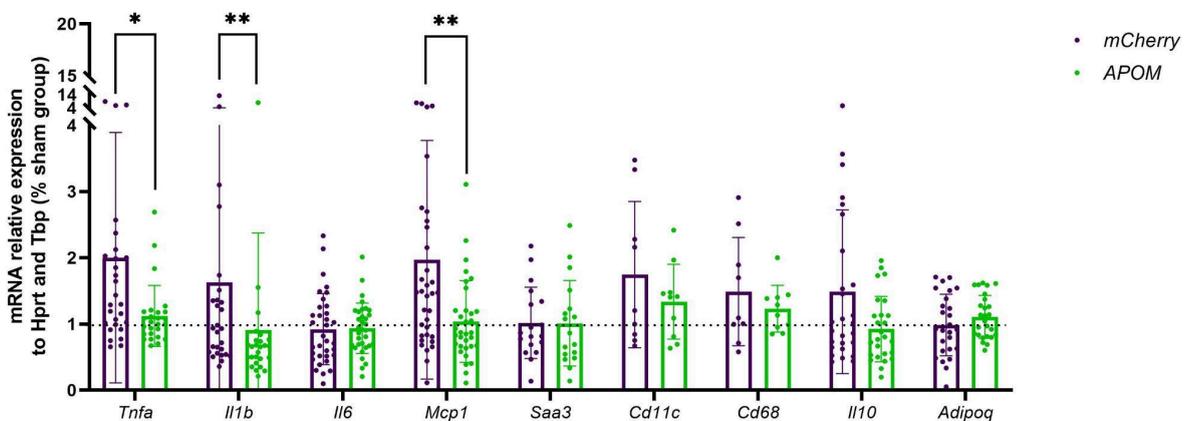
Afin de tester si la surexpression du gène humain *APOM* dans le tissu adipeux pouvait limiter le développement de l'inflammation associée à l'obésité, le PGAT de souris WT mâles a été transduit avec des AAV portant le gène *APOM* ou *mCherry* ou injecté avec du sérum physiologique. Les souris ont été nourries pendant 1 mois avec un régime enrichi en lipides afin d'induire une inflammation du tissu adipeux. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'intégration des gènes codés par les AAV et leur expression locale dans le PGAT puis à la signature inflammatoire induite par le régime enrichi en lipides et l'opération.



**Figure 18** : Intégration du génome des AAV-*APOM* et AAV-*mCherry* et expression locale de *APOM* dans le tissu adipeux péri-gonadique après transduction. (A) Mesure par qPCR de la quantité d'ADN viral présent dans le PGAT de souris mâles ayant été transduites avec des AAV portant le gène *mCherry* (n=10) ou le gène *APOM* (n=10) après 1 mois de HFD 60%. Les quantités d'ADN détectées sont exprimées en (1/Ct). Les résultats ont été analysés par un test de Mann-Whitney. (B) Niveaux d'ARNm de *APOM* dans le PGAT de souris mâles ayant été transduites avec des d'AAV *APOM* (n=10) ou *mCherry* (n=2) ou non transduites (Sham) (n=2) après 1 mois de HFD 60%. (C) Niveaux d'ARNm de *mCherry* dans le PGAT de souris mâles ayant été transduites avec des d'AAV *mCherry* (n=10) ou *APOM* (n=2) ou non transduites (Sham) (n=2) après 1 mois de HFD 60%. La moyenne de l'expression de *Hprt* et *Tbp* a été utilisée pour la normalisation. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type. Les résultats ont été analysés par des tests de Kruskal-Wallis. AAV : Adeno associated virus ; Ct : cycle threshold ; *Hprt* : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase ; *Tbp* : TATA-binding protein.

Les AAV sont présents dans le génome des souris ayant été transduites avec un même taux d'intégration (Figure 18A). Comme attendu, les souris transduites avec l'AAV-*mCherry* ou l'AAV-*APOM* expriment le gène transduit (Figures 18B et 18C).

La signature inflammatoire a ensuite été étudiée en mesurant le niveau d'expression de marqueurs pro-inflammatoires (*Tnfa*, *Il-1 $\beta$* , *Il-6*, *Saa3*, *Cd11c*, *Mcp-1*, *Cd68*) et de marqueurs anti-inflammatoires (*Adipoq*, *Il10*).



**Figure 19** : Effet d'une surexpression locale d'*APOM* dans le tissu adipeux péri-gonadique sur l'expression des gènes de l'inflammation. Expression génique de *Tnfa*, *Il-1 $\beta$* , *Il-6*, *Mcp-1*, *Cd11c*, *Cd68*, *Il10* et *Adipoq* dans le PGAT des souris transduites avec des AAV portant le gène *mCherry* (violet) (n=10-37) ou le gène *APOM* (vert) (n=10-37) après 1 mois de HFD 60%. L'expression de *Hprt* et *Tbp* a été utilisée pour la normalisation. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type. Le 1 représente le 100% du groupe contrôle (sham). Les résultats ont été analysés par des tests de Mann-Whitney. \*P<0,05, \*\*P<0,01. *Adipoq* : Adiponectine ; *Cd11c* : Cluster de différenciation 11c ; *Cd68* : Cluster de différenciation 68 ; *Hprt* : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase ; *Il-1 $\beta$*  : Interleukin 1 B ; *Il-6* : Interleukin 6 ; *Il-10* : Interleukin 10 ; *Mcp-1* : Monocyte chemoattractant protein 1 ; PGAT : Tissu adipeux péri-gonadique ; *Saa3* : Serum amyloid A3 ; *Tbp* : TATA-binding protein ; *Tnfa* : Tumor necrosis factor  $\alpha$ .

Dans le PGAT, la surexpression en *APOM* entraîne une expression plus faible de *Tnfa*, d'*Il-1 $\beta$*  et de *Mcp-1* après un mois de régime enrichi en lipides comparativement aux souris transduites avec l'AAV portant le gène *mCherry*. Les

niveaux d'expression de *Il-6*, *Saa3*, *Cd11c*, *Cd68* et *Adipoq* ne sont pas différents entre les souris transduites avec l'AAV-APOM et celles transduites avec l'AAV-*mCherry* (Figure 19). Dans l'ensemble, les souris transduites avec l'AAV-*mCherry* ont une signature inflammatoire plus importante que les souris contrôles alors que les souris transduites avec l'AAV-APOM ont une signature inflammatoire similaire aux contrôles.

## DISCUSSION

Chez l'Homme, l'expression dans le tissu adipeux de l'*APOM*, récemment identifiée comme une adipokine, est positivement corrélée à celle d'*ADIPOQ*, codant l'adiponectine, une adipokine anti-inflammatoire (52,107). Leurs expressions sont faibles dans le tissu adipeux d'individus obèses, qui présentent une inflammation locale et systémique. L'ApoM est une protéine chaperonne de ligands hydrophobes (68) impliqués dans les processus inflammatoires (104,105) et son gène est localisé à proximité de gènes codant des protéines de l'inflammation (71), suggérant une implication de l'ApoM dans l'inflammation. Cependant, le rôle de l'ApoM dans l'inflammation du tissu adipeux n'avait jusqu'ici jamais été investigué. L'objectif de ces travaux était donc d'étudier l'implication de l'ApoM dans l'inflammation de bas grade du tissu adipeux liée à l'obésité.

Nous avons dans un premier temps étudié les conséquences d'une déficience en *Apom* chez la Souris. Pour cela, une cohorte de souris WT et KO a été mise pendant 3 mois sous un régime enrichi en lipides afin d'obtenir des souris obèses et une inflammation du tissu adipeux. La déficience en *Apom* n'induit pas de différence de phénotype entre les souris WT et les souris KO. Dans cette cohorte, les mâles ont pris plus de poids, de masse grasse et de masse non grasse que les femelles. Il est intéressant de souligner la divergence de ce modèle murin, où les mâles présentent un pourcentage de masse grasse plus important que les femelles (108–110), contrairement aux observations chez l'Homme où les femmes tendent à avoir davantage de masse grasse (111). Concernant la variation de masse non grasse chez les souris femelles ; les animaux KO ont tendance à avoir une augmentation de

la masse non grasse plus importante que les animaux WT. Cette tendance n'a cependant pas été retrouvée dans différentes cohortes postérieures à cette étude. Ces observations sont cohérentes avec les travaux de Kurano (104), qui n'a pas noté de différence de prise de poids sous régime gras entre les souris WT et KO. Cependant, elles diffèrent des résultats de l'équipe de Christoffersen, qui a rapporté une prise de poids et de masse grasse moins importantes chez les souris déficientes en *Apom* sous régime gras par rapport aux souris WT (112). Également, aucune différence n'a pu être mise en avant concernant la taille des adipocytes des souris KO comparativement aux souris WT (résultats non présentés). Sachant que les AG saturés déclenchent une réponse inflammatoire médiée par TLR4 (*Toll-like receptor 4*) (113,114), il serait pertinent de s'intéresser à la composition lipidique des adipocytes des souris KO et WT. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de la déficience en *Apom* sur la signature inflammatoire des dépôts adipeux. Nous avons observé, en particulier dans les tissus adipeux blancs comme le PGAT et le SCAT, que la déficience en *Apom* semble augmenter l'expression de certains marqueurs de l'inflammation. Parmi eux, nous retrouvons une tendance à l'augmentation de *Cd11c*, un marqueur des macrophages pro-inflammatoires (115) et une augmentation de *Mcp1*, une chimiokine participant au recrutement des macrophages (52) ainsi que *Tnfa* et *Il-1β*, tous deux sécrétés par les macrophages et les cellules présentatrices d'antigène (116). En conclusion, la déficience en *Apom* semble favoriser l'inflammation et suggère un rôle de l'ApoM adipocytaire dans l'inflammation du tissu adipeux.

Afin d'étudier le développement d'une inflammation de bas grade dans le tissu adipeux, dans un contexte où le niveau d'expression d'*APOM* est maintenu, nous

avons utilisé un modèle de souris surexprimant le gène humain *APOM* dans le PGAT. Ces souris ont ensuite été mises pendant 1 mois sous un régime enrichi en lipides afin d'induire une inflammation dans le tissu adipeux. La surexpression en *APOM* dans le tissu adipeux chez la Souris, s'accompagne d'une expression plus faible de marqueurs de l'inflammation dont *Tnfa*, *Il-1 $\beta$*  et *Mcp1*. Ces observations semblent indiquer un rôle de l'ApoM dans la prévention du développement de l'inflammation du tissu adipeux associée à l'obésité. La corrélation entre la quantité protéique d'ApoM synthétisée par le tissu adipeux et les niveaux d'expression des cytokines de l'inflammation n'a pas été réalisée. Le dosage de la protéine hApoM pourra être fait par spectrométrie de masse dans les tissus.

L'expression de *Mcp1* dans le tissu adipeux est plus élevée chez les souris déficientes en *Apom* et plus faible chez les souris surexprimant *APOM*. MCP1 étant une chimiokine (52), ces résultats pourraient suggérer un rôle bénéfique de l'ApoM contre l'infiltration en macrophages décrite dans la littérature lors de l'inflammation du tissu adipeux (117). Afin d'explorer les effets de l'ApoM adipocytaire sur les macrophages du tissu adipeux, des coupes de tissu adipeux avec des marqueurs spécifiques des macrophages tels que F4/80, un marqueur d'invasion macrophagique ; CD11c, un marqueur des macrophages M1 ; ou CD206, un marqueur des macrophages M2, pourront être réalisées. De plus, nous pourrions également prévoir de faire un western-blot avec des anticorps primaires ciblant les marqueurs énoncés plus haut ainsi qu'une analyse des populations immunitaires du tissu adipeux par FACS pour une quantification plus précise.

L'utilisation de modèles murins permet d'étudier la régulation *in vivo* de l'expression des gènes et le résultat du phénotype. Cependant, ces modèles représentent certaines limites pour la transposition à l'Homme. Dans un premier temps, les Souris ont une majorité de HDL, et non de LDL comme chez l'Homme (69). Or, l'ApoM est retrouvée en grande majorité dans les HDL, ce qui pourrait influencer les résultats observés. Dans un second temps, s'il existe environ 80% de similitude protéique entre l'ApoM murine et l'ApoM humaine, il reste toutefois 20% de séquences en acides aminés différentes (86), ce qui n'exclut pas l'éventualité d'un rôle différent entre ces deux protéines. Il serait donc intéressant de coupler ses expériences *in vivo* avec des expériences *in vitro* sur des cellules humaines. Ces expériences permettraient d'étudier le rôle de l'ApoM produite par des adipocytes humains, sur des macrophages humains avant polarisation vers un phénotype pro-inflammatoire, par l'utilisation de milieux conditionnés.

Il est primordial d'identifier l'implication de la S1P dans nos effets. A ce jour, 5 récepteurs de la S1P ont été identifiés (S1P1-5). Les récepteurs S1P1-3 sont largement répandus, avec des niveaux d'expression plus élevés dans les systèmes cardiovasculaire et immunitaire (68). L'équipe de Christoffersen, s'intéressant à l'ApoM dans le cadre de l'axe S1P/ApoM, a montré que la déficience en *Apom* dans un modèle murin s'accompagnait d'une diminution du signal sur les récepteurs S1P1 et S1P3 (112). De plus, l'équipe de Kurano a montré que les souris KO avaient moins de S1P plasmatique que les animaux contrôles (104). Nous pourrions mesurer l'effet de la déficience en *Apom* ou de sa surexpression sur l'activité de la Sphingosine-kinase, enzyme responsable de la synthèse de S1P dans le tissu adipeux (63,118). De façon plus intéressante, nous pourrions également envisager

d'utiliser FTY720, un antagoniste de S1P1-3 (112) ou GLPG2938, un antagoniste de S1P2 (119) sur les macrophages humains exposés à de l'ApoM adipocytaire, afin d'identifier les effets du complexe ApoM/S1P sur la polarisation inflammatoire des macrophages.

L'expression d'*ADIPOQ* et d'*APOM* est similaire dans le tissu adipeux ; elle est faible chez des individus en situation d'obésité ou présentant un syndrome métabolique et augmente après un régime faible en calories (52,73,107). Chez l'Homme, il existe une forte corrélation entre l'expression d'*ADIPOQ* et d'*APOM* (107). De plus, la déficience en *Adipoq* montre des résultats similaires à la déficience en *Apom*, c'est-à-dire une inflammation plus prononcée des tissus du côlon (120). L'adiponectine augmente l'expression d'*APOM* dans les adipocytes *in vitro* (107). Dans nos modèles murins, la déficience en *Apom* ou sa surexpression ne semblent pas influencer l'expression de *Adipoq*. L'ApoM pourrait donc être régulée par l'adiponectine et participer à ses effets anti-inflammatoires.

## CONCLUSION

En conclusion, cette étude met en évidence un lien entre l'ApoM et l'inflammation dans le tissu adipeux. Nous montrons un rôle de l'ApoM dans la prévention de l'inflammation induite par un régime hyperlipidique dans un modèle murin. Ces premiers résultats prometteurs ont été reproduits lors de plusieurs expériences afin de valider ou invalider les tendances statistiques (Frances et *al.*, in review). Des expériences complémentaires seront également nécessaires pour déterminer l'implication réelle de l'ApoM dans la prévention de l'inflammation en utilisant des antagonistes ciblant les récepteurs de la S1P présents sur les macrophages.

# BIBLIOGRAPHIE

1. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism*. 1 mars 2019;92:6-10.
2. Obésité et surpoids [Internet]. [cité 10 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
3. Ross R, Neeland IJ, Yamashita S, Shai I, Seidell J, Magni P, et al. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. *Nat Rev Endocrinol*. mars 2020;16(3):177-89.
4. Bray GA. Beyond BMI. *Nutrients*. janv 2023;15(10):2254.
5. Endalifer ML, Diress G. Epidemiology, Predisposing Factors, Biomarkers, and Prevention Mechanism of Obesity: A Systematic Review. *J Obes*. 31 mai 2020;2020:e6134362.
6. Obésité et surpoids [Internet]. [cité 30 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
7. Overweight and obesity - BMI statistics [Internet]. [cité 1 mars 2024]. Disponible sur: [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Overweight\\_and\\_obesity\\_-\\_BMI\\_statistics](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Overweight_and_obesity_-_BMI_statistics)
8. Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité pour la Ligue contre l'Obésité. 2020.
9. Okunogbe A, Nugent R, Spencer G, Powis J, Ralston J, Wilding J. Economic impacts of overweight and obesity: current and future estimates for 161 countries. *BMJ Glob Health*. 1 sept 2022;7(9):e009773.
10. Lette M, Bemelmans WJE, Breda J, Slobbe LCJ, Dias J, Boshuizen HC. Health care costs attributable to overweight calculated in a standardized way for three European countries. *Eur J Health Econ*. 2016;17(1):61-9.
11. Effertz T, Engel S, Verheyen F, Linder R. The costs and consequences of obesity in Germany: a new approach from a prevalence and life-cycle perspective. *Eur J Health Econ*. 1 déc 2016;17(9):1141-58.
12. d'Errico M, Pavlova M, Spandonaro F. The economic burden of obesity in Italy: a cost-of-illness study. *Eur J Health Econ*. 1 mars 2022;23(2):177-92.
13. Pi-Sunyer FX. The Obesity Epidemic: Pathophysiology and Consequences of Obesity. *Obes Res*. 2002;10(S12):97S-104S.
14. Meldrum DR, Morris MA, Gambone JC. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions—but do we have the will? *Fertil Steril*. 1 avr 2017;107(4):833-9.
15. Rohde K, Keller M, la Cour Poulsen L, Blüher M, Kovacs P, Böttcher Y. Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism*. 1 mars 2019;92:37-50.
16. Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Mamun AA, Bonneux L. Obesity in Adulthood and Its Consequences for Life Expectancy: A Life-Table Analysis. *Ann Intern Med*. 7 janv 2003;138(1):24-32.
17. Lingvay I, Sumithran P, Cohen RV, le Roux CW. Obesity management as a primary treatment goal for type 2 diabetes: time to reframe the conversation. *The Lancet*. 22 janv 2022;399(10322):394-405.
18. Lainez NM, Coss D. Obesity, Neuroinflammation, and Reproductive Function.

