HAL
open science

Infection par le VIH et tissu adipeux

Abderaouf Damouche

To cite this version:

Abderaouf Damouche. Infection par le VIH et tissu adipeux. Maladies infectieuses. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS124 . tel-01618212

HAL Id: tel-01618212

https://theses.hal.science/tel-01618212v1

Submitted on 17 Oct 2017

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.

NNT : 2017SACLS124

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
LA FACULTE DE PHARMACIE
(CHATENAY-MALABRY)

ECOLE DOCTORALE N° 569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Spécialité de doctorat : Immunologie

Par

Mr Abderaouf DAMOUCHE

Tissu adipeux et infection par le VIH

Thèse présentée et soutenue à Le Kremlin Bicêtre, le 30 Juin 2017 :

Composition du Jury :

Mme DELAUGERRE Constance	PU-PH (Hôpital Saint-Louis - INSERM UMR 941)	Présidente
Mme HÜE Sophie	PU-PH (CHU Henri Mondor Créteil - INSERM U955)	Rapporteur
Mr DELOBEL Pierre	PU-PH (CHU de Toulouse - INSERM UMR 1043)	Rapporteur
Mme LAGATHU Claire	MC (Hôpital Saint-Louis - INSERM UMR 938)	Examinatrice
Mme BOURGEOIS Christine	CR1 (CHU du Kremlin Bicêtre - INSERM UMR 1184)	Directeur de thèse
Mr LAMBOTTE Olivier	PU-PH (CHU du Kremlin Bicêtre - INSERM UMR 1184)	Co-directeur de thèse

Dédicace

Je dédie cette thèse à la mémoire de mon professeur d'immunologie, le Pr Mustapha Benboubetra. J'ai beaucoup appris à tes cotés. Ton image, montant l'escalier de la faculté pour nous dispenser des cours, malgré les problèmes de santé que tu avais, restera éternellement gravée dans ma mémoire. J'espère pouvoir consacrer toute ma vie à la science comme tu l'as fait. Repose en paix mon deuxième père et que Dieu t'accueille dans son vaste paradis.

Remerciements

Je remercie les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail :

Mme le Dr Constance Delaugerre, pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury.

Merci aux Pr Hüe et Delobel d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et de m'avoir aiguillé par vos précieux commentaires.

Merci à Mme le Dr Claire Lagathu d'avoir accepté d'être examinatrice de ma thèse.

Je remercie le Dr Roger Le Grand de m'avoir accueilli au sein du centre IMVA et de m'avoir permis de faire cette thèse dans les meilleures conditions. Merci également au Pr Marc Tardieu, notre ancien directeur d'unité.

Ce travail de thèse n'aurait pu avoir lieu sans l'aide de plusieurs personnes que je tiens à remercier ici.

Mes plus vifs et sincères remerciements vont bien entendu à mes deux directeurs de thèse, le Dr Christine Bourgeois et le Pr Olivier Lambotte. Sans vous, ce projet n'aurait pas vu le jour.

Christine,
Pour m'avoir initié aux manipulations expérimentales, pour m'avoir accompagné dans l'aboutissement de ce projet, pour m'avoir épaulé et avoir cru en moi dans les moments les plus difficiles.
Merci beaucoup pour tes encouragements, ta gentillesse, ton humour, et merci surtout pour ta disponibilité au quotidien, ton sens de l'écoute et pour le temps que tu as consacré à nos discussions.

Merci pour toutes tes qualités que j'ai arrêtées de compter depuis longtemps maintenant!!!, qui ne sauront être énumérées dans ces quelques pages! Tu es une personne que je respecte énormément, qui a toujours su me guider dans la bonne voie. J'espère que nous continuerons à collaborer ensemble.

Olivier,
Mille mercis de m'avoir accompagné et aidé jusqu'à l'aboutissement de ce travail, de m'avoir transmis de nombreuses notions d'immunologie et de virologie. Merci pour toutes tes qualités humaines, pour tes encouragements,. Ta rigueur, ta curiosité scientifique et ton esprit critique m'ont beaucoup appris.

<u>Toutes les personnes de notre unité que j'ai pu croisées au cours de cette aventure et qui ont permis de rendre le laboratoire plus vivant et animé:</u>

Maissa,
Ma grande sœur (pas trop grande non plus (30 ans et pas plus!!), on s'arrête à 30 ans comme promis!!). Merci Maissa de nous avoir soutenus, Meriem et moi dans les moments les plus durs de ces 5 dernières années. Je te souhaite un bon courage et que Dieu te facilite inchallah pour la suite. Reste positive et crois moi, tu vas y arriver, j'ai confiance en toi. Tu seras la prochaine sur la liste des doctorants à avoir survécu après leur thèse. Enfin comme vous dites chez vous "sit b 70 ragel, rabi ybarek fik" toi, Mohamed et les deux petits Laemiss et Ghazi.

Saida,
La normando-chleuh!! Le cocktail fatal!! Merci pour ton aide, pour m'avoir expliqué et initié aux manips de bio-mol (et oui t'expliques très bien!!). Merci pour le deuxième tiroir, que j'appelle "le trésor sucré"!! Je vous souhaite que du bonheur, à toi, Badr et au petit Yassir, le chleuh normand parisien 3arbi!!

Salma,
La jeune maman, je suis content pour Ahmed et toi. Merci pour ta précieuse aide et pour tous les conseils que tu m'as donnés tout au long de ma thèse. Je te souhaite un avenir plein de réussite.

Bineta,
La seule rescapée de l'ancienne team, qui m'aura accompagné jusqu'à la fin de ma thèse, merci pour le "trésor sucré" qu'on partageait avec Saida, merci pour ta sympathie et pour tous.

Kim,
Mon ancienne voisine de bureau!! Merci pour ton aide pendant mes débuts au labo, merci d'avoir facilité mon adaptation et de m'avoir mis à l'aise dans l'équipe. Sache que j'admire le choix de carrière que tu as pris après ta thèse. Je te souhaite un bon courage.

La Fat Team!!! Ceux où tu trouves du jaune, sache qu'ils sont passés par là!!!
Merci Samira, Jennifer, Chloé et Ariane, ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

Stéphane,
Mon voisin d'à côté!! Merci pour le soutien que tu m'as apporté au début de ma thèse.
Bon courage pour ton post doc et reviens nous avec beaucoup de sciences et de savoir!!

Adela,
Ma voisine de bureau depuis un an et demi, merci pour tes encouragements, pour ton soutien moral, pour nos discussions interminables sur notre avenir, sur la pertinence de faire une formation après la thèse ou pas. Bon courage, c'est la dernière ligne droite, plus que quelques mois et ce sera terminé.

Aux anciens et actuels thésards,
Gaëtane, Manon, Elodie, Anaëlle, Nicolas et Olivier. Je vous souhaite le meilleur dans votre carrière, nos futurs PU-PH!!!

Marie,
Oh Marie, si tu savais que les meilleurs gâteaux sont par toi fait
Oh Marie, si je pouvais devant ta tarte au citron me reposer!!!
Merci Marie, je te souhaite un bon courage INCHALAH ;-)

Houria, Marie Ghislaine, Camille, Sandie, Soledad, Carole, Cyrielle, Vixra, Juliette, Audrey, Chloé, Philippe, Min, Alex,

C'était un plaisir de vous avoir comme collègues, merci pour votre sympathie et gentillesse

Comme on peut le voir dans ces remerciements, ça sent beaucoup les œstrogènes dans le labo!!! Mais j'y ai survécu!!! Je vous remercie pour nos discussions fructueuses, scientifiques, intellectuelles sur : 1- l'accouchement, 2- les douleurs de la césarienne, 3- l'efficacité de la péridurale, 4-comment boire du lait avec son petit, 5- les douleurs pendant que l'on essaye de comprendre le cycle de .... de Krebs, et la liste est looooooonnnnggguuee.

Mais sincèrement un grand merci, j'ai beaucoup appris de vous!!! Pour mieux comprendre ma Mimi à moi.

<u>Toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer de près ou de loin au cours de ses quatre dernières années.</u>

"Les scientifiques" et "Les cliniciens" Ladies first !!
Merci à Nathalie Dereuddre-Bosquet, Michaela Müller-Trutwin, Christine Rouzioux, Jacqueline Capeau, Véronique Avettand-Fènoël, Véronique Béréziat, Nathalie Dejucq-Rainsford.

Merci à Benoit Favier, Bruno Vaslin, Antonio Cosma, Thierry Lazure, Nicolas Huot, Jade Ghosn, Julien Adam, Valérie Martinez, Guillaume Pourcher, Stéphane Benoist, Jean Jacques Lataillade

<u>Mes amis,</u>

Mourad l12 lrgig,
Merci pour ton soutien et tes encouragements tu étais comme mon grand frère.

Wissem,
Mon meilleur ami et mon frère. Merci de m'avoir transmis ton amour à la science, sans toi je ne serai jamais arrivé ou je suis maintenant. Merci pour les moments qu'on a partagé à lBAZ !!

L Baiche ya l Baiche,
Merci pour tous les moments drôles qu'on à partager et de m'avoir initié au kick boxing et à l'astronomie. J'ai appris beaucoup de choses de toi.

Mohammed Khodja et Mustapha
Merci de m'avoir aidé surtout lors de mes premiers mois d'arrivé en France ou j'étais seul et je connaissais personne.

Les deux séniors 3ami Malek et 3ami Saleh, et chikh boubaker
Merci pour tou

Fouad, Wassila et les trois petits mousquetaires
Merci pour votre soutien, pour ton aide Fouad, tes encouragements pour poursuivre ce chemin. Merci Wasilla pour les succulents plats que j'adorais surtout après des looooongueeeeeees journées de travail !!! Merci vous êtes notre deuxième famille.

Djamel, FZ et les deux petits Ayoub et Sara
Merci pour votre soutient

Mohammed l'oranais « A B dalle de sols »!
Pour les cafés qu'on prenait au relais H, pour ton esprit d'écoute et tes encouragements quand je craquais.

Larbi
Merci pour tes conseils, et courage cet été essaye de partir en Algérie !

Ma famille

Maman,
Tous ce que je pourrai faire ne sera pas suffisant pour te remercier….

Papa,
Le meilleur papa au monde merci pour tout, de m'avoir encouragé à chaque étape et à chaque choix que je faisais

Ali,Anis et Alaa
Et mon adorable petite sœur, merci d'être présent dans ma vie.

Mes grands-parents Baba Ali et Yaya,
Merci de me rappeler à chaque fois qu'il ne faut jamais faire marche arrière dans la quête de la science et jamais arrêter d'étudier.

Ma belle-famille,
Naboulti! Jasi et ghozlein,
Merci

La meilleure chose bien sûr je la garde pour la fin….

Meriem…..

Tu sais ? Il me faut une autre thèse spéciale pour te remercier !!

Merci de :

D'être à mes côtés depuis 10 ans maintenant,
M'avoir accompagné dans toutes les aventures,
M'avoir épaulé et aidé,
Savoir transformer mes douleurs en sourire
D'avoir supporté le thésard que j'étais et les soirs où je rentrai à minuit après les longues manips
D'avoir encaissée au temps de Gouli Gouli !! Et mes sauts d'humour
Merci pour ton Amour, tes encouragements et ta patience et ton Laser qui sans lui j'aurais du terminer ça fait longtemps cette thèse !

Je saurais jamais te rendre ce que tu m'as donné mon ange, tu es Unique !

A la fin et au début Hamdoulah pour tous:

Table des matières

ABREVIATIONS **5**

LISTE DES FIGURES **7**

LISTE DES TABLEAUX **8**

INTRODUCTION **9**

I. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) **11**

I. 1. Généralités 11

I. 1. 1. Epidémiologie 11

I. 1. 2. Cibles cellulaires du virus VIH 12

I. 1. 2. a. Les lymphocytes T CD4 12

I. 1. 2. b. Les macrophages 13

I. 1. 3. Physiopathologie de l'infection par le VIH 14

I. 1. 3. a. Etapes précoces de l'infection 14

I. 1. 3. b. Altérations immunologiques au cours de l'infection par le VIH 16

I. 1. 3. c. Altérations métaboliques au cours de l'infection par le VIH 18

I. 1. 4. Modèles animaux pour l'étude de l'infection par le VIH 21

I. 1. 4. a. Hôtes naturels du SIV / Singes africains 21

I. 1. 4. b. Hôtes non naturels du SIV 22

I. 2. Persistance du virus et réservoirs viraux 24

I. 2. 1. Persistance virale 24

I. 2. 2. Réservoirs latents 26

I. 2. 2. a. Distinguer infection abortive et active 27

I. 2. 2. b. Quand est-ce que le réservoir est établi ? 27

I. 2. 2. c. Les réservoirs cellulaires 28

I. 2. 2. d. Les réservoirs tissulaires 33

I. 3. Activation immunitaire chronique au cours de l'infection par le VIH 37

I. 3. 1. Activation immunitaire et inflammation 37

I. 3. 1. a. Activation immunitaire 38

I. 3. 1. b. Inflammation 40

I. 3. 2. Conséquences de l'inflammation 42

I. 3. 3. Mécanismes d'inflammation et activation immunitaire 45

1. 3. 3. a. Réplication du VIH et réponse immunitaire au virus 45

1. 3. 3. b. Les protéines virales 46

1. 3. 3. c. Translocation microbienne et altération de la muqueuse intestinale 47

1. 3. 3. d. Rôle du microbiote 50

1. 3. 3. e. La lymphopénie T 50

1. 3. 3. f. Les co-infections 51

I. 4. Lien entre réservoirs tissulaires et inflammation chronique au cours de l'infection par le VIH 51

II. Tissu adipeux et infection par le VIH 55

II. 1. Le tissu adipeux 55

II. 1. 1. Localisation 55

II. 1. 2. Composition 56

II. 1. 2. a. Les adipocytes 57

II. 1. 2. b. Les cellules de la fraction stroma-vasculaire 57

II. 1. 3. Fonction métabolique du TA 64

II. 1. 4. Fonctions endocriniennes : les adipokines 66

II.1.5. Caractérisation immunologique du TA 67

II. 1. 5. a. Cytokines pro et/ou anti-inflammatoires 67

II. 1. 5. b. Fonctions immunitaires des cellules du TA 68

II. 1. 5. c. Interaction entre environnement adipeux et cellules immunitaires. 68

II. 1. 5. d. Différence entre tissu adipeux sous-cutané et viscéral. 68

II. 2. Pathologies métaboliques liés au tissu adipeux 69

II. 2. 1. L'obésité 69

II. 2. 2. Les lypodystrophies (congénitales) 69

II. 3. Altération du tissu adipeux au cours de l'infection par le VIH 70

II. 3. 1. Impact direct de l'infection par le VIH 70

II. 3. 2. Impact des ARV 71

Les inhibiteurs de la transcriptase inverse 71

Les inhibiteurs de protéase (IP) 71

Les autres classes d'ART 71

II. 3. 3. Le tissu adipeux site d'infection par le VIH ? 72

II. 4. Microbes et tissu adipeux 73

II. 4. 1. Infection du tissu adipeux 73

II. 4. 2. Microbiote du tissu adipeux 75

III. Objectifs du travail de thèse 77

RESULTATS 81

Article 1. Adipose tissue is a neglected viral reservoir and an inflammatory site during chronic HIV and SIV infection. PLOS Pathogens, 2015. 85

Article 2. A high proportion of PD-1 expressing CD4 T cells in adipose tissue constitutes an immunomodulatory microenvironment that may favour HIV persistence. Eur Journal of immunology, (en révision). 135

Annexe 1. Analyse du potentiel pro- ou anti-inflammatoire du tissu adipeux chez le singe infecté virémique, approche cytokinique et moléculaire. 171

Annexe 2. Proportion de lymphocytes Tγδ dans le TA de patients infectés par le VIH 172

DISCUSSION **173**

I. Persistance du VIH dans le tissu adipeux et identification d'un site réservoir **175**

II. Impact de l'infection par le VIH sur les propriétés immunologiques du TA **178**

III. Quels mécanismes d'infection et de persistance du VIH dans le tissu adipeux ? **182**

III. 1. Infection du TA par le VIH 182

III. 2. Mécanismes de persistance du VIH dans le TA 182

IV. Quelles conséquences liées à l'infection in situ du TA ? **187**

IV. 1. Lien TA / troubles métaboliques et cardiovasculaires. 187

IV. 2. Quelle influence du statut métabolique sur l'évolution de l'infection par le VIH ? . 188

IV. 3. TA : Identification d'un site réservoir jusqu'ici négligée. Quelles conséquences ? . 189

V. Potentiel anti-infectieux du TA hors infection par le VIH **190**

VI. Perspectives et conclusions 192

Une caractérisation des sous-populations immunitaires à poursuivre 192

Un site crucial d'étude de l'immunométabolisme 194

BIBLIOGRAPHIE 195

ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AGM : African Green Monkey (Singe Vert Africain)

ARN : Acide RiboNucléique

ART : Thérapie AntiRétrovirale

ARV : AntiRétroViraux

CAMP : Adénosine Mono-Phosphate cyclique

CCR : Récepteur aux Chimiokines CC

CCR5 : Récepteur aux Chimiokines CC type 5

CD : Classe de Différenciation

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CRP : Protéine C Réactive

CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses

CT : Cholestérol Total

CXCR4 : C-X-C Chemokine Receptor type 4

EBV : Virus Epstein-Barr

EndoCAb : Endogenous endotoxin-core antibody

Fas-L : Fas ligand

GALT : Tissu lymphoïde associé au tube digestif

G-CSF : Granulocyte colony-stimulating factor

HAART : Traitement antirétroviral hautement actif

HALS : Lipodystrophie associé au traitement antirétroviral hautement actif

HDL : Lipoprotéines de Haute Densité

HSV : Virus de l'Herpes Simplex

HTA : HyperTension Artérielle

HTLV1 / HTLV2 : Virus T-lymphotropique humain : type 1/ type 2

I-FABP : Intestinal Fatty Acid Binding Protein

IP : Inhibiteurs de Protéases

ISCT : International Society for Cellular Therapy

LAG-3 : Gène d'Activation Lymphocytaire 3

LBP : Protéine liant les lipopolysaccharides

LDL : Lipoprotéines de basse densité (Low Density Lipoprotein)

LPS : LipoPolySaccharide

PD-1 : Programmed cell death-1

PEG : PolyEthylene Glycol

PPARγ : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes γ

SHIV : Virus de l'immunodéficience simienne et humaine

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise

SIV : Virus de l'Immunodéficience Simienne (Simian immunodeficiency virus)

SMM : Macaque Sooty Mangabey

TARV : Traitment antirétroviral

TCM : Lymphocyte T central mémoire

TEM : Lymphocyte T effecteur mémoire

TG : Triglycéride

Tim-3 : T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3

TLR : Toll Like Receptor

TN : Lymphocyte T naif

TNFα: Facteur de Nécrose Tumorale (Tumor Necrosis Factor)

TNF-R1/R2 : TNF receptor 1/2

TSCM: Lymphocyte T Mémoire Souche

TTM: Lymphocyte T Translationnel Mémoire

VHC/VHB : Virus de l'hépatite C/B

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VNP : Non progresseurs virologiques

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Estimation du nombre de personnes vivant avec le VIH en 2012 et tendances de l'incidence de nouvelles infections de 2001 à 2012 par région mondiale (d'après Maartens et col.).

Figure 2. Evolution des taux de CD4 et charge virale au cours de l'infection (d'après Rowland-Jones et col.).

Figure 3. Différentes phases d'infection après exposition au VIH (d'après Moir et col).

Figure 4. Dissemination et propagation du VIH-1 (d'après Fackler et col.).

Figure 5. Schéma simplifié de la physiopathologie de l'infection par le VIH (d'après Moir et col.).

Figure 6. Les espèces de macaque couramment utilisées dans la recherche sur le SIDA et leurs zones géographiques (d'après Hatziioannou et col.).

Figure 7. Définition clinique du réservoir du VIH (d'après Kulpa and Chomont).

Figure 8. Représentation schématique des différents mécanismes contribuant à l'activation immunitaire chronique associée au VIH (d'après Pairdini et col.).

Figure 9. Mécanismes potentiels conduisant aux interactions entre l'activation immunitaire et la persistance du virus (d'après Reena Rajasuriar et col)

Figure 10. Dépôts de tissu adipeux dans l'organisme (d'après Ouchi et col.).

Figure 11. Composition du tissu adipeux sain (d'après Ouchi et col.).

Figure 12. Différenciation des préadipocytes en adipocytes (d'après (Esteve Ràfols et col.).

Figure 13. Modulation du profil inflammatoire du tissu adipeux au cours de l'obesité.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des paramètres d'inflammation.

Tableau 2. Populations de cellules immunitaires identifiées dans le tissu adipeux.

Tableau 3. Pathogènes détéctés dans le TA.

Introduction bibliographique

"Le secret d'un bon discours, c'est d'avoir une bonne introduction."

Claude Bernard

INTRODUCTION

I. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

I. 1. Généralités

I. 1. 1. Epidémiologie

Le VIH est un agent pathogène humain dévastateur responsable d'une pandémie mondiale conduisant, en l'absence de traitement, au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). En 2012, environ 35 millions de personnes vivaient avec le VIH (Maartens, Celum, and Lewin 2014). L'Afrique subsaharienne, en particulier l'Afrique du sud, represente le pourcentage le plus élevé de patients infectés par le VIH (70,8%) (Figure 1). L'épidémiologie mondiale de l'infection par le VIH a considérablement changé grâce à l'élargissement de l'accès au traitement antirétroviral. Grâce à l'utilisation des antirétroviraux (ARV), l'infection par le VIH n'est plus une infection mortelle mais devient une maladie chronique.

Figure 1. Estimation du nombre de personnes vivant avec le VIH en 2012 et tendances de l'incidence de nouvelles infections de 2001 à 2012 par région mondiale (d'après Maartens et col.).

Le VIH contribue grandement à la mortalité et morbidité mondiale. En 2010, le VIH était la cinquième cause principale de morbidité (Ortblad, Lozano, and Murray 2013). Les décès liés au SIDA dans le monde ont atteint un sommet de 2 à 3 millions en 2005 et ont diminué pour atteindre 1,6 million en 2012 (Maartens, Celum, and Lewin 2014). Dans les pays à revenu élevé, environ 50% des décès chez les personnes infectés sous traitement antirétroviral ne sont pas liés au SIDA (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 2010). Les causes majeures de décès non liés au SIDA sont les cancers (23,5%), les maladies cardiovasculaires (15,7%) et les maladies du foie

(14,1%) (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 2010). Ces complications ont en commun d'être liées à une inflammation chronique.

I. 1. 2. Cibles cellulaires du virus VIH

I. 1. 2. a. Les lymphocytes T CD4

La principale caractéristique immunologique de l'infection par le VIH est une diminution du nombre de lymphocytes T CD4+ circulants (LT CD4+) (Rowland-Jones 2003). Dans les phases précoces de l'infection, une réduction transitoire des LT CD4+ circulants est suivie d'un retour à des concentrations presque normales, qui diminuent alors progressivement (Figure 2). La déplétion des LT CD4+ est rapidement devenue le principal marqueur de la sévérité de l'infection et de l'immunodéficience liée au VIH. Lorsque le nombre absolu de LT CD4+ descend en dessous d'un seuil de 200 LT par mm3 dans le sang périphérique, un individu devient vulnérable aux infections opportunistes caractéristiques et à certaines tumeurs malignes (Rowland-Jones 2003).

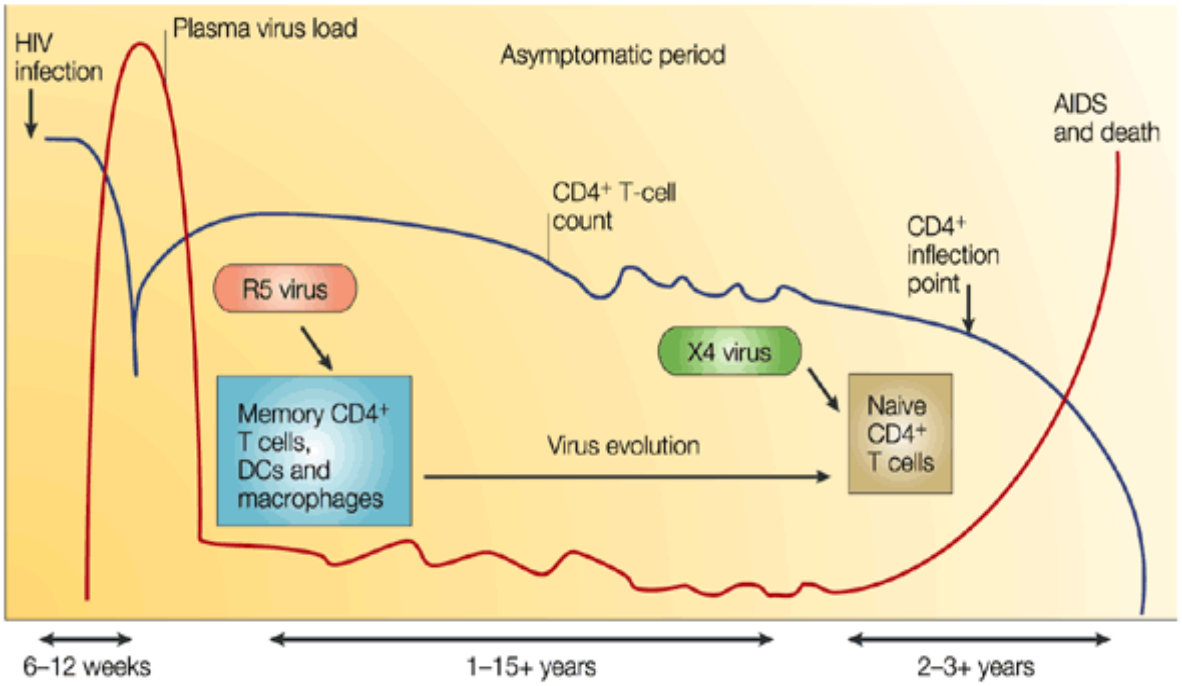


Figure 2. Evolution des taux de CD4 et charge virale au cours de l'infection (d'après Rowland-Jones et col.).

La capacité du virus à infecter particulièrement les LT CD4+ s'explique par l'expression à leur surface de la molécule CD4, récepteur à forte affinité pour le virus (Klatzmann et al. 1984; Dalgleish et al. 1984) et d'un co-récepteur indispensable (CXCR4 ou CCR5). D'autres cellules exprimant la molécule CD4, telles que les macrophages et les cellules dendritiques (DC), sont

d'ailleurs elles-aussi susceptibles d'être infectées (Coleman and Wu 2009; Popov et al. 2005; Klatzmann et al. 1984; Dalgleish et al. 1984).

La déplétion des LT CD4+ est en partie liée à l'élimination des cellules directement infectées, devenues cibles des réponses immunitaires effectrices de l'individu. Mais elle est aussi liée à des mécanismes indirects : mort cellulaire liée à l'activation immunitaire, la prolifération et la sénescence (Okoye and Picker 2013; Février, Dorgham, and Rebollo 2011). L'hétérogénéité fonctionnelle des populations de LT CD4+ sera abordée plus en détail dans le paragraphe I.2.4.a dédié aux réservoirs cellulaires du HIV. C'est un aspect important puisque cette hétérogénéité se traduit par des susceptibilités à l'infection et à la constitution de réservoirs différents en fonction des sous-populations considérés.

I. 1. 2. b. Les macrophages

Les macrophages jouent un rôle important dans l'élimination des agents pathogènes et des débris cellulaires par phagocytose (Kumar and Herbein 2014). Ils agissent également comme des cellules présentatrices d'antigène (Ackerman and Cresswell 2004; Koppensteiner, Brack-Werner, and Schindler 2012). Ces cellules expriment la molécule CD4 et les co-récepteurs de l'infection et constituent des cibles de l'infection. L'influence des macrophages infectés est décrite à différents stades de l'infection.

L'échange d'informations entre les macrophages et les LT CD4+ joue un rôle important dans la transmission et la dissémination du VIH des macrophages aux LT CD4+ par l'intermediaire de synapse virologique (Groot, Welsch, and Sattentau 2008; Crowe et al. 1990). D'autre part, les macrophages infectés par le VIH libèrent des facteurs cytotoxiques solubles comme le TNF-α et le Fas-L qui peuvent favoriser l'apoptose des cellules non directement infectées, qu'ils s'agissent par exemple des LT CD4+ ou CD8+ (Badley et al. 1997; Herbein et al. 1998)

Contrairement aux LT CD4+, les macrophages sont relativement moins sujets à l'effet cytopathique du virus (Gendelman et al. 1988; Carter and Ehrlich 2008). Puisque la durée de vie des macrophages infectés par le VIH-1 est longue, ils agissent ainsi comme source de production de virus pendant une longue durée chez les patients infectés (Kelly et al. 2008). De plus, les macrophages sont pratiquement présents dans tous les organes, ce qui permet une dissémination et une diffusion du VIH-1 dans tout le corps des personnes infectées, y compris le cerveau (Gavegnano and Schinazi 2009).

En résumé, le VIH cible principalement deux populations primordiales au bon fonctionnement du système immunitaire: les LT CD4+ et les macrophages. Chacune de ces deux sous-populations

présente des profils fonctionnels extrêmement hétérogènes non seulement en termes de différenciation mais aussi de localisation anatomique.

I. 1. 3. Physiopathologie de l'infection par le VIH

I. 1. 3. a. Etapes précoces de l'infection

En raison de la difficulté d'identifier les individus infectés rapidement après l'exposition, on sait peu de choses sur les premiers événements de transmission du VIH dans le tractus génital ou la muqueuse rectale. Cependant, les modèles d'infection par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) et les études ex vivo ont permis d'identifier les cellules et les facteurs affectant la transmission du VIH.

Le processus par lequel le virus pénètre les barrières muqueuses pour établir une infection productive a d'abord été évalué in vitro. Des expériences de co-cultures in vitro des LT CD4+ avec des cellules qui peuvent être présentes au point d'entrée du virus, comme par exemple les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques (DC) ou les macrophages (Figure 3), ont démontré qu'une infection productive survient après la formation de synapses immunologiques (Pope and Haase 2003).

