



# Caractérisation Phénotypique et Fonctionnelle des trois Sous Populations de Monocytes dans le Cadre de l'Obésité chez l'Homme

Estelle Pécheux Devêvre

► **To cite this version:**

Estelle Pécheux Devêvre. Caractérisation Phénotypique et Fonctionnelle des trois Sous Populations de Monocytes dans le Cadre de l'Obésité chez l'Homme. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. <NNT : 2015PA066538>. <tel-01319859>

**HAL Id: tel-01319859**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01319859>**

Submitted on 23 May 2016

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

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

# Université Pierre et Marie Curie

ED 394 - Ecole Doctorale  
Physiologie Physiopathologie et Thérapeutique  
UPMC Sorbonne Universités

*INSERM UMRS 1138 Eq 13 « Microenvironnement Immunitaire et Tumeurs »*

*INSERM UMRS U1166 Eq 6 « Nutriomics »*

## **Caractérisation Phénotypique et Fonctionnelle des trois Sous Populations de Monocytes dans le Cadre de l'Obésité chez l'Homme**

Par Estelle Pécheux Devêvre

Thèse de doctorat

Dirigée par le Prof. I. Cremer et le Dr. C. Poitou Bernert

Présentée et soutenue publiquement le 30/11/2015

Devant un jury composé de :

Prof. F. Berenbaum	(PU-PH)	Président
Dr. S. Ledoux	(MCU-PH)	Rapporteur
Dr. A. Lehuen	(DR)	Rapporteur
Dr. E. Gautier	(CR)	Examineur
Dr. L. Yvan-Charvet	(DR)	Examineur
Prof. I. Cremer	(PU)	Directeur
Dr. C. Poitou Bernert	(MCU-PU)	Directeur

## **REMERCIEMENTS**

J'adresse mes plus sincères remerciements :

à Isabelle Cremer et Christine Poitou pour leur encadrement rigoureux et leur patience ;

à Martine Lelièvre-Pégorier et Catherine Fridman pour avoir soutenu mon projet de thèse ;

à Hélène Fohrer-Ting et Christophe Klein pour leur soutien et leur compréhension ;

à l'ensemble des collègues du Centre de Recherche des Cordeliers et de la Pitié-Salpêtrière ;

à ma famille, et plus particulièrement à Louis et Olivier.

## RESUME

Les monocytes détectent des signaux métaboliques circulants qu'ils traduisent en signaux immunologiques. ils infiltrent les tissus inflammés et sont également les précurseurs des macrophages. Dans l'obésité, la fréquence, le nombre, le phénotype et la fonctionnalité des sous populations de monocytes ( $CD14^{++}CD16^{-}$  [CM],  $CD14^{++}CD16^{+}$  [IM] et  $CD14^{+}CD16^{++}$  [NCM]) sont spécifiquement modulés. Le phénotype des monocytes est pro-inflammatoire avec une plus forte réponse à la stimulation de TLR4 et de TLR8. Nos travaux suggèrent une capacité migratoire accrue des CM et des IM. La comparaison du transcriptome des sous populations chez des sujets obèses et des témoins, révèle une signature spécifique de chaque sous population montrant un plus fort impact de l'obésité sur les CM. Ils soutiendraient l'inflammation en modulant des gènes impliqués dans la signalisation cellulaire. Ils migreraient avec les IM vers les tissus inflammés. Les NCM resteraient plus longtemps dans la circulation où leur fonction de « patrouilleurs » serait accrue. Les gènes les plus modulés par les CM et les IM, respectivement Clusterine et CDGSH iron sulfur domain 1 sont des ponts entre la réponse immunitaire, le métabolisme et la réponse au stress. L'étude des « tops » gènes dont l'expression est la plus fortement modulée et des fonctions les plus probablement modulées révèle que le métabolisme des monocytes serait modifié dans l'obésité. Ce travail ouvre des perspectives concernant : 1) une éventuelle composante auto-immune de l'inflammation de bas grade et 2) des relations entre des modifications du métabolisme des monocytes et leur fonctionnalité.

# SOMMAIRE

<b>Abbréviations</b>	5
<b>I. Introduction</b>	7
<b>A. Obésité et inflammation bas grade</b>	9
1. L'inflammation systémique	9
<i>a. Les marqueurs moléculaires</i>	10
<i>b. Les cellules immunitaires circulantes</i>	11
➤ Les granulocytes	11
➤ Les lymphocytes T et B	14
2. L'Inflammation tissulaire	15
<i>a. Le tissu adipeux</i>	15
➤ Les macrophages	16
➤ Les neutrophiles, les mastocytes et les éosinophiles	18
➤ Les cellules NK-T et NK	18
➤ Les lymphocytes T	19
➤ Les lymphocytes B	21
<i>b. Le foie et les muscles</i>	23
<i>c. L'intestin</i>	23
<i>d. Le pancréas</i>	24
<i>e. L'hypothalamus</i>	24
3. Les mécanismes de l'inflammation au cours de l'obésité	25
<i>a. Les conséquences de la sécrétion des cytokines induite par l'obésité</i>	25
<i>b. Les acides gras comme inducteur des voies de signalisation de l'inflammation</i>	26
➤ Les TLR et l'inflammasome	26
➤ Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosome (PPAR)	28
➤ Les céramides et les lipides intracellulaires dans l'inflammation	30
<i>c. Autres mécanismes intervenant dans l'inflammation de bas grade caractérisant l'obésité</i>	30
➤ Le stress du réticulum endoplasmique et des kinases C-Jun N-terminal activées par le stress (JNK)	30
➤ L'hypoxie	31
<b>B. Le rôle des monocytes dans l'obésité</b>	33
1. Monocytes humains : généralités	33
2. Monocytes et obésité	36
3. Le rôle des monocytes circulants dans les pathologies métaboliques associées à l'obésité	38
<i>a/ Monocytes et dyslipidémie</i>	38
<i>b/ Monocytes et athérosclérose</i>	39
<i>c/ Monocytes et diabète de type II</i>	40
<b>II. Objectifs de la thèse</b>	42
<b>A. Investigation du rôle des différentes populations de monocytes dans l'obésité</b>	42
<b>B. Méthodologie</b>	43
<b>III. Résultats</b>	46
<b>A. Les monocytes dans l'obésité humaine : sous populations et fonctions</b>	46
1. Introduction	46
2. Résultats	48
3. Conclusion	49
4. Article 1	49
<b>B. Analyse comparative du transcriptome de chacune des sous populations chez des sujets obèses vs non obèses</b>	61
1. Introduction	61
2. Résultats	61
3. Conclusion	64
4. Projet article 2	64
<b>IV. Discussion</b>	121
<b>A. Modulations phénotypiques et fonctionnelles des monocytes par l'obésité</b>	121
<b>B. L'up-régulation et l'augmentation de la fonctionnalité de TLR4 et de TLR8 par les monocytes dans l'obésité</b>	123
<b>C. Les IM comme précurseurs de macrophages anti-inflammatoires au profil pro-fibrotique</b>	126
<b>D. Le phénotype des NCM est un indicateur des altérations métaboliques</b>	128
<b>E. Existe-t-il une relation entre l'état inflammatoire des monocytes et des modifications de leur métabolisme dans l'obésité ?</b>	129
<b>V. Conclusion</b>	130
<b>VI. Bibliographie</b>	134

# ABREVIATIONS

**ARNm** : ARN messagers

**CAM** : Molécules d'adhérence cellulaire

**CCL** : Chimiokine (C-C motif) ligand

**CCR** : Récepteur de chimiokine C-C

**CD4** : Lymphocytes T CD4

**CD8** : Lymphocytes T CD8

**CM** : Monocytes classiques

**eMoPs** : Cellules progénitrices des monocytes

**CSF** : « Colony-stimulating factors »

**DAMPs** : **motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires**

**DIO** : Diet Induced Obesity

**FA** : Acides gras

**FACS** : Fluorescence Activated Cell Sorting

**HDL-c** : HDL-cholestérol

**HIF-1 $\alpha$**  : Facteur de transcription 1 $\alpha$  inductible par l'hypoxie

**HOMA-IR** : Modèle d'estimation de la résistance à l'insuline

**ICAM** : Molécule d'adhésion intercellulaire-1

**IFN- $\gamma$**  : Interferon- $\gamma$

**IKK** : Kinase inhibitrice du facteur nucléaire kappa

**IL** : Interleukines

**IL-1R** : Récepteur IL-1

**IM** : Monocytes intermédiaires

**IMC** : Indice de masse corporelle

**IP-10** : Protéine-10 inductible par l'INF-  $\gamma$

**JNK** : C-Jun N-terminal kinase

**LEAF-1** : Fonction lymphocytaire associée à l'antigène-1

**LPS** : Lipopolysaccharide

**MAIT** : Cellules T invariantes associées aux muqueuses

**MHC** : Complexe majeur d'histocompatibilité

**NAFLD** : Maladie du foie gras non alcoolique (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease)

**NCM** : Monocytes non classiques

**NK** : Cellules natural killer

**NK-T** : Cellules natural killer-T

**iNK-T** : Cellules NK-T invariantes

**NLRP3** : NOD-Like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3

**NLR** : Récepteurs Nod-like

**NO** : Oxyde nitrique

**oxLDL** : Lipoprotéine oxydées

**PAMPs** : Motifs moléculaires associés aux pathogènes

**PKR** : Kinase dépendantes des ARN double brins

**PKR** : Kinase dépendantes des ARN double brins

**PGN** : Pepitoglycane

**PPAR** : Proliférateurs de peroxydome

**PRRs** : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires conservés

**PSCGL-1** : Ligand de la sélectine P

**RIN** : Valeur d'intégrité de l'ARN

**ROS** : Dérivés réactifs de l'oxygène

**IRS-1 ou 2** : Substrat 1 ou 2 du récepteur de l'insuline

**SP** : Substance P

**MetS** : Syndrome métabolique

**Th1** : Lymphocytes T CD4 auxiliaires Th1

**Th17** : Lymphocytes T CD4 auxiliaires Th17

**Th2** : Lymphocytes T CD4 auxiliaires Th2

**TLR** : Récepteur Toll Like

**TNF- $\alpha$**  : « Tumor necrosis factor »- $\alpha$

**Treg** : Lymphocyte T CD4 régulateur

# I. INTRODUCTION

L'organisation mondiale pour la santé (OMS) estime que chaque année l'obésité est responsable de 3,4 millions de décès. Caractérisée par un indice de masse corporel (IMC) supérieur ou égal à  $30 \text{ kg/m}^2$ , ce phénomène est en augmentation constante depuis les années 1980 pour atteindre 13% de la population mondiale en 2013 (1). Les derniers chiffres de projection de l'OMS communiqués au congrès européen de Prague en mai 2015 sont alarmants puisqu'il est estimé que dans tous les pays européens, l'obésité aura augmenté de façon majeure avec par exemple en France, une proportion de 25% d'hommes et 29% de femmes en obésité en 2030. Des études menées aux Etats-Unis suggèrent que si l'augmentation de l'obésité n'était pas enrayée cela conduirait au recul de l'espérance de vie (2).

L'obésité se définit médicalement comme une augmentation de la masse grasse entraînant des conséquences sur le bien être physique, psychologique et social. L'obésité humaine témoigne d'une mise en échec du système de régulation des réserves énergétiques par des facteurs externes (modes de vie, environnement) et/ou internes (psychologiques ou biologiques). Elle est considérée comme une maladie chronique et évolutive (3). En effet, l'obésité est impliquée dans des modifications métaboliques comme l'hyperglycémie et les dyslipidémies qui conduisent à des complications cliniques parmi lesquelles nous pouvons citer le diabète de type II, l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires, la maladie du foie gras non alcoolique (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD), les pathologies inflammatoires articulaires, des problèmes respiratoires et enfin certains cancers (4) (5) (6). Concernant les complications métaboliques, l'impact de l'obésité sur le risque de diabète de type II est majeur : 75% des patients diabétiques de type 2 sont obèses. Pour une valeur d'IMC supérieure ou égale à 30 comparée à un  $\text{IMC} < 30$ , le risque de diabète de type II est multiplié par 10 chez la femme et 8 chez l'homme. Sont également facteurs de risque de diabète de type II, le gain de poids à l'âge adulte, l'adiposité abdominale, la durée de l'obésité, l'âge et les antécédents familiaux de diabète de type II (3). Les dyslipidémies les plus fréquentes dans l'obésité sont l'augmentation des triglycérides et la diminution du cholestérol-HDL (HDL-c), deux facteurs augmentant le risque de maladies cardiovasculaires (7). Il existe une relation étroite entre l'obésité, le développement de la résistance à l'insuline, les dyslipidémies et le NAFLD. A la fois un IMC excessif et l'obésité viscérale sont des facteurs de risque reconnus de NAFLD (8).

Dans la majorité des cas, l'augmentation excessive du tissu adipeux est due à une



incapacité à faire face à un excès d'apport alimentaire et à une insuffisance des dépenses énergétiques. Ce déséquilibre peut être accentué par une augmentation des capacités de stockage. Il y a quatre acteurs physiopathologiques intervenant dans l'obésité : l'alimentation, les dépenses énergétiques, le tissu adipeux et le dialogue entre les organes impliqués dans le contrôle du bilan d'énergie. Ces dernières décennies, la recherche d'un mécanisme commun à la base des pathologies associées à l'obésité et au surpoids ont mis en avant une relation étroite entre l'excès de nutriments et des perturbations de l'équilibre des médiateurs cellulaires et moléculaires de l'immunité et plus particulièrement de l'inflammation (5). **L'obésité est donc maintenant reconnue comme une maladie inflammatoire de bas-grade et chronique (9) qui de part ce caractère favorise le développement des complications métaboliques et cardiovasculaires (10) (11).**

D'un extrême à l'autre, les situations cliniques de l'obésité sont très diverses puisqu'il existe des formes d'obésité purement biologiques, généralement génétiques, et des formes purement comportementales. La réalité clinique est celle d'un continuum. Les stratégies thérapeutiques sont donc elles aussi très diverses et se construisent au cas par cas. Mais dans tous les cas l'objectif est d'aider le patient à perdre du poids et ainsi limiter les complications métaboliques (7). Parmi les traitements de l'obésité, certains consistent en une modification du mode vie par un changement de régime alimentaire et une augmentation de l'activité physique, d'autres sont médicamenteux ou encore chirurgicaux. Ces traitements sont le plus souvent prescrits simultanément (revue dans 12). La chirurgie bariatrique modifie l'anatomie de l'appareil digestif afin de conduire à une restriction de l'absorption des aliments. Cette chirurgie est une thérapie efficace dans la durée (13) qui conduit à l'amélioration de l'état inflammatoire des patients (14) (15) (16) (17) (18) et des complications de l'obésité (13) (15) (16) (17) (19).

Parce que l'inflammation, qu'elle soit systémique ou tissulaire, est au cœur des complications de l'obésité il est important de mieux la comprendre afin d'identifier de nouvelles thérapies visant à améliorer l'état inflammatoire des patients sur le long terme. Ces nouvelles thérapies pourraient être utilisées soit en complément d'une chirurgie bariatrique ou bien comme une alternative lorsque la chirurgie n'est pas envisageable.

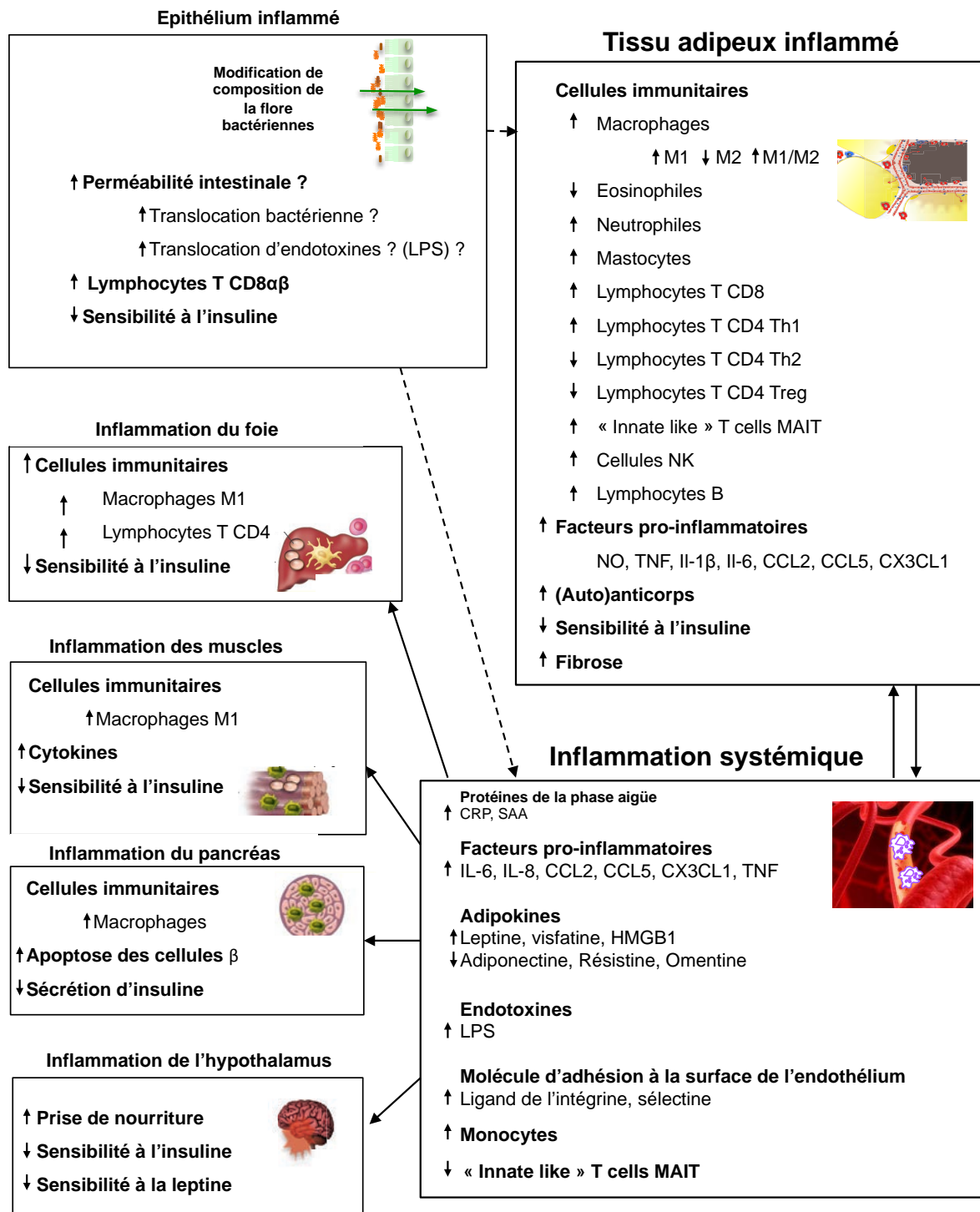
## A. Obésité et inflammation bas grade

L'inflammation est une réponse coordonnée de l'organisme à un signal de danger qui a pour vocation de revenir à son état basal une fois le danger écarté. La réponse inflammatoire existant dans l'obésité est comparable à une réponse inflammatoire classique. Elle est par conséquent caractérisée par une augmentation systémique des marqueurs moléculaires de l'inflammation, par une activation des cellules mononuclées circulantes, par le recrutement de cellules immunitaires activées vers les tissus inflammés et enfin par une réponse réparatrice des tissus. Par contre dans l'obésité, l'inflammation est chronique, créant une activation de bas grade de l'immunité innée et adaptative qui influe sur l'homéostasie métabolique dans la durée. Dans l'obésité, co-existent une inflammation systémique et une inflammation tissulaire, retrouvée au niveau du tissu adipeux, du foie et des muscles, du pancréas, de l'intestin et de l'hypothalamus (figure 1).

### 1. L'inflammation systémique

#### *a. Les marqueurs moléculaires*

L'inflammation systémique se manifeste par une augmentation modérée mais chronique dans la circulation de nombreux marqueurs de l'inflammation parmi lesquels les protéines de la phase aiguë (la protéine C réactive [CRP] x2,5 (18) et le sérum amyloïde A [SAA] x3,5 (20)), certaines cytokines (IL-6 x1,3 (18), IL-8 x6,7 (18), IL-9 x8,8 (18), IL-10 x68,3 (18), IL-1Ra x25,5 (18) et TNF- $\alpha$  x3,2 (21)) et certaines chimiokines (CCL2 x1,8 (18) et CCL5 x8 (18)), des endotoxines (lipopolysaccharide [LPS] x1,3 (22) ainsi que des neuropeptides (substance P [SP] (23)). Le nombre des molécules contribuant à caractériser l'inflammation bas grade chez l'obèse ne cesse d'augmenter depuis plusieurs années et elles sont répertoriées dans le tableau 1 (3). L'origine précise et la contribution relative notamment du tissu hépatique, du tissu adipeux, et des cellules immuno-inflammatoires circulantes dans la production de molécules inflammatoires circulantes ne sont pas encore complètement caractérisées dans l'obésité humaine. Le foie participe largement d'une part par la synthèse accrue de molécules de la phase aiguë (CRP, SAA, haptoglobine, orosomucoïde, ferritine, etc.) et d'autre part par la sécrétion d'IL-6, de TNF- $\alpha$ , et d'IL-1 $\beta$  (24). Celles-ci sont augmentés par deux mécanismes complémentaires : 1) la stéatose, définie par une accumulation de lipides dans le foie au cours de la prise de poids qui peut avoir un effet



**Figure 1. Modification de l'homéostasie immunitaire dans l'obésité et ses conséquences.** L'obésité active des réponses inflammatoires dans le tissu adipeux qui se propagent dans le foie, les muscles du squelette, le pancréas et l'hypothalamus entraînant une résistance à l'insuline systémique. Des modifications fonctionnelles au niveau de l'épithélium intestinal pourraient être la source de ces dérèglements immuno/métaboliques avec notamment une augmentation de sa perméabilité.

inducteur local de la réaction inflammatoire au sein du tissu hépatique, 2) la libération d'acides gras provenant du tissu adipeux *via* la circulation portale (revue dans 25). Parmi ces différents acteurs, le tissu adipeux est considéré comme ayant un rôle central en sécrétant des adipokines et des cytokines. Celles-ci exercent leurs fonctions dans le tissu adipeux lui-même, mais aussi dans les autres organes métaboliques par l'intermédiaire de la circulation. En effet, le tissu adipeux contribue à l'augmentation plasmatique des marqueurs moléculaires de l'inflammation (26).

### *b. Les cellules immunitaires circulantes*

La contribution des cellules immunitaires circulantes est révélée dans de nombreuses études, indiquant que le nombre ou le pourcentage de monocytes, de neutrophiles, de basophiles, d'éosinophiles et de lymphocytes T et B corrèle de façon positive avec l'IMC (27) et avec d'autres phénotypes associés à l'obésité tels que le syndrome métabolique (MetS) et la résistance à l'insuline. Le syndrome métabolique est un ensemble de facteurs de risque qui conduisent au développement des maladies cardiovasculaires et au diabète de type II. Ces facteurs comprennent : l'obésité, l'hypertension artérielle, un taux de triglycéride élevé, un taux de HDL-c bas et une forte glycémie. A la suite d'une thérapie aboutissant à une perte de poids, il est observé une diminution du pourcentage ou de nombre de monocytes, de neutrophiles, des lymphocytes totaux et des lymphocytes T. Enfin le nombre de monocytes corrèle avec l'inflammation du tissu adipeux (27). La modulation des monocytes dans l'obésité fera l'objet du dernier chapitre de l'introduction.

#### ➤ Les granulocytes

Les neutrophiles représentent la majorité des cellules immunitaires circulantes (50-70%) (27), ils interviennent rapidement dans la réponse immunitaire innée, ainsi l'activation potentielle des neutrophiles par l'obésité pourrait être fondamentale. De plus, il est maintenant démontré que les neutrophiles infiltrent le tissu adipeux de souris obèses, par conséquent il est important d'étudier l'état d'activation des neutrophiles circulants dans l'obésité. En effet, ils contribuent potentiellement aux complications métaboliques (28) (29) (30). Le nombre de neutrophiles circulants corrèle avec l'IMC dans la plupart des études (31), il est augmenté chez des patients présentant un MetS par rapport à des sujets témoins sans MetS (31) (32) et corrèle avec les marqueurs de la résistance à l'insuline (31) (32) et ceux de l'inflammation

Nom	Obésité	Ratio obèse/ témoin	Effet de la perte de poids
<b>Phase aiguë de l'inflammation</b>			
Haptoglobine	↑		↓
Sérum amyloïde A	↑	6,0	↓
Protéine C réactive (CRP)	↑	2,5	↓
Fibrinogène	↑	1,1	↓
Orosomucoïde	↑		↓
<b>Cytokines/Chimiokines</b>			
Interleukine 6 (IL6)	↑	1,3	↓
Interleukine 8 (IL8 ou CXCL8)	↑	> 6,7	↓
Interleukine 9 (IL9)	↑	> 8,8	↓
Interleukine 18 (IL18)	↑		↓
Interleukine 10 (IL10)	↑	> 68,3	↓
Interleukine 1ra (IL1Ra)	↑	> 25,5	↓ ou →
Tumor necrosis factor (TNFα)	↑	3,2	
CCL2 (Monocyte Chemoattractant protein [MC P1])	↑	1,8	↓
CCL13 (Monocyte Chemoattractant protein [MC P4])	↑		?
CCL5 (RANTES)	↑	8,0	↓
Macrophage Migration Inhibitory factor (MIF)	↑		↓
Macrophage Inflammatory Protein (MIP1β)	↑	1,3	↓ ou →
Interferon-Inducible-Protein 10 (IP10)	↑	3,3	↓
Eotaxin	↑		↓
Monokine Induced by IFNγ (MIG)	↑	2,3	↓
<b>Autres adipokines</b>			
Leptine	↑		↓
Visfatine	↑		↓
Résistine	↓		↓ ou →
Adiponectine	↓		↑
Omentine	↓		?
HMGB1	↑		
<b>Protéines d'adhésion/remodelage matrice extracellulaire/prothrombotiques</b>			
Matrix metalloproteinase 9 (MMP9)	↑		↓
ICAM	↑		↓
VCAM	↑		↓
HGF	↑		?
Plasminogen activator inhibitor (PA-1)	↑		↓
Cathepsine S	↑		↓
VEGF	↑		↓
<b>Endotoxines</b>			
LPS	↑	1,4	
<b>Neuropeptides pro-inflammatoires</b>			
Substance P (SP)	↑ (enfants)		

**Tableau 1.** Modifications systémiques de marqueurs inflammatoires ou d'adhésions circulants au cours de l'obésité et de la perte de poids. Adapté de Clément et al. (*Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux, Chapitre : Inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité, Springer Paris, 2013*)

systémique (CRP élevée) (32). Des modifications du mode de vie (régime alimentaire hypocalorique et/ou activité physique accrue) et la chirurgie bariatrique conduisant à une perte de poids chez des sujets obèses diminuent le nombre de neutrophiles circulant de 11,7% (31). De nombreuses études montrent que l'activité de certaines fonctions des neutrophiles est modulée par l'obésité. Par exemple les neutrophiles de patients sévèrement obèses (IMC > 40 kg/m<sup>2</sup>) présentent une plus faible expression de CD62L (sélectine-L), une molécule responsable de l'adhésion à la surface de l'endothélium. Cette perte est corrigée six mois après une perte de poids par chirurgie bariatrique (14). A l'inverse l'expression de CD66b, qui est considéré comme un marqueur d'activation des neutrophiles, est plus élevée chez des patients sévèrement obèses comparés à des témoins (33). En accord avec l'idée d'une

activation accrue des neutrophiles dans l'obésité, les travaux de *Brandau et al.* (34) montrent *in vitro* que les neutrophiles de sujets obèses ou en surpoids produisent plus d'IL-8 après stimulation par LPS que des sujets minces. De plus, l'adiponectine (qui est diminuée dans le sérum des patients obèses) inhibe *in vitro* la production d'IL-8 par les neutrophiles et un taux élevé d'adiponectine dans le sérum corrèle avec une faible production d'IL-8 *in vitro*. Des études fonctionnelles ont montré que les neutrophiles de patients sévèrement obèses (IMC > 40 kg/m<sup>2</sup>) ont une capacité réduite à phagocyter *Echerichia Coli* et une production significativement réduite des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) après stimulation par la PMA (phorbol myristate acétate), avec cependant une production basale de ROS significativement plus élevée chez les patients comparée aux témoins (35). Enfin cette même étude montre que les neutrophiles de patients obèses présentent une réponse accrue à une faible dose d'endotoxine (LPS), concomitante avec une diminution de l'apoptose et l'augmentation de leur durée de vie. Ce qui pourrait expliquer l'augmentation du nombre de neutrophiles par une durée de vie plus élevée et ceci tout particulièrement à la lumière de l'endotoxémie qui est suspectée dans l'obésité (36) (37) (38).

L'obésité est de plus en plus associée à des problèmes allergiques et respiratoires (39), ce qui conduit naturellement à chercher des associations avec les basophiles et les éosinophiles. Les basophiles sont les leucocytes les plus rares dans la circulation (0,4%) (27) mais ils sont des modulateurs de la réponse immunitaire et sont les effecteurs de l'inflammation allergique. Certaines études montrent une corrélation positive entre l'IMC et le nombre de basophiles (40) (41) (42) alors qu'une étude chez des adolescentes montre une corrélation négative (43). La leptine, une adipokine augmentée dans le sérum de patients obèses, en interagissant avec son récepteur à la surface des basophiles, est responsable d'une augmentation de leur capacité à migrer, à dégranuler et à synthétiser de cytokines. La leptine augmente aussi leur survie et leur activation, révélée par une up-régulation de CD63. Ceci suggère un effet de l'hyper-leptinémie sur l'état d'activation des basophiles circulants dans l'obésité (44). Les éosinophiles représentent de 1-4% (27) des cellules immunitaires circulantes et comme les basophiles ils interviennent dans la réponse allergique. Il existe des études contradictoires concernant l'existence ou non d'une corrélation entre le nombre d'éosinophiles circulants et l'obésité (revue dans 27). Néanmoins, comme pour les basophiles, la leptine augmente les fonctions et la survie des éosinophiles, ce qui ouvre des voies en ce qui concerne la compréhension des mécanismes reliant l'obésité et l'exacerbation de l'asthme (45).

## ➤ Les lymphocytes T et B

Les lymphocytes qui représentent de 20-40% (27) des cellules immunitaires circulantes sont des cellules de l'immunité adaptative. On distingue deux populations qui répondent spécifiquement aux antigènes grâce à leurs récepteurs hautement spécifiques : le BCR pour les lymphocytes B et le TCR pour les lymphocytes T. Le nombre de lymphocytes totaux corrèle avec l'IMC dans de nombreuses études (31) (41) (42) (46), même après un ajustement de l'âge, du sexe (41) (46), du statut de fumeur (46) ou de l'origine ethnique (41). De plus le nombre total de lymphocytes corrèle avec la prévalence du MetS (42) et avec différents facteurs du MetS pris individuellement ou avec au taux d'insuline à jeun élevé (31) (47). Une perte de poids induite par une chirurgie bariatrique est associée à une diminution du nombre de lymphocytes totaux dans la circulation (31).

Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CD8) qui représentent de 19-48% (48) des lymphocytes totaux sont diminués en nombre absolu et en pourcentage dans la circulation avec l'obésité (49), ainsi que la proportion relative de CD8 par rapport aux lymphocytes totaux (50). Malgré toutes ces observations cohérentes entre elles aucun changement n'est observé en ce qui concerne le nombre absolu ou la proportion de CD8 dans les lymphocytes totaux après une perte de poids induite par une chirurgie bariatrique ou un régime pauvre en calories (49). Ce qui suggère que leur rôle dans les complications de l'obésité n'est pas critique. A l'opposé de très nombreuses publications ont montré que le nombre absolu de lymphocytes T auxiliaires CD4 (CD4), qui représente de 28-58% (48) des lymphocytes totaux, était plus élevé chez des patients obèses (51) (52) (49) (53) et sévèrement obèses (IMC > 40 kg/m<sup>2</sup>) (41) (54) (50) (53) comparé à des sujets minces. Les CD4 participent à la coordination et à la régulation de la réponse immunitaire. Parmi les CD4 on distingue notamment les CD4 Th1 (Th1) des CD4 Th2 (Th2). Les Th1 sont pro-inflammatoires et sécrètent préférentiellement l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12 alors que les Th2 sont anti-inflammatoires, ils sécrètent les cytokines IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13 et favorisent la réponse humorale. Le ratio Th1/Th2, utilisé comme index de polarisation des lymphocytes d'un phénotype pro- vers un phénotype anti-inflammatoire, a été rapporté comme étant plus élevé chez des sujets obèses comparé à celui de sujets non obèses. Ce ratio corrèle aussi avec l'IMC, le degré de résistance à l'insuline mesuré par le modèle d'estimation de la résistance à l'insuline (HOMA-IR) (55). Une perte de poids induite par un régime hypocalorique suivi d'une chirurgie bariatrique ou par un régime seul entraîne une diminution du ratio Th1/Th2 (56). Les lymphocytes T CD4 régulateurs (Treg) sont des cellules au caractère anti-inflammatoire

connues pour leur rôle dans la tolérance immunitaire et dont la prolifération est contrôlée par la leptine (57). Leur description dans la circulation de patients obèses ne sont pas nombreuses et présentent des résultats contradictoires (58) que nous ne décrivons donc pas ici.

Il existe aussi des cellules T invariantes associées aux muqueuses (MAIT) qui reconnaissent des ligands bactériens. Elles sont présentes dans la circulation où elles représentent de 1-10% (59) des lymphocytes T et sont augmentées dans les muqueuses et les tissus inflammés. Leur fréquence est diminuée dans la circulation de patients diabétiques et/ou sévèrement obèses jusqu'à parfois devenir indétectables. Elles présentent un phénotype associé à la production de cytokines de type Th1 et Th17 (IL-17, IL-21 et IL-22) dans la circulation. Trois mois après une chirurgie bariatrique la fréquence des MAIT dans la circulation augmente et leur production de cytokines diminue (60). Les MAIT sont donc modulés chez des patients diabétiques et/ou sévèrement obèses ce qui suggère leur implication dans le développement de ces pathologies.

Les lymphocytes B qui interviennent dans la réponse humorale, représentent 7-23% des lymphocytes, et comme les Tregs, ils restent peu étudiés dans la circulation de patients obèses. Néanmoins leur nombre et/ou leur pourcentage est rapporté comme étant augmenté dans la circulation de patients obèses comparé à des sujets minces (51) (61) (62) et corrélient avec l'IMC (51). Chez des hommes, tous vétérans de l'armée américaine et de diverses origines ethniques, le nombre de lymphocyte B a été corrélé avec un les facteurs de risque du MetS (obésité, hypertension, fort taux de triglycérides et faible taux d'HDL-c) (62). Par contre, une autre étude montre, quant à elle chez des étudiantes originaires d'Arabie Saoudite, que le nombre de lymphocytes B et leur pourcentage parmi les leucocytes circulants ne corrélient pas avec l'IMC chez des sujets obèses (52).

## 2. L'Inflammation tissulaire

### *a. Le tissu adipeux*

Il reste difficile d'établir clairement le ou les événements responsables de l'inflammation dans le tissu adipeux. Les adipocytes eux-mêmes sont capables de produire de nombreuses biomolécules pro- ou anti-inflammatoires. L'accroissement de la taille des adipocytes, qui caractérise l'état obèse, altère leur profil de sécrétion et induit un statut pro-inflammatoire, sans que les signaux impliqués soient clairement définis. La répartition caractéristique des macrophages en couronne autour d'adipocytes présentant des signes de



mort cellulaire (63) suggère l'intervention de facteurs attractants spécifiques. Des signaux exogènes comme les acides gras ou le LPS d'origine bactérienne induisent une réponse inflammatoire en activant leur récepteur Toll-like (TLR)-4 exprimé à la surface des adipocytes et des macrophages et les voies de signalisation intracellulaires associées, principalement la voie NFκB (64). Localement, les adipocytes inflammatoires, dont l'activité lipolytique est élevée, libèrent des acides gras qui stimulent la voie NFκB dans les macrophages, contribuant ainsi à une boucle paracrine délétère entre les deux types cellulaires. Parmi d'autres facteurs, l'hypoxie tissulaire, cause classique d'attraction des macrophages dans certaines tumeurs et dans la plaque d'athérome, pourrait aussi intervenir dans le déclenchement de l'inflammation du tissu adipeux et des autres tissus chez les sujets obèses (65). Le stress du réticulum endoplasmique et le stress oxydant seraient également susceptibles d'intervenir dans l'inflammation locale.

Le rôle du tissu adipeux dans la production de molécules inflammatoires circulantes est central puisqu'un des aspects fondamentaux de l'obésité est l'hypertrophie des adipocytes qui est associée à un profil sécrétoire pro-inflammatoire (Figure 1). Si l'accumulation globale de dépôt de tissu adipeux dans tout l'organisme contribue aux complications de l'obésité, la distribution des adipocytes hypertrophiés dans l'organisme est fondamentale. Notre équipe a montré que l'abondance des macrophages infiltrant le tissu adipeux était deux fois plus importante dans le tissu adipeux viscéral que dans le sous cutané. De plus il existe une association entre l'augmentation des macrophages dans le tissu adipeux viscéral et la stéatose hépatique non alcoolique et/ou les lésions fibro/inflammatoires du foie (66). L'hypertrophie des adipocytes conduit à terme à leur mort et au relargage de leur contenu dans l'espace extracellulaire. Ce phénomène, par la libération d'acides gras ou d'autres facteurs, déclencherait une réponse inflammatoire des cellules immunitaires environnantes et plus particulièrement des macrophages (67) (68). D'autres facteurs, tels que l'hypoxie, le stress du réticulum endoplasmique ou la production de chimiokines par les adipocytes hypertrophiés, interviendraient également dans l'activation des cellules immunitaires (69) (70). La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui en résulte amplifie cet état pathologique en conduisant au recrutement de plus de cellules immunitaires. Ainsi, toutes les populations de cellules immunitaires du tissu adipeux sont augmentées dans l'obésité (71).

#### ➤ Les macrophages

En 2003, deux équipes américaines décrivent l'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux de souris obèses de même que chez l'homme en relation avec l'augmentation de l'IMC (70) (72). L'infiltration macrophagique n'est que partiellement réversible avec la perte de poids induite par la chirurgie gastrique (73) (74). Les macrophages se disposent typiquement en couronne autour d'un adipocyte présentant des signes de mort cellulaire (67) (73). Cette disposition est spécifique du tissu adipeux obèse et plus fréquente dans le territoire viscéral. Ces observations suggèrent que les macrophages exercent leur rôle « classique » de phagocytose et d'élimination des adipocytes métaboliquement déficients chez le sujet obèse, en particulier ceux ayant atteint une taille critique provoquant la mort cellulaire. L'injection d'un marqueur spécifique des monocytes chez la souris a permis de montrer que l'obésité induite par un régime riche en graisse dans le modèle murin DIO (Diet Induced Obesity) provoque le recrutement de macrophages de type M1 ayant un phénotype pro-inflammatoire caractérisé par l'expression de CD11c, d'oxydes nitriques (NO), de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 (75). Ces macrophages sont chargés en gouttelettes lipidiques en accord avec une activité de phagocytose des lipides (67) (76). En l'absence d'obésité, des macrophages « résidents » sont également détectés dans le tissu adipeux. Ils présentent un phénotype anti-inflammatoire de type M2, produisent des médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 et jouent un rôle important dans le maintien de la sensibilité à l'insuline. Leur abondance n'est pas ou peu modifiée dans l'obésité (74) (75). Une étude cinétique dans le modèle DIO suggère une situation plus complexe. En effet, l'apparition et l'accumulation de macrophages de type M1 augmente jusqu'à seize semaines de régime puis diminue au profit de macrophages de type M2, sans que l'on sache s'il s'agit d'un recrutement ou d'une repolarisation *in situ* des macrophages M1 en macrophages M2 (68). De plus, une troisième population de phénotype intermédiaire M1-M2 a été identifiée dans le tissu adipeux de souris DIO, qui pourrait constituer un groupe de cellules en cours de repolarisation (77). Chez l'homme, ce sont principalement des macrophages de phénotype mixte, intermédiaire entre la polarisation M1 et M2 qui ont été décrits (78) (79). Leur abondance est augmentée en relation avec le degré d'adiposité. Ils favorisent la fibrose du tissu adipeux et la résistance à l'insuline. Dans une population de sujets massivement obèses, notre équipe a observé une augmentation du nombre des cellules positives pour un marqueur de type M1 (CD40), face à un nombre constant de cellules exprimant des marqueurs de type M2 (CD206 et CD163) par rapport à des sujets témoins, suggérant que l'obésité favorise l'accumulation de macrophages de type M1 (74). Une caractérisation plus précise montre que, comme chez la souris, les macrophages

en couronne présentent un phénotype orienté M1, alors que les macrophages interstitiels ont un phénotype orienté M2 (80) (81).

➤ Les neutrophiles, les mastocytes et les éosinophiles

Chez la souris DIO, les neutrophiles sont recrutés dans le tissu adipeux dès la première semaine d'un régime riche en graisse. Bien qu'en petit nombre, ils interviennent dans le contrôle de la tolérance au glucose, de la sensibilité à l'insuline et dans le maintien de l'inflammation (82) (30) (28). Les mastocytes qui sécrètent l'IL-6 et l'IFN- $\gamma$  semblent également jouer un rôle dans les maladies métaboliques (83). Les cellules éosinophiles, quant à elles, participent à la réduction de l'inflammation en favorisant la polarisation de type M2 des macrophages dépendant de la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13 (84).

➤ Les cellules NK-T, NK-T invariantes (iNK-T) et NK

Chez la souris, des cellules NKT capables de reconnaître des antigènes glycolipidiques, colonisent également le tissu adipeux dans les premières phases de l'obésité induite par un régime riche en graisse, et cette étape semble être nécessaire à l'infiltration macrophagique. En effet, Ohmura *et al.* (85) ont montré que l'infiltration macrophagique du tissu adipeux et l'intolérance au glucose, observées lorsque des souris sont soumises à un régime riche en graisse, sont respectivement réduites et améliorées chez des souris déficientes en  $\beta 2$  microglobuline qui ne possèdent pas de cellules NKT comparées à des souris sauvages. De plus, lorsque les souris sauvages sont traitées avec un activateur spécifique des cellules NKT ( $\alpha$ -galactosylcéramide) après 13 semaines d'un régime riche en graisse, l'intolérance au glucose, l'infiltration macrophagique du tissu adipeux ainsi que l'expression au niveau des ARN messagers de CCL2 (MCP-1), de CCL5 (RANTES), TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  dans le tissu adipeux sont augmentés.

Les cellules NK-T invariantes (iNK-T) sont des cellules qui reconnaissent des antigènes lipidiques présentés par CD1d. Chez la souris et chez l'homme le tissu adipeux viscéral est enrichi en cellules iNK-T. Ces cellules représentent 15 à 20% des cellules T et produisent l'IL-2 et l'IL-10. Elles induisent un phénotype anti-inflammatoire des macrophages et, par l'intermédiaire de la production d'IL-2, contrôlent le nombre et la prolifération des Tregs dans le tissu adipeux (86).

Les cellules NK sont des sentinelles de l'organisme qui surveillent les tissus à la recherche de cellules infectées, transformées ou stressées. Elles sont équipées de récepteurs qui leur permettent de détecter des cellules pathologiques. Parmi ceux-là, NKp46 (NCR1 chez la souris) est un récepteur impliqué dans le développement du diabète de type I (87). Une étude récente a montré son implication dans les complications métaboliques de l'obésité. En effet, Wensveen *et al.* (88) ont montré chez la souris obèse DIO que les cellules NK résidentes du tissu adipeux viscéral sont des éléments déterminants qui permettent de faire le lien entre le stress du tissu adipeux qui est en hypoxie et dont l'accès aux nutriments est limité (89) (90), l'activation des macrophages et le développement de la résistance à l'insuline. Dans le modèle murin DIO, un régime riche en graisse provoque l'up-régulation du ligand de NC1R à la surface des adipocytes, ce qui entraîne l'activation des cellules NK et induit leur prolifération. L'IFN- $\gamma$  produite par ces cellules en réponse à la signalisation induite par NC1R provoque la polarisation M1 des macrophages. A l'inverse lorsque l'activation des cellules NK est empêchée, la polarisation M1 des macrophages est fortement réduite et la tolérance au glucose ainsi que la sensibilité à l'insuline sont améliorées. Les cellules NK sont donc des éléments clés de régulation de la polarisation des macrophages en réponse au stress des adipocytes dans l'obésité.

#### ➤ Les lymphocytes T

L'activation des macrophages est modifiée par les lymphocytes T. En effet, les lymphocytes Th1 qui sécrètent l'IFN- $\gamma$  ainsi que les lymphocytes T auxiliaires CD4 Th17 (Th17) qui sécrètent l'IL-17 augmentent les fonctions pro-inflammatoires des macrophages en induisant la sécrétion d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ . A l'inverse, les lymphocytes anti-inflammatoires Th2 qui sécrètent l'IL-4 et l'IL-13 ainsi que les Tregs modifient les fonctions des macrophages en induisant leur différenciation en macrophages de type M2 qui sécrètent IL-10 ou encore en macrophage de type intermédiaire M1-M2 (91) (92). L'étude de la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux chez l'homme a révélé que les lymphocytes représentent  $6 \pm 0,5\%$  des cellules immunitaires CD45+ et que la majorité d'entre-eux sont des lymphocytes T CD3+ (CD3). Ils sont organisés en grappe autour des adipocytes, quelques CD3+ isolés sont identifiés dans le stroma et très peu dans les capillaires. Les CD4 et les CD8 forment la majorité des CD3. Le nombre de CD3, de CD4 et de CD8 dans le tissu adipeux augmente avec l'IMC et ce nombre est statistiquement plus élevé chez les sujets obèses que chez les sujets minces (93) (94). De plus, le nombre de CD3 dans le tissu adipeux viscéral des

patients obèses est plus élevé que dans le tissu adipeux sous cutané avec une augmentation accrue du nombre de CD8 par rapport au nombre CD4 (93). Des expériences de culture d'adipocytes en présence de milieu de culture de lymphocytes du tissu adipeux ont montré que les lymphocytes T du tissu adipeux avaient un effet médié par l'insuline sur l'expression d'enzyme lipogéniques et que cet effet nécessitait l'action de l'IFN- $\gamma$ . A l'inverse, la culture d'apocytes en présence de milieu de culture de macrophages n'a pas montré d'effet comparable (93). Chez la souris non obèse les lymphocytes T représentent environ 10% de la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux, 50% d'entre eux sont des CD3, avec un nombre plus important de CD4 que de CD8 (ratio de 3/1). Environ 50% des CD4 sont des Treg, ce qui est bien plus que dans les autres organes, qu'ils soient lymphoïdes (rates et ganglions) ou non (foie, poumon). De plus, les Treg s'accumulent préférentiellement dans le tissu adipeux viscéral. Concernant le ratio Th1/Th2, les lymphocytes Th1 et Th2 sont en nombres équivalents (95). Chez la souris durant le développement d'une obésité induite le nombre de lymphocytes T augmente ainsi que le ratio CD8/CD4 alors que la proportion de Treg diminue (94) (95) (96) (97). Par un suivi cinétique des populations de cellules immunitaires infiltrant le tissu adipeux dans le modèle murin d'obésité induite par un régime riche en graisse, il a été montré que l'accumulation des CD8 dans le tissu adipeux précède celle des macrophages. De plus la déplétion des CD8 par un traitement à l'aide d'anticorps neutralisants a montré que l'absence de CD8 réduisait l'infiltration des macrophages de type M1 sans affecter les macrophages de type M2. Des expériences de co-cultures de CD8 provenant du tissu adipeux de souris non obèse ou de souris obèses avec des monocytes (en présence de tissu adipeux non obèse) ont montré que les CD8 de tissu adipeux obèse généraient plus de macrophages que ceux de tissu adipeux non obèse. Des expériences de culture *in vitro* ont également montré que les CD8 de tissu adipeux obèse comparés à ceux de tissu adipeux non obèse sécrétaient plus des chimiokines (C-C motif) ligand MCP-1 (CCL2), MCP-3 (CCL7), RANTES (CCL5) (94) et de protéine-10 inductible par l'INF-  $\gamma$  (IP-10). Ces molécules sont connues pour leur capacité à induire la migration des macrophages/monocytes. Des expériences de migration *in vitro* ont confirmé la migration accrue des macrophages en milieu de culture conditionné par les CD8 provenant de tissu adipeux obèse vs non obèse et le traitement du milieu par un anti-CCL2 montre l'importance de cette chimiokine pour la migration des macrophages. Chez la souris la déplétion des CD8 réduit l'inflammation et améliore la résistance à l'insuline (94) mais au côté des CD8, les CD4 interviennent aussi dans les dysfonctionnements métaboliques liés à l'obésité. Dans le tissu adipeux les CD4 sont polarisés Th1 et leur déplétion chez la souris améliore l'inflammation en réduisant l'influx de

lymphocytes T et de macrophages et en réduisant la résistance à l'insuline (96). Les Treg du tissu adipeux jouent également un rôle en prévenant l'apparition de la résistance à l'insuline liée à l'obésité. Ceci a été démontré par des expériences de déplétion chez la souris où l'absence de Treg entraînait l'inflammation du tissu adipeux et l'installation de la résistance à l'insuline (98). Des observations similaires ont été faites dans le tissu adipeux humain avec, dans le tissu adipeux viscéral, la présence de lymphocytes Th1 douze fois plus nombreux que les Treg Foxp3+. La proportion relative de Th1 par rapport aux Treg Foxp3+ corrèle avec l'IMC. Les Treg Foxp3+ sont le plus souvent à proximité des monocytes et des macrophages ce qui laisse entrevoir une interaction entre ces types cellulaires (95). La dernière sous-population de lymphocytes impliquée dans la résistance à l'insuline est celle des lymphocytes T CD4 auxiliaires Th17 (Th17). Les CD4 Th17 sont des cellules importantes dans l'inflammation locale par leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17, l'IL-21 et l'IL-22. Chez l'homme, les CD4 Th17 sont augmentés 3 fois dans le tissu adipeux de sujets obèses présentant une résistance à l'insuline par rapport au tissu adipeux de sujets obèses encore sensibles à l'insuline, et 10 fois par rapport au tissu adipeux de sujets non obèses. La concentration en IL-22 et en IL-6 dans le sérum de ces patients est également augmentée. Sachant que les cellules musculaires du squelette et les hépatocytes de sujets obèses expriment les récepteurs de l'IL-17 et de l'IL-22, des expériences de culture in vitro ont été réalisées afin de tester l'effet de ces deux cytokines. Ces expériences ont montré que l'IL-22 et l'IL-17 avaient la capacité à réduire l'absorption du glucose par les cellules musculaires du squelette et à réduire la sensibilité à l'insuline des hépatocytes (99). Les MAIT dont la fréquence est diminuée dans la circulation de patients diabétiques est inversement augmentés dans le tissu adipeux. Ils présentent un phénotype associé à la production de cytokines de type Th1 et Th17 dans la circulation et fortement de type Th17 dans le tissu adipeux. Trois mois après une chirurgie bariatrique, la fréquence des MAIT dans la circulation augmente et leur production de cytokine diminue (60). Les MAIT sont donc modulés chez des patients diabétiques et/ou sévèrement obèses ce qui suggère leur implication dans le développement de ces pathologies.

### ➤ Les lymphocytes B

Les travaux de *Winer et al.* (100) ont montré que les lymphocytes B sont recrutés dans le tissu adipeux viscéral au cours de l'obésité induite par un régime riche en graisse dans le modèle murin DIO. Ils ont également montré que des souris DIO déplétées de leur

lymphocytes B à l'aide d'un anticorps anti-CD20 sont protégées des complications de l'obésité, et cela, en dépit d'une prise de poids. L'effet des lymphocytes B sur le métabolisme du glucose est mécaniquement associé à l'activation pro-inflammatoire des macrophages et des lymphocytes T et à la production d'IgG pathogéniques. Le traitement avec l'anti-CD20 diminue l'intolérance au glucose alors que le transfert d'IgG provenant de souris DIO induit rapidement la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose. Pour compléter ces observations, *Winer et al.* ont aussi montré que l'obésité humaine associée à la résistance à l'insuline possède un profil spécifique d'auto-anticorps circulants. En effet, en utilisant la technologie ProtoArray comprenant 9000 antigènes, les auto-anticorps ont été dosés dans le sérum de 32 individus minces, en surpoids ou obèses, et identifiés comme résistants ou non à l'insuline. Ils ont mis en évidence 122 IgGs spécifiquement augmentés par la résistance à l'insuline. Les 10 auto-anticorps les plus présents dans le sérum des sujets obèses de sexe masculin sont essentiellement des anticorps dirigés contre des protéines intracellulaires, la plupart d'entre elles étant ubiquitaires. On les retrouve au niveau des cellules immunitaires, du pancréas, du système nerveux, des muscles ou du tissu adipeux. Trois de ces auto-anticorps ont été confirmés par western-blot. Les cibles de ces auto-anticorps sont : GOSR1 (golgi SNAP receptor complex member 1, transcript variant 1), BTK (Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase) and GFAP (glial fibrillary acidic protein). Des études expérimentales (101) ont montré que les lymphocytes B de souris obèses sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , IL-6 et IL-8) et moins de cytokines anti-inflammatoires (IL-5 et IL-10). De plus, au cours de l'obésité, les lymphocytes B sont 1) directement activés par le biais de l'induction par des lipides des voies de signalisation dépendantes des TLRs, des récepteurs transmembranaires jouant un rôle important dans l'immunité innée et dans l'induction de la réponse inflammatoire, ou 2) indirectement activés par le biais de mécanismes dépendant des lymphocytes T pour produire des (auto)anticorps qui favorisent l'inflammation du tissu adipeux et la résistance à l'insuline. L'ensemble de ces travaux montre l'importance des lymphocytes B et de l'immunité adaptative dans le développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité et suggère de nouvelles modalités diagnostiques et thérapeutiques applicables à cette pathologie.

**L'accumulation de toutes ces preuves renforce l'idée d'une implication coordonnée de l'immunité adaptative et de l'immunité innée dans l'inflammation de bas grade qui caractérise le tissu adipeux au cours de l'obésité.**

### *b. Le foie et les muscles*

De nombreuses voies de signalisation impliquées dans l'inflammation et le métabolisme sont activées en cas de NAFLD. De la même façon que dans le tissu adipeux la stéatose hépatique non alcoolique est associée à une augmentation des cytokines associée à une polarisation M1/Th1 et une augmentation du nombre de cellules immunitaires infiltrant le foie (102) (103). Les muscles du squelette de personnes obèses ont un phénotype métabolique anormal dans le sens où même si ils sont exposés à un taux de lipides élevé à jeun, le glucose a tendance à être préféré comme substrat pour la production d'ATP conduisant à l'accumulation de lipides dans les muscles (104) (105) et contribue à l'établissement de la résistance à l'insuline (106) (107). TLR4, connu pour être le récepteur du LPS, en plus d'être exprimé à la surface des cellules immunitaires, est aussi exprimé à la surface des hépatocytes et des myocytes (108) (109). Son expression par ces différents types cellulaires suggère que TLR4 n'est pas seulement un récepteur de l'immunité innée mais peut-être aussi un régulateur du métabolisme. En effet, l'activation *in vitro* de TLR4 avec une faible dose de LPS, comparable à celle de l'endotoxémie métabolique (50 pg/mL) (22), dans des cultures de myocytes humains primaires résulte en une augmentation de l'oxydation du glucose et à une diminution de l'oxydation des acides gras (110). De plus, il existe des preuves d'une inflammation accrue des cellules musculaires du squelette qui s'accompagne d'une production accrue de cytokines. L'inflammation des muscles pourrait être due à un recrutement de macrophages polarisés M1(111) (112).

### *c. L'intestin*

Dans l'intestin, la barrière mucoale, qui sépare le milieu intérieur de la lumière intestinale, est constituée de cellules épithéliales, de cellules immunitaires et d'une couche de mucus. Toutes ces cellules ainsi que leurs produits (*e.g.* mucus, défensines et cytokines) permettent l'absorption des nutriments mais prévient aussi le passage des microbes et des virus. De plus, l'intestin des mammifères renferme environ  $10^{14}$  bactéries qui vivent en symbiose avec leur hôte et qui contribuent aussi au maintien de l'homéostasie. Elles influent directement sur le métabolisme et la résistance à l'insuline (113). Dans l'obésité humaine les modifications fonctionnelles de l'intestin sont encore peu étudiées. Pourtant, une étude chez l'homme montre une corrélation positive entre le taux d'endotoxines (LPS) et le développement du diabète de Type II chez des sujets obèses (114). Ce qui pourrait s'expliquer



par une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale induite par l'obésité. De plus, il a été montré chez la souris que l'obésité induite par un régime riche en graisse facilite la translocation des bactéries intestinales et de leurs sous produits comme le LPS par une dégradation des jonctions serrées de l'épithélium intestinal (115) (116). Il est par conséquent possible que des mécanismes comparables à ceux observés chez la souris existent aussi chez l'homme (117) (118). Ainsi, le microbiote intestinal jouerait un rôle prépondérant dans l'installation de l'inflammation par le biais du LPS qui, associé à un régime hypercalorique, pourraient induire au long-terme une endotoxémie métabolique. Celle-ci participerait activement au maintien de l'inflammation de bas grade relative à l'obésité (117) (118). Ceci d'autant plus que le LPS peut interagir avec TLR4 qui est exprimé aussi bien au niveau des cellules immunitaires circulantes et tissulaires, qu'au niveau des adipocytes, des hépatocytes et des myocytes (119) (108) (109). Enfin, des travaux récents, toujours chez l'homme démontrent que l'obésité provoque une inflammation du jéjunum par le biais des lymphocytes T et une résistance à l'insuline des entérocytes, les cellules absorbantes de la muqueuse intestinale (120).

#### *d. Le pancréas*

Comme dans le tissu adipeux, les macrophages s'accumulent dans les îlots au cours de l'installation de l'obésité induite par l'alimentation, et ils sont probablement à l'origine de cytokines pro-inflammatoires dont IL1- $\beta$  qui entravent le fonctionnement des cellules  $\beta$  du pancréas. L'inflammation peut réduire la sécrétion d'insuline et déclencher l'apoptose des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans qui conduit la diminution de la taille des îlots, un événement majeur dans l'installation du diabète de type II (121) (122).

#### *e. L'hypothalamus*

Chez la souris et le rat, des expériences de comparaison entre une alimentation riche ou pauvre en graisse, ainsi que des expériences de perfusions intra-cérébroventriculaires de lipides montrent que les acides gras saturés provoquent une activation des voies de signalisation de l'inflammation dans l'hypothalamus qui aboutit à une augmentation de la prise de nourriture et au stockage des nutriments. Avec une alimentation riche en graisse, des métabolites comme les diacylglycérols et les céramides s'accumulent dans l'hypothalamus et

provoque des résistances à la leptine et l'insuline au niveau du système nerveux central (123) (124) (125).

### 3. Les mécanismes de l'inflammation au cours de l'obésité

Les lipides sont des signaux importants de la réponse immunitaire et du contrôle de la régulation du métabolisme. De nombreux mécanismes ont été appréhendés pour comprendre les conséquences de l'interaction entre des signaux lipidiques et des récepteurs de l'immunité innée et des récepteurs nucléaires. Il existe aussi d'autres mécanismes intervenant dans l'inflammation ne faisant pas appel directement aux signaux lipidiques, c'est le cas de l'hypoxie et du stress du reticulum endoplasmique (Figure 2).

#### a. Les conséquences de la sécrétion des cytokines induite par l'obésité

L'activation des tissus et des cellules immunitaires circulantes déclenche la sécrétion de cytokines, qui peuvent induire des dysfonctionnements métaboliques dont la résistance à l'insuline. Parmi les cytokines pro-inflammatoires, TNF- $\alpha$  est la cytokine la plus étudiée et est toujours associée à la résistance à l'insuline. Par exemple, le TNF- $\alpha$  peut stimuler des sérines kinases dont les kinases inhibitrices du facteur nucléaire kappa (IKK) et les kinases C-Jun N-terminales (JNK) qui entraînent la phosphorylation du substrat 1 du récepteur de l'insuline (IRS-1) (126) (127), modulant ainsi sa capacité à propager les signaux en aval de la voie de signalisation de l'insuline. L'augmentation des acides gras par une alimentation riche en graisse active l'inflammasome résultant en la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , une diminution de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline (128). Le taux d'IL-6 corrèle également avec la résistance à l'insuline induite par l'obésité, et de nombreux travaux montrent que l'IL-6 a un effet pro-inflammatoire (130) (131). Les cytokines pro-inflammatoires peuvent également avoir un effet sur l'expression de certains gènes. Par exemple, le traitement des adipocytes par le TNF- $\alpha$  induit une baisse de l'expression des transporteurs du glucose GLUT4 et PPAR- $\gamma$  (132) (133). Un autre mécanisme, intéressant, serait que les cytokines pro-inflammatoires et les acides gras saturés pourraient up-réguler des gènes impliqués dans la synthèse des céramides (123).

En plus des cytokines pro-inflammatoires, certaines cytokines anti-inflammatoires sont augmentées dans l'obésité (IL-1Ra, SFRP5 et IL-10). L'équilibre entre les cytokines pro-

et anti-inflammatoires définit l'amplitude de l'inflammation et de son effet sur la résistance à l'insuline (135) (136) (112).

Pour conclure, les cytokines dans l'obésité ont un effet paracrine local avec un taux dans les tissus suffisamment élevé pour qu'elles puissent se propager dans la circulation systémique. Néanmoins la concentration de cytokines dans les tissus est certainement plus élevée que dans la circulation, et il reste encore à montrer que le niveau de cytokines circulantes dans l'obésité est suffisant pour exercer un effet endocrine sur la sensibilité systémique à l'insuline.

#### *b. Les acides gras comme inducteurs des voies de signalisation de l'inflammation*

##### ➤ Les TLR et l'inflammasome

Les PRRs, composants de l'immunité innée, détectent des molécules étrangères notamment les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) tels que le LPS, le peptidoglycane (PGN), et les acides nucléiques des micro-organismes. Mais ils détectent aussi des signaux endogènes de stress comme les motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires (DAMPs). Une quantité accrue de DAMPs libérés par des cellules nécrotiques dans l'obésité (des acides gras saturés libres, des protéines « Heat-shock » [HSP60], des protéines « calcium-binding » [S100A8 et S100A9] etc...) pourraient participer à l'inflammation chronique de bas grade en partie *via* les PRRs par exemple dans le tissu adipeux et les îlots pancréatiques (122).

Parmi les PRRs, la famille des TLRs comprend au moins 10 membres chez l'homme et leur stimulation entraîne l'activation du facteur nucléaire (NF- $\kappa$ B) et des protéines kinases MAPKs ce qui induit la sécrétion de protéines pro-inflammatoires. Les récepteurs TLR2, et TLR4 sont certainement les plus étudiés dans l'obésité (138). En effet, il a été montré que les acides gras modulaient les voies de signalisation induites par TLR4 et la quantité d'acides gras libres présents dans le sérum après relargage par les adipocytes, est augmentée dans l'obésité (139). Par exemple des acides gras saturés tels que l'acide laurique, l'acide palmitique et l'acide stéarique induisent et/ou modulent une réponse inflammatoire *via* TLR4 (140) (141) (142). Concernant les protéines sécrétées par le tissu adipeux nous pouvons illustrer leur action par l'exemple de la résistine. Elle est augmentée dans le sérum des patients obèses (tableau 1) et se fixe directement à TLR4 ce qui induit la résistance à

l'insuline (143). TLR2 reconnaît une large gamme de dérivés bactériens tels que des lipopeptides ou le PGN. Il a été montré que l'acide laurique induit l'activation de NF- $\kappa$ B *via* la dimérisation de TLR2 avec TLR1 et TLR6 (144) (145) (146). D'autres travaux ont montré que la stimulation de lignées de myoblastes par l'acide palmitique active NF- $\kappa$ B par la voie TLR2-MyD88, et que cette réponse inflammatoire entraîne la résistance à l'insuline (146) (Figure 2).

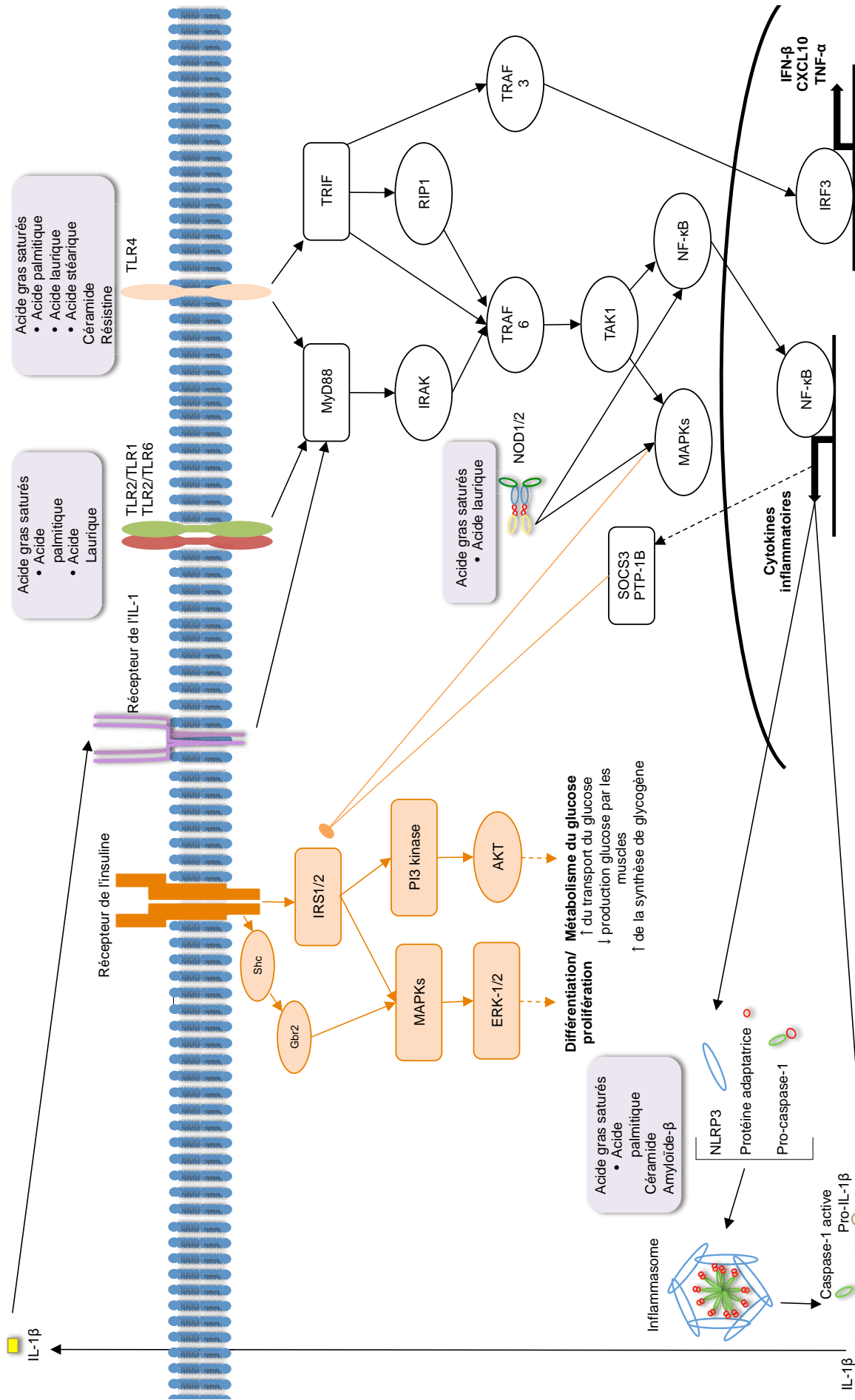
D'autres PRRs sont représentés par la famille des récepteurs Nod (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain)-like (NLR). Ce sont des récepteurs intracellulaires qui reconnaissent des PGN bactériens. Les récepteurs NOD1 reconnaissent des dérivés des bactéries Gram+ et les récepteurs NOD2 reconnaissent des dérivés des bactéries Gram+ et Gram-. Il existe de nombreux travaux montrant que l'activation de NOD1 et NOD2 est associée à la résistance à l'insuline. Par exemple Schertzer *et al.* (147) ont montré que des souris double KO NOD1 et NOD2 sont protégées de l'inflammation induite par un régime riche en graisse, de l'accumulation de lipides dans le foie et du développement de la résistance à l'insuline dans le tissu adipeux et le foie. De plus, l'acide laurique peut activer la voie NF- $\kappa$ B par le biais de NOD1/2 ce qui suggère que les acides gras saturés pourraient être des ligands endogènes de NOD1 et NOD2 (148) (149). Un autre récepteur NLR est impliqué dans l'obésité, il s'agit de NLRP3 (NOD-Like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3). NLRP3 est exprimé par les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les neutrophiles, et son expression est augmentée suite à une réponse aux PAMPs et aux DAMPs (150). La signalisation par NLRP3 se fait en deux étapes. La première implique l'induction de l'expression de NLRP3 et du pro-IL-1 $\beta$  ce qui se fait grâce à l'activation de NF- $\kappa$ B par les TLRs et l'IL-1R. La seconde étape est l'assemblage de l'inflammasome NLRP3, un complexe protéique oligomérique comprenant NLRP3 et pro-caspase-1, dont la résultante est l'activation de la caspase 1 qui permet le clivage du pro-IL-1 $\beta$  et ainsi la libération d'IL-1 $\beta$ . L'inflammasome a un rôle critique dans le développement de l'inflammation du tissu adipeux et de la résistance à l'insuline chez la souris et chez l'homme. En effet, chez des patients souffrants de diabète de type II, la perte de poids corrèle avec l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, une diminution de l'expression de NLRP3 et d'IL-1 $\beta$  dans le tissu adipeux (151). L'IL-1 $\beta$  sécrétée active les voies NF- $\kappa$ B et MAPK par son interaction avec le récepteur IL-1R et perturbe la voie de signalisation de l'insuline (Figure 3). Au cours de l'obésité, la quantité d'acides gras libres est augmentée (139). Ces acides gras peuvent être phagocytés par les macrophages qui les utiliseront pour générer des céramides (152). Par conséquent, les céramides, composés de shingoside et d'acides gras, pourraient être des DAMPs responsables

de l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans l'obésité car elles induisent l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  d'une manière dépendante de NLRP3. Un autre acide gras, l'acide palmitique, est aussi capable d'activer l'inflammasome (128). Parallèlement, le polypeptide amyloïde des îlots pancréatiques (IAPP), qui s'accumule chez les patients souffrant de diabète de type II, est également un inducteur de NLRP3 (153). En ce qui concerne les monocytes, l'activation de l'inflammasome NLRP3 se fait par l'intermédiaire de l'activation de TLR2, et elle est modulée par les acides gras provenant de l'alimentation (154). Certains acides gras insaturés préviennent l'activation de l'inflammasome NLRP3 alors que des acides gras saturés tels que l'acide palmitique l'activent (155) (Figure 2).