- Endocrinology. 1 nov 2019;160(11):2719-36.
19. Fulton S, Décarie-Spain L, Fioramonti X, Guiard B, Nakajima S. The menace of obesity to depression and anxiety prevalence. *Trends Endocrinol Metab.* 1 janv 2022;33(1):18-35.
  20. Pestel J, Blangero F, Eljaafari A. Pathogenic Role of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Obesity and Obesity-Related Inflammatory Diseases. *Cells.* janv 2023;12(3):348.
  21. Setty AR, Curhan G, Choi HK. Obesity, Waist Circumference, Weight Change, and the Risk of Psoriasis in Women: Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med.* 13 août 2007;167(15):1670-5.
  22. Rowan CR, McManus J, Boland K, O'Toole A. Visceral adiposity and inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis.* 1 nov 2021;36(11):2305-19.
  23. Vilalta A, Gutiérrez JA, Chaves S, Hernández M, Urbina S, Hompesch M. Adipose tissue measurement in clinical research for obesity, type 2 diabetes and NAFLD/NASH. *Endocrinol Diabetes Metab.* n/a(n/a):e00335.
  24. Palmer BF, Clegg DJ. The sexual dimorphism of obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 15 févr 2015;402:113-9.
  25. Kang SM, Yoon JW, Ahn HY, Kim SY, Lee KH, Shin H, et al. Android Fat Depot Is More Closely Associated with Metabolic Syndrome than Abdominal Visceral Fat in Elderly People. *PLOS ONE.* 11 nov 2011;6(11):e27694.
  26. Fu X, Song A, Zhou Y, Ma X, Jiao J, Yang M, et al. Association of regional body fat with metabolic risks in Chinese women. *Public Health Nutr.* oct 2014;17(10):2316-24.
  27. Corvera S. Cellular Heterogeneity in Adipose Tissues. *Annu Rev Physiol.* 10 févr 2021;83:257-78.
  28. Cypess AM. Reassessing Human Adipose Tissue. *N Engl J Med.* 24 févr 2022;386(8):768-79.
  29. Yang Loureiro Z, Solivan-Rivera J, Corvera S. Adipocyte Heterogeneity Underlying Adipose Tissue Functions. *Endocrinology.* 1 janv 2022;163(1):bqab138.
  30. Wang T, Sharma AK, Wolfrum C. Novel insights into adipose tissue heterogeneity. *Rev Endocr Metab Disord.* 1 févr 2022;23(1):5-12.
  31. Cheng L, Wang J, Dai H, Duan Y, An Y, Shi L, et al. Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. *Adipocyte.* 2021;10(1):48-65.
  32. Maniyadath B, Zhang Q, Gupta RK, Mandrup S. Adipose tissue at single-cell resolution. *Cell Metab.* 7 mars 2023;35(3):386-413.
  33. Sakers A, De Siqueira MK, Seale P, Villanueva CJ. Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell.* 3 févr 2022;185(3):419-46.
  34. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* nov 2009;297(5):E977-86.
  35. Ambele MA, Dhanraj P, Giles R, Pepper MS. Adipogenesis: A Complex Interplay of Multiple Molecular Determinants and Pathways. *Int J Mol Sci.* janv 2020;21(12):4283.
  36. Hammarstedt A, Gogg S, Hedjazifar S, Nerstedt A, Smith U. Impaired Adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity. *Physiol Rev.* oct 2018;98(4):1911-41.
  37. Festa J, AlZaim I, Kalucka J. Adipose tissue endothelial cells: insights into their heterogeneity and functional diversity. *Curr Opin Genet Dev.* 1 août

- 2023;81:102055.
38. Escobedo N, Oliver G. The Lymphatic Vasculature: Its Role in Adipose Metabolism and Obesity. *Cell Metab.* 3 oct 2017;26(4):598-609.
  39. Redondo P de AG, Gubert F, Zaverucha-do-Valle C, Dutra TPP, Ayres-Silva J de P, Fernandes N, et al. Lymphatic vessels in human adipose tissue. *Cell Tissue Res.* 1 mars 2020;379(3):511-20.
  40. Antoniak K, Hansdorfer-Korzon R, Mrugacz M, Zorena K. Adipose Tissue and Biological Factors. Possible Link between Lymphatic System Dysfunction and Obesity. *Metabolites.* sept 2021;11(9):617.
  41. Westcott GP, Rosen ED. Crosstalk Between Adipose and Lymphatics in Health and Disease. *Endocrinology.* 1 janv 2022;163(1):bqab224.
  42. Chi J, Wu Z, Choi CHJ, Nguyen L, Tegegne S, Ackerman SE, et al. Three-Dimensional Adipose Tissue Imaging Reveals Regional Variation in Beige Fat Biogenesis and PRDM16-Dependent Sympathetic Neurite Density. *Cell Metab.* 9 janv 2018;27(1):226-236.e3.
  43. Guilherme A, Henriques F, Bedard AH, Czech MP. Molecular pathways linking adipose innervation to insulin sensitivity in obesity and type 2 diabetes. *Nat Rev Endocrinol.* avr 2019;15(4):207-25.
  44. Bartness TJ, Liu Y, Shrestha YB, Ryu V. Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. *Front Neuroendocrinol.* 1 oct 2014;35(4):473-93.
  45. Wang Y, Leung VH, Zhang Y, Nudell VS, Loud M, Servin-Vences MR, et al. The role of somatosensory innervation of adipose tissues. *Nature.* sept 2022;609(7927):569-74.
  46. Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol-Cell Physiol.* mars 2021;320(3):C375-91.
  47. Nawaz A, Fujisaka S, Kado T, Jeelani I, Tobe K. Heterogeneity of adipose tissue-resident macrophages-beyond M1/M2 paradigm. *Diabetol Int.* 3 avr 2023;14(2):125-33.
  48. Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus MV. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab.* 9 janv 2018;27(1):68-83.
  49. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol.* 13 avr 2016;7:30.
  50. Ikeda K, Yamada T. UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes. *Front Endocrinol.* 2020;11:498.
  51. Kershaw EE, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 juin 2004;89(6):2548-56.
  52. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* févr 2011;11(2):85-97.
  53. Fasshauer M, Blüher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1 juill 2015;36(7):461-70.
  54. Scheja L, Heeren J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat Rev Endocrinol.* sept 2019;15(9):507-24.
  55. Ren Y, Zhao H, Yin C, Lan X, Wu L, Du X, et al. Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation. *Front Endocrinol.* 2022;13:873699.
  56. Wang D, Zhang Y, Shen C. Research update on the association between SFRP5, an anti-inflammatory adipokine, with obesity, type 2 diabetes mellitus

- and coronary heart disease. *J Cell Mol Med.* 2020;24(5):2730-5.
57. White U. Adipose tissue expansion in obesity, health, and disease. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11:1188844.
  58. Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol.* 1 juill 2011;32(7):307-14.
  59. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2 janv 2007;117(1):175-84.
  60. Para I, Albu A, Porojan MD. Adipokines and Arterial Stiffness in Obesity. *Medicina (Mex).* juill 2021;57(7):653.
  61. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci.* janv 2019;20(9):2358.
  62. Khanna D, Khanna S, Khanna P, Kahar P, Patel BM. Obesity: A Chronic Low-Grade Inflammation and Its Markers. *Cureus.* 14(2):e22711.
  63. Fang Z, Pyne S, Pyne NJ. Ceramide and sphingosine 1-phosphate in adipose dysfunction. *Prog Lipid Res.* 1 avr 2019;74:145-59.
  64. Juchnicka I, Kuźmicki M, Szamatowicz J. Ceramides and Sphingosino-1-Phosphate in Obesity. *Front Endocrinol.* 2021;12:635995.
  65. Green CD, Maceyka M, Cowart LA, Spiegel S. Sphingolipids in metabolic disease: The good, the bad, and the unknown. *Cell Metab.* 6 juill 2021;33(7):1293-306.
  66. Ali-Berrada S, Guitton J, Tan-Chen S, Gyulkhandanyan A, Hajduch E, Le Stunff H. Circulating Sphingolipids and Glucose Homeostasis: An Update. *Int J Mol Sci.* janv 2023;24(16):12720.
  67. Kajita K, Ishii I, Mori I, Asano M, Fuwa M, Morita H. Sphingosine 1-Phosphate Regulates Obesity and Glucose Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 11 janv 2024;25(2):932.
  68. Obinata H, Hla T. Sphingosine 1-phosphate and inflammation. *Int Immunol.* 23 août 2019;31(9):617-25.
  69. Tavernier G, Caspar-Bauguil S, Viguerie N. Apolipoprotein M: new connections with diet, adipose tissue and metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol.* févr 2020;31(1):8-14.
  70. Xu N, Dahlbäck B. A novel human apolipoprotein (apoM). *J Biol Chem.* 29 oct 1999;274(44):31286-90.
  71. Ren K, Tang ZL, Jiang Y, Tan YM, Yi GH. Apolipoprotein M. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 15 juin 2015;446:21-9.
  72. Christoffersen C. Apolipoprotein M-A Marker or an Active Player in Type II Diabetes? *Front Endocrinol.* 2021;12:665393.
  73. Sramkova V, Berend S, Siklova M, Caspar-Bauguil S, Carayol J, Bonnel S, et al. Apolipoprotein M: a novel adipokine decreasing with obesity and upregulated by calorie restriction. *Am J Clin Nutr.* 1 juin 2019;109(6):1499-510.
  74. Huang LZ, Gao JL, Pu C, Zhang PH, Wang LZ, Feng G, et al. Apolipoprotein M: Research progress, regulation and metabolic functions (Review). *Mol Med Rep.* 1 août 2015;12(2):1617-24.
  75. Cheng G, Zheng L. Regulation of the apolipoprotein M signaling pathway: a review. *J Recept Signal Transduct.* 4 mai 2022;42(3):285-92.
  76. FLOWER DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J.* 15 août 1996;318(1):1-14.

77. Sevana M, Kassler K, Ahnström J, Weiler S, Dahlbäck B, Sticht H, et al. Mouse ApoM Displays an Unprecedented Seven-Stranded Lipocalin Fold: Folding Decoy or Alternative Native Fold? *J Mol Biol.* 3 déc 2010;404(3):363-71.
78. Ahnström J, Faber K, Axler O, Dahlbäck B. Hydrophobic ligand binding properties of the human lipocalin apolipoprotein M. *J Lipid Res.* 1 août 2007;48(8):1754-62.
79. Elsøe S, Ahnström J, Christoffersen C, Hoofnagle AN, Plomgaard P, Heinecke JW, et al. Apolipoprotein M binds oxidized phospholipids and increases the antioxidant effect of HDL. *Atherosclerosis.* 1 mars 2012;221(1):91-7.
80. Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M. Apolipoprotein M is required for pre $\beta$ -HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. *Nat Med.* avr 2005;11(4):418-22.
81. Plomgaard P, Dullaart RPF, De Vries R, Groen AK, Dahlbäck B, Nielsen LB. Apolipoprotein M predicts pre- $\beta$ -HDL formation: studies in type 2 diabetic and nondiabetic subjects. *J Intern Med.* 2009;266(3):258-67.
82. Mulya A, Seo J, Brown AL, Gebre AK, Boudyguina E, Shelness GS, et al. Apolipoprotein M expression increases the size of nascent pre $\beta$  HDL formed by ATP binding cassette transporter A1. *J Lipid Res.* 1 mars 2010;51(3):514-24.
83. Christoffersen C, Jauhiainen M, Moser M, Porse B, Ehnholm C, Boesl M, et al. Effect of Apolipoprotein M on High Density Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor Knock-out Mice\*. *J Biol Chem.* 25 janv 2008;283(4):1839-47.
84. Axler O, Ahnström J, Dahlbäck B. An ELISA for apolipoprotein M reveals a strong correlation to total cholesterol in human plasma. *J Lipid Res.* 1 août 2007;48(8):1772-80.
85. Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, Galvani S, Ahnström J, Sevana M, et al. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 juin 2011;108(23):9613-8.
86. Christoffersen C, Nielsen LB. Apolipoprotein M: bridging HDL and endothelial function. *Curr Opin Lipidol.* août 2013;24(4):295.
87. Wang X, Wang F. Vascular protection by high-density lipoprotein-associated sphingosine-1-phosphate. *J Geriatr Cardiol JGC.* nov 2017;14(11):696-702.
88. Christensen PM, Liu CH, Swendeman SL, Obinata H, Qvortrup K, Nielsen LB, et al. Impaired endothelial barrier function in apolipoprotein M-deficient mice is dependent on sphingosine-1-phosphate receptor 1. *FASEB J.* 2016;30(6):2351-9.
89. Mathiesen Janiurek M, Soyulu-Kucharz R, Christoffersen C, Kucharz K, Lauritzen M. Apolipoprotein M-bound sphingosine-1-phosphate regulates blood-brain barrier paracellular permeability and transcytosis. *Westbrook GL, Hla T, éditeurs. eLife.* 25 nov 2019;8:e49405.
90. Li T, Yang L, Zhao S, Zhang S. Correlation Between Apolipoprotein M and Inflammatory Factors in Obese Patients. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 15 août 2018;24:5698-703.
91. Kumaraswamy SB, Linder A, Åkesson P, Dahlbäck B. Decreased plasma concentrations of apolipoprotein M in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Crit Care.* 18 avr 2012;16(2):R60.
92. Bisgaard LS, Christoffersen C. Apolipoprotein M/sphingosine-1-phosphate: novel effects on lipids, inflammation and kidney biology. *Curr Opin Lipidol.* juin

- 2019;30(3):212.
93. Kurano M, Uranbileg B, Yatomi Y. Apolipoprotein M bound sphingosine 1-phosphate suppresses NETosis through activating S1P1 and S1P4. *Biomed Pharmacother.* 1 oct 2023;166:115400.
  94. Lai WQ, Irwan AW, Goh HH, Howe HS, Yu DT, Valle-Oñate R, et al. Anti-Inflammatory Effects of Sphingosine Kinase Modulation in Inflammatory Arthritis1. *J Immunol.* 1 déc 2008;181(11):8010-7.
  95. Hu HJ, Jin EH, Yim SH, Yang SY, Jung SH, Shin SH, et al. Common variants at the promoter region of the APOM confer a risk of rheumatoid arthritis. *Exp Mol Med.* nov 2011;43(11):613-21.
  96. Park YJ, Yoo SA, Lee JH, Chung YJ, Cho CS, Kim WU. The APOM polymorphism as a novel risk factor for dyslipidaemia in rheumatoid arthritis: a possible shared link between disease susceptibility and dyslipidaemia. *Clin Exp Rheumatol.* 2013;31(2):180-8.
  97. Huang Y, Liu Y, Jiang L, Sun R, Zhang H, Liu R, et al. Apolipoprotein m (APOM) levels and APOM rs805297 G/T polymorphism are associated with increased risk of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 1 janv 2014;81(1):32-6.
  98. Kurano M, Yatomi Y. Sphingosine 1-Phosphate and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2018;25(1):16-26.
  99. Zheng Z, Zeng Y, Zhu X, Tan Y, Li Y, Li Q, et al. ApoM-S1P Modulates Ox-LDL-Induced Inflammation Through the PI3K/Akt Signaling Pathway in HUVECs. *Inflammation.* 1 avr 2019;42(2):606-17.
  100. Liu Y, Tie L. Apolipoprotein M and sphingosine-1-phosphate complex alleviates TNF- $\alpha$ -induced endothelial cell injury and inflammation through PI3K/AKT signaling pathway. *BMC Cardiovasc Disord.* 2 déc 2019;19(1):279.
  101. Tydén H, Lood C, Jönsen A, Gullstrand B, Kahn R, Linge P, et al. Low plasma concentrations of apolipoprotein M are associated with disease activity and endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2 mai 2019;21(1):110.
  102. Blaho VA, Galvani S, Engelbrecht E, Liu C, Swendeman SL, Kono M, et al. HDL-bound sphingosine 1-phosphate restrains lymphopoiesis and neuroinflammation. *Nature.* 16 juill 2015;523(7560):342-6.
  103. Kurano M, Tsuneyama K, Morimoto Y, Nishikawa M, Yatomi Y. Apolipoprotein M suppresses the phenotypes of IgA nephropathy in hyper-IgA mice. *FASEB J.* 2019;33(4):5181-95.
  104. Kurano M, Tsukamoto K, Shimizu T, Kassai H, Nakao K, Aiba A, et al. Protection Against Insulin Resistance by Apolipoprotein M/Sphingosine-1-Phosphate. *Diabetes.* 8 janv 2020;69(5):867-81.
  105. Hajny S, Christoffersen C. A Novel Perspective on the ApoM-S1P Axis, Highlighting the Metabolism of ApoM and Its Role in Liver Fibrosis and Neuroinflammation. *Int J Mol Sci.* 27 juill 2017;18(8):1636.
  106. Zaiss AK, Liu Q, Bowen GP, Wong NCW, Bartlett JS, Muruve DA. Differential Activation of Innate Immune Responses by Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors. *J Virol.* mai 2002;76(9):4580-90.
  107. Frances L, Croyal M, Ruidavets JB, Maraninchi M, Combes G, Raffin J, et al. Identification of circulating apolipoprotein M as a new determinant of insulin sensitivity and relationship with adiponectin. *Int J Obes.* 15 mars 2024;1-8.
  108. Dobner J, Ress C, Ruffinatscha K, Salzmann K, Salvenmoser W, Folie S, et al. Fat-enriched rather than high-fructose diets promote whitening of adipose tissue

- in a sex-dependent manner. *J Nutr Biochem*. 1 nov 2017;49:22-9.
109. Jeyakumar S, Raja Gopal Reddy M, Garlapati C, Desi Reddy S, Vajreswari A. Diabetogenic diet-induced insulin resistance associates with lipid droplet proteins and adipose tissue secretome, but not with sexual dimorphic adipose tissue fat accumulation in Wistar rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1 déc 2020;24:100831.
  110. Leonardi BF, Gosmann G, Zimmer AR. Modeling Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rodents. *Mol Nutr Food Res*. 2020;64(22):2000249.
  111. Blaak E. Gender differences in fat metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. nov 2001;4(6):499-502.
  112. Christoffersen C, Federspiel CK, Borup A, Christensen PM, Madsen AN, Heine M, et al. The Apolipoprotein M/S1P Axis Controls Triglyceride Metabolism and Brown Fat Activity. *Cell Rep*. 2 janv 2018;22(1):175-88.
  113. Rocha DM, Caldas AP, Oliveira LL, Bressan J, Hermsdorff HH. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis*. 1 janv 2016;244:211-5.
  114. Rogero MM, Calder PC. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*. avr 2018;10(4):432.
  115. Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, Doyle L, Phipson B, Smyth GK, et al. Pro-Inflammatory CD11c+CD206+ Adipose Tissue Macrophages Are Associated With Insulin Resistance in Human Obesity. *Diabetes*. juill 2010;59(7):1648-56.
  116. Van den Bossche J, O'Neill LA, Menon D. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? *Trends Immunol*. juin 2017;38(6):395-406.
  117. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 15 déc 2003;112(12):1796-808.
  118. Chen W, Lu H, Yang J, Xiang H, Peng H. Sphingosine 1-phosphate in metabolic syndrome (Review). *Int J Mol Med*. 1 oct 2016;38(4):1030-8.
  119. Mammoliti O, Palisse A, Joannesse C, El Bkassiny S, Allart B, Jaunet A, et al. Discovery of the S1P2 Antagonist GLPG2938 (1-[2-Ethoxy-6-(trifluoromethyl)-4-pyridyl]-3-[[5-methyl-6-[1-methyl-3-(trifluoromethyl)pyrazol-4-yl]pyridazin-3-yl]methyl]urea), a Preclinical Candidate for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Med Chem*. 13 mai 2021;64(9):6037-58.
  120. Saxena A, Chumanevich A, Fletcher E, Larsen B, Lattwein K, Kaur K, et al. Adiponectin deficiency: Role in chronic inflammation induced colon cancer. *Biochim Biophys Acta*. avr 2012;1822(4):527-36.