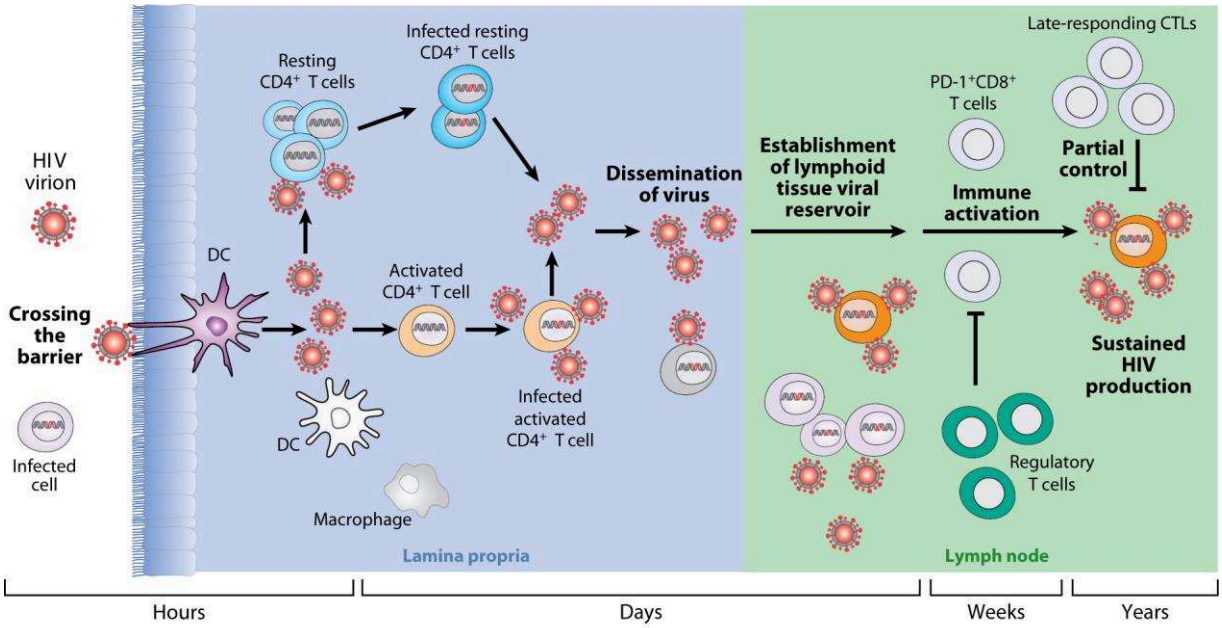


Figure 3. Différentes phases d'infection après exposition au VIH (d'après Moir et col.).

Plus récemment, les événements précoces de la transmission du VIH ont été étudiés ex vivo (culture de la membrane épitheliale basale de la muqueuse vaginale), ce modèle permet une observation directe de la façon dont le VIH-1 cible les cellules dans l'épithélium vaginal externe (Hladik et al. 2007). Dans ce modèle, le VIH se lie aux cellules de Langherhans et peut traverser

les couches épithéliales pour former des complexes avec les LT CD4+ mémoires environnantes, ces derniers assurant la replication virale productive (Arthos et al. 2008).

Les LT CD4+ partiellement activés de la muqueuse génitale sont donc les premières cibles de la réplication virale productive et cela dès la première semaine après exposition (Figure 4). Le modèle SIV a permis de montrer que quelques jours après l'entrée du SIV dans une muqueuse, une propagation locale du SIV dans les LT CD4+ activés a lieu (Figure 4). Chez le macaque infecté par le SIV (Mattapallil et al. 2005; Li et al. 2005), le virus migre alors rapidement, probablement via le drainage des ganglions lymphatiques, vers les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT), où il induit une déplétion massive des LT CD4+ mémoires de la lamina propria intestinale. Cette déplétion a aussi été observée chez les patients infectés par le VIH (Mehandru et al. 2004; Brenchley et al. 2004; Guadalupe et al. 2003). Cette réplication précoce est suivie de la propagation du virus vers les organes lymphoïdes proximaux puis d'une infection systémique (Lackner, Lederman, and Rodriguez 2012).

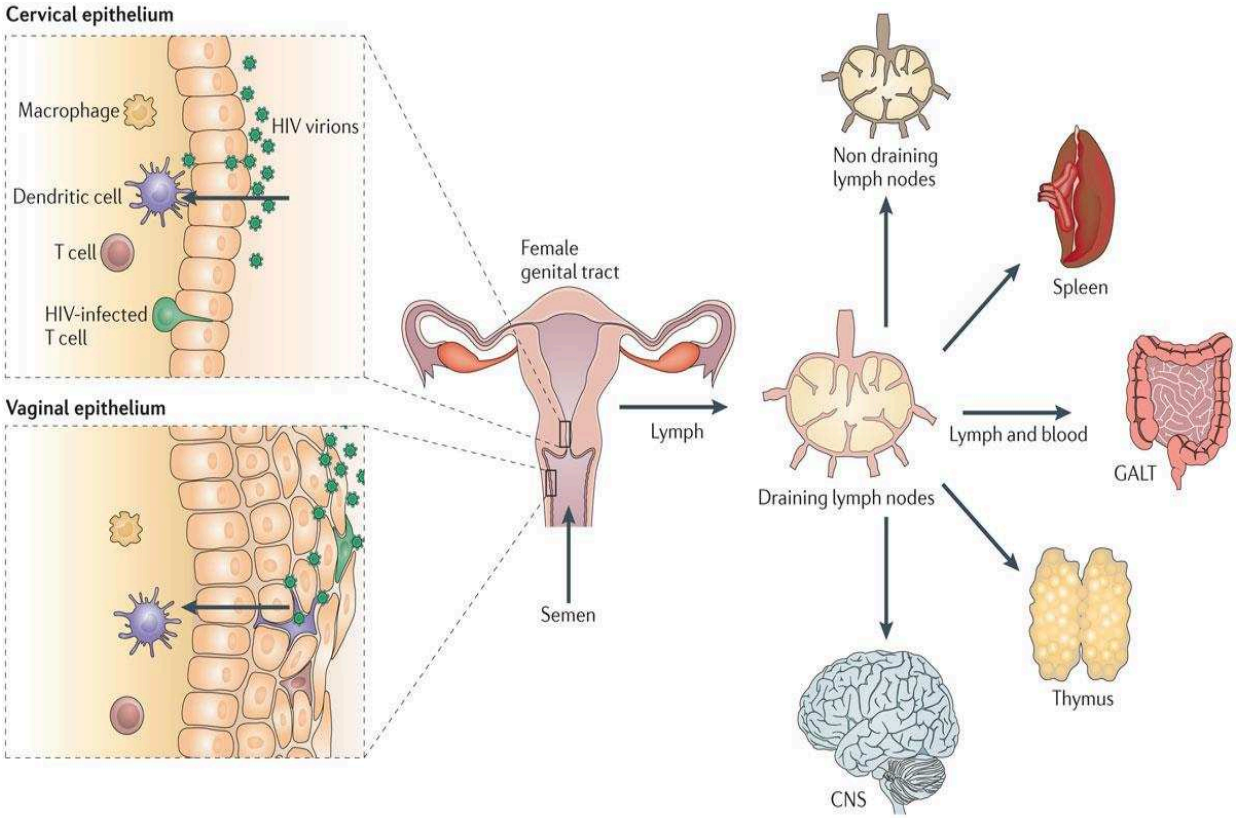


Figure 4. Dissemination et propagation du VIH-1 (d'après Fackler et col.)

I. 1. 3. b. Altérations immunologiques au cours de l'infection par le VIH

- Atteinte mucosale et translocation microbienne

Un effet précoce et important de l'infection par le VIH/SIV sur l'homéostasie des LT CD4+ se produit dans le tractus gastro-intestinal où a lieu une déplétion massive des LT CD4+ activés. Celle-ci n'est que partiellement corrigée après thérapie antirétrovirale (Kök et al. 2015). En plus de la perte quantitative des LT CD4+ totaux, une déplétion préferentielle de la fraction des LT CD4+ Th17 est observée.

Cette population de LT CD4+ Th17 est particulièrement cruciale pour l'immunité des muqueuses et notamment de la muqueuse intestinale (Aggarwal et al. 2003, Steinman 2007). Les LT CD4+ Th17 sont fonctionnellement distincts des LT CD4+ Th1 ou Th2 par leur profil de sécrétion de cytokines. Les LT CD4+ Th17 sont des inducteurs puissants de l'inflammation tissulaire, produisent l'interleukine 17 (IL-17), une cytokine importante dans l'immunité adaptative contre les bactéries extracellulaires et les champignons (Huang et al. 2004; Chung et al. 2003). Les LT CD4+ Th17 produisent non seulement de l'IL-17, mais peuvent également sécréter le TNFα, l'IL-1, l'IL-2, l'IL-21 et l'IL-22, reflétant leur potentiel pro-inflammatoire. Les LT CD4+ Th17 ont la capacité de recruter des neutrophiles et des cellules myéloïdes dans des sites effecteurs en sécretant le G-CSF (facteur de croissance de la lignée granulocytaire) (Ye et al. 2001). Les LT CD4+ Th17 sont aussi impliqués dans la régénération épithéliale des tissus muqueux (Brand et al. 2006) par différents mécanismes : l'induction de l'expression des claudines (composants des jonctions épithéliales étroites), la stimulation des défensines et la production de mucine. Tous ces facteurs sont vitaux et nécessaires pour assurer l'intégrité de la muqueuse intestinale (Sugimoto et al. 2008; Chen et al. 2003).

La déplétion massive et profonde des cellules lymphoïdes dans le tractus gastro-intestinal, associée à l'apoptose des entérocytes et l'augmentation de la perméabilité du tractus gastro intestinal, conduit à une augmentation de la concentration plasmatique de produits microbiens comme le lipopolysaccharide (LPS) (Nichole R. Klatt and Brenchley 2010; Brenchley et al. 2006) dans le plasma.

- Epuisement progressif des réponses immunitaires

L'infection par le VIH est aussi associée à un épuisement progressif des réponses immunitaires. Cet épuisement affecte les fractions LT CD4+, cible de l'infection mais aussi les fractions effectrices telles que les LT CD8+, les LB et les cellules NK. Ces deux dernières ne seront pas détaillées dans ce document et nous nous concentrerons principalement sur les LT. En effet, des

populations de cellules T épuisées avec des propriétés effectrices réduites peuvent émerger, en particulier lors d'infections chroniques (Klenerman and Hill 2005; Wherry 2011).

L'épuisement progressif quantitatif des LT CD4+ est lié à la réduction de la production de ces cellules et à leur destruction accrue (par infection directe, ou du fait de l'activation immunitaire accrue et l'induction de la sénescence (Cooper et al. 2013)). Fonctionnellement, la capacité proliférative des LT CD4+ en réponse au VIH (Krowka et al. 1989) est perdue dans la phase chronique de l'infection. Leur capacité de sécrétion est aussi diminuée, avec une "polyfonctionnalité" réduite, c'est-à-dire la capacité des cellules individuelles à produire des cytokines multiples, en particulier une capacité réduite à produire de l'IL-2 (Palmer, Boritz, and Wilson 2004; Iyasere et al. 2003, 2). L'expression de molécules inhibitrices comme PD-1 et CTLA-4 sur les LT CD4+ spécifiques du VIH contribue également à cet épuisement qualitatif (D'Souza et al. 2007; Kaufmann et al. 2007).
La population de LT CD8+ est aussi particulièrement perturbée pendant l'infection par le VIH (Cao et al. 2016). Un tel épuisement des LT commence peu après le pic de viremie et se développe tout au long de l'infection (Radebe et al. 2015).
Enfin la destruction du réseau cellulaire réticulaire fibroblastique, les dépôts de collagène et l'accès restreint à l'IL-7 (qui est un facteur de survie) dans les GL des LT contribuent davantage à l'appauvrissement quantitatif des LT naïfs CD4 et CD8 (Zeng et al. 2012).

La persistance du virus conduit à l'expansion et à l'activation continue des LT CD8+ mémoires, conduisant à une dysrégulation de leur renouvellement, leur épuisement et leur sénescence. Les caractéristiques de l'épuisement des LT CD8+ comprennent une réduction de leur potentiel prolifératif et de leur production de cytokines, la perte du phénotype mémoire centrale et la co-expression acquise de multiples récepteurs inhibiteurs tels que la protéine de mort cellulaire programmée-1 (PD-1), la protéine du gène-3 d'activation des lymphocytes (LAG-3), CD160 et l'immunoglobuline des cellules T mucine-3 (Tim-3) (Peretz et al. 2012; Desai and Landay 2010). L'exposition chronique et persistante à l'antigène viral, le manque d'aide par les LT CD4 et la co-expression soutenue de multiples récepteurs inhibiteurs caractérisent l'épuisement des cellules T CD8+ dans l'infection par le VIH. Bien que les LT CD4+ et CD8+ partagent de nombreuses caractéristiques d'épuisement, un ensemble distinct de récepteurs inhibiteurs est exprimé par chaque population avec une expression préférentielle de CD160 et 2B4 ainsi qu'une plus grande expression de PD-1 sur les LT CD8+ (Youngblood et al. 2013).

Ces altérations quantitatives et qualitatives qui touchent les cellules immunitaires au cours de l'infection par le VIH, sont liées principalement à la persistance virale, l'activation immunitaire et l'inflammation chronique, des phénomènes qui seront abordés plus spécifiquement en paragraphe I.2 et I.3.

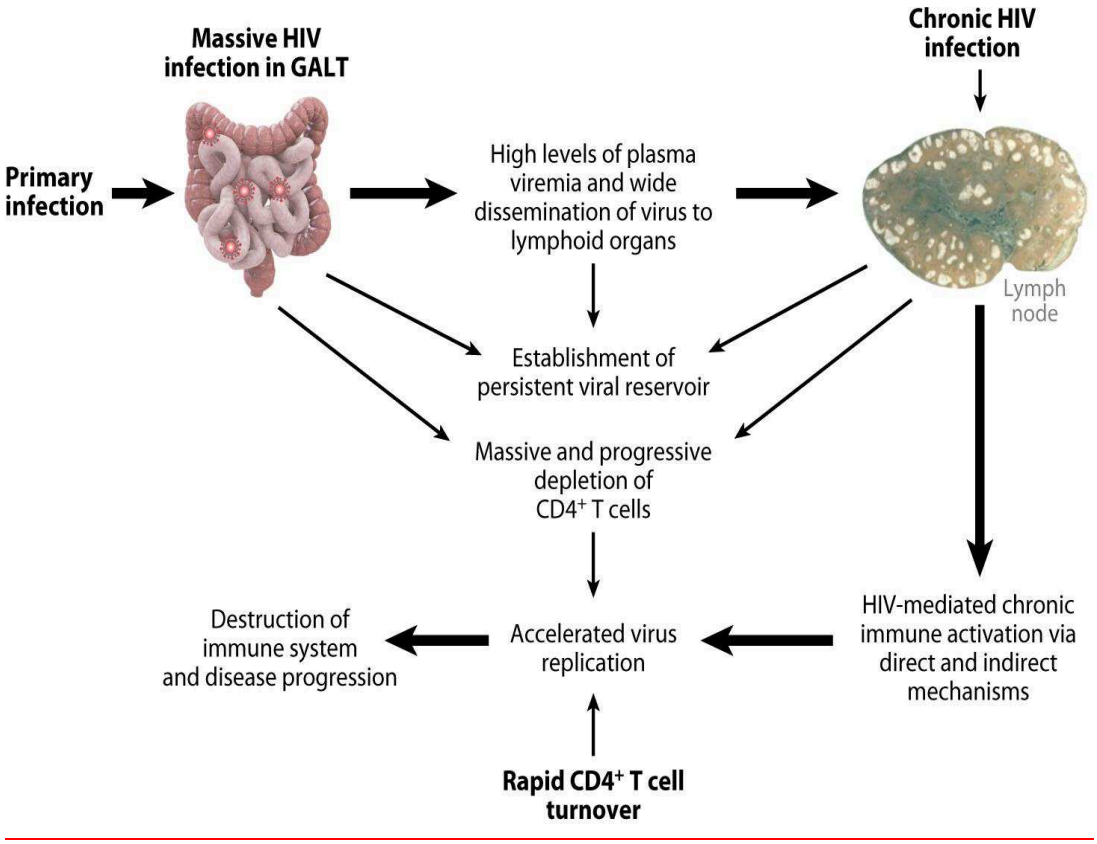


Figure 5. Schéma simplifié de la physiopathologie de l'infection par le VIH (d'après Moir et col.).

I. 1. 3. c. Altérations métaboliques au cours de l'infection par le VIH

Les patients infectés par le VIH présentent de multiples complications (apparaissant généralement plus tôt que dans la population générale): ostéoporose, troubles neuro cognitifs, pathologie cardiovasculaire, hypertension artérielle (HTA), diabète, dyslipidémie, cancers non classant SIDA. Une proportion non négligeable de ces complications est directement liée aux altérations métaboliques associées à l'infection. Différentes modifications du profil lipidique, telles que l'augmentation des triglycérides sériques (TG) et la diminution du taux du cholesterol total (CT) ont été décrites chez des patients infectés par le VIH et cela avant l'introduction des traitements antiretroviraux (TARV) (Grunfeld et al. 1991; Shor-Posner et al. 1993). Ces perturbations métaboliques étaient même exacerbées après mise sous TARV (et notamment sous antiprotéases).

Dyslipidimie au cours de l'infection par le VIH

La dyslipidimie est un trouble du métabolisme des lipoprotéines, avec une surproduction ou une carence en lipoprotéines. Les dyslipidémies peuvent se manifester par une élévation du CT, du «mauvais» cholestérol (LDL) et des triglycérides ainsi qu'une diminution des concentrations du «bon» cholestérol (HDL) dans le sang. Au début de l'infection non traitée du VIH, les taux du HDL et de LDL diminuent et les taux de TG augmentent. Après l'initiation du TARV, les taux de TG et de LDL augmentent (Friis-Møller et al. 2003) et les taux du HDL restent généralement faibles.

L'étiologie de ces anomalies semble en partie due à l'infection par le VIH elle-même, car les changements dans le profil lipidiques sont observés chez les individus naïfs aux TARV, potentiellement en relation avec des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires circulantes en particulièrement l'IFN-α (M. K. Hellerstein et al. 1993). En outre, les individus infectés par le VIH peuvent présenter une consommation augmentée de graisses saturées par rapport aux témoins, ce qui conduit à une exacerbation des anomalies lipidiques (Joy et al. 2007) .

Les antirétroviraux, en particulier les inhibiteurs de la protéase, contribuent également à une altération de l'homéostasie des lipides. De nombreux inhibiteurs de la protéase altèrent la différenciation adipocytaire et diminuent l'accumulation des triglycérides dans les adipocytes, entraînant une augmentation des taux de triglycérides circulants (Kim et al. 2006; S. P. Jones et al. 2008). Chez les sujets sous TARV, les élévations des taux de TG et de CT sont associées à l'utilisation des traitements à base d'inhibiteurs de la protéase /et des inhibiteurs non nucléosidique de la transcriptase (Friis-Møller et al. 2003).

Ces profils dyslipidémiques (avec diminution du HDL et augmentation des taux de triglycérides et de LDL-C) sont associés ou non à des anomalies de la distribution corporelle du tissu adipeux (Hadigan et al. 2001) et/ou à l'induction d'un diabète. Toutes ces altérations contribuent à l'augmentation du risque d'atteintes cardio-vasculaires. Janiszewski et col. (Janiszewski et al. 2011) ont reporté que, dans une cohorte de plus de 2000 hommes et femmes infectés par le VIH, l'hypertriglycéridémie, associée à une augmentation du tour de taille, sont des facteurs de prédiction du syndrome métabolique, de l'insulino-résistance et le risque cardiovasculaire. C'est aussi le cas pour des niveaux anormaux de HDL, de triglycérides et de LDL (Stanley and Grinspoon 2012).

Lipodystrophies

Après l'introduction des inhibiteurs de la protéase (IP) en 1996, les patients ont développé un syndrome de redistribution de la graisse avec perte périphérique et gain central, généralement

associé à des anomalies métaboliques et à l'insulinorésistance (A. Carr and Cooper 1998). La prévalence de la lipodystrophie associée au TARV varie de 2% (Reus et al. 2000) à 83% (A. Carr et al. 1999) chez les patients traités. Cette énorme variation s'explique par le manque de définition uniformément acceptée de la lipodystrophie et les différentes combinaisons d'ARV utilisées ainsi que la durée du traitement dans ces différentes études. Les estimations provenant de grandes études indiquent une prévalence de 50% après 12 à 18 mois de traitement (Andrew Carr and Cooper 2000; Schambelan et al. 2002). La plupart de ces données de prévalence proviennent de patients traités principalement par des anti protéases (Gallant et al. 2004; Podzamczer et al. 2007). Les données plus récentes suggèrent un effet toxique moins marqué des ARV de nouvelles générations, même si des atteintes métaboliques restent présentes (Leclercq et al. 2013).

Les effets secondaires marqués de certains TARV ont conduit à étudier l'impact de l'infection chronique (incluant le virus proprement dit et les TARV) sur les fonctions métaboliques du TA, sans considérer la composante immunologique de ce tissu.

Insulino résistance et diabète Mellitus

Bien que les individus naïfs aux TARV semblent avoir un risque de diabète similaire (Butt et al. 2009; Brar et al. 2007) ou légèrement supérieur à la population générale (T. T. Brown et al. 2005), les personnes sous TARV montrent une augmentation marquée de l'intolérance au glucose et de diabéte sucré (T. T. Brown et al. 2005; Hadigan et al. 2001) . Brown et al (T. T. Brown et al. 2005) ont démontré que les patients infectés et sous TARV avaient une prévalence de diabète de 14%, contre 5% pour les témoins et avaient un risque environ 4 fois supérieur de développer un diabète au cours de la période d'observation de 4 ans.

De nombreux facteurs semblent jouer un rôle important dans la prévalence élevée de l'insulino résistance et du diabète au sein des patients infectés par le VIH et sous TARV. Les forts taux de CRP, les TNF-Rs 1 et 2 (récepteurs 1 et 2 aux facteurs de nécrose tumorale) sont associés à un risque accru de développement de diabète au cours de l'infection par le VIH, suggérant un rôle de l'inflammation chronique dans l'altération du métabolisme du glucose. Les antirétroviraux semblent également contribuer à une augmentation du risque du diabète. Dans une étude prospective multi-cohorte qui met l'accent sur la reconnaissance précoce des événements indésirables (problèmes cardiovasculaires, maladies du foie et rénales) qui pourraient résulter des TARV, une augmentation de l'incidence du diabète avec l'exposition cumulative aux ARV a été mentionnée (De Wit et al. 2008). De plus, Capeau et al. ont démontré que l'incidence du diabète peut être liée plus spécifiquement à l'utilisation de l'indinavir, de la stavudine et de la didanosine, ainsi qu'à une lipoatrophie périphérique (Capeau et al. 2012).

Stéatose hépatique non alcoolique

Un autre aspect de ces altérations métaboliques est la stéatose hépatique non alcoolique. Sa prévalence est plus élevée chez les patients infectés par le VIH (30-40%) que dans la population générale (14-31%). Les TARV pourrait favoriser la stéatose hépatique non alcoolique du fait de ses effets négatifs sur le contrôle du glucose, le métabolisme lipidique, la redistribution des graisses corporelles, la résistance à l'insuline et la toxicité mitochondriale (Crum-Cianflone et al. 2009; Guaraldi et al. 2008).

I. 1. 4. Modèles animaux pour l'étude de l'infection par le VIH

Modèles de primates non humains

L'utilisation d'un modèle animal est une stratégie classique pour mieux comprendre les mécanismes mis en œuvre par le virus et l'organisme pour se défendre. C'est particulièrement vrai dans le contexte de l'infection par le VIH. La complexité du virus, l'évolution lente de l'infection, le nombre important de dysfonctionnements immunitaires engendrés directement ou indirectement par la réplication virale, la large distribution tissulaire et l'existence de réservoirs viraux tissulaires nécessitent l'utilisation de modèles animaux. Il n'existe pas de modèles murins fiables d'infection par le VIH. La souris n'est pas infectée par le VIH (ni aucun autre rétrovirus proche) à l'exception des modèles de souris humanisés disponibles tout récemment (Denton and García 2011). Le modèle de choix est le primate non humain (PNH) avec qui nous partageons près de 98% de notre génome. On distingue classiquement les singes d'Afrique et les singes d'Asie. Les premiers sont des hôtes naturels du SIV et ne développent pas de maladie après leur infection. En revanche, l'infection des macaques asiatiques (qui ne sont pas des hôtes naturels pour les lentivirus de primates) présente de nombreuses similarités avec l'infection chez l'homme : charge virale élevée, déplétion progressive des LT CD4+ et infections opportunistes.

I. 1. 4. a. Hôtes naturels du SIV / Singes africains

Plus de 40 différentes espèces de primates africains sont infectées et porteurs sains de la souche de SIV propre à leur espèce. En raison de milliers d'années de co-évolution virus-hôte, ces hôtes naturels du SIV ne développent généralement pas de maladie malgré l'infection et ne sont donc pas utiles comme modèles d'infection pathogène. A l'inverse, ils sont utiles pour comprendre les mécanismes les empêchant de progresser vers la maladie. Les deux modèles les mieux étudiés sont l'infection par la souche SIVsmm du sooty mangabey (Cercocebus atys) et l'infection par la souche SIVagm du singe vert africain (AGM) (Chlorocebus aethiops) (Hirsch et al. 1989). Comme pour les infections lentivirales pathogènes, les infections par SIVsmm et SIVagm de leurs hôtes naturels

entraînent des taux élevés de réplication virale, la déplétion sévère des LT CD4+ des muqueuses pendant l'infection aiguë et l'activation de l'immunité innée et adaptative. Cependant, ces virus ne donnent pas lieu à une activation immunitaire chronique, ni à un épuisement progressif des LT CD4+ des muqueuses intestinales ou de la périphérie, ou à la destruction de l'architecture des ganglions lymphatiques chez leurs hôtes respectifs. De plus, alors que les infections par VIH-1 et SIVmac sont associées à une déplétion massive des LT CD4+ mémoires « centrale », le virus du SIVsmm infecte préférentiellement les LT CD4+ mémoires effectrices tissulaires (Chahroudi et al. 2012).

Aucune augmentation dans la proportion des monocytes et des macrophages activés n'est observée chez l'hôte naturel du SIV et cela est dûe au fait que la translocation microbienne ne se produit pas chez l'hôte naturel et que les monocytes/macrophages ne sont pas exposés au LPS (I. Pandrea et al. 2008; D. Ma et al. 2013; Wijewardana et al. 2013). Conformément à cela, le marqueur d'activation de monocytes/macrophages sCD14 n'est pas augmenté dans les AGM sauvages infectés par SIV, contrairement aux macaques (D. Ma et al. 2013). Dans l'ensemble, cela suggère que les monocytes/macrophages sont moins activés chez les hôtes naturels que pendant les infections par le VIH / SIVmac chez les humains et les macaques.

I. 1. 4. b. Hôtes non naturels du SIV

Contrairement à l'infection des singes africains, les singes originaires d'Asie sont sensibles au SIVmac et développent un stade SIDA dont l'évolution dépend des espèces : en moins de six mois pour les macaques dits «à queue de cochon», entre six mois et un an pour les macaques rhésus et au-delà d'un an pour les macaques cynomolgus. De nombreux progrès dans notre compréhension de la transmission virale, de la pathogenèse et de la latence peuvent être attribués à l'utilisation de modèles de macaques. Les modèles d'infection pathogène sont aussi largement utilisés dans les études visant le développement de vaccins et de microbicides pour la prévention de l'infection par le VIH-1.

Bien que la plupart, sinon tous, des macaques puissent être infectés par le SIV, trois espèces sont systématiquement utilisées comme modèles animaux pour le SIDA: le macaque rhésus (Macaca mulatta), le macaque nain (Macaca nemestrina) et le macaque cynomolgus (Macaca fascicularis) (Figure 6).

Le modèle d'infection doit donc être défini par (a) l'espèce utilisée : chacune de ces espèces a une histoire évolutive et une structure de population qui peuvent affecter profondément la progression et la pathologie de l'infection par le SIV mais aussi (b) par la souche virale utilisée : les

caractéristiques de l'infection étant différentes selon que le virus soit entièrement adapté ou non à une espèce donnée.

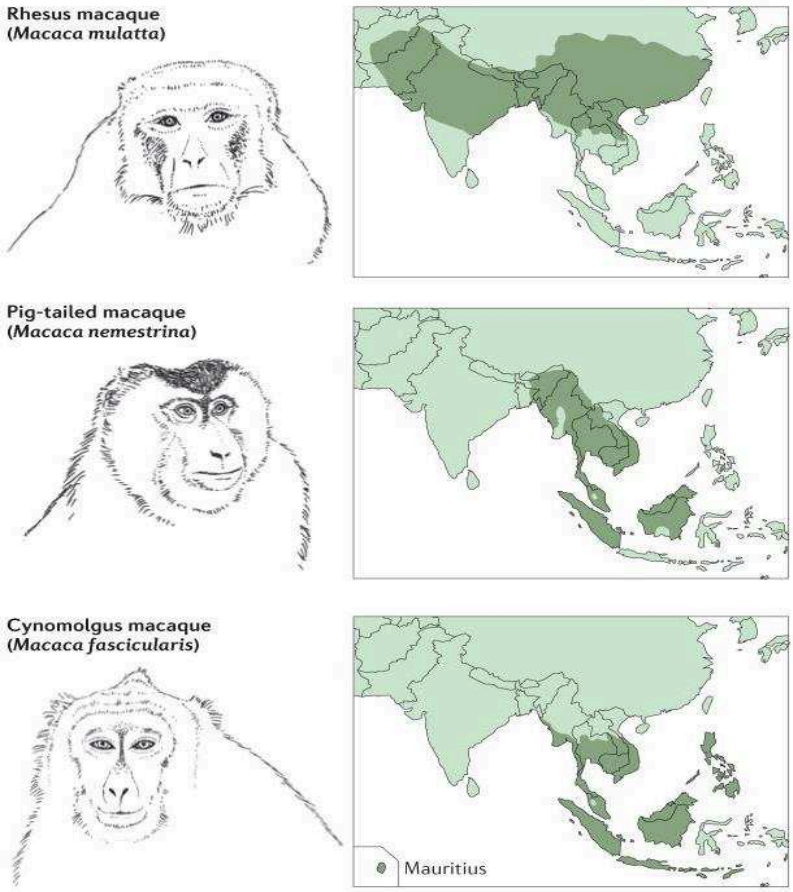


Figure 6. Les espèces de macaque couramment utilisées dans la recherche sur le SIDA et leurs zones géographiques (d'après Hatziioannou et Col.).

Macaque Rhésus

Les macaques rhésus d'origine indienne sont de loin le modèle PNH le plus caractérisé et le plus utilisé pour le SIDA. Les deux souches les plus courantes SIVmac251 et SIVmac239 ont été initialement isolées à partir de macaques rhesus d'origine indienne et sont donc particulièrement bien adaptées à ces animaux, avec des infections entraînant des charges virales élevées avec une variation minimale d'animal à animal. De façon analogue à la réplication du VIH-1, la réplication du SIV entraîne un renouvellement et une perte progressive des LT CD4+, en particulier dans le GALT (Veazey et al. 1998). Cependant, le taux de progression de la maladie chez les animaux infectés par le SIV est beaucoup plus rapide que chez les humains infectés par le VIH-1. Les macaques rhésus d'origine indienne progressent généralement vers le SIDA dans les 1 à 2 ans

suivant l'infection par le SIV, contre 8 à 10 ans chez les humains infectés par le VIH-1 ne recevant pas de traitement antirétroviral.