Dans l'obésité il existe une quantité accrue de DAMPs libérés par les cellules nécrotiques. Ces DAMPs se retrouvent dans la circulation et dans les tissus et, parce que des cellules très diverses telles que les cellules immunitaires, les cellules musculaires, les cellules hépatiques, les adipocytes et les cellules des îlots pancréatiques expriment différents types de PRRs. l'effet de ces ligands endogènes est donc global au niveau de l'organisme dans l'inflammation chronique induite par l'obésité. De plus les modifications au niveau de la barrière intestinale (115) (116) (117) (118) et le taux plus élevé de ligands exogènes dans le sérum de patients obèses comme par exemple le LPS (22), indiquent que des ligands endogènes et exogènes peuvent déclencher et maintenir l'inflammation dans l'obésité.

➤ Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosome (PPAR)

Les PPAR sont des récepteurs nucléaires qui transmettent les effets des acides gras et de leurs dérivés sur l'expression des gènes, ils comprennent PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\delta$  et PPAR- $\gamma$ . Ils sont exprimés par les monocytes, les macrophages et les adipocytes et sont des modulateurs clefs de la polarisation des macrophages et de l'inflammation du tissu adipeux. PPAR- $\alpha$  aurait un effet anti-inflammatoire. Sa déplétion chez la souris conduit à l'up-régulation de cytokines, de chimiokines et de marqueurs de l'inflammation des macrophages chez des souris soumises à un régime riche en graisse (156). De la même façon PPAR- $\delta$  et PPAR- $\gamma$  réduisent l'inflammation du tissu adipeux, favorisent la polarisation M2 des macrophages, et améliorent la sensibilité à l'insuline (157) (158) (133) (159). Les PPARs suppriment l'inflammation par de nombreux mécanismes. Ainsi PPAR- $\alpha$  et PPAR- $\gamma$  inhibent l'expression de gènes pro-



**Figure 2.** Les voies de signalisation de l'insuline peuvent être inhibées par des signaux endogènes de danger (DAMPs) (cadre violet) intervenant au niveau des récepteurs « toll-like » (TLR) ou des récepteurs NOD-like (NLR). TLR2/TLR1, TLR2/TLR6 et TLR4 activent à la fois le facteur nucléaire NF-κB et les protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPKs) en reconnaissant différents DAMPs. L'activation de NF-κB conduit à la synthèse de cytokines inflammatoires. Le suppresseur de la signalisation par les cytokines (SOCS)-3, la protéine tyrosine phosphatase (PTP)-B1 et des MAPKs inhibent la phosphorylation du récepteur de l'insuline par les substrats du récepteur de l'insuline (IRS) 1 et 2. L'activation de NF-κB par les TLRs conduit aussi à la synthèse de NLRP3 (NOD-Like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3) et du précurseur de l'IL-1β. La reconnaissance de DAMPs par NLRP3 déclenche l'assemblage de l'inflammasome qui aboutit à l'activation de la caspase-1 et finalement à la production d'IL-1β. L'interaction de l'IL-1β sécrétée avec le récepteur de l'IL-1β active des MAPKs et ainsi inhibe la voie de signalisation de l'insuline.

inflammatoires en interférant avec l'activité des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, AP-1 et STATs (160) (161).

➤ Les céramides et les lipides intracellulaires dans l'inflammation

Un autre dénominateur commun entre le métabolisme et l'inflammation est l'équilibre entre les différentes espèces de lipides intracellulaires comme les céramides et les sphingolipides. Il est intéressant de prendre en considération le fait que dans de nombreux tissus métaboliques la synthèse de céramides par le LPS et les acides gras saturés dépend de TLR4 (123) et que l'inhibition de la production de céramide bloque la capacité des acides gras à induire la résistance à l'insuline. L'effet bénéfique de l'adiponectine en tant que désactivatrice des voies pro-inflammatoires et promotrice de la sensibilité à l'insuline pourrait être du en partie à sa capacité à stimuler les céramidases et donc à moduler l'équilibre entre les céramides et les sphingolipides (162).

*c/ Autres mécanismes intervenant dans l'inflammation de bas grade caractérisant l'obésité*

➤ Le stress du réticulum endoplasmique et les kinases C-Jun N-terminales activées par le stress (JNK)

On observe une activation globale du stress du réticulum endoplasmique dans l'obésité qui est intimement liée aux deux voies JNK1 et IKK/NF- $\kappa$ B dans les tissus métaboliques (163). Par exemple, la kinase dépendante des ARN double brins (PKR) est un PRR qui se situe à l'interface entre le stress du réticulum endoplasmique et les nutriments. En effet, Nakamura *et al.* ont montré à l'aide du modèle murin DIO, d'un modèle de souris génétiquement obèse, de souris sauvages perfusées avec des acides gras libres, et à l'aide de lignées de fibroblastes de souris cultivées en présence d'acide palmitique, que l'activité de PKR était régulée par les lipides. Ils ont montré aussi qu'elle était régulée par le stress du réticulum endoplasmique et que PKR coordonne l'activité d'autres kinases inflammatoires comme les JNKs pour réguler l'action de l'insuline (164). Plus généralement, l'obésité active JNK dans les tissus répondant à l'insuline certainement en réponse à des signaux de stress tels que les acides gras, l'insuline, l'hyperglycémie et les cytokines pro-inflammatoires par le biais de voies de signalisations communes à IKK/NF- $\kappa$ B et situées en aval de JNK (131). Les

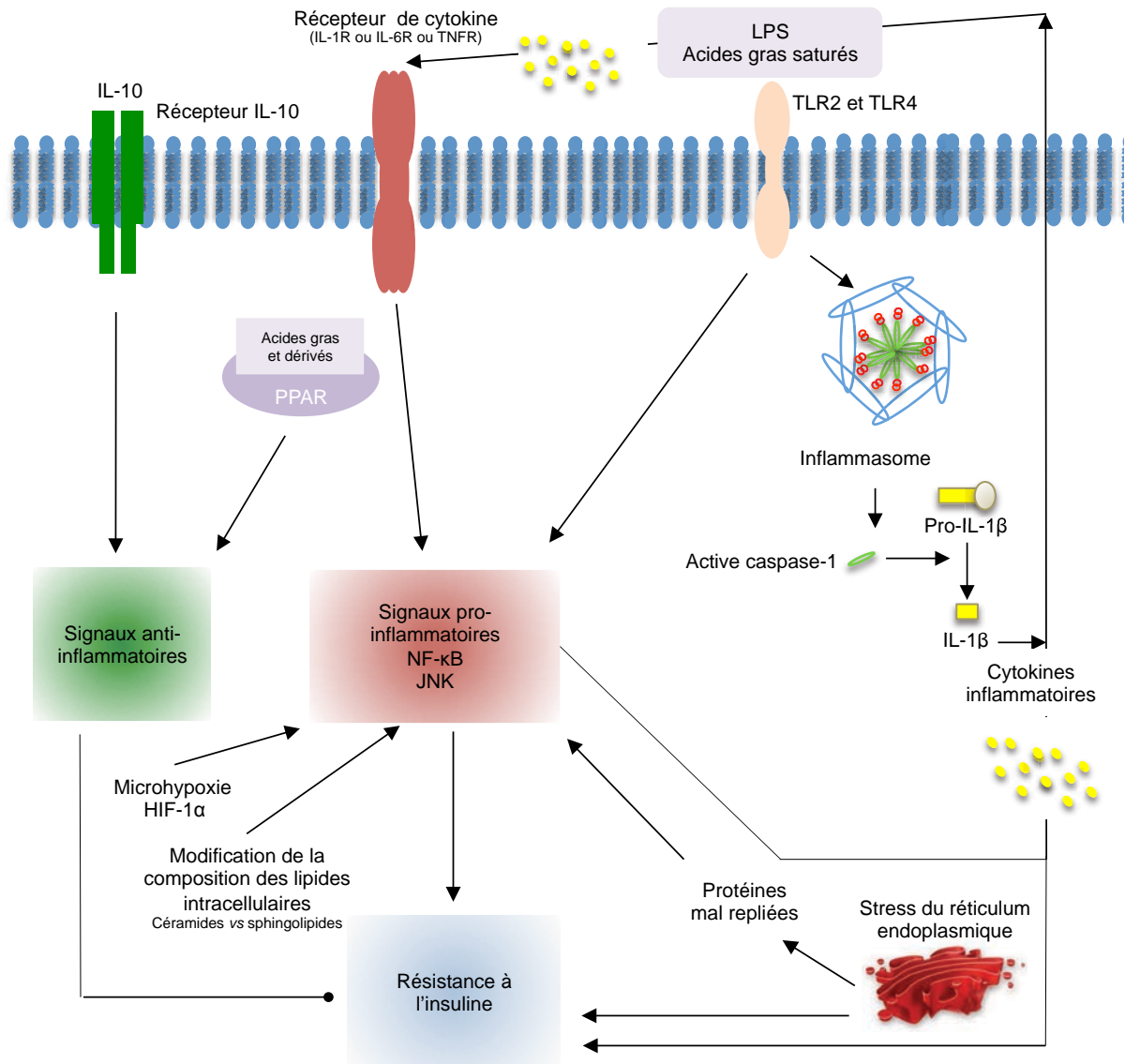
effets de JNK1 sur les cellules non hématopoiétiques jouent sur le contrôle de la masse corporelle, la dépense énergétique et le métabolisme du glucose (166) (167).

➤ L'hypoxie

Au cours du développement de l'obésité, l'approvisionnement en oxygène du tissu adipeux devient insuffisante ; il se forme des zones de « microhypoxie ». Ce phénomène d'abord observé chez la souris est aussi présent chez l'homme (168). Cela entraîne l'activation du facteur de transcription  $1\alpha$  inducible par l'hypoxie (HIF- $1\alpha$ ) qui lui-même entraîne l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, le syndrome d'apnée du sommeil, responsable d'épisodes d'hypoxie nocturnes est très fréquent dans l'obésité et participe à l'activation de l'inflammation systémique et tissulaire (170) (171)

Pour conclure la figure 3 présente un modèle hypothétique de l'initiation et du maintien de l'inflammation dans l'obésité.



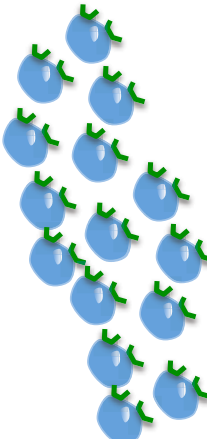

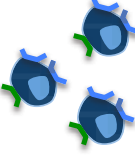


**Figure 3. Modèle hypothétique de l'initiation et du maintien de l'inflammation dans l'obésité.** Des signaux tels que les acides gras saturés, le lipopolysaccharide (LPS) ou le « tumor necrosis factor » (TNF) stimulent les voies pro-inflammatoires par leur interaction avec les récepteurs membranaires TLRs ou le récepteur au TNF entraînant l'activation de signaux pro-inflammatoires des voies NF-κB et JNK ou l'activation de l'inflammasome qui conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire et à la libération d'interleukine-1β (IL-1β). Au niveau intracellulaire, les acides gras peuvent promouvoir le stress du réticulum endoplasmique. Ce phénomène avec l'hypoxie et la modification de l'équilibre entre les céramides et les sphingolipides activent également les signaux pro-inflammatoires. L'ensemble conduit à l'installation de la résistance à l'insuline. L'interleukine-10 (IL-10) en interagissant avec son récepteur membranaire module l'inflammation. Les récepteurs nucléaires PPAR peuvent également moduler l'inflammation par leur capacité à répondre aux acides gras.

## **B. Le rôle des monocytes dans l'obésité**

### 1. Monocytes humains : généralités

Les monocytes sont des cellules mononuclées faisant partie du système immunitaire inné, représentant environ 6% des globules blancs chez l'homme. Les monocytes sont issus des cellules progénitrices des monocytes (cMoPs) de la moelle osseuse. Ils circulent dans le sang quelques jours puis meurent où bien infiltrent les tissus et se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques, dont les fonctions variées dépendent du microenvironnement dans lequel ils résident. Ils peuvent également dans certaines conditions garder leur phénotype de monocyte lorsqu'ils entrent dans des tissus comme la peau ou les poumons où ils acquièrent des antigènes puis ils retournent dans la circulation en direction des ganglions lymphatiques sans s'être différenciés en macrophages ou en cellules dendritiques (172) (173). Chez la souris, il a été montré qu'il existe des macrophages qui ne proviennent pas des monocytes circulants mais qui sont différenciés dans les tissus au cours de l'embryogénèse. Ils sont génétiquement différents des macrophages dérivant des monocytes circulants (174) (175). Le besoin en monocytes est augmenté pendant l'inflammation, ils sont alors rapidement remplacés grâce à leur mobilisation depuis la moelle osseuse ce qui résulte en une augmentation de leur nombre dans la circulation que l'on appelle monocytose. Ce phénomène est à associer avec un influx important de monocytes dans les tissus durant l'inflammation (176) (169) (178). Chez l'homme, où l'étude de l'ontogénèse n'est pas facilitée comme chez la souris, les populations de cellules phagocytaires mononuclées qui dériveraient directement des monocytes ne sont pas aussi bien définies. Il existe néanmoins des analyses transcriptomiques suggérant une origine monocytaires de certaines populations de cellules dendritiques du derme et de l'intestin ainsi que dans des tissus inflammés (179). Ainsi, les monocytes ne sont pas seulement les précurseurs de cellules phagocytaires mononuclées infiltrant les tissus inflammés, ils sont aussi des cellules multifonctionnelles jouant un rôle essentiel dans l'homéostasie, la défense immunitaire et la réparation des tissus. La nomenclature officielle de l'Union Internationale des Sociétés d'Immunologies distingue trois sous populations de monocytes humains en fonction du niveau d'expression des récepteurs FCR $\gamma$ III (CD16) et CD14 : les monocytes classiques CD14 $^{++}$ CD16 $^{-}$  (CM), les monocytes intermédiaires CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$  (IM) et, les monocytes non classiques CD14 $^{+}$ CD16 $^{++}$  (NCM) (180) (Figure 4). Ces sous populations présentent des profils d'expression des récepteurs de chimiokines différents qui reflètent

	Marqueurs principaux	Fonctions principales
		
<b>CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup></b> (80%-90%)	CCR2 CD93 CD64 CD11b CD36 CXCR2 CD62L CCR1 CXCR1 CD99 CLEC4d CLEC5A IL13RA1	<b>Monocytes Classiques</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fort potentiel de phagocytose</li> <li>• Production d'agents antimicrobien</li> <li>• Production de CCL2 et d'IL-10 après stimulation par LPS</li> </ul>
		
<b>CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup></b>	CCR5 CD74 HLA-DR CD105 VEGFR2 HLA-ABC CD301 GFRA2	<b>Monocytes Intermédiaires</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Présentation de l'antigène par les MHCII; stimulation de la prolifération des lymphocytes T CD4</li> <li>• Forte production basale de dérivés réactifs de l'oxygène</li> <li>• Production de TNF et d'IL-1<math>\beta</math> après stimulation par LPS</li> <li>• Mobilisation du pool marginal par l'exercice</li> <li>• Déplétion par les glucocorticoïdes</li> <li>• Pouvoir angiogénique</li> </ul>
		
<b>CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup></b>	CX3CR1 CD31 CD43 CD11a CD47 CD115 CD294 SIGLEC10 CD162	<b>Monocytes Non Classiques</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Patrouille les endothélium de manière dépendante de LFA-1</li> <li>• Détecte les virus et les acides nucléiques via TLR7 et TLR8</li> <li>• Télomères courts</li> <li>• Mobilisation du pool marginal par l'exercice</li> <li>• Déplétion par les glucocorticoïdes</li> </ul>

**Figure 4.** Principaux marqueurs et principales fonctions caractérisant les trois sous population de monocytes humains tirés de plusieurs publications. D'après A.M. Zawada et al., *Immunobiology*, 2012

probablement des capacités à être recrutées différentes. Les CM CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> sont CCR2<sup>++</sup>CX3CR1<sup>-/+</sup>CCR5<sup>-</sup>, les IM sont CCR2<sup>-/+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CCR5<sup>++</sup> et enfin les NCM sont

CCR2-CX3CR1<sup>++</sup>CCR5<sup>-</sup>. Wong *et al.* (181) et Zawada *et al.* (182) ont décrit en 2011 les trois sous populations de monocytes chez des sujets sains par des analyses transcriptomiques, cytométrie en flux et par des tests fonctionnels de production de cytokines. Leurs travaux ont montré chez l'homme que les CM qui représentent la population majoritaire (environ 90%), sont les plus versatiles. Ils expriment le plus large panel de récepteurs membranaires, de gènes impliqués dans une grande diversité de fonctions comprenant la réparation des tissus et la réponse immunitaire et produisent le plus grand nombre de cytokines et de chimiokines (G-CSF, IL-10, CCL2, CCL5 et IL-6) en réponse à la stimulation par LPS. Ces données complètent les travaux de Cros *et al.* (183) montrant qu'ils produisent CCL2 et IL-10 consécutivement à une stimulation par LPS. De plus, ils entretiendraient l'inflammation par la surexpression de gènes pro-inflammatoires tels que les gènes codant pour les protéines S100 fixant le calcium (S100) A12 et A8/9 (181). S100A12 et S100A8/9 sont des marqueurs importants jouant un rôle dans le maintien de l'inflammation. Elles sont sécrétées en autres par les granulocytes et les monocytes suite à une activation de l'immunité innée par exemple par le biais de l'interaction entre TLR4 et LPS. Elles peuvent être sécrétées par des cellules activées ou bien relarguées par des cellules en nécrose. Fonctionnellement, elles sont considérées comme des DAMPs. Elles ont la capacité à activer les cellules endothéliales par les voies de TLR4 et du récepteur des produits avancés de la glycation (RAGE) conduisant *via* l'action de NF- $\kappa$ B à 1) l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium, les molécules d'adhésion intercellulaires et vasculaires (ICAM et VCAM) et la sélectine et 2) à la sécrétion de chimiokines comme l'IL-8 (CXCL8) qui attirent les monocytes vers l'endothélium (184). Les IM et NCM représentent 10% des monocytes restant, sont très proches phénotypiquement mais possèdent néanmoins des caractéristiques fonctionnelles qui leur sont propres (183). Ainsi les IM seraient plus impliqués dans la présentation des antigènes. Ils possèdent un fort potentiel inflammatoire puisqu'ils sont les principaux producteurs des dérivés réactifs de l'oxygène à l'état basal (185) et qu'ils produisent spécifiquement IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  suite à une stimulation par LPS. A l'opposé, les NCM produisent IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et CCL3 après stimulation par des acides nucléiques *via* la voie TLR7-TLR8-MyD88-MEK plutôt que par une stimulation avec LPS (183). Enfin, les NCM humains patrouillent les endothéliums des vaisseaux sanguins de souris après un transfert adoptif par un mécanisme dépendant de la fonction lymphocytaire associée à l'antigène-1 (LEAF-1) (183). Une analyse comparant les données de cinq études transcriptomiques des sous populations de monocytes confirme que les CM soutiennent les

réponses anti-bactériennes et inflammatoires alors que les NCM ont une activité métabolique et du cytosquelette en accord avec celui de cellules patrouilleuses motiles (186).

Les trois sous populations de monocytes sont différenciellement impliquées dans diverses pathologies dont voici quelques illustrations. Le nombre de NCM et IM est significativement augmenté chez des patients atteints de psoriasis, une maladie inflammatoire et chronique de la peau. La proportion de monocytes CD16+ est augmentée chez des patients souffrant de la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire et chronique de l'intestin, et curieusement, il a été montré dans cette pathologie qu'un traitement efficace par des anticorps anti-TNF- $\alpha$  augmentait encore plus la proportion d'IM (187). Dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, une maladie inflammatoire chronique touchant les articulations, il a été montré qu'un nombre plus important de CM et d'IM dans la circulation des patients est un mauvais indicateur pronostic de la réponse clinique à un traitement par méthotrexate (acide (N-[4-[[[2,4-diamino-6-pteridiny]méthyl]méthylamino]benzoyl]-L-glutamique) (188). Des travaux sur la pré-éclampsie, une complication de la grossesse associée à une hypertension artérielle et dont l'obésité est un facteur de risque ont montré l'implication spécifique des IM (189). Enfin, une étude comparative montre que les phénotypes des sous populations de monocytes de patients infectés par le virus HIV-1 et de patients présentant un syndrome coronarien aigu mais non infectés par le virus HIV-1 présentaient des similitudes. Il existe donc des mécanismes communs faisant intervenir les monocytes dans ces deux pathologies (190). Pour conclure, si l'on cherche des points communs à toutes ces pathologies où il a été montré une implication des monocytes et plus précisément une implication différencielle des trois sous populations, ce sont les caractères inflammatoires et chroniques qui émergent. Par conséquent, nous nous sommes naturellement interrogés sur le rôle de chacune des trois sous populations de monocyte dans l'obésité et ses pathologies métaboliques associées.

## 2. Monocytes et obésité

Des études visant à quantifier les cellules immunitaires dans le cadre de l'obésité chez l'homme montrent une corrélation positive entre le nombre de monocytes et l'IMC (191) (192) (14). De plus, la quantité de monocytes est positivement corrélée au taux de triglycérides et négativement aux taux de HDL-cholestérol (HDL-c) (14), deux anomalies métaboliques classiquement observées au cours de l'obésité. Une première étude portant plus spécifiquement sur les monocytes a montré que l'augmentation du nombre de monocytes avec

l'IMC corrélait avec une augmentation de la sous-population exprimant à la fois CD14 et CD16 avec un retour à l'état basal après une perte de poids induite par chirurgie gastrique (14). Prenant en compte l'évolution de la nomenclature officielle de l'Union Internationale des Sociétés d'Immunologie, notre équipe est allée plus loin en considérant séparément les trois sous populations de monocytes. Elle a montré une augmentation de la proportion et du nombre absolu des IM et des NCM chez des patients obèses par rapport aux sujets non obèses et une corrélation entre le pourcentage de monocytes non classiques et la glycémie qui est indépendante de la masse grasse. De plus, une perte de poids importante induite par une chirurgie bariatrique s'accompagne d'une diminution de la fréquence de cette sous-population et ces variations sont fortement corrélées aux variations de masse grasse (193). D'autres études portant sur le phénotype des monocytes révèlent des corrélations positives entre les marqueurs de l'activation des monocytes et l'obésité (194). Un phénotype inflammatoire des monocytes dans la circulation de patients obèses a été mis en évidence par une augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) ainsi que par l'activation du stress du réticulum endoplasmique (190).

De ces observations découlent des interrogations concernant le rôle et l'origine des monocytes dont le nombre et le phénotype sont modifiés par l'obésité. Les premières idées furent qu'ils étaient les précurseurs des macrophages du tissu adipeux. En effet, des expériences *in vitro* laissent penser que CCL5 qui est augmenté dans le sérum et le tissu adipeux de patients obèses par rapport à ceux de sujets sains, participerait à l'inflammation du tissu adipeux en recrutant des monocytes et en ayant une fonction anti-apoptotique sur les macrophages du tissu adipeux (196). Dans le même ordre d'idée, l'haptoglobine qui est une protéine de la réaction inflammatoire ayant des propriétés anti-oxydantes et qui est up-régulée par le tissu adipeux de sujets obèses, est capable d'attirer par chimiotactisme les monocytes grâce à son interaction avec CCR2 (197). Une autre étude, qui confirme une augmentation du pourcentage de monocytes exprimant à la fois CD14 et CD16 dans l'obésité, révèle une modulation par l'obésité du profil d'expression des récepteurs de chimiokine C-C (CCR) des monocytes et plus particulièrement de CCR2 qui est up-régulé. Ces mêmes travaux, par des essais de migration *in vitro*, ont montré une plus grande activité chimiotactique des monocytes de patientes obèses en corrélation avec l'expression de CCR2 et la résistance à l'insuline (198). Concernant l'explication de l'origine des monocytes surnuméraires dans la circulation de patients obèses, des pistes sont apportées par des travaux sur des modèles murins d'obésité. Ils ont montré une monocytose importante associée à une expansion des progéniteurs myéloïdes de la moelle osseuse. Ils ont également montré que par l'intermédiaire

des protéines S100A8/A9 produites par les adipocytes, les macrophages du tissu adipeux produisent IL-1 $\beta$  notamment par la voie TLR4/MyD88. IL-1 $\beta$  interagit avec le récepteur IL-1 (IL-1R) des progéniteurs myéloïdes entraînant la stimulation de la production de monocytes. Les macrophages du tissu adipeux favorisent ainsi la myélopoïèse et la monocytose dans l'obésité (199).

### 3. Le rôle des monocytes circulants dans les pathologies métaboliques associées à l'obésité

#### *a. Monocytes et dyslipidémie*

Les dyslipidémies sont des maladies du métabolisme des lipoprotéines. Dans l'obésité elles se manifestent par un taux élevé à jeun et également post-prandial des triglycérides, des acides gras libres, un taux réduit de HDL-c, et une composition anormale des LDL avec notamment un nombre plus important de LDL petites et denses. Le faible taux de HDL-c est dû à son catabolisme accru et peut être relié à l'enrichissement en triglycérides. Il existe donc un lien entre le nombre de monocytes dans la circulation et les dyslipidémies de l'obésité puisque la quantité de monocytes est positivement corrélée au taux de triglycérides et négativement aux taux de HDL-c (201). Il faut noter qu'un traitement à la pravastatine, un médicament de la classe des statines qui a pour objectif de réduire le taux de cholestérol et de triglycérides sanguins, induit également une réduction du nombre de monocytes (201). Chez l'homme, des taux élevés de cholestérol et de LDL corrélaient avec une plus forte expression de CCR2 à la surface des monocytes (203) or CCR2 est notamment utilisé par les monocytes pour quitter la moelle osseuse (204) et est préférentiellement exprimé par les CM. D'autres études ont montré que l'hyperlipidémie altérait le phénotype des monocytes. Non seulement l'hyperlipidémie provoque l'up-régulation de molécules d'adhérence cellulaire (CAM) à la surface des cellules endothéliales mais également à la surface des monocytes humains. Ainsi, l'expression de CD18 (intégrin  $\beta$ 2) et CD54 (ICAM-1) est plus élevée à la surface des monocytes de patients présentant de l'hypertriglycéridémie que chez des sujets contrôles (203). Concernant l'implication des différentes sous populations de monocytes dans les dyslipidémies, il a été observé chez des patients ayant (familialement) un taux de cholestérol élevé que les monocytes CD16+ étaient plus spécialisés dans l'ingestion des oxLDL à la surface des endothéliums activés que les CM CD16- qui ingèrent les LDL natifs (204). Une

étude de 2013 portant sur l'analyse spécifique des trois sous populations de monocytes humains en relation avec le taux de HDL-c met en évidence, grâce à une cohorte de sujets sélectionnés de façon aléatoire, une corrélation négative entre le pourcentage de CM et le taux de HDL-c et une corrélation directe entre le pourcentage de NCM et ce même taux alors qu'aucune corrélation n'a été observée avec le pourcentage des IM. Ensuite, dans cette même étude et grâce à une autre cohorte, des sujets sains ont été comparés à des patients présentant une dyslipidémie avec un faible taux de HDL-c. Ces derniers présentent une augmentation significative du pourcentage de CM et une diminution significative des NCM. De plus, les monocytes isolés des sujets sains et des patients ont montré une expression accrue chez les patients des ARNm codant pour une série de chimiokines et de cytokines en relation avec l'activation des monocytes telles que : CD40L, MCP1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 et IL-10 (205).

### *b. Monocytes et athérosclérose*

Des dysfonctionnements de l'endothélium vasculaire ainsi que l'inflammation chronique des parois artérielles entraînent le développement de plaques d'athérome. Ces événements sont causés par des facteurs de risque qui comprennent non seulement l'obésité mais aussi la consommation de cigarettes, l'hypercholestérolémie et l'hypertension. Ces facteurs de risque par l'intermédiaire de stimuli pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'ox-LDL et l'angiotensine II (206) (207) (208) (209) (210), induisent l'expression de molécules d'adhésion, dont notamment le ligand de l'intégrine et la sélectine, à la surface des cellules endothéliales, ce qui permet le recrutement de monocytes circulants (208) (211). Les monocytes sont les premières cellules immunitaires à infiltrer les plaques d'athéromes en formation et, de nombreuses études indiquent qu'ils sont essentiels au développement de l'athérosclérose (212). Les efforts de recherche ont essentiellement porté sur les molécules responsables de leur recrutement et leur maintien dans les plaques d'athérome. Ils ont mis en évidence chez la souris, grâce à des études impliquant du transfert adoptif de cellules marquées avec des molécules fluorescentes, la déplétion de sous populations ou l'utilisation de souris KO, le rôle essentiel de trois récepteurs de chimiokines et de leurs ligands respectifs : CCR2, CCR5 et CX3CR1. Ces molécules sont importantes de par leur fonction migratoire et, en plus, pour CX3CR1 par leur rôle dans le contrôle de la survie cellulaire (213). Des études de suivi des sous populations de monocytes ont montré chez la souris que les monocytes classiques (CCR2<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>) et les non classiques (CCR2<sup>-</sup>CX3CR1<sup>++</sup>Ly-6C<sup>lo</sup>) peuvent entrer dans les plaques d'athéromes mais les non classiques avec



une fréquence moindre. Ces deux types cellulaires ne dépendent pas des mêmes récepteurs de chimiokine pour migrer dans les plaques. Les monocytes non classiques ne sont pas dépendant de CX3CR1 pour migrer mais ont besoin de CCR2 et CCR5 alors que étonnamment, les monocytes CCR2(+)CX3CR1(+)Ly-6C(hi) que l'on peut comparer aux CM humains ont besoin de CX3CR1 en plus de CCR2 et CCR5 (214). Chez l'homme des études mécanistiques sur la mobilisation différentielle des sous populations de monocytes n'est pas possible *in vivo* et par conséquent l'appréhension des ces questions est essentiellement corrélative. Il existe des preuves expérimentales et cliniques laissant entrevoir une contribution spécifique des sous populations de monocytes dans l'athérosclérose. Plus précisément, une étude de 2012 portant sur une cohorte de 951 patients sélectionnés pour subir une angiographie coronaire a montré que parmi les trois sous populations de monocytes ce serait principalement le nombre de IM qui seraient indicateur du risque cardiovasculaire (215). Ceci est d'autant plus intéressant que les monocytes intermédiaires expriment sélectivement CCR5, un marqueur qui a été associé à l'athérosclérose dans plusieurs études épidémiologiques à grande échelle (216). Ces résultats sont à rapprocher de nos travaux qui montrent une diminution des NCM et des IM durant la perte de poids avec en plus une association entre la diminution des IM et la diminution de l'épaisseur de l'intima média mesurée à l'aorte (193). Néanmoins, une autre étude portant cette fois-ci non pas sur une cohorte de patients mais sur une cohorte de 700 sujets choisis aléatoirement, présente des résultats contradictoires. En effet, une augmentation des CM en nombre et en proportion serait indicatrice du risque d'évènements cardiovasculaires indépendamment du sexe, de l'âge, du statut de fumeur ou non, du taux de HDL-c, de la présence de diabète ou d'hypertension. Cette même étude montre une corrélation négative entre l'épaisseur de l'intima média mesurée à l'aorte et le pourcentage de monocytes exprimant CD16 (217). Deux aspects différencient cette dernière étude de la notre et de celle effectuée par Rogacev *et al.* (215) : 1) Elle a été effectuée à partir d'échantillons congelés et non à partir d'échantillons analysés le jour du prélèvement et 2) La cohorte est constituée de sujets sélectionnés aléatoirement alors que pour l'étude de Rogacev *et al.* et la notre deux cohortes de patients ont été étudiées, respectivement des patients éligibles pour une angiographie coronaire et des patients obèses avec ou non un diabète de type II, éligibles pour une chirurgie bariatrique.

### *c. Monocytes et diabète de type II*

L'inflammation chronique qui caractérise l'obésité est une composante clef dans le

développement de la résistance à l'insuline, une des caractéristiques du diabète de type II. Les cytokines pro-inflammatoires sont en partie la cause de la résistance à l'insuline dans le tissu adipeux, les muscles du squelette et le foie en inhibant les signaux de transduction de l'insuline (figure 3). Ces cytokines sont produites par les tissus cibles de l'insuline eux même, en particulier le tissu adipeux et le foie avec un rôle important des macrophages et des autres cellules immunitaires les infiltrants et notamment des lymphocytes T les infiltrants. C'est ainsi que les macrophages du tissu adipeux de patients présentant un diabète de type II ont une signature pro-inflammatoire très marquée conduite par une production accrue d'IL-1 $\beta$  dépendante de NLRP3. Cette augmentation est positivement corrélée avec une détérioration de la glycémie et diminue après une chirurgie gastrique. A cela s'ajoute un enrichissement spécifique en lymphocytes T CD4 produisant l'IL-17 et l'IL-22 (218). Parallèlement, dans la circulation de patients présentant un diabète de type II, le taux d'IL-6, d'IL-1 $\beta$  et de TGF- $\beta$  est élevé, or ces trois cytokines sont connues pour induire la différenciation des lymphocytes T vers un profil Th17 (219). Effectivement, le pourcentage de lymphocytes T mémoires Th17 est plus plus élevé dans la circulation de donneurs diabétiques comparés à des donneurs non diabétiques. *In vitro* les monocytes sont nécessaires au maintien du phénotype pro-inflammatoire des lymphocytes T provenant du sang de patients (220). Nous pouvons donc en déduire un rôle important des monocytes circulants dans l'installation mais aussi dans le maintien de l'inflammation systémique liée au diabète de type II. De plus, les monocytes de patients présentant un diabète de type II sécrètent de façon constitutive un taux élevé d'IL-6, d'IL-8, de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  (221).

## **II. Objectifs de la thèse**

### **A. Investigation du rôle des différentes populations de monocytes dans l'obésité**

Il existe donc une relation étroite entre l'augmentation excessive de la masse grasse qui caractérise l'obésité et les perturbations de l'équilibre des médiateurs cellulaires et moléculaires de l'immunité et plus particulièrement de l'inflammation. Cela se manifeste notamment par une activation des cellules mononucléées circulantes et par leur recrutement actif vers les tissus. L'inflammation systémique, centrale dans l'établissement et le maintien de l'état inflammatoire chronique, rend primordiale l'étude des monocytes circulants en tant que détecteurs de signaux métaboliques circulants qu'ils traduisent en signaux immunologiques mais aussi en tant que précurseur des macrophages. Nous savons déjà que le nombre et le phénotype des monocytes est modifié dans l'obésité avec notamment une modulation des proportions de chacune des trois sous populations (193). C'est pourquoi nous avons pour premier objectif de poursuivre la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des trois sous populations de monocytes afin de mieux comprendre leur participation dans l'inflammation de bas grade qui caractérise l'obésité. Pour cela, nous avons comparé dans les 3 sous populations de monocytes, l'expression de « gènes candidats » impliqués dans la migration, la phagocytose et l'inflammation chez des sujets sains et des sujets obèses. Nous avons ensuite testé leur capacité à sécréter des cytokines et des chimiokines inflammatoires en réponse à une stimulation de TLR4 ou de TLR8 et mesuré l'expression protéique des gènes surexprimés. Enfin nous avons examiné les corrélations existant entre le degré d'expression protéique de ces récepteurs surexprimés et des marqueurs cliniques de l'obésité. Les résultats de ces travaux sont présentés en première partie des résultats de la thèse sous la forme d'un article publié dans « The Journal of Immunology ». Notre second objectif était de découvrir des voies de signalisation qui seraient différenciellement modulées par les trois sous populations de monocytes afin de mieux comprendre l'implication de chacune des trois sous populations dans les comorbidités de l'obésité. Nous avons donc décidé de comparer l'expression au niveau du génome complet des trois sous populations de monocytes à partir de cellules triées par « Fluorescence Activated Cell Sorting » FACS chez des sujets témoins et chez des sujets obèses en utilisant la technique « Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays ». L'analyse de ces données est présentée en deuxième partie des résultats de la

thèse sous la forme d'un article à soumettre.

## **B. Méthodologie**

Pour l'ensemble de ces travaux de thèse nous disposions d'une cohorte de 45 patients obèses non diabétiques, éligibles pour un programme de chirurgie bariatrique et recrutés dans le service de nutrition de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière à Paris et d'un groupe de 26 sujets sains également non diabétiques. Les deux groupes étaient d'un âge moyen comparable. Afin de préserver au mieux la viabilité des monocytes, chacun des échantillons a été immédiatement traité après le prélèvement. Pour réduire le temps de tri par (FACS), il était impératif d'enrichir les échantillons par une première étape de centrifugation sur un gradient de Ficoll Hypaque suivit d'une deuxième étape par centrifugation sur un gradient de Percoll. Nous ne disposions que d'un maximum de 10 ml de sang par patient ou par donneur ce qui ajouté aux limitations techniques (présentées dans le paragraphe suivant) a rendu le recrutement d'un grand nombre de patients et de témoins dans l'étude difficile. L'ensemble de l'organisation expérimentale est présenté figure 5.

Pour la première partie de ce travail, nous avons mis au point une méthode de tri cellulaire par FACS impliquant le tri de populations rares. Pour l'expérience d'expression au niveau du génome complet les cellules étaient marquées avec CD14-APC et CD16-FITC. Après élimination des doublets et des cellules mortes, les monocytes ont été sélectionnés sur la base de leur morphologie, définie à l'aide d'un Dot-Plot représentant l'intensité de la lumière diffractée contre celle de la lumière réfractée par les cellules (FSC vs SSC), et de leur expression de CD14. Les trois sous populations de monocytes ont été sélectionnées ensuite en fonction de l'intensité d'expression de CD14 et CD16 : CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> pour les CM, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> pour les IM et CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> pour les NCM. En raison du faible volume de sang disponible pour certains sujets et pour les sous populations les moins représentées (IM et NCM) nous avons parfois moins de 9000 cellules à notre disposition. La rareté du matériel biologique nous a conduit à optimiser l'extraction des ARNs pour la réalisation des PCR quantitatives. Nous avons donc décidé de trier les cellules directement dans le tampon de lyse cellulaire et de les congeler immédiatement dans l'azote liquide. Les cellules triées étaient conservées à -80°C avant l'extraction de l'ARN. La vérification de la pureté des populations était faite immédiatement après le tri par répétition du tri dans du PBS afin de pouvoir ré-analyser par cytométrie en flux les populations triées. Les tris dont la pureté était

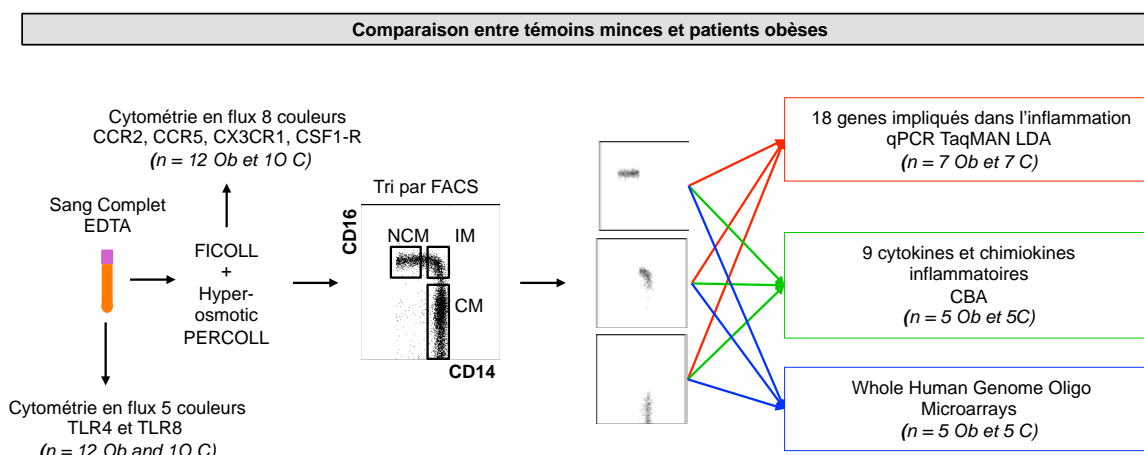
supérieure à 95% étaient validés et les échantillons inclus dans l'étude. 9000 cellules correspondent au nombre minimal de cellules triées à partir desquelles nous obtenons suffisamment d'ARN (5124 pg) de qualité, avec une valeur d'intégrité (RIN) supérieure ou égale à 7, pour effectuer les analyses d'expression des gènes par PCR quantitative. Après une transcription inverse les mêmes quantités d'ADNc ont été pré-amplifiées à l'aide d'un Taqman Master Mix PreAmp (Applied Biosystem) puis amplifiées à l'aide d'un Low Density Array System (LDA) réalisé à façon et enfin, analysées par le Biosystem Applied 7900HT. Le LDA a été conçu pour mesurer les variations d'expression des gènes de : CX3CR1, CSF-1R, SELPLG, TNF- $\alpha$ , CCR2, CCR5, CD3, ICAM1, IL-10, IL-8, IL-1 $\beta$ , CCL2, CCL3, TLR2, TLR4, TLR7, TLR8, PPAR- $\gamma$ . L'actine a été utilisée comme gène de référence. L'analyse de l'expression des gènes au niveau protéique a été faite par cytométrie en flux sur des PBMC enrichis en monocytes par un gradient de Percoll, à l'aide d'un panel comprenant CD14-APC, CD16-APC-H7, CD3-V450 CD19-V450, CD56-V450, CSF-1R-FITC, CCR5-PE/CF594, CCR2-PerCP-Cy5.5 et CX3CR1-PE-Cy7 afin de confirmer la modulation par l'obésité de l'expression de CSF-1R, CCR5, CCR2 et CX3CR1 au niveau de chaque sous population de monocytes. Un autre panel comprenant CD14-APC, CD16-APC-H7, CD3-V450 CD19-V450, CD56-V450 et TLR4-PE ou TLR8-PE a été conçu pour mesurer l'expression de TLR4 et de TLR8 à partir de sang complet.

Pour la réalisation des tests fonctionnels de production de cytokines par stimulation de TLR4 ou de TLR8, nous avons fixé le nombre minimal de cellules acceptables à 10000 cellules triées. Pour la sélection des monocytes nous avons ajouté au panel d'anticorps CD3-PE, CD19-PE et CD56-PE afin de créer un canal d'exclusion permettant d'éliminer les contaminations potentielles par des lymphocytes T et B et des cellules NK. Les cellules étaient triées dans du milieu de culture (RPMI 1640) supplémenté par 10% de sérum foetal bovin (RPMI 10% FBS). Après centrifugation des cellules triées, le milieu a été remplacé par du RPMI 10% FBS incluant du LPS (10 ng/ml), de l'ARN simple brin (ssRNA) (10 ug/ml) ou dans du milieu seul afin de tester la capacité différentielle des trois sous populations à répondre à une stimulation de TLR4 ou de TLR8. Après 18 heures de culture les surnageants ont été prélevés et congelés à -80°C pour un dosage ultérieur de 10 cytokines et chimiokines pro-inflammatoires : TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CXCL10 (IP10) et CXCL8 (IL-8) par la technique « Cytometry Bead Array » de la société Becton Dickinson. Pour le dosage, 20  $\mu$ l de chaque surnageant ont été utilisés.

Toutes les analyses statistiques de comparaison des moyennes entre le groupe de patients et le groupe de témoins ont été faites à l'aide du test U non paramétrique de Mann-

Whitney sauf pour les comparaisons d'expressions de gènes des microarrays où nous avons utilisé le test *t* de Student. La détermination des corrélations entre les différentes variables quantitatives mesurées a été faite par le calcul du coefficient de corrélation de Spearman. Pour chacune des analyses une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme significative.

La deuxième partie de ce travail qui consistait à rechercher des voies de signalisation qui seraient différenciellement modulées par l'obésité au niveau des trois sous populations de monocytes. Nous avons opté pour une étude au niveau du génome complet, et en raison notamment de son coût, nous n'avons la possibilité d'analyser le transcriptome que d'un très petit nombre d'échantillons. En effet, l'analyse du transcriptome d'un sujet implique le tri des trois sous populations et consécutivement l'hybridation de 3 microarrays. Nous avons donc pour 5 sujets obèses et 5 sujets sains, 30 échantillons à traiter. Brièvement, nous avons trié 2000 cellules de chacune des sous populations directement dans du tampon de lyse, vérifié la pureté des tris et congelé les échantillons. L'ensemble de la réalisation des microarray a été assuré par la société Miltenyi Biotec. Après extraction, les ARNs messagers ont été convertis en ADNc puis amplifiés et quantifiés. L'intégrité des ARNs a été vérifiée et 250 ng de chaque ADNc a été étiqueté avec la molécule fluorescente Cy3 et hybridé à un microarray « Agilent Whole Human Genome Microarray ». La fluorescence des signaux émis par les microarray hybridés a été scannée et convertie en valeur d'intensité du signal qui est proportionnelle à l'expression de chacune des sondes constituant le microarray. La démarche que nous avons adoptée pour le filtrage des données ainsi que la méthode d'analyse de ces données seront présentées dans la deuxième partie des résultats.



**Figure 5. Organisation expérimentale.** Comparaison des sous populations de monocytes chez des sujets sains et chez des sujets obèses non diabétiques

### **III. RESULTATS**

#### **A. Les monocytes dans l'obésité humaine : sous populations et fonctions**

Nos travaux visant à caractériser phénotypiquement et fonctionnellement les monocytes dans l'obésité humaine sont exposés dans un article intitulé : « Profiling of the three circulating monocyte subpopulations in the context of human obesity » et publié en mars 2015 dans la revue « The Journal of Immunology ».

##### 1. Introduction

Dans un article précédent nous avons observé une augmentation de la fréquence des IM et des NCM chez des patients obèses comparés à des sujets témoins non obèses avec une augmentation significative des NCM chez les patients obèses et diabétiques. Par une analyse multivariée nous avons montré une corrélation entre le pourcentage de NCM et la glycémie indépendante de la masse grasse. Nous avons aussi montré qu'une perte de poids drastique obtenue après une chirurgie bariatrique entraîne une diminution de la fréquence de ces deux sous populations et que l'amplitude de cette diminution corrèle avec la perte de masse grasse. De plus, une diminution d'au moins 5% de la masse grasse est suffisante pour observer une diminution significative du pourcentage des NCM. Nous avons également observé une diminution des IM après perte de poids corrélée avec une diminution de l'épaisseur de l'intima média mesurée à l'artère carotide. L'objectif de cette première partie a été de décrire les modifications phénotypiques et fonctionnelles des sous populations de monocytes dans l'obésité et de relier ces modifications aux fonctions métaboliques dans le but de mieux comprendre le rôle des monocytes dans l'inflammation de bas grade caractéristique de l'obésité. L'hypothèse de départ a reposée sur la modulation de l'expression de certains gènes dont les produits impliqués dans l'inflammation sont essentiels aux différentes fonctions des monocytes directement ou indirectement. Le point de départ de ce travail de caractérisation a été le choix de 18 gènes candidats qui pourraient être différentiellement modulés par l'obésité dans chacune des trois sous populations de monocytes. Nous avons donc sélectionné en premier lieu des gènes impliqués dans la fonction de migration avec les récepteurs de chimiokines : CCR2, CCR5 et CX3CR1 (138) (139) (140) (141) (142) (143) (144) (145)

(146) (222), en postulant qu'une expression différentielle de ces récepteurs expliquerait le recrutement préférentiel de l'une ou l'autre des sous populations dans les tissus inflammés. Une expression différentielle de CX3CR1 expliquerait également une meilleure résistance à l'apoptose de l'une ou l'autre des sous populations et par conséquent pourrait expliquer les variations de proportion de chacune des sous populations entre des sujets obèses et des témoins (223). Toujours concernant la fonction migratoire nous avons recherché des modulations d'expression des chimiokines CCL2 (MCP-1) et CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ). Ces deux molécules sont produites en abondance par les macrophages du tissu adipeux. L'idée était de définir laquelle des trois sous populations avait un profil sécrétoire s'approchant de celui des macrophages du tissu adipeux (78) (79). Afin de définir laquelle des trois sous populations infiltre préférentiellement le tissu adipeux inflammé dans l'obésité et plus largement les autres tissus métaboliques inflammés (*e.g.* le foie, le pancréas, les muscles), nous avons mesuré le niveau d'expression de molécules d'adhésion indispensables à la transmigration dans les tissus, le ligand de la sélectine P (PSCGL-1) et la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM). Enfin, pour terminer avec le rôle des monocytes en tant que précurseur des macrophages, nous avons mesuré l'expression de CSF1-R, un gène impliqué dans la différenciation des macrophages. Ensuite, nous nous sommes intéressés aux PPRs, comme médiateurs des signaux métaboliques en signaux inflammatoires. Nous avons évidemment choisi de mesurer l'expression différentielle de TLR2 et TLR4, deux récepteurs déjà largement étudiés dans l'obésité (138) (139) (140) (141) (142) (143) (144) (145) (146) (222) auxquels nous avons ajouté l'étude des récepteurs intracellulaires TLR7 et TLR8 comme détecteurs des acides nucléiques (ssRNA) ou de complexes contenant des acides nucléiques qui pourraient être libérés dans le milieu extracellulaire par des cellules en nécrose ou des cellules activées (137). Ceci d'autant plus que les NCM répondent spécifiquement aux virus et aux complexes contenant des acides nucléiques *via* la voie TLR7-TLR8-MyD88-MEK en sécrétant TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) (183). Une expression différentielle de ces PPRs impliquerait plus ou moins l'une ou l'autre des sous populations dans l'initiation et l'entretien de l'état inflammatoire de bas grade qui caractérise l'obésité. Avec toujours en tête la fonction de détecteur des signaux métaboliques nous avons ajouté à la liste de gènes, CD36 pour sa capacité à fixer les oxLDL (224), les lipoprotéines natives (225), les phospholipides et certaines acides gras libres (226). Concernant les récepteurs impliqués dans les grandes voies de signalisation nous avons sélectionné PPAR- $\gamma$  parce que c'est un récepteur nucléaire qui transmet les effets des acides gras et de leurs dérivés sur l'expression des gènes et parce qu'il est impliqué dans de nombreuses fonctions modulées par l'obésité comme par exemple la



polarisation des macrophages, le développement de la résistance à l'insuline et le transport du glucose (160) (161). Pour conclure notre exploration nous nous sommes intéressés aux cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IL-10 en tant qu'effectrices de la traduction inflammatoire des signaux métaboliques (128) (132) (133) (136) afin de savoir laquelle des sous populations était le plus directement impliquée dans le développement des maladies métaboliques associées à l'obésité. La suite de notre travail a été de confirmer au niveau protéique et fonctionnel les résultats de l'analyse transcriptomique.

## 2. Résultats

L'analyse de la modulation de la transcription par l'obésité des 18 gènes sélectionnés a montré que 7 gènes étaient modulés (Article 1, Figure 2). Le fait que ces gènes soient différemment modulés par les trois sous populations de monocytes nous ouvre des pistes dans la compréhension du rôle de chacune des sous populations de monocytes dans l'obésité. Il apparaît en première analyse que les CM et les IM up-régulent les récepteurs CCR2, CX3CR1 et CCR5 impliqués dans la migration, tandis que les IM up-régulent plutôt la sécrétion de molécules effectrices avec la chimiokine CCL2 et la cytokine IL-1 $\beta$  et que les NCM up-régulent le récepteur PPAR- $\gamma$ . Ces résultats feraient des CM, les précurseurs des macrophages dans les tissus des IM, les effecteurs de la réponse inflammatoire et des NCM, des « réparateurs » par l'up-régulation d'un récepteur nucléaire ayant des propriétés anti-inflammatoires et favorisant la polarisation M2 des macrophages. En accord avec la littérature TLR4 (138) est up-régulé par tous les monocytes et pour la première fois nous montrons une up-régulation de TLR8, un PPR intracellulaire, également par chacune des sous populations.

Nous avons pu confirmer au niveau protéique la surexpression de CCR2 et CCR5 par les CM et les IM indiquant une augmentation de leur potentiel migratoire dans l'obésité. En revanche CX3CR1 serait up-régulé par l'ensemble des monocytes (Article 1, Figure 4). Concernant l'up-régulation de TLR4 et de TLR8, nous la retrouvons au niveau protéique même si les différences ne sont pas statistiquement différentes. Au niveau fonctionnel nous avons montré que toutes les sous populations répondent plus fortement à la stimulation de TLR4 ou de TLR8 bien que pas toujours de façon significative (Article 1, Figure 3). Ces résultats renforcent l'idée de l'importance des TLRs comme médiateurs de l'inflammation dans l'obésité par leur fonctionnalité accrue dans les monocytes circulants de patients obèses comparés à ceux de donneurs non obèses.

L'étude des corrélations existantes entre le degré d'expression protéique des récepteurs surexprimés et des marqueurs cliniques de l'obésité ont montré une corrélation négative entre le degré d'expression de CCR2 et de CX3CR1 et le taux de HDL-c alors que le degré d'expression de CCR5 est positivement corrélé avec la glycémie, le taux de triglycérides et l'HOMA-IR, tous trois sont des marqueurs sanguins métaboliques de l'obésité (Article 1, Figure 5).

### 3. Conclusion

Nos résultats confirment le phénotype pro-inflammatoire des monocytes dans l'obésité avec notamment l'up-régulation de TLR4 et TLR8 par les trois sous populations et une plus forte réponse à la stimulation de TLR4 ou de TLR8. Il existe cependant des différences entre les sous populations en ce qui concerne l'intensité de la réponse à ces stimulations. Les CM de patients obèses comparés à ceux de témoins non obèses répondent plus fortement à la stimulation par LPS en produisant significativement plus d'IL-1 $\beta$  et, de TNF- $\alpha$  et d'IL-10 suite à la stimulation par ssRNA. Parmi les trois sous populations c'est donc celle dont la réponse fonctionnelle *via* TLR4 ou TLR8 est la plus fortement augmentée chez les sujets obèses, quantitativement et qualitativement, puisqu'elle implique le plus grand nombre de cytokines. Nous avons aussi montré que la fonction migratoire était différenciellement modulée par les trois sous populations avec une intensité d'expression significativement plus forte chez les sujets obèses des trois récepteurs de chimiokines étudiés : CCR2, CCR5 et CX3CR1 par les CM et les IM. Les NCM ne surexpriment significativement que CX3CR1. Les corrélations observées entre le degré d'expression de CCR2 et de CX3CR1 et le taux de HDL-c et celles observées entre le degré d'expression de CCR5 avec la glycémie, le taux de triglycérides et l'HOMA-IR varient en fonction des sous populations. Elles sont significativement plus fortes pour les NCM comparées à celles des CM et des IM. Il en est de même pour la corrélation entre le degré d'expression de CSF-1R et l'insulinémie et l'HOMA-IR. Ce qui suggère que l'augmentation des NCM en proportion et en nombre absolu dans l'obésité pourrait être un indicateur de risque des maladies cardiovasculaires et métaboliques.

### 4. Article 1 :



Turn complexity into clarity  
with Guava® multichannel, configurable flow cytometers.

EMD Millipore Corp. is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.



Guava easyCyte™ Flow Cytometers

[Request Demo](#)



## Profiling of the Three Circulating Monocyte Subpopulations in Human Obesity

Estelle F. Devêvre, Mariana Renovato-Martins, Karine Clément, Catherine Sautès-Fridman, Isabelle Cremer and Christine Poitou

This information is current as of June 9, 2015.

*J Immunol* 2015; 194:3917-3923; Prepublished online 18 March 2015;

doi: 10.4049/jimmunol.1402655

<http://www.jimmunol.org/content/194/8/3917>

**Supplementary Material** <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2015/03/18/jimmunol.140265.5.DCSupplemental.html>

**References** This article **cites 41 articles**, 21 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/194/8/3917.full#ref-list-1>

**Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscriptions>

**Permissions** Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/ji/copyright.html>

**Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

*The Journal of Immunology* is published twice each month by  
The American Association of Immunologists, Inc.,  
9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994.  
Copyright © 2015 by The American Association of  
Immunologists, Inc. All rights reserved.  
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



## Profiling of the Three Circulating Monocyte Subpopulations in Human Obesity

Estelle F. Devêvre,<sup>\*,†,‡,§,¶,1</sup> Mariana Renovato-Martins,<sup>\*,†,‡,§,1</sup> Karine Clément,<sup>†,‡,§,||,#,\*\*\*</sup>  
Catherine Sautès-Fridman,<sup>\*,‡,§</sup> Isabelle Cremer,<sup>\*,‡,§,1</sup> and Christine Poitou<sup>†,‡,§,||,#,\*\*\*,1</sup>

Three subpopulations of circulating monocytes have been described: CD14<sup>2+</sup>CD16<sup>-</sup> (classical monocytes [CM]), CD14<sup>2+</sup>CD16<sup>+</sup> (intermediate monocytes [IM]), and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>2+</sup> (nonclassical monocytes [NCM]). We previously showed that obesity is associated with an increased proportion of IM and NCM. Our objective is to decipher the migratory and inflammatory functions of each monocyte subset in obesity-related low-grade inflammation. Twenty-six healthy, normal-weight and nondiabetic volunteers (C) and 40 obese nondiabetic (Ob) individuals were included in this study. We explored the gene expression profile of 18 inflammatory genes in each subset of C and Ob subjects and measured protein expression of the upregulated genes. We then tested their functional response to TLR signaling in both groups. We showed an increased expression of CX3CR1 in all monocyte subpopulations and of CCR2 and CCR5 in CM and IM in the Ob group. We found negative correlation between CCR2 and CX3CR1 expressions and high-density lipoprotein-cholesterol, whereas CCR5 expression was positively linked to obesity-related metabolic traits. Production of inflammatory proteins upon bacterial LPS and viral ssRNA stimulation was higher in CM and NCM of the Ob group compared with the C group. Our work highlights an enhanced inflammatory phenotype of monocytes with a higher response to TLR4 and TLR8 stimulations in obesity. Moreover, it suggests an increased migration capacity of CM and IM subpopulations. *The Journal of Immunology*, 2015, 194: 3917–3923.

Obesity is an ongoing worldwide epidemic now recognized as a low-grade inflammatory disease characterized by increased concentrations of a large panel of cytokines, chemokines, and acute-phase proteins in the circulation (1, 2). Obesity-related inflammation favors the development of metabolic and cardiovascular complications (3), (4). This systemic inflammation results, at least in part, from activation of circulating immune cells (5), vascular endothelium (6), and excessive accumulation of inflammatory cells in adipose tissue (7). Monocytes, acting critically in several inflammatory diseases, have been recently categorized in three subsets according to the expression of LPS (CD14) and the FcγRIII (CD16) receptors (8, 9). The

CD14<sup>2+</sup>CD16<sup>-</sup> classical monocytes (CM) express high levels of CCR2, the chemokine receptor of CCL2 also known as MCP-1, and low levels of CCR5, receptor of CCL3 and CCL5, and of CX3CR1, the fractalkine (CX3CL1) receptor. In contrast, CD14<sup>2+</sup>CD16<sup>+</sup> intermediate monocytes (IM) and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>2+</sup> nonclassical monocytes (NCM) express high levels of CX3CR1 and CCR5 but do not express CCR2 (10, 11). We and others have described an increased proportion of circulating NCM and IM subsets in human chronic pathologies associated with low-grade inflammation, including obesity (12, 13). In addition, we demonstrated a decrease in proportion of NCM and IM during weight loss, a clinical situation characterized by a major improvement of systemic inflammation (12). In healthy subjects, transcriptomic approaches revealed major differences among CM, IM, and NCM subsets. Classical CD16<sup>-</sup> monocytes were described as the main antimicrobial monocytes (14, 15), whereas the two CD16<sup>+</sup> monocyte subsets were linked to Ag processing and presentation, and inflammation (16, 17). The three monocyte subsets can be polarized by the cytokine environment to acquire their functions and migration properties (10). Interestingly, it has been demonstrated that the NCM subset, known as “patrolling” monocytes, has the capacity to be stimulated by TLR7 and TLR8 ligands, implicating them in local surveillance of damaged or virus-infected tissues (15).

To date, there is no available information on the migratory and inflammatory functions of each monocyte subset in human obesity. Therefore, we performed array analysis to compare gene expression of 18 candidate genes related to migration, phagocytosis, and inflammatory processes in normal-weight and obese subjects before and after surgery-induced weight loss. We then tested their functional response to TLR signalings, and measured surface and intracellular protein expression of the upregulated genes (TLR4, TLR8, CCR2, CCR5, CX3CR1, and CSF-1R). Finally, we examined the correlation between protein expression of the upregulated receptors and common obesity-related clinical markers.

\*INSERM, Unité Mixte de Recherche 1138, Team 13, Centre de Recherches des Cordeliers, F-75006 Paris, France; †INSERM, U1166, Nutriomic Team 6, F-75006 Paris, France; ‡Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, F-75013 Paris, France; §Université Paris Descartes, F-75006 Paris, France; ¶Centre d’Imagerie Cellulaire et de Cytométrie, Centre de Recherche des Cordeliers, Unité Mixte de Recherche 1138, F-75006 Paris, France; ††Institute of Cardiometabolism and Nutrition, F-75013 Paris, France; †††Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Département Nutrition, F-75013 Paris, France; and ††††Centre de Recherche en Nutrition Humaine-Ile de France, F-75013 Paris, France

<sup>1</sup>E.F.D., M.R.-M., I.C., and C.P. contributed equally to this work.

Received for publication October 21, 2014. Accepted for publication February 4, 2015.

This work was supported by a Centre de Recherche des Cordeliers, Paris Young Investigator Fellowship (to I.C.), INSERM, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Université Paris-Descartes-Paris 5, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, and Contrat de Recherche Clinique Grant CRC P050318 (to C.P.).

Address correspondence and reprint requests to Prof. Isabelle Cremer, INSERM, Unité Mixte de Recherche 1138, Team 13, Centre de Recherches des Cordeliers, F-75006 Paris, France. E-mail address: isabelle.cremer@crc.jussieu.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: BMI, body mass index; C, normal-weight and nondiabetic volunteer; CM, classical monocyte; FMO, fluorescence minus one; HDL-c, high-density lipoprotein-cholesterol; % HS, % human serum PBS; IM, intermediate monocyte; MFI, mean fluorescence intensity; NCM, nonclassical monocyte; Ob, obese nondiabetic.

Copyright © 2015 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/15/\$25.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1402655

## Materials and Methods

### Subjects

Two groups of subjects were included in this study (Table I). The first group included 40 obese nondiabetic (Ob) individuals involved in a bariatric surgery program and recruited to the nutrition division of Pitié-Salpêtrière Hospital (Reference Center for the Medical and Surgery Care of Obesity, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN La Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France). Patients met the criteria for bariatric surgery as described earlier (12). The second group comprised 26 healthy normal-weight and nondiabetic volunteers (C), living in the same region as the Ob subjects. The Ethics Committee (CPP Ile de France 1) approved the clinical investigations for both Ob and C individuals. All subjects gave written informed consent. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was registered in a public trial registry (NCT00476658 and NCT01655017).

For each of the experiments, we used fasting blood samples from only part of the two groups. For ethical reasons, blood withdrawal for monocyte isolation was restricted to a maximum of 10 ml per patient. This resulted in isolation of  $1 \times 10^6$  to  $4 \times 10^6$  monocytes per patient, which limited the number of IM and NCM after FACS sorting, and experimental design was adapted accordingly (Supplemental Fig. 1).

### Mononuclear cell isolation and FACS sorting of monocyte subpopulations

PBMCs were isolated from blood by centrifugation on a Ficoll-Hypaque gradient (PAA Laboratories). Monocytes were then enriched by a centrifugation on a Hyper-osmotic Percoll<sup>plus</sup> Gradient (GE Healthcare) (18). Monocyte-enriched cell fraction was further subdivided by FACS. For the gene expression experiment, cells were stained with allophycocyanin-CD14 and FITC-CD16. Doublets and dead cells were excluded, monocytes were selected based on their light scatters and CD14 and CD16 expressions, and sorted into CD14<sup>+</sup>CD16<sup>2+</sup>, CD14<sup>2+</sup>CD16<sup>+</sup>, and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> cells directly in RNeasy Lysis Buffer (Qiagen) using a FACS Vantage cell sorter (BD Biosciences). Sorted cells were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  before RNA isolation. For cytokine production, we added a PE-elimination channel with PE-CD3, PE-CD19, and PE-CD56 to exclude potential contaminant from the monocyte gate. A total of 10,000 monocytes per subset were sorted using a FACSAria III (BD Biosciences) into RPMI 1640 medium. Sorted monocytes were cultivated immediately. Supplemental Table I describes Abs used for these studies.