# ANNEXES

	Femmes					Hommes				
	Total 18 ans et +	18-24	25-44	45-64	65-74	Total 18 ans et +	18-24	25-44	45-64	65-74
Belgique	14,7	5,4	11,6	17,1	21,5	13,3	3,3	11,5	18,5	11,3
Bulgarie	11,3	1,0	6,6	14,6	18,9	11,6	1,3	12,1	14,8	14,9
Rép. tchèque	18,3	4,8	10,6	25,1	35,9	18,4	4,9	15,0	26,8	25,3
Danemark	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
Allemagne	15,6	u	12,0	18,2	21,7	16,1	4,6	13,8	21,1	18,2
Estonie	20,5	3,7	10,1	30,4	33,8	16,0	3,8	15,7	21,5	20,4
Irlande	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
Grèce	17,6	3,2	9,2	24,6	32,4	17,6	3,7	15,4	22,7	25,8
Espagne	14,4	3,9	9,3	17,1	26,8	17,0	5,8	14,7	21,8	23,9
France	12,7	4,3	10,5	15,1	17,8	11,7	2,8	8,6	15,1	19,4
Italie	9,3	2,0	4,6	11,7	16,1	11,3	3,4	8,3	15,2	15,3
Chypre	14,5	1,7	9,2	19,7	26,6	16,7	5,8	13,2	22,0	22,8
Lettonie	20,9	1,7	9,6	31,0	35,3	12,0	2,3	10,0	16,5	19,6
Lituanie	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
Luxembourg	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
Hongrie	18,8	3,0	12,8	25,5	26,0	21,4	7,2	15,5	28,6	33,9
Malte	(21,1)	10,7	15,6	(24,9)	(31,9)	24,7	7,8	25,0	29,5	(31,1)
Pays-Bas	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
Autriche	13,2	4,7	8,8	18,0	19,6	12,4	5,0	9,6	17,0	19,1
Pologne	15,8	2,1	7,5	22,9	27,6	17,3	4,1	14,4	23,6	24,6
Portugal	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
Roumanie	8,0	1,6	4,1	13,7	10,8	7,6	1,8	6,3	10,7	10,5
Slovénie	16,3	4,0	10,0	23,2	24,2	17,3	3,6	14,5	24,4	24,3
Slovaquie	15,7	1,3	7,8	23,3	33,7	14,5	3,5	12,7	19,2	25,1
Finlande	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
Suède	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
Royaume-Uni**	23,9	16,6	20,7	27,7	31,1	22,1	5,9	17,5	33,2	29,6

- \* Les données se réfèrent aux années 2008 ou 2009, sauf pour l'Autriche et l'Estonie: 2006/7, la Slovénie: 2007 et l'Allemagne: 2009/10  
 \*\* Les groupes d'âge sont 16 ans et + et 16-24 ans au lieu de 18 ans et + et 18-24 ans, les données se réfèrent seulement à l'Angleterre  
 () Données moins fiables en raison d'un grand nombre de réponses manquantes  
 u Données non publiées en raison de la petite taille de l'échantillon  
 : Données non disponibles

**Annexe 1 : Proportion de personnes en situation d'obésité par sexe et groupe d'âge en 2008/2009. Eurostat.**

**Proportion de personnes obèses âgées de 18 ans et plus, par sexe et niveau d'éducation, en 2008 ou 2009\***

	Femmes			Hommes		
	Niveau inférieur	moyen	supérieur	Niveau inférieur	moyen	supérieur
Belgique	21,8	15,3	7,9	17,5	13,7	10,0
Bulgarie	14,0	11,5	6,9	10,4	11,7	13,7
Rép. tchèque	28,0	16,9	12,5	17,9	19,9	10,4
Danemark	:	:	:	:	:	:
Allemagne	21,9	14,7	8,8	16,4	17,4	13,1
Estonie	27,4	19,9	11,2	14,7	16,2	18,5
Irlande	:	:	:	:	:	:
Grèce	25,2	13,5	8,4	20,2	17,6	13,9
Espagne	21,1	8,3	6,0	21,1	12,8	12,8
France	18,7	11,3	5,5	16,4	10,7	7,5
Italie	12,9	5,3	3,6	13,8	8,7	7,6
Chypre	23,6	10,8	7,1	20,6	14,8	14,6
Lettonie	24,1	22,0	15,9	12,8	11,5	12,7
Lituanie	:	:	:	:	:	:
Luxembourg	:	:	:	:	:	:
Hongrie	26,9	16,1	13,5	23,9	21,8	17,1
Malte	(30,5)	18,1	11,7	(30,5)	22,5	22,8
Pays-Bas	:	:	:	:	:	:
Autriche	20,9	10,4	8,3	13,6	12,1	12,2
Pologne	24,8	15,4	7,2	16,0	18,1	15,0
Portugal	:	:	:	:	:	:
Roumanie	9,0	7,9	5,0	5,6	8,5	7,3
Slovénie	22,7	11,2	6,6	20,2	15,7	7,0
Slovaquie	28,2	15,0	8,8	14,6	15,5	10,5
Finlande	:	:	:	:	:	:
Suède	:	:	:	:	:	:
Royaume-Uni	:	:	:	:	:	:

Le niveau d'éducation inférieur se rapporte à l'éducation pré-primaire, primaire et secondaire inférieur (CITE niveaux 0-2), le niveau moyen correspond au second cycle de l'éducation secondaire et post secondaire non supérieur (CITE niveaux 3-4) et le niveau supérieur à l'éducation supérieur (CITE niveaux 5-6)

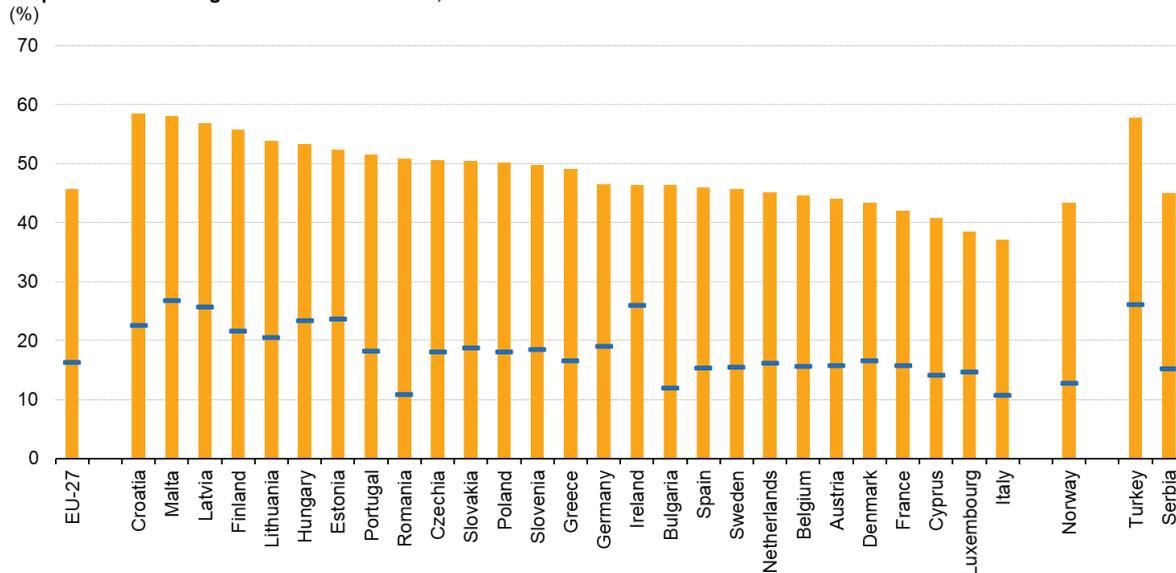
\* Les données se réfèrent aux années 2008 ou 2009, sauf pour l'Autriche et l'Estonie: 2006/7, la Slovénie: 2007 et l'Allemagne: 2009/10

( ) Données moins fiables en raison d'un grand nombre de réponses manquantes

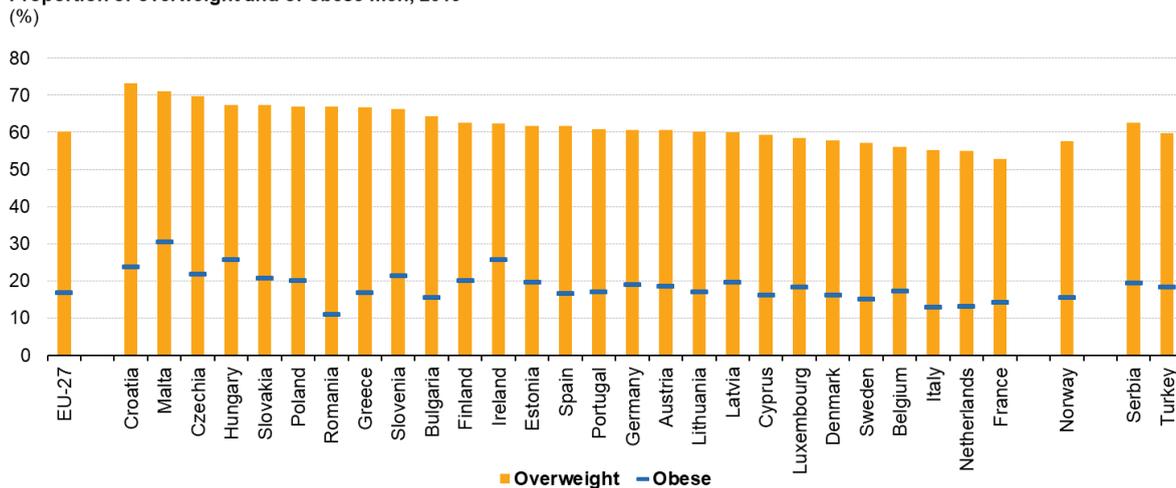
:

**Annexe 2 : Proportion de personnes âgées de 18 ans et plus par sexe et niveau d'éducation atteintes d'obésité en 2008/2009. Eurostat.**

Proportion of overweight and of obese women, 2019



Proportion of overweight and of obese men, 2019



Note: population aged 18 and over.

Source: Eurostat (online data code: hlth\_ehis\_bm1e)



**Annexe 3 : Proportion de personnes en situation d'obésité en 2019. Eurostat.**

#### **Annexe 4** : Les différentes amorces et sondes qPCR utilisées dans cette étude

<b>Marqueurs</b>	<b>[C] nM</b>	<b>Séquences sens</b>	<b>Séquences anti-sens</b>
<i>Hprt</i>	300	5'-CAGACTGAAGAGCTACTGTAATGA-3'	5'-CTTTCCAGTTAAAGTTGAGAGATCA-3'
<i>Tbp</i>	300	5'-GGA ATT GTA CCG CAG CTT CAA A-3	5'-GAT GAC TGC AGC AAA TCG CTT-3'
<i>Adipoq</i>	300	5'-GAA TCA TTA TGA CGG CAG CA-3'	5'-TCA TGT ACA CCG TGA TGT GGT A-3'
<i>Tnfa</i>	300	5'-CTGAACTTCGGGGTGATCGG-3'	5'-GTGGTTTGCTACGACGTGGG-3'
<i>Il1β</i>	300	5'-CAG GCA GGC AGT ATC ACT CA-3'	5'-AGG CCA CAG GTA TTT TGT CG-3'
<i>Il6</i>	900	5'-TCC AGT TGC CTT CTT GGG AC-3'	5'-GTG TAA TTA AGC GCC GAC TTG-3'
<i>Mcp1</i>	300	5'-ACTGAAGCCAGCTCTCTCTTCCTC-3'	5'-TTC CTT CTT GGG GTC AGC ACA GAC-3'
<i>Saa3</i>	900	5'-GAACTATGATGCTGCCCGGA-3'	5'-TTGGCAAACCTGGTCAGCTCT-3'
<i>Cd11c</i>	300	5'-CTG GAT AGC CTT TCT TCT GCT G-3'	5'-GCA CAC TGT GTC CGA ACT C-3'
<i>Cd68</i>	300	5'-CTT CCC ACA GGC AGC ACA G-3'	5'-AAT GAT GAG AGG CAG CAA GAG G-3'
<i>AAV</i>	300	5'-GTG CCC ACC AGC CTT GTC-3'	5'-TGT CTT CCC AAC TTG CCC CTT-3'
<i>Il10</i>	300	5'-GCT CTT ACT GAC TGG CAT GAG-3'	5'-CGC AGC TCT AGG AGC ATG TG-3'
<i>mCherry</i>	300	5'-ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA-3'	5'-TCG CCC TCG ATC TCG AAC TC-3'

<b>Gènes</b>	<b>Références sonde Taq-Man</b>
<i>mApom</i>	Mm00444525_m1
<i>APOM</i>	Hs00219533_m1

# SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens
- De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

**Title: The adipocyte apolipoprotein M is negatively associated with inflammation**

Authors: Laurie Frances<sup>1</sup>, Mikael Croyal<sup>2,3,4</sup>, Soline Pittet<sup>1</sup>, Léa Da Costa Fernandes<sup>1</sup>, Milan Boulaire<sup>1</sup>, Laurent Monbrun<sup>1</sup>, Ellen E. Blaak<sup>5</sup>, Christina Christoffersen<sup>6</sup>, Cédric Moro<sup>1</sup>, Geneviève Tavernier<sup>1\*</sup> and Nathalie Viguerie<sup>1\*</sup>

Affiliation :

<sup>1</sup> Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases (I2MC), Team MetaDiab, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Université Toulouse III - Paul Sabatier (UPS), UMR1297, Toulouse, France.

<sup>2</sup> Nantes Université, CNRS, INSERM, Institut du Thorax, Nantes, France

<sup>3</sup> Nantes Université, CHU Nantes, Inserm, CNRS, SFR Santé, Inserm UMS 016, Nantes, France

<sup>4</sup> CRNH-Ouest Mass Spectrometry Core Facility, Nantes, France

<sup>5</sup> Department of Human Biology, NUTRIM, School of Nutrition and Translational Research in Metabolism, Maastricht University Medical Centre+(MUMC+), Maastricht, The Netherlands

<sup>6</sup> Department of Clinical Biochemistry, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark; Department of Biomedical Sciences University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark.

Contact info: \*Corresponding authors:

Geneviève Tavernier, Inserm, UMR 1297, 1 Avenue du Pr. Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse, France. Tel: +33561325626. ORCID ID : 0000-0002-0214-0344 Email : [genevieve.tavernier@inserm.fr](mailto:genevieve.tavernier@inserm.fr)

Nathalie Viguerie, Inserm, UMR 1297, 1 Avenue du Pr. Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse, France. Tel: +33561325631. [ORCID ID : 0000-0002-1730-9915](https://orcid.org/0000-0002-1730-9915) Email : [nathalie.viguerie@inserm.fr](mailto:nathalie.viguerie@inserm.fr)

Short title: Adipose tissue APOM and inflammation

### Funding sources:

This research was supported by Inserm, Toulouse 3 University, grants from Société Française de Nutrition, Fondation pour la Recherche Médicale (EQU202303016316) (C.M.), Agence Nationale de la Recherche ANR-21-CE14-0057-01 (C.M.) and ANR-22-JHDH-0003-05 (N.V.). L.F. was supported by a Ph.D. fellowship from Region Occitanie Pyrénées-Méditerranée and Inserm (ALDOCT-001007). The I2MC cytometry and cell sorting facility (Genotoul-TRI) is supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04).

### Abbreviations:

AAV, adeno-associated virus

APOM, apolipoprotein M

AT, adipose tissue

CD, cluster of differentiation

CLS, crown-like structure

CRP, C-reactive protein

HFD, high fat diet

hMADS, human multipotent adipose-derived stem

Hprt, hypoxanthine phosphoribosyltransferase

IBMX, isobutyl-1-methylxanthine

IL, interleukin

LPS, lipopolysaccharide

LRP10, ldl receptor related protein 10

MCP1, monocyte chemoattractant protein 1

NCD, normal chow diet

PCA, Principal Component Analysis

PGAT, perigonadal adipose tissue

PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate

PSMC4, proteasome 26S subunit, ATPase 4

PUM1, pumilio RNA binding family member 1

SAA, serum amyloid A

SCAT, inguinal subcutaneous adipose tissue

S1P, sphingosine-1-phosphate

Tbp, TATA-binding protein

## **Abstract**

Obesity is associated with the development of a local adipose tissue (AT) and systemic inflammation. Most adipokines are upregulated with obesity and have pro-inflammatory properties. Few are downregulated and possess beneficial anti-inflammatory effect. The apolipoprotein M (APOM) is an adipokine whose expression is low during obesity and associated with a metabolically healthy AT. Here, the role of adipose-derived APOM on obesity-associated AT inflammation was investigated by measuring the expression of pro-inflammatory genes in humans and mice models. In 300 individuals with obesity, AT *APOM* mRNA level was negatively associated to plasma hs-CRP. The inflammatory profile was assessed in *Apom*<sup>-/-</sup> and WT mice fed a normal chow diet (NCD), or a high fat diet (HFD) to induce AT inflammation. After HFD, mice had a higher inflammatory profile in AT and liver, and a 50% lower *Apom* gene expression compared with NCD-fed mice. The *Apom* deficiency was associated with a higher inflammatory signature in AT compared with WT mice, but not in liver. Adeno-associated viruses encoding human *APOM* were used to induce *APOM* overexpression: *in vivo*, in WT mice AT prior to HFD; *in vitro*, in human adipocytes which conditioned media was applied to ThP-1 macrophages. The murine AT overexpressing *APOM* gene had a reduced inflammatory profile. The macrophages treated with APOM-enriched media from adipocytes exhibited lower *IL6* and *MCP1* gene expression compared with macrophages treated with control media, independently of S1P. Our study highlights a protective role of adipocyte APOM against obesity-induced AT inflammation.