Macaques cynomolgus

L'infection par le SIV du macaque cynomolgus est un modèle supplémentaire d'infection qui présente quelques avantages : leur séquence génomique est disponible (Higashino et al. 2012), la possibilité de définir leur haplotype de CMH, une cinétique d'infection plus lente (constituant donc un bon modèle d'étude de l'infection chronique) et leur disponibilité par rapport à d'autres PNH. Les macaques cynomolgus infectés par le SIV présentent une diminution de la charge virale, une perte de LT CD4+ et une phase chronique plus lente par rapport aux macaques rhésus (Reimann et al. 2005). Une population de macaques cynomolgus trouvée sur l'île de Maurice est particulièrement utile. Cette population est issue d'une colonie souche constitué d'un petit groupe de singes et présente donc une faible diversité de MHC: plus de la moitié des animaux présentaient les allèles MHC 1 Mafa-B * 430101, Mafa-B * 440101 et Mafa-B * 460101 (Krebs et al. 2005). Cette homogénéité du CMH réduit la variabilité génétique entre les animaux. Etant donné que la variation est réduite dans le groupe, moins d'animaux sont nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Il faut cependant noter que les macaques cynomolgus d'origine chinoise ou vietnamienne, contrairement à ceux d'origine mauricienne, ont des allèles hétérogènes du CMH, de sorte que l'origine des macaques cynomolgus doit être déterminée lors de la planification des études sur les vaccins anti-VIH.

I. 2. Persistance du virus et réservoirs viraux

I. 2. 1. Persistance virale

A partir de 1997, les TARV ont permis de réduire la charge virale plasmatique du VIH-1 à des niveaux en-dessous de la limite de détection des dosages cliniques (400 puis 50 copies d'ARN du VIH/mL actuellement) (Perelson et al. 1997). Les thérapies antirétrovirales ont diminué de manière spectaculaire le taux de décès chez les patients infectés par le VIH-1 (Palella et al. 1998) et des millions de vies ont été sauvées (Walensky et al. 2006). Malgré ce succès incontestable à réduire la réplication du VIH et à améliorer la qualité de vie de nombreuses personnes vivant avec ce virus, les TARV ne parviennent pas à éradiquer complétement le virus du corps humain (Richman et al. 2009; International AIDS Society Scientific Working Group on HIV Cure et al. 2012). La meilleure preuve clinique de l'existence d'un réservoir pour le VIH est fournie par le rebond viral rapide observée dans la grande majorité des personnes qui interrompent le TARV (Kulpa and Chomont 2015; Davey et al. 1999) (Figure 7). Si le rebond était classiquement observé,

des travaux plus récents rapportent l'existence de contrôle « post-arrêt » : la prise d'un traitement lors de la phase précoce de l'infection par le VIH peut être associé à un contrôle du virus à long terme après l'interruption du traitement. Ceci suggère que la limitation de la réplication du virus dans les premiers moments de l'infection pourrait améliorer la capacité de l'hôte à contrôler l'infection (Saez-Cirion et al. 2014).

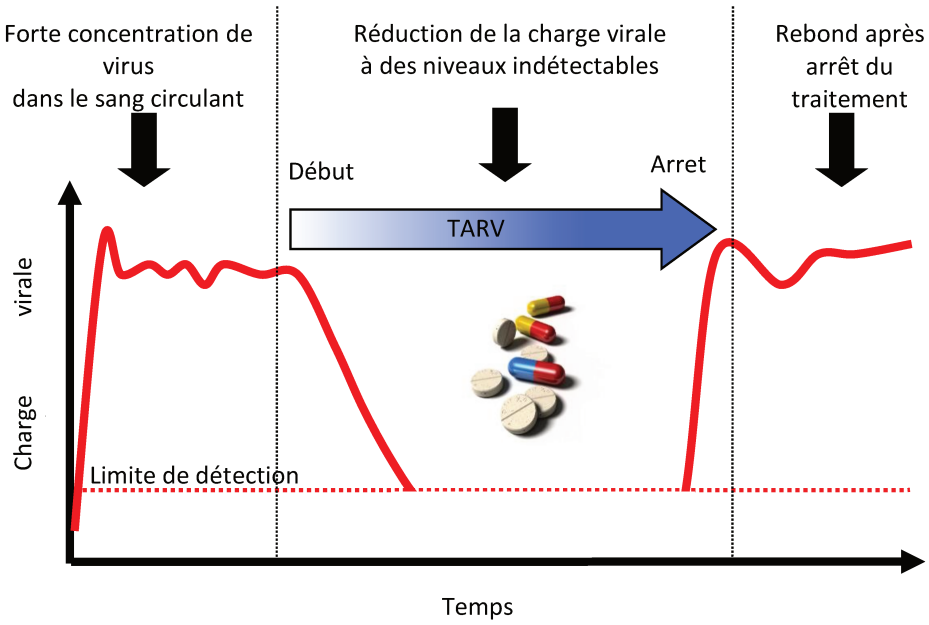


Figure 7. Définition clinique du réservoir du VIH (d'après Kulpa and Chomont 2015).

Trois principales raisons sous-tendent la persistance du VIH au cours des TARV :

- la persistance d'un petit nombre de cellules portant des génomes viraux intégrés mais silencieux qui peuvent être réactivés et relancer l'infection.
- une réplication virale résiduelle qui n'est pas entièrement supprimée dans les compartiments anatomiques inaccessibles aux molécules antirétrovirales ou dans lesquelles leur biodiffusion est insuffisante ;
- des dysfonctionnements immunitaires persistants qui ne parviennent pas à contrôler la réplication virale résiduelle ;

La persistance du VIH pendant le TARV est la raison pour laquelle les traitements actuels ne sont pas curatifs et a fait l'objet d'intenses recherches au cours de ces 15 dernières années. L'existence d'un réservoir latent est maintenant reconnu comme le principal obstacle à l'éradication du VIH-1 (Richman et al. 2009).

I. 2. 2. Réservoirs latents

Les réservoirs viraux peuvent être définis comme des types de cellules ou sites anatomiques dans lesquelles une forme virale compétente pour la réplication persiste avec une cinétique de renouvellement beaucoup plus lente que le pool principal du virus (Blankson, Persaud, and Siliciano 2002). Une forme latente du VIH-1 a été identifiée in vivo, dans une petite fraction de LT CD4+ quiescents. Ces cellules, au repos, ne sont pas capables de relarguer le virus infectieux mais peuvent le faire suite à l'activation cellulaire (Finzi et al. 1999). Ce réservoir latent dans les LT CD4+ quiescents persiste chez les patients sous TARV avec des charges virales indétectables (Kulpa and Chomont 2015; Finzi et al. 1999). L'analyse longitudinale a démontré que, le temps de l'éradication de la population de cellules infectées de façon latente serait de plus de 60 ans chez les patients sous TARV en raison de la longue demi-vie de ce réservoir (44 mois) (Finzi et al. 1999).

L'identification des mécanismes par lesquels le VIH persiste est une condition préalable à la conception de stratégies thérapeutiques visant à éradiquer le VIH. Deux questions principales sont posées : est-il possible d'empêcher la constitution du réservoir ? Est-il possible de mobiliser les réservoirs et éliminer le virus dans les phases chroniques de l'infection ? Deux modèles ont été proposés pour expliquer l'infection latente du VIH dans les LT CD4+ mémoires en repos. Le modèle de latence « avant activation » propose que les LT CD4+ au repos puissent être directement infectés par le VIH (Swiggard et al. 2005; Cameron et al. 2010). Le modèle de latence « post-activation » suggère que les LT CD4+ « mémoire » activés sont infectés lors de l'activation, échappent à la mort cellulaire et reviennent à l'état de repos (Bosque and Planelles 2009). Après l'infection, les mécanismes qui entraînent la latence du VIH comprennent l'hyperméthylation de l'ADN et la modification des histones et de l'ADN dans les séquences long terminal repeat du VIH qui arrêtent la transcription du VIH (Kauder et al. 2009). D'autres mécanismes comprennent la suppression des facteurs de transcription dans les LT CD4+ au repos et les faibles taux de transactivateur de la protéine d'expression génique du VIH dans ces cellules (Pan et al. 2013). Le rôle joué par le site de l'intégration du VIH dans l'ADN génomique de l'hôte en affectant les taux de transcription peut également être important (Brady et al. 2009).

L'identification des réservoirs reste une problématique centrale dans le domaine de l'infection par le VIH. Benkirane et ses collègues ont développé un système in vitro élégant pour étudier les LT CD4 + infectés de manière latente. Ils ont identifié un ensemble d'environ 100 gènes up-régulés dans les cellules infectées par du VIH-1 latent, dont 16 codant pour des protéines

transmembranaires (Descours et al. 2017). Parmi eux, le CD32a, un récepteur à faible affinité pour le fragment Fc des IgG (également appelé FcγRIIa), a montré une expression spécifique sur les LT CD4+ quiescents infectés in vitro. Chez les patients traités par ART, en moyenne, la moitié des LT CD4+ du réservoir expriment CD32a, ces cellules contiennent du provirus compétent pour la réplication (Descours et al. 2017).

I. 2. 2. a. Distinguer infection abortive et active

Différentes formes d'ADN du VIH ont été trouvées dans les sous populations des LT CD4+. Elles incluent des formes intégrées de l'ADN du VIH et non intégrées telles que le complexe de préintégration linéaire et les cycles de répétition terminale 1 (LTR) et 2-LTR. Le virus est intégré à différents sites et la plupart des cellules CD4 + infectées contiennent une molécule d'ADN-VIH (Josefsson et al. 2011). Mais tous les ADN-VIH intégrés ne constituent pas une source de virus capable de se répliquer après réactivation cellulaire (Rouzioux and Richman 2013). Une étude récente a suggéré que le nombre de cellules T CD4+ quiescentes, qui contiennent de l'ADN viral défectueux peut être, en moyenne, 300 fois plus élevé que le nombre de cellules infectées capables de produire un virus compétent pour la réplication après l'activation cellulaire (Eriksson et al. 2013).

L'expression de l'ARN intracellulaire du VIH est un marqueur qui a été utilisé pour démontrer que les médicaments, tels que les inhibiteurs des histones désacétylases, peuvent induire la production de transcrits d'ARN du VIH par des cellules infectées de manière latente chez des patients sous TARV efficace (N. M. Archin et al. 2012). La quantification des ARN du VIH épissés et non épissés est ainsi proposée comme marqueur des cellules productives (Schmid et al. 2010; Lewin et al. 2008). Cependant, il reste à déterminer si cette transcription se traduit par la production de virions. Pour démontrer formellement la capacité de cellules infectées à produire un virus actif, assurant la propagation de l'infection, les expériences de réactivation virale restent la technique de référence avec la détection de la production de p24 ou d'ARN viral dans les surnageants. L'utilisation de dilutions limites des cellules d'intérêt (LT CD4+ ou macrophage) permet d'avoir une approche quantitative.

I. 2. 2. b. Quand est-ce que le réservoir est établi ?

L'hypothèse que l'initiation rapide des TARV après l'infection pourrait empêcher la mise en place du réservoir du VIH et permettre l'éradication du virus a conduit à évaluer la cinétique d'établissement des réservoirs (Chun et al. 1998). En 1998, Chun et al. ont démontré que l'initiation du TARV seulement 10 jours après l'apparition des symptômes de la primo-infection

n'empêche pas la génération de LT CD4+ infectés de manière latente (Chun et al. 1998). Ceci est en lien avec les données récentes générées dans le modèle PNH d'infection par le SIV, dans lequel le TARV a été initié dès le troisième jour post-infection. Le traitement précoce ne pouvait pas empêcher la mise en place d'un réservoir viral, comme en témoigne le rebond viral après l'interruption du traitement (Whitney et al. 2014).

Même si l'établissement du réservoir ne peut être empêché, la capacité de réduire la taille du réservoir en initiant le TARV rapidement après l'infection a été démontrée dans plusieurs études indépendantes (Ananworanich et al. 2012; Ananworanich, Dubé, and Chomont 2015; Buzon, Martin-Gayo, et al. 2014; Nancie M. Archin et al. 2012; Strain et al. 2005). Le temps de déclenchement du rebond viral après l'interruption du traitement est en corrélation avec la virémie totale au cours de l'infection aiguë et avec l'ADN proviral au moment de l'arrêt du traitement (J. P. Williams et al. 2014). La mise sous TARV précoce semble donc une stratégie thérapeutique favorable, même si la nature des réservoirs préservés reste à mieux définir.

I. 2. 2. c. Les réservoirs cellulaires

I.2.4.a. Les lymphocytes T CD4+

Les LTCD4+ ont été décrits comme le principal réservoir cellulaire Il existe cependant des différences notables selon les sous-populations de LT CD4+ en termes de susceptibilité à l'infection et potentiel « réservoir ». Il existe différentes stratégies de caractérisation des LT CD4+.

- Différenciation naïve/effecteur/mémoire

Une stratégie d'analyse des LT CD4+ est basée sur la distinction de stades de différenciation liés au contact antigénique qui distingue les cellules naïves (n'ayant pas rencontré l'antigène spécifique) (Wightman et al. 2010), effectrices (induite suite au contact avec l'antigène spécifique et de courte durée de vie) et les cellules « mémoires » (une petite fraction de cellules effectrices se différencie en cellules T mémoire de longue durée de vie). Il existe un degré supplémentaire d'hétérogénéité au sein des cellules mémoires. On distingue les cellules mémoires qui peuvent être : souche (TSCM), centrale (TCM), transitionnelle (TTM), effectrice (TEM), résidente du tissu (TRM) et terminale différenciée (TTD) (Restifo and Gattinoni 2013) en fonction de leur propriétés fonctionnelles et de leur localisation.

La susceptibilité à l'infection et le potentiel de latence ont été étudiés pour chacune de ces sous-populations, avec un intérêt majeur pour les fractions mémoires que l'on croit être les principales cellules qui hébergent et contiennent la forme latente du VIH-1.

- Les LT CD4+ « naïfs » (LTN). Ces cellules sont permissives à l'infection par le VIH-1, mais à de très basse fréquence (Fabre-Mersseman et al. 2011; Baldanti et al. 2001). L'infection des LT naïfs in vitro avec des virus utilisant CXCR4 (X4) et CCR5 (R5) peut conduire à une intégration du virus, mais l'efficacité de l'infection des LT CD4+ naïfs était significativement plus faible que dans les LT CD4+ « mémoire » quiescents (Dai et al. 2009). Fait intéressant, très peu de séquences du VIH-1 ont été détectées lors de l'expansion clonale des cellules naïves, ce qui indique que la prolifération de ces cellules ne contribue que très peu à l'augmentation du pool de cellules infectées de manière latente par le VIH (Wightman et al. 2010; von Stockenstrom et al. 2015).
- Les LT CD4+ « mémoire souche » (TSCM). Les TSCM ont été récemment identifiés et sont considérés comme le stade le moins différencié d'un LT mémoire, préservant notamment une forte capacité d'auto-renouvellement (Gattinoni et al. 2011; Cieri et al. 2013). Cette sous-population représente 2 à 4% des LT circulants. Elles sont caractérisées par leur longue durée de vie et la capacité de se différencier en cellules TCM et TEM (Cieri et al. 2013): elles représentent donc la population progénitrice des deux populations mémoires classiquement décrites. Deux groupes ont montré que les TSCM sont permissives à l'infection par le VIH-1. La quantité d'ADN proviral du VIH contenue dans ces cellules est supérieure à celle mesurée dans les LTN, TCM, TEM et TTD (Buzon, Sun, et al. 2014). Les TSCM sont extrêmement stables dans le temps et sont maintenus par l'auto-renouvellement homéostatique, ce qui rend ces cellules un réservoir durable du VIH-1 malgré la taille relativement petite de cette population (Jaafoura et al. 2014).
- Les LT CD4+ « mémoire centrale » (TCM). Ces cellules ont une longue durée de survie et présentent une capacité de migration préférentielle dans les organes lymphoïdes (Chomont, El-Far, et al. 2009). Les TCM sont fortement représentés dans le sang circulant et sont considérés comme le principal réservoir du virus dans le sang en raison de leur capacité proliférative, de leur longue durée de vie et de leur capacité à produire du virus après réactivation.
- Les LT CD4+ « mémoire transitionnelle » (TTM). Les TTM sont un stade intermédiaire entre les TCM et TEM, caractérisés par l'expression de la molécule CCR5. Si la distinction entre TCM, TTM et TEM reste peu claire fonctionnellement, cette stratégie a permis d'identifier un important réservoir contenant l'ADN du VIH-1. Il a été récemment montré que l'ADN du VIH-1 dans la TTM est moins fréquemment capable de se répliquer que dans les TCM, ce qui suggère un excès de virus défectueux dans cette fraction (Soriano-Sarabia et al. 2014).
- Les LT CD4+ « effecteur mémoire » (TEM) sont caractérisés par leur capacité à migrer vers les tissus non lymphoïdes. Ils sont plus rapidement capables d'initier une réponse effectrice, avec un potentiel de prolifération plus marqué mais ont une durée de vie plus courte que les autres fractions mémoires.

Après avoir identifié les fractions de LT CD4+ infectés, la contribution relative de chaque sous population de LT CD4+ mémoire a fait l'objet de plusieurs études. Trois études ont mesuré le taux d'ADN VIH-1 dans les différentes sous populations de LT CD4+ triées à partir du sang périphérique. Parmi elles, deux études ont montré que les plus hauts niveaux d'ADN VIH-1 étaitent retrouvé au sein des LT TEM et TTM, à des niveaux similaires (von Stockenstrom et al. 2015; Yukl et al. 2013). La troisième étude a révélé que le plus haut niveau d'ADN VIH-1 était retrouvé dans les LT TCM, puis à plus faible niveau dans les TTM et TEM (Chomont, El-Far, et al. 2009). Ces différences entre ces études peuvent être expliquées par les niveaux de variabilités élevés entre les patients dans chaque étude. Dans l'ensemble, les LT TEM, TCM et TTM contiennent toujours des niveaux plus élevés de VIH-1 que les TN. La contribution relative de chaque sous populations mémoire semble varier également selon le moment où les participants ont commencé le TARV et la localisation lorsque les sous-populations sont triées de tissus (von Stockenstrom et al. 2015; Yukl et al. 2013). Lorsque l'ADN proviral du VIH-1 est séquencé à partir de ces différentes sous-populations, l'expansion de séquences provirales identiques à celles retrouvées dans les LT CD4+ TEM est montré, ce qui indique que la prolifération cellulaire des cellules infectées est un mécanisme par lequel le réservoir est maintenu dans les LT CD4+ TEM (Chomont, El-Far, et al. 2009).

Détecter l'ADN VIH-1 dans ces fractions indique que ces cellules sont infectées mais le potentiel réplicatif de ces formes virales reste à définir pour caractériser le potentiel réservoir. Une étude plus récente a révélé que les LT CD4+ TCM contenait le plus haut niveau de virus inductible capable de se répliquer, suivis par les LT CD4+ TTM et TN (Soriano-Sarabia et al. 2014).

- Différenciation fonctionnelle des LT CD4+

Comme alternative à la classification en fractions naïve/effecteur/mémoire, le compartiment LT CD4+ peut être divisé en différentes sous populations selon leurs caractéristiques fonctionnelles : capacité de sécrétion de cytokines et/ou capacités de migration. On distingue les LT CD4+ Th1, Th2, Th17, T régulatrices (Treg) et les T auxiliaires folliculaires (Tfh). Ces sous populations peuvent être identifiées par l'expression de leurs facteurs de transcription respectifs (T-bet, GATA-3, ROR-γ, Foxp3, Bcl-6), de récepteurs de chimiokines (CXCR3 et CXCR6 pour les Th1, CCR4 et CCR8 pour les Th2, CCR6, CCR4-5-7 pour les Th17) ou par la sécrétion de leurs cytokines spécifiques lors d'une stimulation. Les LT CD4+ Tregs et les cellules Tfh ont été identifiés comme des réservoirs cellulaires préférentiels pour le VIH chez les individus avec une charge virale indétectable (Lindqvist et al. 2012; Perreau et al. 2013; T.-A. Tran et al. 2008).

- Les LT CD4 « régulateurs »

Les LT CD4 Treg sont impliqués dans la suppression de l'activation cellulaire, de la prolifération et de la production de cytokines des LT effecteurs. Ils sont importants dans le maintien de la tolérance immunitaire et le contrôle de l'activation immunitaire. Leur différenciation est régulée par le facteur de transcription Foxp3. Les LT CD4+ Treg se caractérisent par l'expression du facteur de transcription Foxp3 et par l'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25). Les Tregs sont sensibles à l'infection par le VIH in vitro et sont déplétés dans l'intestin lors de la phase d'infection aiguë entraînant une réduction de l'activité suppressive des Treg (Chase et al. 2007). Dans l'infection chronique par le SIV, il y a un déclin progressif du nombre absolu des Treg dans le sang. Les animaux à forte charge virale plasmatique présentent un faible nombre de Tregs circulant. Cette diminution n'est pas spécifique mais reflète la perte générale de LT CD4+ mémoires (Pereira et al. 2007). Enfin il a été aussi montré que les Treg sont infectés par le VIH et contribuent au reservoir viral chez des patients infectés par le VIH et sous TARV efficace (T.-A. Tran et al. 2008).

- les LT CD4 « folliculaires helper »

Les LTfh interagissent avec des cellules B spécifiques de l'antigène dans des structures spécialisées connues sous le nom de centres germinatifs (CG) de tissus lymphoïdes secondaires. Cette interaction est cruciale à la maturation d'affinité des anticorps et à la différenciation des cellules B folliculaires en cellules B mémoires à longue durée de vie et/ou cellules plasmatiques. Un élément crucial dans le développement des LT CD4+ Tfh est l'expression du facteur de transcription Bcl-6. Ils sont en outre caractérisés par l'expression du récepteur de chimiokine CXCR5, PD-1, ICOS et la sécrétion d'IL-21. Les cellules Tfh sont principalement situées dans les tissus lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, amygdales, plaques de Peyer) (C. S. Ma et al. 2012; Nutt and Tarlinton 2011). Un certain nombre de groupes ont montré des altérations importantes de la dynamique des LT CD4+ Tfh dans l'infection à VIH et SIV. Comme les LT CD4+ Th17, les LT CD4+ Tfh sont sensibles à l'infection in vivo et peuvent soutenir la réplication et la production virale in vitro (Lindqvist et al. 2012; Perreau et al. 2013). Leur localisation dans les tissus lymphoïdes secondaires les expose à des concentrations élevées de particules de VIH qui sont piégées sur les cellules dendritiques folliculaires résidentes (FDC) sous forme de complexes immuns (avec anticorps et/ou complément) (Smith-Franklin et al. 2002). Les FDC jouent également un rôle dans le recrutement et le maintien de cellules Tfh spécifiques de l'antigène dans le GC (Estes et al. 2004). À l'autopsie, les tissus lymphoïdes secondaires contiennent des niveaux significativement plus élevés d'ARN et d'ADN viral associés aux cellules que la moelle osseuse ou les tissus provenant de sites effecteurs extra-lymphoïdes (jéjunum, foie et poumons), ce qui

suggère que les LT Tfh résidants dans les ganglions lymphatiques servent de sanctuaire pour la persistance du SIV (Fukazawa et al. 2012).

De multiples facteurs contribuent probablement à la concentration de la réplication du virus dans les LT CD4+ Tfh, y compris la permissivité accrue de ces cellules, la présence de virions hautement infectieux sur les cellules dendritiques folliculaire (FDCs), les fréquences très basses de LT cytotoxiques spécifiques du virus dans les follicules de cellules B, et la prolifération. Récemment, une proportion substantielle des cellules TCM fonctionnellement similaire aux LTfh a été identifiée dans le sang circulant. Cette sous population, appelée T helper folliculaire périphérique (pTfh) exprime le récepteur aux chimiokines CXCR5 comme les LT Tfh, et sont permissive à l'infection par le VIH. Chez les patients infectés par le VIH-1 et sous TARV efficace, on a pu démontrer que ces cellules peuvent produire du virus après réactivation (Pallikkuth et al. 2015).

I. 2. 4. b. Les macrophages

Les monocytes circulent dans le sang puis migrent vers divers tissus où ils se différencient en macrophages. En fonction du tissu, la durée de vie de ces cellules peut aller de quelques jours à plusieurs mois. Contrairement à ce qui se passe dans les LT CD4+ activés, l'infection par le VIH-1 n'a qu'un effet limité sur la viabilité des monocytes et macrophages (Ho, Rota, and Hirsch 1986; Nicholson et al. 1986; Swingler et al. 2007). Ces cellules peuvent transférer efficacement le virus aux LT CD4+, ce qui contribue à leur déplétion à travers les différents sites anatomiques (Duncan, Russell, and Sattentau 2013). Le rôle « réservoir » des macrophages a été mis en évidence par plusieurs études. Chun et col. ont montré que l'ADN proviral latent du VIH-1 dans le compartiment des LT CD4+ quiescents n'est pas le seul et potentiellement pas la principale source de rebond du virus après l'arrêt du traitement ART. Cela a été révélé en comparant la séquence du virus VIH-1 issue des LT CD4+ réservoirs pré-existants et celle du virus qui émergeait immédiatement après l'arrêt du traitement. La différence de séquences indiquait la présence de réservoirs viraux dans d'autres cellules que les LT CD4+ quiescents (Chun et al. 2000). L'initiation du TARV chez les patients infectés est accompagnée d'une diminution de 99% de la charge virale plasmatique dans les deux semaines, attribuée à l'élimination rapide des LT CD4+ infectées de façon productive. Une deuxième phase de décroissance suit et a été attribuée à des cellules de plus longue durée, probablement des cellules de la lignée mono-macrophagique, avec une demi-vie de 1 à 4 semaines (Perelson et al. 1997). La taille du pool mono-macrophagique infecté est estimée plus petite que celle des LT CD4+ infectés. On estime que l'ADN proviral du VIH-1 est présent

dans moins de 1% des monocytes (McElrath, Steinman, and Cohn 1991), tandis que dans une étude ultérieure, on a montré que seulement ~50 cellules par million de macrophages de ganglions lymphatiques sont infectés (Chun et al. 1997). Ce faible taux d'infectiosité est attribué à l'expression faible du CD4 à la surface des macrophages (ce qui conduit à une réduction de la liaison virale (Nicholson et al. 1986)) mais aussi à des obstacles lors de la rétro-transcription (O'Brien 1994) et l'importation nucléaire, conduisant à une infection abortive des macrophages (Diamond et al. 2004).

Les cellules de la lignée mono-macrophagique peuvent héberger un grand nombre de souches du VIH-1 (Xu et al. 2008), constituent jusqu'à 10% de toutes les cellules productivement infectées dans les premiers stades de la maladie et peuvent augmenter de manière significative lorsque les LT CD4 + sont déplétés (Smith et al. 2003).

I. 2. 4. c. Conclusion de la partie des réservoirs cellulaires

Un point critique majeur qui n'est pas pris en considération dans ces différentes études est le fait que les lymphocytes du sang périphérique représentent moins de 2% du nombre total de lymphocytes du corps. La même observation peut être faite pour la lignée mono-macrophagique bien que plus difficilement quantifiable. Le poids relatifs des réservoirs cellulaires dans le sang circulant ou les tissus restent à mieux définir.

I. 2. 2. d. Les réservoirs tissulaires

Dans les tissus, les mécanismes d'infection et d'établissement des réservoirs pourraient être différents. La réplication du VIH-1 peut être favorisée par des mécanismes tels que la transmission de cellule à cellule (Duncan, Russell, and Sattentau 2013; Zhong et al. 2013; Sigal et al. 2011). Une étude récente montre que la transmission du VIH-1 du macrophage au LT CD4+ n'est pas affectée par les TARV contrairement à l'infection directe des LT CD4+ par le VIH (Duncan, Russell, and Sattentau 2013). Ceci peut être expliqué par la forte charge virale présente au niveau des synapses virologiques, mettant ainsi en évidence la nécessité d'atteindre les concentrations optimales des médicaments à tous les sites de réplication (Cohen 2011). Dans les tissus, les LT CD4+ sont principalement des LT CD4+ mémoires résidents (TRM) qui restent séquestrés dans une région tissulaire locale limitée (Carbone 2015). Ces cellules participent à la surveillance périphérique et à la protection des tissus contre l'infection locale (Carbone 2015). Cependant, la fonction de ces cellules résidentes des tissus, leur prolifération et leur contribution à la persistance

du VIH-1 réservoir restent à élucider. Indépendamment de cette approche cellulaire, différents tissus constituent des réservoirs majeurs de l'infection.

Le Tractus gastro-intestinal (le Gut)

Du fait de l'accumulation physiologique de LT CD4+ dans l'intestin, celui-ci est une cible évidente de l'infection. L'infection de la muqueuse intestinale est une étape précoce et cruciale dans la pathogenèse de l'infection à VIH (Mehandru et al. 2004; Veazey et al. 1998). Les LT CD4+ CCR5+ du tractus gastro-intestinal sont infectés de manière sélective et subissent une forte déplétion (jusqu'à 60%) dès les premières semaines de l'infection (Brenchley et al. 2004; Mehandru et al. 2004). Les LT CD4+ infectés qui échappent à cette déplétion persistent sous forme quiescente et intègrent une forme latente du VIH-1 malgré le TARV (Finzi et al. 1999; Chun et al. 1998; Joos et al. 2008; Swanstrom and Coffin 2012). En outre, les souches du VIH-1 résidant dans les cellules infectées de l'intestin peuvent être différentes de celles des cellules qui circulent dans le sang périphérique. Récemment, Yukl et ses collègues ont montré que l'ADN et l'ARN du VIH sont retrouvés principalement dans les LT CD4+ TCM et TN dans le sang et principalement dans les TEM dans l'intestin (en particulier dans l'iléon et le rectum) (Yukl et al. 2013). Ces résultats confirment l'existence de réservoirs viraux de nature différente selon les tissus considérés. Ils suggèrent aussi que les connaissances fournies par les études du sang périphérique peuvent ne pas être représentatives de ce qui se passe dans les tissus (Yukl et al. 2013). Un autre résultat intéressant de cette étude est la détection dans l'intestin de l'ADN et de l'ARN du VIH dans les cellules non-CD4+ (Yukl et al. 2013).

Les macrophages sont des cellules qui permettent aussi la persistante du réservoir du VIH-1 dans l'intestin. En particulier, McElrath et ses collaborateurs ont montré qu'il existe trois fois plus de macrophages qui expriment CCR5 dans le rectum que dans le colon. Cette plus grande expression de CCR5 sur les macrophages rectaux suggère que les sections les plus distales de l'intestin peuvent être particulièrement vulnérables à l'infection par le VIH (McElrath et al. 2013) et que le côlon et le rectum peuvent être des compartiments anatomiques immunologiquement distincts.