### RNA extraction, reverse transcription, and cDNA preamplification

Total RNA was isolated from 9000 to 90,000 sorted monocytes. RNeasy Mini Kit (Qiagen) was used according to manufacturer's instructions including DNase treatment. RNA quality and quantity were analyzed by capillary electrophoresis (BioAnalyzer; Agilent). Equal amounts of cDNA were preamplified using the TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems).

### Real-time PCR

Preamplified cDNA samples were amplified using Made-to-Order Low Density Array System according to manufacturers' instructions. The arrays were carried out on the Applied Biosystems 7900HT. TaqMan Low Density Array was designed to screen for changes in gene expression of CX3CR1, CSF-1R, SELPLG, TNF, CCR2, CCR5, CD36, ICAM1, IL-10, IL-8, IL-1 $\beta$ , CCL2, CCL3, TLR2, TLR4, TLR7, TLR8, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  genes, and actin as endogenous controls. A detailed list of probes is given in Supplemental Table 1. Each sample was run in duplicate, and the results were analyzed with the RQ Manager software (Applied Biosystems) and expressed as relative gene expression ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method) using  $\beta$ -actin expression as endogenous control.

### Cytokine production

To analyze cytokine production, we cultivated  $1 \times 10^4$  FACS-sorted CM, IM, or NCM in 100  $\mu\text{l}$  RPMI 1640 and 10% FBS. Each subset was stimulated with 10 ng/ml LPS, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  viral ssRNAs (ssRNA40/LyoVect; InvivoGen), or media alone. After 18 h, supernatants were harvested and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  for cytokine quantification. Monocyte supernatants were quantified for TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CXCL10 (IP10), and IL-8 (CXCL8) by the human 9-flex cytometric bead array. Details about each flex set are given in Supplemental Table I. Samples were processed according to the manufacturer's instructions; acquisition was performed on an LSRII and quantification calculated with FCAP array v3 software (all from Becton Dickinson).

### Protein expression

Flow cytometry using 8-fluorophores was performed on monocyte-enriched PBMCs. To prevent nonspecific binding, we blocked FcRs using 2% human serum PBS (2% HS) for 10 min. Abs were diluted in the same buffer and incubated 30 min in the dark at  $4^{\circ}\text{C}$ . Monocyte subsets were selected as described earlier. Fluorescence minus one (FMO) was used to determine the cutoff between cells expressing FITC-CSF-1R, PE/CF594-CCR5, PerCP/Cy5.5-CCR2, or PE/Cy7-CX3CR1 and negative cells (Supplemental Fig. 2). Expression of TLR4 and TLR8 was performed separately on whole blood. Whole blood was FcR blocked in 2% HS for 15 min. Anti-TLR4 Ab or matching isotype control was added to cells before a mix of allophycocyanin-CD14, allophycocyanin/H7-CD16, V450-CD3, V450-CD19, V450-CD56, and a fixable dead cell marker. After 30 min of surface staining, RBC lysis and fixation were performed simultaneously using Versafix (Beckman Coulter). TLR8 intracellular staining was performed after surface staining; cells were permeabilized with 0.1% saponin 2% HS for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Anti-TLR8 or matching isotype was diluted in this buffer and incubated 30 min in the dark at  $4^{\circ}\text{C}$ . Monocyte subsets were selected as described earlier, and FMO, including PE-isotype, was used to determine the cutoff between cells expressing TLR4 or TLR8 and negative cells. Labeled cells were washed and analyzed using FACSAria III (8-fluorophore flow cytometry) or LSRII (TLR4 and TLR8) (both instruments from BD Biosciences). Acquisitions were standardized over time by the use of both BD Cytometer Setup and Tracking software and the application setting functions available in BD FACSDiva software. We used the mean fluorescence intensity (MFI) to evaluate the expression of CSF1R, CCR5, CCR2, CX3CR1, TLR4, and TLR8. Abs description and dead cell markers are given in Supplemental Table I.

### Statistical analyses

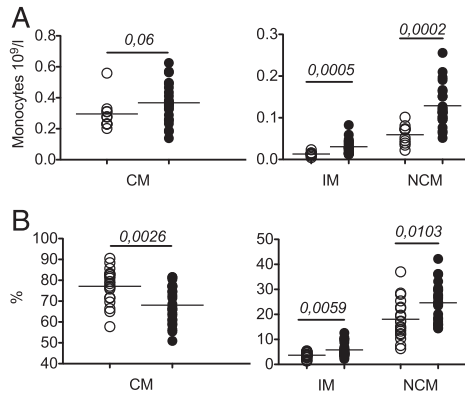
Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Comparisons of mean for quantitative variables between groups were performed using the nonparametric Mann-Whitney *U* test. Relationship among the different quantitative variables was determined by calculating the Spearman correlation coefficient. For all analyses, a *p* value  $< 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were done with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

## Results

### Specific gene expression profile in monocyte subsets in obesity

In accordance with previous findings (12), monocyte absolute numbers were increased in each subset of the obese subject group, as well as the proportion of IM and NCM (Fig. 1). To unravel the molecular signature of monocytes in obesity, we compared expression of 18 candidate genes related to monocyte functions in 3 monocyte subpopulations isolated from C and Ob subjects before and after gastric surgery-induced weight loss (Fig. 2). We found that each monocyte subset displayed a specific gene expression signature. Regarding molecules involved in chemotaxis, mRNA expression of CX3CR1 was significantly increased (2- to 2.5-fold) in the Ob group compared with the C group in the CM and IM, and with a trend in the NCM. After weight loss, the expression of CX3CR1 decreased in all monocyte subsets. In obese CM and IM, CCR2 and CCR5 were significantly 2- to 2.5-fold overexpressed. Decreased mRNA expression was observed after weight loss for CCR5 in the CM and for CCR2 in the IM. The expression of CCL2 chemokine was increased by 3.6-fold in the IM of Ob subjects and decreased to levels comparable with C group after weight loss. We found no difference in CCL3 expression in Ob group. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , which regulates fatty acid storage and glucose metabolism, was increased in the NCM of Ob individuals and in the CM after weight loss.

For genes involved with the pathogen recognition function, we found a 2- to 4-fold increased expression of TLR4 and TLR8 in all monocyte subsets of the Ob group. Conversely, the expression of TLR2 and TLR7 was similar in both groups. After weight loss, the expression profiles of these TLRs was not significantly modified.



**FIGURE 1.** Quantification of monocyte subsets of obese and control subjects. **(A)** Absolute numbers and **(B)** percentages of each subset. Normal-weight control group is represented by clear dots ( $n = 22$ ) and obese group by black dots ( $n = 24$ ). Statistical comparisons between each group were obtained by the nonparametric Mann-Whitney  $U$  test.

For genes involved in cytokine production, we found increased expression of IL-1 $\beta$  in NCM and of TNF in IM in Ob individuals. No significant difference in NCM expression level of IL-1 $\beta$  was observed after weight loss, whereas IM expression level of TNF tended to return to normal value.

Taken together, these results show modified mRNA expression of gene related to monocyte functions in obesity. We observed specific characteristics for each monocyte subset for genes involved in cytokines production, chemotaxis, fatty acid storage and glucose metabolism, and pathogen recognition. Indeed, TLR4 and TLR8 overexpression could be considered as a molecular signature of monocytes in obese patients.

*Monocyte subsets are characterized by stronger responses upon TLR4 and TLR8 stimulation in obesity*

While observing only a slight increase, however not statistically significant, in TLR4 and TLR8 expressions at the protein level in monocytes of obese patients compared with lean subjects (Fig. 3A, 3B), we demonstrated that monocyte subsets from obese patients compared with lean subjects have increased ability to secrete inflammatory molecules upon stimulation with LPS or viral ssRNA respective ligands of TLR4 and TLR8.

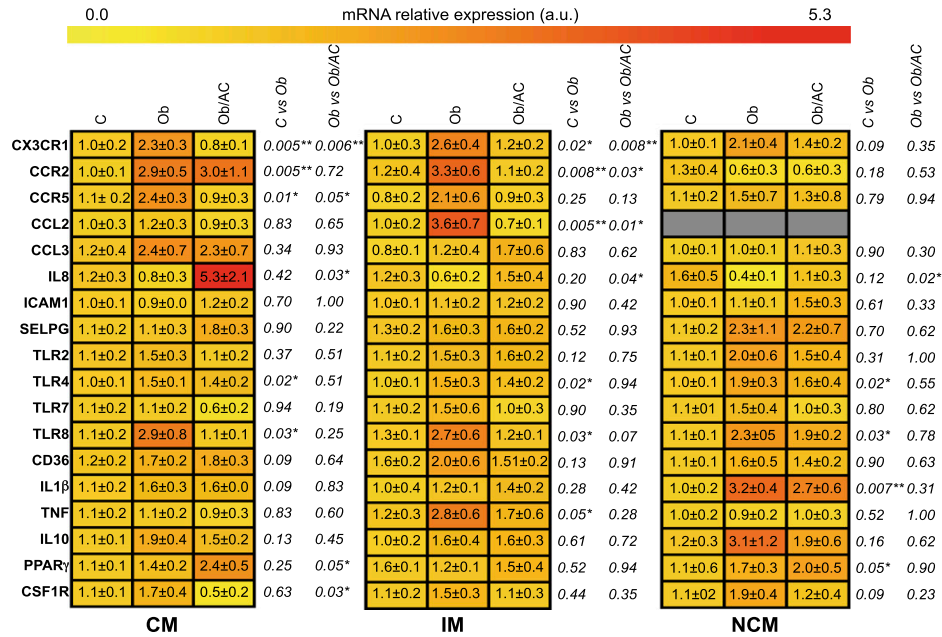
We found that some cytokines involved in the inflammatory response were increased in the monocyte subsets (Fig. 3C). CMs were characterized by an increased production of IL-1 $\beta$  in response to LPS and an increased production of TNF and IL-10 upon ssRNA stimulation in the Ob group compared with C. The IM subset did not differ in terms of cytokine production in response to LPS or ssRNA. Finally, the NCM subset displayed higher production of IL-1 $\beta$  upon ssRNA stimulation.

Chemokine production analysis (Fig. 3D) revealed an increased CM production of CCL5 when stimulated by LPS in the Ob group compared with C. The IM subset did not differ in terms of chemokine production in response to LPS or ssRNA. Finally, the NCM subset of Ob subjects displayed higher secretion of CCL5 upon ssRNA stimulation.

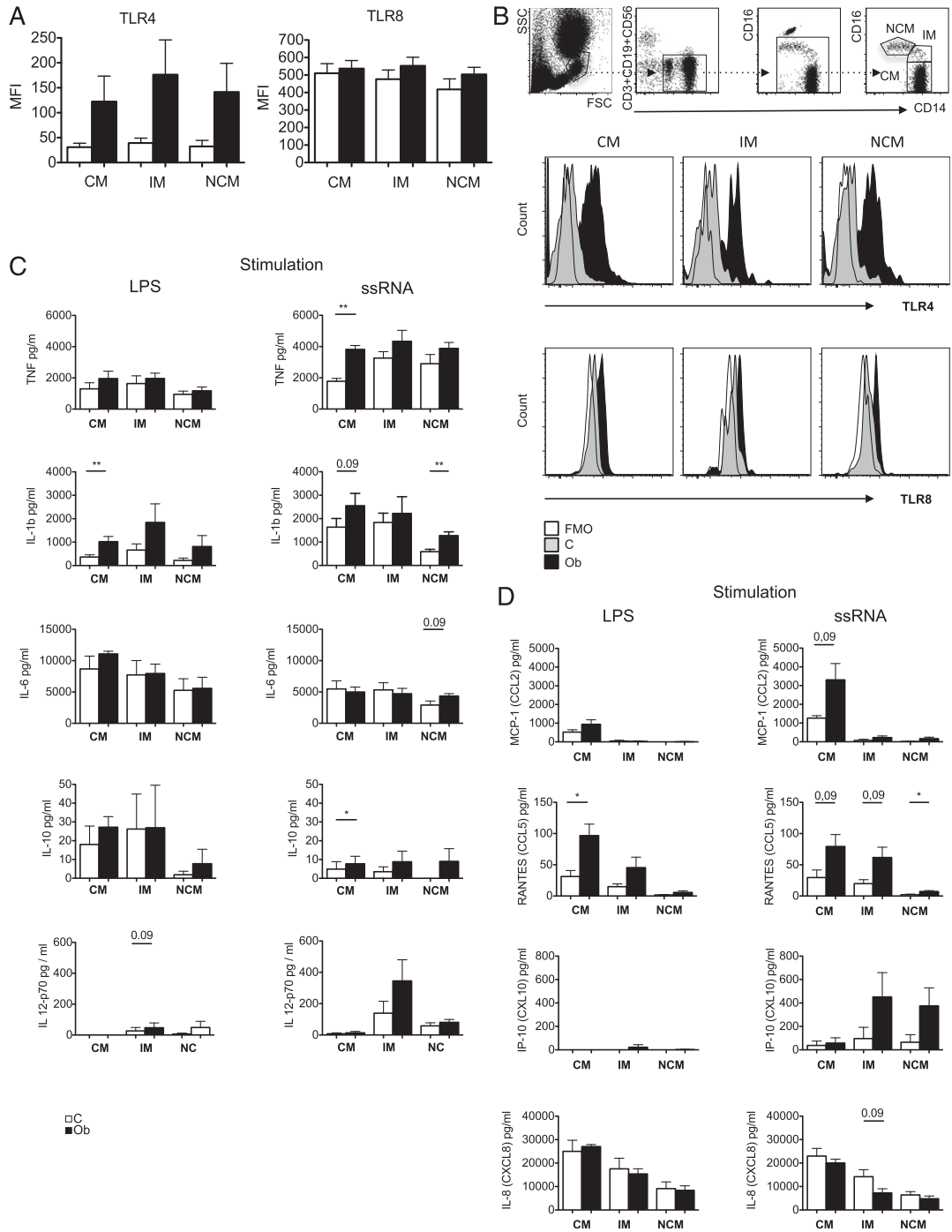
We present in this article convincing evidence that CM and NCM are characterized by a higher response upon TLR4 and TLR8 activation in obese patients compared with lean subjects.

*Monocyte subsets are characterized by changes in chemokine receptor expression related to obesity-related biochemical features*

The analysis of gene expression signatures revealed specificities between monocyte subsets regarding chemotaxis. The heat-map representation of CCR2, CCR5, CX3CR1, and CSF-1R protein expression revealed a general overexpression of these receptors in



**FIGURE 2.** Heat-map gene expression of 18 candidate genes related to migration, phagocytosis, and inflammatory processes in the CM, IM, and NCM purified from seven normal-weight and nondiabetic volunteers (C) and seven obese nondiabetic (Ob) subjects before and after surgery-induced weight loss (Ob/AC). Data are means relative gene expression in arbitrary unit (a.u.)  $\pm$  SEM. Statistical comparisons between each group were obtained by the nonparametric Mann-Whitney  $U$  test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

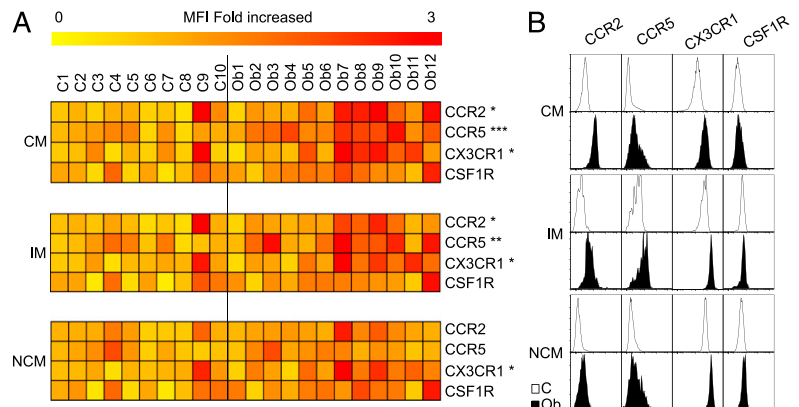


**FIGURE 3.** Comparison of inflammatory molecule secretion by monocyte subsets upon TLR4 and TLR8 stimulation. **(A)** Protein expression of TLR4 and TLR8 measured by flow cytometry.  $n = 12$  normal-weight and nondiabetic volunteers (C),  $n = 10$  obese nondiabetic subjects (Ob). **(B)** Representative examples of TLR4 surface staining and TLR8 intracellular staining of one C and one Ob. Black histogram represents obese patient, gray histogram represents lean subject, and clear histogram represents FMO, with matching isotype control for TLR8. **(C)** Cytokines TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, and IL-12p70, and **(D)** chemokines MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), IP-10 (CXCL10), and IL-8 (CXCL8) measured by cytometric bead array upon 18-h LPS (10 ng/ml) or ssRNA (10  $\mu$ g/ml) stimulation. C is represented by clear bar and Ob by black bar.  $n = 5$  C,  $n = 5$  Ob. Statistical comparisons between each group were obtained by the nonparametric Mann-Whitney  $U$  test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

all subsets of the Ob group (Fig. 4). Thus, the overexpression is significant only for CCR2, CCR5, and CX3CR1 in the CM and IM subsets and for CX3CR1 at the surface of NCM subset (Fig. 4 and

Supplemental Fig. 2). Taken together, these findings suggest higher migration ability and increased survival of monocytes in Ob compared with C subjects. Indeed, the highest increased

**FIGURE 4.** Protein expression (CCR2, CCR5, CX3CR1, and CSF-1R) in CM, IM, and NCM of obese nondiabetic (Ob) and normal-weight and nondiabetic volunteers (C). **(A)** Surface protein expression was measured by flow cytometry; fold increase was calculated by dividing MFI of each individual by the average MFI of C. **(B)** Representative examples of CCR2, CCR5, CX3CR1, and CSF-1R surface staining of one C and one Ob subject (Ob).  $n = 10$  C,  $n = 12$  Ob. Statistical comparisons between each group were obtained by the nonparametric Mann–Whitney  $U$  test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



expression of CCR5 and CCR2 in the CM and the IM imply that those two cell subpopulations could have higher migration capacity than the NCM (19).

To evaluate the clinical relevance of increased expression of chemokine receptors, we performed correlation analysis between protein expression of CCR2, CCR5, CX3CR1, and CSF-1R and phenotypes related to corpulence (body mass index [BMI]) and metabolic status (lipid and diabetes-related traits) listed in Table I. The complete linkage clustering of correlation coefficients of obese clinical outcomes and protein expression levels of CCR2, CCR5, CX3CR1, and CSF-1R showed that for each receptor the expression level of CM and IM segregated from the one of NCM (Fig. 5). We found that monocyte surface expression of CX3CR1 and CCR2 was negatively correlated with high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c), a protective marker of cardiovascular risk. The strength of the negative correlation was particularly strong for NCM subset. This suggests that increased NCM subpopulation in obesity could be linked to cardiovascular risk. The expression of CCR5 was positively correlated with BMI and metabolic traits (glycemia and triglycerides) in the three subsets. Furthermore, expression of CCR5 and CSF-1R in NCM correlated with homeostasis model assessment–estimated insulin resistance, an index of insulin resistance. Overexpression of CCR5 and CSF-1R in NCM could therefore be considered a hallmark of metabolic alteration, especially insulin resistance, in Ob subjects. Fig. 6 proposes a model of the presumed functions of monocyte subsets in obesity-related low-grade inflammation.

**Discussion**

Recent studies in healthy individuals have characterized gene expression profiles of the three monocyte subsets (11, 16, 17). However, little is known about these different subpopulations in inflammatory-related diseases. In this study, we show that the three subsets display specific modified gene expression and protein expression profiles of inflammatory molecules, as well as differential functional response to the TLR signaling in obesity, a well-known low-grade (sterile) inflammatory pathology.

It is well established that monocytes migrate into sites of inflammation in response to several chemokines and obesity is closely associated with an enhanced number of adipose tissue macrophages (7). We showed that a common characteristic of the three subsets of monocytes in obesity is the overexpression of CX3CR1, suggesting their increased potential to migrate in response to CX3CL1, the chemokine ligand for CX3CR1. This result is consistent with the demonstration by Shah et al. (20) that CX3CL1 is secreted by adipose tissue and mediates monocyte adhesion to human adipocytes. They concluded that CX3CL1 is a novel adipose tissue chemokine in humans and may modulate the recruitment of monocytes into adipose tissue. Consistently, Polyák et al. (21) demonstrated that the CX3CL1-CX3CR1 chemokine system is implicated in the development of metabolic visceral adipose tissue inflammation in obese mice. This is further supported by several studies performed in murine models (22, 23) and clinical investigations in humans (24–26) that suggest a role

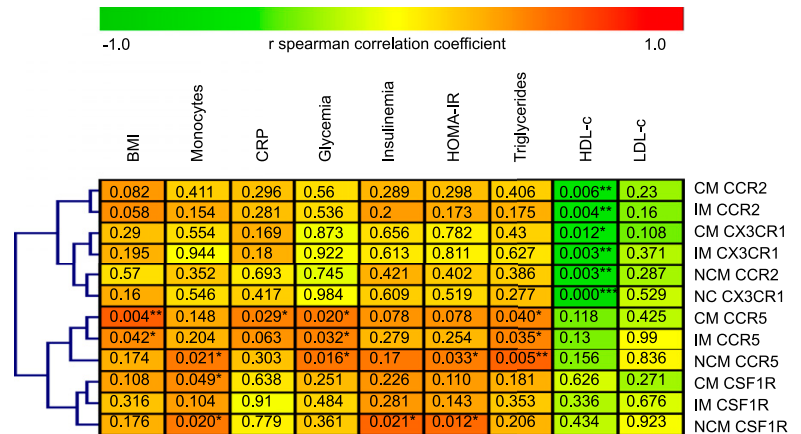
Table I. Bioclinical characteristics of obese and control subjects

Characteristics	Ob	C	$p$
Subjects, $n$	40	26	
Age (mean $\pm$ SEM), y	41 $\pm$ 2	37 $\pm$ 2	0.211
BMI (mean $\pm$ SEM), kg/m <sup>2</sup>	43.2 $\pm$ 0.7	21.0 $\pm$ 0.4	<0.0001
Sex, female/male	36/4	24/2	
Glycemia (mean $\pm$ SEM), mmol/L	5.4 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 0.1	0.002
Insulinemia (mean $\pm$ SEM), mU/l	15.6 $\pm$ 1.4	7.8 $\pm$ 1.1	0.001
Total cholesterol (mean $\pm$ SEM), mmol/l	5.1 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.3	0.883
HDL-c (mean $\pm$ SEM), mmol/l	1.2 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	0.002
LDL-c (mean $\pm$ SEM), mmol/l	3.2 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.3	0.197
Total triglycerides (mean $\pm$ SEM), mmol/l	1.3 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.001
CRP (mean $\pm$ SEM), mg/L	9.8 $\pm$ 1.2	<5	0.001
Total WBCs (mean $\pm$ SEM), 10 <sup>9</sup> /l	7.4 $\pm$ 0.3	6.4 $\pm$ 0.6	0.054
Lymphocytes (mean $\pm$ SEM), %	32.7 $\pm$ 1.2	30.1 $\pm$ 2.2	0.323
Neutrophils (mean $\pm$ SEM), %	57.4 $\pm$ 1.3	60.0 $\pm$ 2.2	0.440
Monocytes (mean $\pm$ SEM), %	7.1 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.4	0.022
Total monocytes (mean $\pm$ SEM), 10 <sup>9</sup> /l	0.5 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.003

Statistical comparisons between each group were obtained by the nonparametric Mann–Whitney  $U$  test. CRP, C-reactive protein; LDL, low-density lipoprotein-cholesterol.



**FIGURE 5.** Correlation among CCR2, CCR5, CX3CR1, and CSF-1R protein expressions of each monocyte subset with obesity-related clinical parameters. Data are from 10 normal-weight and 12 obese subjects. Correlations were estimated by the nonparametric Spearman test. Distance between protein expression of each subset was estimated by complete linkage clustering. Heat-map colors are representations of each correlation coefficient, and numbers indicate *p* values (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001). CRP, C-reactive protein; HOMA-IR, homeostasis model assessment-estimated insulin resistance; LDL-c, low-density lipoprotein-cholesterol.



of CX3CR1–CX3CL1 axis in the development of atherosclerosis and cardiovascular events. In this scenario, CX3CL1 functions as chemoattractant or as an adhesion molecule, facilitating monocyte and T cell transmigration in atherosclerotic lesion areas (27–29) and is also able to regulate monocyte differentiation and survival (30).

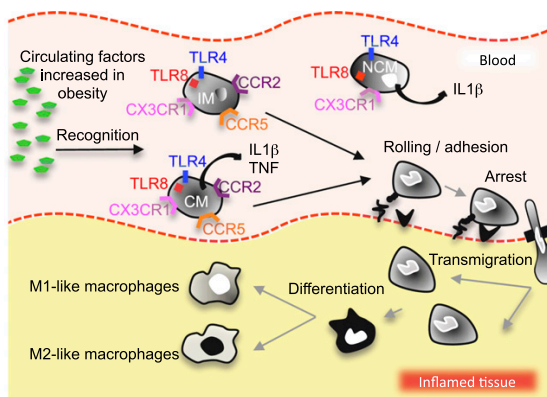
We also observed increased expression of CCR2 and CCR5, which have been involved in the recruitment of monocytes in atherosclerotic plaques in murine models (31, 32), in CM and IM of obese subjects. We previously observed that conditioned medium from visceral adipose tissue of obese subjects or the addition of CCL5 induced adhesion and transmigration of human blood monocytes through adipose tissue endothelium (33). A recent study on obese women demonstrated higher chemotactic activity of monocytes from obese subjects in response to CCL2 and CCL5 (19). These findings together with our data suggest that higher levels of macrophages found among adipose tissue during obesity could be a result of increased migration of monocytes expressing high levels of CX3CR1, CCR2, or CCR5 in response to chemokines secreted by activated endothelium and adipose tissue. Furthermore, our results suggest higher chemotactic ability specifically

of the CM and IM subsets. It suggests that the NCM would be less involved than the two other subsets in recruiting monocytes to atherosclerotic plaques and decreased migration toward the adipose tissue.

Interestingly, we found a strong negative correlation between HDL-c serum level and CX3CR1 and CCR2 expression. On the same line, others reported that in vitro incubation of monocytes with reconstituted high density lipoprotein reduces CCR2 and CX3CR1 expression (34). These data suggest that decreased HDL, a common abnormality observed in obesity, could be directly linked to changes in monocyte phenotype and function.

We observed that CSF-1R was overexpressed in the NCM of obese subjects, however not at a significant level. CSF-1R (also known as CD115, c-fms, and M-CSF receptor) is a tyrosine kinase protein high-affinity receptor for CSF-1 and IL-34. Its ligands, IL-34 and CSF-1, have a pivotal role in regulating survival, proliferation, and differentiation of mononuclear phagocytes (9, 35, 36). CSF-1R is notably expressed by adipose tissue in obese subjects (37, 38). The highest expression of CSF-1R in the NCM could reflect a longer life span compared with the other subsets. Interestingly, we found a positive association between overexpression of CSF-1R in NCM and homeostasis model assessment-estimated insulin resistance, a surrogate of insulin resistance, suggesting that CSF-1R could be considered as characteristic of metabolic alteration, especially insulin resistance, in obese subjects.

TLRs are members of a family of pattern-recognition receptors that detect components of microorganisms, playing a critical role in the innate immune system by activating inflammatory signaling pathways (39). Studies highlighted the involvement of TLR2 and TLR4 in metabolic functions, as well as in innate immune responses, in obesity (40, 41). An interesting finding from this study is a higher activation of TLR4 signaling in response to LPS of CM subset. TLR4 could be stimulated by circulating bacterial LPS or fatty acids, whose levels are commonly increased in obesity (40). We demonstrate for the first time, to our knowledge, a higher activation of TLR8 signaling in response to ssRNA in NCM and CM from obese patients compared with lean subjects. TLR8 is an endosomal TLR that binds viral ssRNAs (17). Although there are no evidences showing increased levels of circulating nucleic acids in obesity, we can suggest that TLR8 present in monocytes from obese subjects could detect circulating nucleic acids or some not yet known ligands other than viral ssRNAs. Moreover, in accordance with increased TLR8 overexpression and stimulation, we found that monocytes display high levels of proinflammatory cytokines in obese patients, particularly IL-1β for NCM.



**FIGURE 6.** Presumed functions of monocyte subsets in obesity-related low-grade inflammation. We propose a model where proinflammatory monocytes of obese subjects would sense circulating factors through TLR4 and TLR8. In response, the CM and NCM subsets secrete more inflammatory cytokines. Expressing more CCR5 and CCR2, the IM and CM could be able to migrate more toward tissues where they could differentiate into macrophages. Both phenomena contribute to sustain low-grade inflammation associated with obesity, whereas NCM could stay longer in the circulation and assume “patrolling” function.

In conclusion, our findings demonstrate that the three monocyte subsets from obese patients display a more inflammatory phenotype with a higher response to TLR4 and TLR8 stimulation, and a chemokine receptor expression profile that suggests a higher capacity to migrate for CM and IM and increased survival for NCM (Fig. 6). Indeed, therapeutic strategies targeting inflammatory processes or TLR signaling could be a promising approach to reduce inflammatory, metabolic, and cardiovascular complications linked to obesity.

### Acknowledgments

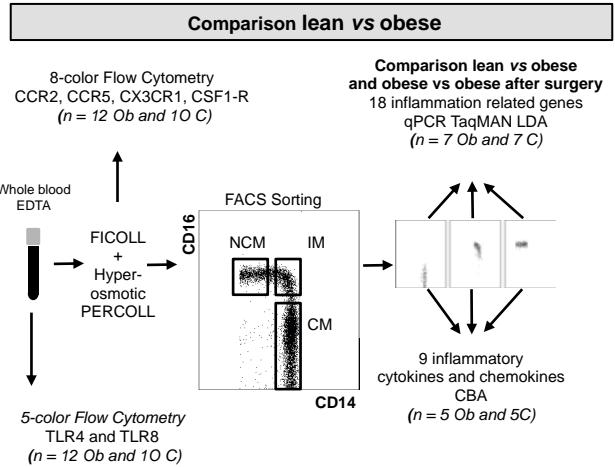
We thank Rohia Alili, Valentine Lemoine, and Dr. Florence Marchelli (Center for Research on Human Nutrition, Pitié-Salpêtrière Hospital) who were involved in patient recruitment and sampling. We thank Dr. Sarah Church for English proofreading and helpful comments on the manuscript. We thank Assistance Publique-Hôpitaux de Paris and the Director of Clinical Research for the Department of Clinical Research and Development for promoting and supporting this clinical investigation.

### Disclosures

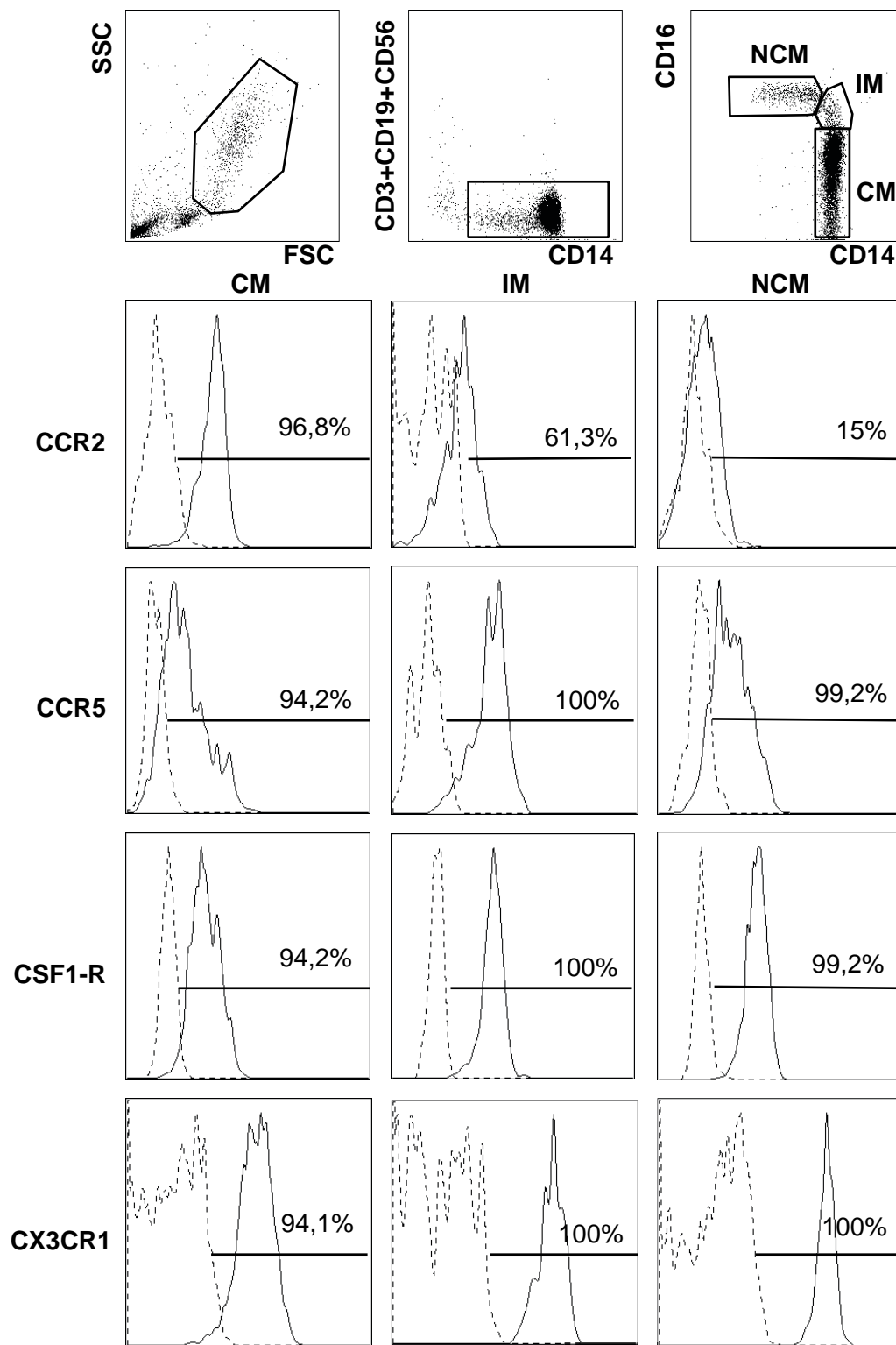
The authors have no financial conflicts of interest.

### References

1. Canello, R., and K. Clément. 2006. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG* 113: 1141–1147.
2. Dalmas, E., C. Rouault, M. Abdenour, C. Rovere, S. Rizkalla, A. Bar-Hen, J.-L. Nahon, J.-L. Bouillot, M. Guerre-Millo, K. Clément, and C. Poitou. 2011. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in caloric and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am. J. Clin. Nutr.* 94: 450–458.
3. Lumeng, C. N., and A. R. Saltiel. 2011. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 121: 2111–2117.
4. Mathieu, P., I. Lemieux, and J.-P. Després. 2010. Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Clin. Pharmacol. Ther.* 87: 407–416.
5. Ghanim, H., A. Aljada, D. Hofmeyer, T. Syed, P. Mohanty, and P. Dandona. 2004. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 110: 1564–1571.
6. Rizvi, A. A. 2009. Cytokine biomarkers, endothelial inflammation, and atherosclerosis in the metabolic syndrome: emerging concepts. *Am. J. Med. Sci.* 338: 310–318.
7. Dalmas, E., K. Clément, and M. Guerre-Millo. 2011. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol.* 32: 307–314.
8. Ziegler-Heitbrock, H. W. 2000. Definition of human blood monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 67: 603–606.
9. Auffray, C., D. K. Fogg, E. Narni-Mancinelli, B. Senechal, C. Trouillet, N. Saederup, J. Leemput, K. Bigot, L. Campisi, M. Abitbol, et al. 2009. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J. Exp. Med.* 206: 595–606.
10. Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327: 656–661.
11. Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. M. Leenen, Y.-J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, et al. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116: e74–e80.
12. Poitou, C., E. Dalmas, M. Renovato, V. Benhamo, F. Hajduch, M. Abdenour, J.-F. Kahn, N. Veyrie, S. Rizkalla, W.-H. Fridman, et al. 2011. CD14dimCD16+ and CD14+CD16+ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 2322–2330.
13. Ziegler-Heitbrock, L. 2007. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 81: 584–592.
14. Zhao, C., H. Zhang, W.-C. Wong, X. Sem, H. Han, S.-M. Ong, Y.-C. Tan, W.-H. Yeap, C.-S. Gan, K.-Q. Ng, et al. 2009. Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods. *J. Proteome Res.* 8: 4028–4038.
15. Cros, J., N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S.-Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S. K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, et al. 2010. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33: 375–386.
16. Wong, K. L., J. J.-Y. Tai, W.-C. Wong, H. Han, X. Sem, W.-H. Yeap, P. Kourilsky, and S.-C. Wong. 2011. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118: e16–e31.
17. Zawada, A. M., K. S. Rogacev, B. Rotter, P. Winter, R.-R. Marell, D. Fliser, and G. H. Heine. 2011. SuperSAGE evidence for CD14+CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118: e50–e61.
18. Repnik, U., M. Knezevic, and M. Jeras. 2003. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *J. Immunol. Methods* 278: 283–292.
19. Krinninger, P., R. Ensenauer, K. Ehlers, K. Rauh, J. Stoll, S. Krauss-Etschmann, H. Hauner, and H. Laumen. 2014. Peripheral monocytes of obese women display increased chemokine receptor expression and migration capacity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99: 2500–2509.
20. Shah, R., C. C. Hinkle, J. F. Ferguson, N. N. Mehta, M. Li, L. Qu, Y. Lu, M. E. Putt, R. S. Ahima, and M. P. Reilly. 2011. Fractalkine is a novel human adipochemokine associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 60: 1512–1518.
21. Polyák, A., S. Ferenczi, A. Dénes, Z. Winkler, R. Kriszt, B. Pintér-Kübler, and K. J. Kovács. 2014. The fractalkine/Cx3CR1 system is implicated in the development of metabolic visceral adipose tissue inflammation in obesity. *Brain Behav. Immun.* 38: 25–35.
22. Combadière, C., S. Potteaux, J.-L. Gao, B. Esposito, S. Casanova, E. J. Lee, P. Debré, A. Tedgui, P. M. Murphy, and Z. Mallat. 2003. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 107: 1009–1016.
23. Lesnik, P., C. A. Haskell, and I. F. Charo. 2003. Decreased atherosclerosis in CX3CR1<sup>-/-</sup> mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 111: 333–340.
24. Damás, J. K., A. Boullier, T. Wachre, C. Smith, W. J. Sandberg, S. Green, P. Aukrust, and O. Quehenberger. 2005. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, is elevated in coronary artery disease and is reduced during statin therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 2567–2572.
25. Apostolakis, S., E. Krambovitis, Z. Vlata, G. E. Kochiadakis, S. Baritaki, and D. A. Spandidos. 2007. CX3CR1 receptor is up-regulated in monocytes of coronary artery diseased patients: impact of pre-inflammatory stimuli and renin-angiotensin system modulators. *Thromb. Res.* 121: 387–395.
26. Ikejima, H., T. Imanishi, H. Tsujioka, M. Kashiwagi, A. Kuroi, T. Tanimoto, H. Kitabata, K. Ishibashi, K. Komukai, T. Takeshita, and T. Akasaka. 2010. Upregulation of fractalkine and its receptor, CX3CR1, is associated with coronary plaque rupture in patients with unstable angina pectoris. *Circ. J.* 74: 337–345.
27. Fong, A. M., L. A. Robinson, D. A. Steeber, T. F. Tedder, O. Yoshie, T. Imai, and D. D. Patel. 1998. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J. Exp. Med.* 188: 1413–1419.
28. Lucas, A. D., C. Bursill, T. J. Guzik, J. Sadowski, K. M. Channon, and D. R. Greaves. 2003. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation* 108: 2498–2504.
29. Tacke, F., D. Alvarez, T. J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, J. Liu, M. Mack, N. van Rooijen, et al. 2007. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 117: 185–194.
30. Combadière, C., S. Potteaux, M. Rodero, T. Simon, A. Pezard, B. Esposito, R. Merval, A. Proudford, A. Tedgui, and Z. Mallat. 2008. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytoysis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117: 1649–1657.
31. Braunerreuther, V., S. Steffens, C. Arnaud, G. Pelli, F. Burger, A. Proudford, and F. Mach. 2008. A novel RANTES antagonist prevents progression of established atherosclerotic lesions in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 1090–1096.
32. Jones, K. L., J. J. Maguire, and A. P. Davenport. 2011. Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *Br. J. Pharmacol.* 162: 1453–1469.
33. Keophiphath, M., C. Rouault, A. Divoux, K. Clément, and D. Lacasa. 2010. CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 39–45.
34. Bursill, C. A., M. L. Castro, D. T. Beattie, S. Nakhla, E. van der Vorst, A. K. Heather, P. J. Barter, and K.-A. Rye. 2010. High-density lipoproteins suppress chemokines and chemokine receptors in vitro and in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 1773–1778.
35. Lin, H., E. Lee, K. Hestir, C. Leo, M. Huang, E. Bosch, R. Halenbeck, G. Wu, A. Zhou, D. Behrens, et al. 2008. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 320: 807–811.
36. Wei, S., S. Nandi, V. Chitu, Y.-G. Yeung, W. Yu, M. Huang, L. T. Williams, H. Lin, and E. R. Stanley. 2010. Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 88: 495–505.
37. Levine, J. A., M. D. Jensen, N. L. Eberhardt, and T. O'Brien. 1998. Adipocyte macrophage colony-stimulating factor is a mediator of adipose tissue growth. *J. Clin. Invest.* 101: 1557–1564.
38. Harman-Boehm, I., M. Blüher, H. Redel, N. Sion-Vardy, S. Ovadia, E. Avinoach, I. Shai, N. Klötting, M. Stumvoll, N. Bashan, and A. Rudich. 2007. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92: 2240–2247.
39. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135–145.
40. Shi, H., M. V. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzameli, H. Yin, and J. S. Flier. 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116: 3015–3025.
41. Fresno, M., R. Alvarez, and N. Cuesta. 2011. Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. *Arch. Physiol. Biochem.* 117: 151–164.



**Supplemental Figure 1. Experimental set-up.** LDA = Low Density Array. CM = classical monocytes, IM = Intermediate monocytes and NCM = non-classical monocytes. CBA = Cytometric Bead Array. Ob = obese subjects and C = normal-weight control subjects.



**Supplemental figure 2: A representative example for the evaluation of CCR2, CCR5, CX3CR1 and CSF1-R protein expressions.** Dotted lines = all fluorescences minus the relevant antibody (FMO), continuous line = Whole staining. CM = Classical Monocytes, IM = Intermediate Monocytes and NCM = Non Classical Monocytes. MFI = mean fluorescence intensity

## Supplemental table 1. Reagent descriptions.

A/ Description of Flow Cytometry antibodies	B/ Probe description of 18 gene Taq man Low Density Array (Applied Biosystems)	
<b>FACS sorting for gene expression</b>	<b>Gene</b>	<b>Reference</b>
APC-conjugated anti-CD14 (clone MfP9 from Becton Dickinson)	CX3CR1	Hs00365842_m1
FTTC-conjugated anti-CD16 (clone 3G8 from Becton Dickinson)	CSF1R	Hs00911250_m1
Dead cell marker: 4',6-diamidino-2-phenylindole dilactate (DAPI) (Life technologies)	SELPLG	Hs00380945_m1
<b>FACS sorting for CBA</b>	TNF	Hs99999043_m1
APC-conjugated anti-CD14 (clone MfP9 from Becton Dickinson)	CCR2	Hs00356601_m1
FTTC-conjugated anti-CD16 (clone 3G8 from Becton Dickinson)	CCR5	Hs00152917_m1
PE-conjugated anti-CCR2 (clone 48607 from Becton Dickinson)	CD36	Hs00169627_m1
PE-anti-CD19 (clone HIB19 from Becton Dickinson)	ICAM1	Hs00164932_m1
PE-conjugated anti-CD56 (clone B159 from Becton Dickinson)	IL10	Hs00961622_m1
Dead cell marker: 4',6-diamidino-2-phenylindole dilactate (DAPI) (Life technologies)	IL8	Hs00174103_m1
<b>8-color flow cytometry</b>	IL1b	Hs01555410_m1
APC-conjugated anti-CD14 (clone MfP9 from Becton Dickinson)	CCL2	Hs00234140_m1
APC/H7-conjugated anti-CD16 (clone 3G8 from Becton Dickinson)	CCL3	Hs00234142_m1
V450-conjugated anti-CD3 (clones UCHT1 from Becton Dickinson)	TLR2	Hs00152932_m1
V450-conjugated anti-CD19 (clones HIB19 from Becton Dickinson)	TLR4	Hs00152939_m1
V450-conjugated anti-CD56 (clones 3G8 from Becton Dickinson)	TLR7	Hs00152971_m1
FTTC-conjugated anti-CSF1R (clone 61708 from R&D systems)	TLR8	Hs00607866_mH
PE/CF594-conjugated anti-CCR5 (clone 2D7/CCR5 from Becton Dickinson)	PPARG	Hs01115513_m1
PerCP/Cy5.5-conjugated anti-CCR2 (clone TG5/CCR2 from Biolegend)		
PE/Cy7-conjugated anti-CX3CR1 (clone 2A9-1 from Biolegend)		
Dead cell marker: 4',6-diamidino-2-phenylindole dilactate (DAPI) (Life technologies)		
<b>5-TLR protein expression</b>		
APC-conjugated anti-CD14 (clone MfP9 from Becton Dickinson)		
APC/H7-conjugated anti-CD16 (clone 3G8 from Becton Dickinson)		
V450-conjugated anti-CD3 (clone UCHT1 from Becton Dickinson)		
V450-conjugated anti-CD19 (clone HIB19 from Becton Dickinson)		
V450-conjugated anti-CD56 (clone 3G8 from Becton Dickinson)		
PE-conjugated anti-TLR4 (clone 610015 from R&D systems)		
PE-conjugated IgG <sub>2A</sub> isotype control (clone 20102 from R&D systems)		
PE-conjugated anti-TLR8 (clone 44C143 from ENZO Life Sciences)		
PE-conjugated IgG1 isotype control (clone MOPC-21 from ENZO Life Sciences)		
LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell marker (Life technologies)		
	<b>C/ Description of the 9 Flex Set (BD™ CBA Flex Set)</b>	
	<b>Protein</b>	<b>Material name</b>
	Human IL-1b	Human IL-1b Flex Set
	Human TNF	Human TNF Flex Set
	Human IP-10 or CXCL10	Human IP-10 Flex Set
	Human IL-10	Human IL-10 Flex Set
	Human MCP-1 or CCL2	Human MCP-1 Flex Set
	Human RANTES or CCL5	Human RANTES Flex Set
	Human IL-12p70	Human IL-12p70 Flex Set
	Human IL-6	Human IL-6 Flex Set
	Human IL-8 or CXCL8	Human IL-8 Flex Set
		<b>Material number</b>
		558279
		558273
		558280
		558274
		558287
		558324
		558283
		558276
		558277

## **B. Analyse comparative du transcriptome de chacune des sous populations de monocytes chez des sujets obèses vs non obèses**

Ces travaux visant à comparer le transcriptome de chacune des trois sous populations de monocytes chez des sujets obèses et chez des sujets non obèses sont présentés sous la forme d'un article et intitulé «Transcriptomic comparative analysis of each monocyte subset from obese and lean subject: classical monocytes (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) sustain obesity low grade inflammation » à soumettre au journal Plos Biology. La soumission se fera après confirmation par PCR quantitative de la modulation de l'expression des gènes intéressants.

### 1. Introduction

Notre travail préalable a montré un phénotype pro-inflammatoire des monocytes dans l'obésité, qui se traduit par une plus forte réponse à la stimulation de TLR4 et de TLR8, avec une augmentation de la réponse moins importante pour les IM que pour les NCM et les CM. Il suggère également une capacité migratoire accrue des CM et des IM dans l'obésité. Ce travail était basé sur une sélection limitée de molécules, choisies en raison de leur implication dans la réponse inflammatoire. Il nous semblait indispensable de passer à l'échelle de l'analyse du génome complet afin d'aborder l'étude de l'implication des différentes sous populations de monocyte dans l'obésité et ses comorbidités sous un grand angle. Grâce à cette analyse, nous avons recherché les gènes et les grandes fonctions les plus modulées afin de découvrir de nouvelles voies de signalisation activées dans le contexte de l'obésité, et ainsi mieux comprendre l'implication de chacune des sous populations.

### 2. Résultats

Nous retrouvons les variations de proportions des trois sous populations de monocytes lorsque l'on compare le sang de sujets obèses et non obèses. La fréquence des CM diminue, celles des IM et NCM augmentent (Article 2 Figure 1). Les données des microarrays se présentent sous la forme de listes de sondes. Chaque sonde est spécifique d'un gène, et elle est associée à une intensité de fluorescence proportionnelle à l'expression du gène. Une liste composée 42405 sondes a été générée pour chacun des trente échantillons. Nous avons normalisé ces données à l'aide du logiciel Gene Spring Software (Agilent), puis chacune des valeurs a été comparée au bruit de fond, et nous avons extrait une liste « P50 » des gènes

exprimés dans au moins 50% des échantillons pour chaque sous population. Ces listes comprennent respectivement 30550, 30688 et 31036 sondes pour les CM, les IM et les NCM. Les listes « P50 » ont été utilisées pour la comparaison de l'expression des gènes entre les sujets obèses et les sujets non obèses. Les gènes dont la variation d'expression est statistiquement significative et  $\geq 1,5$  ont été sélectionnés. Ensuite, l'analyse des listes de 670, 640 et 570 gènes respectivement modulés par l'obésité dans les CM, les IM et les NCM a été faite en trois étapes : 1/ vérification de l'existence de variations différentielles d'expression des gènes mesurées au niveau du génome complet entre le groupe obèse et le groupe témoin pour chacune des sous populations, 2/ analyse des gènes dont l'expression est la plus modulée par l'obésité et 3/ analyse intégrative grâce au logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA) des voies de signalisation et des fonctions associées aux gènes modulés dans chaque sous population. La figure 2 de l'article 2 résume la stratégie d'analyse.

L'analyse de l'expression des gènes au niveau du génome complet confirme sa modulation par l'obésité qui est spécifique de chacune des sous populations (Article 2, Figures 3 et 4) avec une signature plus homogène pour les CM que pour les IM et les NCM (Article 2, Figure 5).

Parmi les gènes dont l'expression est la plus modulée par l'obésité dans les CM, se trouvent des gènes codant pour des molécules impliquées dans la migration cellulaire, l'adhésion, la réponse immunitaire et le métabolisme (Article 2, Tableau 2). Concernant la migration et l'adhésion cellulaire les CM up-régulent fortement CLU (Clusterin), PLXNA2 (plexin A2), FBLIM1 (filamin binding LIM protein 1) (Article 2, Tableau 2). Ils up-régulent aussi CCR5 (Rantes) et FPR2 (formyl-peptide receptor 2), un gène pro-inflammatoire récepteur du SAA. Le gène de la clusterine ou apolipoprotéine J est le plus up-régulé par l'obésité (114,89 fold change,  $p < 0001$ ), c'est une molécule intervenant dans la réponse immunitaire et la régulation du métabolisme (Article 2, Tableau 2). L'analyse intégrative par IPA a révélé que les gènes dont l'expression est modulée par l'obésité sont impliqués entre autre dans la signalisation cellulaire et le transport de molécules (Article 2, Tableau 5 et Figure 6). Les gènes les plus différentiellement exprimés par les IM de sujets obèses vs non obèses jouent un rôle dans les grandes fonctions moléculaires et cellulaires suivantes : adhésion cellulaire, réponse immunitaire, métabolisme, réponse aux substances toxiques, apoptose, régulation de la prolifération cellulaire et régulation de la respiration (Article 2, Tableau 3). Ils up-régulent par exemple des molécules clefs (ATP2A1 [ATPase, Ca<sup>++</sup> transporting, cardiac muscle, fast twitch 1] et MAP3K13 [mitogen-activated protein kinase

13]) des voies de signalisation NF- $\kappa$ B, JNK et de la réponse cellulaire au glucose. CISD1 (CDGSH iron sulfur domain 1), encore appelé MitoNEET, est le gène le plus fortement up-régulé par l'obésité dans les IM (353,78-fold change,  $p = 0,003$ ). Il s'agit d'une molécule intervenant dans la réponse au stress et dans la tolérance au glucose. L'analyse intégrative par IPA met en évidence que les IM modulent 95 gènes impliqués dans la mort cellulaire (Article 2, Tableau 5 et figure 7) dont 25 sont impliqués dans la mort du tissu conjonctif.

Les gènes les plus différentiellement exprimés par les NCM de sujets obèses *vs* non obèses interviennent dans l'adhésion cellulaire, la réponse immunitaire, le métabolisme, la réponse aux dérivés réactifs de l'oxygène, l'apoptose et le contrôle de la prolifération cellulaire (Tableau 4 article 2). L'analyse intégrative par IPA met en évidence que le métabolisme des sucres et des lipides est modifié par l'obésité dans les NCM et notamment la régulation du taux de glycogène (Article 2, Tableau 5 et Figure 8). Les NCM chez les sujets obèses seraient responsables d'une augmentation de la quantité de mégacaryocytes (les cellules à l'origine des plaquettes sanguines), et favoriseraient également la migration des cellules dendritiques.

### 3. Conclusion

L'analyse au niveau du génome complet confirme partiellement nos hypothèses et ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension du rôle de chacune des sous populations de monocytes dans le développement des maladies associées à l'obésité. Notre hypothèse de base faisait des CM les médiateurs de l'inflammation, des IM ses effecteurs et des NMC les modulateurs. L'image est en réalité plus complexe. Nous confirmons l'impact de l'obésité sur le transcriptome des monocytes qui est spécifique à chacune des sous populations. Néanmoins, l'influence de l'obésité sur l'expression des gènes des CM est plus homogène que sur celles des IM et des NCM.

Chez les sujets obèses, les CM up-régulent des gènes impliqués dans la migration, dans l'adhésion cellulaire (CLU, PLXNA, FBLIM1, CCR5) et dans l'inflammation (FPR2). Ces résultats confirment leur rôle dans le maintien de l'inflammation de bas grade qui caractérise l'obésité. Chez les sujets obèses, les IM par l'up-regulation de molécules clés (ATP2A1 et MAP3K13) des voies de signalisation NF- $\kappa$ B, JNK et de la réponse cellulaire au glucose, pourraient effectivement être les effecteurs dans la circulation systémique de la réponse inflammatoire aux signaux métaboliques, comme l'hyperglycémie et la dyslipidémie, présents chez les patients obèses. Mais sans doute pour contre balancer la réponse pro-



inflammatoire, ils up-régulent un gène tel que CISD1 ayant des fonctions protectrices dans l'obésité. L'analyse intégrative par IPA suggère que les IM chez les sujets obèses favorisent la fibrose et la mort et du tissu conjonctif ; ils seraient donc les précurseurs de macrophages tissulaires pro-fibrotiques, dont le phénotype ne favoriserait pas l'angiogénèse.

Les NCM chez les sujets obèses pourraient aussi être capables de stocker des lipoprotéines circulantes par l'up-régulation d'un gène comme PXN (paxillin) qui intervient la phagocytose des oxLDL et dans la motilité. De plus, l'analyse intégrative par IPA suggère qu'ils stockent moins de glycogène que les NCM de sujets non obèses. Enfin, les NCM joueraient également un rôle dans la régulation des différentes populations de cellules immunitaires circulantes chez les sujets obèses. Ceci est mis en évidence par la modulation de l'expression d'un ensemble de gènes dont CXCL12, qui pourraient augmenter entre autre la quantité de mégacaryocytes circulants et la migration des cellules dendritiques.

#### 4. Projet article 2

# **Transcriptomic comparative analysis of each monocyte subset from obese and lean subject: classical monocytes (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) sustain obesity low-grade inflammation**

Estelle Devêvre<sup>1,2,3,4,5</sup>, Nicolas Cagnard<sup>6</sup>, Catherine Sautès-Fridman<sup>1,3,4</sup>, Karine Clément<sup>2,3,7</sup>,  
Christine Poitou<sup>2,3,7#</sup> and Isabelle Cremer<sup>1,3,4##</sup>\*

## **Author affiliations**

(1) INSERM, UMRS 1138, team 13, Cordeliers Research Center, Paris, F-75006 France

(2) INSERM, UMRS 1166, Nutriomic team 6; Paris, F-75013 France

(3) Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMRS 1138 and UMRS 1166, Paris F-75005 France

(4) Université Paris Descartes-Paris 5, UMRS 1138, Paris, F-75006 France

(5) Centre d'imagerie Cellulaire et de Cytométrie (CICC), Centre de Recherche des Cordeliers, UMRS 1138, Paris, F-75006 France

(6) Plate-Forme de Bioinformatique, Université Paris Descartes, Paris, France

(7) Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital Nutrition Department, Paris, F-75013 France

# Authors contributed equally to this work.

\* Corresponding author

## **Abstract**

Monocytes as major actors of the innate immune response in the circulation are considered as a bridge between inflammation and metabolism alterations. Our previous studies showed that monocytes quantities and inflammatory and migratory phenotypes of their subsets (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> [CM, Classical], CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> [IM, Intermediate] and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> [NCM, Non Classical]) were specifically altered in human obesity, a disease associated to metabolic disorders. The aim of the present study was to decipher more broadly their individual contribution to obesity by comparative microarray analysis of sorted CM, IM and NCM isolated from blood of non diabetic obese patients and healthy non obese subjects; monocytes from 5 subjects of each group were analyzed for a total of thirty microarrays processed. Our results demonstrate that monocytes display a signature of obesity specific to each monocyte subset. The obesity imprint on CM reveals that they sustain the obesity linked-inflammation by modulating genes involved in cell signaling and among those genes we found up-regulation of CCR5 and FPR2 (formyl-peptide receptor 2), a receptor of serum amyloid A (SAA). The top regulated genes by obese-CM and obese-IM, respectively clusterin (CLU) and CISD1 or MitoNEET (CDGSH iron sulfur domain 1), link the immune response to metabolism and response to stress; CISD1 has protective functions in obesity. The microarray analysis showed that IM modulate also genes involved in increased activation of cell death of connective tissue and NCM modulate genes implicated in hematological development.

**Key words:** monocyte-subsets, obesity, transcriptomic microarray

## Introduction

Obesity is recognized as a low-grade inflammatory disease characterized by an increased concentration of a large panel of cytokines, chemokines and acute phase proteins in the circulation (1) (2). Obesity-related inflammation favors the development of comorbidities such as type II diabetes, atherosclerosis, cardiovascular diseases, non-alcoholic steatohepatitis and some cancers (3) (4) (5) (6). The last decades, research for shared mechanism between obesity related pathologies and overweight highlighted closed relationships between nutrient excess and immunological homeostasis (4). Monocytes as major actors of the innate immune response in the circulation are considered as a bridge between inflammation and metabolism alterations. Indeed, there is positive correlation between the body mass index (BMI) and absolute number of monocytes (7) (8) (9) and monocytes are involved in cardiovascular disease pathophysiologies (10) (11) (12) (13) (14) (15). Three subsets of circulating monocytes have been described: classical monocytes (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> [CM]), intermediate monocytes (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> [IM]) and non-classical monocytes (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> [NCM]). CM represent about 90% of total monocytes and IM and NCM about 10%, they express differentially chemokine receptors indicating specific migratory potential: CM are CCR2<sup>++</sup>CX3CR1<sup>-/+</sup>CCR5<sup>-</sup>, IM are CCR2<sup>-/+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CCR5<sup>++</sup> and NCM are CCR2<sup>-</sup>CX3CR1<sup>++</sup>CCR5<sup>-</sup>. Wong *et al.* (16) and Zawada *et al.* (17) described the three subsets in healthy donors using transcriptomic analysis, flow cytometry and functional *in vitro* tests of cytokine production; they showed that the CM are the more versatile ones, expressing the broadest range of trans-membrane receptors, of gene involved in a wide diversity of functions from tissue repair to immune response and producing the most important number of cytokines (G-CSF, IL-10, CCL2, CCL5 et IL-6) and chemokines when stimulated by LPS. IM would be more implicated in antigen presentation with a high inflammatory potential. Indeed, they are the main producers at basal state of reactive oxygen species and they produce specifically IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  upon LPS stimulation (18). Inversely, NCM produce IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and CCL3 upon nucleic acid stimulation *via* TLR7-TLR8-MyD88-MEK pathway (19) and human NCM patrol endothelium of murine blood vessels after adoptive transfer (19). Our group described the three monocyte-subsets in obesity and we previously showed that both IM and NCM were increased in obese compared to lean subjects, with a significant enrichment of the NCM subset in obese diabetic patients. Multivariate analysis demonstrated a link between the percentages of NCM and glycemia, independent of fat mass. Drastic weight loss led to a sharp decrease of this subset, the variations of which were strongly related to fat mass changes. A

reduction of at least 5% of fat mass was sufficient to observe a significant decrease of NCM monocytes. A diminution of the NCM subset was also observed during weight loss and was associated with a decrease in intima-media thickness (20). Phenotypically, we showed an increased expression of CX3CR1 in all monocyte subsets and of CCR2 and CCR5 in CM and IM in the Ob group. We found negative correlation between CCR2 and CX3CR1 expressions and high-density lipoprotein cholesterol, whereas CCR5 expression was positively linked to carbohydrate and lipid metabolism. Functionally, production of inflammatory proteins upon bacterial LPS and viral ssRNA stimulation was higher in obese-CM and obese-NCM compared to lean ones. Therefore our work highlighted an enhanced inflammatory phenotype of monocytes with a higher response to TLR4 and TLR8 stimulations in obesity and it suggested an increased migration capacity of CM and IM subsets (21). Our objective here is to decipher their individual contribution in obesity-linked inflammation more broadly by characterizing the transcriptional signature of each subset. To this purpose, we compared gene expression profile at whole genome level of sorted CM, IM and NCM monocytes isolated from blood of non-diabetic obese patients and healthy non-obese subjects. We conducted our analysis in three steps: 1/ demonstration that obesity specifically modulates mRNA expression at whole genome level in each subset, 2/ Individual analysis of modulated genes in each subset selected among the top ten up- and down-modulated genes and 3/ Research of top obesity modulated functions in each subset.

Our results demonstrate that monocyte display at the whole genome level a specific gene expression signature of obesity. This signature is specific to each monocyte subset and the CM obesity imprint shows that they sustain the obesity linked-inflammation.

## Materials and methods

### *Blood samples and cell sorting*

We used fasting blood samples from a group of 5 obese (Ob) and 5 control lean subjects (C). The obese patients enrolled in this study were involved in a bariatric surgery program and recruited to the nutrition division of Pitié-Salpêtrière Hospital (Reference Center for the Medical and Surgery Care of Obesity, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN La Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France). Patients were non-diabetic and met the criteria for bariatric surgery *i.d.* BMI  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup> or  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> with at least 1 of the following comorbidity (hypertension, dyslipidemia, or obstructive sleep apnea syndrome). The second group comprised healthy normal-weight and non-diabetic volunteers (C), living in the same region as the Ob subjects. The Ethics Committee (CPP Ile de France 1) approved the clinical investigations for both Ob and C individuals. All subjects gave written informed consent. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was registered in a public trial registry (NCT00476658).

### *Cell sorting*

PBMCs were isolated from blood by centrifugation on a Ficoll-Hypaque gradient (PAA Laboratories). Monocytes were then enriched by a centrifugation on a Hyper-osmotic Percoll<sup>Plus</sup> Gradient (GE Healthcare) (22). Monocyte-enriched cell fraction was stained with APC-CD14, FITC-CD16, PE-CD3, PE-CD19, and PE-CD56. Doublets, dead cells, CD3<sup>+</sup> T-cells, CD19<sup>+</sup> B-cells and CD56<sup>+</sup> NK cells were excluded, finally monocytes were selected based on their light scatters, CD14 and CD16 expressions and sorted into CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> cells. 2000 Cells were directly sorted in SuperAmp lysis<sup>TM</sup> buffer (MACS molecular Miltenyi Biotec) using a FACS ARIA III cell sorter (BD Biosciences), incubated at 45°C for 10 minutes and kept at -20°C until shipping on dry ice to Miltenyi Biotec. Supplemental Table I describes antibodies used for this studies.

### *Isolation of total RNA and cDNA amplification*

SuperAmp RNA amplification was performed according to miltenyi Biotec's undisclosed procedure. Message RNA was isolated *via* magnetic bead technology and amplification was made according to a global PCR protocol using mRNA-derived cDNA. Amplified cDNA samples were quantified using the ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies). The integrity of the cDNA was check *via* the Agilent 2100 Bioanalyzer platform (Agilent Technologies)

### ***Whole genome experiment***

250 ng of each of the cDNAs were used as template for Cy3 labeling which was performed according to Miltenyi Biotec's undisclosed protocol. The Cy3-labeled cDNA were hybridized to an Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays 8x60K. Fluorescence signals of the hybridized Agilent Microarrays were detected using Agilent's Microarray Scanner System (Agilent Technologies). The Agilent Feature Extraction Software (FES) was used to read out and process the microarray image files. The software determines features intensities, reject outliers and calculate statistical confidences. The output data includes gene probe list for each sample.

### ***Statistical and data analysis analysis***

For each probe and each monocyte subset we calculated the average fluorescence intensity of samples from obese subjects and lean controls. The ratio between obese and lean groups was calculated (fold-change). Three "P50" lists have been created by filtering probes flagged as "Present" for at least half of the chips involved in the study, and were used for the genome comparison. The group comparisons were done using Student's *t*-test. To estimate the false discovery rate the resulting *p*-values were filtered at 0.05. Cluster analysis was performed by hierarchical clustering, using the Spearman correlation similarity measure and ward linkage algorithm. Unsupervised analysis step were performed using clustering prior to any supervised statistical comparison to unveil natural groups among the tested samples. Probes lists were filtered by *p*-value < 0.05 reflecting the statistical validity and by 1.5 fold-change variation of the gene expression. A new clustering step was performed after supervised analysis in order to test the generated list by classifying the samples in expected groups. To visualize the gene expression we turn mean centered data into heat-maps built by hierarchical classification using the Spearman correlation similarity measure and ward linkage

in clustering algorithm. The data were computed with R and the graphic produced with TreeView. Volcano plots were constructed by plotting for each comparison the negative log of the  $p$ -value on the  $y$ -axis and the  $x$ -axis is the log of the fold-change between the two conditions. Data were subsequently used for Ingenuity Pathway Analysis (IPA), a knowledge and discovery tool allowing to relate the most recent literature findings to experimental data, to model relationships among genes and proteins and to determine putative relevant biological processes.