**Keywords:** obesity, inflammation, lipoproteins, cytokines, adipokines, adipocytes, macrophages, sphingosine-1-phosphate, lipocalin

## **Introduction**

Obesity is characterized by an excess of fat mass and is associated to a systemic and localized low-grade inflammation within the adipose tissue (AT) [1]. The AT is not only a long-term energy storage organ but also secretes a large variety of bioactive factors, among which are adipokines. Adipokines secretion is altered with obesity and compelling evidence indicates that a variety of adipokines play an important role in obesity-related comorbidities [2]. Most of the adipokines exhibit increased expression and secretion with obesity, and some act as pro-inflammatory factors to promote obesity-linked metabolic diseases [3]. Conversely, few are down-regulated during obesity and a defect in secretion of those anti-inflammatory adipokines (e.g., adiponectin), is likely to induce metabolic disturbances [4]. Among those factors, we previously reported that the apolipoprotein M (APOM), which had been first discovered as produced by hepatocytes and kidney proximal tubule epithelial cells [5], then brain endothelial cells [6], and in colorectal tissues [7], is expressed and secreted by the adipocytes [8]. Conflicting results exist regarding the link between plasma APOM and obesity, or type 2 diabetes (T2D). Plasma APOM is lower in individuals with obesity compared with lean subjects [9], negatively associated with waist circumference [10] and lower in T2D compared with glucose tolerant individuals [11, 12]. However, a positive correlation between plasma APOM and leptin was reported [13]. Mice models of T2D with hyperinsulinemia display lower plasma APOM levels compared with controls [14, 15], but streptozotocin-induced diabetes raised plasma APOM [16]. The *APOM* gene expression in the AT is lower in individuals with metabolic syndrome, obesity, or T2D [8]. The role of APOM in the AT remains unknown.

The human *APOM* gene is localized on chromosome 6p21.3 in the major histocompatibility complex of class III, which also includes genes of the TNF family. The APOM is a lipocalin, mainly known as a chaperone for sphingosine-1-phosphate (S1P), a sphingolipid with anti-inflammatory properties [17]. In the recent years, several evidences were provided about the protective effect of APOM, with S1P or not, against various inflammation processes [18]. A negative association between plasma APOM and the C-reactive protein (CRP) has been previously reported [19, 20]. We also reported a downregulation of AT

*APOM* with obesity, metabolic syndrome and T2D which are metabolic states associated with low-grade systemic and AT inflammation [8].

To the best of our knowledge, no data are currently available on the putative role of adipocyte-derived APOM within the AT. We therefore combined *in vivo* and *in vitro* experiments aiming to investigate the relationship between adipose APOM and AT inflammation. We compared AT inflammatory signature of *Apom*<sup>-/-</sup> mice to those of WT littermates. The human *APOM* gene was specifically expressed in the perigonadal AT of WT mice. Further, the expression of *APOM* was forced in adipocytes and conditioned media used to culture macrophages before inducing pro-inflammatory phenotype.

The present study shows that APOM is one of these rare adipokines associated with a healthy metabolic phenotype that could be protective regarding AT inflammation and questions about the mechanism by which this may occur.

## **Materials and Methods**

### *Human subjects*

Baseline AT samples and clinical data were obtained on 300 individuals (aged  $42.5 \pm 6.4$  Y; 101 men and 199 women) with overweight or obesity (BMI:  $34.1 \pm 4.7$  kg/m<sup>2</sup>) from the DiOGenes study (NCT00390637) [21]. Abdominal subcutaneous AT biopsies were obtained by needle aspiration under local anaesthesia after an overnight fast. The study was performed according to the latest version of the Declaration of Helsinki. Local ethics committees approved all procedures that involved human participants and written informed consent was obtained from all participants after verbal and written instructions.

### *Animals*

All animal experiments were approved by the Ethics Committee CEAA-122 and the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation and performed in the specific pathogen-free CREFRE animal facility, Inserm UMS006, University of Toulouse, National Veterinary School,

France (DAP-APAFiS-2018111316011388). All animals were housed and manipulated according to the European Directive 2010/63/UE, to the Inserm guidelines. All animals were housed in cages of 3 to 5 individuals, in a temperature-controlled environment with a 12-hour dark/light cycle, into well-controlled animal care facilities. For the studies of weight gain and AAVs transduction, five-week-old C57BL/6J male mice were purchased from ENVIGO (Gannat, France).

For the study of APOM regulation following a weight gain, animals were fed either a normal chow diet (NCD, #EF D12450J, Ssniff) or a 60% high fat diet (HFD, #EF D12492, Ssniff) at weaning time, and were housed either in a thermoneutral environment at 28-30°C in a vented animal cabinet or at standard temperature 22°C in the same room. Ten mice per group were killed after 1, 3 or 6 months of diet.

For the *APOM* gene overexpression study, the perigonadal fat pad of mice were transduced with adeno-associated viruses (AAVs) encoding either human APOM cDNA or *MCHERRY* cDNA, or injected with a physiological saline (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). After surgery, mice were monitored daily and fed a 60% HFD for 5 weeks.

The *Apom*<sup>-/-</sup> mice were provided by Christina Christoffersen from the University of Copenhagen, Denmark [22], and backcrossed with C57BL/6J mice to obtain heterozygous founders, which were intercrossed to get *Apom*<sup>-/-</sup> mice and control *Apom*<sup>+/+</sup> (WT) littermates. Sixteen male and female WT and *Apom*<sup>-/-</sup> mice were housed in a thermoneutral environment at 28-30°C in a vented animal cabinet, other mice were housed in the same room at standard temperature (22°C). Body composition was assessed every 4 weeks with an NMR analyzer MiniSpec (Brucker Biospin, Billerica, USA). For the flow cytometry analysis of perigonadal fat pad, 10 WT and 21 *Apom*<sup>-/-</sup> female mice were housed at standard temperature and fed with either a 60% HFD or a NCD for 12 weeks.

At the end of all protocols, mice underwent a 3-hour fasting before necropsies and plasma was sampled for glucose measurement and further blood analysis. Tissues were immediately processed for flow cytometry analyses or flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use for RNA isolation or protein extraction.

*AAVs*

AAV vectors of serotype 8 encoding the human *APOM* cDNA, or *MCHERRY* cDNA as control, were designed and produced by the Plateforme de Vectorologie of the Cancerology Research Center of Toulouse, France (Inserm UMR1037).

#### *Plasma measurements*

Human high-sensitivity CRP (hs-CRP) was quantified by immunoturbidimetry using a Cobas Integra 400 (Roche Diagnostics, Meylan, France). Murine CRP was dosed in plasma on a Luminex MAGPIX system (Luminex Corp., Austin, USA) using a multiplex assay (MAP2MAG-76K, Merck Millipore, Burlington, USA).

#### *Flow Cytometry Analyses*

Perigonadal fat pads were collected and processed as described in [23]. Briefly, after weighing, the tissues were rinsed in cold Krebs-Ringer bicarbonate buffer (Sigma-Aldrich), minced then digested in PBS (Sigma-Aldrich) containing 2% bovine fatty acids free albumin (Sigma-Aldrich), 1% type I collagenase (Sigma-Aldrich), 60 µg/mL liberase (Roche, Basel, Switzerland), 250 IU/mL hyaluronidase (Sigma-Aldrich) for 1h at 37°C under agitation. Digested tissues were filtrated through 225 µm pore filters and centrifuged at 1500 rpm for 5 min. After washing with PBS, the adipocytes-containing supernatants were discarded and the pelleted stromal vascular fractions (SVF) were suspended in erythrocyte lysis buffer (8g/L NH<sub>4</sub>Cl, 1g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.04g/L EDTA) and incubated for 10 min at room temperature with constant agitation. The SVF cells were then centrifuged at 1500 rpm for 5 min and 0.5\*10<sup>6</sup> cells were suspended in PBS supplemented with 0.5% albumin and 2mM EDTA (Sigma-Aldrich). Live cells were stained for 20 min using a LIVE/DEAD Fixable blue stain (Invitrogen, St Aubin, France) diluted 1/1000 in PBS. Pro-inflammatory macrophages were stained using anti-CD45-PE-Vio 770 REAfinity (clone REA737, Miltenyi,Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), anti-F4/80-APC (clone BM8, BioLegend, San Diego, USA), anti-CD11b-PE-Vio 615 REAfinity (clone REA592, Miltenyi) and anti-CD11c-Brilliant Violet 711 (clone N418, BioLegend) antibodies. Cells were analysed using an Aurora Cell Sorter flow cytometer (Cytex Biosciences, Fremont, USA). Results were acquired using the OMIQ software (OMIQ, Boston, USA).

### *Histological analyses*

Perigonadal AT from WT and *Apom*<sup>-/-</sup> mice fed a 60% HFD for 12 weeks were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS, dehydrated, embedded in paraffin, and cut into 5  $\mu$ m sections. Sections were stained with hematoxylin and eosin using standard protocols. Digital images of the entire fat pads sections were captured using light microscope coupled to a camera (NanoZoomer 2.0 RS Hamamatsu) and analyzed using the morphometric programme Fiji v2.1.0 (ImageJ, NIH, USA) with the adipocytes automated detection plugin AdipoTool. The crown-like structures (CLS) in the whole fat pad sections were counted blindly by two analysts. The CLS density was expressed per mm<sup>2</sup> of tissue section.

### *Cell culture*

To mimic *in vitro* the human AT landscape, cell lines were used instead of primary cultured cells to ensure concomitant availability of each cell type.

Human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells were cultured as previously described [8]. Cells were differentiated in serum-free DMEM low-glucose/Ham's F-12 (Lonza, Basel, Switzerland) medium supplemented with 125 nM transferrin, 10 nM insulin, 0.2 nM triiodothyronine, 100  $\mu$ M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1  $\mu$ M dexamethasone (Sigma-Aldrich) and 100 nM rosiglitazone (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA). After 6 days of differentiation (day 6), dexamethasone and IBMX were omitted from the medium. Rosiglitazone was omitted at day 9 and on day 13, hMADS cells were fully differentiated.

Human ThP-1 monocytes were cultured in suspension in RPMI-1640 medium containing 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate, 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (Invitrogen) and 36 mM glucose (Sigma-Aldrich). For differentiation, cells were seeded in a serum-free, 2-mercaptoethanol-free RPMI medium containing 100 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) for 48h. Pro-inflammatory macrophages polarization was triggered with 2 ng/mL *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich) and 10 ng/mL IFN $\gamma$  (Sigma-Aldrich). Cells were fully polarized after 3 days.

### *Treatments*

For the study of APOM regulation, hMADS were treated at day 10 with 10 or 50 µg/mL CRP (Merck Millipore) for 48h. For AAV transduction, the hMADS adipocytes were transduced at day 10 as described in [24]. On day 13, conditioned media were sampled. ThP-1 cells were treated with 50/50 conditioned media from transduced hMADS cells and RPMI, with 1 µM SIP prepared in 0.4% BSA when indicated, one day prior to polarization [25]. All cells were lysed using RLT buffer (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) containing 10% 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), flash frozen and stored at -80°C until use.

#### *Human APOM measurements*

Human APOM was dosed in hMADS conditioned media as described in [26]. Briefly, medium samples were concentrated in ammonium bicarbonate buffer with a 5.000 Da molecular mass cut-off filter. Concentrated samples were then reduced, alkylated and trypsin digested overnight. Human APOM was quantified using proteotypic signature peptide AFLLTPR and labelled synthetic peptide (AFLLTPr-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>4</sub>]R) as internal standard. Labelled and unlabelled peptides were then separated and detected by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) as described previously [26]. Data acquisition and analyses were performed with MassLynx® and TargetLynx® software, respectively (Waters Corporation).

#### *RNA extraction and RT-PCR*

Tissues were lysed in Qiazol reagent (Qiagen) and RNA was extracted using a RNeasy mini kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. Total RNA (500 ng) was reverse transcribed for 120 min at 37°C using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) in the presence of random hexamers. Real-time PCR was performed using Taqman probes or Sybergreen primers assays (Table S1) with a QuantStudio 5 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Expression of murine *Tnfa*, Interleukin 1b (*Il1b*), Interleukin 6 (*Il6*), Monocyte chemoattractant protein 1 (*Mcp1*), Cluster of differentiation 68 (*Cd68*), Cluster of differentiation 11c (*Cd11c*), Serum amyloid A3 (*Saa3*) and *Apom* were measured in all murine tissues; expression of human *APOM* and *MCHERRY* gene were additionally measured in AT from the *APOM* gene overexpression study. Expression of human *APOM* gene was measured in AT of

human subjects and human *TNFA*, *IL1B*, *IL6*, *MCPI*, *APOM* and *MCHERRY* were measured in *in vitro* models. The murine tissue data were normalized to the mean between Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*Hprt*) and TATA-binding protein (*Tbp*). The human tissue data were normalized to Pumilio RNA-binding family member 1 (*PUM1*). The hMADS and ThP-1 data were normalized to LDL receptor related protein 10 (*LRP10*) and Proteasome 26S subunit, ATPase 4 (*PSMC4*), respectively.

#### *Western-blot*

AT proteins were extracted using a RIPA buffer (Sigma-Aldrich) and quantified using a Pierce BCA assay kit (ThermoFisher). Proteins were separated using a 4-20% SDS-PAGE. Gels and nitrocellulose membranes were exposed to UV light in a ChemiDoc imaging system (Bio-Rad) to permit stain-free normalization. Membranes were incubated overnight with primary antibodies anti-APOM (H00055937-M03, Abnova, Taipei, Taiwan) diluted 1/1000 in TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20) buffer containing 5% skimmed milk. After washing, membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies and proteins were visualized using a Clarity ECL reagent and ChemiDoc imaging system (Bio-Rad). Data were analyzed using Image Lab™ software (Bio-Rad) version 6.1. Signal intensity was normalized to the total protein signal, using the Stain-Free Technology, in each lane.

#### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software v9.4.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) or R software v4.0.5 with the factoextra and FactoMineR packages. The centroid of mean gene expression was calculated as the mean of geometric means of all genes mRNA level as described in [27-29] to represent weighted average of several gene expression levels. Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests were performed to determine differences between groups, Spearman correlation and two-way ANOVA followed by Sidak post hoc test were applied when appropriate. All values in figures are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## **Results**

### **AT *APOM* gene expression is negatively associated with systemic and AT inflammation**

As a negative association between the circulating CRP and APOM was repeatedly reported in humans [19, 30], we questioned about the relationship between *APOM* gene expression in human subcutaneous AT and circulating hs-CRP in 300 individuals with overweight or obesity (Table S2). An inverse association between adipose *APOM* mRNA level and hs-CRP ( $r = -0.167$ ;  $P = 0.0038$ ) was found (Fig. 1A).

To investigate whether a weight gain could regulate *Apom* expression, mice were fed with a HFD or NCD for 1, 3 and 6 months. Weight gain of HFD-fed mice reached a plateau at 3 months of diet (Fig. 1B). Since housing temperature can alter inflammatory response to HFD [31, 32] and metabolic phenotype [33], mice were housed either at 22°C or 30°C. We measured the expression of 7 genes encoding inflammatory proteins, namely *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Mcp1*, *Cd68*, *Cd11c* and *Saa3*, in perigonadal AT (PGAT), inguinal subcutaneous AT (SCAT) and in liver. Principal component analysis (PCA) was performed based on this inflammatory gene expression panel (Fig. 1C). PGAT, SCAT and liver were distinctly separated by the two principal components. No effect of housing temperature was observed. Therefore, we chose to analyze data independently of housing temperature. Figure 1D shows the centroids calculated on the inflammatory gene expression in PGAT, SCAT and liver. Inflammatory signature was higher after 3 and 6 months of HFD in both fat pads and liver. Therefore, we chose to analyze PGAT and liver data, at 3 months of HFD. Figure 1E shows that the *Apom* mRNA level in PGAT and liver was significantly decreased after a 3-month HFD.

### **The *Apom* deficiency is associated with higher systemic and AT inflammation**

To study the role of APOM in the AT, we investigated the effect of *Apom* deficiency on HFD-induced AT inflammation in *Apom*<sup>-/-</sup> and WT mice fed a HFD for 3 months. Body weight and composition, as well as adipocytes sizes in PGAT, were similar between *Apom*<sup>-/-</sup> and WT mice both before and after HFD (Fig. S1 and S2). After the 3-month HFD, plasma CRP was higher in males compared to females ( $P < 0.0001$ ) and exhibited a trend ( $P = 0.0604$ ) to be higher in *Apom*<sup>-/-</sup> compared with WT mice

(Fig. 2A). Figure 2B displays the PCA of body composition of mice according to sex, genotype and housing temperature. Components 1 and 2 explained 96.8% of data variability. No impact of genotype or housing temperature was observed.

We then examined the gene expression of the 7 pro-inflammatory markers in PGAT. For each tissue/group of mice, the centroid of mean gene expression was calculated [28]. A positive association between plasma CRP and inflammation centroids in AT was found ( $r = 0.415$ ,  $P = 0.001$ ), but not in liver (Fig. 2C). Figure 2D shows the PCA based on the expression of the genes encoding inflammatory markers. The maximal amount of variance came from tissues, whereas sex or housing temperature had no effect. We therefore examined gene expression data independently of sex and housing temperature. Figure 2E shows the gene expression of each marker. Compared with WT mice, a higher expression in *Apom*<sup>-/-</sup> mice was found for *Tnfa* and *Il6* ( $P < 0.05$ ), in the PGAT, not in the liver. Also, the inflammation centroids means in PGAT were 0.290 (CI<sub>95</sub> = [0.212;0.368]) for *Apom*<sup>-/-</sup> mice and 0.258 for WT mice (CI<sub>95</sub> = [0.178;0.338]), and 0.113 (CI<sub>95</sub> = [0.067;0.159]) for *Apom*<sup>-/-</sup> mice and 0.102 (CI<sub>95</sub> = [0.088;0.115]) for WT mice in liver (data not shown). Altogether, this indicates that the PGAT of *Apom*<sup>-/-</sup> mice under HFD display a more pronounced inflammatory signature than the PGAT of the WT littermates.