Les ganglions lymphatiques

Dans les ganglions lymphatiques, la réplication du VIH-1 a lieu dans de nombreux foyers indépendants, chacun conduisant à la propagation locale de séquences génétiques quasi-espèce virale. Dans cette optique, l'hypothèse qui a été émise est que les souches virales circulant dans le sang périphérique sont la somme de toutes les souches virales qui se répliquent dans les ganglions lymphoïdes (Spiegel et al. 1992; Horiike et al. 2012; Burton et al. 2002). Dans les ganglions

lymphatiques, les cellules dendritiques peuvent agir en tant que réservoir cellulaire pour le VIH-1 par leur capacité à retenir les particules infectieuses à leur surface et à les transférer vers les LT CD4+ (Burton et al. 2002; Spiegel et al. 1992). L'étude du réservoir ganglionnaire a conduit à se focaliser sur les LT CD4+ folliculaires helper (Tfh) des centres germinatifs dans les ganglions lymphatiques. Les LT CD4+ Tfh se multiplient dans le GL pendant la phase chronique de l'infection par le VIH et le SIV (Perreau et al. 2013; Lindqvist et al. 2012) et sont hautement permissifs à l'infection (Petrovas et al. 2012; Fukazawa et al. 2015). Une étude récente a montré dans un modèle macaques rhésus (élites controleurs) infectés par le SIV que les LT CD4+ Tfh dans les zones B folliculaires sont infectés par le SIV et peuvent produire le virus (Fukazawa et al. 2015). Cette persistante virale dans cette population Tfh a été expliquée par le fait que cette dernière est éloignée et protégée des LT CD8+ cytotoxiques.

De même dans les ganglions lymphatiques, les concentrations des médicaments couramment utilisés (tels que le ténofovir, l'emtricitabine et l'atazanavir) peuvent être suboptimales conduisant ainsi à une réplication continue du virus dans les ganglions lymphatiques, malgré la charge virale indétectable dans le sang de ses patients. Les résultats de Fletcher et col. chez les patients infectés traités (Fletcher et al. 2014) sont en accord avec une étude réalisée chez les animaux infectés par le SIV, montrant que les ganglions lymphatiques et les autres tissus lymphatiques contiennent les principaux réservoirs cellulaire du VIH-1 et sont principalement responsables du rebond virologique après interruption du traitement (Horiike et al. 2012).

Autres sites réservoirs

- Le tractus génital

Les souches virales retrouvées au niveau du tractus génital masculin et féminin démontrent qu'il existe une compartimentalisation du virus au niveau des tractus génitaux (Pillai et al. 2005; Bull et al. 2009). Chez la majorité des hommes infectés, les TARV actuels réduisent les quantités d'ARN VIH-1 dans le sang et le sperme au-dessous de la limite de détection (ce qui diminue considérablement le risque de transmission sexuelle du VIH) (Shehu-Xhilaga et al. 2009; Politch et al. 2012). L'effet préventif sur la transmission apportée par le TARV est maintenant solidement établi, néanmoins, une excrétion virale intermittente du VIH à partir de sécrétion peut se produire malgré le traitement. Cela peut être dû à la présence du virus et des LT CD4+ infectés dans le sperme (R. Kaul et al. 2008) combinée à la mauvaise pénétration du médicament dans le tractus génital (Else et al. 2011).

Chez les femmes, le VIH est également présent dans l'appareil génital au début de l'infection et a été détecté chez certaines femmes qui avaient des charge virale indétectable dans le sang (Chomont

et al. 2007, 1; A. Kovacs et al. 2001). Les mutations retrouvées dans les spécimens d'organes génitaux étaient différentes de celles du sang circulant (De Pasquale et al. 2003). Même dans le tractus génital, les séquences virales du lavage cervicovaginal présentaient des caractéristiques génétiquement distinctes par rapport aux virus présent dans les sécrétions endocervicales (De Pasquale et al. 2003). La réplication du VIH à bas bruit dans les voies génitales masculines et féminines reste une explication possible de la viremie persistante pendant le traitement antirétroviral éventuellement en raison de la mauvaise pénétration du médicament et de la présence de cellules infectées à longue durée de vie dans ces compartiments.

- Le système nerveux central

L'invasion du VIH dans le système nerveux central (SNC) est un événement précoce après l'infection périphérique pouvant entraîner un dysfonctionnement neurologique. Les lésions neuronales sont liées à une interaction complexe entre le virus et différents types de cellules, principalement les macrophages (M. Kaul, Garden, and Lipton 2001). Dans le SNC, quatre grands types de macrophages ont été identifiés: les macrophages méningés, les macrophages du plexus choroïde, les macrophages périvasculaires et les macrophages de la microglie (K. C. Williams and Hickey 2002; Le Douce et al. 2010). Parmi ceux-ci, les macrophages périvasculaires et les macrophages de la microglie semblent principalement contribuer aux lésions neurologiques (Le Douce et al. 2010). Au-delà des macrophages, une autre cible du VIH-1 dans le SNC est représentée par les astrocytes, cellules importantes au niveau de la barrière hémato-encéphalique, qui soutiennent la fonction et le métabolisme des neurones. Les astrocytes contrôlent l'état des synapses neuronales par l'up-take des neurotransmetteurs, l'homéostasie ionique dans le système nerveux central, la réparation des tissus et sont aussi des régulateurs importants de la réponse immunitaire dans le cerveau. Malgré l'absence d'expression détectable du récepteur CD4 sur leur membrane, les astrocytes peuvent soutenir la réplication du VIH à faible niveau, devenant ainsi un acteur principal de la virémie résiduelle dans le SNC (Narasipura et al. 2012). Eugenin et col. ont montré que l'infection par le VIH dans les astrocytes peut conduire à la génération d'un réservoir et à l'apoptose des astrocytes non infectés environnants par la transmission de signaux intracellulaires toxiques à travers les jonctions gap (Eugenin and Berman 2013).

- La muqueuse gastrique

Une étude récente démontre la capacité du virus à infecter des cellules épithéliales gastriques par l'intermédiaire d'un mécanisme dépendant des LT CD4+ et à induire une inflammation sévère dans le tissu gastrique (R. Liu et al. 2013). En particulier, Liu et col. ont détecté des protéines du VIH et des acides nucléiques dans les cellules épithéliales gastriques dans des biopsies et autopsies de

patients infectés par le VIH. Ils ont mis en évidence par microscopie électronique à transmission la présence de particules virales du VIH dans le cytoplasme des cellules épithéliales gastriques, proposant ainsi ces cellules comme des cibles naturelles de l'infection par le VIH.

- Le foie

Des résultats récents ont mis en évidence un potentiel rôle réservoir du foie au cours de l'infection par le VIH (Blackard et al. 2011; Penton and Blackard 2014). Dans cette étude, les auteurs ont identifié plusieurs mutations d'acides aminés qui peuvent distinguer les variants du VIH retrouvés dans le foie, suggérant ainsi la réplication autonome du VIH dans cet organe (Blackard et al. 2011). Ceci est particulièrement pertinent à la lumière des études récentes soutenant une contribution directe du VIH aux altérations qui touchent le foie. En particulier, Bruno et col ont démontré l'effet de la protéine gp120 du VIH-1 sur les cellules stellaires hépatiques modulant leur profil profibrogénique et accélérant ainsi le début du processus fibrotique. Cela pourrait favoriser la progression vers la cirrhose dans le contexte des co-infection du VIH-1 avec les virus de l'hépatite (Bruno et al. 2010).

I. 3. Activation immunitaire chronique au cours de l'infection par le VIH

I. 3. 1. Activation immunitaire et inflammation

L'activation immunitaire au cours de l'infection par le VIH est une notion qui couvre un large éventail d'événements moléculaires et cellulaires actifs (liés à l'activation, la prolifération, la mort

cellulaire et la sécrétion de molécules solubles) et leurs conséquences (Appay and Sauce 2008). On distingue schématiquement l'activation immunitaire et l'inflammation.

I. 3. 1. a. Activation immunitaire

Au cours d'une réponse immunitaire adaptative, les cellules T naïves humaines sont activées par des cellules présentatrices d'antigène, telles que des cellules dendritiques, à travers les interactions MHC-peptide et des molécules costimulatrices. Cette activation entraîne une prolifération et une acquisition des fonctions effectrices, accompagnées de changements de phénotype qui reflètent à la fois l'activation et l'état de différenciation des cellules T. A plus long terme, un phénomène d'«épuisement immunitaire» défini par la perte de fonctions effectrices et proliférative des les LT mémoires peut se développer.

- Activation immunitaire

Les patients infectés par le VIH présentent une augmentation des marqueurs d'activation et/ou d'apoptose notamment sur les LT CD4+ et les LT CD8+ (Finkel et al. 1995; Groux et al. 1992), ainsi que sur les LB, les cellules NK et les monocytes (Hasegawa et al. 2009; Burdo et al. 2011; K. N. Brown, Trichel, and Barratt-Boyes 2007).

Les premières descriptions de l'activation immunitaire associée au VIH étaient basées sur des observations cliniques (lymphadénopathie) et des analyses d'échantillons de sang recueillis auprès d'individus chroniquement infectés par le VIH. Ces analyses ont révélé l'expression accrue des marqueurs d'activation (HLA-DR, CD38) et de prolifération (Ki-67) sur les LT CD4+ et CD8+. La proportion augmentée de LT CD8+ activés HLA-DR+, CD38+ a été associée à une baisse du nombre de LT CD4+ et au développement du SIDA (J. V. Giorgi and Detels 1989). Chez les HIV « contrôleurs », une plus forte activation des LT CD4+ et CD8+ était associée à des taux de LT CD4+ plus bas (Hunt et al. 2008). Fait intéressant, le niveau d'activation des LT au temps précoce ou au set point prédit la vitesse à laquelle les LT CD4+ seront déplétés dans le temps (S. G. Deeks et al. 2004; van Asten et al. 2004).

L'expression des marqueurs d'activation CD38 et HLA-DR est également augmentée sur les LT CD8+ spécifiques du VIH et, à un niveau moindre, sur les LT CD8+ non spécifiques du VIH (Doisne et al. 2004). L'expression de CD38 sur les LT CD8+ spécifiques du VIH ainsi que les LT CD8+ spécifiques de l'EBV, du CMV et d'influenza est en corrélation avec la charge virale du VIH (Doisne et al. 2004).

L'épuisement immunitaire dans le contexte d'infections virales persistantes a d'abord été décrit dans le modèle de souris de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV). Dans une étude historique, Zajac et col. ont démontré que les LT CD8+ spécifiques de LCMV persistaient pendant une infection chronique mais n'avaient pas de potentiel cytotoxique. Ces LT cytotoxiques dysfonctionnels ont été appelés "épuisés" ou exhaustés (Zajac et al. 1998).
Les équipes de Day et Trautmann ont signalé, presque simultanément, une augmentation de l'expression de PD-1 sur les LT CD8+ spécifiques du VIH (Day et al. 2006; Trautmann et al. 2006). Les deux groupes ont démontré que l'expression de PD-1 sur les LT CD8+ spécifiques du VIH était plus élevée que dans les cellules T spécifiques du CMV. Chez les individus infectés par le VIH, l'expression de PD-1 sur les LT CD4+ et CD8+ était en corrélation avec la charge virale plasmatique et le nombre de cellules T CD4+ circulant, qui sont deux marqueurs de la progression de la maladie (Day et al. 2006; Trautmann et al. 2006). En outre, les réponses des LT CD4+ et CD8+ spécifiques du VIH ont été rétablies ou secourues par blocage de la voie PD-1 (Day et al. 2006; Trautmann et al. 2006). Dans deux analyses longitudinales, l'expression de PD-1 chez les sujets infectés par le VIH est diminuée après le début du traitement antirétroviral (Day et al. 2006; Trautmann et al. 2006). Enfin, Zhang et col. (J.-Y. Zhang et al. 2007) ont signalé que les Long Term Non Progressor (LTNP), des individus infectés par le VIH qui maintiennent le nombre de LT CD4+, avaient une expression de PD-1 plus faible sur les LT CD8+ spécifiques du VIH, par rapport aux individus atteints d'une infection évolutive par le VIH.

L'expression de PD-1 a été évaluée chez les macaques rhésus avec une infection SIV pathogène dans deux études indépendantes (Petrovas et al. 2007; Velu et al. 2007). Dans les deux rapports, la majorité des LT CD8+ spécifiques du SIV ont exprimé PD-1 et le blocage de la prolifération des LT cytotoxiques SIV spécifique était lié au PD-1, situation similaire à l'infection par le VIH chez les humains (Petrovas et al. 2007; Velu et al. 2007). Velu et col. ont décrit l'expression la plus élevée de PD-1 dans les tissus intestinaux et lymphoïdes plutôt que sur le sang, ce qui correspond aux sites présentant une réplication virale la plus élevée (Velu et al. 2007). Petrovas et col. ont démontré que la stimulation TCR répétée est un facteur crucial dans l'expression de PD-1, car les épitopes SIV avec échappement mutationnel ont conduit à une diminution de l'expression de PD-1 (Petrovas et al. 2007). L'expression de PD-1 reste néanmoins difficile à interpréter puisque PD-1 est à la fois un marqueur d'activation exprimé au cours des phases précoces de l'activation mais aussi un marqueur d'épuisement dans les phases les plus tardives. Cette difficulté ne concerne pas la seule expression de PD-1 mais l'ensemble des marqueurs d'épuisement classiquement décrit (LAG-3, CD160, CD244, ...).

- Activation immunitaire dans les tissus

La grande majorité des études sur l'activation immunitaire a été effectuée dans le sang, car ce compartiment est le plus accessible. Les études qui évaluent l'activation immunitaire dans les tissus, en particulier lors des premières phases de l'infection, sont plus rares (Emilie et al. 1990). Les différentes études ont constamment montré que les infections par le VIH-1 et SIVmac sont caractérisées par une hyperplasie marquée dans les ganglions lymphatiques avec une expansion significative des plasmocytes (Pantaleo, Graziosi, and Fauci 1993). La zone T des ganglions lymphatiques est marquée par des infiltrations de macrophages CD163+, des polynucléaires neutrophiles, ainsi que de cellules Treg productrices de TGF-β et d'IL-10 (Estes et al. 2006; Tabb et al. 2013).

En conclusion, il est clairement établi que l'infection par le VIH se caractérise par un état d'activation immunitaire qui englobe de nombreuses cellules et tissus, avec des marqueurs associés aux LT et aux monocytes / macrophages. Bien que le consensus général soit pour un lien entre l'inflammation et l'activation des LT, les mécanismes exacts reliant ces deux phénomènes doivent encore être clairement définis.

I. 3. 1. b. Inflammation

Chez les patients infectés par le VIH, les ARV ont permis de réduire significativement l'inflammation associée à l'infection. Pourtant, une inflammation chronique à bas-bruit semble persister, que le traitement soit initié longtemps après l'infection (Neuhaus et al. 2010; Lederman et al. 2013) ou précocement (Sereti et al. 2017; Hunt 2017). Différents mécanismes d'inflammation sont identifiés : la persistance virale, la translocation microbienne, la dysbiose, l'atteinte métabolique, les perturbations immunologiques (perte d'efficacité des mécanismes de régulation), les co-infections, les effets toxiques des traitements antirétroviraux, les facteurs de comorbidités associés (alcool, tabac, toxicomanie, IST) (Deeks, Tracy, and Douek 2013).

Stratégie d'étude	Composante	Marqueurs
1 Inducteurs exogènes	Persistance virale	CV plasmatique ultrasensible
	Translocation microbienne	LPS, ADN 16S
	(liée à l'atteinte mucosale)	IFABP (Atteinte des entérocytes) Zonuline

2 Inducteurs endogènes	Compartiment lymphocytaire T	sCD28, SCD40L
	Monocytes / macrophages	sCD14, sCD163
	Adhésion / cellules endothéliales	sICAM, sVCAM-1
	Facteurs de migration	CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10), CXCL11
	Fibrose	Acide hyaluronique
	Compartiment métabolique	Insuline, lipides oxydés
	Coagulation	D-Dimères, PAI-1
3 Marqueurs systémiques	Marqueurs d'inflammation non spécifique	CRPus, IL-6, IL-1β, IL-8, IFN de type I
		TNF-α, sTNFR-1, sTNFR2
		IL-10 et autres marqueurs anti-inflammatoires

Tableau 1 : Paramètres d'inflammation.
Les facteurs inducteurs d'inflammation sont classiquement dissociés en facteurs exogènes (microbes, toxiques, atteintes physiques) et facteurs endogènes (d'origine cellulaire (produit par les compartiments T ou mono/macrophagiques), tissulaire (stress oxydant lié à dysfonction tissulaire, fibrose) ou plasmatique (facteurs de coagulation)) (Medzhitov 2008). Une autre approche est de réaliser une analyse de marqueurs d'inflammation systémique, mais peu informatifs de la nature des processus inflammatoires impliqués. La liste des biomarqueurs présentés dans ce tableau est non exhaustive.

L'étude de biomarqueurs d'activation mono-macrophagique a suggéré que l'inflammation chronique affectait plus spécifiquement les patients présentant des taux de CD4 bas : aucune inflammation persistante n'était observée au-dessus de 200 CD4/µL (Armah et al. 2012), mais cette notion reste controversée (Kuller et al. 2008; Tenorio et al. 2014; Justice et al. 2012; N. G. Sandler et al. 2011; Hunt, 2016).

Plus récemment, les travaux menés au sein de la cohorte APROCO chez des patients traités démontrent que l'inflammation chronique est fortement liée à des paramètres non liés à l'infection VIH et sans lien avec la sévérité de l'infection (taux de CD4, charge virale) (J.-P. Bastard et al. 2015). L'existence ou non d'une inflammation à bas bruit persistante reste difficile à évaluer du fait de la grande hétérogénéité des groupes étudiés (tant pour les groupes de patients infectés que pour les groupes « contrôle ») et de l'absence de paramètres consensus pour évaluer l'inflammation chronique. Une publication récente a listé 34 marqueurs biologiques d'inflammation utilisés lors d'études d'association entre inflammation et risque cardiovasculaire (Vos et al. 2017). La caractérisation de l'inflammation chronique résiduelle chez les patients infectés diffère en fonction des critères biologiques étudiés. Ainsi les travaux de French montrent que l'ensemble des paramètres d'inflammation n'est pas normalisé sous traitement antirétroviral efficace : CXCL10 (IP-10), MCP-1 (CCL2), TNF-α, IL-6, sCD14 (CD14 soluble) ou encore la

CRP ne sont pas normalisés et évoluent à distance de la mise en place d'un traitement efficace (French et al. 2009; Hatano et al. 2013; Wada et al. 2015). Des données contradictoires sont aussi retrouvées pour certains paramètres tels que sCD14 dont la concentration plasmatique reste augmentée ou revient à la normale selon les études (Cassol, Malfeld, et al. 2010; Taiwo et al. 2013; Hattab et al. 2015; Sereti et al. 2017). Krastinova et col. ont exploré la valeur pronostique des niveaux de CD14s au cours de la primo infection par le VIH. Dans cette étude, les hauts niveaux de CD14s durant la primo-infection étaient associés à un déclin plus rapide des LT CD4+ et à un risque accru de décès par un infarctus du myocarde. S'il est confirmé dans des études plus larges, ces résultats devraient aider à identifier les patients à risque de progression de la maladie (Krastinova et al. 2015). L'expression d'autres marqueurs plasmatiques immuno-modulateurs et pro-apoptotiques (sCTLA-4 et sTRAIL) est également affectée par l'infection par le VIH même sous traitement efficace prolongé (6 ans) (French et al. 2009). Certains marqueurs, peu spécifiques (CRP ultrasensible (us), IL-6, IL-1β, TNF-α, …), permettent de quantifier l'inflammation globale mais ne renseignent pas sur les sources de l'inflammation. Plusieurs biomarqueurs additionnels ont été étudiés au cours de l'infection par le VIH, de manière à refléter/intégrer les différents mécanismes d'activation immunitaire. Deux approches non mutuellement exclusives sont proposées : une approche en fonction des mécanismes d'inflammation (persistance virale, atteinte mucosale et translocation microbienne, co-infection, vieillissement, atteinte métabolique, défaut de coagulation) ou des types cellulaires impliqués dans l'inflammation (compartiment mono/macrophagique, les LT, les DCs).

I. 3. 2. Conséquences de l'inflammation

Indépendamment du rôle potentialisant de l'activation chronique au maintien du réservoir, l'activation immunitaire a aussi des conséquences sur le développement de pathologies associées non liées au VIH.

Maladies cardio-vasculaire

Indépendamment de son impact direct sur la persistance virale, la persistance d'une inflammation chonique contribue aussi au développement de pathologies cardiovasculaires. Les patients infectés par le VIH font face à un risque accru de maladie cardiovasculaire. Des études observationnelles de multiples cohortes (Currier et al. 2003; Triant et al. 2007) ont démontré des taux élevés d'infarctus du myocarde ou de maladie coronarienne chez les patients infectés par le VIH par rapport aux patients témoins, avec un risque relatif de 1,5 à 2 fois plus élevé. Des données récentes ont renforcé ces résultats. Dans une étude menée auprès de plus de 27 000 patients majoritairement masculins et infectés par le VIH, les taux d'infarctus du myocarde étaient plus élevés chez les patients infectés par le VIH dans chaque groupe d'âge que chez les patients témoins (Freiberg et al. 2013).

Diabète type II

Comme cela a été établi chez les personnes non infectées par le VIH, les marqueurs solubles de l'inflammation semblent aussi augmenter le risque de diabète de type II dans le contexte de l'infection par le VIH traitée, indépendamment d'autres facteurs de risque (T. T. Brown et al. 2010).

Cancers

Dans une étude récente, les niveaux plus élevés de marqueurs inflammatoires (y compris IL-6 et CRP) et les biomarqueurs stimulants les cellules B ont prédit un développement ultérieur du lymphome non-hodgkinien chez les partients infectés par le VIH et sous TARV, même après ajustement sur le nombre de LT CD4+ (Breen et al. 2011). La relation entre inflammation/activation immunitaire et développement de cancers non liés au sida est complexe mais ces données suggèrent un impact de l'activation immunitaire sur les cancers indépendamment du degré d'immunodéficience.

Dysfonction neuro-cognitives

Bien que les marqueurs d'activation des macrophages et des cellules microgliales soient fortement corrélés à la démence associée au SIDA dans l'ère pré-ART, peu de données sont disponibles concernant le lien entre biomarqueurs inflammatoires et troubles neuro-cognitifs associés au VIH dans l'ère des traitements modernes. Cependant, des concentrations plus élevées des marqueurs d'activation des macrophages au niveau des liquides plasmatiques et céphalo-rachidiens (CD163s, CD14s, …) sont significativement associées aux troubles neuro-cognitifs associés au VIH dans une cohorte d'individus sous TARV efficace (Burdo et al. 2013), ce qui souligne le rôle important

de l’activation macrophagique comme cible thérapeutique pour le dysfonctionnement neurocognitif dans ce contexte.

Collectivement, les quelques études brièvement citées dans cette introduction illustrent clairement que l'infection par le VIH se caractérise par un état d'activation immunitaire qui englobe de nombreuses cellules et tissus ainsi que des facteurs solubles pro-inflammatoires prédictifs de la progression de la maladie. Bien que le consensus général définisse un lien entre l'inflammation et l'activation des LT, les mécanismes exacts liés à ces deux phénomènes doivent encore être clairement définis.

I. 3. 3. Mécanismes d'inflammation et activation immunitaire

Il existe plusieurs mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels l'infection par le VIH peut induire une activation immunitaire. Je parlerai dans cette partie des mécanismes considérés comme des acteurs clés de l'activation immunitaire chronique dans la littérature (Figure 8).

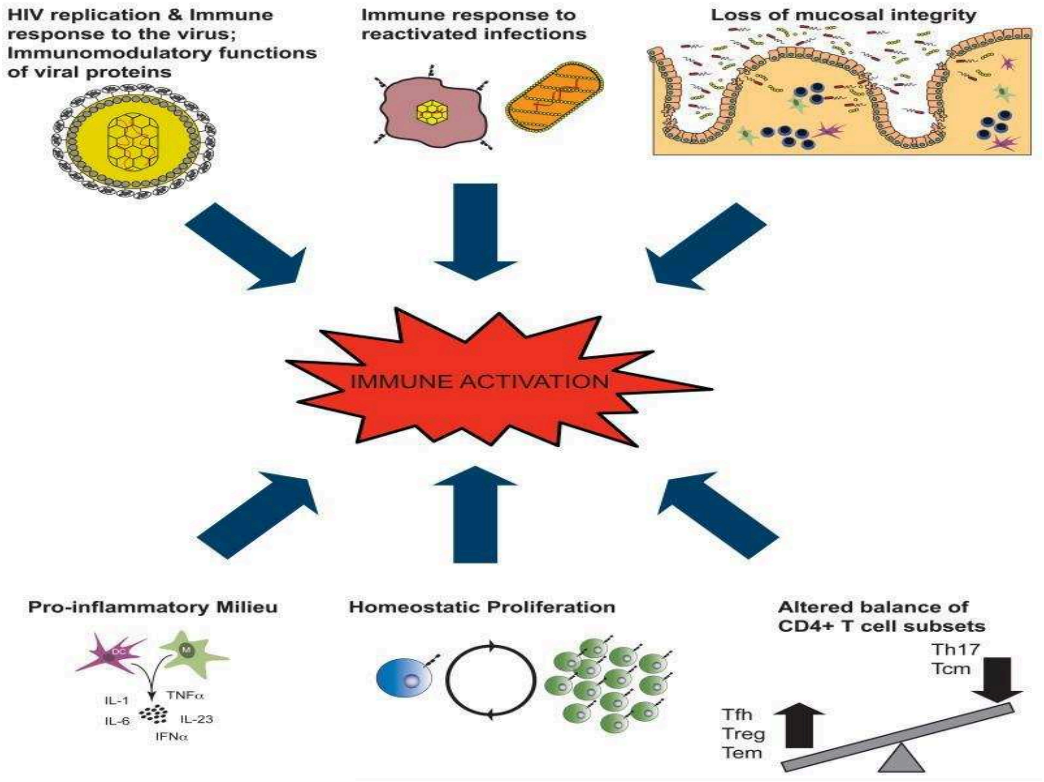


Figure 8. Représentation schématique des différents mécanismes contribuant à l'activation immunitaire chronique associée au VIH (d'après Pairdini et col).

1. 3. 3. a. Réplication du VIH et réponse immunitaire au virus

La cause la plus évidente de l'activation immunitaire dans le contexte de l'infection par le VIH est la réponse immunitaire directe (innée et adaptative) contre le virus et ses antigènes. Les antigènes du VIH sont reconnus par les cellules T exprimant des récepteurs de LT spécifiques de virus et les LB porteurs d'immunoglobulines de surface spécifiques du virus, mais certaines structures virales sont aussi détectées par les récepteurs de reconnaissance de motifs antigéniques associés au pathogène (PAMP) tels que les Toll-like récepteurs 7 et 9 (Beignon et al. 2005; Vabret et al. 2012). Cette reconnaissance antigénique spécifique ou non conduit à l'activation des cellules immunitaires. De plus, au cours de son processus d'entrée et de fusion, le VIH pourrait activer ses cellules cibles par sa liaison à la molécule CD4 et à ses corécepteurs tels que le CCR5 (Maartens, Celum, and Lewin 2014).

L'activation immunitaire et l'inflammation sont en corrélation avec le niveau de virémie et sont significativement plus faibles chez les patients infectés par le VIH qui contrôlent la réplication virale spontanément (HIC) ou par ART. Bien que la contribution directe de la réplication du VIH à l'activation immunitaire chronique soit bien reconnue, différents arguments démontrent que ce seul mécanisme n'est pas suffisant pour expliquer l'activation immunitaire chronique. Premièrement, la fréquence des LT activés dépasse largement la fréquence des LT CD4+ infectés par le VIH et des LT CD4+ et CD8+ spécifiques du VIH (Doisne et al. 2004; Finkel et al. 1995; Marc K. Hellerstein et al. 2003). Deuxièmement, chez les patients infectés par le VIH traités par ARV ainsi que chez les HIC, les marqueurs principaux de l'activation et de l'inflammation immunitaires sont encore significativement plus élevés que chez les personnes non infectées par le VIH, malgré les charges virales indétectables (Sauce et al. 2011; Hunt et al. 2003). Ainsi, le contrôle de la réplication virale reste associé à des niveaux non physiologiques d'activation immunitaire. Troisièmement, la charge virale élevée n'est pas strictement suffisante pour induire des niveaux pathologiques d'activation immunitaire, comme observé dans des études d'hôtes naturels pour SIV (Liovat et al. 2009; Chahroudi et al. 2012). D'autres preuves proviennent d'études de l'activation immunitaire dans un sous-ensemble rare de personnes infectées par le VIH nommé les « non progresseurs virologiques » (VNPs). Les VNP maintiennent un taux élevé et remarquablement stable de LT CD4+ pendant de nombreuses années malgré des niveaux de réplication virale similaires à ceux observés chez les non-contrôleurs. Malgré des charges virales élevées, les VNP présentent un profil de non-activation, remarquablement similaire à ceux trouvés chez des hôtes naturels infectés par SIV (Rotger et al. 2011). Tous ces résultats indiquent donc que les taux élevés de réplication du VIH ne sont ni suffisants ni strictement nécessaires pour induire une activation immunitaire ni durant les stades précoces de l'infection ni dans la phase chronique chez les patient traités ou non, contrôlant l'infection.

1. 3. 3. b. Les protéines virales

Les protéines virales du VIH comme Env, Tat et Nef, contribuent également à l'activation immunitaire induite par le VIH. La protéine Nef du VIH-1 interfère avec la signalisation associée à la liaison du TCR et perturbe la down-régulation du complexe CD3-TCR à la surface des cellules T infectées (Schindler et al. 2006, 1). En conséquence, la protéine Nef du VIH-1 peut contribuer directement à l'activation immunitaire en rendant les LT CD4+ infectés très sensibles à la re-stimulation par le TCR. Ce mécanisme n'est pas observé dans les modèles macaques SM et AGM infectés par SIV : les protéines Nef ne perturbent pas la modulation du complexe CD3-TCR, ce qui rend les LT CD4+ infectés plus réfractaires à une stimulation antigénique supplémentaire

(Münch et al. 2007). La contribution de ce mécanisme doit cependant être discutée puisque la proteine Nef provenant du HIV-2 et du SIVmac peut également réduire la modulation du complexe CD3-TCR.

1. 3. 3. c. Translocation microbienne et altération de la muqueuse intestinale

- Translocation microbienne

La «translocation» intestinale de bactéries ou d'autres microbes est définie comme le passage non physiologique de la microflore gastro-intestinale à travers la barrière épithéliale intestinale, la lamina propria et éventuellement vers les ganglions lymphatiques mésentériques locaux et, de là, vers des sites extranodaux (Wolochow, Hildebrand, and Lamanna 1966; Fuller and Jayne-Williams 1970). Lorque cette première barrière physique est rompue, les microbes et les produits microbiens translocateurs peuvent être éliminés dans la lamina propria et les ganglions mésentériques (Berg 1995). Cependant, si le système immunitaire de la muqueuse est compromis et/ou la translocation microbienne importante, ces mécanismes de défense peuvent être insuffisant conduisant ainsi à la sortie et la survie des bactéries sur des sites extra-intestinaux éloignés (Berg 1995; Tancrède and Andremont 1985).