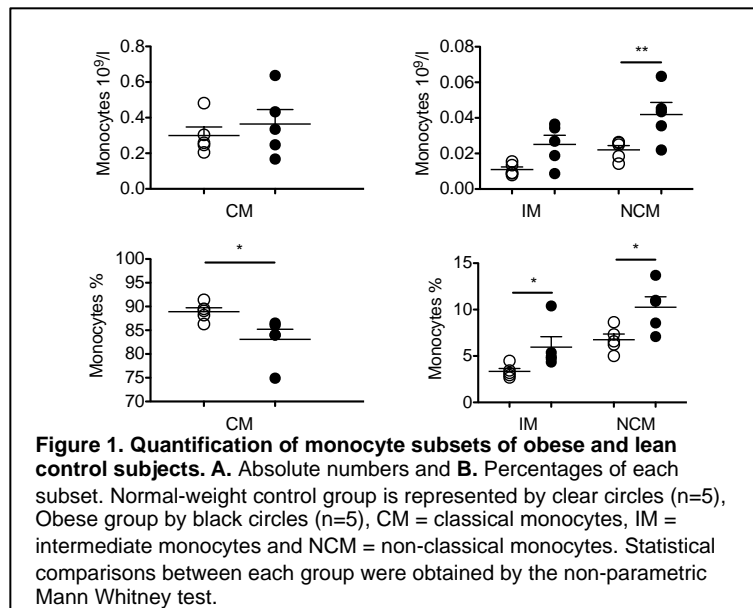
## Results

### *Obese patients, lean controls and cell sorting*

The Ob patients and C subjects enrolled in this study were all non-diabetic females, aged 44.1±1.8 and 39.8±3.4 years respectively. The mean body mass index (BMI) was 44.1±8.9 for Ob group and 22.4±1.7 for the C group (Table 1). As expected, metabolic traits (glycemia, insulinemia and HOMA-IR) were significantly altered in Ob compared C group. As already published (23) (21), percentage of CM was decreased in the Ob group compared to the C group whereas percentages of IM and NCM were increased (Figure 1). Absolute number of NCM was also significantly increased in Ob group. Sorted monocyte subpopulations containing more than 98% of CD14<sup>+</sup>C16<sup>++</sup> or CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> or CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> cells were considered acceptable to include in the study (supplemental figure 1). Total RNA from obese and lean monocyte subsets was used to analyze whole genome expression by microarray experiments.

Characteristics	Ob	C	p
Subjects. number	5	5	
Age (mean ± SEM). years	44.40±8.88	39.8±3.44	0.832
Sex. female/male	5/0	5/0	
BMI (mean ± SEM). Kg/m <sup>2</sup>	44.13±1.79	22.42±1.73	0.008
Glycemia (mean ± SEM). mmol/L	6.14±1.54	4.58±0.30	0.094
Insulinemia (mean ± SEM). μUI/L	18.32±4.58	7.40±2.48	0.015
HOMA-IR (mean ± SEM)	5.44±2.86	1.54±0.58	0.015
Total cholesterol (mean ± SEM). mmol/L	3.95±0.48	4.74±0.84	0.209
Triglycerides (mean ± SEM). mmol/L	1.15±0.50	0.67±0.12	0.222
HDL-cholesterol (mean ± SEM). mmol/L	1.30±0.27	1.60±0.36	0.209
CRP (mean ± SEM). mg/L	9.78±2.75	3.60±3.36	0.072
White blood cells (mean ± SEM). 10 <sup>9</sup> /L	7.37±1.36	5.89±1.28	0.309
Neutrophils (mean ± SEM). 10 <sup>9</sup> /L	4.58±0.91	3.41±1.01	0.222
Lymphocytes (mean ± SEM). 10 <sup>9</sup> /L	2.13±0.41	1.97±0.30	0.548
Total monocytes (mean ± SEM). 10 <sup>9</sup> /L	0.43±0.15	0.34±0.08	0.548

**Table 1. Bioclinical characteristics of obese and lean control subjects.** Statistical comparisons between each group were obtained by the nonparametric Mann-Whitney U test. Ob. obese patients. C. lean controls. CRP. C-reactive protein; HDL-c. high-density lipoprotein-cholesterol

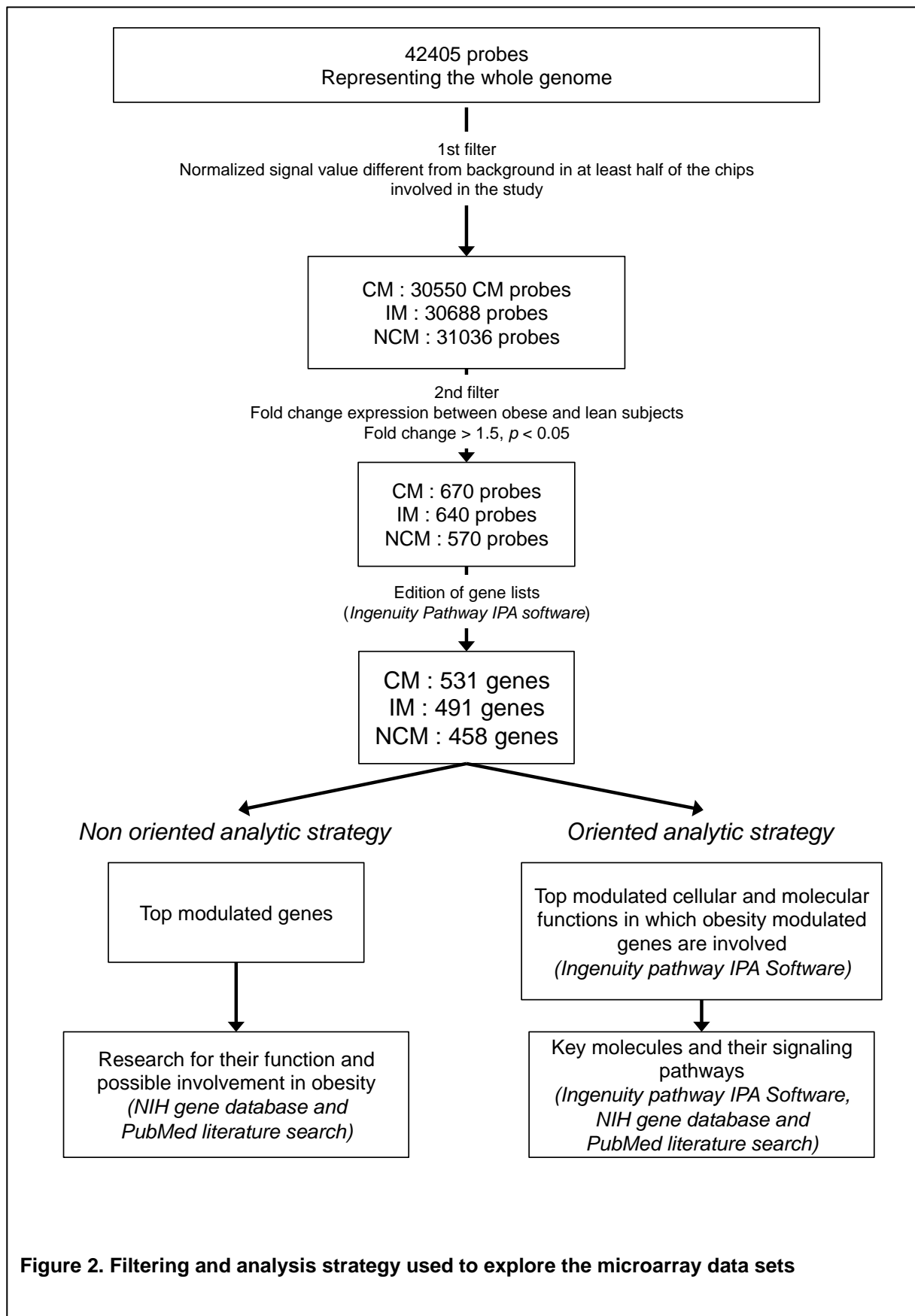


### *Genome-wide expression reveals an impact of obesity on the three subsets of monocytes*

Our previous study showed that monocyte phenotype and functions of each of the three subsets was specifically altered in human obesity (21). Here, gene expression profiling using Agilent Microarray technology was performed to characterize the transcriptional signature of each monocyte subset in obesity. Our aim was to discover new key pathways and molecules that would be specifically modulated by obesity in each monocyte subpopulation. The whole strategy of filtering and analysis of the microarray data sets is summarized in figure 2. Normalized signal values corresponding to the 42405 probe-sets representing the whole genome were imported from microarrays data files for each subset. Probes giving normalized signal values different from the background signal in at least half of the chips involved in the study of each subset were selected, which represents 30550, 30688 and 31036 probes respectively for the CM, the IM and NCM (Figure 2).

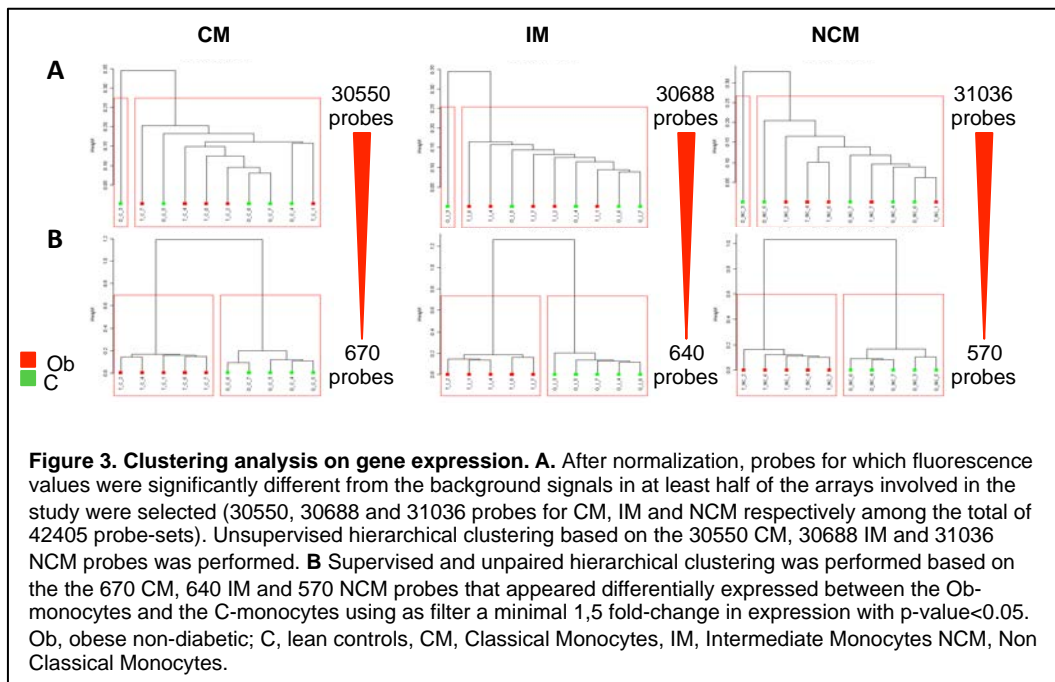
To determine whether obese monocyte displayed a specific transcriptomic signature, a non-supervised clustering analysis (Spearman correlation similarity measure and ward linkage algorithm) with normalized signal values of the 30550, 30688 and 31036 probes-sets was performed (Figure 3A) followed by an unpaired supervised clustering including probes showing a minimal 1.5 fold-change expression between monocytes from obese and lean subjects, with a minimal  $p$ -value of 0.05. Using these filters, lists of 670, 640 and 570 probes that were differentially and significantly expressed were obtained for the CM, IM and NCM

respectively (Figure 3B). A perfect delineation between monocytes from obese and lean

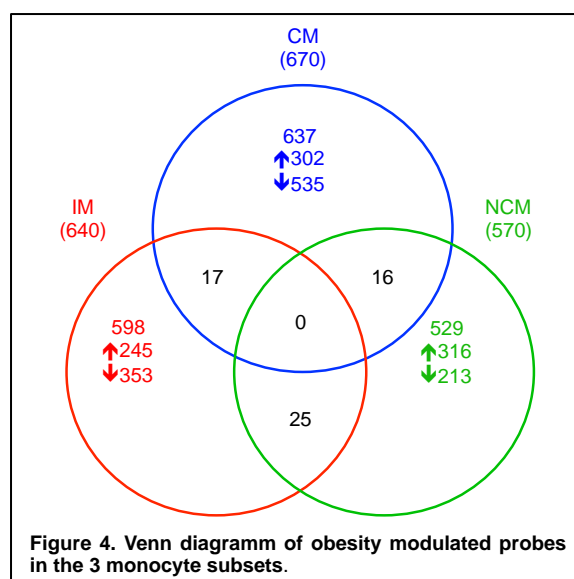


**Figure 2. Filtering and analysis strategy used to explore the microarray data sets**

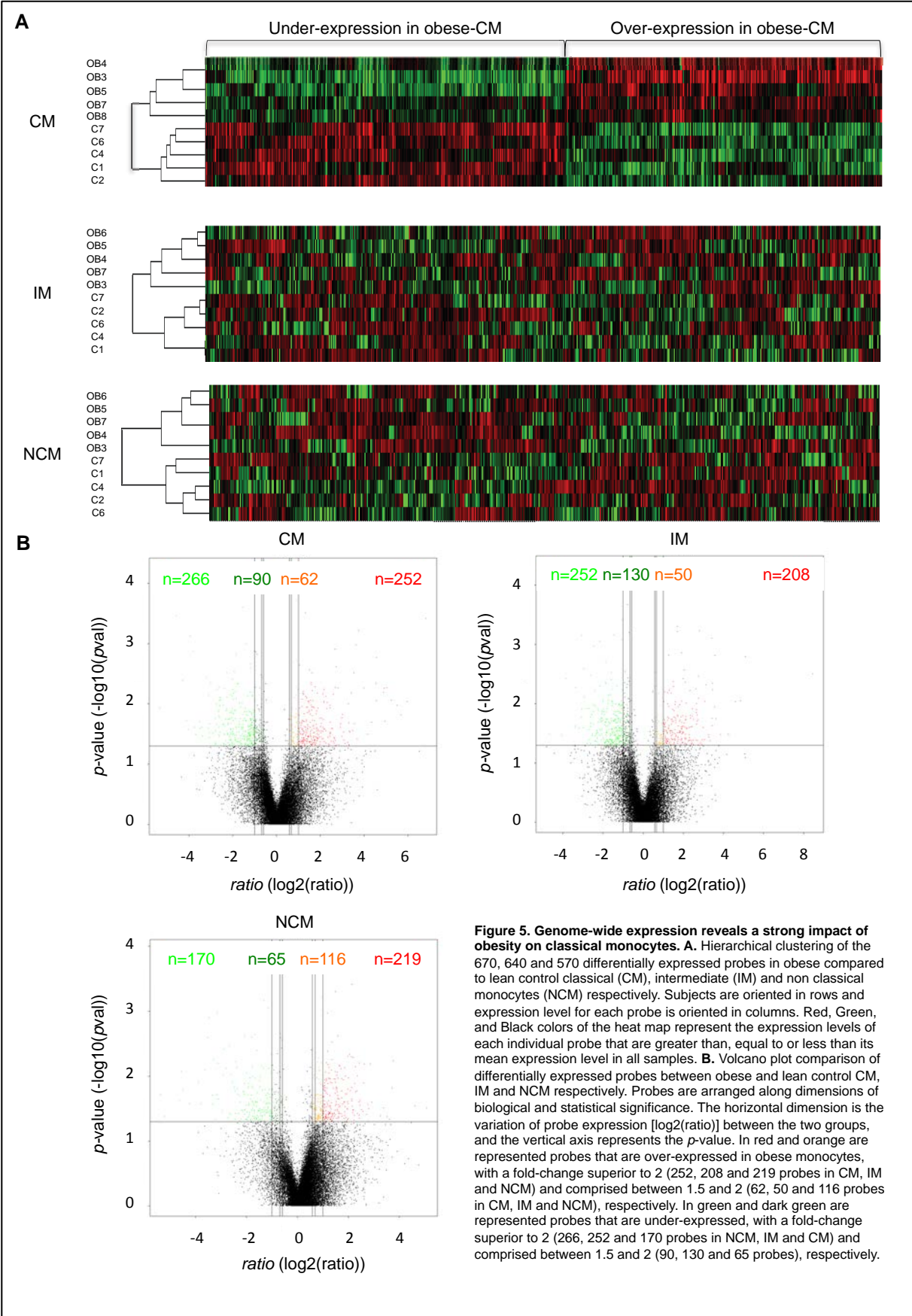
subjects was observed for each subset demonstrating that obesity is associated with significant modifications in molecular features of the three monocyte subpopulations.



To ascertain the specificity of the probes modulated in each subset of monocyte by human obesity we constructed a Venn diagram and we found 17 obesity-modulated probes shared by CM and IM, 25 by IM and NCM and 16 by NCM and CM and none shared by the three subsets together (Figure 4). A list of the genes shared by two of the three subsets is presented in supplemental tables 1 to 3. Taken together, these results clearly demonstrate that monocyte sorted from blood obese patient display a specific gene expression signature, different from that of monocyte sorted from blood of lean subjects and the signature is specific to each monocyte subset.



To emphasize these observations, three heat maps including the 670, 640 and 570 differentially expressed probes between the two groups (fold-change > 1.5, *p*-value < 0.05)



**Figure 5. Genome-wide expression reveals a strong impact of obesity on classical monocytes.** **A.** Hierarchical clustering of the 670, 640 and 570 differentially expressed probes in obese compared to lean control classical (CM), intermediate (IM) and non classical monocytes (NCM) respectively. Subjects are oriented in rows and expression level for each probe is oriented in columns. Red, Green, and Black colors of the heat map represent the expression levels of each individual probe that are greater than, equal to or less than its mean expression level in all samples. **B.** Volcano plot comparison of differentially expressed probes between obese and lean control CM, IM and NCM respectively. Probes are arranged along dimensions of biological and statistical significance. The horizontal dimension is the variation of probe expression [log<sub>2</sub>(ratio)] between the two groups, and the vertical axis represents the *p*-value. In red and orange are represented probes that are over-expressed in obese monocytes, with a fold-change superior to 2 (252, 208 and 219 probes in CM, IM and NCM) and comprised between 1.5 and 2 (62, 50 and 116 probes in CM, IM and NCM), respectively. In green and dark green are represented probes that are under-expressed, with a fold-change superior to 2 (266, 252 and 170 probes in NCM, IM and CM) and comprised between 1.5 and 2 (90, 130 and 65 probes), respectively.

were built. For the CM, all obese and lean samples are clustered in homogenous manner: on the upper part of the map are clustered the obese samples, the obesity-under expressed genes and the obesity-over-expressed genes segregate respectively on the left and the right side of the heat map; the inverse pattern was observed on the lower part of the heat map where are clustered the lean samples. These patterns were not observed for the IM and the NCM (Figure 5A) indicating a clearer signature of obesity for the CM compared to the two other subsets. Volcano plots showing probe expression variation in monocytes from obese and lean subjects revealed set of 314, 258 and 335 up-regulated probes and of 356, 382 and 235 down-regulated probes in obese CM, IM and NCM respectively (Figure 5B).

***The top regulated genes in the three monocytes subsets link the immune response to metabolism and response to stress***

We first performed without any functional filtering the analysis of the top regulated genes by obesity in the three monocytes subsets. Among the modulated probes in the CM, IM and NCM, 531, 491 and 458 unique and predicted probes were successfully mapped to a gene in Ingenuity Pathways Knowledge Base (IPKB). Complete lists of regulated genes are visible as supplementary data (Supplemental tables 4 to 6). The distribution of the different gene types is comparable between the three subsets with a maximum of 1% cytokines, 1% to 2% G-protein coupled receptors, less than 1% growth factors, 4% to 6% kinases, 1% to 3% peptidases, 1% to 2% phosphatases, less than 1% ligand-dependent nuclear factors, 2% to 3% trans-membrane receptors and 3% to 5% transporters. In Table 2 to 4 are presented top ten up- and top ten down-regulated genes in each monocyte subset in obesity.

Among the top 10 up- or down-regulated genes in obese-CM we found genes coding for molecules involved in: **1/** cell migration and adhesion (CLU [Clusterin], PLXNA2, FBLIM1 [filamin binding LIM protein 1]), **2/** immune response (ZP3 [zona pellucida glycoprotein 3 *sperm receptor*], SPON2 [spondin 2, extracellular matrix protein] and CLU) and **3/** metabolism (CLU, WDR35 [WD repeat domain 35], PINLYP [phospholipase A2 inhibitor and LY6/PLAUR domain containing] and BCKDHB [branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide]). We also found important up-regulation (51.64-fold change,  $p=0.02$ ) of PEX11G (peroxisomal biogenesis factor 11 $\gamma$ ) a gene coding for a molecule involved in size regulation of the peroxisome, an organelle involved in oxidation reactions and in lipid biosynthesis. CLU or apolipoprotein J is the most regulated gene

Gene Symbol		Gene name	Functions and process	Over expression in obesity	Fold Change Ratio OB vs C	p-value
CLU	clusterin		<i>Misfolded protein binding, protein binding, ubiquitin and protein ligase binding.</i> Coagulation, cell morphogenesis, chaperone, complement activation, innate immune response, lipid metabolism, microglial activation, platelet activation, positive regulation of NF- $\kappa$ B, positive regulation of $\beta$ -amyloid formation, positive regulation of neurone death, positive regulation of nitric oxide biosynthesis	114.89	780.75	3.86E-04
FAM90A1	family with sequence similarity 90, member A1		Nucleic acid binding, protein binding, zinc ion binding	63.34	736.83	9.16E-03
PEX11G	peroxisomal biogenesis factor 11 gamma		<i>Protein binding</i> Peroxisome fission, regulation of peroxisome size	51.64	443.83	1.52E-02
UBE3D	ubiquitin protein ligase E3D		<i>Ligase activity</i> Protein ubiquitination	46.15	167.27	1.06E-02
PLXNA2	plexin A2		<i>Protein binding, semaphorin receptor activity</i> Regulation of cell migration	37.97	106.65	8.68E-03
WDR35	WD repeat domain 35		<i>Phosphatidylinositol binding</i> Fatty acid degradation	33.17	96.95	5.41E-03
PINLYP	phospholipase A2 inhibitor and LY6/PLAUR domain containing		<i>Phospholipase inhibitor activity</i> Negative regulation of catalytic activity	31.26	502.91	1.96E-02
FBLIM1	filamin binding LIM protein 1		<i>Filamin binding, Protein binding, Zinc ion binding</i> Cell junction assembly, regulation of cell shape, regulation of integrin activation, single organismal cell-cell adhesion	30.31	90.45	5.56E-03
ZNF699	zinc finger protein 699		<i>DNA binding, Letal ion binding, protein binding</i>	29.91	96.69	6.46E-03
CFAP45	cilia and flagella associated protein 45		Transcription, DNA-templated	23.98	580.59	1.72E-03
<b>Lower expression in obesity</b>						
C10orf113	chromosome 10 open reading frame 113			-40.351	173.302	1.16E-02
CCDC85C	coiled-coil domain containing 85C		Cerebral cortex development	-23.888	267.723	3.44E-04
PGBD4	piggyBac transposable element derived 4		Branched-chain amino acid catabolism, cellular nitrogen compound metabolism, oxidation-reduction, small molecule metabolism	-17.889	58.343	5.66E-05
BCKDHB	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta		<i>3-methyl-2-oxobutanate dehydrogenase (2-methylpropanoyl-transferring) activity, c-ketocacid dehydrogenase activity, carboxy-lyase activity, protein binding</i>	-17.335	327.976	1.92E-02
LINC00954	long intergenic non-protein coding RNA 954			-16.335	222.333	2.65E-02
ZP3	zona pellucida glycoprotein 3 (sperm receptor)		<i>Acrosin binding, carbohydrate binding, manganese ion transmembrane transporter activity, signal transducer activity, store-operated calcium channel activity</i>	-15.297	225.786	7.55E-04
TRIM65	tripartite motif containing 65		<i>Calcium ion transmembrane transport, humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin, intracellular protein transport, intracellular signal transduction, negative regulation of transcription, DNA-templated, phosphatidylinositol-mediated signaling, positive regulation of acrosomal vesicle exocytosis, positive regulation of inflammatory response</i>	-13.929	117.26	1.31E-03
SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein		<i>zinc ion binding</i> <i>Antigen binding, lipopolysaccharide binding, metal ion binding, protein binding</i>	-13.412	129.006	2.48E-02
ARMCX5	armadillo repeat containing, X-linked 5		Cell adhesion, defense response to fungus, defense response to virus, induction of bacterial agglutination, innate immune response, mast cell mediated immunity, opsonization, positive regulation of interleukin-6, macrophage cytokine production and TNF production	-12.88	57.631	3.25E-02
LOC100128079	uncharacterized		<i>Protein binding</i>	-11.378	195.154	1.99E-02

**Table 2. Top up and down regulated genes in classical monocytes in obesity.** \*P50<sup>+</sup>-probes "present" at least in half of the chips involved in the study were analysed and filtered by 1.5-fold-change variation of the gene expression between obese and lean control groups and by *p*-value <0.05 reflecting the statistical validity. Resulting lists were analysed with Ingenuity Pathway IPA software and specific genes modulated in obese monocyte subsets were edited. We looked for gene functions and process in the NCBI gene database.

Over expression in obesity

Gene Symbol	Gene name	Functions and process	Fold Change	Ratio OB vs C	P-value
CISD1	CDGSH iron sulfur domain 1	<i>Zn</i> ion, <i>Z</i> sulfur cluster binding, metal ion binding Regulation of cellular respiration	353,78	1369,27	3,00E-03
SFTPD	surfactant protein D	Carbohydrate binding, protein binding Defense response to bacterium, innate immune response, macrophage chemotaxis, negative regulation of T cell proliferation, negative regulation of interleukin-2 biosynthetic process, reactive oxygen species metabolic process, receptor-mediated endocytosis, regulation of cytokine production, respiratory gaseous exchange, surfactant homeostasis	34,35	2448,33	2,00E-03
TMEM44	transmembrane protein 44	DNA binding, Lysine ion binding, protein binding	29,26	101,71	9,00E-03
ZNF696	zinc finger protein 696	Transcription, DNA-templated	24,53	397,07	9,00E-03
POU6F1	POU class 6 homeobox 1	DNA binding	18,97	150,22	3,30E-02
BPHL	biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase)	Brain, heart, muscle development, Transcription, DNA-templated Cellular amino acid metabolic process, response to toxic substance	14,62	621,61	3,40E-02
NAE1	NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1	Contributes to NEDD8 activating enzyme activity, protein binding, protein heterodimerization activity, ubiquitin protein ligase binding	12,45	356,71	1,80E-02
ARSD	arylsulfatase D	Mitotic DNA replication checkpoint, protein neddylation, regulation of apoptotic process, signal transduction Arylsulfatase activity, metal ion binding	11,98	41,74	2,00E-03
ATP2A1	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, cardiac muscle, fast twitch 1	Cellular protein metabolic process, glycosphingolipid metabolic process, post-translational protein modification, small molecule metabolic process, sphingolipid metabolic process 14-3-3 protein binding, insulin receptor binding, phosphatidylinositol 3-kinase binding, protein binding, protein kinase binding, protein phosphatase binding, signal transducer activity	11,06	111,31	6,00E-03
MAP3K13	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	Toll-like receptor signaling pathway/Fc-epsilon receptor signaling pathway, JAK-STAT cascade involved in growth hormone signaling pathway, cell proliferation, cellular response to glucose stimulus, cellular response to insulin stimulus, epidermal and fibroblast growth factor receptor signaling pathway, glucose metabolic process, innate immune response, interact with insulin receptors 1 & 2, lipid homeostasis, negative regulation of B cell apoptotic process, negative regulation of kinase activity, positive regulation of fatty acid beta-oxidation, negative regulation of plasma membrane long-chain fatty acid transport ATP binding, MAP kinase activity, metal ion binding, protein kinase binding, JNK cascade, activation of MAPKK activity, positive regulation of NF-kB, protein phosphorylation	11	261,65	5,00E-03

Lower expression in obesity

CD22	CD22 molecule	Carbohydrate binding, protein binding Cell adhesion	-25,394	864,236	3,18E-02
DOK4	docking protein 4	Insulin receptor binding, receptor signaling protein activity, protein binding MAPK cascade, nervous system development, transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	-16,529	92,43	3,40E-02
SPEN	spen family transcriptional repressor	RNA polymerase II transcription factor binding, nucleotide binding, poly(A) RNA binding, sequence-specific DNA binding transcription factor activity, transcription corepressor activity, protein binding	-15,046	48,835	4,74E-05
GPR137	G protein-coupled receptor 137	Notch signaling pathway, viral process	-14,225	625,875	3,80E-03
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	DNA repair, protein complex assembly, regulation of cell proliferation Protein binding	-10,417	73,766	2,49E-02
ZNF254	zinc finger protein 254	Metal ion and DNA binding Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, DNA-templated	-10,259	216,849	5,30E-03
TRIM35	tripartite motif containing 35	Zinc ion binding Positive regulation of apoptosis, negative regulation of viral release from host cell, innate immune response, negative regulation of mitotic cell cycle	-8,278	99,205	1,24E-02
USP38	ubiquitin specific peptidase 38	Cysteine-type endopeptidase activity, ubiquitin-specific protease activity Proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	-8,241	93,307	7,05E-04
UBE2Q2	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 2	ATP binding, ligase activity, ubiquitin-protein transferase activity	-7,602	55,323	7,75E-03
MYBL1	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1	Protein K48-linked ubiquitination RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding Gene expression	-6,89	79,8	4,71E-02

**Table 3. Top up and down regulated genes in intermediate monocytes in obesity.** \*P50\*-probes "present" at least in half of the chips involved in the study were analysed and filtered by 1.5-fold-change variation of the gene expression between obese and lean control groups and by *p*-value <0.05 reflecting the statistical validity. Resulting lists were analysed with Ingenuity Pathway IPA software and specific genes modulated in obese monocyte subsets were edited. We looked for gene functions and process in the NCBI gene database.



**Over-expression in obesity**

Gene Symbol	Gene name	Functions and process	Fold Change	Ratio OB vs C	P-value
ME1TL24	methyltransferase like 24	<i>Methyltransferase activity</i>	33,96	298,31	3,10E-02
DCHS1	dachsous cadherin-related 1	Methylation Calcium ion binding	24,7	341,75	2,90E-02
FAM198B	family with sequence similarity 198, member B	Calcium-dependent cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules	13,61	59,92	6,00E-03
CMPK2	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	<i>ATP binding</i> , <i>UMP kinase activity</i> , <i>cytidylate kinase activity</i> , <i>nucleoside diphosphate kinase activity</i> , <i>thymidylate kinase activity</i>	13,14	594,07	1,50E-02
NF1	neurofibromin 1	Cellular response to lipopolysaccharide <i>GTPase activator activity</i> , <i>phosphatidylinositol 3-OH kinase activity</i> , <i>phosphatidylinositol 4-OH kinase activity</i> , <i>Ras protein signal transduction</i> , <i>actin cytoskeleton organization</i> , <i>artery morphogenesis</i> , <i>cell communication</i> , <i>cellular response to heat</i> , <i>extracellular matrix organization</i> , <i>extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors</i> , <i>negative regulation of MAPK cascade</i> , <i>negative regulation of Rac protein signal transduction</i> <i>DNA, protein and zinc binding</i>	12,25	54,43	4,60E-02
TCEA2	transcription elongation factor A (SII), 2	DNA templated transcription, elongation, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	11,46	366,88	4,30E-02
IQCE	IQ motif containing E	<i>Protein binding</i>	10,47	79,78	3,10E-02
CLEC1A	C-type lectin domain family 1, member A	Glycosaminoglycan metabolism <i>Carbohydrate binding</i> , <i>transmembrane signaling receptor activity</i>	9,71	56,64	0,00E+00
PXN	paxillin	Cell surface receptor signaling pathway, defense response <i>BH4 domain binding</i> , <i>b-catenin binding</i> , <i>integrin binding</i> , <i>protein kinase binding</i> , <i>vinculin binding</i> , <i>zinc ion binding</i>	9,66	170,87	4,10E-02
CLASP2	cytoplasmic linker associated protein 2	Activation of MAPK activity, cell adhesion, cellular response to reactive oxygen species, cytoskeleton organization, epidermal growth factor receptor signaling pathway, integrin-mediated signaling pathway, peptidyl-tyrosine phosphorylation, regulation of cell shape, substrate adhesion-dependent cell spreading, transforming growth factor beta receptor signaling pathway, vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway <i>Dystroglycan binding</i> , <i>galactoside 2-<math>\alpha</math>-L-fucosyltransferase activity</i> , <i>microtubule plus-end binding</i> , <i>protein binding</i>	7,59	352,95	2,50E-02

**Lower-expression in obesity**

FAHD2A	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2A	<i>Hydrolase activity</i> , <i>metal ion binding</i> Metabolic process	-41,465	127,604	1,93E-02
ATP6AP1L	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 1-like	<i>Proton-transporting ATP synthase activity</i> , <i>rotational mechanism</i>	-36,83	430,14	4,22E-02
OLFM1	olfactomedin 1	ATP hydrolysis coupled proton transport <i><math>\beta</math>-amyloid binding</i>	-24,833	416,689	2,37E-02
PDXP	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) phosphatase	Atreticular valve formation, cardiac epithelial to mesenchymal transition, negative regulation of beta-amyloid formation, positive regulation of epithelial to mesenchymal transition <i>Pyridoxal phosphatase activity/heat shock protein binding</i> , <i>magnesium ion binding</i>	-23,527	153,05	8,47E-03
ATF7IP2	activating transcription factor 7 interacting protein 2	Regulation of cytokinesis, cellular response to ATP, regulation of mitotic nuclear division <i>Transcription factor</i>	-22,341	85,291	1,64E-02
LILRB5	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 5	Defense response, immune system response <i>Transmembrane signaling receptor</i>	-14,716	99,251	1,22E-02
AACS	acetoacetyl-CoA synthetase	<i>ATP binding</i> , <i>acetoacetyl-CoA ligase activity</i> , <i>butyrate-CoA ligase activity</i> , <i>protein binding</i>	-13,754	54,841	2,67E-02
SLC35G2	solute carrier family 35, member G2	Adipose tissue development, cellular response to cholesterol, cellular response to glucose stimulus, cellular response to testosterone stimulus, fatty acid metabolism, liver development, positive regulation of insulin secretion, response to drug, nutrient, oleic acid, starvation, white fat cell differentiation	-12,348	42,41	7,98E-03
KLHL21	kelch-like family member 21	<i>Contributes to ubiquitin-protein transferase activity</i>	-11,437	108,323	2,54E-03
SNORA58	small nucleolar RNA, H/ACA box 58	Cell division, mitotic nuclear division, protein ubiquitination, regulation of cytokinesis	-11,097	63,577	1,26E-03

**Table 4. Top up and down regulated genes in non classical monocytes in obesity.** "P50"-probes "present" at least in half of the chips involved in the study were analysed and filtered by 1.5-fold-change variation of the gene expression between obese and lean control groups and by *p*-value <0.05 reflecting the statistical validity. Resulting lists were analysed with Ingenuity Pathway IPA software and specific genes modulated in obese monocyte subsets were edited. We looked for gene functions and process in the NCBI gene database.

(114.89-fold change,  $p < 0.001$ ) in obese-CM. It is implicated in metabolic and immunological process. Which makes it interesting as a gene coding for a molecule linking the immune response with regulation of metabolism.

The top 10 up- or down-regulated genes in obese-IM are involved in many processes: **1/** cell adhesion (CD22), **2/** immune response (SFTPD [surfactant protein D], ATP2A1 [ATPase, Ca<sup>++</sup> transporting, cardiac muscle, fast twitch 1], MAP3K13 [mitogen-activated protein kinase 13], DOK4 [docking protein 4] and USP38 [ubiquitin specific peptidase 38]), **3/** metabolism (BPHL [biphenyl hydrolase-like - *serine hydrolase*], ARSD [arylsulfatase D] and ATP2A1), **4/** response to toxic substance (BPHL [biphenyl hydrolase-like – *serine hydrolase*]), **5/** apoptosis and regulation of cell proliferation (NAE1 [NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1], TRIM35 [tripartite motif containing 35] and FANCA [Fanconi anemia, complementation group A]) and **6/** regulation of respiration (CISD1 [CDGSH iron sulfur domain 1] and SFTPD). Interestingly molecules like ATP2A and DOK4 binds the insulin receptors, and more particularly ATP2A is involved as well in metabolism process and in pathways of the inflammatory response. In the obese-IM, CISD1 is the most up-regulated gene (353,78-fold change,  $p = 0,003$ ). CISD1 is also known as MitoNEET, a molecule already studied in obesity and acting on the oxidative stress and glucose intolerance (24).

The top modulated genes by obese-NCM are involved in: **1/** cell adhesion (DCHS1 [dachsous cadherin-related 1], PXN [paxillin) and CLASP2 [cytoplasmic linker associated protein 2]), **2/** immune response (NF1 [neurofibromin 1], CLEC1A [C-type lectin domain family 1, member A], PXN, PDXP [pyridoxal - *pyridoxine, vitamin B6* – phosphatase], LILRB5 [leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B - *with TM and ITIM domains*, member 5] and KLHL21 [kelch-like family member 21]), **3/** metabolism (CMPK2 [cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial], NF1, IQCE [IQ motif containing E], FAHD2A [fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2A] and AACCS [acetoacetyl-CoA synthetase], **4/** response to reactive oxygen species (PXN) and **5/** apoptosis and regulation of cell proliferation (NF1 and KLHL21). NF1 and PXN, because of their implication in processes of immune response, metabolism and response to stress are of interest in the comprehension of NCM functions in obesity. The top obesity modulated gene in the NCM is not as highly altered as the ones in the CM and IM, with a fold change of 33.96 and a  $p$  value of 0.031. The name of the molecule is methyltransferase like 24 (METTL24) and its functions are still unknown.

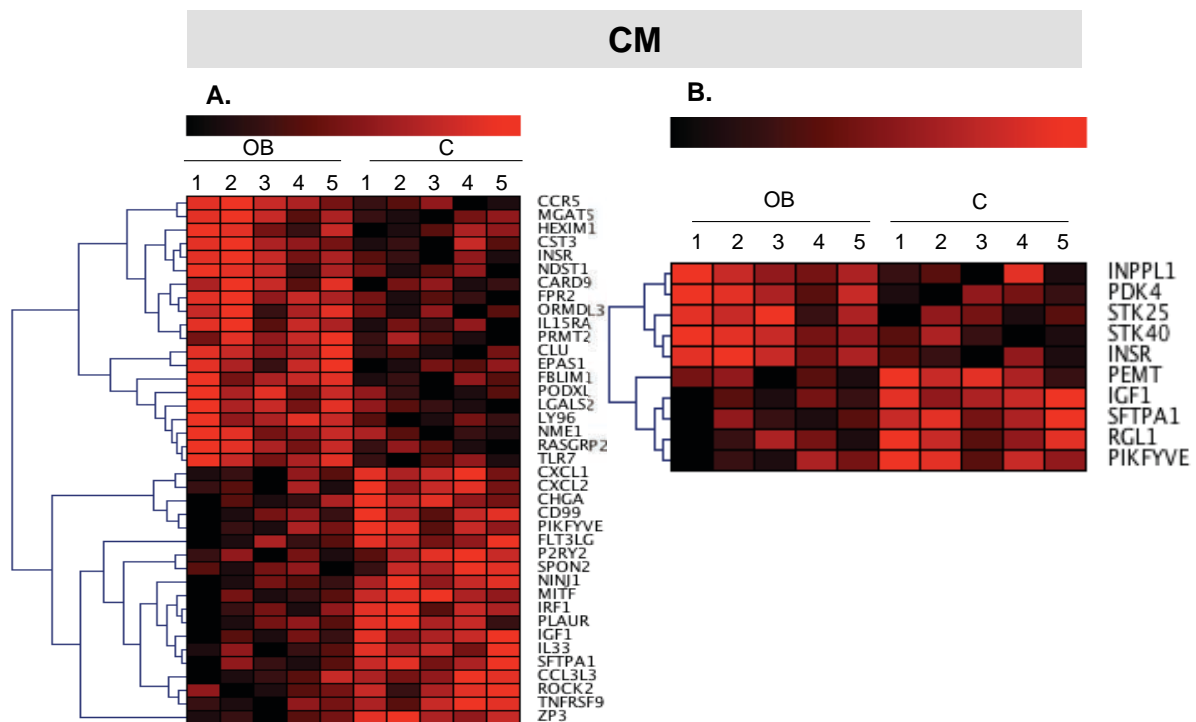
*Top biological functions in which obesity modulated genes by each monocyte subset are implicated*

To determine the link between the obesity-modulated genes in each monocyte subset and obesity related disorders we characterized the most relevant functions related to those genes using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) application. Networks were then generated to determine top associated molecular and cellular functions. IPA calculates for each function an activation z-score. A positive activation z-score indicates an increase and, a negative one a decrease of the relevant function. When the absolute value of the activation z-score is  $\geq 2$  the increase or decrease is statistically significant (Table 5). We took into consideration functions relevant to obesity related disorders with z-score  $>1$  and/or number of obesity modulated genes implicated  $> 6$ . We plotted the obesity-modulated genes implicated on those functions on heat-maps representing their level of expression in the obese and lean control groups (Figures 6, 7 and 8).

Top molecular and cellular group of functions modulated by obesity in the CM are: cell signaling, cellular compromise, DNA replication, recombination, and repair, molecular transport and nucleic acid metabolism. Cell signaling is the one that is the most likely to be modulated by obese-CM ( $4.57 \times 10^{-4} < p > 2.14 \times 10^{-2}$ ). It involves 39 genes implicated in immune cells recruitment, adhesion and migration and their modulation would lead to significant decrease of these functions (activation z-scores  $\leq -2,000$ ). Five of the modulated genes (INRS [insulin receptor], NME1 [non-metastatic cells 1], PIKFYVE [phosphoinositide kinase, FYVE finger containing], PLAUR [plasminogen activator, urokinase receptor], ROCK2 [Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2]) lead to an increase quantity of actin synthesis ( $p = 1.12 \times 10^{-2}$ , activation z-score = +2,000), a molecule involve in cell migration, by obese-CM (Figure 6A and table 5). Among the 19 genes involved in molecular transport, we found 10 genes involved as well in carbohydrate and lipid metabolism with 7 of them controlling the amount of glycogen (IGF1 [insulin-like growth factor 1], INPPL1 [inositol polyphosphate phosphatase-like 1], INSR, PDK4 [pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4], RGL1 [ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1], STK25 [serine/threonine kinase 25], STK40 [serine/threonine kinase 40]) though with a  $p$  value of  $1,47 \times 10^{-3}$  and an null activation z- activation (Figure 6B and table 5).

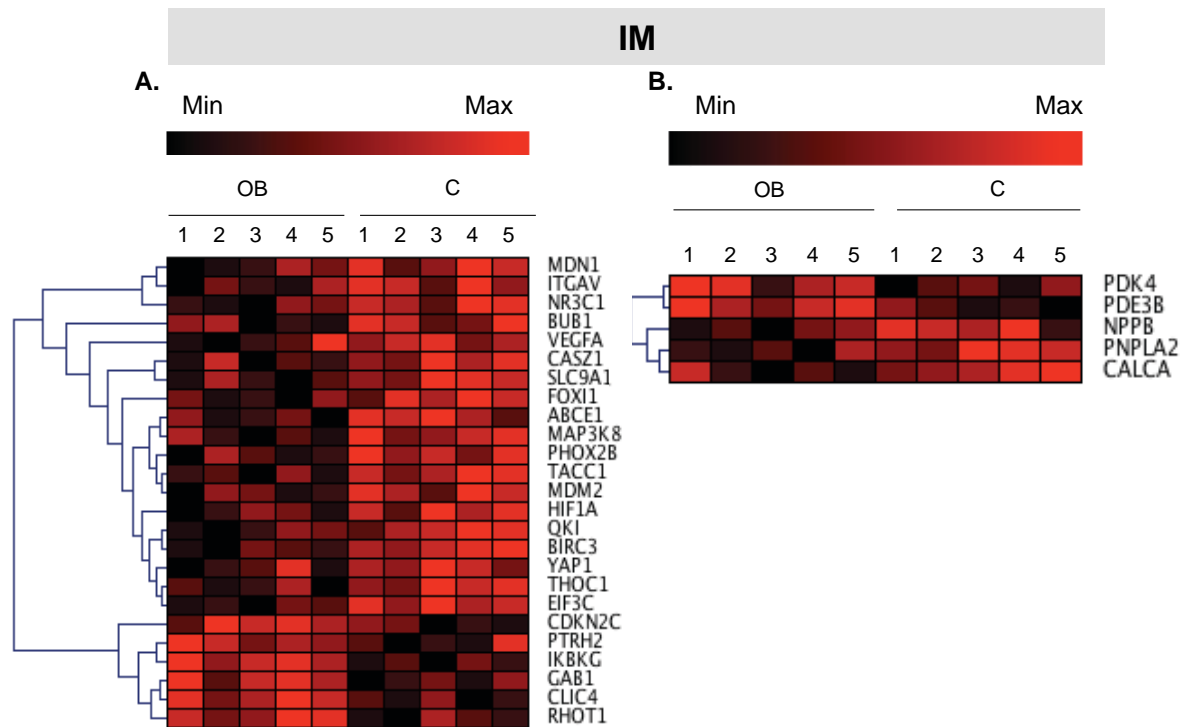
Monocyte subsets	Molecular and cellular group of functions	# of genes involved in the group of functions	p-value	Functions within the group with absolute value z-score > 1 and/or number of genes implicated > 6																								
CM	Cell Signaling	39	2.14.10 <sup>-2</sup> - 4.57.10 <sup>-4</sup>	Adhesion of granulocyte (z = -2,102, # genes = 10)																								
				Adhesion of immune cells (z = -2,243, # genes = 19)																								
				Adhesion of neutrophils (z = -1,477, # genes = 6)																								
				Adhesion of phagocyte (z = -1,732, # genes = 8)																								
				Recruitment of cells (z = -2,116, # genes = 20)																								
				Recruitment of leukocytes (z = -2,154, # genes = 18)																								
				Recruitment of granulocytes (z = -2,488, # genes = 13)																								
				Recruitment of phagocytes (z = -2,309, # genes = 12)																								
				Quantity of actin stress (z = 2,000, # genes = 5)																								
				Quantity of glycogen (z = 0,000, # genes = 7)																								
IM	Cellular Compromise DNA Replication, Recombination, and Repair	15	2.14.10 <sup>-2</sup> - 4.57.10 <sup>-4</sup>																									
				Molecular Transport	13	2.14.10 <sup>-2</sup> - 4.57.10 <sup>-4</sup>																						
							Nucleic Acid Metabolism	19	2.14.10 <sup>-2</sup> - 4.57.10 <sup>-4</sup>																			
										Cell morphology Gene expression	9	2.14.10 <sup>-2</sup> - 4.57.10 <sup>-4</sup>																
													Cell Death and survival	33	1.97.10 <sup>-2</sup> - 2.50.10 <sup>-4</sup>	Transactivation (z = -2,156, # genes = 24)												
																Cellular movement	35	1.97.10 <sup>-2</sup> - 3.10.10 <sup>-4</sup>	Cell death of connective tissue (z = 1,621, # genes = 25)									
																			Molecular Transport	95	1.97.10 <sup>-2</sup> - 3.87.10 <sup>-4</sup>	Cell death of fibroblast cell lines (z = 1,432, # genes = 20)						
																						Carbohydrate and lipid Metabolism	24	1.97.10 <sup>-2</sup> - 3.87.10 <sup>-4</sup>	Apoptosis of fibroblast cell lines (z = 0,847, # genes = 17)			
																									Cell Death and Survival	13	1.97.10 <sup>-2</sup> - 3.87.10 <sup>-4</sup>	Apoptosis of leukocytes (z = 0,770, # genes = 20)
																												Small Molecule Biochemistry
Cell Morphology	12	3.69.10 <sup>-2</sup> - 1.02.10 <sup>-3</sup>	Recruitment of cells (z = -0,886, # genes = 16)																									
			Hematological system and development	23	3.69.10 <sup>-2</sup> - 1.02.10 <sup>-3</sup>	Release of glycerol (z = -1,980, # genes = 4)																						
						Cell Morphology	24	3.69.10 <sup>-2</sup> - 1.24.10 <sup>-3</sup>	Quantity of glycogen (z = -1,133, # genes = 6)																			
									Hematological system and development	17	3.69.10 <sup>-2</sup> - 2.02.10 <sup>-2</sup>	Quantity of glycogen (z = -1,133, # genes = 6)																
												Hematological system and development	17	3.69.10 <sup>-2</sup> - 2.02.10 <sup>-2</sup>	Spreading of blood cells (z = 1,452, # genes = 5)													
															Hematological system and development	17	3.69.10 <sup>-2</sup> - 2.02.10 <sup>-2</sup>	Quantity of megakaryocytes (z = 1,000, # genes = 4)										
																		Hematological system and development	17	3.69.10 <sup>-2</sup> - 2.02.10 <sup>-2</sup>	Migration of dendritic cells (z = 2,148, # genes = 9)							

**Table 5. Top bio-functions in which obesity modulated genes are implicated.** Analysis of genes presenting a 1.5 fold modulated expression in obesity were performed with Ingenuity Pathway IPA software to find their implication in bio-functions. Presented are group functions that are strongly associated with the up- and down-regulated molecules. The number of genes involved in each group of functions are indicated. *p* values reflect the less and the most probable function. Only functions with a *p* value < 0.05 were considered as relevant. Z-score (z) = activation score were calculated by IPA, positive or negative z indicates increase or decrease of the relevant function, absolute z-score > 2 is significant



**Figure 6. Obese-classical monocytes (CM) modulate genes involved in cell signaling and in molecular transport and carbohydrate & lipid metabolism.** Heat Maps representing gene expression by CM from obese (OB) subjects and lean controls (C) of genes involved **A.** in cell signaling and **B.** in molecular transport and carbohydrate & lipid metabolism. Hierarchical clustering was calculated using complete linkage.

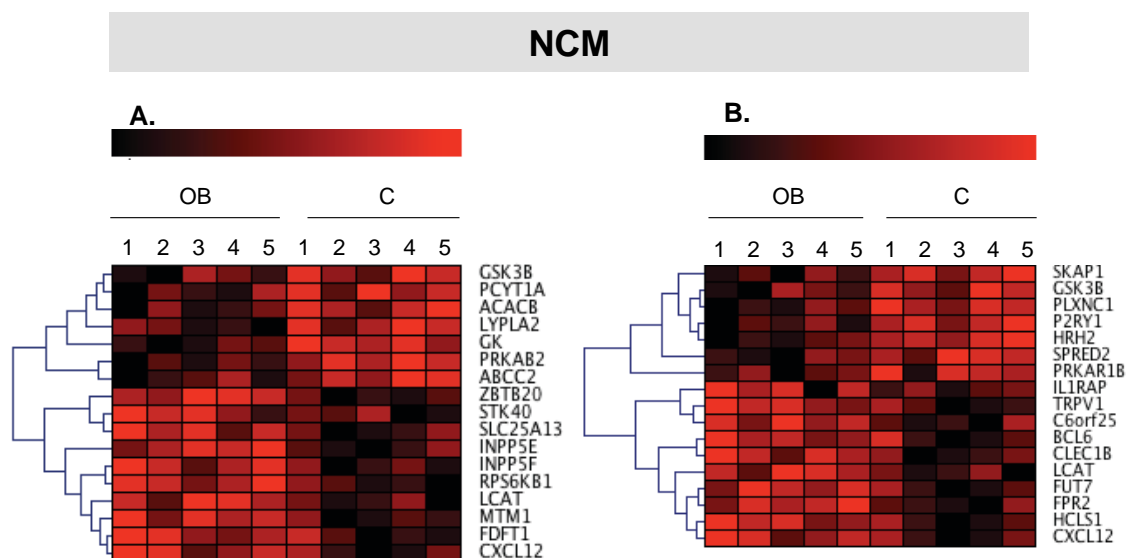
Top molecular and cellular group of functions modulated by obesity in the IM are: cell morphology, gene expression, cell death and survival, cellular movement and molecular transport. Cell death and survival includes 95 modulated genes and among them 25 are implicated in cell death of connective tissue ( $p = 1.13 \times 10^{-2}$ , activation z-score = +1.621) (Figure 7A and table 5) and interestingly the down-regulation of VEGFA (Vascular endothelial growth factor A) could lead according to IPA prediction to increased activation of fibrosis of adipose tissue. Regarding molecular transport 13 molecules are implicated and, 5 of them control the release of glycerol ( $p = 1.57 \times 10^{-3}$ , activation z-score = -1.980) (Figure 7B and table 5).



**Figure 7. Obese-intermediate monocytes (IM) modulate genes involved in cell death of connective tissue and in controlling the release of glycerol.** Heat Maps representing gene expression by (IM) from obese (OB) subjects and lean controls (C) of genes involved **A.** in cell death of connective tissue and **B.** in controlling the release of glycerol. Hierarchical clustering was calculated using complete linkage.

Top molecular and cellular group of functions modulated by obesity in the NCM are: carbohydrate and lipid metabolism, cell death and survival, small molecule biochemistry, cell morphology and hematological system and development. The two groups, carbohydrate metabolism and lipid metabolism include 17 molecules; 13 belong only to the carbohydrate metabolism group of functions, 4 belong only to the lipid metabolism group of functions and 5 are shared by both of them. Seven molecules are involved in determining the quantity of glycogen (ACACB [acetyl-CoA carboxylase beta], PCYT1A [phosphate cytidyltransferase 1, choline, alpha], PRKAB2 [protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit], RPS6KB1 [protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit], STK40 and ZBTB20 [zinc finger and BTB domain containing 20]) ( $p = 1.15 \times 10^{-2}$ , activation z-score = -1.133) (Figure 8A and table 5). Seventeen genes modulated by obesity in the NCM are related functions of hematological system and development with a  $p$  values between  $3.69 \times 10^{-2}$  and  $2.02 \times 10^{-2}$ . Four genes, C6orf25 (chromosome 6 open reading frame 25), CXCL12 (chemokine (C-X-C motif) ligand 12), FUT7 (fucosyltransferase 7 (alpha (1,3) fucosyltransferase)) and SPRED2 (sprouty-related, EVH1 domain containing 2) are implicated in regulating the quantity of megakaryocyte ( $p = 1.29 \times 10^{-9}$ , z-score = +1,000) and

6 are significantly ( $p = 2.57 \times 10^{-2}$ , activation z-score = +2.148) involved in increasing the migration of dendritic cells (CLEC1B [C-type lectin domain family 1, member B], CXCL12, FPR2, HCLS1 [hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1], PLXNC1 [plexin C1], TRPV1 [transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1]) (Figure 8B and table 5). Among those genes, CXCL12 (fold increased OB vs C = 1,766,  $p = 4.36 \times 10^{-2}$ ) is a central molecule that controls the amount of megakaryocytes together with SPRED2 and FUT7. IPA predicts its involvement in humoral immune response by acting with BCL6 (B-cell CLL/lymphoma 6) (fold increased OB vs C = 2,131,  $p = 4.19 \times 10^{-2}$ ) on pro-B lymphocyte and development of plasma cells. It is also involved in chemotaxis of monocyte and migration of dendritic cells (z-score = +2,148) (Table 5).



**Figure 8. Obese-non classical monocytes (NCM) modulate genes involved in carbohydrate & lipid metabolism and in hematological system and development.** Heat Maps representing gene expression by (NCM) from obese (OB) subjects and lean controls (C) of genes involved **A.** in carbohydrate & lipid metabolism and **B.** in hematological system and development. Hierarchical clustering was calculated using complete linkage.

## Discussion

There are an increased proportion of circulating NCM and IM subsets in human obesity low-grade inflammation and an increased absolute number of each subsets including CM (23) (21). We previously showed that these modifications are associated with an enhanced inflammatory phenotype of monocytes in obesity (21). Therefore, the next step was to complete their description by a whole genome microarray analysis of sorted monocyte subsets from obese and lean subjects. The microarray results reinforce the role of CCR5 in CM previously described by Krinninger *et al.* (25) and our team (21). Here, we demonstrated specific characteristics for each monocyte subset at the whole genome level whereas, in our previous study, we showed specific modulation by obesity in each monocyte subset of only a selection of genes involved in the inflammatory response (21). More precisely, the microarray study reveals transcriptional modulations occurring specifically in monocyte present in the circulation of obese patient, with specific gene expression signature for each monocyte subset. This finding therefore shows clearer transcriptional modulation of the CM in obesity compared to the other subsets and brings them in front for their implication in obesity low-grade inflammation. These results have to be put in line with the work of Wong *et al.* (16) defining circulating human monocyte subsets in healthy conditions. According to their microarray results, classical monocytes are the more versatile ones and they express the broadest range of sensing receptor genes, and also genes involved in a wide diversity of functions, including tissue repair and immune responses. Furthermore, the relatively high expression of pro-inflammatory genes may underlie the ability of classical monocytes to support inflammation.

In the obese-CM, CLU or apolipoprotein J is the most regulated gene. It has been shown by Won *et al.* (26) that plasma CLU levels were positively associated with indices of obesity and markers of systemic inflammation. Furthermore, plasma CLU levels showed an upward trend with increasing numbers of metabolic syndrome components. These findings suggest that fasting plasma CLU levels correlate with the parameters of adiposity and systemic inflammation in healthy adults. Therefore, the authors suggest that circulating CLU level may be a surrogate marker for obesity-associated systemic inflammation. By up-regulating molecules like CLU, obese-CM could participate to increase circulating CLU levels. CLU circulates in plasma as a HDL complex (27) and recent proteomic analyses revealed that CLU is also bound to LDL and very-low density LDLs (28) (29) (30). It may



serve not only as an inhibitor of the lytic terminal complement cascade, but also as a regulator of lipid transport and local lipid redistribution (27). CLU is ubiquitously expressed in most cells and tissues, and is up-regulated under a variety of pathological conditions including ageing, diabetes, dyslipidemia, atherosclerosis, degenerative diseases (31) (32) (33). Whether increased CLU levels have beneficial or adverse effects on the cardiovascular system remains uncertain depending on its secreted or nuclear forms (34) (35) (36). The transcriptional regulation of CLU is very complex and controversial depending on the cytokines and tissues involved; it can be differentially regulated by various stimuli due to many distinct regulatory sites. As a matter of fact its promoter, highly conserved among the species, contains many potential regulatory elements including transforming growth factor (TGF)- $\beta$  inhibitory element, activator protein-1 (AP-1), CLU-specific elements, and carbohydrate response element.

To get further inside on implication of CM in maintenance of inflammation, we studied the top biological functions in which CM obesity modulated genes are implicated. We found that cell signaling is the most modulated group of functions by obesity in the CM with a significant decreased activation of functions involved in immune cell recruitment, adhesion and migration. It shows that indeed CM are not responsible for the increased recruitment toward inflamed tissues, adhesion or migration of the other immune cells in obesity. Nevertheless, among the genes implicated in cell signaling over expression of CCR5 and FPR2 by obese-CM compare to lean-CM, indicate that the CM in obesity sustains the low-grade inflammation and could be involved in obesity-related cardiovascular diseases. Undeniably there are now more evidences showing that CCR5 is implicated in monocyte attraction toward inflamed tissues (21) (25) (37). Furthermore CCR5 has been reported to be an active participant in the late stage of atherosclerosis and has the potential as a prognostic biomarker for plaque stability (38). FPR2 is activated by the acute phase reactant serum amyloid A (SAA), a marker of adiposity-induced low-grade inflammation (39) (40). SAA along with CRP are used clinically as inflammatory markers. Some studies have shown that SAA levels increase with higher degrees of inflammation, even in some non-cardiovascular inflammatory conditions, whereas CRP levels remain normal (41). Thus, SAA is considered more sensitive and useful than CRP as a marker of acute inflammatory response (41) (42). It was determined that SAA could potentiate atherogenesis at a number of stages. 1/ SAA is chemotactic for neutrophils and monocytes. 2/ SAA-carrying LDL may have greater proteoglycan-binding affinity leading to increased retention. 3/ SAA stimulates the synthesis of biglycan and increases its binding affinity for LDL. 4/ SAA can stimulate the production of

other pro-inflammatory cytokines, exacerbating the vascular inflammation. 5/ SAA can induce matrix metalloproteinases (MMPs) that can lead to destabilization of the developing atherosclerotic plaque. Since SAA-1 allelic variant variant *via* FPR2 indirectly provokes monocyte chemotaxis by induction of cooperating CC and CXC chemokines (43) these new data suggest that SAA participate to the sustainability of obesity low-grade inflammation by interacting with the up-regulated receptor FPR2 at the surface of obese-CM. Furthermore, the significant increased activation of actin synthesis, a molecule involved in cell motility, by obese-CM consolidate the idea of an increased migratory potential of obese-CM. Interestingly among the gene participating to the increased activation of actin synthesis we found the insulin receptor, a key receptor in glucose metabolism, that is increased in obese-CM. Actually, this molecule is also implicated in function controlling the amount of glycogen together with IGF1, INPPL1, PDK4, RGL1, STK25, STK40 that are also modulated by obesity in CM.

Interestingly IM up-regulate with a very high magnitude a molecule (CISD1 or MitoNEET) that would make them actors of the organism protection against excess free fatty acid. A very complete work (24) performed on mouse models with altered adipocyte expression of mitoNEET shows that adipocyte overexpression of mitoNEET enhances lipid uptake and storage, leading to an expansion of the mass of adipose tissue. Nevertheless, despite the resulting massive obesity, benign aspects of adipose tissue expansion prevail, and insulin sensitivity is preserved. Mechanistically, they also found that mitoNEET inhibits mitochondrial iron transport into the matrix and, because iron is a rate-limiting component for electron transport, lowers the rate fatty acid degradation by  $\beta$ -oxidation. This effect is associated with lower mitochondrial membrane potential and lower levels of reactive oxygen species-induced damage, along with increased production of adiponectin. Conversely, a reduction in mitoNEET expression enhances mitochondrial respiratory capacity through enhanced iron content in the matrix, ultimately corresponding to less weight gain on a high-fat diet. However, this reduction in mitoNEET expression also causes heightened oxidative stress and glucose intolerance. They found similar effect exerted by mitoNEET in hepatocytes indicating a common effect of mitoNEET on cellular physiology in different tissue types. Our whole genome microarray analysis is the first one showing increased expression of mitoNEET by a specific cell type in the context of human obesity. This finding suggests an adaptation of IM to obesity by becoming able to store and neutralize excess free fatty acid.

In the same line among top biological functions in which IM obesity modulated genes are implicated we found decreased activation of release of glycerol. IM modulate also genes involved in increased activation of cell death of connective tissue, among those genes we showed a decreased expression of VEGFA and HIF1A, two pro-angiogenic factors. The Ingenuity Pathway analysis highlighted that their decreased expression could lead to fibrosis of adipose tissue. In non-pathological conditions IM are the pro-angiogenic monocytes (17) exhibiting features of senescent cells and increased capacity for endothelial adhesion (44). Our findings suggest that in the context of obesity IM phenotype is modified by the storage of excess free fatty acid and therefore could be precursors of tissue macrophages that produce less angiogenic factors, promote cell death of connective tissues and are pro-fibrotic. This hypothesis is supported by a recent work that compared transcriptomes of foamy and non-foamy macrophages that accumulate in the subcutaneous granulomas (induced by surgical sponge implantation) of fed-fat ApoE null mice and normal chow fed wild-type mice *in vivo*. Indeed, the results of this work show that foam cell formation *in vivo* leads to a pro-fibrotic macrophage phenotype (45).

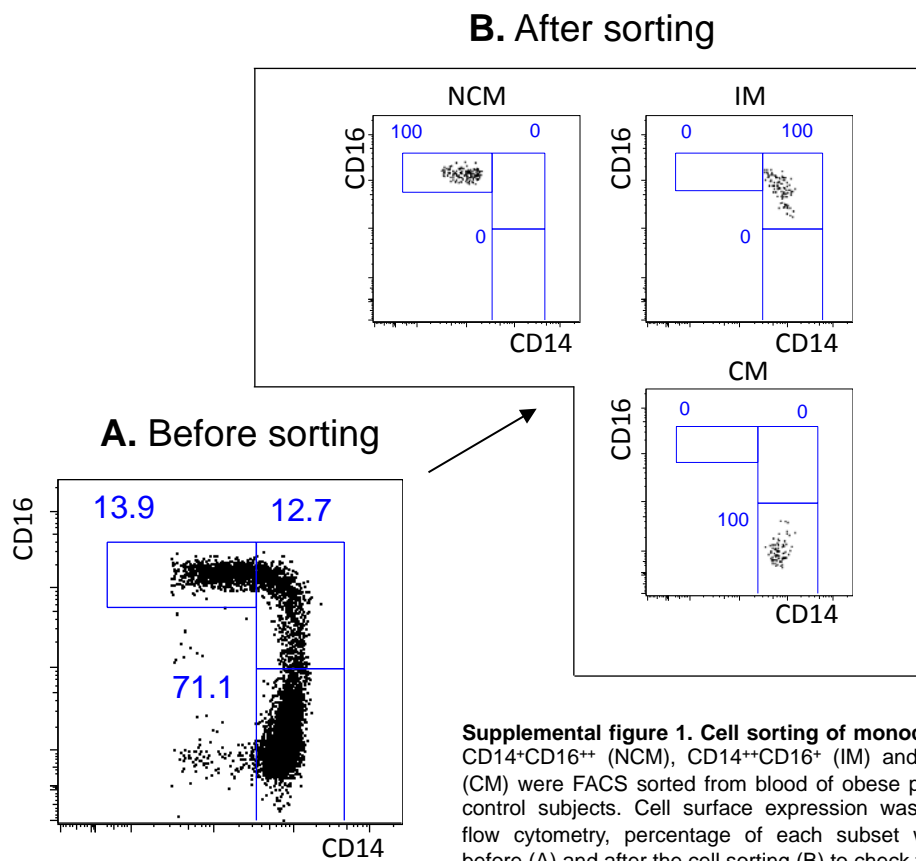
NCM top up-regulated genes included NF1 and PXN. Both are involved in processes of immune response, metabolism and response to stress. PXN is a cytoskeletal protein that is phosphorylated in response to LPS in monocyte and macrophages. It is involved in the reorganization of actin cytoskeleton driving motility upon monocyte/macrophage LPS stimulation (46) (47). Miller *et al.* (48) showed that minimal Low Density Lipoprotein (LDL) induces *via* TLR4, signaling events and cytoskeletal rearrangements leading to enhanced uptake of both native and oxidized LDL; resulting in intracellular lipid accumulation. Therefore the up-regulation of PXN by obese-NCM suggests that this specific subset of circulating monocytes can accumulate lipoproteins. With regard to NF1, it is implicated in controlling myeloid cell proliferation (49). A mutation in this gene cause a disease named Neurofibromatosis type 1 and one of its manifestation involves disorders of the cardiovascular system with increased circulating inflammatory monocytes and arterial occlusion; inactivation of NF1 in myeloid cells enhanced neointima formation. It has been shown using murine *in vivo* model and *in vitro* migration assays that NF1 deficient macrophages demonstrate enhance migration and proliferation in response to growth factor stimulation compare to wild type ones. This response is dependent on the RAS-ERK pathway (50). The increased expression of NF1 by obese-NCM could be a response to control the obesity related inflammation.

The analysis of the top biological functions in which NCM obesity modulated genes are implicated revealed that NCM modulate gene involved in carbohydrate and lipid metabolism and in hematological development. The detailed analysis of those genes suggests that obese-NCM would store less glycogen than lean ones. It also suggests that the modulated genes would lead to increased quantity of megakaryocytes, the cells responsible for the production of platelets and increased migration of dendritic cells. Among the genes involved in dendritic cells migration we found FPR2, a receptor activated by SAA that is also up-regulated by obese-CM. Showing that indeed both subsets are involved in sustaining obesity low grade inflammation. We also found up-regulation of the chemokine CXCL12. CXCL12 plays a critical role in monocyte extravasation and is expressed under homeostatic conditions at sites where resident macrophages are present, and is highly inducible in some pathologic conditions involving ischemia and/or hypoxia and in pro-angiogenic environments, such as tumors (51). It is secreted by monocytes that also express its receptors CXCR4 and CXCR7 which leads to an autocrine/paracrine loop that contributes to modulate differentiation of monocytes toward a distinct program with pro-angiogenic function and reduced functional ability to stimulate antigen-specific T-lymphocyte responses (52). Furthermore, it has been demonstrated that during obesity, adipocytes within human and mouse breast tissues recruit and activate macrophage, through a CCL2/IL-1 $\beta$ /CXCL12 signaling pathway (53). Finally, CXCL12 was identified as potential therapeutic target for atherosclerosis and thrombosis by genome-wide association studies (GWAS) (54). Therefore, targeting CXCL12 could be a possibility to reduce obesity related inflammation.