In the AT, after a 3-month HFD, the density of CLS was 1.44-fold ( $P = 0.033$ ) higher in *Apom*<sup>-/-</sup> than in WT mice (Fig.S3, Fig. 2F). The PGAT immune cells content was analyzed by flow cytometry in *Apom*<sup>-/-</sup> and WT mice after 3 months of HFD, or NCD. Pro-inflammatory F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> macrophages number was studied following the gating process described in Fig. S34. Figure 2G shows the number of F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> (pro-inflammatory) macrophages per mg of PGAT. As expected, HFD-fed mice had a higher proportion of pro-inflammatory macrophages among total macrophages compared to with NCD-fed mice ( $P < 0.0001$ ). The *Apom*<sup>-/-</sup> mice displayed a higher number of F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> cells among total macrophages than WT mice ( $P = 0.0416$ ). No significant interaction was found between diet and genotype ( $P > 0.1$ ).

### **Adipose tissue *APOM* overexpression is associated with lower local inflammation**

We tested *in vivo* whether overexpressing *APOM* while promoting obesity could limit obesity-induced inflammation development in AT. The PGAT of WT mice were transduced with AAV encoding either the human *APOM* cDNA or the control cDNA, *MCHERRY*. Animals were subsequently fed a HFD for 5 weeks to trigger the development of inflammation in AT (Fig. 3). As expected, *MCHERRY* or *APOM* gene expression were only found in PGAT of mice transduced with the AAV-*MCHERRY* or AAV-*APOM*, respectively (Fig. 3A), and the human APOM protein was only detected in the later (Fig. 3B). No difference in the murine *Apom* gene expression between the groups ( $P = 0.7496$ ) was found (Fig. 3C). Figure 3D shows the expression of the pro-inflammatory markers in PGAT after HFD. Expression of inflammatory genes was lower in PGAT of mice transduced with AAV-*APOM* compared to with PGAT of mice transduced with AAV-*MCHERRY*. The inflammation centroids means were 90.49 ( $CI_{95} = [80.0;101.0]$ ) for AAV-*APOM* transduced fat pad and 137.31 ( $CI_{95} = [102.8;171.8]$ ) for AAV-*MCHERRY* transduced fat pad. The density of CLS was 62% lower ( $P = 0.034$ ) in the PGAT of mice transduced with the AAV-*APOM* than in the PGAT of mice transduced with the AAV-*MCHERRY* (Fig. 3E).

#### ***APOM* overexpression in adipocytes restrains macrophages pro-inflammatory polarization**

To mimic *in vitro* the effect of adipocyte-derived APOM on macrophages polarization in AT, hMADS adipocytes were transduced with either AAV-*MCHERRY* or AAV-*APOM* (Fig. 4). Both AAV-*MCHERRY* and AAV-*APOM* promoted *MCHERRY* and *APOM* gene expression (Fig. 4A) and the human APOM protein was found in media from AAV-*APOM* transduced cells at a mean concentration of  $26.81 \pm 0.87$  nM (Fig. 4B). Figure 4C displays the mRNA levels of 4 cytokines which are secreted by adipocytes [34, 35]. Cytokines gene expression in hMADS adipocytes are similar between AAV-*MCHERRY* and AAV-*APOM* transduced cells, except for a decreased expression of *IL1B* gene in hMADS overexpressing *APOM* gene.

The conditioned media from hMADS cells were used to treat non-polarized (M0) ThP-1 cells. The cells were thereafter polarized onto pro-inflammatory macrophages. *IL6* and *MCPI* gene expression were lower ( $P < 0.01$ ) in pro-inflammatory macrophages treated with APOM-enriched media compared to with control (*MCHERRY*) media (Fig. 4D).

As a lipocalin, APOM binds S1P, which has anti-inflammatory properties [17]. We thus tested if the effect of APOM-enriched media on macrophages was S1P-dependent. We compared the effect of the conditioned media from hMADS, with or without S1P supplementation, on the pro-inflammatory polarization of ThP-1 cells. Figure 4E shows the ratio of cytokine gene expression in ThP-1 cells treated with conditioned media in the presence of S1P normalized to the expression level in ThP-1 cells treated with conditioned media without S1P. No difference was found, suggesting that the effect of APOM on macrophages was independent of S1P.

## **Discussion**

In recent years, the APOM has gained interest as a novel player of inflammation. This small lipocalin binds several small lipidic molecules, especially S1P, and the APOM/S1P complex displays anti-inflammatory properties [36]. As circulating APOM is negatively associated to plasma CRP in various inflammatory conditions, some authors have qualified the APOM as a negative acute phase protein [19, 30]. In addition, several studies have provided evidence regarding the beneficial role of APOM, with its main ligand S1P, in severe inflammatory contexts, including sepsis [37], heart failure [38], auto-immune diseases [20] and cancers [39]. However, the role of APOM in a low-grade inflammatory context, such as the obesity-associated inflammation, has not been studied yet. The development of obesity is characterized by AT expansion, which triggers anatomical and functional alterations such as hypertrophy and hyperplasia, tissue fibrosis, enhanced deleterious adipokines secretion and immune cells recruitment [40]. Overall, obesity is associated with a low-grade inflammatory state both at the systemic and tissue levels [1]. We previously identified APOM as an adipokine whose gene expression in AT is lower in individuals with obesity, metabolic syndrome or T2D, compared to healthy ones [8].

In this study, we examined the adipocyte APOM with regard to the inflammatory status. First, the *APOM* gene expression in AT was negatively correlated to plasma CRP in individuals with overweight or

obesity, indicating that adipose APOM is inversely associated with obesity-related low-grade systemic inflammation.

To study the regulation of the adipose APOM in an inflammatory context, WT mice were exposed to HFD. An HFD increases circulating CRP [41] and induces a shift in bacterial species in the gut microbiota, with an increase in lipopolysaccharide-secreting species and a consequent activation of the inflammasome [42]. Several saturated fatty acids, such as lauric acid or palmitic acid, have been identified as pro-inflammatory fatty acids because they are recognized by Toll-like receptor 4, which led to the transcription of inflammasome components [43]. In the AT, the HFD-induced weight gain is responsible of an unbalanced secretion of adipokines which favors pro-inflammatory cytokines and a recruitment of Th17 lymphocytes and dendritic cells which promote M1-like polarization of macrophages [44]. We found that the HFD downregulates *Apom* gene expression in AT and liver, suggesting that APOM is negatively regulated by the obesity-associated inflammation. This observation is supported by our previous findings indicating a negative influence of TNFA, or CRP, on *APOM* gene expression in human adipocytes [8, 45], as well as in a study from Gao *et al.* in human hepatocytes [46].

Secondly, we investigated the systemic and local inflammation profile in AT of *Apom*<sup>-/-</sup> mice. We previously reported a negative association between AT *APOM* mRNA level and adipocyte size in women with obesity [8]. In the present mouse models, no difference in body weight or composition, nor in adipocyte size, was found between *Apom*<sup>-/-</sup> and WT mice. However, we found a higher number of pro-inflammatory macrophages and CLS in AT of *Apom*<sup>-/-</sup> mice. This observation suggests that *Apom* deficiency might promote the mobilization of monocyte-derived pro-inflammatory macrophages to the AT adipose tissue. We also found a higher inflammatory signature in AT of *Apom*<sup>-/-</sup> mice. This was not detected in liver. Also, surprisingly, we found a positive association between plasma CRP and inflammatory gene expression only in the AT, but not in the liver. The discrepancies between those tissues may suggest that the *Apom* deficiency is more deleterious for AT than for liver, in a context of obesity-induced inflammation, but such a difference could be because the genes investigated here are not the most representatives of liver inflammation.

Because housing temperature may impact inflammation [31], mice were housed at standard and neutral temperature. Interestingly, we did not find any difference in the AT inflammatory gene expression profile between standard-housed and neutral-housed mice. The impact of ambient temperature during housing on body composition and inflammation is still a debated question: although several authors reported increased body weight, adipose mass, adipocyte size [47] and plasma pro-inflammatory cytokines levels in neutral-housed compared to with standard-housed mice [31], other studies showed similar adipose mass [48] and little differences in plasma cytokines levels between the two groups of mice [47]. Also, housing temperature was reported to impact body temperature in *Apom<sup>-/-</sup>* mice compared to with WT mice when housed at standard but not at neutral temperature [49]. In the liver, thermoneutral housing induces an increased collagen deposition and fibrosis as well as an increased infiltration of lymphocytes and innate immune cells [50], but not macrophages [51]. Almost all the markers that we measured are linked to AT macrophages and therefore does not exactly recapitulate liver inflammation. Our observation is consistent with the study of Tian *et al.*, in which macrophages count was similar in AT from standard-housed and neutral-housed mice after 12 weeks of HFD, despite an earlier infiltration of these cells in AT from neutral-housed mice [48].

Then we aimed to explore the role of the adipose-derived APOM on AT during an obesity-induced inflammation. To simulate the effect of adipose APOM in a healthy context, we forced human *APOM* gene specifically in the PGAT of mice and in human adipocytes using AAVs. We found that human APOM locally prevents the obesity-associated inflammation of the AT. The APOM may promote the impediment of macrophages inflammatory polarization and limit the ability of activated macrophages to recruit circulating monocytes, through a lower MCP1 expression. Moreover, in our study this novel role for APOM in AT may be independent of S1P. This observation was unexpected because no specific receptor for APOM has been identified on mature adipocytes and the APOM effect is likely mediated by its ligands. Abboud and colleagues have reported the expression of the megalin receptor only on pre-adipocytes, which then decreased during the differentiation of the adipocytes [52]. Of note, we were unable to reveal gene expression of the megalin receptor in the hMADS adipocytes (data not shown). Although S1P is the most studied ligand for APOM, this lipocalin can bind other lipidic molecules

including retinoic acid, oxidized phospholipids and C14 to C18 fatty acids [53, 54]. Retinol as well as polyunsaturated fatty acids have anti-inflammatory properties, as reviewed in [55, 56]. Therefore, we cannot exclude a local anti-inflammatory effect of APOM with these lipid species. Likewise, Yore *et al.* have identified hydroxylated fatty acids as promising anti-inflammatory lipids [57]. Whether APOM binds any of those branched chain fatty acids deserves further interest. Also, whether the adipose APOM is similar to that produced by liver, and so binds S1P, is an open question.

This study has several limitations, some of them being due to the use of a murine model. Indeed, advances in the understanding of mice physiology have led to reconsider animals feeding, breeding and housing strategies, in addition to individual-linked variables (age, sex and genetic background among others). Also, mice have higher HDL-particles than LDL-particles, whereas humans have the opposite, but plasma lipidomics studies showed strong correlations between human and mouse ( $r=0.810$ ,  $P < 0.0001$ ) unlike the other species such as dog and rat [58]. The APOM is mainly bound to HDL-particles [59], suggesting that variations of plasma lipids contents can also modulate plasma APOM levels in mice. In studying lipoproteins components, one has to consider using pigs or guinea pigs to extrapolate the data to humans, or using isolated lipoproteins from human donors. Nevertheless, mouse models have been extensively used to study APOM [49, 60, 61]. In addition, despite we previously reported that the AT releases more APOM after a caloric restriction [8], we must acknowledge that the overexpression experiments do not mimic what happens in a physiological context. Also, as the adipocytes may account for less than half of the AT cells, notably in individuals with obesity [62], our *in vitro* experiments do not fully recapitulate physiology. Lastly, the murine APOM protein, despite a sequence homology of 81% with the human APOM, has a different lipocalin fold than the human APOM. Lipocalins are typically formed by a  $\beta$ -barrel composed of 8 strands, while the murine APOM only has 7 strands [63]. Whether this unusual conformation has an impact on APOM binding properties, particularly regarding its anti-inflammatory ligands, is an unaddressed question. Therefore, the use of a humanized model, such as the present AAV induced model of human *APOM* gene overexpression, and better, in species that exhibit similar lipoprotein profile than that of humans, deserves consideration.

Overall, our study highlights the relationship between APOM and obesity-associated low-grade inflammation and proposes adipose-derived APOM as a novel and local protective factor against AT inflammation.

#### Data availability statement

Data are available on reasonable request.

#### Acknowledgments

We are grateful to the subjects for their participation in the DiOGenes study. We thank Marie-Adeline Marques for the technical support and the CREFRE, especially animal care facilities (for breeding at Langlade site, and for experiments at Rangueil site), the platform for *in vivo* phenotyping, the I2MC cytometry and cell sorting facility (Genotoul-TRI), member of the national infrastructure France-BioImaging, and the Get Santé Genotoul platforms.

#### Competing interests

The authors have no conflicts of interest to declare.

#### Author contributions

G.T., N.V. conceptualization; L.F., L.M., investigation; L.F., M.C., S.P., L.D.C., M.B., C.C. methodology; E.B., resources; L.F., G.T. and N.V. formal analysis; G.T., N.V. supervision; L.F., G.T., NV writing-original draft preparation; L.F., M.C., S.P., L.D.C., M.B., L.M., E.B., C.C., C.M., G.T., N.V. writing-review and editing. C.M., N.V., funding acquisition.

GT and NV had primary responsibility for the final content; and all authors read and approved the final manuscript.

## References

1. Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease, *Nature reviews Immunology*. **11**, 85-97.
2. Fasshauer, M. & Bluher, M. (2015) Adipokines in health and disease, *Trends Pharmacol Sci*. **36**, 461-70.
3. Scheja, L. & Heeren, J. (2019) The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease, *Nature reviews Endocrinology*. **15**, 507-524.
4. Maeda, N., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. & Shimomura, I. (2020) Adiponectin, a unique adipocyte-derived factor beyond hormones, *Atherosclerosis*. **292**, 1-9.
5. Dahlback, B. & Nielsen, L. B. (2009) Apolipoprotein M affecting lipid metabolism or just catching a ride with lipoproteins in the circulation?, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. **66**, 559-64.
6. Luo, G., Zhang, X., Mu, Q., Chen, L., Zheng, L., Wei, J., Berggren-Soderlund, M., Nilsson-Ehle, P. & Xu, N. (2010) Expression and localization of apolipoprotein M in human colorectal tissues, *Lipids in health and disease*. **9**, 102.
7. Kober, A. C., Manavalan, A. P. C., Tam-Amersdorfer, C., Holmer, A., Saeed, A., Fanaee-Danesh, E., Zandl, M., Albrecher, N. M., Bjorkhem, I., Kostner, G. M., Dahlback, B. & Panzenboeck, U. (2017) Implications of cerebrovascular ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) and apolipoprotein M in cholesterol transport at the blood-brain barrier, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. **1862**, 573-588.
8. Sramkova, V., Berend, S., Siklova, M., Caspar-Bauguil, S., Carayol, J., Bonnel, S., Marques, M., Decaunes, P., Kolditz, C. I., Dahlman, I., Arner, P., Stich, V., Saris, W. H. M., Astrup, A., Valsesia, A., Rossmeislova, L., Langin, D. & Viguerie, N. (2019) Apolipoprotein M: a novel adipokine decreasing with obesity and upregulated by calorie restriction, *The American journal of clinical nutrition*. **109**, 1499-1510.
9. Ooi, E. M., Watts, G. F., Chan, D. C., Nielsen, L. B., Plomgaard, P., Dahlback, B. & Barrett, P. H. (2010) Association of apolipoprotein M with high-density lipoprotein kinetics in overweight-obese men, *Atherosclerosis*. **210**, 326-30.
10. Dullaart, R. P., Plomgaard, P., de Vries, R., Dahlback, B. & Nielsen, L. B. (2009) Plasma apolipoprotein M is reduced in metabolic syndrome but does not predict intima media thickness, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. **406**, 129-33.
11. Plomgaard, P., Dullaart, R. P., de Vries, R., Groen, A. K., Dahlback, B. & Nielsen, L. B. (2009) Apolipoprotein M predicts pre-beta-HDL formation: studies in type 2 diabetic and nondiabetic subjects, *Journal of internal medicine*. **266**, 258-67.
12. Ravnsborg, T., Andersen, L. L., Trabjerg, N. D., Rasmussen, L. M., Jensen, D. M. & Overgaard, M. (2016) First-trimester multimarker prediction of gestational diabetes mellitus using targeted mass spectrometry, *Diabetologia*.
13. Xu, N., Nilsson-Ehle, P. & Ahren, B. (2004) Correlation of apolipoprotein M with leptin and cholesterol in normal and obese subjects, *The Journal of nutritional biochemistry*. **15**, 579-82.
14. Wolfrum, C., Howell, J. J., Ndungo, E. & Stoffel, M. (2008) Foxa2 activity increases plasma high density lipoprotein levels by regulating apolipoprotein M, *The Journal of biological chemistry*. **283**, 16940-9.