L'étendue de la translocation microbienne peut être évaluée soit directement par la mesure de sous-produits bactériens dans le plasma, tels que le LPS et les fragments d'ADN ou d'ARN bactériens, soit indirectement par la mesure du LBP, des endoCAb et les anticorps anti-flagelline. Récemment, les taux plasmatiques de protéine liant les acides gras intestinaux (I-FABP), marqueur des lésions entérocytaires (Pelsers et al. 2003), ont également été utilisés pour corréler les lésions intestinales et la translocation microbienne (Netanya G. Sandler et al. 2011; Mavigner et al. 2012). Une méthode alternative pour évaluer la translocation microbienne est la détection et la quantification de l'ADN 16S microbien dans le plasma (Drancourt et al. 2000).

- Altérations de la muqueuse intestinale

Dès la phase précoce de l'infection aiguë par le VIH ou SIV, et tout au long de la maladie chronique, le tractus gastro-intestinal souffre d'une importante perturbation immunologique et structurelle, qui comprend l'épuisement des LT CD4+ avec une perte préférentielle des LT Th17, l'établissement d'une hyperactivation immunitaire et d'une inflammation locale de la muqueuse, l'épuisement de la fonction phagocytaire des macrophages intestinaux et des lésions structurales de l'épithélium (apoptose des entérocytes et rupture des jonctions serrées, etc.) (Veazey et al. 1998; Mattapallil et al. 2005; Guadalupe et al. 2003; Mehandru et al. 2004). Collectivement, ces altérations peuvent entraîner un passage accru de la microflore intestinale et des produits

microbiens dans la circulation systémique. Une étude majeure de Brenchley et col. (Brenchley et al. 2004) a démontré que les individus chroniquement infectés par le VIH et les macaques rhésus infectés par le SIV présentent des niveaux significativement augmentés de LPS dans le sang circulant. En particulier, les patients infectés par le VIH à un stade avancé de la maladie (< 200 LT CD4+/mL) présentaient des niveaux de LPS plasmatiques significativement plus élevés que les individus non infectés. Il est intéressant de noter qu'une corrélation positive a été trouvée entre les niveaux de LPS dans le plasma et les marqueurs d'activation immunitaire innée et adaptative (Brenchley et al. 2006; Marchetti et al. 2008), ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle la translocation microbienne peut entraîner une activation immunitaire (S. G. Deeks et al. 2004; Hunt et al. 2008; Janis V. Giorgi et al. 2002).

- Population LT CD4+ de la muqueuse gastro-intestinale

Il est intéressant de noter que les études sur l'infection par le SIV non pathogène chez les hôtes naturels du SIV (les SM et les AGM) ont également montré une déplétion massive des LT CD4+ dans les tissus muqueux au cours de l'infection aiguë (S. N. Gordon et al. 2007; I. V. Pandrea et al. 2007). Cependant, cette déplétion n'est pas accompagnée d'une translocation microbienne et d'une activation immunitaire chronique des muqueuses. Contrairement aux infections pathogènes par le SIV et le VIH, la perte des LT CD4+ dans la muqueuse ne semble pas progresser davantage chez les SM et est même suivie par un rétablisement partielle chez les AGM (Paiardini et al. 2008). Malgré ces dernières constatations, il est intrigant que les hôtes SIV naturels ne montrent aucune preuve de translocation microbienne en dépit d'une perte significative de LT CD4+ intestinaux, ce qui suggère que la déplétion des LT CD4+ de la muqueuse est nécessaire mais pas suffisante pour conduire à la translocation microbienne. En plus de l'hypothèse évolutionniste que les hôtes SIV naturels se sont progressivement adaptés pour maintenir l'immunité muqueuse en dépit d'une diminution des taux de LT CD4 + locaux, plusieurs mécanismes non exclusifs pourraient expliquer les différences de translocation microbienne entre les modèles d'infections pathogènes et les hôtes naturels du SIV. Tout d'abord, il est possible qu'une «qualité» différente de l'appauvrissement des LT CD4+ chez les hôtes SIV naturels ou non naturels au niveau de la muqueuse intestinale joue un rôle majeur. En effet, les animaux infectés par le SIV et les patients infectés par le VIH subissent une réduction significative et préférentielle des sous populations LT CD4+ (Th17) et CD8+ (Tc17) produisant de l'IL-17 dans le tractus gastro-intestinal (Brenchley et al. 2008; Nigam et al. 2011). De même, l'épuisement des cellules lymphoïdes innées (ILC) produisant de l'IL-17 dans les tractus gastro-intestinaux de macaques asiatiques infectés par le SIV a été démontré (Reeves et al. 2011; N. R. Klatt et al. 2012). A l'inverse, il a été montré que les hôtes naturels du SIV maintiennent des

fréquences de LT CD4+ Th17 et Th1 fonctionnels à des niveaux comparables à ceux des animaux non infectés (Favre et al. 2009). Comme les cellules Th17 intestinales jouent un rôle important dans l'immunité antimicrobienne, en particulier aux sites muqueux, ainsi que dans l'homéostasie des entérocytes (Kolls and Lindén 2004; Kao et al. 2004), la déplétion préférentielle des LT CD4+ Th17 dans les infections pathogènes par le VIH / SIV pourrait être impliquée dans l'atteinte de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la barrière intestinale et dans la perte de contrôle sur la translocation microbienne. Cette altération de l'homéostasie des LT CD4+ Th17 participe ainsi à la destruction/désorganisation du tissu intestinal et à l'inflammation. En effet, Favre et col. ont démontré que la perte précoce des Th17 du tractus GI dans l'infection pathogène par le SIV est associée à des signes évidents de progression de la maladie qui comprennent l'activation immunitaire, l'apoptose des LT, l'augmentation de l'interféron alpha circulant (IFN-α) et l'élimination rapide des LT CD4+ (Favre et al. 2009).

La déplétion sélective des LT CD4+ Th17 dans l'intestin de patients infectés par le VIH doit aussi être évaluée en tenant compte des Treg. Il a été suggéré que le déséquilibre de la balance Th17/Treg pourrait refléter le maintien d'un état inflammatoire chronique et pourrait être un paramêtre prédictif de la progression de la maladie (Pelletier et al. 2010; Shaw et al. 2011).

Au cours de l'infection par le VIH-1, la balance Th17/Treg Treg diminue dans le sang périphérique et les biopsies rectosigmoïdes (Favre et al. 2009). Une étude récente a pu démontrer que la balance Treg/Th17 est significativement augmentée chez les patients infectés par le VIH et a été inversement corrélée à la restauration des LT CD4+ de la muqueuse intestinale mais n'était pas corrélée aux niveaux d'ADN viral dans l'intestin (Kök et al. 2015). Cette étude montre aussi que l'initiation précoce du TARV contribue à préserver et/ou à restaurer l'homéostasie de la muqueuse intestinale et justifie l'initiation du TARV pendant la phase aiguë de l'infection par le VIH (Kök et al. 2015).

Les lymphocytes T primés dans des sites inductifs tels que les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT), les plaques de Peyer et les ganglions lymphatiques mésentériques expriment un niveau élevé de récepteurs de migration intestinale tels que l'intégrine α4β7 et CCR9, qui sont responsables de leur migration du sang vers les sites effecteurs de la muqueuse intestinale, la lamina propria et l'épithélium (Johansson-Lindbom et al. 2003; Mora et al. 2003). Un défaut de migration des LT CD4+ perturbe aussi l'homéostaise mucosale. L'étude ANRS EP44 PERSIST montre qu'il existe un défaut de homing des LT CD4+ CCR9 et α4ß7, qui restent accumulés dans le sang des patients infectés par le VIH et sous TARV au lieu de migrer vers la muqueuse intestinale. Leur rôle principal au niveau de la muqueuse intestinale est de préserver son intégrité. Leur accumulation dans le sang et non pas dans la muqueuse intestinale des patients infectés

favoriserait donc l'inflammation. Ce défaut de homing est lié à une déficience dans la sécrétion d'une chimiokine clé qui est le CLL25 (Mavigner et al. 2012).

1. 3. 3. d. Rôle du microbiote

Une étude de Dillon et col. (Dillon et al. 2014) a montré que l'infection par le VIH-1 est associée à une modification de la flore intestinale et que ce changement de microbiote est associé à l'inflammation des tissus intestinaux, à la translocation microbienne et à l'activation accrue des LT en périphérie. Divers composants bactériens peuvent favoriser l'activation immunitaire en induisant des cytokines pro-inflammatoires de type IL-1 et IFN-γ (Dinh et al. 2015). Somsouk et col. ont montré une infiltration de neutrophiles et une apoptose de la muqueuse malgré le traitement HAART (Somsouk et al. 2014). Ils ont en outre montré que le défaut de prolifération épithéliale semble être associé au taux de CD14s dans le plasma et l'inflammation systémique.

Enfin, une étude récente a montré qu'après le traitement par probiotiques des patients infectés par le VIH-1, il y a une diminution significative de la translocation microbienne et de l'inflammation (caractérisée par une diminution de la production d'IL-6) (Villar-Garcia et al. 2015).

1. 3. 3. e. La lymphopénie T

Un faible taux de LT CD4+ est un autre facteur favorisant indirectement l'activation immunitaire. Dans les modèles murins, l'existence d'une lymphopénie T sévère (induite par irradiation, ou constitutive par l'utilisation d'animaux dépourvus de LT) a été associée au développement d'une prolifération dite « homéostatique » appelée aussi prolifération « lymphopénie-induite ». L'une des raisons en est que la lymphopénie augmente la disponibilité en IL-7, une cytokine de survie qui peut aussi exercer une activité pro-inflammatoire. L'extrapolation de cette activation lymphopénie-induite au contexte de lymphopénie partielle telle que celle observée dans l'infection par le VIH peut toutefois être discutée. Quelques éléments suggèrent néanmoins un impact de la lymphopénie T sur l'activation. L'administration d'IL-7 aux répondeurs non immunologiques au TARV augmente l'activation des LT CD8+ (Sereti et al. 2009). Chez l'homme, la lymphopénie CD4+ idiopathique est une pathologie ayant de fortes similitudes avec le SIDA, mais sans origine infectieuse. Elle est caractérisée par un important déficit immunitaire des LT CD4+ entraînant des infections opportunistes graves. Ce déficit immunitaire rare (associé à une perte de fonction de la molécule CXCR4, perturbant l'homéostasie des LT CD4+) (Scott-Algara et al. 2010), est aussi

associée à une activation des LT (Zonios et al. 2008), suggérant un lien entre lymphopénie et activation.

1. 3. 3. f. Les co-infections

Les co-infections associées à l'infection par le VIH-1 sont un autre facteur d'activation immunitaire chronique. Par exemple, les femmes infectées par le virus de l'hépatite C (VHC) et le VIH-1 présentent une activation des LT plus élevée que les femmes mono-infectées par le VIH-1 (Andrea Kovacs et al. 2008). De plus, la suppression du VHC par l'interféron alpha PEGylé et le traitement par la ribavirine réduit l'activation des LT (Gonzalez et al. 2009). La co-infection VIH/VHB accélère l'inflammation et contribue au développement de maladies hépatiques (Bautista-Amorocho et al. 2014). De même, les co-infections par le virus de l'herpès simplex de type 2 (HSV2) (Sheth et al. 2008) et de type 8 (Masiá et al. 2014) sont associées à l'activation des LT CD4+ et CD8+ (Sheth et al. 2008). La charge d'ADN du virus d'Epstein-Barr (EBV) corrèle avec le niveau des cytokines inflammatoires IL-6 et TNF-α (Petrara et al. 2012; Gianella et al. 2012). Chez les patients VIH-1, les taux de cytomegalovirus (CMV) séminal sont aussi corrélés à l'activation des LT (Gianella et al. 2012) et le valganciclovir, traitement antiviral de l'infection par le CMV, a montré une régulation négative de cette activation.

I. 4. Lien entre réservoirs tissulaires et inflammation chronique au cours de l'infection par le VIH

L'activation immunitaire est nécessaire au développement de l'immunité antivirale. Cependant, dans les années 1990, Giorgi et ses collègues ont rapporté une observation plutôt contre-intuitive: les niveaux d'activation des LT, mesurés avec l'expression du marqueur d'activation CD38 sur les LT CD8+, prédisaient un pronostic défavorable pour les patients infectés (J. V. Giorgi et al. 1993; Z. Liu et al. 1998; J. V. Giorgi et al. 1999). Plusieurs équipes ont ensuite confirmé qu'il existe effectivement une corrélation directe entre la progression de l'infection par le VIH-1 et les niveaux d'activation des LT CD8+ (Hazenberg et al. 2003; Wilson et al. 2004; S. G. Deeks et al. 2004).

Une autre preuve du rôle délétère de l'activation immunitaire dans l'infection par le VIH a été apportée par des études de primates infectés par le SIV. Les macaques rhésus qui, comme les humains infectés par le VIH, souffrent d'une déplétion progressive des LT CD4+ et d'une progression vers le SIDA lors de l'infection par SIV, sont caractérisés par une forte activation des LT. En revanche, les macaques sooty mangabes infectés par le SIV et les singes verts africains, hôtes naturels du SIV, qui ne développent aucune immunodéficience, présentent une activation minimale des LT malgré une réplication virale évidente (Silvestri et al. 2003). Une autre

observation intéressante vient de l'étude de l'infection par le VIH-2. La plupart des personnes infectées par le VIH-2 éprouvent une progression légère ou lente et mourront pour des causes non liées au VIH-2. En plus de la faible charge virale et une réponse immunitaire forte et robuste (Leligdowicz et al. 2007), ces patients infectés par le VIH-2 affichent généralement une activation immunitaire significativement moindre par rapport aux individus infectés par le VIH-1 (Sousa et al. 2002). L'effet indésirable de l'activation immunitaire dans la pathogénèse du VIH est également démontré par les observations liant la progression plus rapide de la maladie chez des prostituées kenyanes avec des infections intercurrentes (Anzala et al. 2000) ou par la progression accélérée après l'infection par le SIV chez des macaques qui ont été soumis à un stimulus immunitaire répété indépendant du SIV pour induire une activation chronique (Villinger et al. 2001). Enfin les niveaux d'activation immunitaire prédisent le déclin des LT CD4+, mieux et indépendamment de la charge virale (J. V. Giorgi et al. 1999; S. G. Deeks et al. 2004).

Une forte association ou corrélation entre la fréquence des LT CD4+ contenant de l'ADN intégré et la fréquence de LT CD4+ proliférantes (mesurées par Ki67) est démontrée chez des patients sous TARV (Chomont, El-Far, et al. 2009). La relation directe entre la prolifération des LT et la persistance du VIH a récemment été rapportée dans deux études majeures. Maldarelli et col. et Wagner et col. ont identifié des sites spécifiques d'intégration du VIH liés à l'expansion clonale des cellules infectées par le VIH (Maldarelli et al. 2014;Wagner et al. 2014). Les intégrations du provirus ont été fréquemment trouvées dans des gènes associés à la régulation du cycle cellulaire et à leur survie, favorisant l'infection des cellules en prolifération et la persistance des cellules infectées par le prolongement de leur survie. Le nombre limité d'individus analysés dans ces deux études n'a pas permis d'évaluer la contribution de l'activation continue ou chronique des LT, de la prolifération homéostatique ou l'expansion induite par les antigènes viraux à la persistance du VIH.

Schématiquement, l'association entre l'activation immunitaire et la persistance du virus peut résulter des facteurs suivants (Figure 9). Premièrement, la réplication résiduelle du virus au sein des LT CD4+ activés du sang circulant ou dans les tissus. Deuxièmement, l'infection continue des LT CD4+ quiescents qui est favorisée en présence de niveaux élevés de chimiokines inflammatoires, comme CXCL10 (Cameron et al. 2010). Troisièmement, le trafic cellulaire des cibles du VIH aux tissus, comme le tractus gastro-intestinal, dans lequel il y a une mauvaise pénétration de certains ARV (Fletcher et al. 2014). Quatrièmement, la transcription de l'ADN viral à partir de cellules infectées de manière latente favorise l'inflammation. Cinquièmement, la prolifération homéostatique des LT mémoires quiescents infectés (Chomont, El-Far, et al. 2009; Maldarelli et al. 2014) et éventuellement des LT mémoires activés chez les patients sous ART.

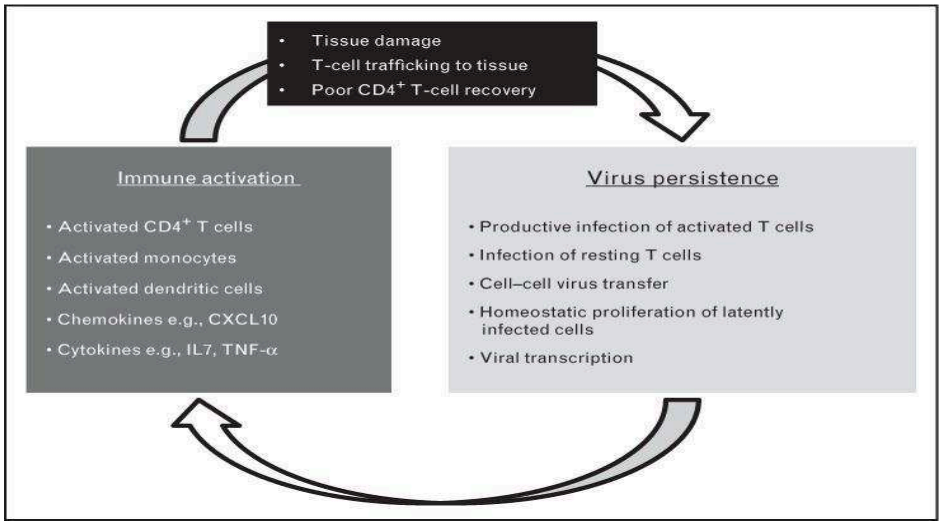


Figure 9. Mécanismes potentiels conduisant aux interactions entre l'activation immunitaire et la persistance du virus chez les patients sous TARV. (d'après Reena Rajasuriar et col)

Il nous semble intéressant d'aborder le lien entre ces deux phénomènes, persistance virale et inflammation/activation chronique en intégrant une approche tissulaire. Le TA nous a semblé être un tissu important qui peut réunir ces deux caractéristiques sur un site unique. Dans le chapitre ci-dessous nous allons voir ce qu'est le tissu adipeux et pourquoi nous nous y sommes intéressés.

II. Tissu adipeux et infection par le VIH

II. 1. Le tissu adipeux

Trois principaux types de tissus adipeux (TA) existent chez l'homme: les TA blanc, brun et beige (M.-J. Lee, Wu, and Fried 2013). C'est un tissu conjonctif spécialisé initialement décrit comme ayant un rôle métabolique important (c'est la principale réserve énergétique de l'organisme), mais qui joue aussi un rôle d'isolant thermique et mécanique. Le TA, et notamment le TA blanc, exerce enfin une forte activité endocrinienne. Le TA blanc représente le principal TA chez l'homme adulte (Sarjeant and Stephens 2012a). Il correspond à 15 à 25% de la masse corporelle de l'être humain avec une proportion qui varie selon l'âge, le sexe (15% et 25% du poids corporel chez l'homme et la femme respectivement) et l'activité. Lorsque le taux de graisse dépasse 35% chez la femme et 25% chez l'homme, l'individu est considéré comme obèse (Ouchi et al. 2011). Nous nous intéresserons principalement au TA blanc.

II. 1. 1. Localisation

Les deux dépôts les plus abondants du TA sont la graisse profonde (localisée au niveau de la cavité viscérale) et les TA sous-cutanés.

Chez la femme, le TA est surtout localisé dans les parties inférieures de l'organisme (hanche et cuisse) et autour des glandes mammaires. Chez l'homme, la majeure partie du TA se trouve au niveau abdominal soit au niveau sous-cutané soit au niveau intra-viscéral. Il existe des dépôts

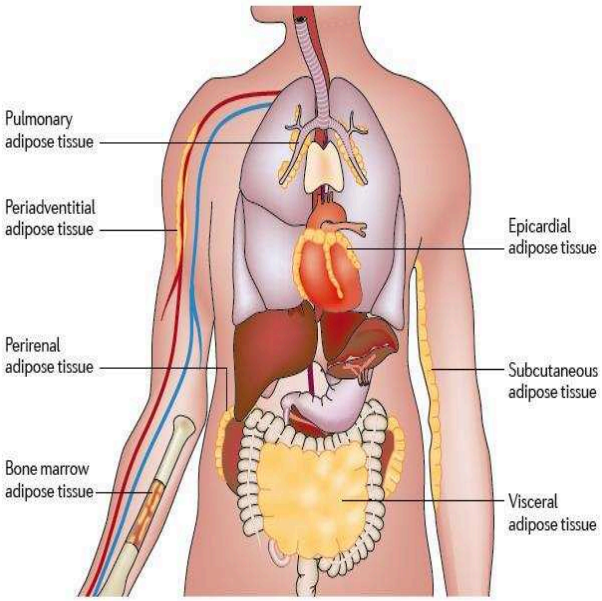


Figure 10. Dépôts de tissu adipeux dans l'organisme
Le tissu adipeux se trouve principalement dans les dépôts sous-cutanés et viscéraux. Dans le contexte de l'obésité, le tissu adipeux se développe dans ces dépôts mais aussi dans d'autres sites (Ouchi et col. 2011).

adipeux également autour des intestins, dans le péritoine, le foie, le muscle, la moelle osseuse et dans le thorax, en particulier autour du cœur, surtout chez les personnes obèses (Fain et al. 2004).

Les différences entre TASC et le TAV présents dans la cavité abdominale sont relativement bien détaillées (Shen et al. 2003). Celles-ci incluent des différences anatomiques, cellulaires, moléculaires, physiologiques, cliniques et pronostiques. Anatomiquement, le TAV est présent principalement dans le mésentère et l'omentum, et sa vascularisation s'écoule directement à travers la veine porte vers le foie (Heinrich, Castell, and Andus 1990; Wajchenberg 2000). La composition cellulaire du TAV diffère par rapport au TASC: le TAV a une plus forte densité de cellules dans la fraction stroma-vasculaire, il est plus vascularisé, plus innervé et contient un plus grand nombre de cellules inflammatoires et immunitaires (Bruun et al. 2005; C. A. Curat et al. 2006).

II. 1. 2. Composition

Le TA est composé de plusieurs types cellulaires. On peut distinguer deux fractions : une fraction adipocytaire qui représente 90% du volume du TA, mais aussi une fraction stroma-vasculaire (FSV) qui représente environ 60 % de la cellularité du TA. Cette fraction stroma-vasculaire comprend des progéniteurs adipocytaires (pré-adipocytes, cellules souches mésenchymateuses du TA), des cellules immunitaires (notamment les LT et les macrophages), les cellules composant les capillaires et le réseau vasculaire (péricytes, cellules endothéliales, fibroblastes...) (Ouchi et al. 2011).

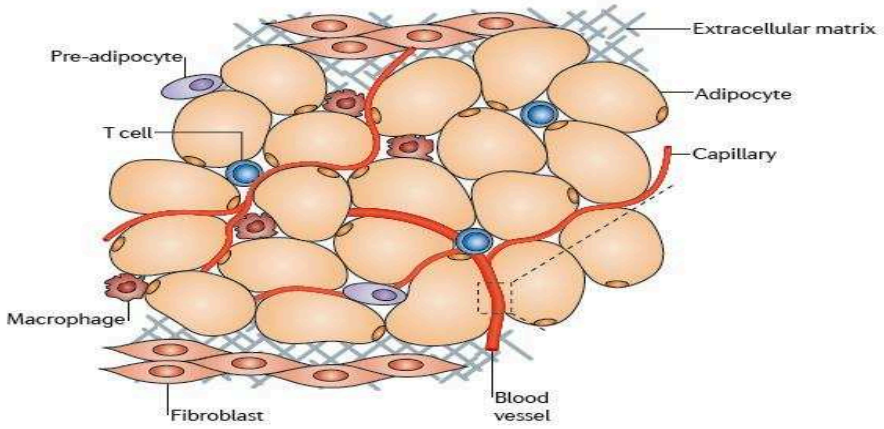


Figure 11. Composition du tissu adipeux sain

Le tissu adipeux est une structure complexe regroupant de multiples types cellulaires. Les adipocytes sont la principale composante cellulaire du tissu adipeux. Les autres types de cellules qui sont présentes sont des cellules précurseurs, des pré-adipocytes, des fibroblastes, des cellules vasculaires, des cellules immunitaires. Ces cellules constituent la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux (Ouchi et col. 2011).

II. 1. 2. a. Les adipocytes

L'adipocyte mature est la cellule spécifique du TA. C'est une grosse cellule sphérique pouvant atteindre 100 à 200µm. Son cytoplasme est largement occupé par une vacuole lipidique qui repousse le noyau en périphérie contre la membrane plasmique. L'adipocyte présente deux fonctions principales selon le contexte métabolique : (a) le stockage des lipides par le processus de lipogénèse qui assure la néosynthèse d'acides gras à partir de glucose et de synthèse des triglycérides et (b) la mobilisation des lipides via le processus de lipolyse.

Les adipocytes ne sont pas les mêmes dans toutes les localisations. Ceux qui sont autour des organes abdominaux sont plus petits, plus nombreux et métaboliquement plus actifs que ceux qui sont en position sous-cutanée. Les adipocytes du TA viscéral ont une forte activité lypolytique et libèrent de grandes quantités d'acides gras libres. Ils présentent un profil sécrétoire différent avec une expression de cytokines pro-inflammatoires plus marquée que le TA sous-cutané. (Avram, Avram, and James 2005; Sarjeant and Stephens 2012a). Les adipocytes périvasculaires semblent être intrinsèquement différents des adipocytes d'autres dépôts adipeux, comme en témoigne une étude de Chaterjee et col dans laquelle les adipocytes périvasculaires des artères coronaires humaines ont été comparés aux adipocytes des dépôts périrénaux et sous-cutanés. L'étude a révélé que les adipocytes périvasculaires sont moins différenciés et ont un profil sécrétoire favorisant les cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, l'IL-8 et le MCP-1 avec une sécrétion réduite de l'adiponectine. Les auteurs suggèrent que les adipocytes périvasculaires contribuent plus spécifiquement à l'inflammation vasculaire et au développement de l'athérosclérose (Chatterjee et al. 2009).

Les données récentes montrent que les adipocytes peuvent jouer un rôle microbicide, c'est le cas par exemple dans l'infection à Staphylococcus aureus où les adipocytes sont capables de sécréter des défensines, rôle normalement joué par les macrophages (L. Zhang et al. 2015).

II. 1. 2. b. Les cellules de la fraction stroma-vasculaire

- Les cellules progénitrices

Le TA est aussi caractérisé par un fort potentiel progéniteur. D'après l'ISCT (International Society for Cellular Therapy), les cellules souches mésenchymateuses sont capables de se différencier en un ou plusieurs types cellulaires (Bourin et al. 2013). Les trois critères principaux établis par l'ISCT pour définir les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont leurs capacités d'adhérence au plastique, l'expression positive des molécules CD73, CD90, CD105 et négative de CD11b, CD14, CD45 et HLA-DR, et enfin leurs pouvoir de différenciation en lignées mésenchymateuses : chondrocytes, adipocytes, myocytes et ostéoblastes.

Les cellules souches dérivées du TA sont isolées de la FSV et ont une forte ressemblance avec les cellules souches de la moelle osseuse (BMSC) pour l'expression de marqueurs de surface cellulaire courants, leurs profils d'expression génique et leurs pouvoir de différenciation (Lin et al. 2008). Les cellules souches mésenchymateuses du TA, contrairement à celle de la moelle osseuse peuvent être obtenues en grandes quantités et à faible risque. En plus d'être plus abondant et facilement accessible, le tissu adipeux contient beaucoup plus de cellules souches que la moelle osseuse (5 000 contre 100 à 1 000 par gramme) (Strem et al. 2005). De ce fait, les cellules souches du TA sont particulièrement étudiées en tant que source de cellules souches mésenchymateuses chez l'adulte, du fait de leur propriétés progénitrices et leur facilité d'accès en vue de stratégies thérapeutiques régénératives.

Les CSM présentent d'autre part des propriétés immunitaires remarquables. In vitro, les CSM inhibent la prolifération des LT, des LB, des NK et des DC, en induisant leur anergie. Les CSM peuvent inhiber une variété de fonctions telles que la sécrétion de cytokines, l'effet cytotoxique des LT et des NK, la maturation des LB et leur capacité de sécrétion d'anticorps (De Miguel et al. 2012). Les CSM dérivées du TA présentent des capacités immunosuppressives à la fois in vitro et in vivo. L'injection de ces dernières un jour après la transplantation augmente considérablement la survie de l'allogreffe de la peau en inhibant la réponse immunitaire pro-inflammatoire Th17 et en améliorant la réponse immunitaire protectrice Treg. La thérapie par les CSM du TA pourrait ouvrir de nouvelles opportunités pour promouvoir la survie des allogreffes lors des transplantations cliniques (Larocca et al. 2013). Le rôle immunomodulateur de cette fraction dans un contexte infectieux reste aussi à mieux déterminer.

- Les cellules endothéliales

La présence d'un réseau vasculaire fonctionnel est nécessaire pour assurer l'intégrité et le bon fonctionnement du TA. L'apport insuffisant d'oxygène génère une zone hypoxique dans le tissu qui favorise les anomalies métaboliques et le recrutement de cellules immuno-inflammatoires (Villaret et al. 2011). Au cours du processus inflammatoire, l'activation des cellules endothéliales aboutit à des voies de signalisation intracellulaire conduisant à la production d'une série de molécules d'adhésion cellulaire (CAM), de chimiokines et de cytokines, ainsi que d'ectoenzymes (Sengenès et al. 2007). En 2012 le groupe du Pr Saverio Cinti, en collaboration avec l'équipe de Silvia Corvera, a publié un article suggérant que les cellules endothéliales des capillaires du TA blanc et brun peuvent se différencier en cellules adipeuses matures (K. V. Tran et al. 2012).

- Les cellules immunitaires

Les lymphocytes T

Différentes sous-populations de LT sont décrites dans les TA : les LT CD4+ et les LT CD8+. Une population particulièrement étudiée est celle des LT CD4+ régulatrices (Treg). Les Treg sont abondantes dans le TA viscéral de souris non-obèses (40-70% des LT CD4+ totaux) et leur nombre est considérablement réduit dans les modèles animaux de résistance à l'insuline et d'obésité (Feuerer et al. 2009).