All together this study at the whole genome level confirms that indeed obesity modulate the transcriptome of monocytes and furthermore specific obesity related modulations occur within each monocyte subset. The obesity imprint on CM shows that they sustain obesity low-grade inflammation and that they could be involved in obesity-related cardiovascular diseases. The analysis of the IM obesity modulated genes suggests that circulating obese-IM could be able to store and neutralize excess free fatty acid and could give rise to pro-fibrotic macrophages within tissues. Obese-NCM modulate compare to lean ones genes involved in carbohydrate and lipid metabolism; their profile suggest that they could store less glycogen and the over-expression of PXN indicates that as well they could be able to accumulate lipoproteins. Obese-NCM could be responsible for an increased amount of megakaryocytes and an increase migration of dendritic cells. Finally, probably to control

inflammation, obese-IM and NCM up-regulate molecules, CISD1 and NF1, with protective functions against obesity comorbidities.

## Supplemental materials



APC-conjugated anti-CD14 (clone MfP9 from Becton Dickinson)
FITC-conjugated anti-CD16 (clone 3G8 from Becton Dickinson)
PE-conjugated anti-CCR2 (clone 48607 from Becton Dickinson)
PE-anti-CD19 (clone HIB19 from Becton Dickinson)
PE-conjugated anti-CD56 (clone B159 from Becton Dickinson)
Dead cell marker: 4',6-diamidino-2-phenylindole dilactate (DAPI) (Life technologies)

**Supplemental table 1.** list of antibodies used for of monocyte subset FACS sorting

Symbol	Gene Name	Location	Type(s)	Fold Change	Ratio OB vs C (fluorescent Signal Intensity)	p-value
BUB1	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase	Nucleus	kinase	-3,721	64,035	4,66E-02
EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	Other	translation regulator	-1,57	117,6	4,64E-02
FLT3LG	fms-related tyrosine kinase 3 ligand	Extracellular Space	cytokine	2,986	691,46	4,72E-02
INPPL1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1	Cytoplasm	phosphatase	2,041	2637,4	3,27E-02
LGALS2	lectin, galactoside-binding, soluble, 2	Cytoplasm	other	2,616	426,79	2,83E-02
LOC102723493	uncharacterized LOC102723493	Other	other	-2,568	16,412	1,59E-02
LOC145474	uncharacterized LOC145474	Other	other	-2,312	60,734	4,72E-02
ME1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	Cytoplasm	enzyme	-2,189	12,8	1,92E-02
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	Cytoplasm	kinase	2,607	1218,56	4,90E-02
PKD1L2	polycystic kidney disease 1-like 2 (gene/pseudogene)	Other	ion channel	-2,572	154,862	4,95E-02
SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	Extracellular Space	other	-2,995	169,911	4,06E-02
SYTL3	synaptotagmin-like 3	Cytoplasm	other	-2,703	582,28	4,27E-02
TMSB4Y	thymosin beta 4, Y-linked	Cytoplasm	other	-1,926	557,28	2,06E-02
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-1,754	24,66	1,66E-02

**Supplemental table 2.** List of obesity modulated genes shared by classical and intermediate monocyte subsets

Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)	Fold Change	Other	p-value
ARPIN/C15orf38-AP3S2	C15orf38-AP3S2 readthrough	Plasma Membrane	other	-3,609	48,261	2,26E-02
CCDC85C	coiled-coil domain containing 85C	Plasma Membrane	other	-4,915	138,771	3,76E-02
FAM220A	family with sequence similarity 220, member A	Other	other	6,6	238,255	3,89E-02
FPR2	formyl peptide receptor 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	1,706	276,5	1,06E-02
KLF6	Kruppel-like factor 6	Nucleus	transcription regulator	-2,175	69,768	2,55E-02
LOC101927043	uncharacterized LOC101927043	Other	other	-1,713	623,12	8,99E-03
MEPCE	methylphosphate capping enzyme	Other	enzyme	1,672	750,02	4,38E-02
MPDZ	multiple PDZ domain protein	Plasma Membrane	other	-1,78	10,908	1,73E-02
NRSN1	neurensin 1	Plasma Membrane	other	1,95	37,124	4,00E-02
POPDC2	popeye domain containing 2	Other	other	5,349	465,236	3,98E-02
STK40	serine/threonine kinase 40	Cytoplasm	kinase	2,294	1126,46	4,66E-02
TAF12	TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa	Nucleus	transcription regulator	2,831	301,872	2,82E-02
ZNF326	zinc finger protein 326	Nucleus	transcription regulator	-3,833	49,07	1,96E-02
ZNF618	zinc finger protein 618	Other	other	3,633	137,372	3,55E-02

**Supplemental table 3.** List of obesity modulated genes shared by classical and non classical monocyte subsets

Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)	Fold Change	Other	p-value
ACTR5	ARP5 actin-related protein 5 homolog (yeast)	Other	other	-2,43	366,68	4,01E-02
ANKRD26	ankyrin repeat domain 26	Nucleus	transcription regulator	4,867	29,361	7,17E-03
ASF1A	anti-silencing function 1A histone chaperone	Nucleus	other	-2,883	36,507	3,39E-02
C10orf111	chromosome 10 open reading frame 111	Other	other	-1,9	17,759	4,81E-02
DUX4L9	double homeobox 4 like 9	Nucleus	other	2,094	297,32	1,67E-02
EIF3C	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C	Other	translation regulator	-1,611	2380	1,55E-02
FBXO42	F-box protein 42	Other	other	-4,76	160,527	2,49E-02
GSG2	germ cell associated 2 (haspin)	Nucleus	kinase	-3,867	162,633	4,80E-02
HOMER3	homer scaffolding protein 3	Plasma Membrane	other	3,99	123,936	2,68E-02
IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	Plasma Membrane	transmembrane receptor	5,94	23,199	3,51E-02
LOC158402	uncharacterized LOC158402	Other	other	-1,827	557,78	4,96E-02
LOC729083	uncharacterized LOC729083	Other	other	5,761	1512,86	3,31E-02
MED8	mediator complex subunit 8	Nucleus	other	-5,025	324,15	1,89E-02
NAA38	N(alpha)-acetyltransferase 38, NatC auxiliary subunit	Nucleus	other	3,974	264,1	3,24E-02
NPPB	natriuretic peptide B	Extracellular Space	other	-1,764	24,3	4,78E-02
PAAF1	proteasomal ATPase-associated factor 1	Other	other	3,57	140,852	2,55E-02
PRDM15	PR domain containing 15	Nucleus	other	-2,078	184,686	4,64E-02
RNF139	ring finger protein 139	Cytoplasm	enzyme	-2,825	30,969	3,41E-02
RPS6KA4	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 4	Cytoplasm	kinase	-3,443	202,862	3,43E-02
SARS	seryl-tRNA synthetase	Cytoplasm	enzyme	-1,822	74,112	4,73E-02
SCARNA22	small Cajal body-specific RNA 22	Other	other	1,799	23,872	8,24E-03
SLC10A3	solute carrier family 10, member 3	Plasma Membrane	transporter	3,848	119,756	1,89E-02
SRP14-AS1	SRP14 antisense RNA1 (head to head)	Other	other	2,532	49,139	4,93E-02
TSPAN16	tetraspanin 16	Other	other	-4,171	946,82	2,44E-03

**Supplemental table 4.** List of obesity modulated genes shared by intermediate and non classical monocyte subsets



**Supplemental table 5.** Complete list of gene modulated by obese classical monocyte compared to lean control classical monocyte. Other = ratio MFI obese vs control. D = duplicate.

Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)	Fold Change	Other	p-value	Notes
CLU	clusterin	Cytoplasm	other	114,888	780,745	3,86E-04	
FAM90A1	family with sequence similarity 90, member A1	Other	other	63,335	736,827	9,16E-03	
PEX11G	peroxisomal biogenesis factor 11 gamma	Cytoplasm	other	51,642	443,826	1,52E-02	
UBE3D	ubiquitin protein ligase E3D	Other	other	46,153	167,265	1,06E-02	
PLXNA2	plexin A2	Plasma Membrane	transmembrane receptor	37,967	106,65	8,68E-03	
WDR35	WD repeat domain 35	Cytoplasm	other	33,171	96,945	5,41E-03	
PINLYP	phospholipase A2 inhibitor and LY6/PLAUR domain containing	Other	other	31,263	502,91	1,96E-02	
FBLIM1	filamin binding LIM protein 1	Plasma Membrane	other	30,31	90,45	5,56E-03	
ZNF699	zinc finger protein 699	Other	other	29,905	96,694	6,46E-03	
CFAP45	cilia and flagella associated protein 45	Nucleus	other	23,977	580,592	1,72E-03	
SLC22A16	solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 16	Plasma Membrane	transporter	23,968	1218,45	8,96E-03	
ACSF2	acyl-CoA synthetase family member 2	Cytoplasm	enzyme	20,535	729,381	2,02E-02	
SUPT3H	suppressor of Ty 3 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	transcription regulator	17,993	126,39	3,18E-02	
BTG3	BTG family, member 3	Nucleus	other	15,957	256,27	5,50E-03	
VWA9	von Willebrand factor A domain containing 9	Cytoplasm	other	13,548	869,6	6,10E-04	
PLCD1	phospholipase C, delta 1	Cytoplasm	enzyme	12,839	356,482	3,81E-02	
ZC2HC1A	zinc finger, C2HC-type containing 1A	Other	other	12,57	118,135	1,05E-03	
TAF12	TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa	Nucleus	transcription regulator	11,682	408,643	3,07E-03	
POPDC2	popeye domain containing 2	Other	other	11,236	198,025	2,80E-02	
LINC01011	long intergenic non-protein coding RNA 1011	Other	other	10,662	366,726	6,57E-03	
NACC1	nucleus accumbens associated 1, BEN and BTB (POZ) domain containing	Nucleus	transcription regulator	10,333	846,847	2,95E-02	
CRYGS	crystallin, gamma S	Other	other	10,039	577,819	2,85E-02	
DPM2	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit	Cytoplasm	enzyme	9,994	529,27	2,07E-02	
CCDC23	coiled-coil domain containing 23	Other	other	9,968	147,223	4,74E-02	
KREMEN1	kringle containing transmembrane protein 1	Plasma Membrane	other	9,939	210,118	4,87E-02	
UBE2J2	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2	Cytoplasm	enzyme	9,784	74,43	1,00E-02	
DUSP23	dual specificity phosphatase 23	Cytoplasm	phosphatase	9,638	1123,715	4,40E-02	
FAM90A20P (includes others)	putative protein FAM90A20	Other	other	8,808	401,65	4,52E-02	
C5orf28	chromosome 5 open reading frame 28	Other	other	8,46	160,372	2,96E-02	
EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	Nucleus	transcription regulator	8,409	35,9	4,01E-02	
RFX7	regulatory factor X, 7	Other	other	8,125	95,448	1,51E-02	
KCNJ15	potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 15	Plasma Membrane	ion channel	7,929	84,665	3,48E-02	
RTP4	receptor (chemosensory) transporter protein 4	Plasma Membrane	other	7,685	125,753	2,16E-02	
YIPF3	Yip1 domain family, member 3	Cytoplasm	other	7,605	764,195	2,48E-02	
YIPF3	Yip1 domain family, member 3	Cytoplasm	other	7,605	764,195	2,48E-02	
ZAK	sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK	Cytoplasm	kinase	7,301	381,631	4,75E-02	
PHTF1	putative homeodomain transcription factor 1	Nucleus	transcription regulator	7,06	45,435	5,47E-03	
IFI27L2	interferon, alpha-inducible protein 27-like 2	Other	other	6,744	5120,92	4,82E-02	
PGAP3	post-GPI attachment to proteins 3	Cytoplasm	enzyme	6,496	649,168	5,38E-03	
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	Nucleus	enzyme	6,491	77,25	4,04E-02	
POLR2I	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide I, 14.5kDa	Nucleus	transcription regulator	6,458	1061,525	4,96E-02	
CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5 (gene/pseudogene)	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	6,42	142,466	1,24E-03	
PGRMC1	progesterone receptor membrane component 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor	6,3	459,095	3,75E-02	
MXD4	MAX dimerization protein 4	Nucleus	transcription regulator	6,202	92,5	4,51E-02	
L3MBTL4	l(3)mbt-like 4 (Drosophila)	Other	other	6,096	62,667	4,17E-02	
ZNF32	zinc finger protein 32	Nucleus	other	6,089	352,477	7,00E-03	
NCLN	nicalin	Cytoplasm	peptidase	5,766	570,763	2,57E-02	
GABPB1	GA binding protein transcription factor, beta subunit 1	Nucleus	transcription regulator	5,715	407,117	4,18E-02	
MGAT5	mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	Cytoplasm	enzyme	5,564	65,491	3,08E-02	
LOC643549	uncharacterized LOC643549	Other	other	5,543	115,861	2,02E-02	
ZNF790	zinc finger protein 790	Other	other	5,48	22,736	2,95E-02	
SDS	serine dehydratase	Cytoplasm	enzyme	5,478	388,884	1,17E-02	
FSD1L	fibronectin type III and SPRY domain containing 1-like	Other	other	5,46	128,65	3,46E-02	
TBC1D25	TBC1 domain family, member 25	Other	other	5,46	226,92	1,07E-02	
CS	citrate synthase	Cytoplasm	enzyme	5,308	52,078	4,81E-02	
JAGN1	jagunal homolog 1 (Drosophila)	Cytoplasm	other	5,212	455,664	4,65E-02	
UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	Cytoplasm	enzyme	5,177	283,956	3,56E-02	
RSPH4A	radial spoke head 4 homolog A (Chlamydomonas)	Nucleus	other	4,987	63,714	9,43E-03	D
STK26	serine/threonine protein kinase 26	Nucleus	kinase	4,795	130,818	4,51E-02	
AKAP8	A kinase (PRKA) anchor protein 8	Nucleus	other	4,782	1061,038	2,78E-02	
TRAPPC2L	trafficking protein particle complex 2-like	Cytoplasm	other	4,594	1997,954	4,24E-02	
INSR	insulin receptor	Plasma Membrane	kinase	4,531	635,574	5,78E-03	
EFNA4	ephrin-A4	Plasma Membrane	kinase	4,502	1722,86	9,36E-03	
HIST1H2BG	histone cluster 1, H2bg	Nucleus	other	4,5	1299,66	9,31E-03	
SMAD1	SMAD family member 1	Nucleus	transcription regulator	4,422	40,596	1,85E-02	
FAM220A	family with sequence similarity 220, member A	Other	other	4,414	317,57	3,75E-02	
EIF3J-AS1	EIF3J antisense RNA 1 (head to head)	Other	other	4,379	978,837	2,87E-02	
VAT1	vesicle amine transport 1	Plasma Membrane	transporter	4,367	682,018	2,48E-02	
COG8	component of oligomeric golgi complex 8	Cytoplasm	transporter	4,346	1988,68	6,87E-03	D
SCAPER	S-phase cyclin A-associated protein in the ER	Extracellular Space	other	4,246	71,907	3,86E-02	
MEI1	meiosis inhibitor 1	Other	other	4,185	988,956	1,73E-02	
MRPL34	mitochondrial ribosomal protein L34	Cytoplasm	other	4,152	1233,166	2,12E-02	
ADIRF-AS1	ADIRF antisense RNA 1	Other	other	4,127	251,892	2,82E-02	

MAK16	MAK16 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	other	4,12	186,076	3,54E-02
MAGOHB	mago-nashi homolog B (Drosophila)	Nucleus	other	4,083	131,849	3,03E-02
ST7	suppression of tumorigenicity 7	Other	other	4,078	40,225	2,38E-02
RBAK	RB-associated KRAB zinc finger	Nucleus	transcription regulator	4,019	121,782	4,27E-02
PTTG2	pituitary tumor-transforming 2	Cytoplasm	other	3,964	165,694	1,75E-02
ZNF419	zinc finger protein 419	Nucleus	other	3,945	52,852	4,70E-02
GYG1	glycogenin 1	Cytoplasm	enzyme	3,867	555,064	3,58E-02
STK25	serine/threonine kinase 25	Cytoplasm	kinase	3,825	1892,16	2,84E-02
HMGXB4	HMG box domain containing 4	Nucleus	other	3,811	166,81	3,27E-02
PGBD1	piggyBac transposable element derived 1	Extracellular Space	enzyme	3,76	171,384	2,69E-02
TIMM44	translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog (yeast)	Cytoplasm	transporter	3,729	207,36	1,19E-02
ATAT1	alpha tubulin acetyltransferase 1	Cytoplasm	enzyme	3,671	99,226	6,68E-03
CARD9	caspase recruitment domain family, member 9	Cytoplasm	other	3,662	1454,134	4,11E-02
EPOR	erythropoietin receptor	Plasma Membrane	transmembrane receptor	3,662	392,404	3,68E-02
ACADSB	acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain	Cytoplasm	enzyme	3,658	138,34	3,84E-02
FPGT	fuco-1-phosphate guanylyltransferase	Cytoplasm	enzyme	3,622	148,57	3,13E-02
TXLNA	taxilin alpha	Extracellular Space	cytokine	3,618	63,334	2,82E-02
PCBD1	pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha	Nucleus	transcription regulator	3,601	782,492	2,51E-02
ERLEC1	endoplasmic reticulum lectin 1	Cytoplasm	other	3,599	77,48	1,32E-02
LGALS2	lectin, galactoside-binding, soluble, 2	Cytoplasm	other	3,594	2226,2	2,64E-02
BCAS3	breast carcinoma amplified sequence 3	Nucleus	other	3,577	1046,54	3,59E-02
TRAPPC2	trafficking protein particle complex 2	Cytoplasm	other	3,55	321,408	4,48E-02
ZNF783	zinc finger family member 783	Other	other	3,517	27,707	1,47E-02
UCK2	uridine-cytidine kinase 2	Cytoplasm	kinase	3,492	199,698	4,11E-02
PEX1	peroxisomal biogenesis factor 1	Cytoplasm	enzyme	3,439	847,57	3,54E-02
SCNM1	sodium channel modifier 1	Nucleus	other	3,387	2036,92	4,73E-02
PLCD4	phospholipase C, delta 4	Cytoplasm	enzyme	3,379	217,508	4,45E-02
EXOSC1	exosome component 1	Nucleus	enzyme	3,377	1326,46	3,93E-02
MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	Nucleus	other	3,36	47,214	3,00E-02
CHRNB1	cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)	Plasma Membrane	transmembrane receptor	3,348	330,242	4,08E-02
ADCY4	adenylate cyclase 4	Plasma Membrane	enzyme	3,347	729,34	1,90E-02
HIST1H2BC	histone cluster 1, H2bc	Nucleus	other	3,337	1598,4	4,13E-02
COQ5	coenzyme Q5 homolog, methyltransferase (S. cerevisiae)	Cytoplasm	enzyme	3,301	499,644	3,96E-02
NSUN6	NOP2/Sun domain family, member 6	Other	enzyme	3,298	545,78	3,95E-02
PODXL	podocalyxin-like	Plasma Membrane	kinase	3,285	253,598	3,47E-02
H2AFJ	H2A histone family, member J	Cytoplasm	other	3,284	480,618	4,44E-02
PIK3R4	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4	Cytoplasm	kinase	3,275	617,58	4,43E-02
RAD1	RAD1 checkpoint DNA exonuclease	Nucleus	enzyme	3,275	272,622	2,57E-02
UBE2O	ubiquitin-conjugating enzyme E2O	Nucleus	enzyme	3,251	530,534	2,25E-02
SAP130	Sin3A-associated protein, 130kDa	Nucleus	transcription regulator	3,236	653,54	3,64E-02
ELMO1	engulfment and cell motility 1	Cytoplasm	other	3,221	596,552	3,05E-02
SESN3	sestrin 3	Extracellular Space	other	3,194	178,2	8,95E-03
CMTR1	cap methyltransferase 1	Nucleus	enzyme	3,174	675,22	1,13E-02
C17orf89	chromosome 17 open reading frame 89	Cytoplasm	other	3,173	865,62	2,36E-02
DHFR1	dihydrofolate reductase-like 1	Cytoplasm	enzyme	3,166	24,272	1,87E-02
DHX58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	Cytoplasm	enzyme	3,162	1021,3	4,52E-02
RNF8	ring finger protein 8, E3 ubiquitin protein ligase	Nucleus	enzyme	3,154	329,058	4,75E-02
ORMDL3	ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 3	Cytoplasm	other	3,145	1511,56	4,71E-02
FAM65A	family with sequence similarity 65, member A	Cytoplasm	other	3,127	1093,42	4,02E-02
TUBA4A	tubulin, alpha 4a	Cytoplasm	other	3,118	1052,52	6,04E-03
MIEN1	migration and invasion enhancer 1	Cytoplasm	other	3,113	446,968	1,57E-02
mir-1247	microRNA 1247	Cytoplasm	microRNA	3,092	38,738	3,07E-03
HIST1H2BK	histone cluster 1, H2bk	Nucleus	other	3,064	2656,4	1,27E-02
LOC145474	uncharacterized LOC145474	Other	other	3,06	219,97	4,85E-02
WDR92	WD repeat domain 92	Other	other	3,055	302,478	2,73E-02
DTWD1	DTW domain containing 1	Other	other	3,05	168,154	1,12E-02
CST3	cystatin C	Extracellular Space	other	3,033	106,411	3,83E-02
CST3	cystatin C	Extracellular Space	other	3,033	106,411	3,83E-02
BBIP1	BBSome interacting protein 1	Cytoplasm	other	3,003	312,028	4,78E-02
TTC31	tetratricopeptide repeat domain 31	Other	other	3,001	1218,92	4,81E-03
PSMD5-AS1	PSMD5 antisense RNA 1 (head to head)	Other	other	3	176,878	4,83E-02
ZSCAN5A	zinc finger and SCAN domain containing 5A	Nucleus	transcription regulator	3	596,4	1,05E-02
AAK1	AP2 associated kinase 1	Cytoplasm	kinase	2,999	752,22	4,35E-02
POLR3K	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K, 12.3 kDa	Nucleus	transcription regulator	2,996	1102,6	4,64E-02
ARHGAP35	Rho GTPase activating protein 35	Nucleus	transcription regulator	2,97	216,35	8,73E-03
NDST1	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1	Cytoplasm	enzyme	2,954	302,14	3,17E-02
FAM195B	family with sequence similarity 195, member B	Other	other	2,952	1195,12	3,42E-02
TM9SF1	transmembrane 9 superfamily member 1	Plasma Membrane	transporter	2,947	523,668	2,90E-02
VDAC3	voltage-dependent anion channel 3	Cytoplasm	ion channel	2,927	1532,92	2,03E-02
CFLAR-AS1	CFLAR antisense RNA 1	Other	other	2,919	104,118	2,44E-02
YIF1A	Yip1 interacting factor homolog A (S. cerevisiae)	Cytoplasm	other	2,9	258,636	4,16E-02
GCDH	glutaryl-CoA dehydrogenase	Cytoplasm	enzyme	2,899	991,44	4,27E-02
RFC5	replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa	Nucleus	enzyme	2,855	150,636	2,73E-03
ZNF222	zinc finger protein 222	Nucleus	other	2,83	42,436	1,29E-02
C17orf89	chromosome 17 open reading frame 89	Cytoplasm	other	2,821	991,5	4,34E-02
BCL2A1	BCL2-related protein A1	Cytoplasm	other	2,814	1297,9	1,37E-02
WDSUB1	WD repeat, sterile alpha motif and U-box domain containing 1	Other	other	2,81	235,582	9,05E-03

PHF12	PHD finger protein 12	Nucleus	transcription regulator	2,803	26,584	9.58E-03
H1FOO	H1 histone family, member O, oocyte-specific	Nucleus	other	2,732	255.72	9.16E-03
HELZ2	helicase with zinc finger 2, transcriptional coactivator	Nucleus	transcription regulator	2,714	185,078	2.35E-02
ZYG11B	zyg-11 family member B, cell cycle regulator	Other	other	2,708	57.06	3.53E-02
BLOC155	biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 5, muted	Extracellular Space	other	2,707	567.5	3.46E-02
ME1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	Cytoplasm	enzyme	2,68	26,516	1.41E-02
IGKV1D-8	immunoglobulin kappa variable 1D-8	Other	other	2,679	24,447	2.54E-02
PROK2	prokinectin 2	Extracellular Space	other	2,652	22,141	2.89E-02
ZNF580	zinc finger protein 580	Nucleus	other	2,648	1876.62	1.14E-02
ZCCHC14	zinc finger, CCHC domain containing 14	Other	other	2,645	68,158	1.13E-02
LIMK2	LIM domain kinase 2	Cytoplasm	kinase	2,628	832.2	7.90E-03
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	Cytoplasm	enzyme	2,628	379.76	3.86E-02
SMNDC1	survival motor neuron domain containing 1	Nucleus	other	2,625	144,418	4.20E-02
CBX7	chromobox homolog 7	Nucleus	other	2,616	2556.66	4.49E-02
HIST1H2BI	histone cluster 1, H2bi	Nucleus	other	2,602	1172.98	1.86E-02
DCBLD1	discoidin, CUB and LCCL domain containing 1	Extracellular Space	other	2,575	187.76	2.69E-02
NPFF	neuropeptide FF-amide peptide precursor	Extracellular Space	other	2,565	267,498	1.97E-02
TLR7	toll-like receptor 7	Plasma Membrane	transmembrane receptor	2,547	1054.78	2.41E-02
TMEM50B	transmembrane protein 50B	Plasma Membrane	other	2,543	249.02	3.42E-02
TMEM161B	transmembrane protein 161B	Other	other	2,542	332.7	3.24E-02
RBM33	RNA binding motif protein 33	Other	other	2,538	82,572	4.10E-02
CBFA2T3	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3	Nucleus	transcription regulator	2,536	1854.58	7.58E-03
MXRA8	matrix-remodelling associated 8	Other	other	2,521	230.9	3.11E-04
SLC24A1	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 1	Plasma Membrane	transporter	2,487	1061.46	2.91E-02
RPS21	ribosomal protein S21	Cytoplasm	other	2,462	17482.8	4.95E-02
NME1	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1	Cytoplasm	kinase	2,445	1071.78	4.60E-02
STK40	serine/threonine kinase 40	Cytoplasm	kinase	2,433	729.96	2.40E-02
ORMDL2	ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 2	Cytoplasm	other	2,429	356,422	3.95E-02
LY96	lymphocyte antigen 96	Plasma Membrane	transmembrane receptor	2,411	224.53	1.98E-02
POP5	processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP subunit (S. cerevisiae)	Nucleus	enzyme	2,411	338.9	1.46E-02
SPATA13	spermatogenesis associated 13	Plasma Membrane	other	2,398	981.52	3.63E-02
RBM5	RNA binding motif protein 5	Nucleus	other	2,379	3010	2.88E-02
SPICE1	spindle and centriole associated protein 1	Cytoplasm	other	2,376	17,668	3.08E-02
FPR2	formyl peptide receptor 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	2,374	678.34	4.29E-02
OR7E47P	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 47 pseudogene	Other	other	2,365	106.26	4.15E-02
OR7E47P	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 47 pseudogene	Other	other	2,365	106.26	4.15E-02
FBXL12	F-box and leucine-rich repeat protein 12	Cytoplasm	other	2,364	1438.3	3.73E-02
C2orf74	chromosome 2 open reading frame 74	Other	other	2,362	1939.72	6.91E-03
NAV1	neuron navigator 1	Other	enzyme	2,346	345.16	6.27E-03
MAVS	mitochondrial antiviral signaling protein	Cytoplasm	other	2,342	225,532	1.93E-02
RASGRP2	RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)	Cytoplasm	other	2,336	3476	3.91E-02
IREB2	iron-responsive element binding protein 2	Cytoplasm	translation regulator	2,333	186,134	3.24E-02
LRRRC71	leucine rich repeat containing 71	Other	other	2,333	797.12	6.77E-03
SSH2	slingshot protein phosphatase 2	Cytoplasm	phosphatase	2,331	83,386	4.02E-02
C1orf109	chromosome 1 open reading frame 109	Other	other	2,303	238,846	2.77E-02
UNC50	unc-50 homolog (C. elegans)	Cytoplasm	other	2,302	457.38	2.61E-02
DYNLRB1	dynein, light chain, roadblock-type 1	Cytoplasm	other	2,28	5968.4	4.17E-02
ENC1	ectodermal-neural cortex 1 (with BTB domain)	Nucleus	peptidase	2,274	235.64	4.30E-02
GEMIN7	gem (nuclear organelle) associated protein 7	Nucleus	other	2,267	879.18	8.38E-03
PKD4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	Cytoplasm	kinase	2,265	636.98	1.11E-02
DOK1	docking protein 1, 62kDa (downstream of tyrosine kinase 1)	Plasma Membrane	kinase	2,249	800.68	4.59E-02
HEXIM1	hexamethylene bis-acetamide inducible 1	Nucleus	transcription regulator	2,248	417.8	3.68E-02
UPP1	uridine phosphorylase 1	Cytoplasm	enzyme	2,244	2846.4	2.10E-02
ELK3	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	Nucleus	transcription regulator	2,233	181,488	2.62E-02
DEF8	differentially expressed in FDCP 8 homolog (mouse)	Other	other	2,224	1094.74	2.00E-02
ZBTB44	zinc finger and BTB domain containing 44	Other	other	2,211	586.62	4.20E-02
MAVS	mitochondrial antiviral signaling protein	Cytoplasm	other	2,159	236,152	2.49E-02
INPPL1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1	Cytoplasm	phosphatase	2,148	3808.4	3.18E-02
SF3B3	splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa	Nucleus	other	2,123	1551.2	3.10E-02
MEPCE	methylphosphate capping enzyme	Other	enzyme	2,108	977.66	1.19E-02
UBXN8	UBX domain protein 8	Cytoplasm	other	2,107	45,756	2.07E-02
RPGR	retinitis pigmentosa GTPase regulator	Cytoplasm	other	2,083	562.02	2.90E-02
SNX11	sorting nexin 11	Cytoplasm	transporter	2,081	1953.4	4.18E-02
OBFC1	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 1	Nucleus	other	2,077	504.36	2.29E-03
SPRTN	SprT-like N-terminal domain	Nucleus	other	2,064	170.46	4.97E-02
RNF38	ring finger protein 38	Nucleus	enzyme	2,063	522.92	4.23E-02
SELT	selenoprotein T	Cytoplasm	other	2,059	640.3	4.64E-02
PLAC8	placenta-specific 8	Nucleus	other	2,052	5049	1.54E-02
DHX16	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16	Nucleus	enzyme	2,046	1480.58	2.56E-02
TMBIM4	transmembrane BAX inhibitor motif containing 4	Nucleus	other	2,031	300.24	4.77E-02
CPNE2	copine II	Cytoplasm	other	1,992	725.62	4.63E-02
RPA2	replication protein A2, 32kDa	Nucleus	other	1,988	1589.9	4.34E-02
HEXA	hexosaminidase A (alpha polypeptide)	Cytoplasm	enzyme	1,984	3922	2.84E-02
CRYBB2	crystallin, beta B2	Other	other	1,979	409.58	2.55E-02
SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	Nucleus	transcription regulator	1,979	1046.88	5.72E-03
ZFP91	ZFP91 zinc finger protein	Nucleus	transcription regulator	1,964	1602.4	3.89E-02
CFD	complement factor D (adipsin)	Extracellular Space	peptidase	1,951	1597.4	3.22E-02

JMJD1C	jumonji domain containing 1C	Nucleus	other	1,939	955.04	4.73E-02
LRRC25	leucine rich repeat containing 25	Other	other	1,939	1291.16	3.54E-02
VSIG8	V-set and immunoglobulin domain containing 8	Other	other	1,927	484.08	4.84E-02
MED7	mediator complex subunit 7	Nucleus	transcription regulator	1,917	237.34	1.91E-03
LOC101929450	uncharacterized LOC101929450	Other	other	1,908	18,862	2.08E-02
SLCO3A1	solute carrier organic anion transporter family, member 3A1	Plasma Membrane	transporter	1.9	734.14	3.60E-02
RNGTT	RNA guanylyltransferase and 5'-phosphatase	Nucleus	phosphatase	1,895	198	1.90E-04
HIST1H2AJ	histone cluster 1, H2aj	Nucleus	other	1,892	920.78	1.99E-02
DHPS	deoxyhypusine synthase	Cytoplasm	enzyme	1,878	3765.6	3.22E-02
NRGN	neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)	Other	other	1,877	3550	1.46E-02
B9D2	B9 protein domain 2	Cytoplasm	other	1,873	196.72	4.93E-02
SGSM2	small G protein signaling modulator 2	Cytoplasm	other	1,868	394.52	4.95E-02
TMEM50A	transmembrane protein 50A	Plasma Membrane	other	1,866	1396.22	1.67E-02
RNF34	ring finger protein 34, E3 ubiquitin protein ligase	Cytoplasm	enzyme	1,859	555.48	5.22E-03
MTF2	metal response element binding transcription factor 2	Nucleus	transcription regulator	1,849	989.4	7.25E-03
NAGK	N-acetylglucosamine kinase	Cytoplasm	kinase	1,814	9486.6	2.42E-02
PSMD10	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10	Cytoplasm	transcription regulator	1,804	897.68	3.48E-02
RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like	Cytoplasm	other	1,785	336.06	1.69E-02
OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	Cytoplasm	enzyme	1,766	1461.8	7.83E-03
WHSC1L1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1	Nucleus	enzyme	1,756	2367.6	4.97E-02
RRAS	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	Cytoplasm	enzyme	1,755	889.14	1.63E-02
SLC43A3	solute carrier family 43, member 3	Extracellular Space	other	1,727	1698.2	3.73E-02
GLDC	glycine dehydrogenase (decarboxylating)	Cytoplasm	enzyme	1,726	15,208	2.96E-02
PDSS1	prenyl (decaprenyl) diphosphate synthase, subunit 1	Cytoplasm	enzyme	1,713	320.86	4.06E-02
ZCCHC14	zinc finger, CCHC domain containing 14	Other	other	1,708	192.58	4.19E-02
SYTL3	synaptotagmin-like 3	Cytoplasm	other	1,706	1294	4.34E-02
RPRD2	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2	Other	other	1,699	45,258	3.58E-02
UBE2E1	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1	Cytoplasm	enzyme	1,691	664.98	3.92E-02
ZBTB20	zinc finger and BTB domain containing 20	Nucleus	other	1,681	78,664	2.02E-03
PRPF39	pre-mRNA processing factor 39	Nucleus	other	1,679	142.7	4.89E-02
SIGLEC16	sialic acid binding Ig-like lectin 16 (gene/pseudogene)	Plasma Membrane	other	1,656	340.38	3.01E-02
COX4I1	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	Cytoplasm	enzyme	1,653	1383	4.15E-02
STK38	serine/threonine kinase 38	Nucleus	kinase	1,652	911.52	2.63E-02
TRAF3IP3	TRAF3 interacting protein 3	Other	other	1,648	413.6	1.15E-02
IL15RA	interleukin 15 receptor, alpha	Plasma Membrane	transmembrane receptor	1,632	372.3	2.23E-02
HIF1AN	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit inhibitor	Nucleus	enzyme	1,609	779.3	2.13E-02
PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein	Cytoplasm	enzyme	1,591	103.2	4.01E-02
TEP1	telomerase-associated protein 1	Nucleus	enzyme	1,59	272	3.46E-02
EPHB4	EPH receptor B4	Plasma Membrane	kinase	1,587	12,494	1.84E-02
SPIDR	scaffolding protein involved in DNA repair	Nucleus	other	1,584	4242.6	1.60E-02
POP1	processing of precursor 1, ribonuclease P/MRP subunit (S. cerevisiae)	Nucleus	enzyme	1,57	77.24	4.77E-02
GLUD2	glutamate dehydrogenase 2	Cytoplasm	enzyme	1,566	1658	1.81E-02
PRMT2	protein arginine methyltransferase 2	Nucleus	enzyme	1,562	4954.6	2.28E-02
OR7E12P	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 12 pseudogene	Other	other	1,558	187.86	2.79E-02
RHOC	ras homolog family member C	Plasma Membrane	enzyme	1,536	955.8	2.73E-02
ACAA1	acetyl-CoA acyltransferase 1	Cytoplasm	enzyme	1,524	2758.6	4.79E-02
NEK4	NIMA-related kinase 4	Nucleus	kinase	1,523	956.6	3.91E-02

Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)	Fold Change	Other	p-value	Notes
C10orf113	chromosome 10 open reading frame 113	Other	other	-40,351	173,302	1.16E-02	
CCDC85C	coiled-coil domain containing 85C	Plasma Membrane	other	-23,888	267,723	3.44E-04	
PGBD4	piggyBac transposable element derived 4	Other	other	-17,889	58,343	5.66E-05	
BCKDHB	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide	Cytoplasm	enzyme	-17,335	327,976	1.92E-02	
LINC00954	long intergenic non-protein coding RNA 954	Other	other	-16,335	222,333	2.65E-02	
ZP3	zona pellucida glycoprotein 3 (sperm receptor)	Extracellular Space	transporter	-15,297	225,786	7.55E-04	
TRIM65	tripartite motif containing 65	Other	other	-13,929	117.26	1.31E-03	
SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	Extracellular Space	other	-13,412	129,006	2.48E-02	
ARMCX5	armadillo repeat containing, X-linked 5	Other	other	-12,88	57,631	3.25E-02	
LOC100128079	uncharacterized LOC100128079	Other	other	-11,378	195,154	1.99E-02	
LOC642423/LOC727751	golgin A2 pseudogene	Other	other	-11,245	662,916	2.54E-02	
CYHR1	cysteine/histidine-rich 1	Nucleus	other	-10,408	66,038	3.41E-02	
C5orf63	chromosome 5 open reading frame 63	Cytoplasm	other	-9,237	46,715	3.62E-03	
RAPGEFL1	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF)-like 1	Other	other	-8,71	81,516	2.51E-02	
PSMG4	proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 4	Other	transcription regulator	-8,605	114,922	7.25E-03	
RDH12	retinol dehydrogenase 12 (all-trans/9-cis/11-cis)	Cytoplasm	enzyme	-8,427	111,168	3.64E-02	
LINC01530	long intergenic non-protein coding RNA 1530	Other	other	-8,265	298,288	2.12E-02	
C9orf41	chromosome 9 open reading frame 41	Other	other	-8,023	185,635	4.53E-03	
ALKBH8	alkB, alkylation repair homolog 8 (E. coli)	Cytoplasm	enzyme	-7,473	443,379	3.06E-02	
PEMT	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	Cytoplasm	enzyme	-7,001	560,638	4.73E-02	
LINC00869	long intergenic non-protein coding RNA 869	Other	other	-6,894	154,656	2.79E-02	
GATA1	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)	Nucleus	transcription regulator	-6,889	66,576	4.31E-02	
SMIM13	small integral membrane protein 13	Other	other	-6,821	30,279	4.58E-02	
FAM189B	family with sequence similarity 189, member B	Other	other	-6,712	520,456	1.01E-02	
UVRAG	UV radiation resistance associated	Nucleus	other	-6,663	27,342	2.21E-02	
FAM110C	family with sequence similarity 110, member C	Cytoplasm	other	-6,244	137,982	1.35E-02	
SNORA2A	small nucleolar RNA, H/ACA box 2A	Other	other	-6,239	107,173	1.26E-02	

EGOT	eosinophil granule ontogeny transcript (non-protein coding)	Other	other	-6,209	63,301	2,47E-02
TMC8	transmembrane channel-like 8	Cytoplasm	other	-6,203	1276,212	5,27E-03
RPS14	ribosomal protein S14	Cytoplasm	translation regulator	-6,2	781,361	3,28E-02
LPO	lactoperoxidase	Extracellular Space	enzyme	-6,198	107,035	1,59E-02
CAPRIN1	cell cycle associated protein 1	Plasma Membrane	other	-6,172	70,436	6,25E-02
ZKSCAN5	zinc finger with KRAB and SCAN domains 5	Nucleus	transcription regulator	-6,035	67,877	1,70E-02
PHF14	PHD finger protein 14	Nucleus	other	-6,002	74,699	8,85E-03
ZNF618	zinc finger protein 618	Other	other	-5,969	57,514	7,83E-03
C16orf58	chromosome 16 open reading frame 58	Other	other	-5,967	136,416	2,98E-02
LRRC18	leucine rich repeat containing 18	Cytoplasm	other	-5,836	569,676	8,50E-03
ALS2CL	ALS2 C-terminal like	Cytoplasm	other	-5,472	585,48	2,19E-02
ITPK1	inositol-tetrakisphosphate 1-kinase	Cytoplasm	kinase	-5,315	130,474	2,18E-02
TNK2-AS1	TNK2 antisense RNA 1	Other	other	-5,284	212,121	4,77E-02
CDK11A	cyclin-dependent kinase 11A	Nucleus	kinase	-5,229	221,563	4,54E-02
FEM1A	fem-1 homolog a (C. elegans)	Nucleus	transcription regulator	-5,217	212,234	3,23E-02
AK4	adenylate kinase 4	Cytoplasm	kinase	-5,193	41,952	5,54E-03
RPA1	replication protein A1, 70kDa	Nucleus	other	-5,157	100,101	2,34E-02
ACADSB	acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain	Cytoplasm	enzyme	-4,997	119,773	4,72E-02
MORC2-AS1	MORC2 antisense RNA 1	Other	other	-4,975	150,802	1,80E-02
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Extracellular Space	cytokine	-4,955	141,13	4,13E-02
GAPVD1	GTPase activating protein and VPS9 domains 1	Cytoplasm	other	-4,884	145,154	1,31E-02
EVL	Enah/Vasp-like	Plasma Membrane	other	-4,854	329,232	3,02E-03
PCGF5	polycomb group ring finger 5	Cytoplasm	other	-4,824	41,431	7,76E-03
CHGA	chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)	Cytoplasm	other	-4,704	276,873	3,12E-02
CRHR1-IT1	CRHR1 intronic transcript 1 (non-protein coding)	Other	other	-4,681	186,522	3,25E-02
ROCK2	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2	Cytoplasm	kinase	-4,639	150,706	4,46E-02
TAS2R39	taste receptor, type 2, member 39	Plasma Membrane	other	-4,599	234,412	1,81E-02
RAB11FIP3	RAB11 family interacting protein 3 (class II)	Cytoplasm	other	-4,54	204,529	2,11E-02
STARD9	SIAR-related lipid transfer (START) domain containing 9	Cytoplasm	other	-4,488	217,342	4,86E-02
BUB1	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase	Nucleus	kinase	-4,461	41,672	1,82E-02
SPDYA	speedy/RINGO cell cycle regulator family member A	Nucleus	other	-4,413	44,151	3,54E-02
OPN1SW	opsin 1 (cone pigments), short-wave-sensitive	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-4,406	48,31	3,36E-02
OLFM1	olfactomedin 1	Cytoplasm	other	-4,393	151,036	3,99E-02
FMNL3	formin-like 3	Cytoplasm	other	-4,376	383,3	4,78E-02
CHAF1A	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	Nucleus	other	-4,351	426,512	1,76E-02
SNAI3	snail family zinc finger 3	Nucleus	transcription regulator	-4,263	191,154	7,11E-03
LINC00596	long intergenic non-protein coding RNA 596	Other	other	-4,254	35,852	2,65E-02
XKR7	XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 7	Other	other	-4,248	89,91	2,10E-02
LOC100130691	uncharacterized LOC100130691	Other	other	-4,234	58,003	3,84E-02
PDE3A	phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited	Cytoplasm	enzyme	-4,208	37,803	4,02E-02
LOC100294145	uncharacterized LOC100294145	Other	other	-4,207	50,1	1,33E-02
FLT3LG	fms-related tyrosine kinase 3 ligand	Extracellular Space	cytokine	-4,195	318,352	3,17E-02
RGP1	RGP1 retrograde golgi transport homolog (S. cerevisiae)	Cytoplasm	other	-4,102	944,48	1,40E-02
LOC102724428/SIK1	salt-inducible kinase 1	Nucleus	kinase	-4,094	742,012	1,71E-02
TM7SF2	transmembrane 7 superfamily member 2	Cytoplasm	enzyme	-4,076	160,983	4,82E-02
DGCR8	DGCR8 microprocessor complex subunit	Nucleus	enzyme	-4,044	169,256	3,00E-02
KCTD7	potassium channel tetramerization domain containing 7	Other	ion channel	-4,022	36,42	1,21E-02
LRRC29	leucine rich repeat containing 29	Other	enzyme	-4,018	36,789	3,95E-03
LINC00598	long intergenic non-protein coding RNA 598	Other	other	-4,008	35,31	3,33E-02
MRPL46	mitochondrial ribosomal protein L46	Cytoplasm	other	-3,996	109,606	4,64E-02
XKR6	XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 6	Other	other	-3,952	28,09	8,53E-03
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	Extracellular Space	cytokine	-3,949	203,236	1,90E-02
ZNF326	zinc finger protein 326	Nucleus	transcription regulator	-3,949	42,726	5,74E-03
COG2	component of oligomeric golgi complex 2	Cytoplasm	transporter	-3,901	536,434	2,59E-02
TMEM185A	transmembrane protein 185A	Nucleus	other	-3,864	769,738	1,46E-02
ZNF502	zinc finger protein 502	Nucleus	other	-3,844	151,228	2,93E-03
TIAM2	T-cell lymphoma invasion and metastasis 2	Cytoplasm	enzyme	-3,802	38,188	1,29E-02
ZNF235	zinc finger protein 235	Nucleus	other	-3,791	281,912	4,65E-02
ZNF300	zinc finger protein 300	Nucleus	other	-3,716	165,002	3,32E-02
NRSN1	neurensin 1	Plasma Membrane	other	-3,643	149,75	6,28E-03
CYC1	cytochrome c-1	Cytoplasm	enzyme	-3,611	812,04	1,28E-02
GATS	GATS, stromal antigen 3 opposite strand	Other	other	-3,604	970,016	4,01E-02
ARMC9	armadillo repeat containing 9	Cytoplasm	other	-3,569	13,567	1,55E-03
EEPD1	endonuclease/exonuclease/phosphatase family domain containing 1	Other	other	-3,565	105,279	4,19E-02
CCDC57	coiled-coil domain containing 57	Other	other	-3,538	35,896	2,55E-02
OSBP	oxysterol binding protein	Cytoplasm	other	-3,535	426,986	8,35E-03
DCAKD	dephospho-CoA kinase domain containing	Cytoplasm	other	-3,454	366,57	4,35E-02
ESYT3	extended synaptotagmin-like protein 3	Plasma Membrane	other	-3,436	19,918	4,70E-03
ARF3	ADP-ribosylation factor 3	Cytoplasm	enzyme	-3,369	2672,7	3,76E-02
MAN2A2	mannosidase, alpha, class 2A, member 2	Cytoplasm	enzyme	-3,352	43,728	4,21E-02
XPNPEP2	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound	Plasma Membrane	peptidase	-3,332	22,777	4,67E-03
ARPIN/C15orf38-AP3S2	C15orf38-AP3S2 readthrough	Plasma Membrane	other	-3,266	609,208	2,94E-02
NINJ1	ninjurin 1	Plasma Membrane	other	-3,257	446,158	9,78E-03
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-3,247	109,994	2,02E-02
RP9	retinitis pigmentosa 9 (autosomal dominant)	Nucleus	other	-3,155	180,996	3,67E-02

RPS29	ribosomal protein S29	Cytoplasm	other	-3,155	68,362	1.73E-02
FNDC9	fibronectin type III domain containing 9	Other	other	-3,125	436,24	1.15E-02
TMPPE	transmembrane protein with metallophosphoesterase domain	Other	other	-3,105	331,508	4.13E-02
CLPB	ClpB caseinolytic peptidase B homolog (E. coli)	Nucleus	transcription regulator	-3,071	2746,92	3.39E-02
GOLGA1	golgin A1	Cytoplasm	other	-3,012	223,974	4.99E-02
C9orf89	chromosome 9 open reading frame 89	Cytoplasm	other	-3,001	166,31	2.63E-02
C3P1	complement component 3 precursor pseudogene	Other	other	-2,988	43,062	9.71E-03
ZDHHC24	zinc finger, DHHC-type containing 24	Plasma Membrane	other	-2,987	202,921	4.66E-02
SNED1	sushi, nidogen and EGF-like domains 1	Plasma Membrane	other	-2,958	33,366	3.18E-02
CD99	CD99 molecule	Plasma Membrane	other	-2,928	211,628	3.85E-02
ARID5B	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	Nucleus	transcription regulator	-2,912	48,696	1.52E-02
LOC101927043	uncharacterized LOC101927043	Other	other	-2,909	1045,34	2.53E-04
TECPR1	tectonin beta-propeller repeat containing 1	Cytoplasm	other	-2,869	810,32	1.51E-02
BCO2	beta-carotene oxygenase 2	Cytoplasm	enzyme	-2,821	87,602	3.45E-02
VPS41	vacuolar protein sorting 41 homolog (S. cerevisiae)	Cytoplasm	transporter	-2,805	37,82	3.47E-02
SNORA53	small nucleolar RNA, H/ACA box 53	Other	other	-2,76	119,358	3.81E-02
C17orf64	chromosome 17 open reading frame 64	Other	other	-2,75	16,874	1.77E-02
RRP15	ribosomal RNA processing 15 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	other	-2,734	25,082	3.98E-02
LOC145474	uncharacterized LOC145474	Other	other	-2,731	49,998	1.34E-02 D
ITPR3	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 3	Cytoplasm	ion channel	-2,705	101,483	3.60E-02
IPCEF1	interaction protein for cytohesin exchange factors 1	Cytoplasm	enzyme	-2,698	140,998	4.77E-02
LOC642943	SPATA31 subfamily A pseudogene	Other	other	-2,654	26,13	1.91E-02
LOC284395	uncharacterized LOC284395	Other	other	-2,651	48,054	2.92E-02
CDK2AP2	cyclin-dependent kinase 2 associated protein 2	Nucleus	other	-2,643	32,471	4.80E-02
CCL3L3	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	Extracellular Space	cytokine	-2,632	762,58	4.48E-02
LOC100131242	uncharacterized LOC100131242	Other	other	-2,605	699,22	1.94E-02
P2RY2	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-2,598	831,9	3.32E-02
H1FNT	H1 histone family, member N, testis-specific	Nucleus	other	-2,587	216,766	1.50E-02
AFMID	arylfornamidase	Nucleus	enzyme	-2,548	459,54	1.35E-02
LOC100130357	uncharacterized LOC100130357	Other	other	-2,547	29,019	4.99E-02
C10orf131	chromosome 10 open reading frame 131	Other	other	-2,538	44,113	3.83E-02
DDX11	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box helicase 11	Cytoplasm	enzyme	-2,53	97,792	4.10E-02
C11orf71	chromosome 11 open reading frame 71	Other	other	-2,513	124,54	4.12E-02
CTD-3080P12.3	uncharacterized LOC101928857	Other	other	-2,508	117,774	1.59E-02
LINC00852	long intergenic non-protein coding RNA 852	Other	other	-2,473	677,42	3.58E-02
GATA4	GATA binding protein 4	Nucleus	transcription regulator	-2,468	97,008	2.31E-02
IER3	immediate early response 3	Cytoplasm	other	-2,468	1009,66	3.37E-02
KCNQ1OT1	KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1 (non-protein coding)	Other	other	-2,463	58,261	2.71E-02
FAM207A	family with sequence similarity 207, member A	Other	other	-2,457	310,108	4.85E-02
ABCA6	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6	Plasma Membrane	transporter	-2,42	23,061	3.79E-02
NDC1	NDC1 transmembrane nucleoporin	Nucleus	other	-2,42	111,77	2.42E-02
LINC00467	long intergenic non-protein coding RNA 467	Other	other	-2,413	150,622	3.85E-02
CRISP2	cysteine-rich secretory protein 2	Extracellular Space	other	-2,403	23,493	3.03E-02
NAGA	N-acetylgalactosaminidase, alpha-	Cytoplasm	enzyme	-2,358	1031,22	1.33E-02
SLCO4A1-AS1	SLCO4A1 antisense RNA 1	Other	other	-2,355	20,469	3.10E-02
SLC22A6	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6	Plasma Membrane	transporter	-2,352	13,14	3.07E-02
MAP1B	microtubule-associated protein 1B	Cytoplasm	other	-2,349	13,018	3.45E-02
RNF217-AS1	RNF217 antisense RNA 1 (head to head)	Other	other	-2,34	774,62	2.35E-02
C16orf96	chromosome 16 open reading frame 96	Other	other	-2,335	56,654	2.70E-02
LOC100506514	uncharacterized LOC100506514	Other	other	-2,314	22,587	3.38E-02
ART3	ADP-ribosyltransferase 3	Plasma Membrane	enzyme	-2,309	77,922	3.35E-02
TEX41	testis expressed 41 (non-protein coding)	Other	other	-2,306	45,922	3.33E-02
CDK17	cyclin-dependent kinase 17	Cytoplasm	kinase	-2,305	304,924	4.08E-02
HPS1	Hermansky-Pudlak syndrome 1	Cytoplasm	other	-2,301	576,08	2.33E-02
TLE4	transducin-like enhancer of split 4	Nucleus	transcription regulator	-2,3	66,446	4.65E-02
LOC102723493	uncharacterized LOC102723493	Other	other	-2,288	22,4	1.78E-02
SCUBE1	signal peptide, CUB domain, EGF-like 1	Plasma Membrane	receptor	-2,287	83,898	6.37E-03
COG8	component of oligomeric golgi complex 8	Cytoplasm	transporter	-2,282	788,62	2.17E-03 D
RGL1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	Cytoplasm	other	-2,278	72,892	4.22E-02
GNG12-AS1	GNG12 antisense RNA 1	Other	other	-2,267	74,838	1.35E-02
UBE3B	ubiquitin protein ligase E3B	Extracellular Space	enzyme	-2,257	678	1.75E-02
NTRK3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3	Plasma Membrane	kinase	-2,243	47,102	2.55E-03
RTKN2	rhotekin 2	Plasma Membrane	other	-2,242	22,18	2.63E-02
PBXIP1	pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1	Nucleus	transcription regulator	-2,239	1363,94	1.89E-02
CAPN13	calpain 13	Other	other	-2,236	36,494	2.15E-02
C7orf26	chromosome 7 open reading frame 26	Other	other	-2,227	721,44	2.27E-02
PDE2A	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	Cytoplasm	enzyme	-2,227	15,958	1.86E-02
ING3	inhibitor of growth family, member 3	Nucleus	other	-2,222	61,986	3.19E-02
CYP3A5	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5	Cytoplasm	enzyme	-2,217	77,648	2.88E-02
C1orf56	chromosome 1 open reading frame 56	Other	other	-2,211	917,26	4.64E-02
CHAD	chondroadherin	Extracellular Space	other	-2,209	40,116	2.25E-02
C16orf72	chromosome 16 open reading frame 72	Other	other	-2,207	28,95	1.42E-02
CCDC33	coiled-coil domain containing 33	Cytoplasm	other	-2,204	270,04	1.42E-02
PIKFYVE	phosphoinositide kinase, FYVE finger containing	Cytoplasm	kinase	-2,194	513,44	4.79E-02
PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	Plasma Membrane	phosphatase	-2,179	109,352	1.49E-02

HES4	hes family bHLH transcription factor 4	Other	other	-2,162	16,819	2,31E-02
COA5	cytochrome c oxidase assembly factor 5	Cytoplasm	other	-2,156	714,72	2,06E-02
AGFG1	ArfGAP with FG repeats 1	Nucleus	other	-2,154	44,784	4,32E-02
AMICA1	adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1	Plasma Membrane	other	-2,126	381,44	1,77E-02
ANKRD30BP3	ankyrin repeat domain 30B pseudogene 3	Other	other	-2,113	17,143	2,72E-02
SNX3	sorting nexin 3	Cytoplasm	transporter	-2,1	151,824	4,89E-02
MEIKIN	meiotic kinetochore factor	Other	other	-2,096	10,705	3,23E-02
LAMB1	laminin, beta 1	Extracellular Space	other	-2,076	11,935	2,49E-02
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	Extracellular Space	growth factor	-2,068	53,898	1,63E-02
CAMSAP1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1	Cytoplasm	other	-2,059	184,708	3,29E-02
EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	Other	translation regulator	-2,056	265,38	4,15E-02
WDR41	WD repeat domain 41	Cytoplasm	other	-2,055	238,48	2,74E-02
DEFA9P	defensin, alpha 9 pseudogene	Other	other	-2,054	40,03	3,15E-02
KLF6	Kruppel-like factor 6	Nucleus	transcription regulator	-2,043	74,334	4,78E-02
ABLIM1	actin binding LIM protein 1	Cytoplasm	other	-2,04	15,779	2,60E-02
ITLN2	intelectin 2	Plasma Membrane	other	-2,032	30,09	2,52E-02
TMEM100	transmembrane protein 100	Plasma Membrane	other	-2,032	23,82	3,00E-02
MAZ	MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor)	Nucleus	transcription regulator	-2,015	960,9	1,34E-03
MITF	microphthalmia-associated transcription factor	Nucleus	transcription regulator	-2,009	96,894	2,43E-02
TRAC	T cell receptor alpha constant	Plasma Membrane	other	-1,993	16,344	2,45E-02
OTX1	orthodenticle homeobox 1	Nucleus	transcription regulator	-1,99	11,483	8,71E-03
METTL10	methyltransferase like 10	Other	other	-1,964	179,9	5,34E-03
PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	Cytoplasm	other	-1,964	831,48	4,65E-02
PKD1L2	polycystic kidney disease 1-like 2 (gene/pseudogene)	Other	ion channel	-1,962	96,288	4,43E-02
PTAR1	protein prenyltransferase alpha subunit repeat containing 1	Other	other	-1,95	89,648	4,62E-02
HOTAIR	HOX transcript antisense RNA	Other	other	-1,935	88,902	2,53E-02
THAP3	THAP domain containing, apoptosis associated protein 3	Other	other	-1,935	83,592	2,29E-02
GUCA2A	guanylate cyclase activator 2A (guanylin)	Extracellular Space	other	-1,931	12,13	1,39E-03
GPALPP1	GPALPP motifs containing 1	Other	other	-1,914	267,64	3,60E-02
UBXN6	UBX domain protein 6	Cytoplasm	other	-1,903	352,42	4,56E-02
CTU2	cytosolic thiouridylase subunit 2 homolog (S. pombe)	Cytoplasm	other	-1,9	19,856	2,82E-02
SCGB3A1	secretoglobin, family 3A, member 1	Extracellular Space	cytokine	-1,893	713,06	2,61E-02
SFTPA1	surfactant protein A1	Extracellular Space	transporter	-1,893	11,717	3,05E-02
PCDH15	protocadherin-related 15	Plasma Membrane	other	-1,891	19,758	2,44E-02
CES3	carboxylesterase 3	Cytoplasm	enzyme	-1,867	126,872	4,11E-02
TOR3A	torsin family 3, member A	Cytoplasm	enzyme	-1,833	377,52	1,06E-02
RSPH4A	radial spoke head 4 homolog A (Chlamydomonas)	Nucleus	other	-1,823	54,774	3,94E-02
BAG6	BCL2-associated athanogene 6	Nucleus	enzyme	-1,792	1248,4	4,80E-02
TMSB4Y	thymosin beta 4, Y-linked	Cytoplasm	other	-1,761	315,08	3,33E-02
ERVH48-1	endogenous retrovirus group 48, member 1	Extracellular Space	other	-1,758	1598,8	3,02E-02
IL33	interleukin 33	Extracellular Space	cytokine	-1,755	11,32	1,23E-02
NXF5	nuclear RNA export factor 5	Cytoplasm	other	-1,746	8,794	3,67E-02
RMDN3	regulator of microtubule dynamics 3	Cytoplasm	other	-1,746	300,9	3,82E-02
PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-1,741	4414,6	3,46E-02
FILIP1L	filamin A interacting protein 1-like	Nucleus	other	-1,728	15,046	3,26E-02
OR2T33	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 33	Plasma Membrane	other	-1,728	67,484	4,94E-02
BCL7C	B-cell CLL/lymphoma 7C	Other	other	-1,725	100,942	3,34E-02
MAPK11	mitogen-activated protein kinase 11	Cytoplasm	kinase	-1,724	175,72	2,22E-02
CSNK2A1	casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	Cytoplasm	kinase	-1,716	829,38	4,22E-02
WDFY2	WD repeat and FYVE domain containing 2	Other	other	-1,713	138,124	4,15E-02
FAM91A1	family with sequence similarity 91, member A1	Other	other	-1,699	336,92	5,51E-03
CDCA7	cell division cycle associated 7	Nucleus	other	-1,69	82,568	1,23E-02
SUMO1	small ubiquitin-like modifier 1	Nucleus	enzyme	-1,687	122,4	2,30E-02
FAM104A	family with sequence similarity 104, member A	Other	other	-1,669	251,6	1,89E-02
SETBP1	SET binding protein 1	Nucleus	other	-1,667	9,114	2,49E-02
SETBP1	SET binding protein 1	Nucleus	other	-1,667	9,114	2,49E-02
COQ10B	coenzyme Q10 homolog B (S. cerevisiae)	Cytoplasm	other	-1,664	69,614	4,15E-02
LINC00598	long intergenic non-protein coding RNA 598	Other	other	-1,659	10,758	3,59E-02
LOC101059954	uncharacterized LOC101059954	Other	other	-1,659	8,267	2,07E-02
CASC8	cancer susceptibility candidate 8 (non-protein coding)	Other	other	-1,636	12,074	1,52E-02
TYMP	thymidine phosphorylase	Extracellular Space	growth factor	-1,633	778	3,32E-03
IRF1	interferon regulatory factor 1	Nucleus	transcription regulator	-1,631	1694,4	4,22E-02
IRF1	interferon regulatory factor 1	Nucleus	transcription regulator	-1,631	1694,4	4,22E-02
TCERG1L	transcription elongation regulator 1-like	Other	other	-1,621	194,66	4,87E-02
PACSIN2	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2	Cytoplasm	transporter	-1,614	135,74	3,19E-02
CASC15	cancer susceptibility candidate 15 (non-protein coding)	Other	other	-1,606	35,07	3,90E-02
POM121L1P	POM121 transmembrane nucleoporin-like 1, pseudogene	Other	other	-1,602	43,266	8,36E-03
LOC401320	uncharacterized LOC401320	Other	other	-1,584	2390,2	3,63E-03
NGEF	neuronal guanine nucleotide exchange factor	Cytoplasm	other	-1,579	19,196	2,25E-02
SLC25A3P1	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3 pseudogene 1	Other	other	-1,56	170,78	3,56E-02
LRR37BP1	leucine rich repeat containing 37B pseudogene 1	Other	other	-1,554	241,84	3,36E-02
PTCRA	pre T-cell antigen receptor alpha	Plasma Membrane	other	-1,551	30,098	4,24E-02
RBM14-RBM4	RBM14-RBM4 readthrough	Other	other	-1,538	963,8	3,78E-02
CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	Cytoplasm	peptidase	-1,536	560,14	4,09E-02

KRT8	keratin 8, type II	Cytoplasm	other	-1,532	205.02	3.03E-02
MPDZ	multiple PDZ domain protein	Plasma Membrane	other	-1,525	8,244	2,26E-02
ZNF175	zinc finger protein 175	Nucleus	other	-1,524	31,598	2,80E-02
C2CD4C	C2 calcium-dependent domain containing 4C	Extracellular Space	other	-1,519	27,574	3,67E-02
PSCA	prostate stem cell antigen	Plasma Membrane	other	-1,514	6,293	4,80E-02
SERPINE3	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 3	Other	other	-1,514	39,734	3,82E-02

**Supplemental table 6.** Complete list of gene modulated by obese intermediate monocyte compared to lean control intermediate monocyte. Other = ratio MFI obese vs control. D = duplicate.

Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)	Fold Change	Other	p-value	Notes
CISD1	CDGSH iron sulfur domain 1	Cytoplasm	other	353,778	1369,273	3,16E-03	
SFTPD	surfactant protein D	Extracellular Space	other	34,35	2448,326	1,61E-03	
TMEM44	transmembrane protein 44	Other	other	29,257	101,713	8,92E-03	
ZNF696	zinc finger protein 696	Nucleus	other	24,527	397,069	9,26E-03	
POU6F1	POU class 6 homeobox 1	Nucleus	transcription regulator	18,971	150,217	3,31E-02	
BPHL	biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase)	Cytoplasm	enzyme	14,617	621,612	3,35E-02	
NAE1	NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1	Cytoplasm	enzyme	12,453	356,71	1,79E-02	
ARSD	arylsulfatase D	Cytoplasm	enzyme	11,982	41,741	1,55E-03	
ATP2A1	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1	Cytoplasm	transporter	11,064	111,313	5,88E-03	
MAP3K13	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	Cytoplasm	kinase	10,999	261,652	4,55E-03	
LOC100131829	uncharacterized LOC100131829	Other	other	10,936	82,665	2,34E-02	
RYR1	ryanodine receptor 1 (skeletal)	Cytoplasm	ion channel	10,897	273,442	1,76E-02	
FBXO42	F-box protein 42	Other	other	10,123	539,099	4,26E-02	
BBS10	Bardet-Biedl syndrome 10	Other	other	9,546	48,64	3,35E-02	
LINC00685	long intergenic non-protein coding RNA 685	Other	other	8,782	276,022	4,81E-03	
HESX1	HESX homeobox 1	Nucleus	transcription regulator	8,487	66,692	9,12E-03	
SRRD	SRR1 domain containing	Other	other	8,017	143,996	2,52E-02	
ZNF880	zinc finger protein 880	Other	other	7,648	203,735	4,88E-02	
LAMB2P1	laminin, beta 2 pseudogene 1	Other	other	7,623	76,126	4,08E-02	
EYS	eyes shut homolog (Drosophila)	Cytoplasm	other	7,297	51,863	4,60E-02	
MC1R	melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor)	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	6,827	505,88	8,07E-03	
CCRL2	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	6,789	43,79	3,45E-03	
TMEM79	transmembrane protein 79	Cytoplasm	other	6,655	1823,848	1,87E-02	
MRPL52	mitochondrial ribosomal protein L52	Cytoplasm	other	6,527	237,88	1,55E-02	
MAST2	microtubule associated serine/threonine kinase 2	Cytoplasm	kinase	6,495	250,766	1,99E-02	
FER	fer (fps/les related) tyrosine kinase	Cytoplasm	kinase	6,364	34,591	2,21E-02	
NAA38	N(alpha)-acetyltransferase 38, NatC auxiliary subunit	Nucleus	other	6,351	543,906	1,27E-02	
PIGO	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class O	Cytoplasm	enzyme	6,319	2713,56	1,40E-02	
SRP14-AS1	SRP14 antisense RNA1 (head to head)	Other	other	6,272	101,693	4,10E-02	D
LRRC27	leucine rich repeat containing 27	Other	other	6,209	448,016	5,62E-03	
GDAP2	ganglioside induced differentiation associated protein 2	Cytoplasm	other	5,7	185,102	1,84E-02	
SLC10A3	solute carrier family 10, member 3	Plasma Membrane	transporter	5,51	118,555	1,23E-02	
USP41	ubiquitin specific peptidase 41	Other	other	5,51	416,432	1,64E-02	
HOMER3	homer homolog 3 (Drosophila)	Plasma Membrane	other	5,409	317,818	2,44E-02	
sept-10	septin 10	Cytoplasm	transcription regulator	5,394	36,654	4,25E-02	
LOC102724828/MRPL23	mitochondrial ribosomal protein L23	Cytoplasm	other	5,364	710,713	4,77E-02	
CRTAM	cytotoxic and regulatory T cell molecule	Plasma Membrane	other	5,302	149,772	4,77E-02	
LOC389831 (includes others)	uncharacterized LOC389831	Other	other	5,226	23,607	2,46E-02	
LOC100506374	uncharacterized LOC100506374	Other	other	5,121	391,046	1,74E-02	D
RPS6KA4	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 4	Cytoplasm	kinase	5,12	257,212	1,58E-02	
SRP14-AS1	SRP14 antisense RNA1 (head to head)	Other	other	5,087	35,463	4,17E-02	D
ARFIP1	ADP-ribosylation factor interacting protein 1	Cytoplasm	other	4,984	314,084	3,77E-02	
SPATA2L	spermatogenesis associated 2-like	Other	other	4,949	271,37	3,38E-02	
KDEL3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3	Cytoplasm	transporter	4,914	50,658	2,52E-02	
KIAA1191	KIAA1191	Cytoplasm	other	4,908	83,949	4,20E-02	
RSL1D1	ribosomal L1 domain containing 1	Nucleus	other	4,58	54,232	2,59E-02	
RDH10	retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	Nucleus	enzyme	4,529	558,218	4,83E-02	
ZNF414	zinc finger protein 414	Other	other	4,467	388,782	2,63E-02	
PHYH	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase	Cytoplasm	enzyme	4,448	139,406	9,88E-03	
SNHG17	small nucleolar RNA host gene 17 (non-protein coding)	Other	other	4,446	381,622	1,84E-02	
TBCK	TBC1 domain containing kinase	Other	kinase	4,407	124,61	4,77E-02	
ZHX3	zinc fingers and homeoboxes 3	Nucleus	transcription regulator	4,38	881,8	3,90E-02	
ZNF717	zinc finger protein 717	Nucleus	other	4,352	199,87	1,88E-02	
SFMBT1	Scm-like with four mbt domains 1	Nucleus	transcription regulator	4,348	93,991	3,29E-02	
CA5B	carbonic anhydrase VB, mitochondrial	Cytoplasm	enzyme	4,29	304,818	3,94E-02	
CDPF1	cysteine-rich, DPF motif domain containing 1	Extracellular Space	other	4,284	150,422	4,60E-02	D
KHSRP	KH-type splicing regulatory protein	Nucleus	enzyme	4,267	442,872	3,77E-02	
KLHDC2	kelch domain containing 2	Cytoplasm	other	4,175	147,394	4,86E-02	
KIAA1279	KIAA1279	Cytoplasm	enzyme	4,027	77,589	3,01E-02	
EPHB2	EPH receptor B2	Plasma Membrane	kinase	4,025	277,464	2,41E-02	D
BEGAIN	brain-enriched guanlylate kinase-associated	Nucleus	other	4,015	131,972	3,79E-03	



CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	Nucleus	transcription regulator	3,978	36,512	3.12E-02
CTSC	cathepsin C	Cytoplasm	peptidase	3,961	28,365	3.04E-02
OSBPL3	oxysterol binding protein-like 3	Cytoplasm	other	3,928	77.25	1.60E-02
TSSC1	tumor suppressing subtransferable candidate 1	Other	other	3,922	2039.58	4.49E-02
LOC100506374	uncharacterized LOC100506374	Other	other	3,89	386,274	2.44E-02 D
SARM1	sterile alpha and TIR motif containing 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor	3,874	1180.16	4.60E-02 D
NOP56	NOP56 ribonucleoprotein	Nucleus	other	3,862	725.13	2.08E-02
CLIC4	chloride intracellular channel 4	Plasma Membrane	ion channel	3,849	210,165	3.20E-02 D
RYR3	ryanodine receptor 3	Plasma Membrane	ion channel	3,823	17.36	1.39E-03
TMEM185B	transmembrane protein 185B	Other	other	3,795	105,034	9.06E-03
PUF60	poly-U binding splicing factor 60KDa	Nucleus	other	3,79	1374.192	2.61E-02
WDYHV1	WDYHV motif containing 1	Cytoplasm	other	3,79	432,914	2.69E-02
GAB1	GRB2-associated binding protein 1	Cytoplasm	other	3,771	36.143	2.47E-02
ZC3H13	zinc finger CCCH-type containing 13	Extracellular Space	other	3,77	89,954	4.17E-02
ZER1	zyg-11 related, cell cycle regulator	Other	enzyme	3,77	98,724	4.00E-02
F8A1 (includes others)	coagulation factor VIII-associated 1	Nucleus	other	3,733	894,326	4.88E-02
COQ4	coenzyme Q4	Cytoplasm	other	3,65	156,242	2.95E-02
LINC00662	long intergenic non-protein coding RNA 662	Other	other	3,625	274,664	3.03E-02
LRIF1	ligand dependent nuclear receptor interacting factor 1	Nucleus	other	3,604	30,019	1.89E-02
PSMD4	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4	Cytoplasm	other	3,578	1556.5	1.04E-02
FAM220BP	Putative SIPAR-like protein C9orf51	Other	other	3,557	37,174	3.09E-02
MAP7	microtubule-associated protein 7	Cytoplasm	other	3,53	37,264	1.97E-02
SLC2A11	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 11	Plasma Membrane	other	3,471	168,662	3.06E-02
CDPF1	cysteine-rich, DPF motif domain containing 1	Extracellular Space	other	3,402	403,524	4.00E-02 D
MUC5B	mucin 5B, oligomeric mucus/gel-forming	Extracellular Space	peptidase	3,39	232,562	3.67E-02
PGBD3	piggyBac transposable element derived 3	Other	other	3,367	52,556	1.13E-02
THOP1	thimet oligopeptidase 1	Cytoplasm	peptidase	3,357	488.18	3.73E-02
PLXNA4	plexin A4	Plasma Membrane	transmembrane receptor	3,333	45,064	1.62E-02
MECP2	methyl CpG binding protein 2	Nucleus	transcription regulator	3,293	301,408	4.93E-04
TATDN2	TatD DNase domain containing 2	Nucleus	other	3,286	781.3	3.09E-02
ZKSCAN1	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1	Nucleus	transcription regulator	3,271	400.18	4.65E-02
PDE3B	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	Cytoplasm	enzyme	3,267	28,003	1.58E-02
CIAPIN1	cytokine induced apoptosis inhibitor 1	Cytoplasm	other	3,149	359,236	3.42E-02
ZNF232	zinc finger protein 232	Nucleus	other	3,09	200,378	1.92E-02
TOR1A	torsin family 1, member A (torsin A)	Cytoplasm	enzyme	3,07	246,772	1.73E-02
CRYBA1	crystallin, beta A1	Other	other	3,04	236.65	3.94E-02
MIF4GD	MIF4G domain containing	Other	other	3,018	715,932	4.13E-02
PAM16	presequence translocase-associated motor 16 homolog (S. cerevisiae)	Cytoplasm	other	3,017	109,252	3.20E-02
LOC100130817	uncharacterized LOC100130817	Other	other	3,013	106,278	2.76E-02
FLT3LG	fms-related tyrosine kinase 3 ligand	Extracellular Space	cytokine	2,986	691.46	4.72E-02
GTF2E1	general transcription factor IIE, polypeptide 1, alpha 56kDa	Nucleus	transcription regulator	2,939	152,337	3.94E-02
RABAC1	Rab acceptor 1 (prenylated)	Cytoplasm	other	2,925	96,606	4.53E-02
PPAN	peter pan homolog (Drosophila)	Nucleus	other	2,924	675.84	1.68E-02
PPAT	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase	Cytoplasm	enzyme	2,886	201,038	4.83E-02
IKBKG	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma	Nucleus	kinase	2,853	1725	1.99E-02
HMG5	high mobility group nucleosome binding domain 5	Nucleus	transcription regulator	2,85	65,854	4.23E-03
ADCK2	aarF domain containing kinase 2	Cytoplasm	kinase	2,79	459.46	1.26E-02
LINC01146	long intergenic non-protein coding RNA 1146	Other	other	2,774	35,814	4.05E-02
PRDM15	PR domain containing 15	Nucleus	other	2,748	362,578	4.00E-02
TMEM18	transmembrane protein 18	Nucleus	other	2,735	553,008	2.00E-02
DUX4L9	double homeobox 4 like 9	Nucleus	other	2,73	233,638	3.05E-02
SYT17	synaptotagmin XVII	Plasma Membrane	other	2,73	434.54	1.84E-02
FAM3A	family with sequence similarity 3, member A	Extracellular Space	other	2,729	789.6	2.90E-02
NXT2	nuclear transport factor 2-like export factor 2	Nucleus	transporter	2,721	91.89	3.39E-02
RAPH1	Ras association (RaGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1	Plasma Membrane	other	2,661	818.64	2.20E-02
C2CD2L	C2CD2-like	Cytoplasm	other	2,647	802.5	1.85E-02
TP53I3	tumor protein p53 inducible protein 3	Cytoplasm	enzyme	2,647	997.52	3.48E-02
NTAN1	N-terminal asparagine amidase	Nucleus	enzyme	2,636	216,534	6.68E-03
LGALS2	lectin, galactoside-binding, soluble, 2	Cytoplasm	other	2,616	426.79	2.83E-02
PK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	Cytoplasm	kinase	2,607	1218.56	4.90E-02
ERMN	ermin, ERM-like protein	Extracellular Space	other	2,594	575.86	4.99E-02
EFCAB10	EF-hand calcium binding domain 10	Other	other	2,589	18,919	4.98E-02
HIST1H2AM	histone cluster 1, H2am	Other	other	2,588	854.74	2.88E-02
EIF2B2	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 beta, 39kDa	Cytoplasm	translation regulator	2,586	246,376	4.97E-02
TNFRSF8	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	Plasma Membrane	transmembrane receptor	2,57	1100.38	3.12E-02
GAS8-AS1	GAS8 antisense RNA 1	Other	other	2,529	341.04	4.46E-02
PLEC	plectin	Cytoplasm	other	2,466	218,742	5.93E-03
GPR84	G protein-coupled receptor 84	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	2,458	54,108	3.99E-02
CFAP36	cilia and flagella associated protein 36	Other	other	2,441	421,678	4.66E-02
WDR83	WD repeat domain 83	Nucleus	other	2,436	1162.94	1.77E-02
PROSER3	proline and serine rich 3	Other	other	2,432	546.24	2.65E-02
GOLGA7	golgin A7	Cytoplasm	other	2,419	715.84	1.11E-02
NLRP9	NLR family, pyrin domain containing 9	Other	other	2,415	138,262	1.53E-03
CLIC4	chloride intracellular channel 4	Plasma Membrane	ion channel	2,414	303,832	2.63E-02 D

CCDC42	coiled-coil domain containing 42	Other	other	2,404	42,968	2.53E-02
CYP3A5	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5	Cytoplasm	enzyme	2,345	18,789	4.36E-02
MYO19	myosin XIX	Cytoplasm	enzyme	2,345	118,804	1.01E-02
OR7E37P	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 37 pseudogene	Other	other	2,344	103,304	6.54E-03
ATP7A	ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide	Plasma Membrane	transporter	2,341	1385.52	4.27E-02 D
KIFC2	kinesin family member C2	Cytoplasm	other	2,338	827.68	1.67E-02
CEP83	centrosomal protein 83kDa	Extracellular Space	other	2,333	376.14	1.90E-02
RHOT1	ras homolog family member T1	Cytoplasm	enzyme	2,33	146,114	3.08E-02
INVS	inversin	Nucleus	transcription regulator	2,326	330.42	3.88E-02
TOB2	transducer of ERBB2, 2	Nucleus	other	2,305	742.9	4.31E-02
SGSH	N-sulfolglucosamine sulfohydrolase	Cytoplasm	enzyme	2,3	2538.8	3.05E-02
RNF187	ring finger protein 187	Nucleus	enzyme	2,28	496.72	4.63E-02
RBM48	RNA binding motif protein 48	Nucleus	other	2,277	177.9	4.07E-02
SCARNA17	small Cajal body-specific RNA 17	Other	other	2,261	49,443	4.72E-02
ZNF197	zinc finger protein 197	Nucleus	transcription regulator	2,23	164,078	2.83E-02
LGALS9C	lectin, galactoside-binding, soluble, 9C	Other	other	2,228	348.23	3.91E-02
SLC25A20	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	Cytoplasm	transporter	2,227	2961.36	4.52E-02
ZNF137P	zinc finger protein 137, pseudogene	Nucleus	transcription regulator	2,2	27,585	4.36E-02
PELI3	pellino E3 ubiquitin protein ligase family member 3	Cytoplasm	enzyme	2,161	769.52	3.53E-02
C11orf31	chromosome 11 open reading frame 31	Nucleus	other	2,157	1482.3	3.75E-02
DHX32	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 32	Other	enzyme	2,133	259.88	4.12E-02
CD2BP2	CD2 (cytoplasmic tail) binding protein 2	Cytoplasm	other	2,116	489.4	2.28E-02
HAGLROS	HAGLR opposite strand (non-protein coding)	Other	other	2,111	61.772	2.47E-02
EPHB2	EPH receptor B2	Plasma Membrane	kinase	2,106	665.02	1.90E-02 D
PTRH2	peptidyl-tRNA hydrolase 2	Cytoplasm	enzyme	2,106	351.22	4.74E-02
FITM1	fat storage-inducing transmembrane protein 1	Extracellular Space	other	2,104	278.94	6.36E-03
ABCE1	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1	Cytoplasm	transporter	2,097	39.11	2.76E-02 D
DCTN2	dynactin 2 (p50)	Cytoplasm	other	2,085	362.4	2.21E-02
MX2	MX dynamin-like GTPase 2	Nucleus	enzyme	2,061	1716.6	2.96E-02
KANSL2	KAT8 regulatory NSL complex subunit 2	Nucleus	other	2,059	373.28	2.16E-02
RALGAPB	Ral GTPase activating protein, beta subunit (non-catalytic)	Other	other	2,051	651.46	9.12E-03
INPPL1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1	Cytoplasm	phosphatase	2,041	2637.4	3.27E-02
OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	Cytoplasm	enzyme	2,028	3754.8	4.75E-02
SYNGR2	synaptogyrin 2	Cytoplasm	other	2,001	239,648	3.96E-02
PTAR1	protein prenyltransferase alpha subunit repeat containing 1	Other	other	1,989	275.06	4.88E-02
RREB1	ras responsive element binding protein 1	Nucleus	transcription regulator	1,968	1902.2	2.11E-02
C20orf27	chromosome 20 open reading frame 27	Other	other	1,965	1001.66	4.86E-02
IDS	iduronate 2-sulfatase	Cytoplasm	enzyme	1,957	70.686	8.13E-03
ANKHD1/ANKHD1-EIF4EBP3	ankyrin repeat and KH domain containing 1	Other	other	1,93	179.98	4.41E-02
LOC729083	uncharacterized LOC729083	Other	other	1,928	466.84	4.88E-02
VKORC1	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1	Cytoplasm	enzyme	1,919	624,547	4.74E-02
C20orf196	chromosome 20 open reading frame 196	Other	other	1,918	456.08	3.87E-02
ST3GAL1	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	Cytoplasm	enzyme	1,912	425.46	3.74E-02
SRGAP2	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2	Cytoplasm	other	1,909	676	2.16E-02
DCPS	decapping enzyme, scavenger	Nucleus	enzyme	1,904	567.82	3.57E-02
TMEM106A	transmembrane protein 106A	Cytoplasm	other	1,903	216,824	1.62E-02
DIS3L	DIS3 like exosome 3'-5' exoribonuclease	Cytoplasm	enzyme	1,898	430.96	3.35E-02
EPST11	epithelial stromal interaction 1 (breast)	Other	other	1,874	1206.96	3.28E-02
ZNHIT1	zinc finger, HIT-type containing 1	Nucleus	other	1,861	387.2	4.02E-02
BAG5	BCL2-associated athanogene 5	Cytoplasm	other	1,859	392.26	4.26E-02
LOC440292	uncharacterized LOC440292	Other	other	1,847	251.06	4.67E-02
ITIH3	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3	Extracellular Space	other	1,839	99,304	3.39E-02
LOC392364	nuclear pore associated protein 1 pseudogene	Other	other	1,832	228.92	4.57E-02
AMBRA1	autophagy/beclin-1 regulator 1	Cytoplasm	other	1,815	325.36	3.86E-02
CALHM2	calcium homeostasis modulator 2	Other	other	1,792	239	4.62E-02
CIAO1	cytosolic iron-sulfur assembly component 1	Nucleus	transcription regulator	1,791	281.04	1.06E-02
LAIR1	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor	1,775	1570.2	6.70E-05
NCF2	neutrophil cytosolic factor 2	Cytoplasm	enzyme	1,769	297.88	4.78E-02
CXorf21	chromosome X open reading frame 21	Other	enzyme	1,762	1256.42	4.58E-02
LINC00963	long intergenic non-protein coding RNA 963	Other	other	1,747	1011.24	4.87E-02
ATG13	autophagy related 13	Cytoplasm	other	1,73	231.8	4.48E-02
ZBTB80S	zinc finger and BTB domain containing 8 opposite strand	Cytoplasm	other	1,724	4099	6.80E-03
TIRAP	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein	Cytoplasm	other	1,722	855.22	3.26E-02
GOLM1	golgi membrane protein 1	Cytoplasm	other	1,717	565.06	3.83E-02
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	Plasma Membrane	other	1,709	19922.4	4.71E-02
PPL	periplakin	Cytoplasm	other	1,704	27.5	1.97E-02
GTPBP6	GTP binding protein 6 (putative)	Other	other	1,693	622.34	4.80E-02
LOC102725383	uncharacterized LOC102725383	Other	other	1,683	301.54	2.94E-02
BAALC	brain and acute leukemia, cytoplasmic	Cytoplasm	other	1,665	201.86	1.56E-02
EHD2	EH-domain containing 2	Nucleus	other	1,609	32,718	3.64E-02
CD300A	CD300a molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor	1,6	3791.8	4.28E-02
SLC2A14	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 14	Nucleus	transporter	1,6	40,032	1.25E-02
PRH2	proline-rich protein HaellI subfamily 2	Extracellular Space	other	1,541	98.36	2.95E-02
TARP	TCR gamma alternate reading frame protein	Cytoplasm	other	1,54	51.39	5.14E-03

Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)	Fold Change	Other	p-value	Notes
CD22	CD22 molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-25.394	864,236	3.18E-02	
DOK4	docking protein 4	Plasma Membrane	other	-16.529	92,43	3.40E-02	
DOK4	docking protein 4	Plasma Membrane	other	-16.529	92,43	3.40E-02	
SPEN	spen family transcriptional repressor	Nucleus	transcription regulator	-15.046	48,835	4.74E-05	
GPR137	G protein-coupled receptor 137	Other	other	-14.225	625,875	3.80E-03	
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	Nucleus	other	-10.417	73,766	2.49E-02	
ZNF254	zinc finger protein 254	Nucleus	other	-10.259	216,849	5.30E-03	
TRIM35	tripartite motif containing 35	Cytoplasm	other	-8.278	99,205	1.24E-02	
USP38	ubiquitin specific peptidase 38	Other	peptidase	-8.241	93,307	7.05E-04	
UBE2Q2	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 2	Other	enzyme	-7.602	55,323	7.75E-03	
MYBL1	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1	Nucleus	transcription regulator	-6.89	79.8	4.71E-02	
GLB1L	galactosidase, beta 1-like	Other	other	-6.855	202,24	1.20E-02	
MYO7A	myosin VIIA	Cytoplasm	enzyme	-6.611	67,116	2.75E-02	
TAF1	TAF1 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 250kDa	Nucleus	transcription regulator	-6.425	33,401	4.05E-02	
PVT1	Pvt1 oncogene (non-protein coding)	Other	other	-6.416	76,891	1.21E-02	D
EXT2	exostosin glycosyltransferase 2	Cytoplasm	enzyme	-6.12	216,883	2.43E-02	
RIMKB	ribosomal modification protein rimK-like family member B	Cytoplasm	other	-6.054	45,043	3.28E-03	
NR3C1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	Nucleus	ligand-dependent nuclear receptor	-5.894	38,44	1.51E-02	D
ZNF544	zinc finger protein 544	Nucleus	other	-5.765	768,74	3.30E-02	
TMEM38B	transmembrane protein 38B	Nucleus	ion channel	-5.544	101,793	1.35E-02	
RBFOX3	RNA binding protein, fox-1 homolog (C. elegans) 3	Nucleus	other	-5.522	74,415	1.08E-03	
KIAA1328	KIAA1328	Other	other	-5.487	68,65	2.21E-02	
CATIP	ciliogenesis associated TTC17 interacting protein	Cytoplasm	other	-5.319	371,66	6.10E-03	
TSPYL6	TSPYL6-like 6	Other	other	-5.27	85,033	3.49E-02	
GALM	galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)	Cytoplasm	enzyme	-5.254	206,858	4.22E-02	
LOC101929149	uncharacterized LOC101929149	Other	other	-5.198	68,912	4.27E-02	
LOC101928356	uncharacterized LOC101928356	Other	other	-5.033	161,66	3.29E-02	
OR4K14	olfactory receptor, family 4, subfamily K, member 14	Plasma Membrane	other	-4.967	32,132	3.14E-02	
FBRS	fibrosin	Extracellular Space	cytokine	-4.898	134,68	3.81E-02	
CATSPER2	cation channel, sperm associated 2	Plasma Membrane	ion channel	-4.875	381,941	2.91E-02	
CD6	CD6 molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-4.786	65,625	3.09E-02	
WDR7	WD repeat domain 7	Cytoplasm	other	-4.783	32,552	1.20E-02	
ST7L	suppression of tumorigenicity 7 like	Other	other	-4.716	192,439	1.29E-02	
SDC3	syndecan 3	Plasma Membrane	other	-4.666	657,34	2.04E-02	
TMEM229B	transmembrane protein 229B	Other	other	-4.666	171,556	4.86E-02	
YY2	YY2 transcription factor	Other	other	-4.488	352,808	3.43E-02	
SLAIN2	SLAIN motif family, member 2	Cytoplasm	other	-4.412	26,552	5.05E-03	
SARM1	sterile alpha and TIR motif containing 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-4.372	570,665	2.85E-02	D
SLC9A1	solute carrier family 9, subfamily A (NHE1, cation proton antiporter 1), member 1	Plasma Membrane	ion channel	-4.364	289,658	1.83E-02	
LOC100131822	uncharacterized LOC100131822	Other	other	-4.22	57,407	1.73E-02	
PVT1	Pvt1 oncogene (non-protein coding)	Other	other	-4.173	178,737	4.03E-02	D
CBLN3	cerebellin 3 precursor	Extracellular Space	other	-4.172	86,74	3.25E-02	
LOC642236	FSHD region gene 1 pseudogene	Other	other	-4.144	51,91	1.78E-02	
PNPLA2	patatin-like phospholipase domain containing 2	Cytoplasm	enzyme	-4.1	200,414	1.35E-02	
GLIPR1L2	GLI pathogenesis-related 1 like 2	Extracellular Space	other	-4.087	103,573	2.72E-02	
RBM42	RNA binding motif protein 42	Other	other	-3.987	2081,6	9.26E-03	
SARS	seryl-tRNA synthetase	Cytoplasm	enzyme	-3.958	113,817	3.70E-02	
L3MBTL1	l(3)mbt-like 1 (Drosophila)	Nucleus	other	-3.912	78,098	1.22E-02	D
MAN1C1	mannosidase, alpha, class 1C, member 1	Cytoplasm	enzyme	-3.894	96,69	1.37E-02	
RRP9	ribosomal RNA processing 9, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)	Nucleus	other	-3.849	434,76	3.93E-02	
MDN1	MDN1, midasin homolog (yeast)	Nucleus	other	-3.771	87,021	4.46E-02	
IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-3.758	13,108	4.61E-02	
IFIT1B	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1B	Cytoplasm	other	-3.722	29,302	2.27E-02	
BUB1	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase	Nucleus	kinase	-3.721	64,035	4.66E-02	
SYN1	synapsin I	Plasma Membrane	transporter	-3.655	221,622	4.37E-03	
CFAP44	cilia and flagella associated protein 44	Extracellular Space	other	-3.637	101,098	1.97E-03	
ODF3B	outer dense fiber of sperm tails 3B	Other	enzyme	-3.625	2075,46	2.05E-02	
LSM4	LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	Nucleus	other	-3.624	1056,44	4.61E-03	
LOC283710	uncharacterized LOC283710	Other	other	-3.607	209,798	4.32E-02	
DIS3L2	DIS3 like 3'-5' exonuclease 2	Cytoplasm	enzyme	-3.549	642,166	1.38E-02	
OR6P1	olfactory receptor, family 6, subfamily P, member 1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-3.533	34,828	3.15E-02	
SREK1IP1	SREK1-interacting protein 1	Other	other	-3.519	63,742	3.06E-02	
NPPB	natriuretic peptide B	Extracellular Space	other	-3.507	80,314	4.91E-02	
SVIL-AS1	SVIL antisense RNA 1	Other	other	-3.507	86,723	2.91E-02	
OR1L4	olfactory receptor, family 1, subfamily L, member 4	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-3.494	88,788	4.23E-02	
H1FX	H1 histone family, member X	Nucleus	other	-3.474	236,892	1.21E-02	
AMMECR1	Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region gene 1	Other	other	-3.459	80,62	1.81E-02	
DPP9	dipeptidyl-peptidase 9	Cytoplasm	peptidase	-3.453	463,202	4.06E-02	
PAAF1	proteasomal ATPase-associated factor 1	Other	other	-3.358	149,408	2.33E-02	
ZNF154	zinc finger protein 154	Nucleus	transcription regulator	-3.346	96,24	4.24E-02	
SLC3A1	solute carrier family 3 (amino acid transporter heavy chain), member 1	Plasma Membrane	transporter	-3.283	43,06	4.45E-02	
KRTAP20-4	keratin associated protein 20-4	Other	other	-3.276	21,344	2.76E-02	

ANKRD22	ankyrin repeat domain 22	Nucleus	transcription regulator	-3,271	28,189	2.06E-02
MRPL37	mitochondrial ribosomal protein L37	Cytoplasm	enzyme	-3,269	351,466	7.21E-03
NEIL1	nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli)	Nucleus	enzyme	-3,265	340,326	4.41E-02
MPV17	MpV17 mitochondrial inner membrane protein	Cytoplasm	other	-3,227	196,873	4.87E-02
RTN4IP1	reticulon 4 interacting protein 1	Cytoplasm	enzyme	-3,173	191,579	3.98E-02
GSG2	germ cell associated 2 (haspin)	Nucleus	kinase	-3,141	47,158	3.50E-02
DNAJB2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2	Nucleus	other	-3,111	746,506	3.99E-02
ITGAV	integrin, alpha V	Plasma Membrane	ion channel	-3,105	20,642	4.83E-02
BCL2L13	BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)	Cytoplasm	other	-3,084	316,636	7.11E-03
ATP7A	ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide	Plasma Membrane	transporter	-3,075	77,37	4.68E-02
MED8	mediator complex subunit 8	Nucleus	other	-3,072	258,949	3.22E-02
TMEM198B	transmembrane protein 198B, pseudogene	Other	other	-3,038	1046,82	4.86E-02
TCFL5	transcription factor-like 5 (basic helix-loop-helix)	Nucleus	transcription regulator	-3,005	166,504	3.37E-02
SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	Extracellular Space	other	-2,995	169,911	4.06E-02
RNF121	ring finger protein 121	Other	other	-2,994	341,06	3.98E-03
MED19	mediator complex subunit 19	Nucleus	other	-2,983	580,842	2.64E-02
UBTF	upstream binding transcription factor, RNA polymerase I	Nucleus	transcription regulator	-2,975	118,946	4.09E-02
ASXL1	additional sex combs like transcriptional regulator 1	Nucleus	transcription regulator	-2,974	1494,58	1.92E-02
L3MBTL1	l(3)mbt-like 1 (Drosophila)	Nucleus	other	-2,97	65,024	4.91E-02
MATN2	matrilin 2	Extracellular Space	other	-2,953	50,612	2.71E-02
LTB4R2	leukotriene B4 receptor 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-2,941	665,16	9.21E-03
FOXRED2	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2	Cytoplasm	other	-2,94	216,444	4.36E-02
ASF1A	anti-silencing function 1A histone chaperone	Nucleus	other	-2,906	46,154	4.87E-02
CD274	CD274 molecule	Plasma Membrane	enzyme	-2,894	73,122	4.45E-02
ZNF589	zinc finger protein 589	Nucleus	other	-2,855	234,536	4.12E-02
TSPAN16	tetraspanin 16	Other	transmembrane receptor	-2,845	507,237	3.12E-02
CHRNA7	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (neuronal)	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-2,837	31,542	4.62E-02
TAF1A	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, A, 48kDa	Nucleus	transcription regulator	-2,836	113,326	9.02E-03
IFIT5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	Plasma Membrane	other	-2,831	226,328	5.68E-03
KLRAP1	killer cell lectin-like receptor subfamily A pseudogene 1	Other	other	-2,793	26,516	4.59E-02
KRTAP4-2	keratin associated protein 4-2	Other	other	-2,764	17,166	6.96E-04
SLC25A23	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 23	Cytoplasm	transporter	-2,753	130,834	1.98E-02
NR3C1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	Nucleus	ligand-dependent nuclear receptor	-2,703	41,825	3.40E-02
SYTL3	synaptotagmin-like 3	Cytoplasm	other	-2,703	582,28	4.27E-02
PAOX	polyamine oxidase (exo-N4-amino)	Cytoplasm	enzyme	-2,696	327,634	3.36E-02
ANAPC1	anaphase promoting complex subunit 1	Nucleus	other	-2,688	81,235	1.88E-02
HIF1A	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	Nucleus	transcription regulator	-2,688	729,02	1.95E-02
NMNAT3	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3	Cytoplasm	enzyme	-2,663	123,42	3.09E-02
C5orf56	chromosome 5 open reading frame 56	Other	other	-2,637	24,698	1.85E-02
PRAMEF11	PRAME family member 11	Extracellular Space	other	-2,617	23,383	3.32E-02
LOC100129408	uncharacterized LOC100129408	Other	other	-2,604	163,702	4.06E-02
TMEM236	transmembrane protein 236	Other	other	-2,594	33,554	2.08E-02
WDR33	WD repeat domain 33	Nucleus	other	-2,586	101,61	1.82E-02
PKD1L2	polycystic kidney disease 1-like 2 (gene/pseudogene)	Other	ion channel	-2,572	154,862	4.95E-02
LOC102723493	uncharacterized LOC102723493	Other	other	-2,568	16,412	1.59E-02
AGPAT9	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	Cytoplasm	enzyme	-2,554	303,664	2.53E-02
RAI1	retinoic acid induced 1	Cytoplasm	other	-2,552	241,852	4.90E-02
SLC4A5	solute carrier family 4 (sodium bicarbonate cotransporter), member 5	Plasma Membrane	transporter	-2,549	17,384	3.30E-02
PYGM	phosphorylase, glycogen, muscle	Cytoplasm	enzyme	-2,542	21,997	3.80E-02
ATXN10	ataxin 10	Cytoplasm	other	-2,534	16,153	1.55E-02
PIP4K2B	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, beta	Cytoplasm	kinase	-2,528	210,92	2.54E-02
PPP5K1	diphosphoinositol pentakisphosphate kinase 1	Nucleus	phosphatase	-2,525	99,952	2.60E-02
PODXL2	podocalyxin-like 2	Plasma Membrane	other	-2,522	246,652	4.12E-02
SFMBT2	Scm-like with four mbt domains 2	Nucleus	other	-2,52	539,504	4.92E-02
RNF139	ring finger protein 139	Cytoplasm	enzyme	-2,518	42,99	3.78E-02
PELI1	pellino E3 ubiquitin protein ligase 1	Cytoplasm	enzyme	-2,475	16,509	4.81E-02
CYSLTR2	cysteinyl leukotriene receptor 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-2,469	324,88	4.99E-03
ASXL2	additional sex combs like transcriptional regulator 2	Extracellular Space	other	-2,456	204,62	4.91E-02
VWC2L	von Willebrand factor C domain containing protein 2-like	Extracellular Space	other	-2,447	33,8	2.96E-02
AAAS	achalasia, adrenocortical insufficiency, alacrimia	Nucleus	other	-2,434	290,14	3.85E-02
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	Extracellular Space	growth factor	-2,424	135,795	2.11E-02
RUFY2	RUN and FYVE domain containing 2	Nucleus	other	-2,418	82,4	3.66E-02
LINC01021	long intergenic non-protein coding RNA 1021	Other	other	-2,395	20,998	1.65E-02
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	Plasma Membrane	kinase	-2,385	60,192	1.35E-02
CLTC	clathrin, heavy chain (Hc)	Plasma Membrane	other	-2,368	254,552	3.18E-02
TADA1	transcriptional adaptor 1	Other	transcription regulator	-2,366	113,062	3.65E-02
OVCA2	ovarian tumor suppressor candidate 2	Cytoplasm	other	-2,363	217,038	1.80E-02
SLC4A7	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7	Plasma Membrane	transporter	-2,361	11,416	2.38E-02
PHF20L1	PHD finger protein 20-like 1	Other	other	-2,355	30,032	3.79E-02
NRN1L	neuritin 1-like	Other	other	-2,319	36,36	3.99E-02
LINC01220	long intergenic non-protein coding RNA 1220	Other	other	-2,318	296,2	1.99E-02
LINC01220	long intergenic non-protein coding RNA 1220	Other	other	-2,318	296,2	1.99E-02
SH3BGRL2	SH3 domain binding glutamate-rich protein like 2	Nucleus	other	-2,316	15,9	3.40E-02
LOC145474	uncharacterized LOC145474	Other	other	-2,312	60,734	4.72E-02

STX19	syntaxin 19	Other	other	-2,303	125,326	2,87E-02
SNRPG	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	Nucleus	other	-2,301	101,48	2,63E-02 D
USP11	ubiquitin specific peptidase 11	Nucleus	peptidase	-2,299	268,58	1,04E-02
ZNF420	zinc finger protein 420	Cytoplasm	other	-2,288	50,454	3,83E-02
ZNF654	zinc finger protein 654	Other	other	-2,279	55,392	4,43E-02
PLN	phospholamban	Cytoplasm	transporter	-2,269	20,674	4,98E-02
ZNF417/ZNF587	zinc finger protein 587	Nucleus	other	-2,268	465,496	3,49E-02
LOXL2	lysyl oxidase-like 2	Extracellular Space	enzyme	-2,265	12,48	1,00E-02
KDM6A	lysine (K)-specific demethylase 6A	Nucleus	other	-2,258	50,29	1,35E-02
TP53BP2	tumor protein p53 binding protein 2	Nucleus	other	-2,25	197,28	2,52E-02
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Extracellular Space	cytokine	-2,241	93,72	2,59E-02
C10orf111	chromosome 10 open reading frame 111	Other	other	-2,236	16,338	1,82E-02
ZKSCAN3	zinc finger with KRAB and SCAN domains 3	Nucleus	transcription regulator	-2,233	298,558	4,53E-02
BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3	Cytoplasm	enzyme	-2,22	273,54	1,46E-02
SNRPG	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	Nucleus	other	-2,215	141,932	2,87E-02 D
DTX4	deltex 4, E3 ubiquitin ligase	Cytoplasm	other	-2,207	437,14	4,28E-02
GRM1	glutamate receptor, metabotropic 1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-2,193	156,23	3,56E-02
ME1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	Cytoplasm	enzyme	-2,189	12,8	1,92E-02
SERPINB9	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	Cytoplasm	other	-2,167	160,532	1,09E-02
LOC100129322	uncharacterized LOC100129322	Other	other	-2,159	143,044	2,58E-02
FAM230B	family with sequence similarity 230, member B (non-protein coding)	Extracellular Space	other	-2,143	13,459	2,37E-02
EHHADH-AS1	EHHADH antisense RNA 1	Other	other	-2,141	42,574	4,35E-02
GEN1	GEN1 Holliday junction 5' flap endonuclease	Cytoplasm	enzyme	-2,14	18,652	3,04E-02
FXVD1	FXVD domain containing ion transport regulator 1	Plasma Membrane	ion channel	-2,134	81,964	4,43E-02
CCDC7	coiled-coil domain containing 7	Other	other	-2,119	17,728	9,02E-03
FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	Cytoplasm	transporter	-2,117	175,41	2,65E-02 D
MSRA	methionine sulfoxide reductase A	Cytoplasm	enzyme	-2,117	51,139	4,94E-02
ENAH	enabled homolog (Drosophila)	Plasma Membrane	other	-2,104	16,691	2,83E-02
ACTR5	ARP5 actin-related protein 5 homolog (yeast)	Other	other	-2,102	254,66	3,26E-02
XAGE3	X antigen family, member 3	Other	other	-2,098	29,904	4,22E-02
PRAMENP	PRAME N-terminal-like, pseudogene	Other	other	-2,097	14,176	1,08E-02
C19orf70	chromosome 19 open reading frame 70	Cytoplasm	other	-2,087	331,92	1,46E-02
ASPSR1	alveolar soft part sarcoma chromosome region, candidate 1	Cytoplasm	other	-2,082	351,08	4,24E-02
DSG2	desmoglein 2	Plasma Membrane	other	-2,08	16,322	1,23E-02
CASZ1	castor zinc finger 1	Nucleus	enzyme	-2,062	45,244	2,33E-02
FAM155B	family with sequence similarity 155, member B	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-2,057	12,714	3,73E-02
KLK8	kallikrein-related peptidase 8	Extracellular Space	peptidase	-2,048	27,786	2,34E-02
ATP1A4	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 4 polypeptide	Plasma Membrane	transporter	-2,037	969,48	1,74E-02
SCARNA22	small Cajal body-specific RNA 22	Other	other	-2,02	21,194	3,85E-04
SFMBT2	Scm-like with four mbt domains 2	Nucleus	other	-2,018	1326,76	5,86E-03 D
FAM35A	family with sequence similarity 35, member A	Extracellular Space	other	-2,017	251,44	2,86E-02
PPP1R13B	protein phosphatase 1, regulatory subunit 13B	Cytoplasm	phosphatase	-2,008	207,26	3,54E-02
CSPG4	chondroitin sulfate proteoglycan 4	Plasma Membrane	other	-2,007	22,912	4,15E-02
CHTOP	chromatin target of PRMT1	Nucleus	other	-1,999	221,86	3,45E-02
POU4F1	POU class 4 homeobox 1	Nucleus	transcription regulator	-1,987	31,17	2,18E-02
FOX11	forkhead box I1	Nucleus	transcription regulator	-1,978	19,13	1,60E-02
TCHH	trichohyalin	Extracellular Space	other	-1,973	30,152	3,67E-02
FNIP1	folliculin interacting protein 1	Cytoplasm	other	-1,967	36,95	4,14E-02
STARD13	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 13	Cytoplasm	other	-1,956	9,548	4,57E-02
SLC9A7	solute carrier family 9, subfamily A (NHE7, cation proton antiporter 7), member 7	Cytoplasm	transporter	-1,952	514,52	4,78E-02
RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family	Plasma Membrane	enzyme	-1,945	195,36	2,26E-02
MEPE	matrix extracellular phosphoglycoprotein	Extracellular Space	other	-1,941	9,583	3,03E-02
CDH3	cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)	Plasma Membrane	other	-1,94	7,596	1,14E-02
AK2	adenylate kinase 2	Cytoplasm	kinase	-1,939	907,96	1,30E-02
ZNF236	zinc finger protein 236	Nucleus	transcription regulator	-1,938	231,62	4,92E-02
ZNF787	zinc finger protein 787	Other	other	-1,932	630,54	1,95E-02
TMSB4Y	thymosin beta 4, Y-linked	Cytoplasm	other	-1,926	557,28	2,06E-02
OR2AG2	olfactory receptor, family 2, subfamily AG, member 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-1,925	25,48	1,19E-02
THOC1	THO complex 1	Nucleus	transcription regulator	-1,92	877,84	1,45E-02
OR4S1	olfactory receptor, family 4, subfamily S, member 1	Plasma Membrane	other	-1,918	24,964	1,78E-02
AS3MT	arsenite methyltransferase	Cytoplasm	enzyme	-1,912	76,52	1,52E-02
LOC158402	uncharacterized LOC158402	Other	other	-1,904	740,02	3,55E-02
FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	Cytoplasm	transporter	-1,897	422,9	3,19E-02 D
ZNF852	zinc finger protein 852	Other	other	-1,893	143,54	6,65E-03
SLC15A1	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1	Plasma Membrane	transporter	-1,889	10,55	3,38E-02
VSTM5	V-set and transmembrane domain containing 5	Other	other	-1,882	39,044	7,82E-03
UCKL1	uridine-cytidine kinase 1-like 1	Cytoplasm	kinase	-1,869	2369,2	4,61E-02
SLC26A5	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 5	Plasma Membrane	transporter	-1,866	208,38	2,77E-02
SORBS2	sorbin and SH3 domain containing 2	Plasma Membrane	other	-1,86	26,638	5,00E-02
ULBP3	UL16 binding protein 3	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-1,851	33,794	2,64E-02
CD8A	CD8a molecule	Plasma Membrane	other	-1,823	11,634	2,12E-02
LOC441204	uncharacterized LOC441204	Other	other	-1,816	28,998	4,07E-02
DENR	density-regulated protein	Other	other	-1,813	22,308	4,22E-02
MAGI2-AS3	MAGI2 antisense RNA 3	Other	other	-1,807	19,476	2,09E-02

PHOX2B	paired-like homeobox 2b	Nucleus	transcription regulator	-1,804	12,74	2,08E-02
QKI	QKI, KH domain containing, RNA binding	Nucleus	other	-1,802	1004,58	2,36E-02
DCUN1D1	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1	Nucleus	other	-1,797	448,94	4,31E-02
CLEC2D	C-type lectin domain family 2, member D	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-1,792	234,06	4,88E-02
POLR1A	polymerase (RNA) I polypeptide A, 194kDa	Nucleus	enzyme	-1,787	101,63	4,15E-02
MAF1	MAF1 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	other	-1,786	569,24	3,78E-02
CABP7	calcium binding protein 7	Cytoplasm	other	-1,778	18,202	3,09E-02
MRS2P2	MRS2 pseudogene 2	Other	other	-1,759	294,24	3,50E-02
LINC00955	long intergenic non-protein coding RNA 955	Other	other	-1,758	9,503	3,95E-02
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-1,754	24,66	1,66E-02
LOC101927043	uncharacterized LOC101927043	Other	other	-1,749	9,891	5,30E-03
HCFC1	host cell factor C1	Nucleus	transcription regulator	-1,747	358,06	3,77E-02
CCDC108	coiled-coil domain containing 108	Other	other	-1,738	110,674	4,22E-02
LOC102724220	uncharacterized LOC102724220	Other	other	-1,738	12,12	1,06E-02
CTAGE9 (includes others)	CTAGE family, member 4	Other	other	-1,729	171,3	1,47E-02
LRRC58	leucine rich repeat containing 58	Other	other	-1,729	73,688	4,72E-03
LOC102724861	uncharacterized LOC102724861	Other	other	-1,727	31,406	3,47E-02
ABCE1	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1	Cytoplasm	transporter	-1,723	309,9	1,91E-02
NLK	nemo-like kinase	Nucleus	kinase	-1,71	578,88	1,53E-02
YAP1	Yes-associated protein 1	Nucleus	transcription regulator	-1,71	7,662	1,34E-02
KIAA1598	KIAA1598	Plasma Membrane	other	-1,703	568,86	1,55E-02
SLC15A4	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 4	Cytoplasm	transporter	-1,698	713,84	3,46E-02
FZD10	frizzled class receptor 10	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-1,697	14,994	4,86E-02
NUP50-AS1	NUP50 antisense RNA 1 (head to head)	Other	other	-1,694	2335,8	2,13E-04
SLC12A2	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporter), member 2	Plasma Membrane	transporter	-1,694	134,16	1,19E-02
FRG2/FRG2B	FSHD region gene 2	Other	other	-1,692	51,71	1,95E-02
EIF3C	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C	Other	translation regulator	-1,686	2576,2	3,69E-03
USP53	ubiquitin specific peptidase 53	Extracellular Space	enzyme	-1,685	18,69	2,04E-02
MEI4	meiosis-specific 4 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	other	-1,672	12,304	2,03E-02
PHF20	PHD finger protein 20	Nucleus	other	-1,666	467,14	2,09E-02
PHF20	PHD finger protein 20	Nucleus	other	-1,666	467,14	2,09E-02
APPL2	adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 2	Cytoplasm	other	-1,665	437,62	3,11E-02
LTF	lactotransferrin	Extracellular Space	peptidase	-1,661	17,8	8,23E-03
LUC7L3	LUC7-like 3 (S. cerevisiae)	Nucleus	other	-1,646	475,18	2,39E-02
FAM13A-AS1	FAM13A antisense RNA 1	Other	other	-1,638	544,16	1,57E-02
MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	Cytoplasm	kinase	-1,636	493,2	3,36E-02
KANK1	KN motif and ankyrin repeat domains 1	Nucleus	transcription regulator	-1,624	17,092	4,17E-02
SENP7	SUMO1/sentrin specific peptidase 7	Nucleus	peptidase	-1,624	178,9	4,24E-03
MDM2	MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase	Nucleus	transcription regulator	-1,622	832,76	3,25E-02
RNF115	ring finger protein 115	Cytoplasm	enzyme	-1,618	299,2	2,43E-02
SLC24A4	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 4	Plasma Membrane	transporter	-1,616	253,2	3,61E-02
WWP2	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	Cytoplasm	enzyme	-1,611	106,52	4,44E-02
TACC1	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	Nucleus	other	-1,605	622,26	8,29E-03
DNAH17	dynein, axonemal, heavy chain 17	Cytoplasm	other	-1,6	8,352	1,95E-02
NR2C2	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	Nucleus	ligand-dependent nuclear receptor	-1,596	590,22	4,26E-02
AK5	adenylate kinase 5	Cytoplasm	kinase	-1,59	40,23	2,13E-02
SSH2	slingshot protein phosphatase 2	Cytoplasm	phosphatase	-1,579	227,68	4,50E-02
SSH2	slingshot protein phosphatase 2	Cytoplasm	phosphatase	-1,579	227,68	4,50E-02
ANKRD10	ankyrin repeat domain 10	Nucleus	transcription regulator	-1,57	790,98	3,50E-02
EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	Other	translation regulator	-1,57	117,6	4,64E-02
LOC401320	uncharacterized LOC401320	Other	other	-1,57	706,3	3,93E-02
MIPEPP3	mitochondrial intermediate peptidase pseudogene 3	Other	other	-1,568	17,972	3,64E-03
M1AP	meiosis 1 associated protein	Cytoplasm	other	-1,561	9,434	4,88E-03
ARID4B	AT rich interactive domain 4B (RBP1-like)	Nucleus	other	-1,555	166,72	4,18E-03
LOC401320	uncharacterized LOC401320	Other	other	-1,551	744,36	3,76E-02
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	Cytoplasm	enzyme	-1,546	809,4	1,67E-02
CALCA	calcitonin-related polypeptide alpha	Plasma Membrane	other	-1,544	7,741	4,61E-02
OR5M3	olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 3	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-1,543	11,588	3,61E-02
WSCD2	WSC domain containing 2	Other	other	-1,54	33,138	4,95E-02
DNAI1	dynein, axonemal, intermediate chain 1	Extracellular Space	other	-1,534	24,698	3,28E-02
SCEL	sciellin	Cytoplasm	other	-1,528	18,914	3,85E-02
AGFG2	ArfGAP with FG repeats 2	Other	other	-1,505	29,258	8,80E-03

**Supplemental table 7.** Complete list of gene modulated by obese non-classical monocyte compared to lean control non-classical monocyte. Other = ratio MFI obese vs control. D = duplicate.

Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)	Fold Change	Other	p-value	Notes
METTL24	methyltransferase like 24	Other	other	33,956	298,314	3.11E-02	
DCHS1	dachsous cadherin-related 1	Plasma Membrane	other	24,703	341,75	2.88E-02	
FAM198B	family with sequence similarity 198, member B	Cytoplasm	other	13,612	59,923	5.84E-03	
CMPK2	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	Cytoplasm	kinase	13,135	594,066	1.52E-02	
NF1	neurofibromin 1	Cytoplasm	other	12,251	54,428	4.62E-02	
TCEA2	transcription elongation factor A (SII), 2	Nucleus	transcription regulator	11,459	366,879	4.27E-02	
IQCE	IQ motif containing E	Cytoplasm	other	10,474	79,782	3.08E-02	
CLEC1A	C-type lectin domain family 1, member A	Plasma Membrane	transmembrane receptor	9,705	56,637	1.13E-04	
PXN	paxillin	Cytoplasm	other	9,664	170,871	4.10E-02	
CLASP2	cytoplasmic linker associated protein 2	Cytoplasm	other	7,589	352,954	2.54E-02	
RNASEL	ribonuclease L (2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent)	Cytoplasm	enzyme	7,258	89,735	6.48E-03	
ALKBH7	alkB, alkylation repair homolog 7 (E. coli)	Cytoplasm	other	7	245,083	3.18E-02	
ZFP90	ZFP90 zinc finger protein	Nucleus	other	6,786	36,256	2.72E-02	
FAM220A	family with sequence similarity 220, member A	Other	other	6.6	238,255	3.89E-02	
ZNF880	zinc finger protein 880	Other	other	6,19	61,594	6.52E-03	
UTP11L	UTP11-like, U3 small nucleolar ribonucleoprotein (yeast)	Nucleus	other	6,074	81,909	1.28E-02	
IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	Plasma Membrane	transmembrane receptor	5,94	23,199	3.51E-02	
LOC729083	uncharacterized LOC729083	Other	other	5,761	1512,86	3.31E-02	
PREPL	prolyl endopeptidase-like	Other	peptidase	5,513	85,561	2.83E-02	
ABT1	activator of basal transcription 1	Nucleus	transcription regulator	5,486	287,992	2.37E-02	
LINC01547	long intergenic non-protein coding RNA 1547	Cytoplasm	other	5,436	1187,74	6.30E-03	
LOC389834	ankyrin repeat domain 57 pseudogene	Other	other	5,405	45,929	4.51E-02	D
DHRS12	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 12	Nucleus	other	5,368	609,01	2.51E-02	
POPDC2	popeye domain containing 2	Other	other	5,349	465,236	3.98E-02	
NAA30	N(alpha)-acetyltransferase 30, NatC catalytic subunit	Cytoplasm	enzyme	5,152	220,54	3.76E-02	
TMEM44	transmembrane protein 44	Other	other	5,132	261,064	9.88E-03	
CUZD1	CUB and zona pellucida-like domains 1	Plasma Membrane	other	5,07	25,101	1.70E-02	
LOC101929149	uncharacterized LOC101929149	Other	other	4,867	29,361	7.17E-03	
MEF2BNB	MEF2B neighbor	Other	other	4,785	210,388	1.31E-02	
CYB5R4	cytochrome b5 reductase 4	Cytoplasm	enzyme	4,714	58,557	4.00E-02	
FAM209A	family with sequence similarity 209, member A	Other	other	4,697	304,408	4.78E-02	
EEFSEC	eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA-specific	Cytoplasm	translation regulator	4,581	449,142	5.14E-03	
FMO4	flavin containing monooxygenase 4	Cytoplasm	enzyme	4,557	490,407	3.38E-02	
MAU2	MAU2 sister chromatid cohesion factor	Nucleus	other	4,55	225,002	3.68E-02	
DLL1	delta-like 1 (Drosophila)	Plasma Membrane	enzyme	4,438	76,391	1.51E-02	
DLL1	delta-like 1 (Drosophila)	Plasma Membrane	enzyme	4,438	76,391	1.51E-02	
ZNF398	zinc finger protein 398	Nucleus	transcription regulator	4,426	57,896	2.26E-02	
PAAF1	proteasomal ATPase-associated factor 1	Other	other	4,413	129,418	2.42E-02	D
FTSJ1	FtsJ RNA methyltransferase homolog 1 (E. coli)	Other	enzyme	4,404	109,03	3.84E-04	
LAGE3	L antigen family, member 3	Other	other	4,351	472,096	5.06E-03	
AGAP2-AS1	AGAP2 antisense RNA 1	Other	other	4,244	144,828	1.68E-02	
C1QC	complement component 1, q subcomponent, C chain	Extracellular Space	other	4,012	195,216	1.07E-02	
PIP5K1P1	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, pseudogene 1	Other	other	4,005	57,685	4.53E-02	
HOMER3	homer homolog 3 (Drosophila)	Plasma Membrane	other	3,99	123,936	2.68E-02	
NAA38	N(alpha)-acetyltransferase 38, NatC auxiliary subunit	Nucleus	other	3,974	264,1	3.24E-02	
TNFRSF10C	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain	Plasma Membrane	transmembrane receptor	3,923	278,602	2.48E-02	
PVR	poliovirus receptor	Plasma Membrane	other	3,917	719,582	4.68E-02	
SLC25A13	solute carrier family 25 (aspartate/glutamate carrier), member 13	Cytoplasm	transporter	3,857	398,092	3.21E-02	
SLC10A3	solute carrier family 10, member 3	Plasma Membrane	transporter	3,848	119,756	1.89E-02	
LOC101928667	uncharacterized LOC101928667	Other	other	3,841	82,741	4.91E-02	
TMEM255B	transmembrane protein 255B	Other	other	3,77	34,996	4.33E-02	
RPS6KB1	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1	Cytoplasm	kinase	3,712	98,845	1.00E-02	
SLC31A1	solute carrier family 31 (copper transporter), member 1	Plasma Membrane	transporter	3,698	121,522	1.89E-02	
APBA1	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 1	Cytoplasm	transporter	3,669	51,348	2.94E-02	
ZNF618	zinc finger protein 618	Other	other	3,633	137,372	3.55E-02	
NBPF25P	neuroblastoma breakpoint family, member 25, pseudogene	Other	other	3,602	40,824	2.47E-02	
NPM3	nucleophosmin/nucleoplasmin 3	Nucleus	other	3,6	665,48	4.07E-02	
PAAF1	proteasomal ATPase-associated factor 1	Other	other	3,57	140,852	2.55E-02	D
TRPV1	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1	Plasma Membrane	ion channel	3,435	337,418	2.69E-02	
FBXL19	F-box and leucine-rich repeat protein 19	Other	other	3,371	1374,04	4.17E-02	
BMP1	bone morphogenetic protein 1	Extracellular Space	peptidase	3,335	146,374	2.17E-02	
FANCM	Fanconi anemia, complementation group M	Nucleus	enzyme	3,334	68,604	1.70E-02	
LOC389831 (includes others)	uncharacterized LOC389831	Other	other	3,326	53,431	3.78E-02	
CTSL3P	cathepsin L family member 3, pseudogene	Other	other	3,295	79,13	7.80E-03	
TASP1	taspase, threonine aspartase, 1	Nucleus	peptidase	3,171	319,58	6.95E-03	
ATG16L1	autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae)	Cytoplasm	other	3,17	1159,1	3.77E-02	
ATG2B	autophagy related 2B	Other	other	3,138	95,074	2.27E-02	
C6orf25	chromosome 6 open reading frame 25	Plasma Membrane	other	3,134	177,396	2.98E-02	
ZBTB24	zinc finger and BTB domain containing 24	Nucleus	other	3,117	233,892	6.95E-03	
FN3KRP	fructosamine 3 kinase related protein	Other	kinase	3,104	1025,68	4.40E-02	
INPP5E	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 72 kDa	Cytoplasm	phosphatase	3,103	48,492	3.77E-02	
ATXN7L1	ataxin 7-like 1	Other	other	3,085	1064,02	2.76E-02	

CDRT15	CMT1A duplicated region transcript 15	Other	other	3,082	129,294	4.18E-02
INPP5F	inositol polyphosphate-5-phosphatase F	Other	phosphatase	3,031	380,126	2.25E-02
C16orf93	chromosome 16 open reading frame 93	Other	other	3,026	277,592	1.08E-02
PLAC9	placenta-specific 9	Other	other	3,019	516.2	2.41E-03
PLAC9	placenta-specific 9	Other	other	3,019	516.2	2.41E-03
PPP1R10	protein phosphatase 1, regulatory subunit 10	Nucleus	other	3,016	515.7	2.21E-02
KIAA1671	KIAA1671	Other	other	3,005	40,838	3.27E-02
ZNF366	zinc finger protein 366	Nucleus	transcription regulator	2,992	38,634	4.45E-02
DIS3L	DIS3 like exosome 3'-5' exoribonuclease	Cytoplasm	enzyme	2,982	23,572	3.39E-02
APOBEC3A	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	Cytoplasm	enzyme	2,977	449.54	1.76E-02
STX5	syntaxin 5	Cytoplasm	transporter	2,971	746.88	8.77E-03
TNFAIP1	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	Plasma Membrane	ion channel	2,93	333.33	1.53E-02
RNMT	RNA (guanine-7-) methyltransferase	Nucleus	enzyme	2,928	312,498	9.84E-03
EPG5	ectopic P-granules autophagy protein 5 homolog (C. elegans)	Other	other	2,911	33,301	1.62E-02
PTER	phosphotriesterase related	Cytoplasm	enzyme	2,908	21,202	4.48E-02
EXOC3L1	exocyst complex component 3-like 1	Cytoplasm	other	2,905	80,928	1.50E-02
NUDT18	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 18	Cytoplasm	other	2,887	224,844	2.74E-02
CCSAP	centriole, cilia and spindle-associated protein	Cytoplasm	other	2,883	123,286	2.48E-02
TAF12	TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa	Nucleus	transcription regulator	2,831	301,872	3.82E-02
DENND6B	DENN/MADD domain containing 6B	Other	other	2,821	198,608	1.25E-02
FAM173A	family with sequence similarity 173, member A	Other	other	2,816	487.34	5.02E-04
CENPC	centromere protein C	Nucleus	other	2,809	612.12	3.92E-02
AAMDC	adipogenesis associated, Mth938 domain containing	Cytoplasm	other	2,806	836.2	3.33E-02
RBM15	RNA binding motif protein 15	Nucleus	other	2,796	425.48	8.60E-03
GYPB	glycophorin B (MNS blood group)	Plasma Membrane	other	2,791	24,389	1.11E-02
ZNF490	zinc finger protein 490	Nucleus	other	2,741	1084.14	4.14E-02
TLR8-AS1	TLR8 antisense RNA 1	Other	other	2,737	19,624	3.76E-02
LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	Extracellular Space	other	2,722	23,201	3.74E-02
COIL	collin	Nucleus	enzyme	2,716	88,908	1.10E-02
ARFRP1	ADP-ribosylation factor related protein 1	Cytoplasm	enzyme	2,67	123,109	4.51E-02
ZBTB20	zinc finger and BTB domain containing 20	Nucleus	other	2,664	251,002	1.53E-02
APBB3	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 3	Cytoplasm	other	2,615	1410.36	3.95E-02
LRRC40	leucine rich repeat containing 40	Nucleus	other	2,614	29,126	3.74E-02
FOXN2	forkhead box N2	Nucleus	other	2,588	56,068	4.12E-02
ZNF575	zinc finger protein 575	Nucleus	other	2,587	241.5	4.85E-02
VMAC	vimentin-type intermediate filament associated coiled-coil protein	Cytoplasm	other	2,573	560.1	5.55E-03
TRABD2B	TraB domain containing 2B	Plasma Membrane	peptidase	2,567	42.41	3.02E-03
GPSM2	G-protein signaling modulator 2	Nucleus	other	2,562	281,99	1.28E-02
HTRA4	HtrA serine peptidase 4	Other	peptidase	2,561	59,886	3.82E-02
RAB28	RAB28, member RAS oncogene family	Plasma Membrane	enzyme	2,555	425.88	4.93E-02
SRP14-AS1	SRP14 antisense RNA1 (head to head)	Other	other	2,532	49,139	4.93E-02
ANKLE1	ankyrin repeat and LEM domain containing 1	Other	other	2,527	334.24	8.16E-03
RGL4	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 4	Other	other	2,521	291,558	2.57E-02
LIG1	ligase I, DNA, ATP-dependent	Nucleus	enzyme	2,509	454.22	3.21E-02
HCG26	HLA complex group 26 (non-protein coding)	Other	other	2,491	148,926	1.24E-02
EVPLL	envoplakin-like	Other	other	2,471	10,176	4.58E-02
DNM1P46	DNM1 pseudogene 46	Other	other	2,47	1541.34	1.10E-02
LOC101928424	uncharacterized LOC101928424	Other	other	2,457	118,038	3.56E-02
HINFP	histone H4 transcription factor	Nucleus	transcription regulator	2,45	352.2	3.71E-02
CLEC1B	C-type lectin domain family 1, member B	Plasma Membrane	transmembrane receptor	2,44	337.96	4.68E-02
MTG1	mitochondrial ribosome-associated GTPase 1	Cytoplasm	enzyme	2,431	1227.68	2.86E-02
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	Cytoplasm	enzyme	2,414	48,488	3.81E-02
CTDSP1	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 1	Nucleus	phosphatase	2,398	858.9	3.77E-02
CTNS	cystinosis, lysosomal cystine transporter	Cytoplasm	transporter	2,384	452.28	1.09E-02
SKA2	spindle and kinetochore associated complex subunit 2	Nucleus	other	2,365	126,448	8.98E-03
RIF1	replication timing regulatory factor 1	Nucleus	other	2,359	77.49	3.78E-02
DNM1P46	DNM1 pseudogene 46	Other	other	2,355	1015.66	4.41E-02
MSH5	mutS homolog 5	Nucleus	enzyme	2,342	1053.78	2.41E-02
LOC389834	ankyrin repeat domain 57 pseudogene	Other	other	2,339	1408.16	3.57E-02
SPATA13	spermatogenesis associated 13	Plasma Membrane	other	2,338	622.2	1.08E-02
RAD54L2	RAD54-like 2 (S. cerevisiae)	Nucleus	transcription regulator	2,334	1222.94	3.89E-02
DDX39A	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39A	Nucleus	enzyme	2,328	1974.8	4.11E-02
TMEM194B	transmembrane protein 194B	Other	other	2,323	56,234	3.83E-02
AK4	adenylate kinase 4	Cytoplasm	kinase	2,314	38,462	6.65E-03
WDFY4	WDFY family member 4	Other	other	2,305	564.66	1.31E-02
SNRPN	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	Nucleus	other	2,299	13,827	4.34E-02
STK40	serine/threonine kinase 40	Cytoplasm	kinase	2,294	1126.46	4.66E-02
RTN3	reticulon 3	Cytoplasm	other	2,285	674.74	2.72E-02
ALDH3B1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	Cytoplasm	enzyme	2,275	1314.8	1.08E-03
C1QA	complement component 1, q subcomponent, A chain	Extracellular Space	other	2,272	321,836	1.90E-02
MMP17	matrix metalloproteinase 17 (membrane-inserted)	Extracellular Space	peptidase	2,25	243.7	1.52E-02
FAM73A	family with sequence similarity 73, member A	Other	other	2,242	50,108	2.55E-02
NISCH	nischarin	Plasma Membrane	transmembrane receptor	2,235	408.88	4.40E-02
NKAIN3	Na+/K+ transporting ATPase interacting 3	Other	other	2,224	18,389	4.90E-02
HCLS1	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	Nucleus	other	2,206	469.94	6.20E-03
TACR1	tachykinin receptor 1	Plasma Membrane	G-protein coupled	2,206	117,406	2.97E-02





SCARNA22	small Cajal body-specific RNA 22	Other	other	1,799	23,872	8.24E-03
SEMA4A	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4A	Plasma Membrane	other	1,794	835.96	5.29E-03
EMILIN1	elastin microfibril interfacier 1	Extracellular Space	other	1,789	221.84	3.92E-02
FNBP1	formin binding protein 1	Nucleus	enzyme	1,787	271.86	4.10E-02
FAM110C	family with sequence similarity 110, member C	Cytoplasm	other	1,783	18,354	4.50E-02
CDRT15P1	CMT1A duplicated region transcript 15 pseudogene 1	Other	other	1,78	219.08	4.19E-02
SLC22A23	solute carrier family 22, member 23	Other	transporter	1,777	326.58	3.77E-02
GCC2	GRIP and coiled-coil domain containing 2	Cytoplasm	other	1,77	67,482	4.44E-02
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Extracellular Space	cytokine	1,766	114.52	4.36E-02
C2orf83	chromosome 2 open reading frame 83	Other	transporter	1,764	19,972	2.26E-02
OR2M5	olfactory receptor, family 2, subfamily M, member 5	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	1,751	30,518	2.53E-02
FOXP4	forkhead box P4	Nucleus	transcription regulator	1,75	338.68	4.21E-02
HCRT	hypocretin (orexin) neuropeptide precursor	Extracellular Space	other	1,745	120.48	4.81E-02
PRODH2	proline dehydrogenase (oxidase) 2	Cytoplasm	enzyme	1,744	19,154	4.65E-02
ZNF81	zinc finger protein 81	Nucleus	transcription regulator	1,733	583.78	6.03E-03
LOC643711	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, catalytic subunit 2 (30kDa) pseudogene	Other	other	1,724	165.16	4.37E-02
KSR2	kinase suppressor of ras 2	Cytoplasm	kinase	1,72	18,348	4.71E-02
FPR2	formyl peptide receptor 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	1,706	276.5	1.06E-02
RBMX2	RNA binding motif protein, X-linked 2	Other	other	1,695	1070.06	4.70E-02
LUC7L3	LUC7-like 3 (S. cerevisiae)	Nucleus	other	1,678	90,798	4.00E-02
MEPCE	methylphosphate capping enzyme	Other	enzyme	1,672	750.02	4.38E-02
TRPV6	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6	Plasma Membrane	ion channel	1,672	16,704	4.95E-02
GPR156	G protein-coupled receptor 156	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	1,663	20,132	1.89E-02
CDC42SE1	CDC42 small effector 1	Plasma Membrane	other	1,649	376.56	3.30E-02
LRRC24	leucine rich repeat containing 24	Other	other	1,648	16,438	4.51E-02
HOXD9	homeobox D9	Nucleus	transcription regulator	1,646	101,794	3.37E-02
FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	Cytoplasm	enzyme	1,637	277.48	4.68E-02
MTX1	metaxin 1	Cytoplasm	transporter	1,629	558.44	1.11E-02
SLC11A2	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter), member 2	Plasma Membrane	transporter	1,622	826.38	4.03E-02
LOC101929709	uncharacterized LOC101929709	Other	other	1,607	181.42	2.20E-02
PDPR	pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit	Cytoplasm	enzyme	1,607	809.46	3.26E-02
ZNF468	zinc finger protein 468	Other	other	1,59	131.98	3.11E-02
IGLC1	immunoglobulin lambda constant 1 (Mcg marker)	Cytoplasm	other	1,585	23,232	9.66E-03
FAM219A	family with sequence similarity 219, member A	Other	other	1,574	697.78	2.48E-02
OR5J2	olfactory receptor, family 5, subfamily J, member 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	1,563	21.24	3.51E-02
COL9A2	collagen, type IX, alpha 2	Extracellular Space	other	1,559	12,694	4.35E-02
CDC40	cell division cycle 40	Nucleus	other	1,552	445.7	3.01E-02
TGFBRAP1	transforming growth factor, beta receptor associated protein 1	Other	other	1,549	388.48	4.73E-02
SOX13	SRY (sex determining region Y)-box 13	Nucleus	transcription regulator	1,547	7,434	2.13E-02
ASMTL-AS1	ASMTL antisense RNA 1	Other	other	1,543	2620.6	1.07E-02
LCAT	lecithin-cholesterol acyltransferase	Extracellular Space	enzyme	1,505	616.06	4.96E-02
SPDYE2 (includes others)	speedy/RINGO cell cycle regulator family member E6	Other	other	1,502	8504.4	4.34E-02

Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)	Fold Change	Other	p-value	Notes
FAHD2A	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2A	Other	enzyme	-41,465	127,604	1.93E-02	
ATP6AP1L	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 1-like	Other	other	-36.83	430.14	4.22E-02	
OLFM1	olfactomedin 1	Cytoplasm	other	-24,833	416,689	2.37E-02	
PDXP	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) phosphatase	Plasma Membrane	phosphatase	-23,527	153.05	8.47E-03	
ATF7IP2	activating transcription factor 7 interacting protein 2	Nucleus	other	-22,341	85,291	1.64E-02	
LILRB5	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 5	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-14,716	99,251	1.22E-02	
AACS	acetoacetyl-CoA synthetase	Cytoplasm	enzyme	-13,754	54,841	2.67E-02	
SLC35G2	solute carrier family 35, member G2	Cytoplasm	other	-12,348	42.41	7.98E-03	
KLHL21	kelch-like family member 21	Cytoplasm	other	-11,437	108,323	2.54E-03	
SNORA58	small nucleolar RNA, H/ACA box 58	Other	other	-11,097	63,577	1.26E-03	
LMO7	LIM domain 7	Cytoplasm	enzyme	-10,122	105,019	1.98E-02	
GK	glycerol kinase	Cytoplasm	kinase	-9,763	111,417	5.56E-03	
PRKAR1B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta	Cytoplasm	kinase	-9,094	53.05	4.70E-02	
TYW3	tRNA-yW synthesizing protein 3 homolog (S. cerevisiae)	Other	other	-8,799	188,176	1.06E-03	
MTFR1	mitochondrial fission regulator 1	Cytoplasm	other	-7,716	90,847	3.44E-02	
TPK1	thiamin pyrophosphokinase 1	Cytoplasm	kinase	-7,585	54,237	9.71E-03	
PRKAB2	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	Cytoplasm	kinase	-7,402	106.96	3.84E-03	
MAGED1	melanoma antigen family D1	Plasma Membrane	transcription regulator	-6.94	133,872	7.58E-03	
SNHG7	small nucleolar RNA host gene 7 (non-protein coding)	Other	other	-6,629	72,335	4.41E-02	
SNORD8	small nucleolar RNA, C/D box 8	Other	other	-6,341	203.12	3.80E-02	
DKFZp667F0711	uncharacterized protein DKFZp667F0711	Other	other	-6,313	45,866	3.43E-03	
YTHDF3	YTH N(6)-methyladenosine RNA binding protein 3	Cytoplasm	other	-5,885	75,536	1.27E-02	
ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	Plasma Membrane	transporter	-5,533	50,919	1.50E-02	
ERC1	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1	Cytoplasm	other	-5,437	26,952	4.67E-02	
EVA1B	eva-1 homolog B (C. elegans)	Other	other	-5,422	73,809	1.70E-02	
DUSP3	dual specificity phosphatase 3	Cytoplasm	phosphatase	-5,392	152.89	3.78E-02	

LINC00649	long intergenic non-protein coding RNA 649	Other	other	-5,329	123,585	5.95E-03
LMAN2L	lectin, mannose-binding 2-like	Cytoplasm	other	-5,156	120,855	7.47E-03
ZNF252P	zinc finger protein 252, pseudogene	Other	other	-5,151	72,975	1.57E-02
MED8	mediator complex subunit 8	Nucleus	other	-5,025	324,15	1.89E-02
CCDC85C	coiled-coil domain containing 85C	Plasma Membrane	other	-4,915	138,771	3.76E-02
FBXO42	F-box protein 42	Other	other	-4,76	160,527	2.49E-02
FLYWCH1	FLYWCH-type zinc finger 1	Other	other	-4,53	156,283	3.38E-02
BTF3L4	basic transcription factor 3-like 4	Other	other	-4,37	46,427	1.72E-02
TULP2	tubby like protein 2	Other	enzyme	-4,232	46,329	1.90E-02
DNAJC16	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 16	Other	other	-4,215	46,269	3.32E-02
ABCD4	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 4	Cytoplasm	transporter	-4,179	394,545	3.90E-02
TGFBRAP1	transforming growth factor, beta receptor associated protein 1	Other	other	-4,172	103,398	1.29E-02 D
TSPAN16	tetraspanin 16	Other	other	-4,171	946,82	2.44E-03
ORA1	ORAI calcium release-activated calcium modulator 1	Plasma Membrane	ion channel	-4,147	104,167	3.25E-02
AZIN2	antizyme inhibitor 2	Cytoplasm	enzyme	-4,039	33,8	4.66E-02
LINC01355	long intergenic non-protein coding RNA 1355	Other	other	-4,008	52,494	2.83E-02
KRTAP5-3/KRTAP5-5	keratin associated protein 5-5	Other	other	-3,994	138,992	4.62E-02
ZNF275	zinc finger protein 275	Nucleus	other	-3,981	39,424	9.08E-03
PDE8B	phosphodiesterase 8B	Cytoplasm	enzyme	-3,929	32,81	3.55E-02
GSG2	germ cell associated 2 (haspin)	Nucleus	kinase	-3,867	162,633	4.80E-02
ANKRD52	ankyrin repeat domain 52	Nucleus	transcription regulator	-3,864	162,574	1.52E-02
ZNF326	zinc finger protein 326	Nucleus	transcription regulator	-3,833	49,07	1.96E-02
ZNF555	zinc finger protein 555	Other	other	-3,814	63,075	4.35E-02 D
F8	coagulation factor VIII, procoagulant component	Extracellular Space	peptidase	-3,765	91,261	1.30E-02
KIF9	kinesin family member 9	Cytoplasm	enzyme	-3,752	29,908	4.14E-02
CCDC71L	coiled-coil domain containing 71-like	Other	other	-3,745	22,667	1.45E-02
ZNF12	zinc finger protein 12	Nucleus	transcription regulator	-3,729	69,471	2.78E-02
WTAP	Wilms tumor 1 associated protein	Nucleus	other	-3,665	114,738	3.64E-02
ZNF555	zinc finger protein 555	Other	other	-3,648	33,061	3.94E-02 D
EYA3	EYA transcriptional coactivator and phosphatase 3	Nucleus	phosphatase	-3,615	506,3	1.07E-02
ARPIN/C15orf38-AP3S2	C15orf38-AP3S2 readthrough	Plasma Membrane	other	-3,609	48,261	2.26E-02
POLRMT	polymerase (RNA) mitochondrial (DNA directed)	Cytoplasm	enzyme	-3,537	264,596	4.69E-02
RACGAP1P	Rac GTPase activating protein 1 pseudogene	Other	other	-3,495	50,242	1.97E-02
NHSL2	NHS-like 2	Other	other	-3,456	90,001	1.45E-02
RPS6KA4	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 4	Cytoplasm	kinase	-3,443	202,862	3.43E-02
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	Cytoplasm	other	-3,41	429,232	7.23E-03
C17orf97	chromosome 17 open reading frame 97	Other	other	-3,369	58,568	4.18E-02
SEL1L	sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)	Cytoplasm	other	-3,341	27,286	2.55E-02
DPY19L1	dpy-19-like 1 (C. elegans)	Other	other	-3,328	26,068	1.52E-02
ATXN1L	ataxin 1-like	Nucleus	other	-3,279	174,565	2.75E-02
GRIN3A	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 3A	Plasma Membrane	ion channel	-3,23	49,988	4.51E-02
CCDC170	coiled-coil domain containing 170	Extracellular Space	other	-3,228	68,596	4.24E-02
C11orf73	chromosome 11 open reading frame 73	Cytoplasm	transporter	-3,214	270,334	3.42E-02
SPRED2	sprouty-related, EVH1 domain containing 2	Extracellular Space	cytokine	-3,198	125,411	3.36E-02
KLF12	Kruppel-like factor 12	Nucleus	transcription regulator	-3,19	70,605	4.68E-02
CTBP1-AS2	CTBP1 antisense RNA 2 (head to head)	Other	other	-3,182	286,975	3.61E-02
GPR35	G protein-coupled receptor 35	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-3,162	147,282	2.29E-03
NIF3L1	NIF3 NGG1 interacting factor 3-like 1 (S. cerevisiae)	Cytoplasm	other	-3,158	240,828	1.08E-02
FARP2	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2	Cytoplasm	other	-3,121	230,106	2.46E-02
PAQR4	progesterin and adipoQ receptor family member IV	Other	other	-3,055	772,01	2.94E-02
PDLIM7	PDZ and LIM domain 7 (enigma)	Cytoplasm	other	-3,049	302,174	4.51E-02
TCP11L2	t-complex 11, testis-specific-like 2	Other	other	-3,048	383,952	2.56E-02
SKAP1	src kinase associated phosphoprotein 1	Cytoplasm	kinase	-2,995	140,656	4.03E-03
GRPEL2	GrpE-like 2, mitochondrial (E. coli)	Cytoplasm	other	-2,987	37,164	4.03E-02
FUT8	fucosyltransferase 8 (alpha (1,6) fucosyltransferase)	Cytoplasm	enzyme	-2,983	47,287	2.51E-02
CRYBB2P1	crystallin, beta B2 pseudogene 1	Other	other	-2,952	194,682	1.80E-02
UBA6-AS1	UBA6 antisense RNA 1 (head to head)	Other	other	-2,916	35,315	3.45E-02
RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	Cytoplasm	enzyme	-2,898	27,256	4.32E-02
ASF1A	anti-silencing function 1A histone chaperone	Nucleus	other	-2,883	36,507	3.39E-02
IKZF5	IKAROS family zinc finger 5 (Pegasus)	Nucleus	other	-2,873	66,365	4.74E-02
RNF139	ring finger protein 139	Cytoplasm	enzyme	-2,825	30,969	3.41E-02
UQCRC10	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit X	Cytoplasm	enzyme	-2,757	483,808	1.48E-02
GCHFR	GTP cyclohydrolase I feedback regulator	Cytoplasm	other	-2,748	457,936	1.02E-02
SNRPN	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	Nucleus	other	-2,727	615,12	3.73E-02 D
LSS	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	Cytoplasm	enzyme	-2,717	15,683	2.32E-02
CCDC124	coiled-coil domain containing 124	Other	other	-2,707	180,218	4.92E-02
STX1A	syntaxin 1A (brain)	Cytoplasm	transporter	-2,665	33,922	3.37E-02
CCDC58	coiled-coil domain containing 58	Cytoplasm	other	-2,662	582,08	7.01E-03
PPP1R17	protein phosphatase 1, regulatory subunit 17	Cytoplasm	other	-2,607	81,097	4.05E-02
MSTO1	misato 1, mitochondrial distribution and morphology regulator	Cytoplasm	other	-2,59	166,067	4.58E-02
SREK1IP1	SREK1-interacting protein 1	Other	other	-2,579	19,936	4.24E-02

CCDC26	CCDC26 long non-coding RNA	Other	other	-2,514	232,628	7.69E-03
ANKDD1B	ankyrin repeat and death domain containing 1B	Other	other	-2,487	15,783	6.86E-04
L3MBTL1	[(3)mbt-like 1 (Drosophila)]	Nucleus	other	-2,475	24,767	3.60E-02
LYPLA2	lysophospholipase II	Cytoplasm	enzyme	-2,47	605,66	2.48E-02
LINC01545	long intergenic non-protein coding RNA 1545	Other	other	-2,453	62,684	3.08E-02
ACTR5	ARP5 actin-related protein 5 homolog (yeast)	Other	other	-2,43	366,68	4.01E-02
DNMBP-AS1	DNMBP antisense RNA 1	Other	other	-2,421	23,145	4.85E-02
CD82	CD82 molecule	Plasma Membrane	other	-2,397	172,864	3.36E-02
DAGLB	diacylglycerol lipase, beta	Plasma Membrane	enzyme	-2,387	556,92	1.62E-02
PECR	peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	Cytoplasm	enzyme	-2,354	42,83	1.96E-02
PCBD2	pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1) 2	Other	enzyme	-2,346	295,154	2.71E-02
ZNF324B	zinc finger protein 324B	Other	other	-2,338	82,608	3.73E-02
GPATCH2	G patch domain containing 2	Other	other	-2,307	287,12	2.57E-02
LOC729732	uncharacterized LOC729732	Other	other	-2,303	255,626	3.35E-02
ACACB	acetyl-CoA carboxylase beta	Cytoplasm	enzyme	-2,275	137,93	2.21E-02
PSMB2	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2	Cytoplasm	peptidase	-2,268	259,004	3.61E-02
ABC88	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 8	Cytoplasm	transporter	-2,253	59,372	2.67E-02
DAAM1	dishevelled associated activator of morphogenesis 1	Cytoplasm	other	-2,248	90,766	3.56E-02
CDH16	cadherin 16, KSP-cadherin	Plasma Membrane	enzyme	-2,245	24,716	3.07E-02
PSTK	phosphoserine-1RNA kinase	Cytoplasm	kinase	-2,201	8,381	3.04E-02
ERMN	ermin, ERM-like protein	Extracellular Space	other	-2,2	240,22	9.02E-04
PTS	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase	Cytoplasm	enzyme	-2,179	139,702	7.67E-03
KLF6	Kruppel-like factor 6	Nucleus	transcription regulator	-2,175	69,768	2.55E-02
EIF3B	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B	Cytoplasm	translation regulator	-2,152	747,18	1.93E-02 D
EIF3B	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B	Cytoplasm	translation regulator	-2,15	1053,94	1.59E-02 D
TBL2	transducin (beta)-like 2	Plasma Membrane	other	-2,146	281,668	3.69E-02
KIAA1683	KIAA1683	Other	other	-2,133	519,026	4.15E-02
ANAPC1	anaphase promoting complex subunit 1	Nucleus	other	-2,115	68,01	4.12E-02
STAM	signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 1	Cytoplasm	other	-2,113	258,96	3.44E-02
PTCD3	pentatricopeptide repeat domain 3	Cytoplasm	other	-2,108	246,92	4.07E-02
ARID3B	AT rich interactive domain 3B (BRIGHT-like)	Nucleus	other	-2,104	48,138	3.41E-02
ZSWIM3	zinc finger, SWIM-type containing 3	Other	other	-2,098	74,15	2.14E-02
RNF123	ring finger protein 123	Cytoplasm	other	-2,091	597,18	2.67E-02
PRDM15	PR domain containing 15	Nucleus	other	-2,078	184,686	4.64E-02
TRIM11	tripartite motif containing 11	Cytoplasm	enzyme	-2,064	543,8	3.76E-02
ARL3	ADP-ribosylation factor-like 3	Cytoplasm	enzyme	-2,052	270,84	8.94E-03
KLC3	kinesin light chain 3	Cytoplasm	other	-2,034	66,48	3.31E-02
BBS5	Bardet-Biedl syndrome 5	Cytoplasm	other	-2,031	17,761	4.11E-02
TRMT13	tRNA methyltransferase 13 homolog (S. cerevisiae)	Other	other	-2,026	11,47	3.76E-02
GHRLOS	ghrelin opposite strand/antisense RNA	Other	other	-2,023	220,04	4.59E-03
CLIP2	CAP-GLY domain containing linker protein 2	Cytoplasm	transcription regulator	-2,018	342,5	4.28E-02
COL10A1	collagen, type X, alpha 1	Extracellular Space	other	-2,017	15,024	4.77E-02
CUL4B	cullin 4B	Nucleus	other	-2,005	605,4	2.12E-02
GALNT11	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11	Cytoplasm	enzyme	-1,996	149,42	1.55E-02
PK3	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 3	Cytoplasm	kinase	-1,996	324,6	3.67E-02
SIGLEC9	sialic acid binding Ig-like lectin 9	Plasma Membrane	other	-1,996	556,32	4.35E-02
P2RY1	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-1,987	77,2	1.62E-02
TLE4	transducin-like enhancer of split 4	Nucleus	transcription regulator	-1,975	47,312	6.79E-03
LATS1	large tumor suppressor kinase 1	Nucleus	kinase	-1,953	79,21	1.94E-02
RER1	retention in endoplasmic reticulum sorting receptor 1	Cytoplasm	other	-1,948	278,3	4.14E-02
C10orf111	chromosome 10 open reading frame 111	Other	other	-1,9	17,759	4.81E-02
BAIAP2-AS1	BAIAP2 antisense RNA 1 (head to head)	Other	other	-1,892	1701,12	4.48E-02
FAM160B1	family with sequence similarity 160, member B1	Other	other	-1,885	264,3	8.10E-03
NSMCE1	non-SMC element 1 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	transporter	-1,879	485,14	3.07E-02
AP2B1	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	Plasma Membrane	transporter	-1,867	844,06	1.78E-02
BMP2K	BMP2 inducible kinase	Nucleus	kinase	-1,845	82,128	1.91E-02
SAMM50	SAMM50 sorting and assembly machinery component	Cytoplasm	other	-1,844	866,72	3.42E-02
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Cytoplasm	enzyme	-1,837	281,82	3.14E-02
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Cytoplasm	enzyme	-1,837	281,82	3.14E-02
LOC158402	uncharacterized LOC158402	Other	other	-1,827	557,78	4.96E-02
SARS	seryl-tRNA synthetase	Cytoplasm	enzyme	-1,822	74,112	4.73E-02
XXYL1	xyloside xylosyltransferase 1	Other	other	-1,822	145,16	2.95E-02
LCN15	lipocalin 15	Other	other	-1,813	523,3	4.05E-02
ACVR1B	activin A receptor, type 1B	Plasma Membrane	kinase	-1,781	738,86	3.83E-02
LOC401320	uncharacterized LOC401320	Other	other	-1,781	995,82	4.17E-02
MPDZ	multiple PDZ domain protein	Plasma Membrane	other	-1,78	10,908	1.73E-02
NPPB	natriuretic peptide B	Extracellular Space	other	-1,764	24,3	4.78E-02
GTSE1-AS1	GTSE1 antisense RNA 1 (head to head)	Other	other	-1,762	99,192	1.35E-02
GBAS	glioblastoma amplified sequence	Plasma Membrane	other	-1,76	849,38	4.95E-02
NRDE2	NRDE-2, necessary for RNA interference, domain containing	Other	other	-1,756	164,74	3.38E-02
ZSCAN29	zinc finger and SCAN domain containing 29	Nucleus	other	-1,751	548,54	4.49E-02

LINC-PINT	long intergenic non-protein coding RNA, p53 induced transcript	Other	other	-1,742	161,54	2,44E-02 D
RAPH1	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1	Plasma Membrane	other	-1,738	413,68	4,97E-02
CBR4	carbonyl reductase 4	Cytoplasm	enzyme	-1,73	44,18	3,25E-02
LOC101927043	uncharacterized LOC101927043	Other	other	-1,713	623,12	8,99E-03
PNRC2	proline-rich nuclear receptor coactivator 2	Nucleus	other	-1,707	96,966	4,51E-02
CNEP1R1	CTD nuclear envelope phosphatase 1 regulatory subunit 1	Nucleus	other	-1,682	207,66	4,87E-02
LINC-PINT	long intergenic non-protein coding RNA, p53 induced transcript	Other	other	-1,676	134,16	1,80E-02 D
HRH2	histamine receptor H2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-1,66	2817,6	2,32E-02
MAGI3	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 3	Cytoplasm	kinase	-1,654	13,118	3,00E-02
PCYT1A	phosphate cytidylyltransferase 1, choline, alpha	Cytoplasm	enzyme	-1,654	2226,4	2,81E-02
USP12	ubiquitin specific peptidase 12	Cytoplasm	peptidase	-1,654	464,06	1,53E-02
TNFAIP8	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	Cytoplasm	other	-1,625	470,02	8,59E-03
EIF3C	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C	Other	translation regulator	-1,611	2380	1,55E-02
ZBTB1	zinc finger and BTB domain containing 1	Nucleus	other	-1,593	223,24	2,20E-03
PCSK7	proprotein convertase subtilisin/kexin type 7	Cytoplasm	peptidase	-1,574	1987,4	2,58E-03
TMEM199	transmembrane protein 199	Other	other	-1,567	64,75	2,56E-02
SDHC	succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein, 15kDa	Cytoplasm	enzyme	-1,559	1364	3,97E-02
HSPB11	heat shock protein family B (small), member 11	Extracellular Space	other	-1,547	748,92	4,83E-02
TVP23C	trans-golgi network vesicle protein 23 homolog C (S. cerevisiae)	Other	other	-1,547	835,58	4,35E-02
ZNFX1	zinc finger, NFX1-type containing 1	Nucleus	transcription regulator	-1,546	1295,6	2,41E-02
GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta	Nucleus	kinase	-1,544	589,56	2,08E-02
CAP1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	Plasma Membrane	other	-1,536	8308,2	2,61E-02
ZC3H18	zinc finger CCH-type containing 18	Nucleus	other	-1,532	1014	3,87E-02
NOP56	NOP56 ribonucleoprotein	Nucleus	other	-1,524	963,8	2,50E-02
HERC3	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 3	Cytoplasm	enzyme	-1,507	62,8	2,38E-02
PLXNC1	plexin C1	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-1,503	1615,8	2,26E-02

## References

1. Canello, R., and K. Clément. 2006. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 113: 1141–1147.
2. Dalmás, E., C. Rouault, M. Abdennour, C. Rovere, S. Rizkalla, A. Bar-Hen, J.-L. Nahon, J.-L. Bouillot, M. Guerre-Millo, K. Clément, and C. Poitou. 2011. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am. J. Clin. Nutr.* 94: 450–458.
3. Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454: 436–444.
4. Hotamisligil, G. S., and E. Erbay. 2008. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 923–934.
5. Hansson, G. K., and P. Libby. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 508–519.
6. Saxena, N. K., and D. Sharma. 2013. Multifaceted leptin network: the molecular connection between obesity and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 18: 309–320.
7. Kullo, I. J., D. D. Hensrud, and T. G. Allison. 2002. Comparison of numbers of circulating blood monocytes in men grouped by body mass index (<25, 25 to <30, > or =30). *Am. J. Cardiol.* 89: 1441–1443.
8. Cottam, D. R., P. A. Schaefer, G. W. Shaftan, L. Velcu, and L. D. G. Angus. 2002. Effect of surgically-induced weight loss on leukocyte indicators of chronic inflammation in morbid obesity. *Obes. Surg.* 12: 335–342.
9. Pandzic Jaksic, V., B. Gizdic, Z. Miletic, K. Trutin-Ostovic, and O. Jaksic. 2013. Association of monocyte CCR2 expression with obesity and insulin resistance in postmenopausal women. *Clin. Investig. Med. Médecine Clin. Exp.* 36: E24–31.
10. Waterhouse, D. F., R. A. Cahill, F. Sheehan, and C. McCreery. 2008. Prediction of calculated future cardiovascular disease by monocyte count in an asymptomatic population. *Vasc. Health Risk Manag.* 4: 177–187.
11. Han, K. H., R. K. Tangirala, S. R. Green, and O. Quehenberger. 1998. Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 1983–1991.
12. Sala, F., L. Cutuli, L. Grigore, A. Pirillo, G. Chiesa, A. L. Catapano, and G. D. Norata. 2013. Prevalence of classical CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> but not of intermediate CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> monocytes in hypoalphalipoproteinemia. *Int. J. Cardiol.* 168: 2886–2889.
13. Rogacev, K. S., B. Cremers, A. M. Zawada, S. Seiler, N. Binder, P. Ege, G. Große-Dunker, I. Heisel, F. Hornof, J. Jeken, N. M. Rebling, C. Ulrich, B. Scheller, M. Böhm, D. Fliser, and G. H. Heine. 2012. CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60: 1512–1520.
14. Berg, K. E., I. Ljungcrantz, L. Andersson, C. Bryngelsson, B. Hedblad, G. N. Fredrikson, J. Nilsson, and H. Björkbacka. 2012. Elevated CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes predict cardiovascular events. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 5: 122–131.
15. Hatanaka, E., P. T. Monteagudo, M. S. M. Marrocos, and A. Campa. 2006. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 146: 443–447.
16. Wong, K. L., J. J.-Y. Tai, W.-C. Wong, H. Han, X. Sem, W.-H. Yeap, P. Kourilsky, and S.-C. Wong. 2011. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118: e16–31.

17. Zawada, A. M., K. S. Rogacev, B. Rotter, P. Winter, R.-R. Marell, D. Fliser, and G. H. Heine. 2011. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118: e50–61.
18. Zawada, A. M., K. S. Rogacev, B. Rotter, P. Winter, R.-R. Marell, D. Fliser, and G. H. Heine. 2011. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118: e50–61.
19. Cros, J., N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S.-Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S. K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J.-P. Jais, D. D’Cruz, J.-L. Casanova, C. Trouillet, and F. Geissmann. 2010. Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33: 375–386.
20. Ziegler-Heitbrock, L. 2007. The CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 81: 584–592.
21. Devèvre, E. F., M. Renovato-Martins, K. Clément, C. Sautès-Fridman, I. Cremer, and C. Poitou. 2015. Profiling of the three circulating monocyte subpopulations in human obesity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194: 3917–3923.
22. Repnik, U., M. Knezevic, and M. Jeras. 2003. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *J. Immunol. Methods* 278: 283–292.
23. Poitou, C., E. Dalmas, M. Renovato, V. Benhamo, F. Hajdouch, M. Abdennour, J.-F. Kahn, N. Veyrie, S. Rizkalla, W.-H. Fridman, C. Sautès-Fridman, K. Clément, and I. Cremer. 2011. CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 2322–2330.
24. Kusminski, C. M., W. L. Holland, K. Sun, J. Park, S. B. Spurgin, Y. Lin, G. R. Askew, J. A. Simcox, D. A. McClain, C. Li, and P. E. Scherer. 2012. MitoNEET-driven alterations in adipocyte mitochondrial activity reveal a crucial adaptive process that preserves insulin sensitivity in obesity. *Nat. Med.* 18: 1539–1549.
25. Krinninger, P., R. Ensenaer, K. Ehlers, K. Rauh, J. Stoll, S. Krauss-Etschmann, H. Hauner, and H. Laumen. 2014. Peripheral monocytes of obese women display increased chemokine receptor expression and migration capacity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99: 2500–2509.
26. Won, J. C., C.-Y. Park, S. W. Oh, E. S. Lee, B.-S. Youn, and M.-S. Kim. 2014. Plasma clusterin (ApoJ) levels are associated with adiposity and systemic inflammation. *PLoS One* 9: e103351.
27. Jenne, D. E., B. Lowin, M. C. Peitsch, A. Böttcher, G. Schmitz, and J. Tschopp. 1991. Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma. *J. Biol. Chem.* 266: 11030–11036.
28. Banfi, C., M. Brioschi, S. Barcella, R. Wait, S. Begum, S. Galli, A. Rizzi, and E. Tremoli. 2009. Proteomic analysis of human low-density lipoprotein reveals the presence of prenylcysteine lyase, a hydrogen peroxide-generating enzyme. *Proteomics* 9: 1344–1352.
29. Karlsson, H., P. Leanderson, C. Tagesson, and M. Lindahl. 2005. Lipoproteomics I: mapping of proteins in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 5: 551–565.
30. Sun, H.-Y., S.-F. Chen, M.-D. Lai, T.-T. Chang, T.-L. Chen, P.-Y. Li, D.-B. Shieh, and K.-C. Young. 2010. Comparative proteomic profiling of plasma very-low-density and low-density lipoproteins. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 411: 336–344.
31. Jones, S. E., and C. Jomary. 2002. Clusterin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 427–431.
32. Trougakos, I. P., and E. S. Gonos. 2002. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 1430–1448.
33. Choi-Miura, N. H., and T. Oda. 1996. Relationship between multifunctional protein “clusterin” and Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 17: 717–722.

34. Hoofnagle, A. N., M. Wu, A. K. Gosmanova, J. O. Becker, E. M. Wijsman, J. D. Brunzell, S. E. Kahn, R. H. Knopp, T. J. Lyons, and J. W. Heinecke. 2010. Low clusterin levels in high-density lipoprotein associate with insulin resistance, obesity, and dyslipoproteinemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 2528–2534.
35. Baralla, A., E. Sotgiu, M. Deiana, S. Pasella, S. Pinna, A. Mannu, E. Canu, G. Sotgiu, A. Ganau, A. Zinellu, S. Sotgia, C. Carru, and L. Deiana. 2015. Plasma Clusterin and Lipid Profile: A Link with Aging and Cardiovascular Diseases in a Population with a Consistent Number of Centenarians. *PLOS ONE* 10: e0128029.
36. Park, S., K. W. Mathis, and I. K. Lee. 2014. The physiological roles of apolipoprotein J/clusterin in metabolic and cardiovascular diseases. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 15: 45–53.
37. Keophiphath, M., C. Rouault, A. Divoux, K. Clément, and D. Lacasa. 2010. CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 39–45.
38. Luehmann, H. P., E. D. Pressly, L. Detering, C. Wang, R. Pierce, P. K. Woodard, R. J. Gropler, C. J. Hawker, and Y. Liu. 2014. PET/CT imaging of chemokine receptor CCR5 in vascular injury model using targeted nanoparticle. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 55: 629–634.
39. Poitou, C., N. Viguier, R. Canello, R. De Matteis, S. Cinti, V. Stich, C. Coussieu, E. Gauthier, M. Courtine, J. D. Zucker, G. S. Barsh, W. Saris, P. Bruneval, A. Basdevant, D. Langin, and K. Clément. 2005. Serum amyloid A: production by human white adipocyte and regulation by obesity and nutrition. *Diabetologia* 48: 519–528.
40. Poitou, C., C. Coussieu, C. Rouault, M. Coupaye, R. Canello, J.-F. Bedel, M. Gouillon, J.-L. Bouillot, J.-M. Oppert, A. Basdevant, and K. Clément. 2006. Serum amyloid A: a marker of adiposity-induced low-grade inflammation but not of metabolic status. *Obes. Silver Spring Md* 14: 309–318.
41. Mayer, J. M., M. Raraty, J. Slavin, E. Kemppainen, J. Fitzpatrick, A. Hietaranta, P. Puolakkainen, H. G. Beger, and J. P. Neoptolemos. 2002. Serum amyloid A is a better early predictor of severity than C-reactive protein in acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* 89: 163–171.
42. Cunnane, G., S. Grehan, S. Geoghegan, C. McCormack, D. Shields, A. S. Whitehead, B. Bresnihan, and O. Fitzgerald. 2000. Serum amyloid A in the assessment of early inflammatory arthritis. *J. Rheumatol.* 27: 58–63.
43. Gouwy, M., M. De Buck, N. Pörtner, G. Opdenakker, P. Proost, S. Struyf, and J. Van Damme. 2015. Serum amyloid A chemoattracts immature dendritic cells and indirectly provokes monocyte chemotaxis by induction of cooperating CC and CXC chemokines. *Eur. J. Immunol.* 45: 101–112.
44. Merino, A., P. Buendia, A. Martin-Malo, P. Aljama, R. Ramirez, and J. Carracedo. 2011. Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186: 1809–1815.
45. Thomas, A. C., W. J. Eijgelaar, M. J. A. P. Daemen, and A. C. Newby. 2015. Foam Cell Formation In Vivo Converts Macrophages to a Pro-Fibrotic Phenotype. *PloS One* 10: e0128163.
46. Williams, L. M., and A. J. Ridley. 2000. Lipopolysaccharide induces actin reorganization and tyrosine phosphorylation of Pyk2 and paxillin in monocytes and macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164: 2028–2036.
47. Kleveta, G., K. Borzęcka, M. Zdioruk, M. Czerkies, H. Kuberczyk, N. Sybirna, A. Sobota, and K. Kwiatkowska. 2012. LPS induces phosphorylation of actin-regulatory proteins leading to actin reassembly and macrophage motility. *J. Cell. Biochem.* 113: 80–92.
48. Choi, S.-H., R. Harkewicz, J. H. Lee, A. Boullier, F. Almazan, A. C. Li, J. L. Witztum, Y. S. Bae, and Y. I. Miller. 2009. Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake. *Circ. Res.* 104: 1355–1363.
49. Zhu, C., G. Saberwal, Y. Lu, L. C. Plataniias, and E. A. Eklund. 2004. The interferon consensus sequence-binding protein activates transcription of the gene encoding neurofibromin 1. *J. Biol. Chem.* 279: 50874–50885.



50. Stansfield, B. K., W. K. Bessler, R. Mali, J. A. Mund, B. D. Downing, R. Kapur, and D. A. Ingram. 2014. Ras-Mek-Erk signaling regulates Nf1 heterozygous neointima formation. *Am. J. Pathol.* 184: 79–85.
51. Li, M., and R. M. Ransohoff. 2009. The roles of chemokine CXCL12 in embryonic and brain tumor angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 19: 111–115.
52. Sánchez-Martín, L., A. Estecha, R. Samaniego, S. Sánchez-Ramón, M. Á. Vega, and P. Sánchez-Mateos. 2011. The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression. *Blood* 117: 88–97.
53. Arendt, L. M., J. McCreedy, P. J. Keller, D. D. Baker, S. P. Naber, V. Seewaldt, and C. Kuperwasser. 2013. Obesity promotes breast cancer by CCL2-mediated macrophage recruitment and angiogenesis. *Cancer Res.* 73: 6080–6093.
54. Farouk, S. S., D. J. Rader, M. P. Reilly, and N. N. Mehta. 2010. CXCL12: a new player in coronary disease identified through human genetics. *Trends Cardiovasc. Med.* 20: 204–209.

## DISCUSSION

L'obésité provoque des modifications de l'homéostasie immunitaire associées à des complications affectant de nombreux organes. En effet, l'obésité active des réponses inflammatoires dans le tissu adipeux, le foie, les muscles, le pancréas et le cerveau. Des modifications fonctionnelles au niveau de l'épithélium intestinal, telle que la modification de sa perméabilité, pourraient être à l'origine de l'inflammation chronique de l'obésité. L'inflammation systémique est centrale dans le maintien de l'inflammation chronique. Elle est caractérisée par une augmentation chronique des marqueurs circulants de l'inflammation, une activation de l'endothélium, et une activation des cellules immunitaires mononuclées circulantes. Les monocytes capables de détecter des facteurs circulants modifiés dans l'obésité sont augmentés, et la proportion des trois sous populations de monocytes est modifiée. Afin de comprendre leur implication éventuelle dans le développement des complications associées à l'obésité nous avons cherché à caractériser le plus largement possible les monocytes en considérant chacune des trois sous populations individuellement.

### A. Modulations phénotypiques et fonctionnelles des monocytes par l'obésité

Notre première étude a confirmé le phénotype pro-inflammatoire des monocytes dans l'obésité avec l'up-régulation par les trois sous populations de monocytes des récepteurs PPRs TLR4 et TLR8. Cette étude a également montré une up-régulation des récepteurs de chimiokine CCR2, CCR5 et CX3CR1 qui est variable en fonction des sous populations de monocytes. Les tests d'activation *in vitro* de TLR4 et de TLR8 ont montré également que la modulation de leur réponse par l'obésité était variable selon la sous-population considérée. Le premier point à discuter concerne la modulation spécifique de certains marqueurs ou de certaines fonctions par chacune des sous populations de monocytes. Si effectivement ces effets sont observés, il ne faut pas perdre de vue que chaque sous-population exprime différemment ces marqueurs en situation non pathologique. Si nous prenons par exemple le cas de CCR2, il est normalement très fortement exprimé par les CM, peu par les IM et pas du tout par les NCM. Chez les sujets obèses, il y a up-régulation tout en conservant la même hiérarchie dans l'expression par les sous populations. Nous retrouvons le même principe avec CX3CR1, qui est exprimé par chacune des sous populations de monocytes mais moins par les CM que par les IM qui eux l'expriment moins que les NCM. Concernant CCR5, la situation

est un peu différente puisque l'on observe l'acquisition de l'expression de ce récepteur par les CM. Ceci implique que chez les sujets obèses, le chimiotactisme des monocytes et de leur sous population majoritaire les CM, est non seulement très fortement gouverné par CCL2 (un des ligands de CCR2), mais également par CCL5 (un des ligands de CCR5) dont la production est augmentée par le tissu adipeux au cours de l'obésité (196). Au niveau fonctionnel cette remarque est également valable. Les IM des témoins stimulés par LPS ou ssRNA produisent le plus TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  comparés aux CM et aux NCM. De la même façon, les IM des sujets obèses produisent également plus de TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  comparés aux CM et aux NCM. Par contre, les CM de sujets obèses comparés à ceux des témoins produisent significativement plus d'IL-1 $\beta$  après stimulation de TLR4 par LPS et de TNF- $\alpha$  après stimulation de TLR8 par l'ARN simple brin. Ils sont donc devenus plus réactifs et cette modulation de la fonctionnalité n'est pas négligeable étant donné que les CM représentent 80 à 90% des monocytes. Concernant, la quantité de TNF- $\alpha$  sécrétée par les CM après stimulation de TLR8 par l'ARN simple brin chez les sujets obèses, elle rejoint celle des deux sous populations minoritaires. Par conséquent, chez les sujets obèses toutes les sous populations de monocytes produiraient TNF- $\alpha$  dans les mêmes proportions et en plus grande quantité que chez les témoins suite à une stimulation de TLR8. Ce qui signifie que l'ensemble des monocytes pourrait participer à l'augmentation du taux de TNF- $\alpha$  observé dans la circulation de patients obèses comparés à des témoins (Tableau 1) par le biais de la signalisation par TLR8 qui serait activée par des signaux qu'il reste à définir. Cela aurait des conséquences sur le métabolisme du glucose des cellules immunitaires circulantes dont les monocytes, par une action paracrine et autocrine. En effet, le TNF- $\alpha$  sécrété par les monocytes activés pourrait interagir avec son récepteur à la surface des monocytes ce qui entraînerait une activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et la production de cytokines pro-inflammatoires dont IL-1 $\beta$ . L'IL-1 $\beta$  sécrétée pourrait lui-même interagir avec son récepteur à la surface des monocytes et entraîner l'activation de MAPKs qui inhiberaient la voie de signalisation de l'insuline. Le métabolisme du glucose des monocytes serait modifié avec par exemple une diminution du transport du glucose dans les cellules et une augmentation du stockage du glycogène. L'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline pourrait aussi avoir des conséquences sur la différenciation des monocytes. Mais ces hypothèses restent à démontrer. Le TNF- $\alpha$  sécrété pourrait également avoir le même effet sur d'autres cellules immunitaires circulantes (Figures 2).

## **B. L'up-régulation et l'augmentation de la fonctionnalité de TLR4 et de TLR8 par les monocytes chez les sujets obèses**

L'up-régulation de TLR4 par les monocytes se manifeste au niveau fonctionnel par une augmentation de la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les CM après une stimulation par LPS. Les CM chez les sujets obèses répondent plus fortement à la stimulation par LPS que les CM chez les témoins. Dans le contexte de l'obésité deux études parmi lesquelles une étude finlandaise portant sur une cohorte de 2452 individus suivis sur dix ans montrent que dans l'obésité humaine le LPS est augmenté dans la circulation sanguine (22) (227). Nos résultats montrent bien la position clef du LPS, qui proviendrait du microbiote intestinal modifié chez les sujets obèses (228) (115) (229). Le LPS serait l'initiateur de l'inflammation systémique, de par sa capacité à induire une réponse pro-inflammatoire notamment par le biais des monocytes et plus significativement par les CM. Il y aurait donc une synergie entre : l'augmentation du nombre de monocytes, l'augmentation de la fonctionnalité de TLR4, et l'augmentation de LPS, chez les sujets obèses. De plus, si le LPS est le principal ligand de TLR4, il n'est pas le seul et il est maintenant bien établi que d'autres ligands endogènes peuvent entretenir un état pro-inflammatoire. Ces ligands endogènes ou « Damage Associated Molecular Pattern » (DAMPs) sont relargués par les cellules mortes ou mourantes comme signaux de danger pour initier une réponse inflammatoire (230). A ce jour, quinze DAMPs reconnus par TLR4 ont été identifiés : la High Mobility-Group Box protein 1 (HMGB-1), les protéines Heat Shock, les protéines S100, le fibrinogène, les fragments de sulphate d'héparan, la fibronectine, les fragments d'acide hyaluronique, la tenascin-C, la b-defensine-3, les protéines surfactantes A&D, l'elastase neutrophile, la lactoferrine, le SAA, les OxLDL, et les acides gras saturés. Parmi celles-ci, le fibrinogène (231), la SAA (232) et l'HMGB-1 (233) sont augmentés dans le sérum de patients obèses. Ils participeraient donc aussi à l'entretien de l'inflammation systémique dans l'obésité par l'intermédiaire de TLR4. Il pourrait être intéressant de doser les autres DAMPs ligands de TLR4 dans le sérum de patients obèses afin d'en mieux comprendre ce qui provoque/entretient le phénotype pro-inflammatoire des monocytes dans l'obésité.

L'up-régulation de TLR8 par tous les monocytes qui se manifeste fonctionnellement par une plus forte sécrétion de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-10 par les CM, indique que les CM dans l'obésité répondent plus fortement à la stimulation par ssRNA qu'en condition non pathologique. A notre connaissance c'est la première fois que l'up-régulation et

l'augmentation de la fonctionnalité de TLR8 sont observées au niveau des monocytes chez des sujets obèses. TLR8 est un détecteur intracellulaire d'acides nucléiques d'origine le plus souvent virale. L'étude détaillée de lignées transgéniques de souris exprimant le TLR8 humain avec différents niveaux d'expression a révélé que le pancréas, le foie et les reins de ces animaux étaient inflammés. De plus la concentration du sérum de ces souris en TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, IL-12p40, CCL2 et IP-10 est significativement augmentée par rapport aux souris sauvages, ainsi que le taux d'auto-anticorps anti-ADN double brin et anti-ribonucléoprotéines (234). Ces derniers auto-anticorps peuvent activer TLR8 en vertu de leur très haute affinité pour les ssRNA. Finalement, l'ensemble de ce travail montre que la reconnaissance par TLR8 des ARNs peut conduire à une inflammation de type auto-immune (234). Une autre étude, chez l'homme, laisse entrevoir que des auto-anticorps contre les petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP) qui s'organisent en grappe à la surface des cellules en apoptose initieraient le Lupus Systémique Erythémateux en stimulant TLR8 (231). Mécanistiquement, deux études impliquent des auto-anticorps anti-phospholipides dans l'up-régulation de TLR8 notamment par leur implication dans la translocation de TLR8 du réticulum endoplasmique vers l'endosome qui résulte en une plus grande sensibilité envers ses ligands (236) (237). D'où la question suivante : est-ce que l'inflammation systémique de bas grade associée à l'obésité présente des caractéristiques de type auto-immunes? Pour répondre à cette question nous avons déjà recherché dans les listes de gènes dont l'expression par les monocytes est modulée chez les sujets obèses ceux qui pourraient être impliqués dans l'auto-immunité et nous avons trouvé que les CM et les IM up-régulent respectivement TXLNA (taxilin alpha) et FLT3LG (fms-related tyrosine kinase 3 ligand) (238) (239) (240) (données non présentées), deux cytokines favorisant la production d'(auto)anticorps par les lymphocytes B. Ce qui présente un premier élément de réponse, nous devons bien sûr confirmer ces données sur un plus grand nombre de patients. Nous pourrions aussi entreprendre de rechercher dans le sérum de patients obèses la présence d'auto-anticorps en orientant nos recherches vers les auto-anticorps anti-ADN double brin et les auto-anticorps anti-snRNP qui sont augmentés dans les souris transgéniques exprimant le TLR8 humains. Les anti-snRNPs devraient être tout particulièrement augmentés chez les sujets obèses, en raison notamment du nombre très important de cellules en apoptose dans leur tissu adipeux, présentant potentiellement à leur surface des snRNP en grappe. La recherche d'auto-anticorps anti-phospholipides serait également intéressante, puisqu'il a été montré qu'ils intervenaient dans l'up-régulation de TLR8. Si ces éléments de réponse consolidaient notre hypothèse nous pourrions aller encore

plus loin en comparant le phénotype et la fonctionnalité des lymphocytes B dans la circulation de patients obèses et de témoins sains.

L'up-régulation et la fonctionnalité accrue de TLR4 et de TLR8 par les monocytes de sujets obèses comparés à ceux de témoins, peuvent avoir des conséquences sur la fibrose du tissu adipeux chez les usjets obèses, surtout si l'on considère l'augmentation de la capacité migratoire des CM et des IM, qui up-régulent CCR2 et CCR5, faisant de ces cellules les précurseurs de macrophages du tissu adipeux. En effet, TLR4 et TLR8 participent à la régulation de la matrice extracellulaire (241). Nous pouvons donc imaginer que des ARNs relargués par des cellules nécrotiques complexés à des auto-anticorps stimulent TLR8 et/ou que des DAMPs stimulent TLR4. Dans les deux cas une voie de signalisation activant IRAK4 et NFκB conduit à la sécrétion de TIMP-1 (inhibiteur tissulaire de la metalloproteinases-1) et TIMP-1 inhibe l'activité de la MMP-1 (metalloproteinases matricielle-1) ce qui débouche sur un excès de matrice extra cellulaire (242) (243).

TLR4 est un récepteur qui est exprimé aussi bien au niveau des cellules immunitaires circulantes et tissulaires, qu'au niveau des adipocytes, des hépatocytes et des myocytes (119) (108) (109). Il s'agit donc d'un récepteur fondamental qui par l'augmentation de sa fonctionnalité au niveau des monocytes circulants dans l'obésité exerce un rôle central dans l'initiation et le maintien de l'inflammation de bas grade. Il est donc concevable d'envisager de limiter son action par des traitements à base d'antagonistes. Deux antagonistes : E5564 (Eritoran, Eisai Inc) et AK-242 (Takeda Biological), ont été évalués lors d'essais cliniques afin de limiter l'inflammation en contrôlant particulièrement le taux d'Il-6 dans la sepsis sévère. Ces essais ont été suspendus par manque d'efficacité (244) (245). Néanmoins dans une étude publiée dans la revue « Atherosclerosis » en 2015 (246), l'effet d'une nouvelle petite molécule antagoniste de TLR4 (IAXO-102, [Innaxon, Tewkesbury]) a été testé. Ces tests ont été réalisés *in vitro* par des expériences de culture cellulaire de cellules HUVEC (Human umbilical vein endothelial) et *in vivo* à l'aide d'un modèle murin d'anévrisme de l'aorte abdominale induit par l'angiotensine II. Les résultats de ces expériences ont montré qu'IAXO-102 inhibe MAPK et la phosphorylation p65 de NF-κB associée à une down-régulation de TLR4 et de protéines pro-inflammatoires dépendantes de TLR4, au niveau des cellules endothéliales. De plus IAXO-102 réduit les risques liés à l'anévrisme de l'aorte abdominale induit par l'angiotensine II. Pour les auteurs de cette étude, IAXO-102 inhiberait la signalisation par TLR4 induite par des ligands de l'inflammation stérile comme les oxLDL.

Les résultats de cette étude sont encourageants mais des expériences similaires doivent être effectuées sur d'autres types cellulaires et d'autres pathologies inflammatoires afin de vérifier l'action de cette molécule sur les monocytes circulants mais aussi sur les macrophages, les hépatocytes et les adipocytes. Une autre étude (247), cette fois-ci sur un modèle murin (lipoprotein receptor-deficient, LDLR<sup>-/-</sup>) de diabète de type II induit par un régime riche en graisse montre qu'un antagoniste connu de TLR4, Rhodobacter sphaeroides lipopolysaccharide (Rs-LPS), atténue le développement de l'athérosclérose sans pour autant améliorer le statut métabolique des animaux. Le traitement par l'antagoniste de TLR4 diminue l'infiltration des monocytes/macrophages, l'expression de l'IL-6 et la metalloproteinase matricielle 9 (MMP9) dans les lésions athérosclérotiques des souris diabétiques. Il n'existe pas à ce jour d'essais cliniques avancés qui présagent d'une utilisation dans un avenir proche d'antagoniste de TLR4 pour lutter contre les conséquences de l'inflammation chronique qui caractérise l'obésité.

Etant donné les conséquences probables et multiples de l'augmentation de la fonctionnalité de TLR8 notamment sur l'inflammation des tissus comme ceux du foie, du pancréas et des reins, sur la production de cytokines pro-inflammatoires, sur la production d'auto-anticorps et sur le développement de la fibrose du tissu adipeux, il est aussi possible d'envisager chez les sujets obèses, un traitement à base d'antagoniste de TLR8. Deux études portant sur des modèles murins de psoriasis (une pathologie de la peau à caractère inflammatoire) utilisant des antagonistes de TLR8 ont montré des résultats concluants (248) (300). IMO-8044 est un oligonucléotide antagoniste de TLR7, 8 et 9 utilisé dans l'une de ces deux études et qui a été testé lors d'essais cliniques de phase I puis de phase II par la société Idera Pharmaceuticals, Inc. Les essais se sont terminés en mars 2014 et ont démontré que cet antagoniste était bien toléré par les sujets sains et par des patients atteints de psoriasis avec en plus une activité clinique avérée. Nous pourrions donc envisager l'emploi d'un tel antagoniste afin de limiter les effets de l'up-régulation de TLR8 par les monocytes de patients obèses sur l'inflammation systémique et chronique associée à l'obésité en espérant notamment une amélioration du métabolisme du glucose par une diminution de la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les monocytes circulants.

### **C. Les IM comme précurseurs de macrophages anti-inflammatoires au profil profibrotique**

Nous avons montré au niveau transcriptomique qu'il existe pour les CM une signature de l'obésité. Ils modulent des gènes impliqués dans la migration cellulaire, l'adhésion, dans la réponse immunitaire et dans la régulation de leur métabolisme. Concernant la migration cellulaire cela est en accord avec l'up-régulation au niveau protéique des récepteurs : CCR5, CX3CR1, CCR2. Ce qui ferait des CM les précurseurs d'un grand nombre de macrophages dans les tissus inflammés. L'étude de leur transcriptome sous entend qu'ils sont impliqués dans le maintien de l'inflammation systémique de bas grade, ce que nous avons observé par la fonctionnalité accrue de TLR4 et TLR8 chez les CM obèses. De plus, ils up-régulent FPR2 un récepteur du SAA, un facteur pro-inflammatoire augmenté dans l'obésité. Il serait ainsi les précurseurs de macrophages inflammatoires de polarisation de type M1. Au niveau du transcriptome, nous n'avons pas trouvé pour les IM une signature de l'obésité aussi évidente que celle des CM ni au niveau fonctionnel où nous n'avons pas montré d'augmentation significative de la fonctionnalité de TLR4 et de TLR8 par les IM de sujets obèses. Les IM up-régulent très fortement CISD1 ou MitoNEET, une protéine de la membrane externe de la mitochondrie dont l'expression est diminuée dans les tissus adipeux et hépatiques de souris DIO. Les mitochondries d'adipocytes sur-exprimant MitoNEET de souris transgéniques ont une activité respiratoire réduite associée à une diminution des dommages causés par les dérivés réactifs de l'oxygène et une augmentation de la production d'adiponectine. Des effets semblables ont été mesurés sur des hépatocytes sur-exprimant mitoNEET. De plus, ces cellules ont une capacité augmentée à stocker les lipides. Des souris transgéniques sur-exprimant MitoNEET et rendues obèses par une alimentation riche en graisse restent sensible à l'insuline (250). La concordance entre les modifications fonctionnelles des adipocytes et des hépatocytes sur-exprimant MitoNEET suggère des effets similaires sur la physiologie cellulaire dans d'autres tissus. Ainsi MitoNEET est une molécule dont l'action a des propriétés protectrices contre les acides gras en excès et elle est aujourd'hui considérée comme une cible thérapeutique pour le traitement du diabète de type II (251) (252). Une extrapolation aux monocytes indiquerait que les IM dans l'obésité par l'up-régulation de MitoNEET seraient capables de stocker les acides gras libres en excès et produiraient moins de ROS. Par l'accumulation de lipides, ils pourraient s'orienter vers un phénotype profibrotique, comme cela a été montré par la comparaison du transcriptome de macrophages spumeux et non spumeux chez des souris recevant une alimentation riche en graisses (253). Ce que corrobore l'analyse intégrative du transcriptome par IPA indiquant que les IM dans l'obésité favoriseraient la fibrose et la mort du tissu conjonctif. Ils pourraient donc être les précurseurs de macrophages profibrotiques infiltrant les tissus inflammés chez les sujets



obèses. Cette hypothèse est étayée par le fait qu'ils up-régulent aussi des récepteurs membranaires aux propriétés anti-inflammatoires (CCRL2 [chemokine (C-C motif) receptor-like 2] et MC1R [melanocortin 1 receptor]) (254) (255) (256) (données non présentées) mais reste à démontrer.

#### **D. Le phénotype des NCM est un indicateur des altérations métaboliques**

Il existe une corrélation positive entre le pourcentage de NCM et la glycémie, indépendante de la masse grasse (193). De plus, le degré d'expression par les NCM de CCR2 et CX3CR1 est négativement corrélé avec le taux d'HDL-c ; le degré d'expression de CSF-1R est positivement corrélé avec l'HOMA-IR et le degré d'expression de CCR5 est positivement corrélé avec le taux de triglycérides circulants et l'HOMA-IR (257). Ces corrélations existent pour les IM et les CM mais sont significativement moins fortes. Le phénotype des NCM serait donc un indicateur des altérations métaboliques associées à l'obésité. En vertu d'une plus faible up-régulation de l'expression de CCR5 et CCR2 par l'obésité associée au profil de base des NCM où ces deux récepteurs sont très faiblement exprimés, voir pas exprimés en ce qui concerne CCR2, les NCM auraient un plus faible potentiel migratoire que les IM et les CM. De plus, ils répondent plus fortement à la stimulation de TLR8 chez les sujets obèses. Ce qui est en accord avec les travaux de Cros *et al.* (237) qui ont montré que les NCM patrouillaient les endothéliums et répondaient de façon sélective aux virus et à des complexes immunologiques comprenant des acides nucléiques par une voie pro-inflammatoire TLR7-TLR8-MyD88-MEK. Ils seraient donc impliqués dans la surveillance des endothéliums et de la circulation grâce à l'up-régulation de récepteurs membranaires comme par exemple GPR132 (G protein-coupled receptor 132) capables de détecter des nutriments (258) (données non présentées). Ils participeraient de plus à l'inflammation systémique notamment par la production accrue d'IL-1 $\beta$  suite à une stimulation de TLR8 mais aussi par l'up-régulation de molécules pro-inflammatoires comme CXCL12 ou TCAR1 (tachykinin receptor 1) aussi appelé NK1-R (259) (260) (261) (Neurokinin-1 receptor) (données non présentées) dont le ligand SP, un neuropeptide pro-inflammatoire, est augmenté dans le sérum de souris DIO (262) et dans celui d'enfants obèses comparés à celui d'enfants témoins (23). L'up-régulation de CXCL12 confère aux NCM un rôle important dans le contrôle des populations de cellules immunitaires circulantes puisqu'elle intervient notamment dans la migration des cellules dendritiques et serait responsable de l'augmentation des mégacaryocytes, mais aussi de la

migration de nombreux autres types cellulaires tels que les lymphocytes T et B et les monococytes.

#### **E. Existe-t-il une relation entre l'état inflammatoire des monocytes et des modifications de leur métabolisme dans l'obésité ?**

L'analyse transcriptomique a révélé que l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme était modulée dans l'obésité au niveau des trois sous populations. Concernant les vingt gènes les plus modulés nous trouvons cinq gènes impliqués dans le métabolisme pour les CM, six pour les IM et cinq pour les NCM. Parmi ces gènes huit sont également impliqués dans la réponse immunitaire (CLU, CISD1 ou MitoNEET, PXN, ATP2A1, CD22, DOK4, NF1, KLHL21 et PDXP). Concernant les fonctions les plus probablement modulées, nous avons également trouvé des fonctions métaboliques avec notamment le métabolisme des sucres et des lipides pour les CM et les NCM. Ces données mettent en avant une possible relation de cause à effet entre le métabolisme des monocytes et leur fonctionnalité dans l'obésité. Il est possible d'envisager cette relation de deux façons : 1/ le métabolisme des monocytes serait modifié par leur environnement (hyperglycémie et hyperlipidémie) entraînant des modifications phénotypique et fonctionnelle en particulier de type pro-inflammatoire. 2/ à l'inverse nous pouvons envisager que l'activation des monocytes par des facteurs circulants augmentés dans l'obésité entraîne des modifications de leur métabolisme. Notre étude exploratoire ne permet pas de démontrer le sens de cette relation mais permet d'envisager des pistes de recherche.

## V. CONCLUSION

Par ce travail de thèse nous avons caractérisé phénotypiquement et fonctionnellement les monocytes circulants dans l'obésité. Nous nous sommes appuyés sur des travaux antérieurs de notre équipe qui ont montré qu'en plus d'être augmentés en nombre, les monocytes étaient modulés en qualité. C'est à dire que les proportions des IM et des NCM sont augmentées par l'obésité alors que le nombre absolu de monocytes appartenant à chacune des sous populations est augmenté. Ces travaux avaient montré en plus un lien entre le pourcentage de NCM et la glycémie (193).

Ici nous avons montré que les CM qui représentent la majeure partie des monocytes, entre 80% et 90%, étaient ceux qui portaient la signature transcriptomique de l'obésité la plus évidente. Ils soutiendraient donc par leur phénotype et leur nombre l'inflammation systémique de bas grade qui caractérise l'obésité, mais aussi l'inflammation tissulaire puisque nous avons montré qu'ils up-régulent dans l'obésité des gènes impliqués dans la migration cellulaire. Parmi ceux-là nous pouvons citer CCR2, CCR5 et CX3CR1 dont nous avons aussi montré l'up-régulation au niveau protéique. Il est donc très probable qu'ils soient les précurseurs de l'essentiel des macrophages surnuméraires que l'on trouve dans les tissus métaboliques inflammés chez les sujets obèses : le tissu adipeux, le foie, les muscles et le pancréas. Notre analyse au niveau du génome complet a montré que les CM modulent chez les sujets obèses des gènes impliqués dans les maladies cardiovasculaires, ils migreraient donc aussi vers les plaques d'athérome. L'analyse transcriptomique a révélé l'up-régulation de gènes dont le rôle au niveau de l'inflammation est important de part l'amplitude de leur modulation par l'obésité et/ou leur possible interaction avec des facteurs circulants présents dans le sérum de malades obèses ou des récepteurs up-régulés par l'obésité à la surface des autres cellules immunitaires circulantes et de l'endothélium. Il s'agit d'abord du gène CLU, le plus up-régulé par les CM et dont le taux dans le sérum est positivement corrélé avec les marqueurs de l'obésité et de l'inflammation systémique (263). Nous devons donc dans un premier temps confirmer sur une plus large cohorte cette up-régulation avant de poursuivre par d'autres analyses afin de comprendre quelles pourraient être les conséquences au niveau du développement des maladies cardiovasculaires de l'up-régulation de CLU par les CM. Nous devons également confirmer l'up-régulation au niveau des mRNA et au niveau protéique de FPR2, le récepteur du SAA, un des marqueurs cliniques de l'inflammation de

bas grade de l'obésité (207) (20) qui serait impliqué dans l'initiation de l'athérosclérose (264) (265). Par leurs caractéristiques pro-inflammatoires ils pourraient être les précurseurs de macrophages dont la polarisation est de type M1.

La signature de l'obésité au niveau des IM est moins homogène. Cependant dans l'obésité ils modulent l'expression de gènes intéressants qui interviennent dans la mise en place de mécanismes de protection contre un excès d'acides gras. En effet, les IM pourraient avoir une capacité réduite à libérer le glycérol. De plus, les IM up-régulent très fortement CISD1 ou MitoNEET, une molécule qui les rendraient capable de stocker les acides gras. L'analyse transcriptomique laisse supposer que dans l'obésité les IM présentent un caractère anti-inflammatoire et qu'ils interviendraient dans la fibrose et la mort du tissu conjonctif. Ils pourraient donc être les précurseurs de macrophages anti-inflammatoires et profibrotiques dont la polarisation serait de type M2. Nous devons confirmer sur une plus large cohorte l'up-régulation à la fois au niveau des messagers mais aussi au niveau protéique de MitoNEET, des gènes contrôlant la libération du glycérol et des gènes anti-inflammatoires CCRL2 et MC1R. Si ces modulations étaient confirmées cela indiquerait que dans le contexte de l'obésité le métabolisme des IM est modifié, ces modifications pourraient avoir des conséquences sur leur fonctionnalité (253).

Nos deux premières études visant à caractériser les monocytes dans l'obésité montrent une relation entre soit la fréquence des NCM (193), soit leur phénotype (257) et les anomalies métaboliques de l'obésité. Il s'agit respectivement de la glycémie pour la première étude (193), du taux de HDL-c, de triglycéride et de l'estimation de la résistance à l'insuline pour la seconde (257). Le phénotype des NCM peut être donc considéré comme un indicateur de risque cardiovasculaire. Nos travaux vont également dans le sens d'une fonction de patrouilleurs (183) accrue dans l'obésité. En up-régulant le moins les récepteurs de chimiokines CCR2 et CCR5, ils migreraient le moins vers les tissus inflammés.

Les trois sous populations de monocytes sont donc différenciellement impliquées dans l'inflammation chronique de bas grade qui caractérise l'obésité et les pathologies qui y sont associées mais elles partagent également des traits communs. Nous avons montré qu'elles présentaient toutes un phénotype pro-inflammatoire par l'up-régulation de TLR4 et de TLR8 bien qu'au niveau fonctionnel les CM augmentent plus dans l'obésité leur réponse à la stimulation de TLR4 que les deux autres sous populations. Les CM et les NCM augmentent plus dans l'obésité leur réponse à la stimulation de TLR8 que les IM. L'up-régulation de TLR4 par les monocytes dans l'obésité parle en faveur d'un rôle clef du LPS du microbiote

intestinal parmi les possibles facteurs initiateurs de l'inflammation chronique de bas grade. Cela n'exclue pas l'intervention dans le maintien de l'inflammation de DAMPs présents dans la circulation dont certains sont des ligands de TLR4 et ont déjà été identifiés comme étant augmenté dans l'obésité. C'est le cas du Fibrinogène (231), du SAA (232) et de HMGB-1 (233). L'up-régulation de TLR8 et l'augmentation de sa fonctionnalité dans les CM et les NCM sont des éléments nouveaux dans la compréhension du rôle des monocytes dans l'obésité. Si TLR8 intervient dans la production de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , il participe donc à l'inflammation chronique mais cela ne serait pas les seules conséquences de son activation. L'augmentation de la fonctionnalité de TLR8 dans l'obésité pourrait être responsable d'une orientation à caractère auto-immune de l'inflammation par la production accrue d'(auto)anticorps (234). Ces auto-anticorps par leur très grande affinité pour les ARNs simples brins participeraient à l'entretien de l'activation de TLR8 qui serait ainsi sans cesse activé avec des conséquences multiples au niveau des tissus métaboliques (foie, muscles, pancréas et rein) observées chez des souris transgéniques exprimant avec une plus ou moins forte intensité TLR8 (234). De plus, l'activation de TLR8 par les monocytes obèses participerait aussi à la fibrose du tissu adipeux obèse (242) (243). Cibler thérapeutiquement TLR8 avec un antagoniste pourrait donc présenter de nombreux avantages et limiter les conséquences de l'obésité sur le métabolisme. Une molécule IMO-8044 a déjà été testée lors d'essais cliniques de phase I puis de phase II dont les résultats sont positifs sur des sujets sains et des patients souffrant de maladies inflammatoires (psoriasis, lupus) par la société Idera Pharmaceuticals, Inc.

L'augmentation probable du taux d'auto-anticorps dans la circulation des patients obèses en relation avec l'activation de TLR8 ainsi que la découverte de l'up-régulation par l'obésité au niveau des IM et des CM de gènes (TXLNA [taxilin alpha] et FLT3LG [fms-related tyrosine kinase 3 ligand]) impliqués dans développement de réponses auto-immunes (données non présentées ici) ouvrent la porte vers une composante auto-immune de l'inflammation chronique de bas grade qui caractérise l'obésité. Il serait donc nécessaire de vérifier l'up-régulation de TXLNA par les CM obèses et de FLT3LG par les IM, de doser les auto-anticorps qui devraient être augmentés suite à l'activation de TLR8. C'est à dire les auto-anticorps anti-ADN double brin et les auto-anticorps anti-snRNP dans le sérum de patients obèses et dans celui de donneurs sains. Enfin une analyse phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B dans la circulation de patients obèses et de sujets sains compléterait la description de cette composante.

Afin de mettre en évidence les liens existant entre des modifications du métabolisme des monocytes et leur phénotype pro-inflammatoire dans l'obésité nous envisageons dans un premier temps de confirmer pour chaque sous population la modulation des gènes impliqués dans le métabolisme et tout particulièrement des gènes ayant à la fois un rôle dans le métabolisme et la réponse immunitaire. Dans un second temps nous pourrions envisager des tests fonctionnels où nous mettrions en culture des monocytes de sujets minces en présence de concentrations pathologiques de glucose, de certains lipides (céramide, palmitate, cholestérol) et de LPS afin d'étudier l'expression des gènes mis en évidence par microarrays et ainsi voir qui de l'inflammation ou du métabolisme induit la modification de ces gènes dans les monocytes des obèses. Nous pourrions aussi étudier par microscopie des modifications morphologiques dues par exemple à l'accumulation de gouttelettes lipidiques.

L'ensemble de ce travail confirme le profil pro-inflammatoire de tous les monocytes dans l'obésité par l'up-régulation de TLR4 et de TLR8. Avec une très forte implication des CM qui interviendraient dans les complications cardiovasculaires. Nous ouvrons deux nouvelles voies d'investigation. La première serait la composante auto-immune de l'inflammation de bas grade qui caractérise l'obésité. La seconde serait la mise en évidence de relations entre des modifications du métabolisme des monocytes dans l'obésité et leur fonctionnalité. Envisager de limiter les effets de l'up-régulation de TLR8 par les monocytes de patients obèses sur l'inflammation systémique et chronique associée à l'obésité à l'aide d'un antagoniste ne peut néanmoins pas être considérées comme une solution en soi. Ce serait plutôt un complément d'autres thérapies associées à une perte de poids telles que la chirurgie bariatrique et/ou des modifications du mode de vie avec un changement du régime alimentaire et une augmentation de l'activité physique qui ont déjà montré des effets bénéfiques sur le statut inflammatoire des patients (266) (267) (268).