15. Xu, N., Nilsson-Ehle, P., Hurtig, M. & Ahren, B. (2004) Both leptin and leptin-receptor are essential for apolipoprotein M expression in vivo, *Biochemical and biophysical research communications*. **321**, 916-21.
16. Nojiri, T., Kurano, M., Tokuhara, Y., Ohkubo, S., Hara, M., Ikeda, H., Tsukamoto, K. & Yatomi, Y. (2014) Modulation of sphingosine-1-phosphate and apolipoprotein M levels in the plasma, liver and kidneys in streptozotocin-induced diabetic mice, *Journal of diabetes investigation*. **5**, 639-48.
17. Obinata, H. & Hla, T. (2019) Sphingosine 1-phosphate and inflammation, *Int Immunol*. **31**, 617-625.
18. Yao Mattisson, I. & Christoffersen, C. (2021) Apolipoprotein M and its impact on endothelial dysfunction and inflammation in the cardiovascular system, *Atherosclerosis*. **334**, 76-84.
19. Li, T., Yang, L., Zhao, S. & Zhang, S. (2018) Correlation Between Apolipoprotein M and Inflammatory Factors in Obese Patients, *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. **24**, 5698-5703.
20. Tyden, H., Lood, C., Jonsen, A., Gullstrand, B., Kahn, R., Linge, P., Kumaraswamy, S. B., Dahlback, B. & Bengtsson, A. A. (2019) Low plasma concentrations of apolipoprotein M are associated with disease activity and endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Res Ther*. **21**, 110.
21. Larsen, T. M., Dalskov, S., van Baak, M., Jebb, S., Kafatos, A., Pfeiffer, A., Martinez, J. A., Handjieva-Darlenska, T., Kunesova, M., Holst, C., Saris, W. H. & Astrup, A. (2010) The Diet, Obesity and Genes (Diogenes) Dietary Study in eight European countries - a comprehensive design for long-term intervention, *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. **11**, 76-91.
22. Christoffersen, C., Ahnstrom, J., Axler, O., Christensen, E. I., Dahlback, B. & Nielsen, L. B. (2008) The signal peptide anchors apolipoprotein M in plasma lipoproteins and prevents rapid clearance of apolipoprotein M from plasma, *The Journal of biological chemistry*. **283**, 18765-72.
23. Dehondt, H., Marino, A., Butruille, L., Mogilenko, D. A., Nzoussi Loubota, A. C., Chavez-Talavera, O., Dorchie, E., Vallez, E., Haas, J., Derudas, B., Bongiovanni, A., Tardivel, M., Kuipers, F., Lefebvre, P., Lestavel, S., Tailleux, A., Dombrowicz, D., Caron, S. & Staels, B. (2023) Adipocyte-specific FXR-deficiency protects adipose tissue from oxidative stress and insulin resistance and improves glucose homeostasis, *Molecular metabolism*. **69**, 101686.
24. Jimenez, V., Munoz, S., Casana, E., Mallol, C., Elias, I., Jambrina, C., Ribera, A., Ferre, T., Franckhauser, S. & Bosch, F. (2013) In vivo adeno-associated viral vector-mediated genetic engineering of white and brown adipose tissue in adult mice, *Diabetes*. **62**, 4012-22.
25. Tani, M., Kawakami, A., Nagai, M., Shimokado, K., Kondo, K. & Yoshida, M. (2007) Sphingosine 1-phosphate (S1P) inhibits monocyte-endothelial cell interaction by regulating of RhoA activity, *FEBS letters*. **581**, 4621-6.
26. Blanchard, V., Garcon, D., Jaunet, C., Chemello, K., Billon-Crossouard, S., Aguesse, A., Garfa, A., Famchon, G., Torres, A., Le May, C., Pichelin, M., Bigot-Corbel, E., Lambert, G., Cariou, B., Hadjadj, S., Krempf, M., Bach-Ngohou, K. & Croyal, M. (2020) A high-throughput mass spectrometry-based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins, *Journal of lipid research*. **61**, 1128-1139.
27. Klimcakova, E., Roussel, B., Kovacova, Z., Kovacikova, M., Siklova-Vitkova, M., Combes, M., Hejnova, J., Decaunes, P., Maoret, J. J., Vedral, T., Viguerie, N., Bourlier, V., Bouloumie, A., Stich, V.

- & Langin, D. (2011) Macrophage gene expression is related to obesity and the metabolic syndrome in human subcutaneous fat as well as in visceral fat, *Diabetologia*. **54**, 876-87.
28. Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D. & Groop, L. C. (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes, *Nature genetics*. **34**, 267-73.
29. Vila, I. K., Badin, P. M., Marques, M. A., Monbrun, L., Lefort, C., Mir, L., Louche, K., Bourlier, V., Roussel, B., Gui, P., Grober, J., Stich, V., Rossmeislova, L., Zakaroff-Girard, A., Bouloumie, A., Viguerie, N., Moro, C., Tavernier, G. & Langin, D. (2014) Immune cell Toll-like receptor 4 mediates the development of obesity- and endotoxemia-associated adipose tissue fibrosis, *Cell reports*. **7**, 1116-29.
30. Kumaraswamy, S. B., Linder, A., Akesson, P. & Dahlback, B. (2012) Decreased plasma concentrations of apolipoprotein M in sepsis and systemic inflammatory response syndromes, *Crit Care*. **16**, R60.
31. Giles, D. A., Ramkhelawon, B., Donelan, E. M., Stankiewicz, T. E., Hutchison, S. B., Mukherjee, R., Cappelletti, M., Karns, R., Karp, C. L., Moore, K. J. & Divanovic, S. (2016) Modulation of ambient temperature promotes inflammation and initiates atherosclerosis in wild type C57BL/6 mice, *Molecular metabolism*. **5**, 1121-1130.
32. van der Stelt, I., Hoevenaars, F., Siroka, J., de Ronde, L., Friedecky, D., Keijer, J. & van Schothorst, E. (2017) Metabolic Response of Visceral White Adipose Tissue of Obese Mice Exposed for 5 Days to Human Room Temperature Compared to Mouse Thermoneutrality, *Front Physiol*. **8**, 179.
33. Lac, M., Tavernier, G. & Moro, C. (2023) Does housing temperature influence glucose regulation and muscle-fat crosstalk in mice?, *Biochimie*. **210**, 35-39.
34. Liu, L., Shi, Z., Ji, X., Zhang, W., Luan, J., Zahr, T. & Qiang, L. (2022) Adipokines, adiposity, and atherosclerosis, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. **79**, 272.
35. Taylor, E. B. (2021) The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity, *Clin Sci (Lond)*. **135**, 731-752.
36. Wang, M., Luo, G. H., Liu, H., Zhang, Y. P., Wang, B., Di, D. M., Zhan, X. H., Yu, Y., Yao, S., Zhang, X. Y. & Xu, N. (2019) Apolipoprotein M induces inhibition of inflammatory responses via the S1PR1 and DHCR24 pathways, *Molecular medicine reports*. **19**, 1272-1283.
37. Zhu, B., Luo, G. H., Feng, Y. H., Yu, M. M., Zhang, J., Wei, J., Yang, C., Xu, N. & Zhang, X. Y. (2018) Apolipoprotein M Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury via Sphingosine-1-Phosphate Signaling, *Inflammation*. **41**, 643-653.
38. Chirinos, J. A., Zhao, L., Jia, Y., Frej, C., Adamo, L., Mann, D., Shewale, S. V., Millar, J. S., Rader, D. J., French, B., Brandimarto, J., Margulies, K. B., Parks, J. S., Wang, Z., Seiffert, D. A., Fang, J., Sweitzer, N., Chistoffersen, C., Dahlback, B., Car, B. D., Gordon, D. A., Cappola, T. P. & Javaheri, A. (2020) Reduced Apolipoprotein M and Adverse Outcomes Across the Spectrum of Human Heart Failure, *Circulation*. **141**, 1463-1476.
39. He, Y., Chen, J., Ma, Y. & Chen, H. (2022) Apolipoproteins: New players in cancers, *Frontiers in pharmacology*. **13**, 1051280.
40. Kawai, T., Autieri, M. V. & Scalia, R. (2021) Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity, *Am J Physiol Cell Physiol*. **320**, C375-C391.

41. Chen, Y., Wang, X., Mai, J., Zhao, X., Liang, Y., Gu, M., Chen, Z., Nie, R. & Wang, J. (2013) C-reactive protein promotes vascular endothelial dysfunction partly via activating adipose tissue inflammation in hyperlipidemic rabbits, *Int J Cardiol.* **168**, 2397-403.
42. Malesza, I. J., Malesza, M., Walkowiak, J., Mussin, N., Walkowiak, D., Aringazina, R., Bartkowiak-Wieczorek, J. & Madry, E. (2021) High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota: A Narrative Review, *Cells.* **10**.
43. Fritsche, K. L. (2015) The science of fatty acids and inflammation, *Adv Nutr.* **6**, 293S-301S.
44. Kiran, S., Rakib, A., Kodidela, S., Kumar, S. & Singh, U. P. (2022) High-Fat Diet-Induced Dysregulation of Immune Cells Correlates with Macrophage Phenotypes and Chronic Inflammation in Adipose Tissue, *Cells.* **11**.
45. Frances, L., Croyal, M., Ruidavets, J.-B., Maraninchi, M., Combes, G., Raffin, J., de Souto Barreto, P., Ferrières, J., Blaak, E. E., Perret, B., Moro, C., Valéro, R., Martinez, L. O. & Viguerie, N. (2023) Association of circulating levels of apolipoprotein M and adiponectin with insulin sensitivity in overweight subjects and obese patients with weight loss surgery, *medRxiv*.
46. Gao, J. J., Hu, Y. W., Wang, Y. C., Sha, Y. H., Ma, X., Li, S. F., Zhao, J. Y., Lu, J. B., Huang, C., Zhao, J. J., Zheng, L. & Wang, Q. (2015) ApoM Suppresses TNF-alpha-Induced Expression of ICAM-1 and VCAM-1 Through Inhibiting the Activity of NF-kappaB, *DNA and cell biology.* **34**, 550-6.
47. Hoevenaars, F. P., Bekkenkamp-Grovenstein, M., Janssen, R. J., Heil, S. G., Bunschoten, A., Hoek-van den Hil, E. F., Snaas-Alders, S., Teerds, K., van Schothorst, E. M. & Keijer, J. (2014) Thermoneutrality results in prominent diet-induced body weight differences in C57BL/6J mice, not paralleled by diet-induced metabolic differences, *Molecular nutrition & food research.* **58**, 799-807.
48. Tian, X. Y., Ganeshan, K., Hong, C., Nguyen, K. D., Qiu, Y., Kim, J., Tangirala, R. K., Tontonoz, P. & Chawla, A. (2016) Thermoneutral Housing Accelerates Metabolic Inflammation to Potentiate Atherosclerosis but Not Insulin Resistance, *Cell metabolism.* **23**, 165-78.
49. Christoffersen, C., Federspiel, C. K., Borup, A., Christensen, P. M., Madsen, A. N., Heine, M., Nielsen, C. H., Kjaer, A., Holst, B., Heeren, J. & Nielsen, L. B. (2018) The Apolipoprotein M/S1P Axis Controls Triglyceride Metabolism and Brown Fat Activity, *Cell reports.* **22**, 175-188.
50. Nga, H. T., Moon, J. S., Tian, J., Lee, H. Y., Kim, S. H., Lee, Y. S., Jeon, J. H. & Yi, H. S. (2021) Interleukin-10 Attenuates Liver Fibrosis Exacerbated by Thermoneutrality, *Front Med (Lausanne).* **8**, 672658.
51. Nunes, J. R. C., Smith, T. K. T., Ghorbani, P., O'Dwyer, C., Trzaskalski, N. A., Dergham, H., Pember, C., Kilgour, M. K., Mulvihill, E. E. & Fullerton, M. D. (2023) Thermoneutral housing does not accelerate metabolic dysfunction-associated fatty liver disease in male or female C57Bl/6J mice fed a Western diet, *American journal of physiology Endocrinology and metabolism.* **325**, E10-E20.
52. Abboud, M., Gordon-Thomson, C., Hoy, A. J., Balaban, S., Rybchyn, M. S., Cole, L., Su, Y., Brennan-Speranza, T. C., Fraser, D. R. & Mason, R. S. (2014) Uptake of 25-hydroxyvitamin D by muscle and fat cells, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* **144 Pt A**, 232-6.
53. Ahnstrom, J., Faber, K., Axler, O. & Dahlback, B. (2007) Hydrophobic ligand binding properties of the human lipocalin apolipoprotein M, *Journal of lipid research.* **48**, 1754-62.
54. Elsoe, S., Ahnstrom, J., Christoffersen, C., Hoofnagle, A. N., Plomgaard, P., Heinecke, J. W., Binder, C. J., Bjorkbacka, H., Dahlback, B. & Nielsen, L. B. (2012) Apolipoprotein M binds oxidized phospholipids and increases the antioxidant effect of HDL, *Atherosclerosis.* **221**, 91-7.

55. D'Angelo, S., Motti, M. L. & Meccariello, R. (2020) omega-3 and omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids, Obesity and Cancer, *Nutrients*. **12**.
56. Mucida, D. & Cheroutre, H. (2007) TGFbeta and retinoic acid intersect in immune-regulation, *Cell Adh Migr*. **1**, 142-4.
57. Yore, M. M., Syed, I., Moraes-Vieira, P. M., Zhang, T., Herman, M. A., Homan, E. A., Patel, R. T., Lee, J., Chen, S., Peroni, O. D., Dhaneshwar, A. S., Hammarstedt, A., Smith, U., McGraw, T. E., Saghatelian, A. & Kahn, B. B. (2014) Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects, *Cell*. **159**, 318-32.
58. Kaabia, Z., Poirier, J., Moughaizel, M., Aguesse, A., Billon-Crossouard, S., Fall, F., Durand, M., Dagher, E., Krempf, M. & Croyal, M. (2018) Plasma lipidomic analysis reveals strong similarities between lipid fingerprints in human, hamster and mouse compared to other animal species, *Scientific reports*. **8**, 15893.
59. Croyal, M., Billon-Crossouard, S., Goulitquer, S., Aguesse, A., Leon, L., Fall, F., Chetiveaux, M., Moyon, T., Blanchard, V., Ouguerram, K., Lambert, G., Nobecourt, E. & Krempf, M. (2018) Stable Isotope Kinetic Study of ApoM (Apolipoprotein M), *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **38**, 255-261.
60. Kurano, M., Hara, M., Tsuneyama, K., Sakoda, H., Shimizu, T., Tsukamoto, K., Ikeda, H. & Yatomi, Y. (2014) Induction of insulin secretion by apolipoprotein M, a carrier for sphingosine 1-phosphate, *Biochimica et biophysica acta*. **1841**, 1217-26.
61. Kurano, M., Tsukamoto, K., Shimizu, T., Kassai, H., Nakao, K., Aiba, A., Hara, M. & Yatomi, Y. (2020) Protection Against Insulin Resistance by Apolipoprotein M/Sphingosine-1-Phosphate, *Diabetes*. **69**, 867-881.
62. Corvera, S. (2021) Cellular Heterogeneity in Adipose Tissues, *Annu Rev Physiol*. **83**, 257-278.
63. Sevvana, M., Kassler, K., Ahnstrom, J., Weiler, S., Dahlback, B., Sticht, H. & Muller, Y. A. (2010) Mouse ApoM displays an unprecedented seven-stranded lipocalin fold: folding decoy or alternative native fold?, *Journal of molecular biology*. **404**, 363-71.

## **Figures legends**

### **Fig. 1: Association between weight gain-induced inflammation and APOM expression in AT and liver in humans and mice.**

(A) Correlation between plasma hs-CRP and *APOM* gene expression in abdominal SCAT from subjects with obesity or overweight (n = 300). Pearson correlation coefficient is presented. Dotted lines represent 95% confidence interval. (B) Mice body weight after a NCD or a HFD for 1, 3 or 6 months (n = 10 per group). White dots represent HFD-fed mice and black dots NCD-fed mice. (C) Principal component analysis of inflammatory gene expression in HFD-fed mice according to housing temperature, diet duration and tissue type (n = 10 per group). (D) Centroids of inflammatory genes expression in perigonadal, subcutaneous AT and liver of mice housed at standard and neutral temperature, after 1, 3 or 6 months of NCD or HFD (n = 10 per group). (E) *Apom* expression in perigonadal AT and liver of mice housed at standard and neutral temperature, after 3 months of NCD or HFD (n = 10 per group). Results were analysed by Mann-Whitney's test between NCD and HFD groups at each time. Results are presented as mean  $\pm$  SEM and were analyzed by Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc tests. \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ , \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ . AU, arbitrary unit; hs-CRP, high sensitive C-reactive protein; HFD, high fat diet; NCD, normal chow diet; PGAT, perigonadal adipose tissue; SCAT, subcutaneous adipose tissue.

### **Fig. 2: Effect of *Apom* deficiency on AT inflammation**

Mice were fed a HFD for 3 months and were housed at standard or neutral temperature. (A) Plasma CRP dosage in mice housed at standard temperature (n = 6-17 per group). Dark bars, WT mice; white bars, *Apom*<sup>-/-</sup> mice. Results were analyzed by Kruskal-Wallis test. (B) Principal component analysis of phenotypic data centroids according to genotype, sex and housing temperature. (C) Correlation between plasma CRP and centroids calculated on inflammatory gene expression in PGAT or liver of WT and *Apom*<sup>-/-</sup> mice (n = 60). Spearman correlation coefficient is presented. (D) Principal component analysis of inflammatory genes expression according to sex, housing temperature and tissue type. (E) Inflammatory genes expression in PGAT and liver of mice housed at standard and neutral temperature

(n = 29-32). Dark bars, WT mice; white bars, *Apom*<sup>-/-</sup> mice. Data are expressed as percentage of WT mice and were analyzed by Mann-Whitney test. Results are presented as mean ± SEM. (F) Number of CLS per mm<sup>2</sup> of PGAT in WT and *Apom*<sup>-/-</sup> mice fed a HFD for 3 months (n = 6-17 per group). (G) Flow cytometry analyses performed on PGAT of WT (n = 10) and *Apom*<sup>-/-</sup> (n = 21) female mice fed a HFD (n = 23) or NCD (n = 8) for 3 months. The pro-inflammatory macrophages (CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) absolute number is expressed per milligram of PGAT. Data were analyzed by two-way ANOVA. AT, adipose tissue; CLS, crown-like structures; CRP, C-reactive protein; HFD, high fat diet; NCD, normal chow diet; PGAT, perigonadal adipose tissue; SCAT, subcutaneous adipose tissue. \*, *P* < 0.05.

**Fig. 3: Effect of *APOM* overexpression on AT inflammation.**

PGAT of mice were transduced with AAVs encoding MCHERRY (AAV-*MCHERRY*) or human APOM (AAV-*APOM*), and fed a HFD for 5 weeks (n = 26-28 per group). (A) Expression of *MCHERRY* and *APOM* in PGAT. (B) Human APOM protein level in PGAT. A representative Western-blot with 30 µg in each lane is shown. Results are expressed as percentage of the total protein (AAV-*MCHERRY*, n = 28; AAV-*APOM*, n = 26). (C) Expression of murine gene *Apom* in PGAT (n = 26-28 per group). (D) Inflammatory genes expression in PGAT of mice are expressed as percentage of saline group (n = 26-28 per group). (E) Number of CLS per mm<sup>2</sup> of PGAT (n = 26-28 per group). In grey, AAV-*MCHERRY* transduction, in white, AAV-*APOM* transduction. Results are presented as mean ± SEM and were analyzed by Mann-Whitney test between AAV-*MCHERRY* and AAV-*APOM* groups. AAV, adeno-associated virus; AT, adipose tissue; AU, arbitrary units; CLS, crown-like structures; HFD, high fat diet; PGAT, perigonadal adipose tissue. \*, *P* < 0.05, \*\*, *P* < 0.01, \*\*\*\*, *P* < 0.0001.