Les Treg du TA sont différents de leurs homologues retrouvés dans les organes lymphoïdes. Les Treg présentent un profil phénotypique et transcriptionnel différent et un répertoire de reconnaissance des antigènes specifique au TA (Cipolletta et al. 2011). Les Treg du TA se distinguent par la surexpression de CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR9 et CXCR6 et une sous expression de CCR6, CCR7 et CXCR3. Ce profil de migration spécifique pourrait contribuer à l'accumulation des Treg dans le TA (Feuerer et al. 2009; Cipolletta et al. 2011). Les Treg du TA produisent de l'IL-10 et présentent la particularité d'exprimer le récepteur à l'IL-10. D'un point de vue transcriptionnel, les Treg du TA présentent une signature unique avec l'expression du facteur de transcription PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor), un facteur de transcription essentiel à la biologie des adipocytes. L'expression de PPARγ par les Treg du TA est nécessaire à leur accumulation dans le TA, à l'établissement de leur phénotype et leurs fonctions (Cipolletta et al. 2012). L'impact des thiazolidinediones, famille d'anti-diabétiques agonistes de PPARγ permettant la mobilisation du TA viscéral abdominal, n'est d'ailleurs pas restreint aux adipocytes puisque l'expression de PPARγ sur les Treg du TA est indispensable à la restauration complète de la sensibilité à l'insuline médiée par le pioglitazone chez les souris obèses (Cipolletta et al. 2012). Les Treg du TA constituent un exemple de choix de la notion de « plasticité fonctionnelle » et de « signature tissu-spécifique » des Treg. Le développement d'un programme de différenciation proche des cellules cibles de leur régulation est envisagé comme une stratégie d'adaptation des Treg permettant de moduler le plus efficacement leurs cibles.

Les LT CD8+ effecteurs et les LT CD4+ Th1 sont eux principalement décrits dans les contextes de perturbations métaboliques (obésité, diabète). Le recrutement et l'activation de ces cellules dans le TA contribuent à la cascade pro-inflammatoire qui est aussi associée aussi à la résistance à l'insuline (Schipper et al. 2012). La séquence selon laquelle les différentes populations immunitaires pro-inflammatoires interviennent pour conduire à l'inflammation locale reste à mieux définir. L'accumulation des macrophages (et leur modification phénotypique vers un profil pro-inflammatoire) dans le TA de souris et les humains obèses est largement démontrée (Weisberg

et al. 2003; Lumeng, Bodzin, and Saltiel 2007; Gökhan S. Hotamisligil 2006). Pourtant les travaux de Nishimura et col. suggèrent que l'infiltration par les LT CD8+ précède les modifications du compartiment macrophagique (Nishimura et al. 2009).

Les macrophages

Les macrophages sont aussi une population très représentée dans le TA. Ces cellules ont été détectées en microscopie et par des expériences de cytométrie en flux. Ces cellules présentent des profils phénotypiques qui varient en fonction du tissu dans lequel elles résident et du contexte métabolique (Curat et al. 2004).

Hétérogénéité fonctionnelle: Classification des sous-populations macrophagiques

Pour imiter la nomenclature des LT CD4 de type Th1/Th2, une classification M1/M2 basée sur les caractéristiques fonctionnelles et les phénotypes des macrophages a été proposée.

- Les macrophages M2 sont dits « anti-inflammatoires » ou « alternativement activés ». Différents signaux, y compris IL-4, IL-13, les glucocorticoïdes et l'adiponectine induisent leur polarisation. Les macrophages M2 produisent de grandes quantités de cytokines anti-inflammatoires (comme l'IL-10) préservant l'intégrité des tissus. Cependant, le terme M2 semble regrouper des sous-populations relativement hétérogènes fonctionnellement. Trois sous-populations ont été proposées pour mieux caractériser ces macrophages M2: (i) M2a, induite par l'IL-4 ou IL-13 et impliquée dans la destruction de parasites, (ii) M2b, induite par l'exposition des complexes immuns et impliqué dans l'immunorégulation, et (iii) M2c, induite par l'IL-10 et les glucocorticoïdes. L'identification des M2 est basée sur l'expression de la molécule CD206 (récepteur au mannose), et la molécule CD163 (récepteur scavenger) (S. Gordon and Taylor 2005) mais aucun marqueur ne fait réellement consensus.
- Les macrophages M1 sont dits « pro-inflammatoires » ou « classiquement activés ». Leur maturation est induite par des stimuli bactériens (LPS), des cytokines Th1 telles que l'IFNγ, le TNF-α et le GM-CSF. Ces cellules sont caractérisées par une sécrétion élevée de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-12 et IL-23), une forte production d'oxydes nitriques et une grande capacité de présentation antigénique. Les macrophages M1 ont une activité microbicide claire et pourraient jouer un rôle dans la mise en place de la résistance à l'insuline associée à l'obésité. Les marqueurs utilisés pour l'identification des M1 sont le CD40, le CD80 ou encore le CD86 et le CMH de classe II, même si à nouveau, aucun marqueur ne fait consensus. Les M1 pourraient jouer un rôle dans la mise en place de la résistance à l'insuline associée à l'obésité via la sécrétion de certaines cytokines inflammatoires. L'accumulation des macrophages dans le TA hypertrophié et

leur rôle pathogène via la sécrétion de cytokines est clairement démontré (Vachharajani and Granger 2009).

Il est important de noter que les états de polarisation M1 ou M2 sont les extrêmes d'un spectre : les macrophages présentent in vivo des phénotypes intermédiaires qui sont fortement influencés par le microenvironnement tissulaire où ils résident. Dans le même temps, d'autres équipes proposent une nouvelle classification des macrophages établie en fonction de leur fonctions : activité de défense contre les pathogènes (proche du phénotype M1 avec activité microbicide); la cicatrisation des plaies (promue par l'IL-4 produite par les cellules Th2); et la régulation immunitaire (de préférence induite par l'IL-10 produite par Tregs) (Martinez and Gordon 2014).

Autres cellules de l'immunité présentes dans le tissu adipeux

	Rôle fonctionnel	Données concernant le TA
Cellules dendritiques	Présentation de l'Ag Sécrétion de cytokines Activation et différenciation des LT	Peu exploré dans le TA ↗ proportion dans TA de souris HFD Différenciation en LT pro-inflammatoires favorisée par les DC isolées de patients obèses.
Mastocytes	Capacité de dégranulation rapide Sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires	↗ proportion dans TA de souris HFD et patients obèses Déplétion des mastocytes réduit l'infiltrat macrophagique, la prise de poids et la sensibilité à l'insuline dans les modèles HFD. Effet angiogénique des mastocytes
Neutrophiles	De courte durée de vie Migration précoce sur le site d'infection Participe au rerutement des autres cellules de l'immunité	< 1% chez les animaux maigres ↗ proportion dans TA de souris HFD
Cellules iNKT	Reconnaissance des lipides et glycolipides	Dans les modèles d'obésité, ↗ proportion iNKT dans le TA
Cellules NK	Activité cytotoxique naturelle Rôle pro- ou anti-inflammatoire	↘ activité NK chez le sujet obèse ↘ infiltrat macrophagique si déplétion NK
ILC	Rôle pro- ou anti-inflammatoire	↘ du nombre des éosinophiles et des macrophages si déplétion ILC
LTγδ	Rôle pro- ou anti-inflammatoire	Dans les modèles d'obésité, ↗ proportion

Tableau 2. Populations de cellules immunitaires identifiées dans le tissu adipeux.
Tableau non exhaustif répertoriant les sous-populations présentes dans le TA, leur rôle fonctionnel général et plus spécifiquement décrit dans le TA. (Abraham and St John 2010; Boulenouar et al. 2017; Galli et al. 2005; B.-C. Lee and Lee 2014; R. M. Steinman 2008)

Les cellules dendritiques (DC) du TA

Leur identification dans le TA est compliquée par le fait que l'un de leurs principaux antigènes, CD11c, est abondamment exprimé également sur les macrophages pro-inflammatoires du TA de type M1 chez la souris (en cytométrie de flux, les macrophages du TA sont généralement définis comme des cellules F4/80+ CD11b+ CD11c+ tandis que les DC sont F4/80- CD11b-low CD11c+)

(Dominguez and Ardavin 2010). Il a été démontré dans les modèles murins d'obésité qu'un régime alimentaire riche en matières grasses augmente la proportion de DC du TA et que l'expression de CD1c, CD11c et CD83 est élevée dans le TA sous-cutané des patients obèses par rapport à leurs homologues non obèses (Bertola et al. 2012). De plus, les DC de sujets obèses sont capables in vitro d'induire la différenciation des LT vers un profil pro-inflammatoire Th17 (cellules produisant l'IL-17), tandis que la quantité de DC CD103+, importantes pour la différenciation des cellules Treg, est diminuée. Dans une autre étude, la déplétion génétique des DC a été associée à une diminution du nombre des macrophages du TA, des macrophages hépatiques et d'une amelioration de l'insulino-résistance, bien qu'il ne soit pas clairement démontré si ces effets pouvaient être attribuables uniquement à la dépletion des DC ou plutôt à la perte de poids qui accompagnait la mutation (Stefanovic-Racic et al. 2012).

Les mastocytes

Les mastocytes activés sécrètent différents médiateurs inflammatoires comprenant l'histamine, l'héparine, les médiateurs lipidiques (PGE2 et LTB4), les protéases (chymases et tryptases) et les cytokines pro- et anti-inflammatoires (TNF-α, IL-1β, IL-6, TGF-ß, IL-4 et IL-10) (Abraham and St John 2010). Bien qu'ils ne soient pas aussi abondants que les macrophages dans le TA, le nombre de mastocytes est significativement plus élevé chez les souris et les humains obèses (L. L. Liu et al. 2010). Les souris déficientes en mastocytes ne montrent pratiquement aucune infiltration des macrophages du TA, une sensibilité améliorée à l'insuline et une réduction du poids corporel dans les conditions de régime riche, tandis que la reconstitution des mastocytes après leur déplétion est suivie d'une augmentation de l'IR (L. L. Liu et al. 2010). L'IL-6 et l'IFN-γ semblent jouer un rôle important dans ce processus, car la reconstitution avec des mastocytes provenant des souris IL-6 KO ou IFN-γ KO n'a pas eu d'effet sur la sensibilité à l'insuline. Le déficit en mastocytes entraîne également une diminution de l'angiogénèse suggérant que les mastocytes pourraient contribuer à l'inflammation du TA par l'augmentation de l'angiogénèse (L. L. Liu et al. 2010).

Les lymphocytes T cytotoxiques naturels invariants (iNKT)

Les iNKT expriment un TCR semi-invariant et se distinguent des LT classiques par leur capacité à reconnaître les lipides et les glycolipides présentés par la molécule CD1d (molécule du CMH non classique). Les cellules iNKT semblent être plus enrichies dans le TA que dans la circulation systémique (Lynch et al. 2009). En cas d'obésité, le nombre de cellules iNKT est réduit dans le TA ainsi que dans la circulation périphérique et le foie (Lynch et al. 2012). Cependant, le rôle exact

des cellules iNKT dans l'inflammation liée à l'obésité et l'insulino-résistance n'est toujours pas clair.

Les cellules cytotoxiques naturelles (NK, natural killer)

Les cellules NK s'activent en l'absence de molécules de CMH classe I, en présence de différents ligands associés à des molecules de stress cellulaire et/ou par liaison d'IgG membranaire via CD16/FcγR3 qui est un récepteur activateur (ADCC). Elles exercent une activité cytotoxique, impliquant la libération de protéines cytotoxiques comme la perforine, les granzymes et la granulysine (Bellora, Castriconi, Dondero, Pessino, et al. 2014). L'environnement cytokinique régule le phénotype et la fonction des cellules NK. Une étude récente a décrit la réduction des cellules NK chez les patients obèses (Laue et al. 2015). Il a été montré chez la souris qu'en absence de LT et B, les cellules NK étaient capables de produire l'IFN-γ et le TNF-α entraînant le recrutement de macrophages dans le TA pendant l'obésité (Duffaut, Galitzky, et al. 2009). De plus, l'ablation des cellules NK réduit l'infiltration des macrophages du TA (O'Rourke et al. 2014). Enfin, un régime alimentaire riche en matières grasses augmente la production d'IFN-γ par les NK du TA (Wensveen et al. 2015). Chez l'homme, les cellules NK du TA des sujets obèses ont un phénotype activé (O'Rourke et al. 2013) et les cellules NK périphériques des sujets obèses ont une capacité altérée à éliminer les cellules tumorales in vitro (O'Shea et al. 2010). Ce phénomène semble être réversible après la perte de poids (Moulin et al. 2011). De plus, chez la souris, le phénotype des cellules NK lié à l'obésité a été normalisé après transfert adoptif chez les animaux maigres (Lautenbach et al. 2009). Globalement, ces données suggèrent que l'obésité peut induire la production de facteurs conduisant à une altération du phénotype et de la fonction des cellules NK (Viel et al. 2017).

Les cellules lymphoïdes innées (ILCs)

Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) sont enrichies dans les tissus d'interface avec l'environnment extérieur, les barrières épithéliales telles que l'intestin, les poumons et la peau (Artis and Spits 2015). Les ILCs sont des producteurs rapides de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires régulatrices en réponse à une production locale de cytokines, une infection pathogène ou une perturbation microbienne commensale (Artis and Spits 2015; Serafini, Vosshenrich, and Di Santo 2015). Plusieurs études ont identifié certaines populations d'ILC dans des tissus non barrières tels que le TA. Bien que ces populations d'ILC associées au TA limitent l'inflammation et contribuent à l'homéostasie métabolique (Brestoff and Artis 2015), on ne connait

pas clairement la contribution des ILC résidant dans les TA à la progression de la pathologie métabolique (O'Sullivan et al. 2016).

Les lymphocytes Tγδ

Les LTγδ relient les réponses immunitaires inflammatoires innées et adaptées (Bonneville, O'Brien, and Born 2010). Dans la périphérie, les cellules Tγδ sont naturellement activées et sécrètent rapidement des cytokines, telles que l'IFN-γ, le TNF-α et l'IL-17a (Tough and Sprent 1998). Des sous-populations spécifiques de LTγδ sont localisées dans les organes et jouent des rôles spécifiques, tels que la protection de l'hôte contre les blessures et les agents pathogènes. Ils sont soit pro- ou anti-inflammatoires, en fonction des stimuli environnementaux (Carding and Egan 2002). Plus récemment, on a observé que les LTγδ sont également présents dans le TA (Zúñiga et al. 2010; Jiang et al. 2014). Après un régime riche en gras à longue durée, il y a une accumulation de LTγδ dans le TA, et ces derniers sont une source principale d'IL-17a, une cytokine qui régule l'adipogenèse et le métabolisme du glucose dans le TA (Zúñiga et al. 2010; Caspar-Bauguil et al. 2005) et exerce une activité pro-inflammatoire.

II. 1. 3. Fonction métabolique du TA

Le TA est un acteur majeur de la régulation métabolique systémique. En tant que réservoir énergétique, le TA conserve la chaleur du corps et contrôle la mobilisation des lipides (Sethi and Vidal-Puig 2007).

Site de stockage des lipides : les adipocytes

Comme décrit précédemment, l'adipocyte est central à l'équilibre métabolique de chaque individu. L'excédent d'énergie est efficacement stocké sous forme de triglycérides (TG) dans le TA par la voie de la lipogenèse. Cependant, le stockage de TG dans les adipocytes augmente la taille des gouttelettes lipidiques, ce qui entraîne une hypertrophie des adipocytes et potentiellement une obésité ultérieure (Tan and Vidal-Puig 2008). En revanche, lors d'une phase de jeûne ou de fortes dépenses énergétiques, les TG stockés dans les adipocytes sont décomposés en glycérol et en acides gras par la voie de lypolyse (Lafontan and Langin 2009). Le glycérol et les acides gras libérés du TA peuvent ensuite être transportés dans le sang jusqu'au muscle, foie et autres organes (Frayn 2002).

Biologie des adipocytes

- Différenciation cellule souche adipeuse/préadipocyte/adipocyte

Le TA est dérivé de cellules mésenchymateuses embryonnaires et contient une population de cellules souches mésenchymateuses, progénitrices des cellules adipocytaires : les cellules souches adipeuses (ASC) (Patricia A. Zuk 2010). Zuk et col. ont confirmé que l'ASC est capable de se différencier en plusieurs types de cellules mésodermiques: adipogéniques, chondrogéniques, ostéogéniques et myogéniques (P. A. Zuk et al. 2001). Dans le TA, une différenciation physiologique conduit à la génération d'adipocytes. L'adipogenèse débute par la détermination et l'engagement vers le lignage adipocytaire des ASC en préadipocytes qui se différencieront en adipocytes (Sarjeant and Stephens 2012b) (Figure 11). Si, in vitro, les différents stades de différenciation sont relativement bien identifiés, il n'existe pas de stratégies phénotypiques permettant de distinguer ASC et pré-adipocytes ex vivo.

Si la différenciation en adipocytes est attendue dans le TA, la conversion du TA en os calcifié a été observée dans plusieurs maladies, y compris le lupus, la nécrose de la graisse sous-cutanée (Shackelford, Barton, and McAlister 1975) et la maladie de Paget (Clarke and Williams 1975).

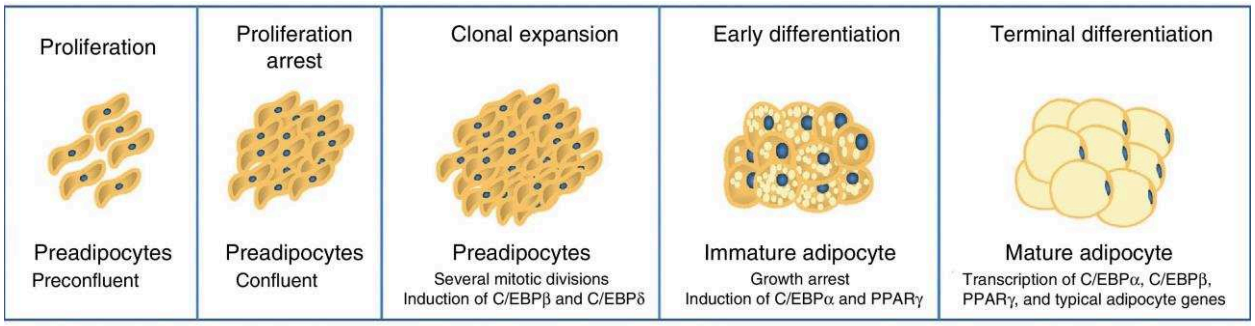


Figure 12. Différenciation des pré-adipocytes en adipocytes.

Processus de transition, du pré-adipocyte à l'adipocyte mature, y compris les différentes étapes (Esteve Ràfols, 2014).

- Modification des adipocytes matures selon le contexte métabolique

Dans les contextes de suralimentation, il existe deux mécanismes principaux d'élargissement du TA: l'hyperplasie (augmentation du nombre de cellules) et l'hypertrophie (augmentation de la taille de la cellule) (Jo et al. 2009). L'obésité du TA est influencée par le régime alimentaire et la génétique. Ces mécanismes sont physiologiques aux premiers stades du développement des TA (Drolet et al. 2008; Spalding et al. 2008) et peuvent constituer un mécanisme sain d'augmentation des capacités de stockage de matières grasses (Zeve, Tang, and Graff 2009). Dans les contextes d'obésité, l''hypertrophie survient avant l'hyperplasie pour fournir une capacité supplémentaire de stockage des graisses (Faust et al. 1978). Les limites d'expansion sont basées sur de multiples

facteurs, comme par exemple l'hypoxie (Halberg et al. 2009) ce qui va aboutir à des adipocytes dysfonctionnels.

II. 1. 4. Fonctions endocriniennes : les adipokines

Le TA est aussi un organe métabolique actif présentant une forte activité endocrinienne, c'est-à-dire la capacité de sécréter une variété de peptides bioactifs, appelées adipokines. Les adipokines sont des molécules de nature protéique, peptidique et lipidique à activité autocrine, paracrine et endocrine. Ces facteurs, sont capables d'influencer les comportements, la régulation énergétique, l'oxydation des lipides, la fonction immune, les fonctions vasculaires, la situation hormonale et ont des activités pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. La production ou la sécrétion déréglée de ces adipokines dues à un dysfonctionnement du TA peut contribuer à la pathogenèse des complications liées à l'obésité.

L'adiponectine et la leptine sont les adipocytokines les plus abondamment et les plus spécifiquement produites par les adipocytes.

- L'adiponectine présente des propriétés métaboliques et immunologiques. Elle est retrouvée à des concentrations élevées dans le sérum humain (5-10 mg par mL, par rapport à la leptine, qui circule à une concentration de quelques ng par mL) et possède une large gamme d'activités biologiques (Fantuzzi 2005). Les taux sériques d'adiponectine sont nettement diminués chez les personnes atteintes d'obésité viscérale et les insulino-résistants (Arita et al. 1999). L'adiponectine induit également la production de cytokines anti-inflammatoires importantes, telles que IL-10 et l'antagoniste des récepteurs de IL-1 (IL-1RA), par des monocytes humains, les macrophages et des cellules dendritiques (DC) et supprime la production d'IFN-γ par des macrophages humains stimulés par le LPS (Wolf et al. 2004).

- Contrairement à l'adiponectine, la leptine est considérée comme une cytokine pro-inflammatoire et elle a une similarité structurelle avec d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-12. La fonction principale de la leptine est le contrôle de l'appétit (Cava and Matarese 2004). Les souris avec une mutation dans le gène codant pour la leptine (souris ob/ob) ou le gène codant pour le récepteur de la leptine (souris db/db) sont utilisées dans de nombreuses études comme modèles d'obésité. Cependant, ces souris ont également divers défauts de l'immunité cellulaire et humorale (Mandel and Mahmoud 1978; Lord et al. 1998; Y. Zhang et al. 1994).

Diverses autres cytokines produites par le TA ont été caractérisées telles que le TNF-α, l'IL-6, l'IL-1 et le ligand CC-chimiokine 2 (CCL2, également connu sous le nom de MCP-1). D'autres facteurs solubles sont aussi produits : les médiateurs du processus de coagulation, tels que l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène type 1; certains facteurs du complément (Wellen and

Hotamisligil 2005). Chacun de ces facteurs participe également aux réponses immunitaires et bien que certains d'entre eux soient également produits par des adipocytes, ils ne sont généralement pas considérés comme des adipocytokines.

II.1.5. Caractérisation immunologique du TA

Dès les années 1990, l'adipsine sécrétée par les adipocytes s'est révélée être identique au facteur D du complément révélant le potentiel immunologique du TA (Cook et al. 1985). Le lien étroit entre TA et système immunitaire est aujourd'hui clairement démontré par la production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires au sein du TA mais aussi par la présence de cellules de l'immunité au sein de la FSV. Tout comme les fonctions endocrines, la composante immunologique est aussi grandement modifiée par le contexte métabolique et participe à l'installation des perturbations métaboliques au sein du TA.

II. 1. 5. a. Cytokines pro et/ou anti-inflammatoires

A l'état basal, les TA sécrètent un petit nombre de facteurs anti-inflammatoires, tels que l'adiponectine et SFRP5 (Ouchi et al. 2011). A l'inverse, dans les contextes d'obésité, la production d'adipokines pro-inflammatoires est bien documentée (Figure 12).

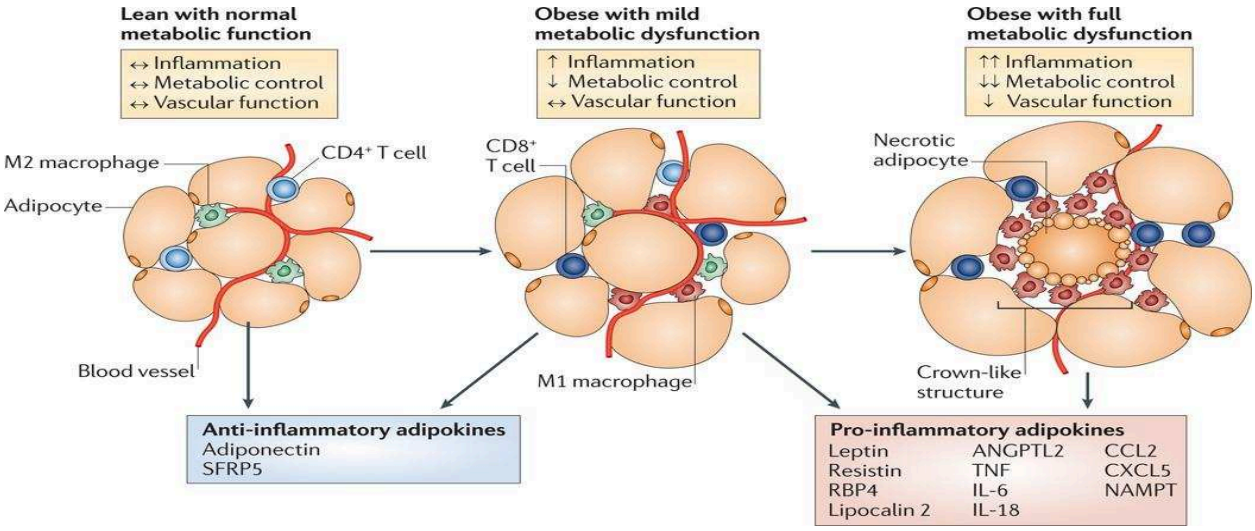


Figure 13. Modulation du profil inflammatoire du tissu adipeux au cours de l'obésité
Les adipokines anti-inflammatoires, y compris l'adiponectine, sont préférentiellement produites par le TA maigre. Au cours de l'obésité, le TA sécrète de grandes quantités d'adipokines pro-inflammatoires, y compris la leptine, la résinine, le TNF, l'IL-6, IL-18 (Ouchi et col. 2011).

Ces adipokines pro-inflammatoires produites par les cellules immunitaires sont principalement le TNF-α, l'IL-6, l'IL-1β, MCP-1, …. Plusieurs autres adipokines pro-inflammatoires ont été

récemment identifiées telle que la résistine, la protéine 4 liant le rétinol (RBP4), la lipocaline 2, IL-18, angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2).

II. 1. 5. b. Fonctions immunitaires des cellules du TA

Très bien étudiée dans le contexte de la régulation des adipocytes, l'activité immunitaire propre des cellules immunitaires du TA reste mal connue. C'est curieusement l'activité anti-infectieuse des adipocytes qui est caractérisée dans la littérature. Des données récentes montrent que les adipocytes expriment les molécules de CMH de classe II, leur conférant ainsi une capacité de présentation d'antigène aux LT CD4+. Les adipocytes constituent alors une population de cellules présentatrice d'antigène, pouvant activer les LT CD4+ et induire la secrétion de l'IFN- γ (Xiao et al. 2016). L'expression du CMH II sur les adipocytes est augmentée au cours de l'obésité. Un autre rôle récemment décrit, qui est tout aussi surprenant, est la capacité des adipocytes à sécréter au niveau de la peau des peptides antimicrobiens, conférant une protection contre l'infection par le Staphylococcus aureus (L. Zhang et al. 2015).

II. 1. 5. c. Interaction entre environnement adipeux et cellules immunitaires.

L'immunométabolisme est une discipline émergente qui étudie le lien entre immunité et métabolisme. Cette discipline regroupe deux domaines d'étude : le premier étudie les effets des cellules immunitaires sur les fonctions métaboliques et les organes qui régulent le métabolisme du corps entier, comme le TA et le foie. Le second explore le rôle des voies métaboliques au sein des cellules immunitaires et la façon dont elles régulent la réponse immunitaire. Des voies métaboliques distinctes sont utilisées en fonction des besoins métaboliques de chaque cellule (Pearce and Pearce 2013). Les LT « mémoires » ou « naifs » ont un métabolisme très différent de leurs homologues « effecteurs ». Les cellules au repos n'utilisent pas de glycolyse aérobie, mais s'appuient sur l'oxydation mitochondriale des acides gras pour leur développement et persistance (Van Der Windt et al. 2012). A l'inverse, les cellules effectrices qui ont de forts besoins énergétiques privilégient la glycolyse aérobie. Indépendamment des voies énergétiques mobilisées par les LT, les ressources en lipides ou glucides doivent être disponibles et vont probablement moduler les réponses immunitaires. La qualité des réponses immunitaires se développant dans le TA et l'influence de l'environnement adipeux restent à mieux définir.

II. 1. 5. d. Différence entre tissu adipeux sous-cutané et viscéral.

Les études différencient les propriétés métaboliques et immunologiques du TA en fonction de sa localisation. Il est décrit que le TAV possède un potentiel plus important de sécrétion de cytokines

pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF-α et de CRP et d'adiponectine (Weisberg et al. 2003; Lemieux et al. 2001; Motoshima et al. 2002).

Le TAV contient un plus grand nombre d'adipocytes larges par rapport au TASC. Les adipocytes du TAV sont plus actifs métaboliquement, plus sensibles à la lipolyse et plus résistants à l'insuline que les adipocytes du TASC. Métaboliquement le TAV a une plus grande capacité à générer des acides gras libres et à absorber le glucose que le TASC et est plus sensible à la stimulation adrénergique, tandis que SCAT est plus avide dans l'absorption des acides gras et des triglycérides libres en circulation. (Marin et al. 1992 ; Misra and Vikram 2003). Toutes ses différences nous ont conduits à traiter séparément les deux types de tissus.

II. 2. Pathologies métaboliques liées au tissu adipeux

II. 2. 1. L'obésité

L'obésité représente l'un des cinq risques majeurs de morbidité dans les sociétés modernes. L'augmentation dramatique de l'incidence de l'obésité pourrait se traduire, pour la première fois dans l'histoire récente, par une diminution de l'espérance de vie en raison de nombreux troubles comorbides associés (Olshansky et al. 2005). L'obésité augmente significativement le risque de développer un diabète de type 2, de l'hypertension, des maladies coronariennes, la stéatose hépatique et plusieurs types de cancers (Blüher 2009; Hofbauer and Nicholson 2006; Kahn, Hull, and Utzschneider 2006).

Les résultats récents démontrent que l'obésité est étroitement associée à une inflammation systémique chronique stérile ou métainflammation (inflammation métabolique). La production de cytokines par le TA en expansion est centrale au développement de l'obésité. Des taux sériques élevés de cytokines pro-inflammatoires (telles que le TNF-α et l'IL-6) sont observés chez les sujets obèses (G S Hotamisligil, Shargill, and Spiegelman 1993). Par la suite, ces stimuli inflammatoires élevés induisent l'activation des voies IKKβ/NFκB et JNK, qui régulent négativement l'action de l'insuline dans les adipocytes et les hépatocytes (Shoelson, Lee, and Goldfine 2006). Il a été proposé que les réponses inflammatoires du TA puissent jouer un rôle causal dans l'insulino-résistance induite par l'obésité. Il est à noter que, dans les premiers stades de l'obésité, l'expression des gènes inflammatoires est sélectivement induite dans les TA et non dans les autres organes métaboliques que sont le foie et le muscle squelettique (Y. S. Lee et al. 2011).