## VI. BIBLIOGRAPHIE

1. Ng, M., T. Fleming, M. Robinson, B. Thomson, N. Graetz, C. Margono, E. C. Mullany, S. Biryukov, C. Abbafati, S. F. Abera, J. P. Abraham, N. M. E. Abu-Rmeileh, T. Achoki, F. S. AlBuhairan, Z. A. Alemu, R. Alfonso, M. K. Ali, R. Ali, N. A. Guzman, W. Ammar, P. Anwari, A. Banerjee, S. Barquera, S. Basu, D. A. Bennett, Z. Bhutta, J. Blore, N. Cabral, I. C. Nonato, J.-C. Chang, R. Chowdhury, K. J. Courville, M. H. Criqui, D. K. Cundiff, K. C. Dabhadkar, L. Dandona, A. Davis, A. Dayama, S. D. Dharmaratne, E. L. Ding, A. M. Durrani, A. Esteghamati, F. Farzadfar, D. F. J. Fay, V. L. Feigin, A. Flaxman, M. H. Forouzanfar, A. Goto, M. A. Green, R. Gupta, N. Hafezi-Nejad, G. J. Hankey, H. C. Harewood, R. Havmoeller, S. Hay, L. Hernandez, A. Hussein, B. T. Idrisov, N. Ikeda, F. Islami, E. Jahangir, S. K. Jassal, S. H. Jee, M. Jeffreys, J. B. Jonas, E. K. Kabagambe, S. E. A. H. Khalifa, A. P. Kengne, Y. S. Khader, Y.-H. Khang, D. Kim, R. W. Kimokoti, J. M. Kinge, Y. Kokubo, S. Kosen, G. Kwan, T. Lai, M. Leinsalu, Y. Li, X. Liang, S. Liu, G. Logroscino, P. A. Lotufo, Y. Lu, J. Ma, N. K. Mainoo, G. A. Mensah, T. R. Merriman, A. H. Mokdad, J. Moschandreas, M. Naghavi, A. Naheed, D. Nand, K. M. V. Narayan, E. L. Nelson, M. L. Neuhouser, M. I. Nisar, T. Ohkubo, S. O. Oti, A. Pedroza, D. Prabhakaran, N. Roy, U. Sampson, H. Seo, S. G. Sepanlou, K. Shibuya, R. Shiri, I. Shive, G. M. Singh, J. A. Singh, V. Skirbekk, N. J. C. Stapelberg, L. Sturua, B. L. Sykes, M. Tobias, B. X. Tran, L. Trasande, H. Toyoshima, S. van de Vijver, T. J. Vasankari, J. L. Veerman, G. Velasquez-Melendez, V. V. Vlassov, S. E. Vollset, T. Vos, C. Wang, X. Wang, E. Weiderpass, A. Werdecker, J. L. Wright, Y. C. Yang, H. Yatsuya, J. Yoon, S.-J. Yoon, Y. Zhao, M. Zhou, S. Zhu, A. D. Lopez, C. J. L. Murray, and E. Gakidou. 2014. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* 384: 766–781.
2. Olshansky, S. J., D. J. Passaro, R. C. Hershov, J. Layden, B. A. Carnes, J. Brody, L. Hayflick, R. N. Butler, D. B. Allison, and D. S. Ludwig. 2005. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N. Engl. J. Med.* 352: 1138–1145.
3. Poitou, C., E. Dalmás, and K. Clément. 2013. Inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité. In *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux* Springer Paris, Paris. 289–301.
4. Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454: 436–444.
5. Hotamisligil, G. S., and E. Erbay. 2008. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 923–934.
6. Hansson, G. K., and P. Libby. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 508–519.
7. Feingold, K., and C. Grunfeld. 2000. Obesity and Dyslipidemia. In *Endotext* L. J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, F. Singer, A. Vinik, and M. O. Weickert, eds. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
8. Dietrich, P., and C. Hellerbrand. 2014. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 28: 637–653.
9. Canello, R., and K. Clément. 2006. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 113: 1141–1147.
10. Lumeng, C. N., and A. R. Saltiel. 2011. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 121: 2111–2117.
11. Mathieu, P., I. Lemieux, and J.-P. Després. 2010. Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Clin. Pharmacol. Ther.* 87: 407–416.
12. Shukla, A. P., W. I. Buniak, and L. J. Aronne. 2015. Treatment of obesity in 2015. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.* 35: 81–92.
13. O'Brien, P. E. 2015. Controversies in bariatric surgery. *Br. J. Surg.* 102: 611–618.
14. Cottam, D. R., P. A. Schaefer, G. W. Shaftan, L. Velcu, and L. D. G. Angus. 2002. Effect of surgically-

- induced weight loss on leukocyte indicators of chronic inflammation in morbid obesity. *Obes. Surg.* 12: 335–342.
15. Richette, P., C. Poitou, P. Garnero, E. Vicaut, J.-L. Bouillot, J.-M. Lacorte, A. Basdevant, K. Clément, T. Bardin, and X. Chevalier. 2011. Benefits of massive weight loss on symptoms, systemic inflammation and cartilage turnover in obese patients with knee osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 70: 139–144.
16. Furet, J.-P., L.-C. Kong, J. Tap, C. Poitou, A. Basdevant, J.-L. Bouillot, D. Mariat, G. Corthier, J. Doré, C. Henegar, S. Rizkalla, and K. Clément. 2010. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 59: 3049–3057.
17. Capuron, L., C. Poitou, D. Machaux-Tholliez, V. Frochot, J.-L. Bouillot, A. Basdevant, S. Layé, and K. Clément. 2011. Relationship between adiposity, emotional status and eating behaviour in obese women: role of inflammation. *Psychol. Med.* 41: 1517–1528.
18. Dalmas, E., C. Rouault, M. Abdennour, C. Rovere, S. Rizkalla, A. Bar-Hen, J.-L. Nahon, J.-L. Bouillot, M. Guerre-Millo, K. Clément, and C. Poitou. 2011. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am. J. Clin. Nutr.* 94: 450–458.
19. Aron-Wisnewsky, J., Z. Julia, C. Poitou, J.-L. Bouillot, A. Basdevant, M. J. Chapman, K. Clément, and M. Guerin. 2011. Effect of bariatric surgery-induced weight loss on SR-BI-, ABCG1-, and ABCA1-mediated cellular cholesterol efflux in obese women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96: 1151–1159.
20. Poitou, C., N. Viguier, R. Canello, R. De Matteis, S. Cinti, V. Stich, C. Coussieu, E. Gauthier, M. Courtine, J. D. Zucker, G. S. Barsh, W. Saris, P. Bruneval, A. Basdevant, D. Langin, and K. Clément. 2005. Serum amyloid A: production by human white adipocyte and regulation by obesity and nutrition. *Diabetologia* 48: 519–528.
21. Fain, J. N. 2006. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam. Horm.* 74: 443–477.
22. Kallio, K. A. E., K. A. Hätönen, M. Lehto, V. Salomaa, S. Männistö, and P. J. Pussinen. 2015. Endotoxemia, nutrition, and cardiometabolic disorders. *Acta Diabetol.* 52: 395–404.
23. Baroncelli, G. I., S. Bertelloni, B. Buggiani, A. Papini, M. Gualtieri, and G. Saggese. 1989. Evidence of increased levels of substance P in obese children. *Funct. Neurol.* 4: 183–184.
24. Ndumele, C. E., K. Nasir, R. D. Conceição, J. A. M. Carvalho, R. S. Blumenthal, and R. D. Santos. 2011. Hepatic steatosis, obesity, and the metabolic syndrome are independently and additively associated with increased systemic inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 1927–1932.
25. Leamy, A. K., R. A. Egnatchik, and J. D. Young. 2013. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog. Lipid Res.* 52: 165–174.
26. Cildir, G., S. C. Akıncılar, and V. Tergaonkar. 2013. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends Mol. Med.* 19: 487–500.
27. Pecht, T., A. Gutman-Tirosh, N. Bashan, and A. Rudich. 2014. Peripheral blood leukocyte subclasses as potential biomarkers of adipose tissue inflammation and obesity subphenotypes in humans. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 15: 322–337.
28. Elgazar-Carmon, V., A. Rudich, N. Hadad, and R. Levy. 2008. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J. Lipid Res.* 49: 1894–1903.
29. Talukdar, S., D. Y. Oh, G. Bandyopadhyay, D. Li, J. Xu, J. McNelis, M. Lu, P. Li, Q. Yan, Y. Zhu, J. Ofrecio, M. Lin, M. B. Brenner, and J. M. Olefsky. 2012. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat. Med.* 18: 1407–1412.



30. Hadad, N., O. Burgazliev, V. Elgazar-Carmon, Y. Solomonov, S. Wueest, F. Item, D. Konrad, A. Rudich, and R. Levy. 2013. Induction of cytosolic phospholipase a2 $\alpha$  is required for adipose neutrophil infiltration and hepatic insulin resistance early in the course of high-fat feeding. *Diabetes* 62: 3053–3063.
31. Dixon, J. B., and P. E. O'Brien. 2006. Obesity and the white blood cell count: changes with sustained weight loss. *Obes. Surg.* 16: 251–257.
32. Kaur, H., B. Adams-Huet, G. Smith, and I. Jialal. 2013. Increased neutrophil count in nascent metabolic syndrome. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 11: 128–131.
33. Nijhuis, J., S. S. Rensen, Y. Slaats, F. M. H. van Dielen, W. A. Buurman, and J. W. M. Greve. 2009. Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obes. Silver Spring Md* 17: 2014–2018.
34. Trellakis, S., A. Rydleuskaya, C. Fischer, A. Canbay, S. Tagay, A. Scherag, K. Bruderek, P. J. Schuler, and S. Brandau. 2012. Low adiponectin, high levels of apoptosis and increased peripheral blood neutrophil activity in healthy obese subjects. *Obes. Facts* 5: 305–318.
35. Trottier, M. D., A. Naaz, K. Kacynski, P. R. Yenumula, and P. J. Fraker. 2012. Functional capacity of neutrophils from class III obese patients. *Obes. Silver Spring Md* 20: 1057–1065.
36. Erridge, C., T. Attina, C. M. Spickett, and D. J. Webb. 2007. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am. J. Clin. Nutr.* 86: 1286–1292.
37. Cani, P. D., J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, F. Fava, K. M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmée, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrières, J.-F. Tanti, G. R. Gibson, L. Casteilla, N. M. Delzenne, M. C. Alessi, and R. Burcelin. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761–1772.
38. Boutagy, N. E., R. P. McMillan, M. I. Frisard, and M. W. Hulver. 2015. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? *Biochimie* .
39. Stream, A. R., and E. R. Sutherland. 2012. Obesity and asthma disease phenotypes. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 12: 76–81.
40. Johannsen, N. M., E. L. Priest, V. D. Dixit, C. P. Earnest, S. N. Blair, and T. S. Church. 2010. Association of white blood cell subfraction concentration with fitness and fatness. *Br. J. Sports Med.* 44: 588–593.
41. Laurson, K. R., D. A. McCann, and D. S. Senchina. 2011. Age, sex, and ethnicity may modify the influence of obesity on inflammation. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* 59: 27–31.
42. Kim, D.-J., J.-H. Noh, B.-W. Lee, Y.-H. Choi, J.-H. Chung, Y.-K. Min, M.-S. Lee, M.-K. Lee, and K.-W. Kim. 2008. The associations of total and differential white blood cell counts with obesity, hypertension, dyslipidemia and glucose intolerance in a Korean population. *J. Korean Med. Sci.* 23: 193–198.
43. Kim, J. A., and H. S. Park. 2008. White blood cell count and abdominal fat distribution in female obese adolescents. *Metabolism.* 57: 1375–1379.
44. Suzukawa, M., H. Nagase, I. Ogahara, K. Han, H. Tashimo, A. Shibui, R. Koketsu, S. Nakae, M. Yamaguchi, and K. Ohta. 2011. Leptin enhances survival and induces migration, degranulation, and cytokine synthesis of human basophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186: 5254–5260.
45. Takeda, M., S. Ueki, H. Kato, Y. Konno, M. Chihara, M. Itoga, Y. Kobayashi, Y. Moritoki, W. Ito, H. Kayaba, and J. Chihara. 2012. Obesity and eosinophilic inflammation: does leptin play a role. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 158 Suppl 1: 87–91.
46. Huang, Z. S., K. L. Chien, C. Y. Yang, K. S. Tsai, and C. H. Wang. 2001. Peripheral differential leukocyte counts in humans vary with hyperlipidemia, smoking, and body mass index. *Lipids* 36: 237–245.
47. Tanigawa, T., H. Iso, K. Yamagishi, I. Muraki, N. Kawamura, A. Nakata, S. Sakurai, T. Ohira, and T.

- Shimamoto. 2004. Association of lymphocyte sub-populations with clustered features of metabolic syndrome in middle-aged Japanese men. *Atherosclerosis* 173: 295–300.
48. Reichert, T., M. DeBruyère, V. Deneys, T. Tötterman, P. Lydyard, F. Yuksel, H. Chapel, D. Jewell, L. Van Hove, and J. Linden. 1991. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 60: 190–208.
49. Hanusch-Enserer, U., E. Cauza, M. Spak, A. Dunky, H. R. Rosen, H. Wolf, R. Prager, and M. M. Eibl. 2003. Acute-phase response and immunological markers in morbid obese patients and patients following adjustable gastric banding. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 27: 355–361.
50. O'Rourke, R. W., T. Kay, M. H. Scholz, B. Diggs, B. A. Jobe, D. M. Lewinsohn, and A. C. Bakke. 2005. Alterations in T-cell subset frequency in peripheral blood in obesity. *Obes. Surg.* 15: 1463–1468.
51. Ilavská, S., M. Horváthová, M. Szabová, T. Nemessányi, E. Jahnová, J. Tulinská, A. Líšková, L. Wsolová, M. Staruchová, and K. Volkovová. 2012. Association between the human immune response and body mass index. *Hum. Immunol.* 73: 480–485.
52. Al-Sufyani, A. A., and S. H. Mahassni. 2011. Obesity and immune cells in Saudi females. *Innate Immun.* 17: 439–450.
53. Womack, J., P. C. Tien, J. Feldman, J. H. Shin, K. Fennie, K. Anastos, M. H. Cohen, M. C. Bacon, and H. Minkoff. 2007. Obesity and immune cell counts in women. *Metabolism.* 56: 998–1004.
54. van der Weerd, K., W. A. Dik, B. Schrijver, D. H. Schweitzer, A. W. Langerak, H. A. Drexhage, R. M. Kiewiet, M. O. van Aken, A. van Huisstede, J. J. M. van Dongen, A.-J. van der Lelij, F. J. T. Staal, and P. M. van Hagen. 2012. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes* 61: 401–408.
55. Viardot, A., L. K. Heilbronn, D. Samocha-Bonet, F. Mackay, L. V. Campbell, and K. Samaras. 2012. Obesity is associated with activated and insulin resistant immune cells. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 28: 447–454.
56. Viardot, A., R. V. Lord, and K. Samaras. 2010. The effects of weight loss and gastric banding on the innate and adaptive immune system in type 2 diabetes and prediabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 2845–2850.
57. De Rosa, V., C. Procaccini, G. Cali, G. Pirozzi, S. Fontana, S. Zappacosta, A. La Cava, and G. Matarese. 2007. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. *Immunity* 26: 241–255.
58. van der Weerd, K., W. A. Dik, B. Schrijver, D. H. Schweitzer, A. W. Langerak, H. A. Drexhage, R. M. Kiewiet, M. O. van Aken, A. van Huisstede, J. J. M. van Dongen, A.-J. van der Lelij, F. J. T. Staal, and P. M. van Hagen. 2012. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes* 61: 401–408.
59. Gapin, L. 2014. Check MAIT. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192: 4475–4480.
60. Magalhaes, I., K. Pingris, C. Poitou, S. Bessoles, N. Venteclef, B. Kiaf, L. Beaudoin, J. Da Silva, O. Allatif, J. Rossjohn, L. Kjer-Nielsen, J. McCluskey, S. Ledoux, L. Genser, A. Torcivia, C. Soudais, O. Lantz, C. Boitard, J. Aron-Wisniewsky, E. Larger, K. Clément, and A. Lehuen. 2015. Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *J. Clin. Invest.* 125: 1752–1762.
61. Nieman, D. C., D. A. Henson, S. L. Nehlsen-Cannarella, M. Ekkens, A. C. Utter, D. E. Butterworth, and O. R. Fagoaga. 1999. Influence of obesity on immune function. *J. Am. Diet. Assoc.* 99: 294–299.
62. Phillips, A. C., D. Carroll, C. R. Gale, M. Drayson, G. N. Thomas, and G. D. Batty. 2010. Lymphocyte sub-population cell counts are associated with the metabolic syndrome and its components in the Vietnam Experience Study. *Atherosclerosis* 213: 294–298.
63. Cinti, S., G. Mitchell, G. Barbatelli, I. Murano, E. Ceresi, E. Faloia, S. Wang, M. Fortier, A. S. Greenberg, and M. S. Obin. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* 46: 2347–2355.

64. Shi, H., M. V. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzameli, H. Yin, and J. S. Flier. 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116: 3015–3025.
65. Ye, J. 2009. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int. J. Obes.* 2005 33: 54–66.
66. Tordjman, J., C. Poitou, D. Hugol, J.-L. Bouillot, A. Basdevant, P. Bedossa, M. Guerre-Millo, and K. Clément. 2009. Association between omental adipose tissue macrophages and liver histopathology in morbid obesity: influence of glycemic status. *J. Hepatol.* 51: 354–362.
67. Cinti, S., G. Mitchell, G. Barbatelli, I. Murano, E. Ceresi, E. Faloia, S. Wang, M. Fortier, A. S. Greenberg, and M. S. Obin. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* 46: 2347–2355.
68. Strissel, K. J., Z. Stancheva, H. Miyoshi, J. W. Perfield, J. DeFuria, Z. Jick, A. S. Greenberg, and M. S. Obin. 2007. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 56: 2910–2918.
69. Hosogai, N., A. Fukuhara, K. Oshima, Y. Miyata, S. Tanaka, K. Segawa, S. Furukawa, Y. Tochino, R. Komuro, M. Matsuda, and I. Shimomura. 2007. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56: 901–911.
70. Ozcan, U., Q. Cao, E. Yilmaz, A.-H. Lee, N. N. Iwakoshi, E. Ozdelen, G. Tuncman, C. Görgün, L. H. Glimcher, and G. S. Hotamisligil. 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306: 457–461.
71. McArdle, M. A., O. M. Finucane, R. M. Connaughton, A. M. McMorrow, and H. M. Roche. 2013. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front. Endocrinol.* 4: 52.
72. Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, and A. W. Ferrante. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112: 1796–1808.
73. Canello, R., C. Henegar, N. Viguerie, S. Taleb, C. Poitou, C. Rouault, M. Coupaye, V. Pelloux, D. Hugol, J.-L. Bouillot, A. Bouloumié, G. Barbatelli, S. Cinti, P.-A. Svensson, G. S. Barsh, J.-D. Zucker, A. Basdevant, D. Langin, and K. Clément. 2005. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54: 2277–2286.
74. Aron-Wisnewsky, J., J. Tordjman, C. Poitou, F. Darakhshan, D. Hugol, A. Basdevant, A. Aissat, M. Guerre-Millo, and K. Clément. 2009. Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94: 4619–4623.
75. Lumeng, C. N., J. L. Bodzin, and A. R. Saltiel. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 117: 175–184.
76. Xu, H., G. T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C. J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J. S. Ross, L. A. Tartaglia, and H. Chen. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112: 1821–1830.
77. Shaul, M. E., G. Bennett, K. J. Strissel, A. S. Greenberg, and M. S. Obin. 2010. Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet--induced obesity in mice. *Diabetes* 59: 1171–1181.
78. Zeyda, M., D. Farmer, J. Todoric, O. Aszmann, M. Speiser, G. Györi, G. J. Zlabinger, and T. M. Stulnig. 2007. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int. J. Obes.* 2005 31: 1420–1428.
79. Bourlier, V., A. Zakaroff-Girard, A. Miranville, S. De Barros, M. Maumus, C. Sengenès, J. Galitzky, M. Lafontan, F. Karpe, K. N. Frayn, and A. Bouloumié. 2008. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* 117: 806–815.

80. Wentworth, J. M., G. Naselli, W. A. Brown, L. Doyle, B. Phipson, G. K. Smyth, M. Wabitsch, P. E. O'Brien, and L. C. Harrison. 2010. Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes* 59: 1648–1656.
81. Spencer, M., A. Yao-Borengasser, R. Unal, N. Rasouli, C. M. Gurley, B. Zhu, C. A. Peterson, and P. A. Kern. 2010. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299: E1016–1027.
82. Talukdar, S., D. Y. Oh, G. Bandyopadhyay, D. Li, J. Xu, J. McNelis, M. Lu, P. Li, Q. Yan, Y. Zhu, J. Ofrecio, M. Lin, M. B. Brenner, and J. M. Olefsky. 2012. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat. Med.* 18: 1407–1412.
83. Liu, J., A. Divoux, J. Sun, J. Zhang, K. Clément, J. N. Glickman, G. K. Sukhova, P. J. Wolters, J. Du, C. Z. Gorgun, A. Doria, P. Libby, R. S. Blumberg, B. B. Kahn, G. S. Hotamisligil, and G.-P. Shi. 2009. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat. Med.* 15: 940–945.
84. Wu, D., A. B. Molofsky, H.-E. Liang, R. R. Ricardo-Gonzalez, H. A. Jouihan, J. K. Bando, A. Chawla, and R. M. Locksley. 2011. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 332: 243–247.
85. Ohmura, K., N. Ishimori, Y. Ohmura, S. Tokuhara, A. Nozawa, S. Horii, Y. Andoh, S. Fujii, K. Iwabuchi, K. Onoé, and H. Tsutsui. 2010. Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 193–199.
86. Lynch, L., X. Michelet, S. Zhang, P. J. Brennan, A. Moseman, C. Lester, G. Besra, E. E. Vomhof-Dekrey, M. Tighe, H.-F. Koay, D. I. Godfrey, E. A. Leadbetter, D. B. Sant'Angelo, U. von Andrian, and M. B. Brenner. 2015. Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. *Nat. Immunol.* 16: 85–95.
87. Gur, C., A. Porgador, M. Elboim, R. Gazit, S. Mizrahi, N. Stern-Ginossar, H. Achdout, H. Ghadially, Y. Dor, T. Nir, V. Doviner, O. Hershkovitz, M. Mendelson, Y. Naparstek, and O. Mandelboim. 2010. The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* 11: 121–128.
88. Wensveen, F. M., V. Jelenčić, S. Valentić, M. Šestan, T. T. Wensveen, S. Theurich, A. Glasner, D. Mendrila, D. Štimac, F. T. Wunderlich, J. C. Brüning, O. Mandelboim, and B. Polić. 2015. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat. Immunol.* 16: 376–385.
89. Ye, J., Z. Gao, J. Yin, and Q. He. 2007. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293: E1118–1128.
90. Khan, T., E. S. Muise, P. Iyengar, Z. V. Wang, M. Chandalia, N. Abate, B. B. Zhang, P. Bonaldo, S. Chua, and P. E. Scherer. 2009. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol. Cell. Biol.* 29: 1575–1591.
91. Odegaard, J. I., R. R. Ricardo-Gonzalez, M. H. Goforth, C. R. Morel, V. Subramanian, L. Mukundan, A. Red Eagle, D. Vats, F. Brombacher, A. W. Ferrante, and A. Chawla. 2007. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447: 1116–1120.
92. Tiemessen, M. M., A. L. Jagger, H. G. Evans, M. J. C. van Herwijnen, S. John, and L. S. Taams. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 19446–19451.
93. Duffaut, C., A. Zakaroff-Girard, V. Bourlier, P. Decaunes, M. Maumus, P. Chiotasso, C. Sengenès, M. Lafontan, J. Galitzky, and A. Bouloumié. 2009. Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29: 1608–1614.
94. Nishimura, S., I. Manabe, M. Nagasaki, K. Eto, H. Yamashita, M. Ohsugi, M. Otsu, K. Hara, K. Ueki, S.

- Sugiura, K. Yoshimura, T. Kadowaki, and R. Nagai. 2009. CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* 15: 914–920.
95. Feuerer, M., L. Herrero, D. Cipolletta, A. Naaz, J. Wong, A. Nayer, J. Lee, A. B. Goldfine, C. Benoist, S. Shoelson, and D. Mathis. 2009. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* 15: 930–939.
96. Winer, S., Y. Chan, G. Paltser, D. Truong, H. Tsui, J. Bahrami, R. Dorfman, Y. Wang, J. Zielenski, F. Mastronardi, Y. Maezawa, D. J. Drucker, E. Engleman, D. Winer, and H.-M. Dosch. 2009. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat. Med.* 15: 921–929.
97. Chatzigeorgiou, A., K. P. Karalis, S. R. Bornstein, and T. Chavakis. 2012. Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation. *Diabetologia* 55: 2583–2592.
98. Cipolletta, D., M. Feuerer, A. Li, N. Kamei, J. Lee, S. E. Shoelson, C. Benoist, and D. Mathis. 2012. PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486: 549–553.
99. Fabbrini, E., M. Cella, S. A. McCartney, A. Fuchs, N. A. Abumrad, T. A. Pietka, Z. Chen, B. N. Finck, D. H. Han, F. Magkos, C. Conte, D. Bradley, G. Fraterrigo, J. C. Eagon, B. W. Patterson, M. Colonna, and S. Klein. 2013. Association between specific adipose tissue CD4<sup>+</sup> T-cell populations and insulin resistance in obese individuals. *Gastroenterology* 145: 366–374.e1–3.
100. Winer, D. A., S. Winer, L. Shen, P. P. Wadia, J. Yantha, G. Paltser, H. Tsui, P. Wu, M. G. Davidson, M. N. Alonso, H. X. Leong, A. Glassford, M. Caimol, J. A. Kenkel, T. F. Tedder, T. McLaughlin, D. B. Miklos, H.-M. Dosch, and E. G. Engleman. 2011. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat. Med.* 17: 610–617.
101. Winer, D. A., S. Winer, M. H. Y. Chng, L. Shen, and E. G. Engleman. 2014. B Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 71: 1033–1043.
102. Li, Z., M. J. Soloski, and A. M. Diehl. 2005. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 42: 880–885.
103. Kremer, M., I. N. Hines, R. J. Milton, and M. D. Wheeler. 2006. Favored T helper 1 response in a mouse model of hepatosteatosis is associated with enhanced T cell-mediated hepatitis. *Hepatology* 44: 216–227.
104. Malenfant, P., D. R. Joannise, R. Thériault, B. H. Goodpaster, D. E. Kelley, and J. A. Simoneau. 2001. Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 25: 1316–1321.
105. Goodpaster, B. H., R. Thériault, S. C. Watkins, and D. E. Kelley. 2000. Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism* 49: 467–472.
106. Dohm, G. L., E. B. Tapscott, W. J. Pories, D. J. Dabbs, E. G. Flickinger, D. Meelheim, T. Fushiki, S. M. Atkinson, C. W. Elton, and J. F. Caro. 1988. An in vitro human muscle preparation suitable for metabolic studies. Decreased insulin stimulation of glucose transport in muscle from morbidly obese and diabetic subjects. *J. Clin. Invest.* 82: 486–494.
107. Cortright, R. N., K. M. Sandhoff, J. L. Basilio, J. R. Berggren, R. C. Hickner, M. W. Hulver, G. L. Dohm, and J. A. Houmard. 2006. Skeletal muscle fat oxidation is increased in African-American and white women after 10 days of endurance exercise training. *Obes. Silver Spring Md* 14: 1201–1210.
108. Gustot, T., A. Lemmers, C. Moreno, N. Nagy, E. Quertinmont, C. Nicaise, D. Franchimont, H. Louis, J. Devière, and O. Le Moine. 2006. Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology* 43: 989–1000.
109. Frost, R. A., G. J. Nystrom, and C. H. Lang. 2002. Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283: R698–709.

110. Frisard, M. I., R. P. McMillan, J. Marchand, K. A. Wahlberg, Y. Wu, K. A. Voelker, L. Heilbronn, K. Haynie, B. Muoio, L. Li, and M. W. Hulver. 2010. Toll-like receptor 4 modulates skeletal muscle substrate metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298: E988–998.
111. Patsouris, D., P.-P. Li, D. Thapar, J. Chapman, J. M. Olefsky, and J. G. Neels. 2008. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab.* 8: 301–309.
112. Hong, E.-G., H. J. Ko, Y.-R. Cho, H.-J. Kim, Z. Ma, T. Y. Yu, R. H. Friedline, E. Kurt-Jones, R. Finberg, M. A. Fischer, E. L. Granger, C. C. Norbury, S. D. Hauschka, W. M. Philbrick, C.-G. Lee, J. A. Elias, and J. K. Kim. 2009. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes* 58: 2525–2535.
113. Bocci, V. 1992. The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. *Perspect. Biol. Med.* 35: 251–260.
114. Creely, S. J., P. G. McTernan, C. M. Kusminski, ff. M. Fisher, N. F. Da Silva, M. Khanolkar, M. Evans, A. L. Harte, and S. Kumar. 2006. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *AJP Endocrinol. Metab.* 292: E740–E747.
115. Caricilli, A. M., P. K. Picardi, L. L. de Abreu, M. Ueno, P. O. Prada, E. R. Ropelle, S. M. Hirabara, Â. Castoldi, P. Vieira, N. O. S. Camara, R. Curi, J. B. Carvalheira, and M. J. A. Saad. 2011. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS Biol.* 9: e1001212.
116. Cani, P. D., R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A. M. Neyrinck, N. M. Delzenne, and R. Burcelin. 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470–1481.
117. Kelly, C. J., S. P. Colgan, and D. N. Frank. 2012. Of microbes and meals: the health consequences of dietary endotoxemia. *Nutr. Clin. Pract. Off. Publ. Am. Soc. Parenter. Enter. Nutr.* 27: 215–225.
118. Kemp, D. M. 2013. Does chronic low-grade endotoxemia define susceptibility of obese humans to insulin resistance via dietary effects on gut microbiota? *Adipocyte* 2: 188–190.
119. Song, M. J., K. H. Kim, J. M. Yoon, and J. B. Kim. 2006. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346: 739–745.
120. Monteiro-Sepulveda, M., S. Touch, C. Mendes-Sá, S. André, C. Poitou, O. Allatif, A. Cotillard, H. Fohrer-Ting, E.-L. Hubert, R. Remark, L. Genser, J. Tordjman, K. Garbin, C. Osinski, C. Sautès-Fridman, A. Leturque, K. Clément, and E. Brot-Laroche. 2015. Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metab.* 22: 113–124.
121. Ehses, J. A., M. Böni-Schnetzler, M. Faulenbach, and M. Y. Donath. 2008. Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes. *Biochem. Soc. Trans.* 36: 340–342.
122. Donath, M. Y., M. Böni-Schnetzler, H. Ellingsgaard, P. A. Halban, and J. A. Ehses. 2010. Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 21: 261–267.
123. Holland, W. L., B. T. Bikman, L.-P. Wang, G. Yuguang, K. M. Sargent, S. Bulchand, T. A. Knotts, G. Shui, D. J. Clegg, M. R. Wenk, M. J. Pagliassotti, P. E. Scherer, and S. A. Summers. 2011. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J. Clin. Invest.* 121: 1858–1870.
124. Benoit, S. C., C. J. Kemp, C. F. Elias, W. Abplanalp, J. P. Herman, S. Migrenne, A.-L. Lefevre, C. Cruciani-Guglielmacci, C. Magnan, F. Yu, K. Niswender, B. G. Irani, W. L. Holland, and D. J. Clegg. 2009. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *J. Clin. Invest.* 119: 2577–2589.
125. Posey, K. A., D. J. Clegg, R. L. Printz, J. Byun, G. J. Morton, A. Vivekanandan-Giri, S. Pennathur, D. G. Baskin, J. W. Heinecke, S. C. Woods, M. W. Schwartz, and K. D. Niswender. 2009. Hypothalamic

- proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296: E1003–1012.
126. Hirosumi, J., G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Görgün, K. T. Uysal, K. Maeda, M. Karin, and G. S. Hotamisligil. 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420: 333–336.
127. Gao, Z., A. Zuberi, M. J. Quon, Z. Dong, and J. Ye. 2003. Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J. Biol. Chem.* 278: 24944–24950.
128. Wen, H., D. Gris, Y. Lei, S. Jha, L. Zhang, M. T.-H. Huang, W. J. Brickey, and J. P.-Y. Ting. 2011. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* 12: 408–415.
129. Pradhan, A. D., J. E. Manson, N. Rifai, J. E. Buring, and P. M. Ridker. 2001. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286: 327–334.
130. Ohshima, S., Y. Saeki, T. Mima, M. Sasai, K. Nishioka, S. Nomura, M. Kopf, Y. Katada, T. Tanaka, M. Suemura, and T. Kishimoto. 1998. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 8222–8226.
131. Sabio, G., M. Das, A. Mora, Z. Zhang, J. Y. Jun, H. J. Ko, T. Barrett, J. K. Kim, and R. J. Davis. 2008. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322: 1539–1543.
132. Stephens, J. M., and P. H. Pekala. 1991. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* 266: 21839–21845.
133. Ye, J. 2008. Regulation of PPARgamma function by TNF-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374: 405–408.
134. Juge-Aubry, C. E., E. Somm, V. Giusti, A. Pernin, R. Chicheportiche, C. Verdumo, F. Rohner-Jeanrenaud, D. Burger, J.-M. Dayer, and C. A. Meier. 2003. Adipose tissue is a major source of interleukin-1 receptor antagonist: upregulation in obesity and inflammation. *Diabetes* 52: 1104–1110.
135. Ouchi, N., A. Higuchi, K. Ohashi, Y. Oshima, N. Gokce, R. Shibata, Y. Akasaki, A. Shimono, and K. Walsh. 2010. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* 329: 454–457.
136. Schottelius, A. J., M. W. Mayo, R. B. Sartor, and A. S. Baldwin. 1999. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J. Biol. Chem.* 274: 31868–31874.
137. Piccinini, A. M., and K. S. Midwood. 2010. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* 2010.
138. Watanabe, Y., Y. Nagai, and K. Takatsu. 2013. Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Nutrients* 5: 3757–3778.
139. Boden, G. 2011. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 18: 139–143.
140. Lee, J. Y., K. H. Sohn, S. H. Rhee, and D. Hwang. 2001. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276: 16683–16689.
141. Wong, S. W., M.-J. Kwon, A. M. K. Choi, H.-P. Kim, K. Nakahira, and D. H. Hwang. 2009. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 284: 27384–27392.
142. Lee, J. Y., J. Ye, Z. Gao, H. S. Youn, W. H. Lee, L. Zhao, N. Sizemore, and D. H. Hwang. 2003. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-

- kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 278: 37041–37051.
143. Benomar, Y., A. Gertler, P. De Lacy, D. Crépin, H. Ould Hamouda, L. Riffault, and M. Taouis. 2013. Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. *Diabetes* 62: 102–114.
144. Nguyen, M. T. A., S. Favellyukis, A.-K. Nguyen, D. Reichart, P. A. Scott, A. Jenn, R. Liu-Bryan, C. K. Glass, J. G. Neels, and J. M. Olefsky. 2007. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 282: 35279–35292.
145. Lee, J. Y., L. Zhao, H. S. Youn, A. R. Weatherill, R. Tapping, L. Feng, W. H. Lee, K. A. Fitzgerald, and D. H. Hwang. 2004. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J. Biol. Chem.* 279: 16971–16979.
146. Senn, J. J. 2006. Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *J. Biol. Chem.* 281: 26865–26875.
147. Schertzer, J. D., A. K. Tamrakar, J. G. Magalhães, S. Pereira, P. J. Bilan, M. D. Fullerton, Z. Liu, G. R. Steinberg, A. Giacca, D. J. Philpott, and A. Klip. 2011. NOD1 activators link innate immunity to insulin resistance. *Diabetes* 60: 2206–2215.
148. Schertzer, J. D., and A. Klip. 2011. Give a NOD to insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301: E585–586.
149. Zhao, L., M.-J. Kwon, S. Huang, J. Y. Lee, K. Fukase, N. Inohara, and D. H. Hwang. 2007. Differential modulation of Nods signaling pathways by fatty acids in human colonic epithelial HCT116 cells. *J. Biol. Chem.* 282: 11618–11628.
150. Guarda, G., M. Zenger, A. S. Yazdi, K. Schroder, I. Ferrero, P. Menu, A. Tardivel, C. Mattmann, and J. Tschopp. 2011. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186: 2529–2534.
151. Vandanmagsar, B., Y.-H. Youm, A. Ravussin, J. E. Galgani, K. Stadler, R. L. Mynatt, E. Ravussin, J. M. Stephens, and V. D. Dixit. 2011. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* 17: 179–188.
152. Shah, C., G. Yang, I. Lee, J. Bielawski, Y. A. Hannun, and F. Samad. 2008. Protection from high fat diet-induced increase in ceramide in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *J. Biol. Chem.* 283: 13538–13548.
153. Masters, S. L., A. Dunne, S. L. Subramanian, R. L. Hull, G. M. Tannahill, F. A. Sharp, C. Becker, L. Franchi, E. Yoshihara, Z. Chen, N. Mullooly, L. A. Mielke, J. Harris, R. C. Coll, K. H. G. Mills, K. H. Mok, P. Newsholme, G. Nuñez, J. Yodoi, S. E. Kahn, E. C. Lavelle, and L. A. J. O’Neill. 2010. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 $\beta$  in type 2 diabetes. *Nat. Immunol.* 11: 897–904.
154. Snodgrass, R. G., S. Huang, I.-W. Choi, J. C. Rutledge, and D. H. Hwang. 2013. Inflammasome-mediated secretion of IL-1 $\beta$  in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191: 4337–4347.
155. L’homme, L., N. Esser, L. Riva, A. Scheen, N. Paquot, J. Piette, and S. Legrand-Poels. 2013. Unsaturated fatty acids prevent activation of NLRP3 inflammasome in human monocytes/macrophages. *J. Lipid Res.* 54: 2998–3008.
156. Stienstra, R., S. Mandard, D. Patsouris, C. Maass, S. Kersten, and M. Müller. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against obesity-induced hepatic inflammation. *Endocrinology* 148: 2753–2763.
157. Kang, K., S. M. Reilly, V. Karabacak, M. R. Gangl, K. Fitzgerald, B. Hatano, and C.-H. Lee. 2008. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPAR $\delta$  regulate macrophage polarization and insulin



sensitivity. *Cell Metab.* 7: 485–495.

158. Marathe, C., M. N. Bradley, C. Hong, L. Chao, D. Wilpitz, J. Salazar, and P. Tontonoz. 2009. Preserved glucose tolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice transplanted with PPAR $\gamma$ -/-, PPAR $\delta$ -/-, PPAR $\gamma$  $\delta$ -/-, or LXR $\alpha$ -/- bone marrow. *J. Lipid Res.* 50: 214–224.
159. Szanto, A., B. L. Balint, Z. S. Nagy, E. Barta, B. Dezso, A. Pap, L. Szeles, S. Poliska, M. Oros, R. M. Evans, Y. Barak, J. Schwabe, and L. Nagy. 2010. STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR $\gamma$ -regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity* 33: 699–712.
160. Delerive, P., J. C. Fruchart, and B. Staels. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J. Endocrinol.* 169: 453–459.
161. Ricote, M., A. C. Li, T. M. Willson, C. J. Kelly, and C. K. Glass. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391: 79–82.
162. Holland, W. L., R. A. Miller, Z. V. Wang, K. Sun, B. M. Barth, H. H. Bui, K. E. Davis, B. T. Bikman, N. Halberg, J. M. Rutkowski, M. R. Wade, V. M. Tenorio, M.-S. Kuo, J. T. Brozinick, B. B. Zhang, M. J. Birnbaum, S. A. Summers, and P. E. Scherer. 2011. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat. Med.* 17: 55–63.
163. Hummasti, S., and G. S. Hotamisligil. 2010. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ. Res.* 107: 579–591.
164. Nakamura, T., M. Furuhashi, P. Li, H. Cao, G. Tuncman, N. Sonenberg, C. Z. Gorgun, and G. S. Hotamisligil. 2010. Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase Links Pathogen Sensing with Stress and Metabolic Homeostasis. *Cell* 140: 338–348.
165. Solinas, G., and M. Karin. 2010. JNK1 and IKK $\beta$ : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24: 2596–2611.
166. Hirosumi, J., G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Görgün, K. T. Uysal, K. Maeda, M. Karin, and G. S. Hotamisligil. 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420: 333–336.
167. Belgardt, B. F., J. Mauer, F. T. Wunderlich, M. B. Ernst, M. Pal, G. Spohn, H. S. Brönneke, S. Brodesser, B. Hampel, A. C. Schauss, and J. C. Brüning. 2010. Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 6028–6033.
168. Kabon, B., A. Nagele, D. Reddy, C. Eagon, J. W. Fleshman, D. I. Sessler, and A. Kurz. 2004. Obesity decreases perioperative tissue oxygenation. *Anesthesiology* 100: 274–280.
169. Jantsch, J., D. Chakravorty, N. Turza, A. T. Prechtel, B. Buchholz, R. G. Gerlach, M. Volke, J. Gläsner, C. Warnecke, M. S. Wiesener, K.-U. Eckardt, A. Steinkasserer, M. Hensel, and C. Willam. 2008. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180: 4697–4705.
170. Poitou, C., M. Coupaye, J.-P. Laaban, C. Coussieu, J. F. Bedel, J.-L. Bouillot, A. Basdevant, K. Clément, and J.-M. Oppert. 2006. Serum amyloid A and obstructive sleep apnea syndrome before and after surgically-induced weight loss in morbidly obese subjects. *Obes. Surg.* 16: 1475–1481.
171. Aron-Wisniewsky, J., and J.-L. Pepin. 2015. New insights in the pathophysiology of chronic intermittent hypoxia-induced NASH: the role of gut–liver axis impairment: Figure 1. *Thorax* 70: 713–715.
172. Jakubzick, C., E. L. Gautier, S. L. Gibbings, D. K. Sojka, A. Schlitzer, T. E. Johnson, S. Ivanov, Q. Duan, S. Bala, T. Condon, N. van Rooijen, J. R. Grainger, Y. Belkaid, A. Ma'ayan, D. W. H. Riches, W. M. Yokoyama, F. Ginhoux, P. M. Henson, and G. J. Randolph. 2013. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39: 599–610.
173. Tamoutounour, S., M. Guillemins, F. Montanana Sanchis, H. Liu, D. Terhorst, C. Malosse, E. Pollet, L. Ardouin, H. Luche, C. Sanchez, M. Dalod, B. Malissen, and S. Henri. 2013. Origins and functional

- specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39: 925–938.
174. Schulz, C., E. Gomez Perdiguero, L. Chorro, H. Szabo-Rogers, N. Cagnard, K. Kierdorf, M. Prinz, B. Wu, S. E. W. Jacobsen, J. W. Pollard, J. Frampton, K. J. Liu, and F. Geissmann. 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336: 86–90.
175. Hoeffel, G., Y. Wang, M. Greter, P. See, P. Teo, B. Malleret, M. Leboeuf, D. Low, G. Oller, F. Almeida, S. H. Y. Choy, M. Grisotto, L. Renia, S. J. Conway, E. R. Stanley, J. K. Y. Chan, L. G. Ng, I. M. Samokhvalov, M. Merad, and F. Ginhoux. 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 209: 1167–1181.
176. Hashimoto, D., A. Chow, C. Noizat, P. Teo, M. B. Beasley, M. Leboeuf, C. D. Becker, P. See, J. Price, D. Lucas, M. Greter, A. Mortha, S. W. Boyer, E. C. Forsberg, M. Tanaka, N. van Rooijen, A. García-Sastre, E. R. Stanley, F. Ginhoux, P. S. Frenette, and M. Merad. 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38: 792–804.
177. Hilgendorf, I., L. M. S. Gerhardt, T. C. Tan, C. Winter, T. A. W. Holderried, B. G. Chousterman, Y. Iwamoto, R. Liao, A. Zirlik, M. Scherer-Crosbie, C. C. Hedrick, P. Libby, M. Nahrendorf, R. Weissleder, and F. K. Swirski. 2014. Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ. Res.* 114: 1611–1622.
178. Arnold, L., A. Henry, F. Poron, Y. Baba-Amer, N. van Rooijen, A. Plonquet, R. K. Gherardi, and B. Chazaud. 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* 204: 1057–1069.
179. Guillemins, M., F. Ginhoux, C. Jakubzick, S. H. Naik, N. Onai, B. U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand, and S. Yona. 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 571–578.
180. Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. M. Leenen, Y.-J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn, and M. B. Lutz. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116: e74–80.
181. Wong, K. L., J. J.-Y. Tai, W.-C. Wong, H. Han, X. Sem, W.-H. Yeap, P. Kourilsky, and S.-C. Wong. 2011. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118: e16–31.
182. Zawada, A. M., K. S. Rogacev, B. Rotter, P. Winter, R.-R. Marell, D. Fliser, and G. H. Heine. 2011. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118: e50–61.
183. Cros, J., N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S.-Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S. K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J.-P. Jais, D. D’Cruz, J.-L. Casanova, C. Trouillet, and F. Geissmann. 2010. Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33: 375–386.
184. Kessel, C., D. Holzinger, and D. Foell. 2013. Phagocyte-derived S100 proteins in autoinflammation: putative role in pathogenesis and usefulness as biomarkers. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 147: 229–241.
185. Zawada, A. M., K. S. Rogacev, B. Rotter, P. Winter, R.-R. Marell, D. Fliser, and G. H. Heine. 2011. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118: e50–61.
186. Anbazhagan, K., I. Duroux-Richard, C. Jorgensen, and F. Apparailly. 2014. Transcriptomic Network Support Distinct Roles of Classical and Non-Classical Monocytes in Human. *Int. Rev. Immunol.* 33: 470–489.
187. Nazareth, N., F. Magro, J. Silva, M. Duro, D. Gracio, R. Coelho, R. Appelberg, G. Macedo, and A. Sarmiento. 2014. Infliximab therapy increases the frequency of circulating CD16(+) monocytes and modifies macrophage cytokine response to bacterial infection. *Clin. Exp. Immunol.* 177: 703–711.
188. Chara, L., A. Sánchez-Atrio, A. Pérez, E. Cuende, F. Albarrán, A. Turrión, J. Chevarria, A. A. del Barco, M. A. Sánchez, J. Monserrat, A. Prieto, A. de la Hera, I. Sanz, D. Diaz, and M. Alvarez-Mon. 2015. The number

of circulating monocytes as biomarkers of the clinical response to methotrexate in untreated patients with rheumatoid arthritis. *J. Transl. Med.* 13: 2.

189. Tang, M.-X., Y.-H. Zhang, L. Hu, J. Kwak-Kim, and A.-H. Liao. 2015. CD14(++) CD16(+) HLA-DR(+) Monocytes in Peripheral Blood are Quantitatively Correlated with the Severity of Pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989* 74: 116–122.

190. Funderburg, N. T., D. A. Zidar, C. Shive, A. Lioi, J. Mudd, L. W. Musselwhite, D. I. Simon, M. A. Costa, B. Rodriguez, S. F. Sieg, and M. M. Lederman. 2012. Shared monocyte subset phenotypes in HIV-1 infection and in uninfected subjects with acute coronary syndrome. *Blood* 120: 4599–4608.

191. Anbazhagan, K., I. Duroux-Richard, C. Jorgensen, and F. Apparailly. 2014. Transcriptomic network support distinct roles of classical and non-classical monocytes in human. *Int. Rev. Immunol.* 33: 470–489.

192. Kullo, I. J., D. D. Hensrud, and T. G. Allison. 2002. Comparison of numbers of circulating blood monocytes in men grouped by body mass index (<25, 25 to <30, > or =30). *Am. J. Cardiol.* 89: 1441–1443.

193. Poitou, C., E. Dalmás, M. Renovato, V. Benhamo, F. Hajdúch, M. Abdennour, J.-F. Kahn, N. Veyrie, S. Rizkalla, W.-H. Fridman, C. Sautès-Fridman, K. Clément, and I. Cremer. 2011. CD14dimCD16+ and CD14+CD16+ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 2322–2330.

194. Pandzic Jaksic, V., B. Gizdic, Z. Miletic, K. Trutin-Ostovic, and O. Jaksic. 2013. Association of monocyte CCR2 expression with obesity and insulin resistance in postmenopausal women. *Clin. Investig. Med. Médecine Clin. Exp.* 36: E24–31.

195. Degasperis, G. R., R. G. P. Denis, J. Morari, C. Solon, B. Geloneze, C. Stabe, J. C. Pareja, A. E. Vercesi, and L. A. Velloso. 2009. Reactive oxygen species production is increased in the peripheral blood monocytes of obese patients. *Metabolism.* 58: 1087–1095.

196. Keophiphath, M., C. Rouault, A. Divoux, K. Clément, and D. Lacasa. 2010. CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 39–45.

197. Maffei, M., M. Funicello, T. Vottari, O. Gamucci, M. Costa, S. Lisi, A. Viegi, O. Ciampi, G. Bardi, P. Vitti, A. Pinchera, and F. Santini. 2009. The obesity and inflammatory marker haptoglobin attracts monocytes via interaction with chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2). *BMC Biol.* 7: 87.

198. Krininger, P., R. Ensenauer, K. Ehlers, K. Rauh, J. Stoll, S. Krauss-Etschmann, H. Hauner, and H. Laumen. 2014. Peripheral monocytes of obese women display increased chemokine receptor expression and migration capacity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99: 2500–2509.

199. Nagareddy, P. R., M. Kraakman, S. L. Masters, R. A. Storzaker, D. J. Gorman, R. W. Grant, D. Dragoljevic, E. S. Hong, A. Abdel-Latif, S. S. Smyth, S. H. Choi, J. Korner, K. E. Bornfeldt, E. A. Fisher, V. D. Dixit, A. R. Tall, I. J. Goldberg, and A. J. Murphy. 2014. Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell Metab.* 19: 821–835.

200. Marsh, J. B. 2003. Lipoprotein metabolism in obesity and diabetes: insights from stable isotope kinetic studies in humans. *Nutr. Rev.* 61: 363–375.

201. Tani, S., K. Nagao, T. Anazawa, H. Kawamata, S. Furuya, H. Takahashi, K. Iida, M. Matsumoto, T. Washio, N. Kumabe, and A. Hirayama. 2009. Association of leukocyte subtype counts with coronary atherosclerotic regression following pravastatin treatment. *Am. J. Cardiol.* 104: 464–469.

202. Tani, S., K. Nagao, T. Anazawa, H. Kawamata, S. Furuya, H. Takahashi, K. Iida, M. Matsumoto, T. Washio, N. Kumabe, and A. Hirayama. 2009. Association of leukocyte subtype counts with coronary atherosclerotic regression following pravastatin treatment. *Am. J. Cardiol.* 104: 464–469.

203. Han, K. H., R. K. Tangirala, S. R. Green, and O. Quehenberger. 1998. Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 1983–1991.

204. Serbina, N. V., and E. G. Pamer. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* 7: 311–317.
205. Sala, F., L. Cutuli, L. Grigore, A. Pirillo, G. Chiesa, A. L. Catapano, and G. D. Norata. 2013. Prevalence of classical CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> but not of intermediate CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> monocytes in hypoalphalipoproteinemia. *Int. J. Cardiol.* 168: 2886–2889.
206. Alamanda, V., S. Singh, N. J. Lawrence, and S. P. Chellappan. 2012. Nicotine-mediated induction of E-selectin in aortic endothelial cells requires Src kinase and E2F1 transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418: 56–61.
207. Alvarez, A., M. Cerdá-Nicolás, Y. Naim Abu Nabah, M. Mata, A. C. Issekutz, J. Panés, R. R. Lobb, and M.-J. Sanz. 2004. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood* 104: 402–408.
208. Eriksson, E. E., J. Werr, Y. Guo, P. Thoren, and L. Lindbom. 2000. Direct observations in vivo on the role of endothelial selectins and alpha(4) integrin in cytokine-induced leukocyte-endothelium interactions in the mouse aorta. *Circ. Res.* 86: 526–533.
209. Hansson, G. K., and A. Hermansson. 2011. The immune system in atherosclerosis. *Nat. Immunol.* 12: 204–212.
210. Riou, S., B. Mees, B. Esposito, R. Merval, J. Vilar, D. Stengel, E. Ninio, R. van Haperen, R. de Crom, A. Tedgui, and S. Lehoux. 2007. High pressure promotes monocyte adhesion to the vascular wall. *Circ. Res.* 100: 1226–1233.
211. Zerneck, A., E. Shagdarsuren, and C. Weber. 2008. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 1897–1908.
212. Thomas, G., R. Tacke, C. C. Hedrick, and R. N. Hanna. 2015. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35: 1306–1316.
213. Gautier, E. L., C. Jakubzick, and G. J. Randolph. 2009. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29: 1412–1418.
214. Tacke, F., D. Alvarez, T. J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, J. Liu, M. Mack, N. van Rooijen, S. A. Lira, A. J. Habenicht, and G. J. Randolph. 2007. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 117: 185–194.
215. Rogacev, K. S., B. Cremers, A. M. Zawada, S. Seiler, N. Binder, P. Ege, G. Große-Dunker, I. Heisel, F. Hornof, J. Jeken, N. M. Rebling, C. Ulrich, B. Scheller, M. Böhm, D. Fliser, and G. H. Heine. 2012. CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60: 1512–1520.
216. Zawada, A. M., K. S. Rogacev, S. H. Schirmer, M. Sester, M. Böhm, D. Fliser, and G. H. Heine. 2012. Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology* 217: 1273–1284.
217. Berg, K. E., I. Ljungcrantz, L. Andersson, C. Bryngelsson, B. Hedblad, G. N. Fredrikson, J. Nilsson, and H. Björkbacka. 2012. Elevated CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monocytes Predict Cardiovascular Events. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 5: 122–131.
218. Dalmás, E., N. Venteclef, C. Caer, C. Poitou, I. Cremer, J. Aron-Wisnewsky, S. Lacroix-Desmazes, J. Bayry, S. V. Kaveri, K. Clément, S. André, and M. Guerre-Millo. 2014. T cell-derived IL-22 amplifies IL-1β-driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 63: 1966–1977.
219. Herder, C., A. Zierer, W. Koenig, M. Roden, C. Meisinger, and B. Thorand. 2009. Transforming growth factor-beta1 and incident type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA case-cohort study, 1984–2002. *Diabetes Care* 32: 1921–1923.
220. Jagannathan-Bogdan, M., M. E. McDonnell, H. Shin, Q. Rehman, H. Hasturk, C. M. Apovian, and B. S.

- Nikolajczyk. 2011. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186: 1162–1172.
221. Hatanaka, E., P. T. Monteagudo, M. S. M. Marrocos, and A. Campa. 2006. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 146: 443–447.
222. Jaedicke, K. M., A. Roythorne, K. Padget, S. Todryk, P. M. Preshaw, and J. J. Taylor. 2013. Leptin up-regulates TLR2 in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 93: 561–571.
223. Gautier, E. L., C. Jakubzick, and G. J. Randolph. 2009. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29: 1412–1418.
224. Nicholson, A. C., S. Frieda, A. Pearce, and R. L. Silverstein. 1995. Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 269–275.
225. Calvo, D., D. Gómez-Coronado, Y. Suárez, M. A. Lasunción, and M. A. Vega. 1998. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J. Lipid Res.* 39: 777–788.
226. Hajri, T., X. X. Han, A. Bonen, and N. A. Abumrad. 2002. Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *J. Clin. Invest.* 109: 1381–1389.
227. Basu, S., M. Haghiaci, P. Surace, J.-C. Challier, M. Guerre-Millo, K. Singh, T. Waters, J. Minium, L. Presley, P. M. Catalano, and S. Hauguel-de Mouzon. 2011. Pregravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. *Obes. Silver Spring Md* 19: 476–482.
228. Janssen, A. W. F., and S. Kersten. 2015. The role of the gut microbiota in metabolic health. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*
229. Brun, P., I. Castagliuolo, V. Di Leo, A. Buda, M. Pinzani, G. Palù, and D. Martines. 2007. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292: G518–525.
230. Chen, G. Y., and G. Nuñez. 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 826–837.
231. Nguyen, X.-M. T., J. Lane, B. R. Smith, and N. T. Nguyen. 2009. Changes in inflammatory biomarkers across weight classes in a representative US population: a link between obesity and inflammation. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* 13: 1205–1212.
232. Poitou, C., C. Coussieu, C. Rouault, M. Coupaye, R. Canello, J.-F. Bedel, M. Gouillon, J.-L. Bouillot, J.-M. Oppert, A. Basdevant, and K. Clément. 2006. Serum amyloid A: a marker of adiposity-induced low-grade inflammation but not of metabolic status. *Obes. Silver Spring Md* 14: 309–318.
233. Giacobbe, A., R. Grasso, G. Imbesi, C. D. Salpietro, L. Grasso, A. S. Laganà, O. Triolo, and A. Di Benedetto. 2015. High mobility group protein B1: a new biomarker of obesity in pregnant women? *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 31: 113–115.
234. Guiducci, C., M. Gong, A.-M. Cepika, Z. Xu, C. Tripodo, L. Bennett, C. Crain, P. Quartier, J. J. Cush, V. Pascual, R. L. Coffman, and F. J. Barrat. 2013. RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 210: 2903–2919.
235. Vollmer, J., S. Tluk, C. Schmitz, S. Hamm, M. Jurk, A. Forsbach, S. Akira, K. M. Kelly, W. H. Reeves, S. Bauer, and A. M. Krieg. 2005. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J. Exp. Med.* 202: 1575–1585.
236. Prinz, N., N. Clemens, D. Strand, I. Pütz, M. Lorenz, A. Daiber, P. Stein, A. Degreif, M. Radsak, H. Schild, S. Bauer, P. von Landenberg, and K. J. Lackner. 2011. Antiphospholipid antibodies induce translocation of TLR7 and TLR8 to the endosome in human monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 118: 2322–2332.

237. Döring, Y., J. Hurst, M. Lorenz, N. Prinz, N. Clemens, M. D. Drechsler, S. Bauer, J. Chapman, Y. Shoenfeld, M. Blank, K. J. Lackner, and P. von Landenberg. 2010. Human antiphospholipid antibodies induce TNF $\alpha$  in monocytes via Toll-like receptor 8. *Immunobiology* 215: 230–241.
238. Ray, R. J., C. J. Paige, C. Furlonger, S. D. Lyman, and R. Rottapel. 1996. Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7. *Eur. J. Immunol.* 26: 1504–1510.
239. Shen, L., C. Zhang, T. Wang, S. Brooks, R. J. Ford, Y. C. Lin-Lee, A. Kasianowicz, V. Kumar, L. Martin, P. Liang, J. Cowell, and J. L. Ambrus. 2006. Development of autoimmunity in IL-14 $\alpha$ -transgenic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177: 5676–5686.
240. Astier, A. L., G. Beriou, T. M. Eisenhaure, S. M. Anderton, D. A. Hafler, and N. Hacohen. 2010. RNA interference screen in primary human T cells reveals FLT3 as a modulator of IL-10 levels. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184: 685–693.
241. Sun, K., J. Tordjman, K. Clément, and P. E. Scherer. 2013. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.* 18: 470–477.
242. Fullard, N., and S. O’Reilly. 2015. Role of innate immune system in systemic sclerosis. *Semin. Immunopathol.*
243. Ciechomska, M., C. A. Huigens, T. Hügle, T. Stanly, A. Gessner, B. Griffiths, T. R. D. J. Radstake, S. Hambleton, S. O’Reilly, and J. M. van Laar. 2013. Toll-like receptor-mediated, enhanced production of profibrotic TIMP-1 in monocytes from patients with systemic sclerosis: role of serum factors. *Ann. Rheum. Dis.* 72: 1382–1389.
244. Salluh, J. I. F., and P. Póvoa. 2010. Biomarkers as end points in clinical trials of severe sepsis: a garden of forking paths. *Crit. Care Med.* 38: 1749–1751.
245. Kalil, A. C., S. P. LaRosa, J. Gogate, M. Lynn, S. M. Opal, and Eritoran Sepsis Study Group. 2011. Influence of severity of illness on the effects of eritoran tetrasodium (E5564) and on other therapies for severe sepsis. *Shock Augusta Ga* 36: 327–331.
246. Huggins, C., S. Pearce, F. Peri, F. Neumann, G. Cockerill, and G. Pirianov. 2015. A novel small molecule TLR4 antagonist (IAXO-102) negatively regulates non-hematopoietic toll like receptor 4 signalling and inhibits aortic aneurysms development. *Atherosclerosis* 242: 563–570.
247. Lu, Z., X. Zhang, Y. Li, M. F. Lopes-Virella, and Y. Huang. 2015. TLR4 antagonist attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice with diet-induced type 2 diabetes. *Immunobiology* 220: 1246–1254.
248. Jiang, W., F.-G. Zhu, L. Bhagat, D. Yu, J. X. Tang, E. R. Kandimalla, N. La Monica, and S. Agrawal. 2013. A Toll-like receptor 7, 8, and 9 antagonist inhibits Th1 and Th17 responses and inflammasome activation in a model of IL-23-induced psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 133: 1777–1784.
249. Suárez-Fariñas, M., R. Arbeit, W. Jiang, F. S. Ortenzio, T. Sullivan, and J. G. Krueger. 2013. Suppression of molecular inflammatory pathways by Toll-like receptor 7, 8, and 9 antagonists in a model of IL-23-induced skin inflammation. *PLoS One* 8: e84634.
250. Kusminski, C. M., W. L. Holland, K. Sun, J. Park, S. B. Spurgin, Y. Lin, G. R. Askew, J. A. Simcox, D. A. McClain, C. Li, and P. E. Scherer. 2012. MitoNEET-driven alterations in adipocyte mitochondrial activity reveal a crucial adaptive process that preserves insulin sensitivity in obesity. *Nat. Med.* 18: 1539–1549.
251. Takahashi, T., M. Yamamoto, K. Amikura, K. Kato, T. Serizawa, K. Serizawa, D. Akazawa, T. Aoki, K. Kawai, E. Ogasawara, J.-I. Hayashi, K. Nakada, and M. Kainoh. 2015. A novel MitoNEET ligand, TT01001, improves diabetes and ameliorates mitochondrial function in db/db mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 352: 338–345.
252. Geldenhuys, W. J., T. C. Leeper, and R. T. Carroll. 2014. mitoNEET as a novel drug target for

mitochondrial dysfunction. *Drug Discov. Today* 19: 1601–1606.

253. Thomas, A. C., W. J. Eijgelaar, M. J. A. P. Daemen, and A. C. Newby. 2015. Foam Cell Formation In Vivo Converts Macrophages to a Pro-Fibrotic Phenotype. *PLoS One* 10: e0128163.

254. Cone, R. D. 2006. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr. Rev.* 27: 736–749.

255. Wallace, J. L. 2014. Exploiting endogenous anti-inflammatory pathways as a therapeutic approach to multiorgan inflammatory disease. *Am. J. Pathol.* 184: 2154–2155.

256. Yoshimura, T., and J. J. Oppenheim. 2011. Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2); two multifunctional receptors with unusual properties. *Exp. Cell Res.* 317: 674–684.

257. Devêvre, E. F., M. Renovato-Martins, K. Clément, C. Sautès-Fridman, I. Cremer, and C. Poitou. 2015. Profiling of the three circulating monocyte subpopulations in human obesity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194: 3917–3923.

258. Vangaveti, V., V. Shashidhar, G. Jarrod, B. T. Baune, and R. L. Kennedy. 2010. Free fatty acid receptors: emerging targets for treatment of diabetes and its complications. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 1: 165–175.

259. Harrison, S. 2001. Substance P. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33: 555–576.

260. Ramalho, R., J. Almeida, M. Beltrão, A. Pirraco, R. Costa, O. Sokhatska, L. Guardão, C. Palmares, J. T. Guimarães, L. Delgado, A. Moreira, and R. Soares. 2013. Substance P antagonist improves both obesity and asthma in a mouse model. *Allergy* 68: 48–54.

261. Khan, M. M., S. D. Douglas, and T. D. Benton. 2012. Substance P-neurokinin-1 receptor interaction upregulates monocyte tissue factor. *J. Neuroimmunol.* 242: 1–8.

262. Ramalho, R., J. Almeida, M. Beltrão, A. Pirraco, R. Costa, O. Sokhatska, L. Guardão, C. Palmares, J. T. Guimarães, L. Delgado, A. Moreira, and R. Soares. 2012. Neurogenic inflammation in allergen-challenged obese mice: A missing link in the obesity-asthma association? *Exp. Lung Res.* 38: 316–324.

263. Won, J. C., C.-Y. Park, S. W. Oh, E. S. Lee, B.-S. Youn, and M.-S. Kim. 2014. Plasma clusterin (ApoJ) levels are associated with adiposity and systemic inflammation. *PLoS One* 9: e103351.

264. Cunnane, G., S. Grehan, S. Geoghegan, C. McCormack, D. Shields, A. S. Whitehead, B. Bresnihan, and O. Fitzgerald. 2000. Serum amyloid A in the assessment of early inflammatory arthritis. *J. Rheumatol.* 27: 58–63.

265. Gouwy, M., M. De Buck, N. Pörtner, G. Opdenakker, P. Proost, S. Struyf, and J. Van Damme. 2015. Serum amyloid A chemoattracts immature dendritic cells and indirectly provokes monocyte chemotaxis by induction of cooperating CC and CXC chemokines. *Eur. J. Immunol.* 45: 101–112.

266. Dalmas, E., C. Rouault, M. Abdennour, C. Rovere, S. Rizkalla, A. Bar-Hen, J.-L. Nahon, J.-L. Bouillot, M. Guerre-Millo, K. Clément, and C. Poitou. 2011. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am. J. Clin. Nutr.* 94: 450–458.

267. Calder, P. C., N. Ahluwalia, F. Brouns, T. Buetler, K. Clement, K. Cunningham, K. Esposito, L. S. Jönsson, H. Kolb, M. Lansink, A. Marcos, A. Margioris, N. Matusheski, H. Nordmann, J. O'Brien, G. Pugliese, S. Rizkalla, C. Schalkwijk, J. Tuomilehto, J. Wärnberg, B. Watzl, and B. M. Winklhofer-Roob. 2011. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br. J. Nutr.* 106 Suppl 3: S5–78.

268. Paley, C. A., and M. I. Johnson. 2015. Physical Activity to Reduce Systemic Inflammation Associated with Chronic Pain and Obesity: A Narrative Review. *Clin. J. Pain* .

## RESUME

Les monocytes détectent des signaux métaboliques circulants qu'ils traduisent en signaux immunologiques. Ils infiltrer les tissus inflammés et sont également les précurseurs des macrophages. Dans l'obésité, la fréquence, le nombre, le phénotype et la fonctionnalité des sous populations de monocytes (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> [CM], CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> [IM] et CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> [NCM]) sont spécifiquement modulés. Le phénotype des monocytes est pro-inflammatoire avec une plus forte réponse à la stimulation de TLR4 et de TLR8. Nos travaux suggèrent une capacité migratoire accrue des CM et des IM. La comparaison du transcriptome des sous populations chez des sujets obèses et des témoins, révèle une signature spécifique de chaque sous population montrant un plus fort impact de l'obésité sur les CM. Ils soutiendraient l'inflammation en modulant des gènes impliqués dans la signalisation cellulaire. Ils migreraient avec les IM vers les tissus inflammés. Les NCM resteraient plus longtemps dans la circulation où leur fonction de « patrouilleurs » serait accrue. Les gènes les plus modulés par les CM et les IM, respectivement Clusterine et CDGSH iron sulfur domain 1 sont des ponts entre la réponse immunitaire, le métabolisme et la réponse au stress. L'étude des « tops » gènes dont l'expression est la plus fortement modulée et des fonctions les plus probablement modulées révèle que le métabolisme des monocytes serait modifié dans l'obésité. Ce travail ouvre des perspectives concernant : 1) une éventuelle composante auto-immune de l'inflammation de bas grade et 2) des relations entre des modifications du métabolisme des monocytes et leur fonctionnalité.

Mots clés : sous populations de monocytes, obésité, inflammation, métabolisme

## ABSTRACT

Systemic inflammation is pivotal in establishing and sustaining the obesity low-grade inflammatory status. Studying monocytes is important because they can detect metabolic cues in the circulation that are then translated into immunological factors. Monocytes infiltrating inflamed tissues are also macrophage precursors. In obesity, frequency, number, phenotype and functionality of the three monocyte-subsets (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> [CM], CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> [IM] et CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> [NCM]) are specifically altered. We observed a pro-inflammatory phenotype of monocytes in obesity with an increased response to TLR4 and TLR8 stimulation. Our work suggests an increased migratory capacity of CM and IM. Comparison of the transcriptome of the three subsets in obese and control subjects shows an increased imprint of obesity on CM. CM could sustain inflammation by modulating genes involved in cell signaling. They most probably migrate with the IM toward inflamed tissues. Whereas, NCM should stay longer in the circulation where their patrolling function could be increased. The most modulated genes by CM and IM, respectively Clusterin and CDGSH iron sulfur domain 1 (CISD1) are bridges between immune response, metabolism and stress response. The analysis of the top modulated genes and of the most probably modulated functions indicates that monocyte metabolism is altered by obesity. We open new paths of research: 1) a possible auto-immune trait of the low grade inflammation and 2) a possible link between altered monocyte metabolism and their functionality.

Key words : monocyte subsets, obesity, inflammation, metabolism