**Fig. 4: Effect of *APOM* overexpression on adipocytes and macrophages.**

hMADS cells were transduced with AAVs encoding APOM (AAV-*APOM*) or MCHERRY (AAV-*MCHERRY*), then ThP-1 cells were treated with conditioned media from hMADS cells before polarization (n = 9). (A) Expression of *MCHERRY* and *APOM* in AAV-transduced hMADS cells (n = 8-10 per condition). (B) APOM concentration in conditioned media from AAV-transduced hMADS

cells. (C) Inflammatory cytokines expression in transduced hMADS cells expressed as percentage of non-transduced cells. Grey bars represent AAV-*MCHERRY* transduced hMADS cells, white bars represent AAV-*APOM* transduced hMADS cells. (D) Inflammatory cytokines expression in pro-inflammatory polarized ThP-1 cells with conditioned media from hMADS cells (n = 9). Data are expressed as percentage of non-polarized ThP-1. (E) Ratios of inflammatory cytokines expression in ThP-1 with conditioned media from hMADS cells and S1P, on gene expression in ThP-1 without S1P (n = 5-6 per condition). Grey bars represent conditioned media from hMADS cells transduced with AAV-*MCHERRY*; white bars represent conditioned media from hMADS cells transduced with AAV-*APOM*. Results are presented as mean  $\pm$  SEM and were analyzed by Mann-Whitney test between AAV-*MCHERRY* and AAV-*APOM* groups. \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ , \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ . AAV, adeno-associated virus; AU, arbitrary unit; NTC, non-transduced cells; S1P, sphingosine-1-phosphate.

Figure 1

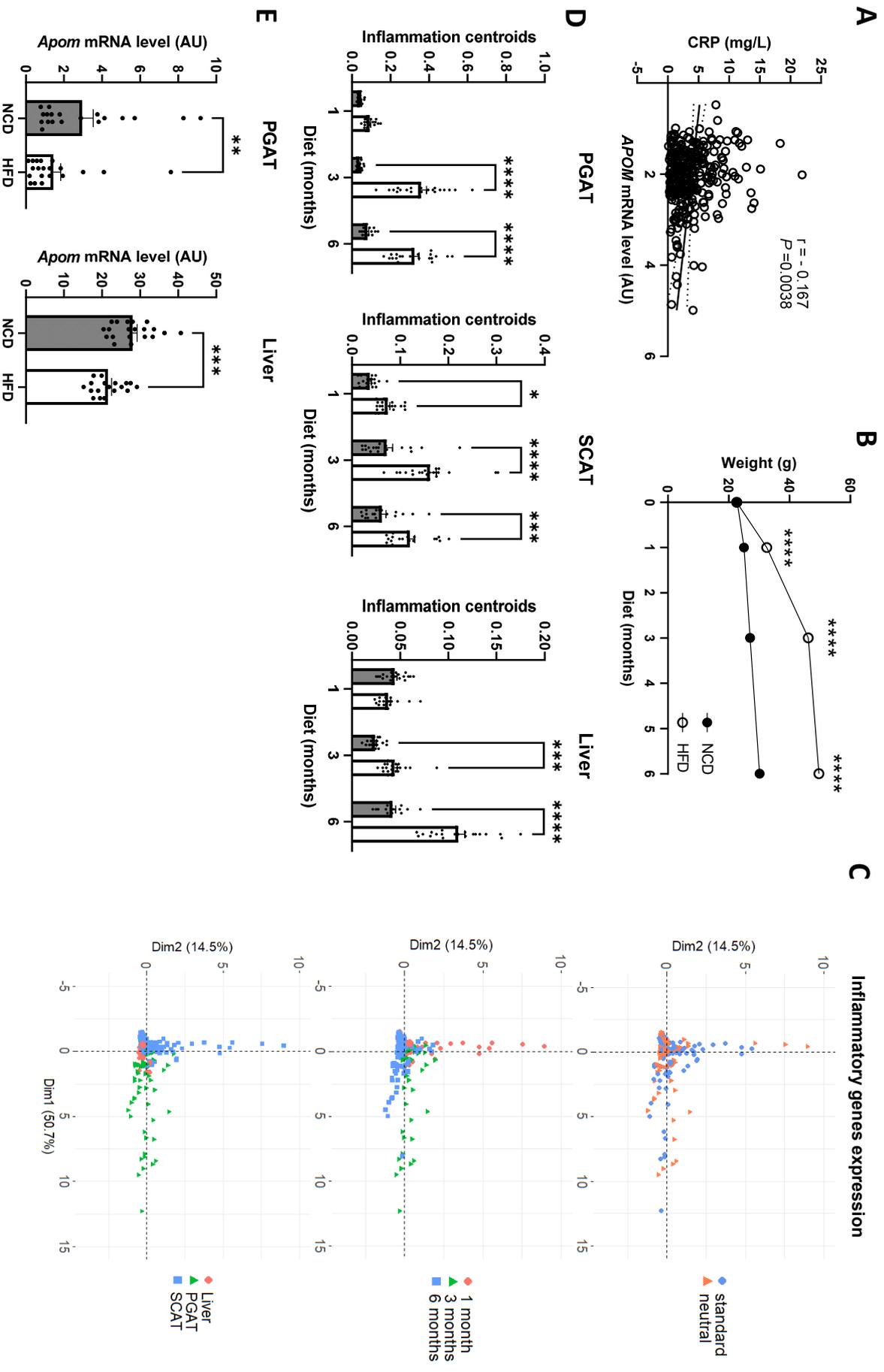


Figure 2

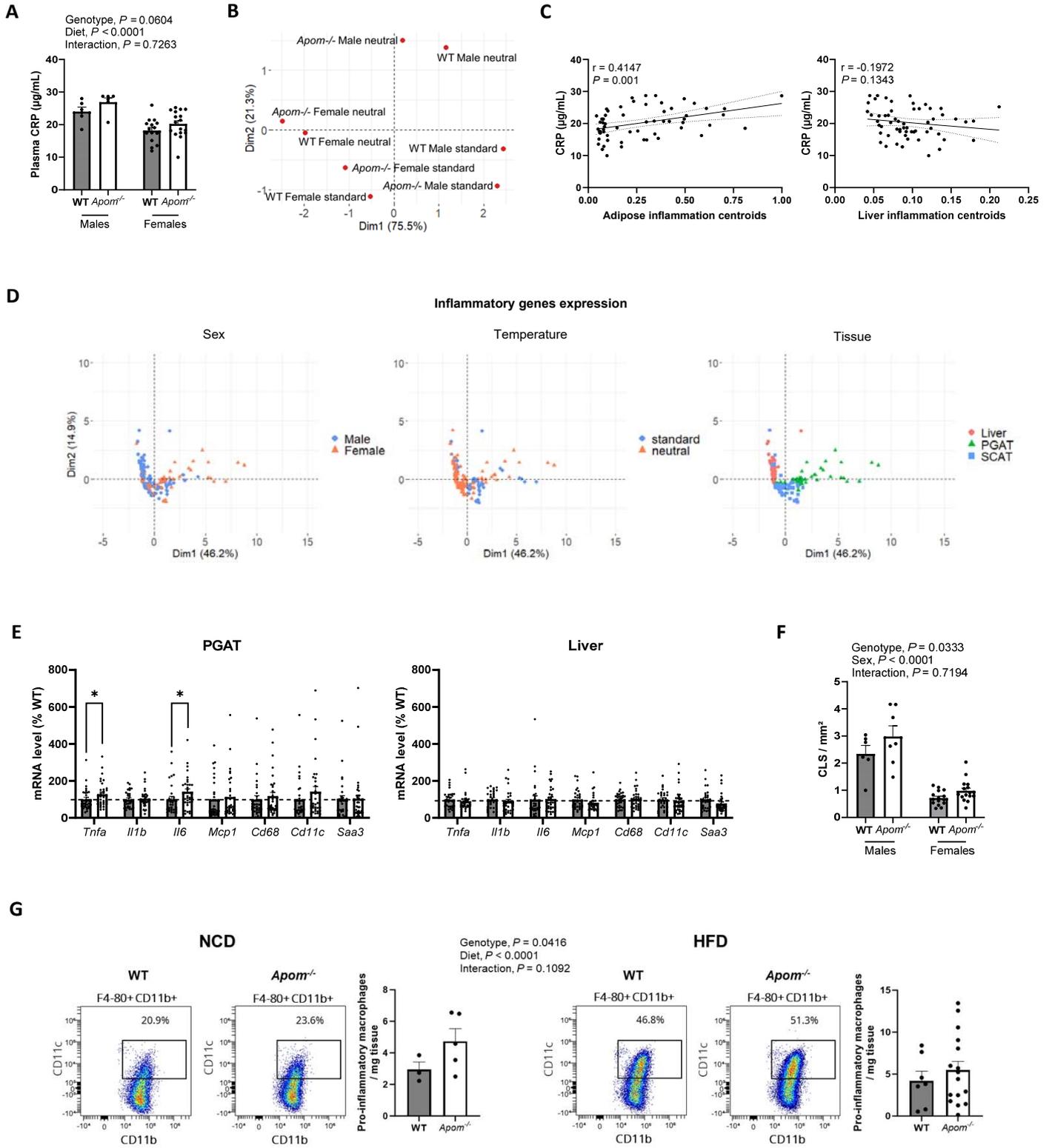


Figure 3

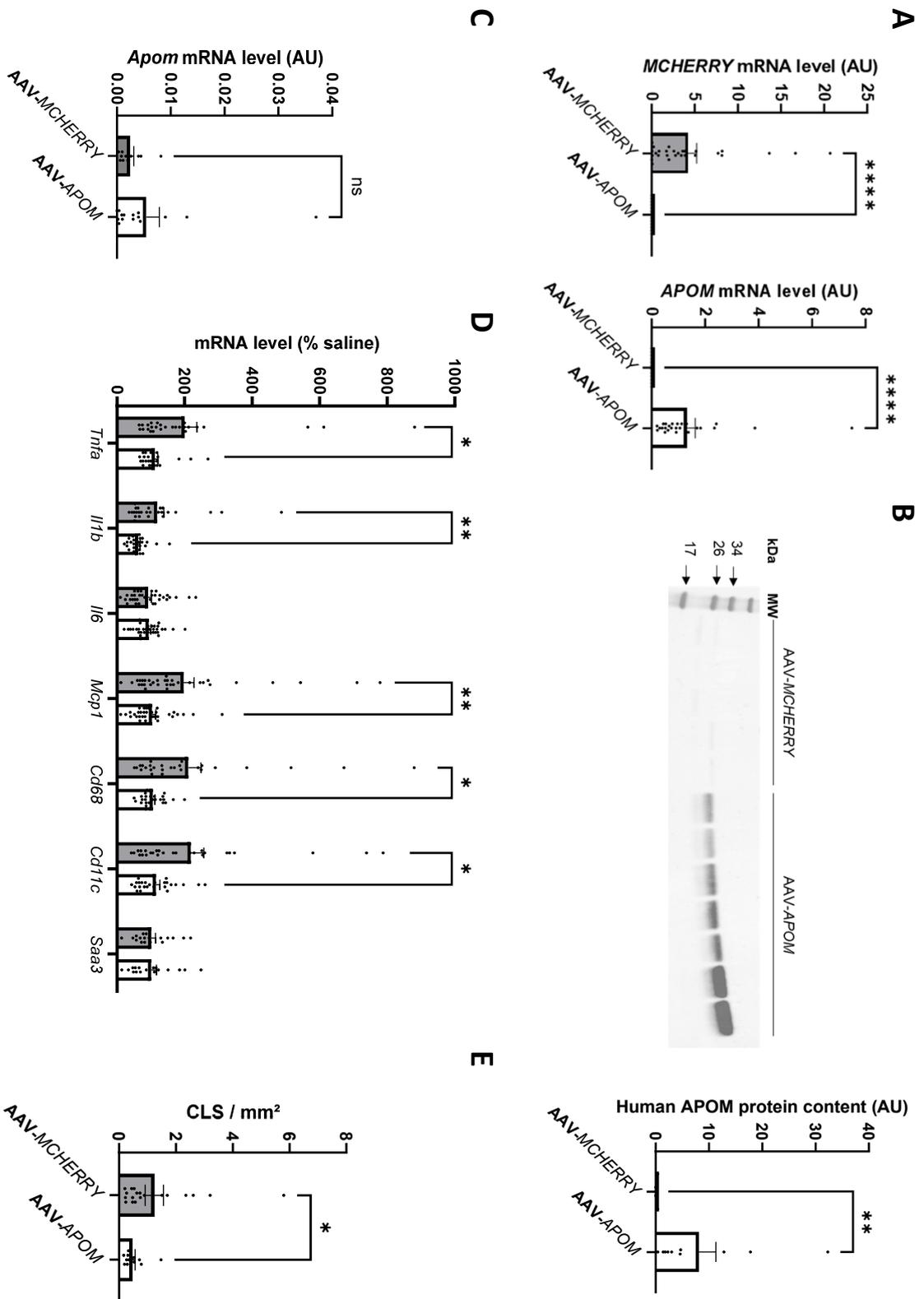
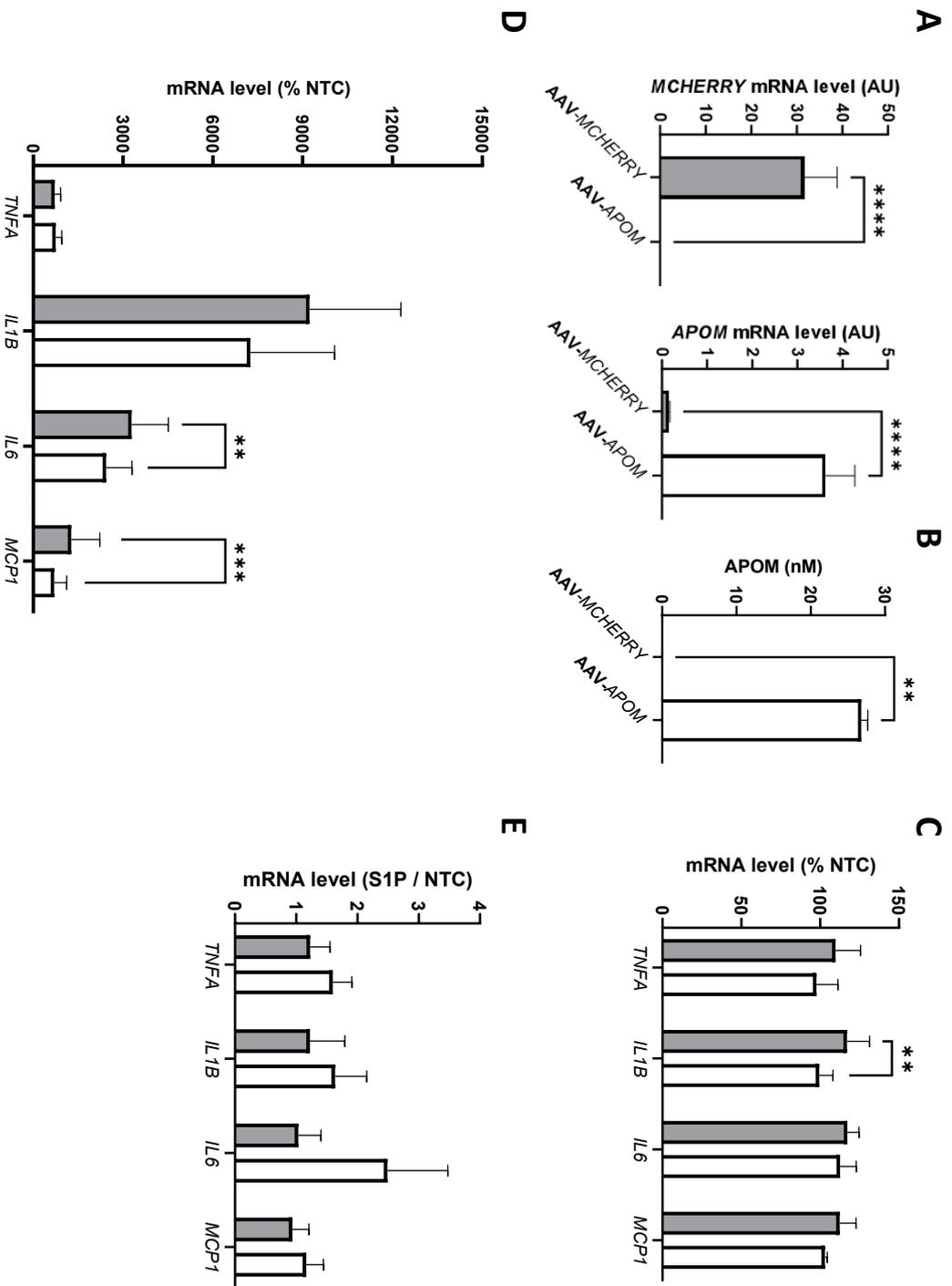


Figure 4



## Supplemental data

**Table S1: List of primers and Assays On Demand for gene expression studies.**

<b>Gene</b>	<b>Primer forward sequence</b>	<b>Primer reverse sequence</b>
Murine <i>Tnfa</i>	CTGAACTTCGGGGTGATCGG	GTGGTTTGCTACGACGTGGG
Murine <i>Il-1β</i>	CAGGCAGGCAGTATCACTCA	AGGCCACAGGTATTTGTGCG
Murine <i>Il-6</i>	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC	GTGTAATTAAGCGCCGACTTG
Murine <i>Mcp-1</i>	ACTGAAGCCAGCTCTCTCTTCCTC	TTCCTTCTTGGGGTCAGCACAGAC
Murine <i>Cd68</i>	CTTCCCACAGGCAGCACAG	AATGATGAGAGGCAGCAAGAGG
Murine <i>Cd11c</i>	AGAGCCAGAACTTCCCAACTG	TCTGAAGCTGGCTCATCACAG
Murine <i>Saa3</i>	GAACTATGATGCTGCCCGGA	TTGGCAAACCTGGTCAGCTCT
Murine <i>Hprt</i>	CAGACTGAAGAGCTACTGTAATGA	CTTTCCAGTTAAAGTTGAGAGATCA
Murine <i>Tbp</i>	GGAATTGTACCGCAGCTTCAAA	GATGACTGCAGCAAATCGCTT
<i>mcherry</i>	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	TCGCCCTCGATCTCGAACTC
	<b>Assay On Demand number</b>	
Murine <i>Apom</i>	Mm00444525_m1	
Human <i>APOM</i>	Hs00219533_m1	
Human <i>TNFα</i>	Hs00174128_m1	
Human <i>IL-1β</i>	Hs00174097_m1	
Human <i>IL-6</i>	Hs00985639_m1	
Human <i>MCP-1</i>	Hs00234140_m1	
Human <i>PUM1</i>	Hs00472881_m1	
Human <i>LRP10</i>	Hs01047362_m1	
Human <i>PSMC4</i>	Hs00197826_m1	