II. 2. 2. Les lipodystrophies (congénitales)

La lipodystrophie congénitale est une maladie autosomique récessive rare qui se manifeste par, l'absence de graisse sous-cutanée, une hypertrophie musculaire et une résistance à l'insuline (Friguls et al. 2009). La maladie apparaît dans la petite enfance avec une croissance linéaire

accélérée, un vieillissement rapide des os et un grand appétit et une insulino-résistance (Capeau et al. 2010).

II. 3. Altération du tissu adipeux au cours de l'infection par le VIH

L'infection par le VIH s'accompagne de troubles métaboliques et/ou de redistribution de la masse graisseuse. Le HALS (highly active antiretroviral therapy-associated lipodystrophy) est un trouble de la redistribution du TA classiquement décrit chez les patients infectés traités qui se caractérise par une lipoatrophie du TA sous-cutané, incluant parfois une hypertrophie du TA viscéral et l'accumulation de graisse dans la partie dorso-cervicale (bosse de bison). Cette lipodystrophie est aujourd'hui moins fréquente, l'action délétère de certains antirétroviraux de première génération ayant été clairement établie. Mais l'infection par le VIH-1 et les protéines virales codées par le VIH-1 contribuent aussi aux altérations du TA par leurs effets sur la biologie des adipocytes ou indirectement par la promotion de l'inflammation locale dans le TA (Giralt, Domingo, and Villarroya 2011a).

II. 3. 1. Impact direct de l'infection par le VIH

Des études suggèrent que l'infection par le VIH affecte le TA avant même la mise sous ARV. Plusieurs études rapportent que la sévérité de l'infection par le VIH s'associe à une prévalence accrue de lipodystrophie (Jacobson et al. 2005; Grinspoon and Carr 2005). L'impact de l'infection sur le TA pourrait être indirect et lié à l'inflammation induite par l'infection. Il a été montré que le TNF-α, cytokine pro-inflammatoire augmentée chez les patients infectés, altère la différenciation et la fonction adipocytaire par l'inhibition de l'expression de PPAR-γ (Jean-Philippe Bastard et al. 2006). En conséquence, l'expression de PPAR-γ est réduite dans la graisse de patients naïfs de traitement (Boothby et al. 2009; Giralt et al. 2006) par rapport aux témoins non infectés. L'inflammation chronique et persistante observée pourrait aussi affecter les propriétés immunologiques du TA et perturber l'équilibre immunométabolique du TA. Par ailleurs, des études in vitro et in vivo ont permis de caractériser les altérations métaboliques (dyslipidémie, insulino-résistance, stéatose hépatique) et immunologiques induites par les protéines virales du VIH : Tat, Vpr, Nef (Neeti Agarwal et al. 2013; Beaupere et al. 2015). Les protéines virales semblent exercer une activité anti-adipogénique par co-répression de PPAR-γ. Fait intéressant, les protéines Tat et Nef du VIH favorisent la sénescence des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine et modifient la différenciation ostéoblastique. (Beaupere et al. 2015).

II. 3. 2. Impact des ARV

L'utilisation des premières trithérapies a induit une fréquence importante de lipodystrophies. Avec l'évolution des molécules utilisées en trithérapie, les formes lipoatrophiques sont moins représentées mais une lipodystrophie associée à une accumulation du TASC et/ou du TAV au niveau abdominal persiste. Les mécanismes de toxicité des antirétroviraux sont relativement bien connus : dysfonction mitochondriale, perturbation de la différenciation adipocytaire, lipolyse adipocytaire élevée et apoptose des adipocytes. L'intensité et la nature de la toxicité dépendent des classes d'ART utilisés. Deux classes d'ART jouent un rôle majeur dans le développement de lipodystrophie acquise liée au VIH :

Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Il existe deux types d'inhibiteurs de la transcriptase inverse : les analogues nucléosidiques (INTI) et non nucléosidiques (INNTI). Les INTI (et en particulier ceux de la première génération, les analogues de la thymidine (stavudine et zidovudine)) ont des effets délétères sur le TA (Caron-Debarle et al. 2010; Caron et al. 2008). Ils induisent une toxicité mitochondriale, l'apoptose des adipocytes et une altération de la lipogenèse (El Hadri et al. 2004; Caron et al. 2007). Ils ont été associés à la lipoatrophie du TASC. Les molécules de deuxième génération comme le Ténofovir (INTI pour nucléotidique) ont une incidence plus faible sur les lipodystrophies (Caron et al. 2007) et donc des effets moins marqués sur le TA.

Les inhibiteurs de protéase (IP)

Les IPs sont aussi responsables de perturbations métaboliques observées chez les patients lipodystrophiques : insulino-résistance, diminution d'adiponectine et de leptine, augmentation de la lipolyse du TA responsable d'une dyslipidémie (Caron et al. 2007; Giralt, Domingo, and Villarroya 2011a; Lagathu et al. 2007). Ils altèrent également l'adipogenèse en ayant une action délétère à la fois sur les pré-adipocytes (Dowell et al. 2000) et sur les cellules souches mésenchymateuses (Hernandez-Vallejo et al. 2013) et induisent l'apoptose des adipocytes (Dowell et al. 2000).

Les autres classes d'ART

D'autres classes d'ART existent parmi lesquels les inhibiteurs d'intégrase (raltégravir, dolutégravir) et les inhibiteurs d'entrée et de fusion. Le raltégravir ne semble pas avoir d'impact sur l'adipogenèse ou sur le métabolisme du TA (Pérez-Matute et al. 2011) mais ses effets à long terme sont encore mal connus. Les effets du dolutégravir sur le TA ne sont pas décrits.

Aujourd'hui, la majorité des patients infectés par le VIH est traitée par une trithérapie composée de Ténofovir et emtricitabine (soit 2 INTI) associée à un inhibiteur d'intégrase (Dolutégravir ou Raltégravir). Cette combinaison semble présenter des effets plus limités sur le métabolisme lipidique (Boothby et al. 2009).

II. 3. 3. Le tissu adipeux site d'infection par le VIH ?

L'impact de l'infection par le VIH sur le TA a conduit à rechercher la présence du virus dans ce tissu. Les données concernant la capacité du VIH à infecter le TA sont peu nombreuses et très hétérogènes. Dans un premier travail, Hazan et col. ont démontré que les adipocytes expriment le récepteur CD4 et les récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CCR5 (Hazan et al. 2002). Ils en concluaient que les adipocytes étaient donc des cibles potentielles du VIH. Ils ont aussi démontré que les pré-adipocytes peuvent être infectés in vitro mais de façon peu efficace par le VIH-1 (Hazan et al. 2002). Une deuxième étude a été menée à partir d'échantillons de lysats adipocytaires chez des patients infectés par le VIH présentant des lipodystrophies. L'ADN proviral a été détecté chez deux patients sur 18 analyses. Les auteurs concluaient que le VIH ne se réplique pas et n'intègre pas le génome dans le TA chez ces patients. Hazan et col.; ont réévalué la capacité d'infection des pré-adipocytes primaires humains et concluent que le VIH-1 ne peut pas infecter le TA in vitro (Munier et al. 2003). A l'inverse, les résultats de Casteilla en 2005 démontrent que le VIH-1 peut infecter les cellules adipeuses humaines in vitro et que l'infection productive peut être favorisée par un traitement de cytokines pro-inflammatoires (Maurin et al. 2005). Etonnamment toutes ces études se sont focalisées sur une seule composante du TA qui est les adipocytes et n'étudient pas les macrophages et les LT résidents, cibles classiques du VIH (Maurin et al. 2005). Bien que le VIH ne semble pas infecter de façon productive les cellules adipeuses, les adipocytes pourraient absorber et séquestrer des virions du VIH ou d'autres protéines solubles (telles que Vpr, Nef et Tat) perturbant l'homéostasie adipeuse. En effet, il a été démontré que les protéines virales du VIH Vpr et Nef sont présentes dans le tissu adipeux, elles induisent un recrutement macrophagique et ont un impact négatif sur l'homéostasie adipeuse en augmentant et en modifiant l'expression de PPARγ (Neeti Agarwal et al. 2013, 2013; Otake et al. 2004). Ces observations fournissent une bonne raison pour reconsidérer l'impact de l'infection par le VIH sur le tissu adipeux en mettant l'accent sur les cellules immunitaires plutôt que sur les adipocytes.

II. 4. Microbes et tissu adipeux

En raison de son association étroite avec l'intestin, le TA omental viscéral et les dépôts mésentériques adipeux pourraient être beaucoup plus enclins à l'infiltration bactérienne par rapport aux autres dépôts adipeux.

II. 4. 1. Infection du tissu adipeux

Comme le résume le tableau 2, la présence de bactéries, de parasites et de virus a été démontrée dans le TA humain et murin. Les cibles cellulaires de ces infections au sein du TA et leur impact sur la physiologie et le métabolisme adipeux sont spécifiques aux différents agents pathogènes. Les pathogènes parasitaires (Trypanozoma cruzi) ou bactériens tels que Mycobacterium tuberculosis, Rickettsia prowazekki, Staphylococus. aureus, C. pneumoniae et Enterococus faecalis peuvent être séquestrés par des adipocytes humains et murins, entraînant généralement une production de cytokines pro-inflammatoires ou une dérégulation des fonctions adipocytaires. Rickettsia prowazekki, S. aureus et C pneumoniae peuvent se répliquer dans les lignées de cellules adipocytaires murines 3T3-L1.

Puisque les macrophages constituent une fraction significative de la FSV du TA, Mycobacterium tuberculosis est un agent pathogène attendu dans le TA. Mycobacterium tuberculosis peut en outre infecter les adipocytes humains et murins en se liant à des récepteur scavenger adipocytaires (Neyrolles et al. 2006; P. Agarwal et al. 2014): la bactérie s'accumule dans les gouttelettes lipidiques et persiste dans un état latent (P. Agarwal et al. 2014; Neyrolles et al. 2006).

L'absorption microbienne par les adipocytes a également été démontrée pour T. cruzi chez la souris et chez l'homme et E. faecalis chez les patients humains atteints de colite ulcéreuse ou de la maladie de Crohn (Cencig et al. 2011; Combs et al. 2005; Zulian et al. 2013). CD36, un récepteur scavenger, est exprimé par les adipocytes et permet également la séquestration intracellulaire de ce germe (Franke-Fayard et al. 2005).

En ce qui concerne les virus, il a été montré que le virus de la grippe, le cytomégalovirus, le virus syncytial respiratoire et l'adénovirus infectaient les adipocytes et augmentent la production de cytokines pro-inflammatoires (Bouwman et al. 2008). A la différence des autres microbes, l'adénovirus 36 augmente l'adipogenèse et l'expression de gènes lipogéniques par des adipocytes humains et murins.

Microbe	Hôte	Fraction cellulaire du TA	Méthode de détection / Etude *in vitro*	Maladie associée	Ref
Adénovirus 36	Humain Macaques rhésus	TA total TA total	ADN Ad36 par PCR niché ADN Ad36 par PCR niché	Dépot massif de TA dans le thorax et l'abdomen Obésité	(Salehian et al. 2010) (Dhurandhar et al. 2002)
Enterococus faecalis	Humain	TA total	Microscopie confocale Infection directe des pré-adipocytes et adipocytes matures	Colite ulcérative Maladie de Crohn	(Zulian et al. 2013)
Mycobacterium tuberculosis	Souris Humain	Adipocyte mature et SVF du TA TA total Adipocytes	Microscopie confocale Infection directe *ex vivo* des adipocytes primaires murins PCR conventionnelle Infection directe des adipocytes humains	Tuberculose/TB latent Tuberculose/TB latente	(P. Agarwal et al. 2014) (Neyrolles et al. 2006)
Plasmodium Berghei	Souris, Rat	TA total	Imagerie *in vivo*	Malaria cérèbrale	(Franke-Fayard et al. 2005)
Rickettsia prowazekii	Souris	Ta total	ADN bactérien par PCR Immuno-histochimie	Maladie de Brill-Zinsser/ Typhus exanthématique	(Bechah et al. 2010)
Trypanosoma cruzi	Souris Souris	TA total TA brun et TA blanc	ADN parasitaire par RT-PCR ADN parasitaire par RT-PCR Infection directe de la lignée adipocytaire 3T3-L1	Maladie de Chagas	(Cencig et al. 2011) (Combs et al. 2005)

Tableau 3. Tableau récapitulatif des pathogènes détectés dans le TA.
Le tableau liste les pathogènes identifiés dans le TA en indiquant la fraction cellulaire dans laquelle il est retrouvé, la méthode de détection utilisée et les pathologies associées à cette infection.

La nature des réponses immunitaires induites suite à ces infections locales reste mal connue. Le rôle des réponses par les LT n'est pas clair : les analyses clonotypiques des TCR des LT du TA de souris obèses indiquent une diversité relativement limitée par rapport aux TCR des LT spléniques, ce qui suggère que la charge microbienne n'est pas un médiateur important de la migration et/ou accumulation des LT du TA (Yang et al. 2010). Les adipocytes expriment les TLRs qui induisent une réponse inflammatoire lors de l'exposition à des ligands microbiens. Le LPS (un agoniste du TLR4), par exemple, augmente la sécrétion de cytokines inflammatoires et de chimiokines, induit une lipolyse et bloque l'adipogenèse chez les adipocytes humains et murins (Kopp et al. 2009).

II. 4. 2. Microbiote du tissu adipeux

L'impact du microbiote intestinal sur les fonctions métaboliques a d'abord été identifié en comparant des souris conventionnelles à d'autres exemptes de germes, soumises à un régime riche en matières grasses (Bäckhed et al. 2004). Alors que les souris conventionnelles prennent du poids, les souris dépourvues de germes restent maigres, bien que leur consommation quotidienne d'aliments soit considérablement augmentée (Bäckhed et al. 2004). Le rôle causal du microbiote intestinal dans le développement d'atteintes métaboliques a ensuite été démontré par des expériences de transfert de microbiote chez des souris dénuées de germe. Le gain de poids corporel a été plus important lorsque les souris sans germe ont été colonisées avec du microbiote provenant de souris obèse plutôt que d'une souris maigre (Turnbaugh et al. 2006). Il a été démontré par la suite que les patients obèses étaient caractérisés par une dysbiose du microbiote intestinal où la proportion des phylas principaux (Firmicutes et Bacteroidetes) a été modifiée en faveur d'un excès de Firmicutes par rapport aux témoins maigres (Ley et al. 2005). Fait important, cette dysbiose a été inversée lorsque les patients obèses ont été soumis à des restrictions caloriques pendant plusieurs mois. Il est intéressant de noter que les souris ob / ob ont montré une dysbiose intestinale similaire (Ley et al. 2006). Au-delà du microbiote intestinal, des données plus récentes proposent l'existence de microbiote spécifique de tissu, tels que le foie et le tissu adipeux. Cette notion de microbiote spécifique du tissu adipeux, probablement très liée au microbiote intestinal, reste à mieux étudier (Burcelin et al. 2013).

III. Objectifs du travail de thèse

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est aujourd'hui une maladie chronique. En effet, les ARV ne parviennent pas à éradiquer totalement le virus qui reste présent dans des sites anatomiques ou cellulaires appelés "réservoirs". Cette persistance virale est aussi associée à une inflammation chronique à bas-bruit, responsable de la majorité des comorbidités associées au VIH (pathologies cardiovasculaires, incidence de cancers,…etc). Si l'éradication du virus semble un objectif difficilement accessible, réduire la taille des réservoirs et/ou l'inflammation chronique sont des objectifs thérapeutiques actuellement considérés. Les mécanismes (et sites) de persistance virale, tout comme les mécanismes d'inflammation chronique sont multiples et complexes et ne sont probablement pas totalement identifiés.

Le tissu adipeux nous a semblé être un candidat intéressant autant pour l'aspect "réservoir" que pour la partie pro-inflammatoire pour plusieurs raisons. C'est un tissu relativement important en poids, réparti dans tout l'organisme et qui est riche en LT CD4+ et macrophages, les cibles classiques du VIH. Il constitue de ce point de vue, un réservoir potentiel pour le VIH et ce d'autant plus qu'il est positionné (pour le TA viscéral) à proximité de la muqueuse intestinale, une cible principale du virus. D'autres éléments de réflexion nous ont semblé importants : (a) le lien historique entre TA et VIH, bien que principalement lié aux effets secondaires des ARV a renforcé notre intérêt pour ce tissu. En effet, la littérature montre un effet spécifique du virus sur le TA, indépendamment des ARV ; (b) le TA est aussi décrit comme un site de persistance pour certains agents pathogènes. Ces éléments nous ont conduits à envisager le TA comme un site d'infection ; (c) une autre particularité du TA est son fort potentiel pro-inflammatoire, particulièrement bien décrit dans les contextes d'obésité. Si le TA adipeux sain (au sens non obèse) est peu inflammatoire, les perturbations métaboliques (liées par exemple à un régime riche en graisse) ou immunologiques (injection de LPS) conduisent à la sécrétion d'une grande variété de cytokines pro-inflammatoires et à l'infiltration de cellules de l'immunité à potentiel pro-inflammatoire. La littérature indique que l'IL-6 détectée dans le plasma est originaire au moins pour un tiers de la production du TA (Weisberg et al. 2003). Le TA constitue donc un tissu pro-inflammatoire dont l'influence au cours de l'infection par le VIH sur l'établissement de l'inflammation chronique systémique reste à mieux définir. Cet aspect est aussi conforté par la littérature abondante dans le domaine du métabolisme qui démontre la perturbation des fonctions métaboliques du TA par le virus. Il est clair que le TA est un tissu largement affecté au cours de l'infection chronique, notamment dans son activité métabolique. Nous avons posé l'hypothèse que le TA pourrait du fait

(a) de la présence in situ du virus, (b) des perturbations métaboliques associées à l'infection et/ou aux ARV, (c) de l'inflammation aiguë puis de l'inflammation chronique persistante, présenter des altérations significatives de son potentiel inflammatoire et participe en retour à l'inflammation chronique systémique.

Nous avons donc souhaité réaliser une caractérisation virologique et immunologique du TA. Les questions que nous nous sommes posées sont :

- Est-ce que le tissu adipeux est un site de persistance du VIH ? Peut-il constituer un réservoir anatomique ?

Pour aborder cet aspect, nous avons utilisé un modèle d'infection chronique par le SIV chez le macaque cynomolgus. Cette stratégie nous permet de collecter du TA viscéral et sous-cutané d'animaux infectés durant la phase chronique. Ces animaux sont infectés et virémiques et nous ont permis de confirmer la présence de virus au sein des fractions LT CD4+ et macrophages du TA Cette étape était un pré-requis crucial pour mettre en place une étude équivalente chez des patients infectés par le VIH mais sous traitement efficace.

Les questions secondaires visaient à confirmer la qualité de « réservoir » du TA en utilisant des stratégies de réactivation ex vivo des cellules infectées, mais aussi à évaluer l'importance quantitative de ce réservoir par rapport aux réservoirs précédemment décrits.

- Quelle est la contribution du tissu adipeux en tant que source locale d'inflammation chronique résiduelle ?

Nous avons posé l'hypothèse que l'infection par le VIH pouvait particulièrement affecter le TA et notamment induire à une activité très pro-inflammatoire qui pourrait contribuer à la persistance virale et à l'inflammation chronique systémique. Nous avons comparé les concentrations de cytokines dans les extraits de TA et dans le sérum de singes infectés et non infectés par le SIV. D'autre part, nous avons caractérisé dans le modèle cynomolgus, puis chez l'homme, la FSV et recherché l'éventuel impact de l'infection sur les sous-populations immunitaires du TA potentiellement impliquées dans l'inflammation. Les premières études ont porté sur les fractions LT CD4+ et les macrophages.

Cette première partie de l'étude nous a permis d'identifier le TA comme un site de persistance virale chez le macaque infecté virémique et chez les patients infectés par le VIH, traités et présentant une charge virale plasmatique indétectable. Dans le même temps, nous avons observé une faible perturbation du compartiment des LT CD4 du TA dans le modèle macaque et chez les

patients infectés contrôlant le virus sous traitement. Dans la continuité de ces travaux, nous avons posé l'hypothèse d'une faible activité immunitaire dans le TA, favorisant la persistance du virus.

- Quels sont les mécanismes qui pourraient favoriser la persistance du VIH/SIV dans le tissu adipeux chez les patients infectés traités efficacement ?

Différents mécanismes, non mutuellement exclusifs, pourraient favoriser la persistance du virus. Trois mécanismes nous semblent importants à évaluer : (a) Un mécanisme métabolique : le TA pourrait favoriser la latence du virus au sein des cellules infectées. (b) Un mécanisme immunologique : le TA présente soit de manière intrinsèque ou du fait de l'infection in situ, une faible capacité de réponses immunitaires et donc une faible capacité à éliminer le virus. (c) Un élément pharmacologique : la persistance du virus dans le TA malgré la mise sous traitement pourrait être liée à une faible diffusion des ARV. C'est plus particulièrement les mécanismes immunologiques que j'ai étudiés. Au vu de nos résultats chez le macaque montrant d'une part une stabilité du compartiment LT CD4+ dans le TA au cours de l'infection, et d'autre part la faible colocalisation des LT CD4+ et LT CD8+ dans le TA, nous avons souhaité mieux caractériser les fractions LT CD4+ du TA. Ces cellules sont en effet cibles du virus mais aussi cellules effectrices dans le TA de sujets infectés ou non par le VIH.

Résultats

“ La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance.”

Claude Bernard

RESULTATS

Article 1

Damouche A. et al. Adipose tissue is a neglected viral reservoir and an inflammatory site during chronic HIV and SIV infection. **PLOS Pathogens**, 2015 Sep 24;11(9):e1005153.

Réponse aux évaluateurs lors de la soumission à Plos Pathogens.

Article 2

Damouche A. et al. A high proportion of PD-1 expressing CD4 T cells in adipose tissue constitutes an immunomodulatory microenvironment that may favour HIV persistence. **Eur Journal of immunology**, (en révision).

Annexes

Annexe 1. Analyse du potentiel pro- ou anti-inflammatoire du tissu adipeux chez le singe infecté virémique : approche cytokinique.

Annexe 2. Proportion de lymphocytes Tγδ dans le TA de patients infectés ou non par le VIH.

Article 1. Adipose tissue is a neglected viral reservoir and an inflammatory site during chronic HIV and SIV infection. PLOS Pathogens, 2015.

Abstract:

Two of the crucial aspects of human immunodeficiency virus (HIV) infection are (i) viral persistence in reservoirs (precluding viral eradication) and (ii) chronic inflammation (directly associated with all-cause morbidities in antiretroviral therapy (ART)-controlled HIV-infected patients). The objective of the present study was to assess the potential involvement of adipose tissue in these two aspects. Adipose tissue is composed of adipocytes and the stromal vascular fraction (SVF); the latter comprises immune cells such as CD4+ T cells and macrophages (both of which are important target cells for HIV). The inflammatory potential of adipose tissue has been extensively described in the context of obesity. During HIV infection, the inflammatory profile of adipose tissue has been revealed by the occurrence of lipodystrophies (primarily related to ART). Data on the impact of HIV on the SVF (especially in individuals not receiving ART) are scarce. We first analyzed the impact of simian immunodeficiency virus (SIV) infection on abdominal subcutaneous and visceral adipose tissues in SIVmac251 infected macaques and found that both adipocytes and adipose tissue immune cells were affected. The adipocyte density was elevated, and adipose tissue immune cells presented enhanced immune activation and/or inflammatory profiles. We detected cell-associated SIV DNA and RNA in the SVF and in sorted CD4+ T cells and macrophages from adipose tissue. We demonstrated that SVF cells (including CD4+ T cells) are infected in ART-controlled HIV-infected patients. Importantly, the production of HIV RNA was detected by in situ hybridization, and after the in vitro reactivation of sorted CD4+ T cells from adipose tissue. We thus identified adipose tissue as a crucial cofactor in both viral persistence and chronic immune activation/inflammation during HIV infection. These observations open up new therapeutic strategies for limiting the size of the viral reservoir and decreasing low-grade chronic inflammation via the modulation of adipose tissue-related pathways.

PLOS | PATHOGENS

RESEARCH ARTICLE

Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection

Abderaouf Damouche[1,2,3], Thierry Lazure[4☯], Véronique Avettand-Fènoël[5,6☯], Nicolas Huot[7‡], Nathalie Dejucq-Rainsford[8‡], Anne-Pascale Satie[8], Adeline Mélard[5,6], Ludivine David[5,6], Céline Gommet[2], Jade Ghosn[5], Nicolas Noel[1,2,3,9], Guillaume Pourcher[10,11], Valérie Martinez[12], Stéphane Benoist[13], Véronique Béréziat[14,15], Antonio Cosma[1,2,3], Benoit Favier[1,2,3], Bruno Vaslin[1,2,3], Christine Rouzioux[5,6], Jacqueline Capeau[14,15], Michaela Müller-Trutwin[7], Nathalie Dereuddre-Bosquet[1,2,3], Roger Le Grand[1,2,3], Olivier Lambotte[1,2,3,9‡], Christine Bourgeois[1,2,3‡]*

1 Université Paris Sud, UMR 1184, Le Kremlin-Bicêtre, France, **2** CEA, DSV/iMETI, IDMIT, Fontenay-aux-Roses, France, **3** INSERM, U1184, Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases, Le Kremlin-Bicêtre, France, **4** Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service d'anatomo-pathologie, Le Kremlin-Bicêtre, France, **5** Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, EA 7327, Paris, France, **6** Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, Laboratoire de Virologie, Paris, France, **7** Institut Pasteur, Unité HIV, Inflammation et Persistance, Paris, France, **8** INSERM, U1085-IRSET, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, Rennes, France, **9** Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service de Médecine Interne et Immunologie clinique, Le Kremlin-Bicêtre, France, **10** Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Hôpital Béclère, Service de Chirurgie Viscérale Minimale invasive, Clamart, France, **11** INSERM U972, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France, **12** Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Hôpital Antoine Béclère, Service de Médecine Interne et Immunologie clinique, Clamart, France, **13** Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service de Chirurgie générale et digestive, Le Kremlin-Bicêtre, France, **14** INSERM UMR S938, CDR Saint-Antoine; Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, Paris, France, **15** Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Service de Biochimie et Hormonologie; ICAN, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris, France

☯ These authors contributed equally to this work.
‡ NH and NDR contributed equally to this work, and OL and CB contributed equally to this work.
* christine.bourgeois@u-psud.fr

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Damouche A, Lazure T, Avettand-Fènoël V, Huot N, Dejucq-Rainsford N, Satie A-P, et al. (2015) Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection. PLoS Pathog 11(9): e1005153. doi:10.1371/journal.ppat.1005153

Editor: Guido Silvestri, Emory University, UNITED STATES

Received: December 11, 2014

Accepted: August 14, 2015

Published: September 24, 2015

Copyright: © 2015 Damouche et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS, France). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Two of the crucial aspects of human immunodeficiency virus (HIV) infection are (i) viral persistence in reservoirs (precluding viral eradication) and (ii) chronic inflammation (directly associated with all-cause morbidities in antiretroviral therapy (ART)-controlled HIV-infected patients). The objective of the present study was to assess the potential involvement of adipose tissue in these two aspects. Adipose tissue is composed of adipocytes and the stromal vascular fraction (SVF); the latter comprises immune cells such as $CD4^+$ T cells and macrophages (both of which are important target cells for HIV). The inflammatory potential of adipose tissue has been extensively described in the context of obesity. During HIV infection, the inflammatory profile of adipose tissue has been revealed by the occurrence of lipodystrophies (primarily related to ART). Data on the impact of HIV on the SVF (especially in individuals not receiving ART) are scarce. We first analyzed the impact of simian immunodeficiency virus (SIV) infection on abdominal subcutaneous and visceral adipose tissues in SIVmac251 infected macaques and found that both adipocytes and adipose tissue immune

cells were affected. The adipocyte density was elevated, and adipose tissue immune cells presented enhanced immune activation and/or inflammatory profiles. We detected cell-associated SIV DNA and RNA in the SVF and in sorted $CD4^+$ T cells and macrophages from adipose tissue. We demonstrated that SVF cells (including $CD4^+$ T cells) are infected in ART-controlled HIV-infected patients. Importantly, the production of HIV RNA was detected by *in situ* hybridization, and after the *in vitro* reactivation of sorted $CD4^+$ T cells from adipose tissue. We thus identified adipose tissue as a crucial cofactor in both viral persistence and chronic immune activation/inflammation during HIV infection. These observations open up new therapeutic strategies for limiting the size of the viral reservoir and decreasing low-grade chronic inflammation via the modulation of adipose tissue-related pathways.

Author Summary

Chronic immune activation/inflammation and viral persistence in reservoirs are important features of chronic HIV infection—even in patients receiving ART. We sought to evaluate the involvement of adipose tissue in chronic HIV/SIV infections. Adipose tissue accounts for 15 to 20% of the body weight, contains both adipocytes and (within the stromal vascular fraction) immune cells, and exerts crucial metabolic and immune activities. We postulated that adipose tissue might provide an ideal environment for HIV persistence and immune inflammation. We first showed that viremic SIV-infected macaques had elevated levels of immune activation and inflammation in adipose tissue, and that both resident $CD4^+$ T cells and macrophages were infected. In similar experiments in ART-controlled HIV-infected patients, HIV DNA was detected in the stromal vascular fraction of adipose tissue (more specifically, in adipose tissue $CD4^+$ T cells). Replication-competent HIV was detected in *ex vivo*- activated, sorted adipose tissue $CD4^+$ T cells from six aviremic, ART-treated patients. Thus, adipose tissue may constitute a viral reservoir and be involved in long-term immune activation and inflammation—even in ART-suppressed patients. Given that adipose tissue is strongly regulated by both metabolic and immune pathways, modulating adipose tissue may constitute a valuable means of limiting both viral persistence and chronic inflammation in HIV-infected patients even ART-controlled.

Introduction

Human immunodeficiency virus (HIV) infection is characterized by massive $CD4^+$ T cell depletion in the intestinal mucosa (progressively affecting blood and lymphoid $CD4^+$ T cells) and sustained systemic immune activation and inflammation. The advent of antiretroviral therapy (ART) has drastically changed the outcomes of HIV infection by enabling a reduction in the viral load and the restoration (at least in part) of $CD4^+$ T cell counts. In people receiving ART, chronic HIV infection is characterized by the persistence of viral reservoirs (preventing the eradication of HIV) and chronic immune activation and inflammation (which are associated with all-cause, non-AIDS-related morbidity, such as cardiovascular disease and non-insulin dependent diabetes, and mortality [1–3]. Similar observations (i.e. viral persistence and low level immune activation and inflammation) apply–albeit to a lesser extent—to "HIV-controllers", i.e. patients who are able to spontaneously control viral load [4,5]. The eradication or

reduction of viral reservoirs remains a crucial therapeutic objective in the fight against HIV [6], and both cellular and anatomical reservoirs require further investigation [7,8]. A second therapeutic objective is to circumscribe the sustained immune activation. It has been suggested that microbial translocation is a potent factor in the maintenance of chronic immune activation/inflammation [9], along with viral persistence, $CD4^+$ T cell lymphopenia, Th17 loss, a change in the regulatory T cell balance, disruption of the lymph node architecture, viral co-infection, accelerated ageing, the side effects of some antiretroviral drugs, and individual susceptibility [2,10,11]). HIV-infected patients on ART are not always able to reestablish gut mucosa integrity and/or normal $CD4^+$ T cell counts, and chronic, low-levels immune activation appears to persist [12]. Taken as a whole, these data suggest that (i) immune activation and chronic inflammation are driven by multiple factors and (ii) targeting several inflammatory mechanisms may achieve better immune restoration.