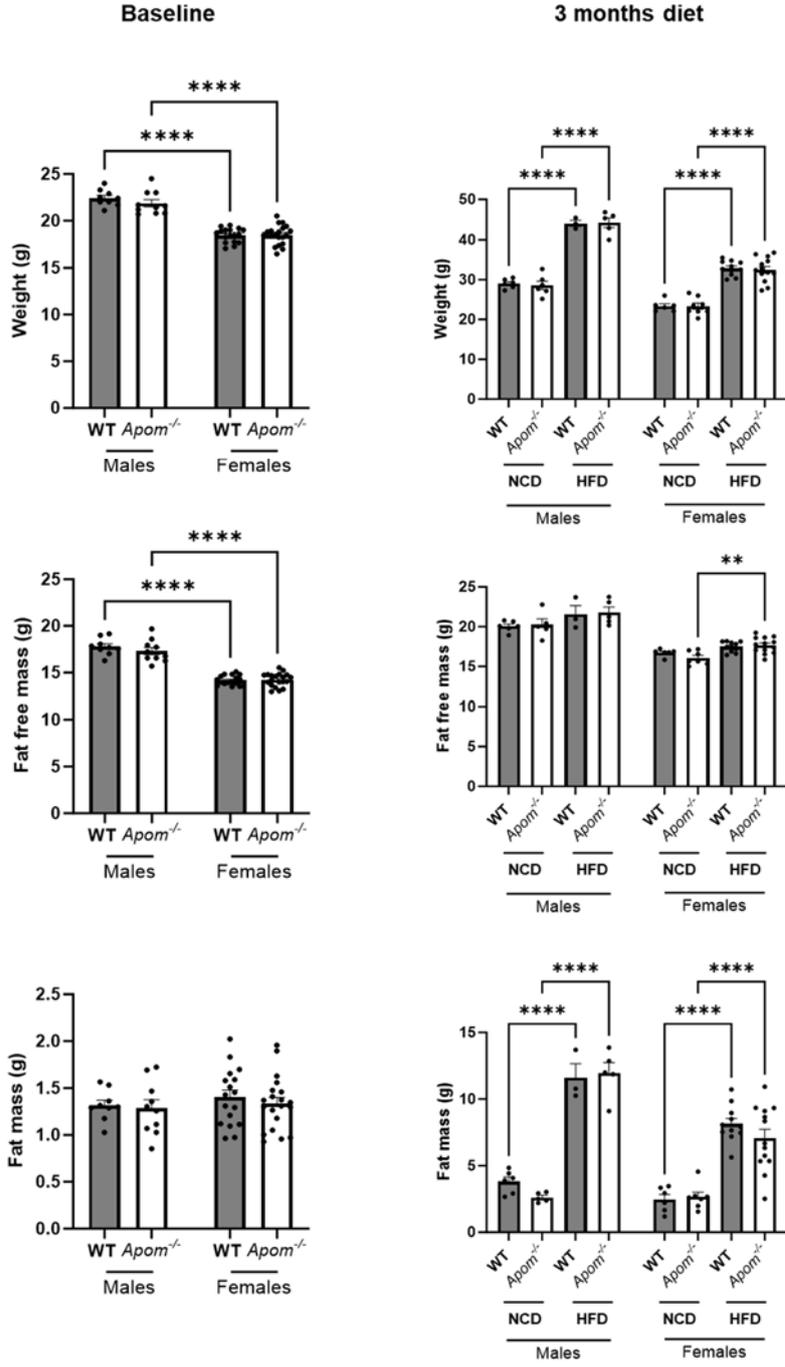
**Table S2. Anthropometric and clinical characteristics of the 300 individuals.**

	Mean (SD)
BMI, kg/m <sup>2</sup>	34.1 (4.7)
Fat mass, % body weight	39.3 (7.5)
Waist circumference, cm	106.0 (12.0)
Triglycerides, g/L	1.36 (0.64)
Total cholesterol, g/L	4.93 (0.99)
LDL-C, g/L	3.05 (0.84)
HDL-C, g/L	1.25 (0.35)
Fasting glucose, mmol/L	5.1 (0.6)
Insulin, IU/L	10.2 (4.9)
HOMA-IR	2.3 (1.2)
hs-CRP, mg/L	3.8 (3.3)
Systolic blood pressure, mm Hg	126 (14)
Diastolic blood pressure, mmHg	78 (11)

101 men and 199 women with bioclinical investigation and needle subcutaneous abdominal adipose tissue biopsies.

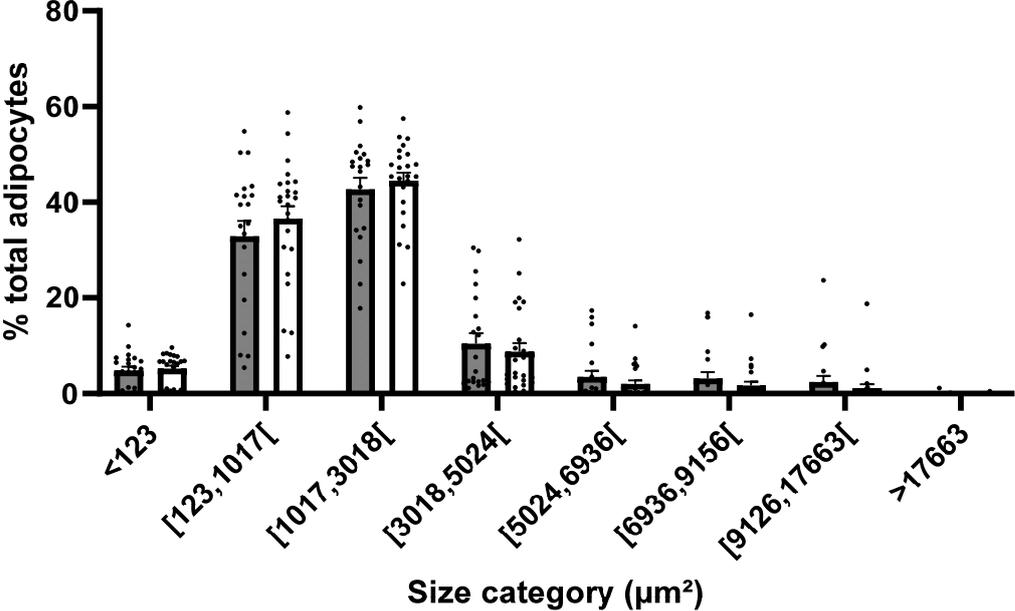
hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance.

Figure S1: Body composition of *Apom*<sup>-/-</sup> mice before and after a 3-month HFD.



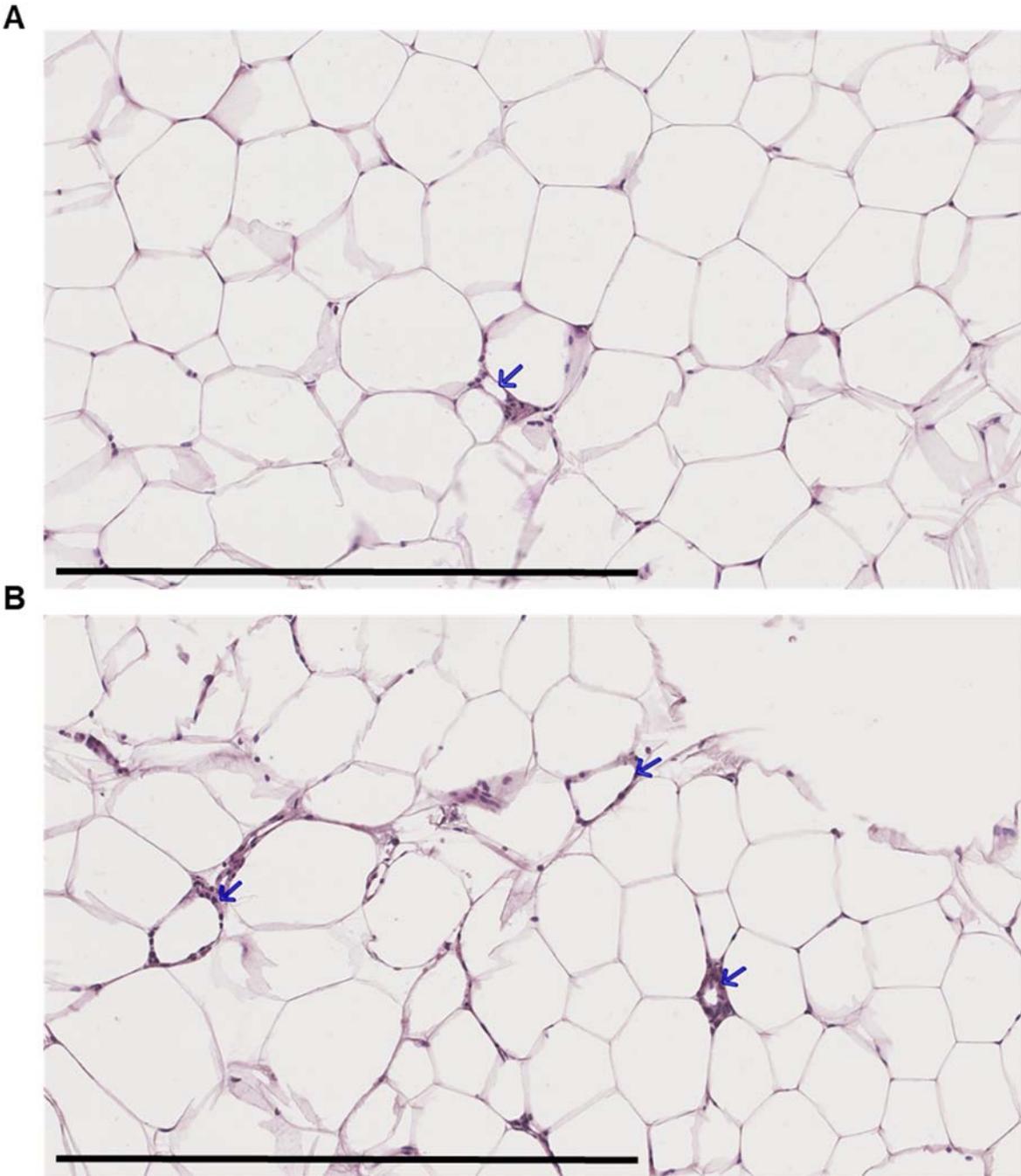
Body weight, fat free mass and fat mass of mice before and after 3 months of NCD or HFD (n = 3-13 per group). Grey bars, WT mice; white bars, *Apom*<sup>-/-</sup> mice. Results are presented as mean ± SEM and were analyzed by Mann-Whitney’s test within each group. HFD, high fat diet; NCD, normal chow diet; WT, wildtype.

Figure S2: Adipocyte size in the perigonadal adipose tissue of *Apom*<sup>-/-</sup> and WT mice after HFD.



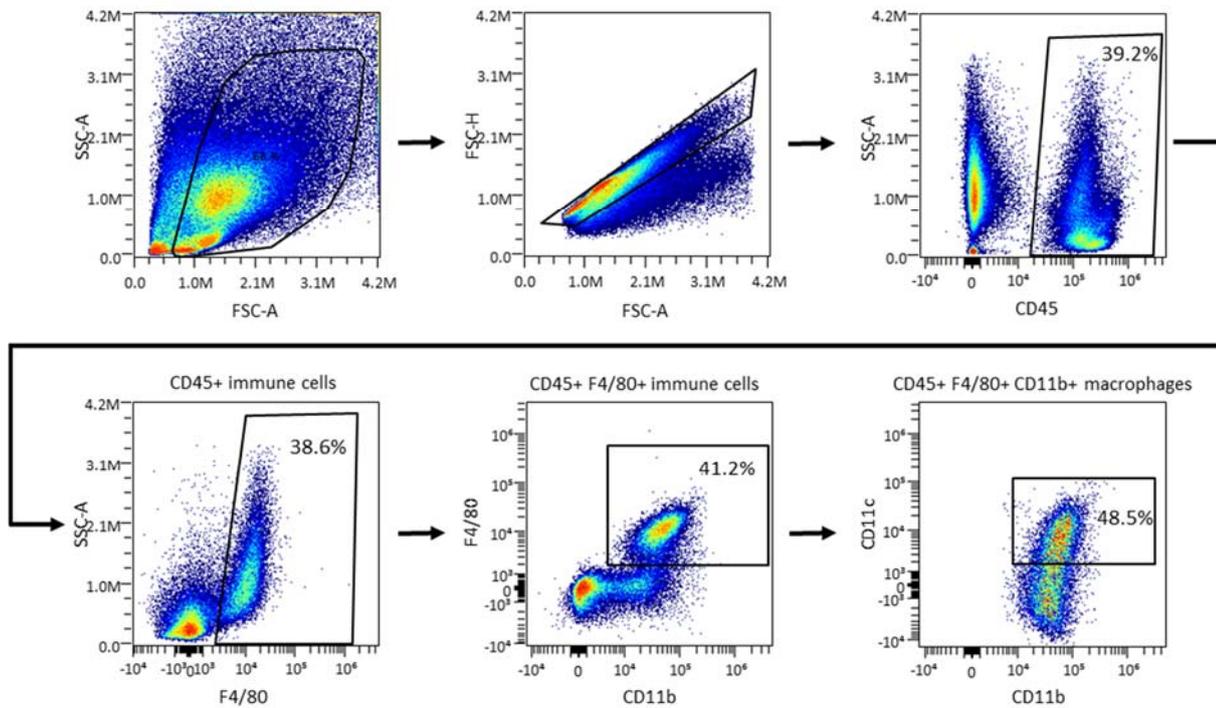
Distribution of the adipocyte sizes in the perigonadal fat pad of mice after 3 months of 60 % HFD. Grey bars represent WT mice (n=21); white bars, *Apom*<sup>-/-</sup> mice (n=24). Results are presented as mean ± SEM and were analyzed by Chi-square test. HFD, high fat diet; WT, wildtype.

**Figure S3: Representative light microscopic image of crown-like structures in the perigonadal adipose tissue of *Apom*<sup>-/-</sup> and WT mice.**



Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. A, PGAT of a WT mouse; B, PGAT of an *Apom*<sup>-/-</sup> mouse. Bar: 500 μm. Blue arrows indicate CLS. CLS, crown-like structures; PGAT, perigonadal adipose tissue; WT, wildtype.

**Figure S4: Gating strategy to identify pro-inflammatory macrophages in SVF of perigonadal adipose tissue from *Apom*<sup>-/-</sup> and WT mice.**



Displayed pictures were acquired for a HFD-fed WT mice. Size and granularity of cells from SVF were analyzed by FSC and SSC using an Aurora Cell Sorter flow cytometer. Pro-inflammatory macrophages were defined as CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> cells. FSC, forward scatter; HFD, high fat diet; SSC, side scatter; SVF, stromal vascular fraction; WT, wildtype.

## RÉSUMÉ en anglais

Obesity is a disease characterized by excessive expansion of adipose tissue. In the context of obesity, adipokines' secretion by adipose tissue is disrupted and chronic low-grade inflammation, both local and systemic, is observed. Apolipoprotein M (ApoM) has recently been identified as an adipokine. In humans, the *APOM* gene is less expressed in the adipose tissue of overweight individuals, those suffering from obesity or those presenting a metabolic syndrome than in the adipose tissue of normal-weight individuals, suggesting a beneficial effect of ApoM on the disturbances associated with excess body fat. ApoM transports sphingosine-1-phosphate (S1P) and retinol, hydrophobic ligands known for their anti-inflammatory properties. Here we explored a role for ApoM in adipose tissue inflammation. We studied i) the effect of *Apom* deficiency on mice after three months of high-fat diet to induce inflammation and ii) the effect of *APOM* overexpression in adipose tissue *in vivo*. *Apom* deficiency is accompanied by local inflammation associated with the expansion of adipose tissue during a lipid-enriched diet. This was not associated with a change in the body composition of the animals. Overexpression of *APOM* in adipose tissue prevents the expression of markers of inflammation induced by the hyperlipid diet. In conclusion, this study suggests a role for ApoM in preventing inflammation in adipose deposits.

# RÉSUMÉ en français

---

L'obésité est une maladie caractérisée par une expansion excessive du tissu adipeux. Dans un contexte d'obésité, la sécrétion des adipokines par le tissu adipeux est perturbée et une inflammation chronique de bas grade, locale et systémique, est observée. L'Apolipoprotéine M (ApoM) a récemment été identifiée comme une adipokine. Chez l'Homme, le gène *APOM* est moins exprimé dans le tissu adipeux des individus en surpoids, atteints d'obésité ou présentant un syndrome métabolique que dans le tissu adipeux d'individus normo-pondérés, suggérant un effet bénéfique de l'ApoM sur les perturbations liées à l'excès de masse grasse. L'ApoM transporte la sphingosine-1-phosphate (S1P) et le rétinol, des ligands hydrophobes connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Nous avons exploré ici un rôle de l'ApoM dans l'inflammation du tissu adipeux. Nous avons pour cela étudié i) l'effet d'une déficience en *Apom* chez la souris après trois mois d'un régime enrichi en lipides afin d'induire une inflammation et ii) l'effet d'une surexpression de l'*APOM* dans le tissu adipeux *in vivo*. La déficience en *Apom* s'accompagne d'une inflammation locale en lien avec l'expansion du tissu adipeux au cours d'un régime enrichi en lipides. Ceci n'est pas associé à une modification de la composition corporelle des animaux. La surexpression de l'*APOM* dans le tissu adipeux prévient l'expression des marqueurs de l'inflammation induite par le régime hyperlipidique. Pour conclure, cette étude suggère un rôle de l'ApoM dans la prévention de l'inflammation dans les dépôts adipeux.

---

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE** : PHARMACIE

---

**MOTS-CLÉS** : Obésité, Tissu adipeux, Adipocyte, Inflammation, Apolipoprotéine M

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR** :

Université Toulouse III Paul Sabatier  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques  
35, chemin des Maraîchers  
31062 TOULOUSE CEDEX 09

---

**Directeur de thèse** : FRANCES Laurie