We hypothesized that adipose tissue has an important role in both chronic immune activation/inflammation and viral persistence. In fact, adipose tissue is not merely a metabolic and endocrine organ for lipid storage; it also exhibits strong immune activity: (a) adipose tissue is an important site of production of both pro-inflammatory molecules (such as leptin, IL-6, MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5) and TNF-α) and anti-inflammatory adipokines (such as adiponectin) [13–21]; (b) the stromal vascular fraction (SVF) contains immune cells ($CD4^+$ T cells and macrophages) that are potentially important target cells for HIV; and (c) a growing body of evidence demonstrates the close relationship between the immune response and metabolic alterations [22,23], such as the recruitment of activated $CD8^+$ T cells and inflammatory macrophages and their participation in inflammation processes (and then the modifications of the adipose tissue) in obesity and non-insulin dependent diabetes [24–31]. In the context of obesity, the interplay between adipocytes and immune cells is being actively investigated. The two cell types are clearly "partners in inflammation" as their coordinated action leads to adipose inflammation [32]. Studies of the adipose tissue during HIV infection have essentially addressed the toxicity of certain antiretroviral drugs and their induction of metabolic alterations–even though a direct impact of infection *per se* was clearly documented by early studies [33,34]. Metabolic alterations [34–38] and elevated levels of pro-inflammatory cytokines have been described in both plasma and adipose tissue [39–43]. Previous analyses of adipocytes failed to demonstrate that adipocytes could be infected by HIV *in vivo* [44]—in contrast to the results of *in vitro* studies [45–47]. However, it has been shown that the HIV viral proteins Vpr and Nef are present in adipose tissue and have a negative impact on adipose homeostasis [48–50]. These observations provide a strong rationale for reconsidering the impact of HIV infection on adipose tissue by focusing on immune cells rather than adipocytes. We hypothesize that adipose tissue may constitute a neglected partner that drives viral persistence and chronic immune activation via two nonexclusive mechanisms: local infection and the abnormal local activation of immune cells. To assess the putative infection of adipose immune cells more precisely, we first analyzed tissues from chronically SIV-infected macaques. We chose to analyze both subcutaneous adipose tissue (SCAT) and visceral adipose tissue (VAT) because they differ in terms of metabolic activity and immune cell content [14,15,17,51]. Secondly, we extended these analyses to ART-treated HIV-infected patients.

In the present report, we demonstrate that SIV infection is associated with changes in the composition of adipose tissue, such as elevated densities of both adipocytes and stromal vascular cells. Importantly, adipose tissue macrophages and $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells exhibited a more intense activation profile (relative to non-infected animals). Furthermore, SIV DNA and RNA was detected in total SVF and in sorted adipose tissue macrophages and $CD4^+$ T cells. We observed similar results in ART-controlled, HIV-infected patients having undergone elective visceral surgery: their SVF samples were positive for HIV DNA. The presence of infected/

virus-producing cells within adipose tissue was confirmed by the detection of HIV RNA in tissue sections via *in situ* hybridization. Lastly, we performed an *in vitro* reactivation assay on samples from six patients and found that adipose tissue $CD4^+$ T cells were capable of producing replication-competent virus. Taken as a whole, our data show that adipose tissue as a viral reservoir with inflammatory potential.

Results

SIV infection influences the density of adipocytes and stromal vascular cells

We first determined the impact of SIV infection on adipocyte density (as evaluated by microscopy) (Fig 1A). Adipocyte density in both SCAT and VAT was markedly higher in SIV-infected macaques than in non-infected animals (median [interquartile range] number of adipocytes per field in SCAT: 51 [31–90] in infected animals and 17 [13–26] in controls, $p = 0.032$; in VAT: 64 [60–95] in infected animals and 31 [21–32] in controls, $p = 0.0059$) (Fig 1B). We also counted SVF cells harvested from SCAT and VAT in infected and non-infected animals (Fig 1C). To enable a valid comparison, SVF cell counts were expressed per gram of adipose tissue. In line with previous publications [47,52], we found that non-infected animals had significantly higher numbers of SVF cells in VAT than in SCAT ($p = 0.009$). Significantly higher SVF cell counts were detected in SCAT and VAT from infected animals than in non-infected animals ($p<0.05$ for both tissues).

We next determined the proportion of CD45-expressing cells in SVF. $CD45^+$ cells accounted for a small proportion of SVF cells in both SCAT and VAT recovered from non-infected animals. In animals with chronic SIV infection, we observed significantly lower percentages of $CD45^+$ cells in SCAT SVF (relative to non-infected animals) (Fig 1D). A similar trend was detected in VAT. To determine whether these lower percentages of $CD45^+$ cells reflected a fall in $CD45^+$ cell numbers or the recruitment/expansion of $CD45^-$ cells, we analyzed the absolute $CD45^+$ cell count. As shown in Fig 1E, groups of infected and non-infected animals did not differ significantly in terms of the number of $CD45^+$ cells recovered from SCAT or VAT; this was suggestive of changes in the numbers of $CD45^-$ cells. We thus demonstrated that chronic SIV infection modulated both adipocyte and SVF cells. In the latter cell population, the quantitative alteration essentially concerned $CD45^-$ cells.

SIV infection influences the characteristics of adipose tissue T lymphocytes

We next looked at whether or not SIV infection was associated with changes in the percentages of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes within adipose tissue. To this end, we determined the percentage of total T lymphocytes among CD45-expressing cells and the percentages of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes among CD3-expressing cells (Fig 2). Adipose tissue T lymphocytes accounted for approximately half of the $CD45^+$ cells within the SVF; SIV-infected and non-infected animals did not differ significantly in terms of the proportion and number of $CD3^+$ cells (Fig 2A).

However, SIV infection was associated with differences in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell relative percentages (Fig 2B and 2C). The proportion of $CD4^+$ T cells was significantly lower in SIV-infected macaques (17.6% [8.9–25] in SCAT, and 20.4% [11.0–28.0] in VAT) than in non-infected animals (40.0% [26.4–49.0] in SCAT, and 39.8% [23.6–48.7] in VAT; $p = 0.0043$ for SCAT, $p = 0.0317$ for VAT). Conversely, $CD8^+$ T cell percentages were significantly higher in infected animals. The low $CD4^+$ T cell percentages may reflect the $CD4^+$ T cell depletion

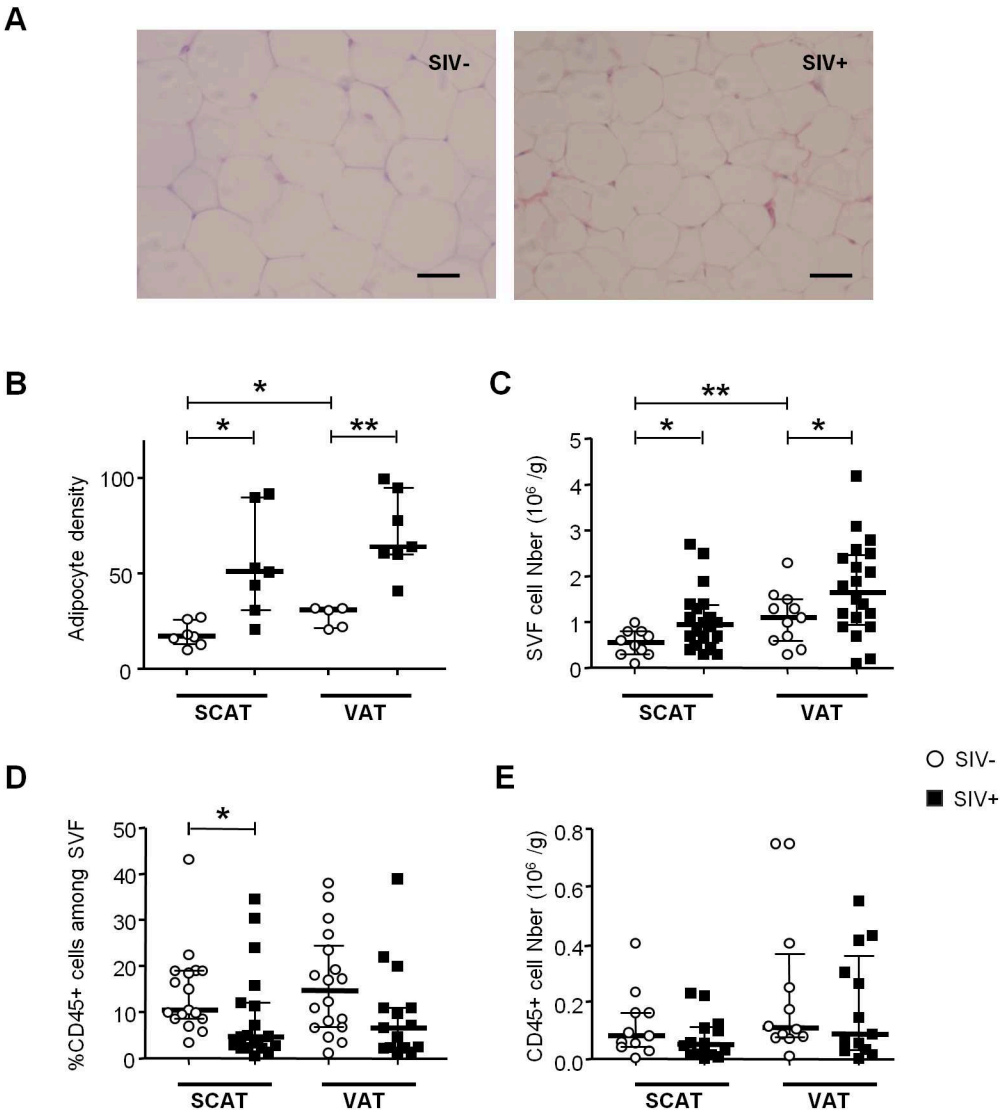


Fig 1. The influence of SIV infection on adipocyte and SVF cell density. (A) Representative adipose tissue sections of SIV-infected and non-infected macaques. Scale bar: 50μm, magnification x 250. (B) The adipocyte density (numbers per HPF) in SCAT and VAT from 5 to 7 non-infected animals (SIV-) and 7 SIV-infected animals (SIV+). (C) Adipose tissue dissociation and counting of cells in the SVF was performed with 20 SIV+ animals and 10 SIV- animals. Counts are expressed per gram of adipose tissue. (D, E) Flow cytometry of the recovered SVF, yielding the proportion (D) and number (E) of CD45-expressing cells per gram of tissue. The analysis was performed for both SCAT and VAT; SIV- animals (n = 10) are represented by open circles and SIV+ animals (n = 12) are represented by filled squares. Data are quoted as the median [interquartile range]. Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

doi:10.1371/journal.ppat.1005153.g001

associated with SIV infection, whereas elevated $CD8^+$ T cell percentages may reflect either a passive increase (due to $CD4^+$ T cell decay), an active increase due to antiviral CD8 recruitment (as described in lungs after SIV infection [53,54]), or viral-independent local recruitment (as described in inflammatory adiposity [27]). To evaluate the direct impact of SIV infection on T cell subsets, we analyzed the numbers of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells recovered from adipose tissue of infected and non-infected groups of animals. Surprisingly, the $CD4^+$ T cell number was not lower in infected animals, and there was even a non-significant trend towards $CD4^+$ T cell

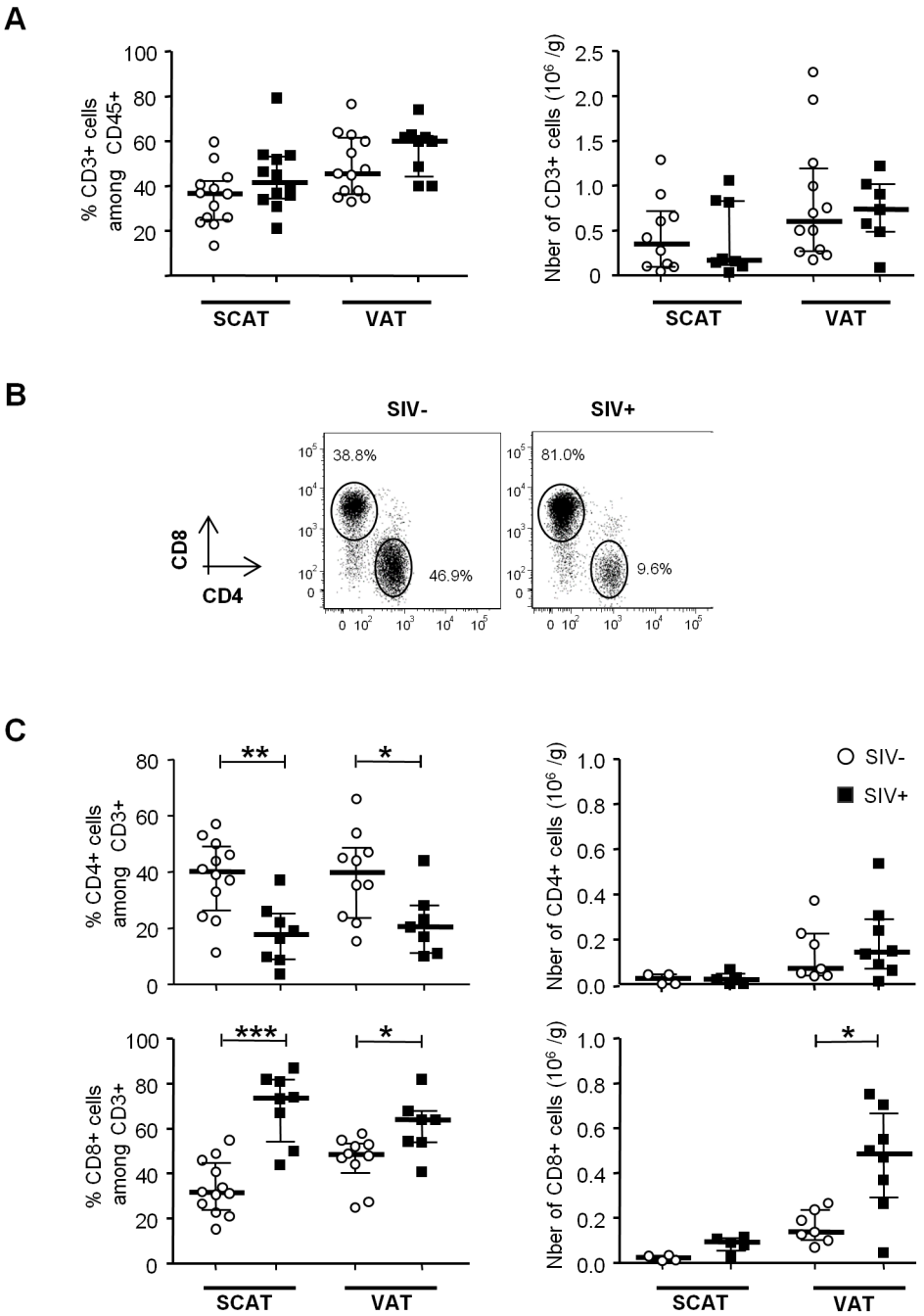


Fig 2. The influence of SIV infection on adipose-resident T cell subsets. (A) Percentages and numbers (expressed per gram of adipose tissue recovered) of CD3-expressing cells among the $CD45^+$ fraction from SCAT and VAT in non-infected animals (open circles) and SIV-infected animals (filled squares). Percentages were derived for 12 to 13 animals per group and counts were derived for 8 to 12 animals. (B) Representative dot plots showing CD4 and CD8 expression among $CD3^+$ T cells in SIV-infected and non-infected animals. (C) Percentages and numbers (expressed per gram of adipose tissue) of CD4- and CD8-expressing cells among $CD3^+$ cells recovered from SCAT and VAT of non-infected animals (open circles) and SIV-infected animals (filled squares). Percentages were derived for 8 to 12 animals per group and counts were derived for 5 to 8 animals. Data are quoted as the median [interquartile range]. Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

doi:10.1371/journal.ppat.1005153.g002

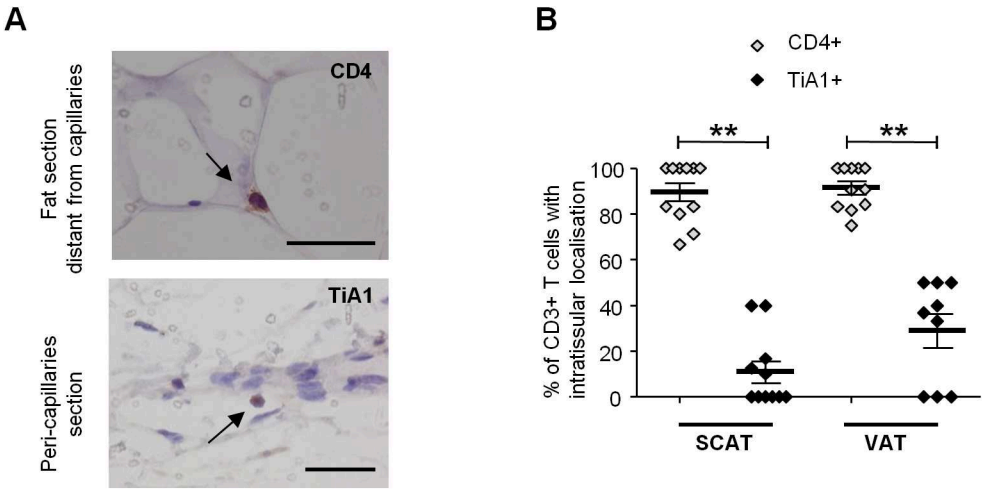


Fig 3. Localization of T cells in the adipose tissue of SIV-infected animals. Immunochemical analyses were performed on 11 SCAT and 10 VAT of SIV-infected animals. (A) Representative tissue sections showing $CD4^+$ T cells within fat and far from capillaries (upper) and $TiA1^+$ cells in the vicinity of the capillaries (lower). Scale bar: 50 μm, magnification x640 for CD4, x500 for TiA1. (B) Percentages of $CD4^+$ T cells (open diamonds) and $CD8^+$ T cells (filled diamonds) far from capillaries, corresponding to adipose-resident lymphocyte subsets. Depending on the location, cells were counted after immunochemical staining on SCAT and VAT sections from SIV-infected animals. Data are quoted as the median [interquartile range]. Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as ** $p<0.01$.

doi:10.1371/journal.ppat.1005153.g003

accumulation in VAT (Fig 2C). In contrast, $CD8^+$ T cell numbers in VAT were significantly higher (0.48 10^6 [0.29–0.67] in SIV-infected animals than in non-infected animals (0.14 10^6 cells/g [0.11–0.24]; $p = 0.0205$). A similar trend was observed for SCAT. Thus, the change in the CD4/CD8 ratio was mainly driven by an increase in $CD8^+$ T cell numbers—a phenomenon that is often associated with inflammatory adiposity [27]. Lastly, we used immunochemical techniques to formally confirm the presence of T lymphocytes in adipose tissue (Fig 3A). Given that the recruitment of peripheral blood cells into adipose tissue during local inflammation has been described, we evaluated the T cell distribution both in the vicinity of the capillaries and far from the capillaries in SIV-infected animals. The $CD4^+$ T cells were mainly located far from the capillaries, whereas $CD8^+$ T cells were essentially located in the capillary area (Fig 3B). These observations are in accordance with massive influx of $CD8^+$ T cells previously described in the context of adipose inflammation [27]. In contrast, $CD4^+$ T cell counts in adipose tissue were only slightly affected by SIV infection, and most $CD4^+$ T cells recovered in the SVF had not recently migrated into the adipose tissue from peripheral blood.

We next evaluated the differentiation of adipose $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells obtained from infected and non-infected animals (Figs 4 and S1). Testing for CD95, CD28 and CCR5 expression enabled us to identify naïve (Tn), central memory (Tcm), transitional memory (Ttm) and effector memory (Tem) subsets (Figs 4A and S1A) [55,56]. In both infected and non-infected animals, naïve $CD4^+$ T cells (CD95- CD28int) were virtually absent, whereas the Tcm ($CD95^+$ $CD28^+$ $CCR5^-$) fraction was predominant in both SCAT and VAT. Interestingly, this profile was specific to $CD4^+$ T cells since $CD8^+$ T cells from adipose tissue were essentially Tem ($CD95^+$ $CD28^-$) (S1 Fig). Among $CD4^+$ T cells, the $CD95^+$ $CD28^+$ $CD4^+$ T cell fraction which includes the two potential cellular $CD4^+$ T cell reservoir, i.e. Tcm ($CCR5^-$) and Ttm ($CCR5^+$), accounted for 82.3% [69.0–89.0] of the total in SCAT and 77.6% [69.9–77.6] in VAT, vs. 45.3% [28.8–62.0] in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ($p = 0.001$ and 0.014 respectively) (S2A and S2B Fig). Interestingly, we did not detect significant differences in any of the $CD4^+$ T

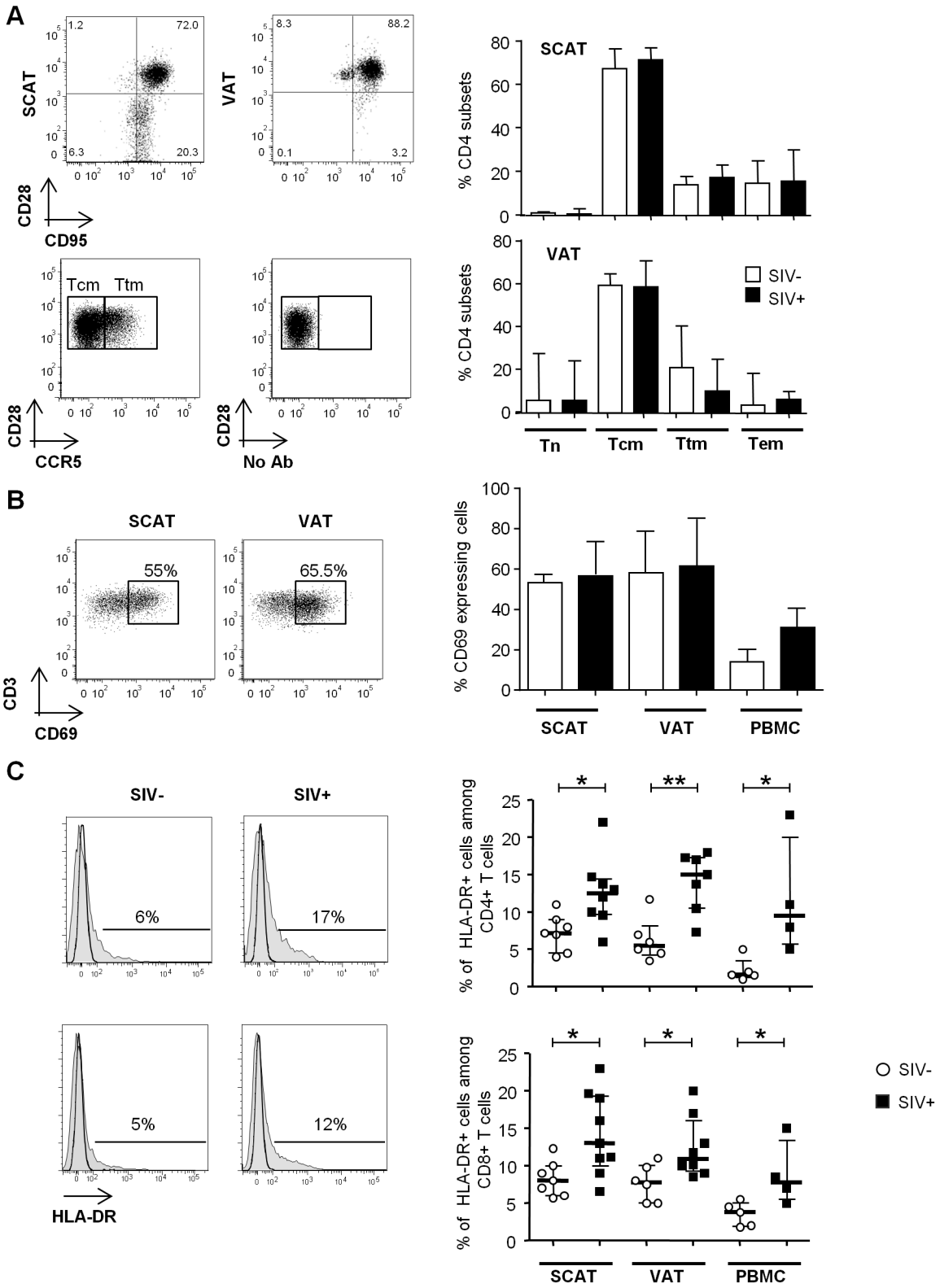


Fig 4. The influence of SIV infection on T cell differentiation and activation status. (A) The naïve and memory CD4$^+$ T cell subset distribution in SCAT and VAT from SIV-infected or non-infected animals. Representative dot plots showing the gating strategies used to define Tn, Tcm, Ttm and Tem subsets among the CD4$^+$ T cells, based on CD28, CD95 (upper dot plot, SCAT and VAT samples). CCR5 expression and the FMO profile in CD28+CD95+ fractions are shown (lower dot plot: VAT sample). The right-hand panels show the distribution of CD4$^+$ T cells among the various subsets in non-infected animals

(n = 5, open column) and SIV-infected animals (n = 7, filled column). (B) CD69 expression on $CD4^+$ T cells recovered from SCAT, VAT and PBMCs from SIV-infected or non-infected animals. Representative dot plots for SCAT and VAT (left panel) and the percentages of CD69-expressing $CD4^+$ T cells in SCAT, VAT and PBMCs from non-infected animals (n = 6, open columns) and SIV-infected animals (n = 7, filled columns) are shown. (C) HLA-DR expression on SCAT, VAT and PBMCs from SIV-infected or non-infected animals. Representative histograms showing HLA-DR expression on adipose-resident $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells recovered from SCAT from non-infected (left panel) and SIV-infected animals (right-hand panel). HLA-DR expression histograms are shown in plain histogram. FMO staining (open histograms) was used to define the gating strategy. The percentage of HLA-DR-expressing cells among $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells recovered from SCAT, VAT and PBMCs from non-infected animals (n = 6, open circles) and SIV-infected animals (n = 4–8, filled squares). Data are quoted as the median [interquartile range]. Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

doi:10.1371/journal.ppat.1005153.g004

cell fractions when comparing adipose tissue from SIV-infected animals (n = 7) and non-infected animals (n = 5). To evaluate the proportion of resident memory T cells [57,58], we next determined CD69 expression on $CD4^+$ T cells recovered from adipose tissue and (as a control) in PBMCs (Fig 4B). The fraction of $CD4^+$ T cells expressing CD69 was significantly higher in adipose tissue than in PBMCs (p = 0.0003 for SCAT and 0.0034 for VAT). However, SIV infection was not associated with a significant difference in the proportion of CD69-expressing cells. Thus, the maintenance of normal $CD4^+$ T cell numbers was associated with preservation of memory $CD4^+$ T cell subset distribution in general as well as the resident $CD4^+$ T cell memory distribution.

Lastly, we evaluated the activation profile of adipose tissue T cells during chronic SIV infection (Fig 4C). We determined the expression of HLA-DR (a standard marker of T cell activation) on adipose tissue $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells and (as a control) in PBMCs. In non-infected animals, there were no significant differences between SCAT and VAT in terms of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell activation ($CD4^+$ T cells: 7.2% [4.5–9] in SCAT and 5.5% [4.3–8.2] in VAT; $CD8^+$ T cells: 8.0% [6.0–10.0] in SCAT and 7.8% [5.0–10.1] in VAT). The percentages of HLA-DR-expressing T cells were higher in both SCAT and VAT than for PBMCs (1.6% [1.3–3.5] for $CD4^+$ T cells in PBMCs and 3.8 [1.9–5.0] for $CD8^+$ T cells in PBMCs). In SIV-infected animals, the percentage of HLA-DR-expressing cells was significantly higher in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells recovered in SCAT, VAT and PBMCs, relative to non-infected controls (Fig 4C). For example, the percentage of HLA-DR-expressing $CD4^+$ T cells was 12.5% [5.5–15] in SCAT, 15.0% [10.5–17.3] in VAT and 9.5% [5.8–20.0] in PBMCs from SIV-infected animals. Interestingly, we could not detect any significant difference in the proportion of Ki-67-expressing $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells (S3 Fig), suggesting that change in activation profile was not associated with massive *in situ* proliferation. Overall, SIV infection slightly affected $CD4^+$ T cell numbers and their differentiation profile, and was associated with increased T cell activation in adipose tissue.

A constant concern when studying immunity in tissues is the potential bias induced by blood contamination. Here, special efforts were made to avoid this; adipose tissue was devascularized and washed in medium prior to digestion. Importantly, the low observed proportion of CD45-expressing cells constitutes important evidence of low blood contamination. It is noteworthy that B cells (identified as CD20-expressing cells) were virtually absent from SCAT (0.10% of SVF cells [0.01–0.40]) and VAT (0.11% [0.01–1.10]) but were detected in PBMCs (9.5% [3.0–10.0]) (S2C Fig). The absence of B cells is thus a reliable indicator of the absence of blood contamination of adipose tissue samples. Moreover, adipose tissue $CD4^+$ T cells differed significantly from PBMCs, with significantly lower percentages of naïve cells (the $CD4^+$ Tn fraction represented 2.0% [0.3–3.6] of the cells in SCAT, 5.6% [1.3–22.0] in VAT and 22.0% [8.9–41.7] in PBMCs; $p<0.0001$ and p = 0.03, respectively) and higher percentages of the two memory T cell subsets that are preferentially infected (i.e. Tcm and Ttm) (S2A and S2B Fig). Lastly, the immunochemical demonstration of different localizations of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells (Fig 3) also suggests that blood contamination was absent or barely present.

SIV infection influences the phenotype of adipose-resident macrophages

We next evaluated the changes among adipose macrophages (Fig 5), which are involved both in innate immunity and adipose homeostasis. At present, there is no clear phenotypic strategy for identifying tissue-resident macrophages and defining their activation profile. The pro-inflammatory (M1) versus anti-inflammatory (M2) distinction (commonly used in murine models) may not reflect the great heterogeneity of macrophage phenotypes in tissues. Indeed, macrophages probably develop across a continuum, with anti-inflammatory to pro-inflammatory profiles. In the present study, we considered macrophages to be $CD45^{+}CD3^{-}CD14^{+}$ cells.

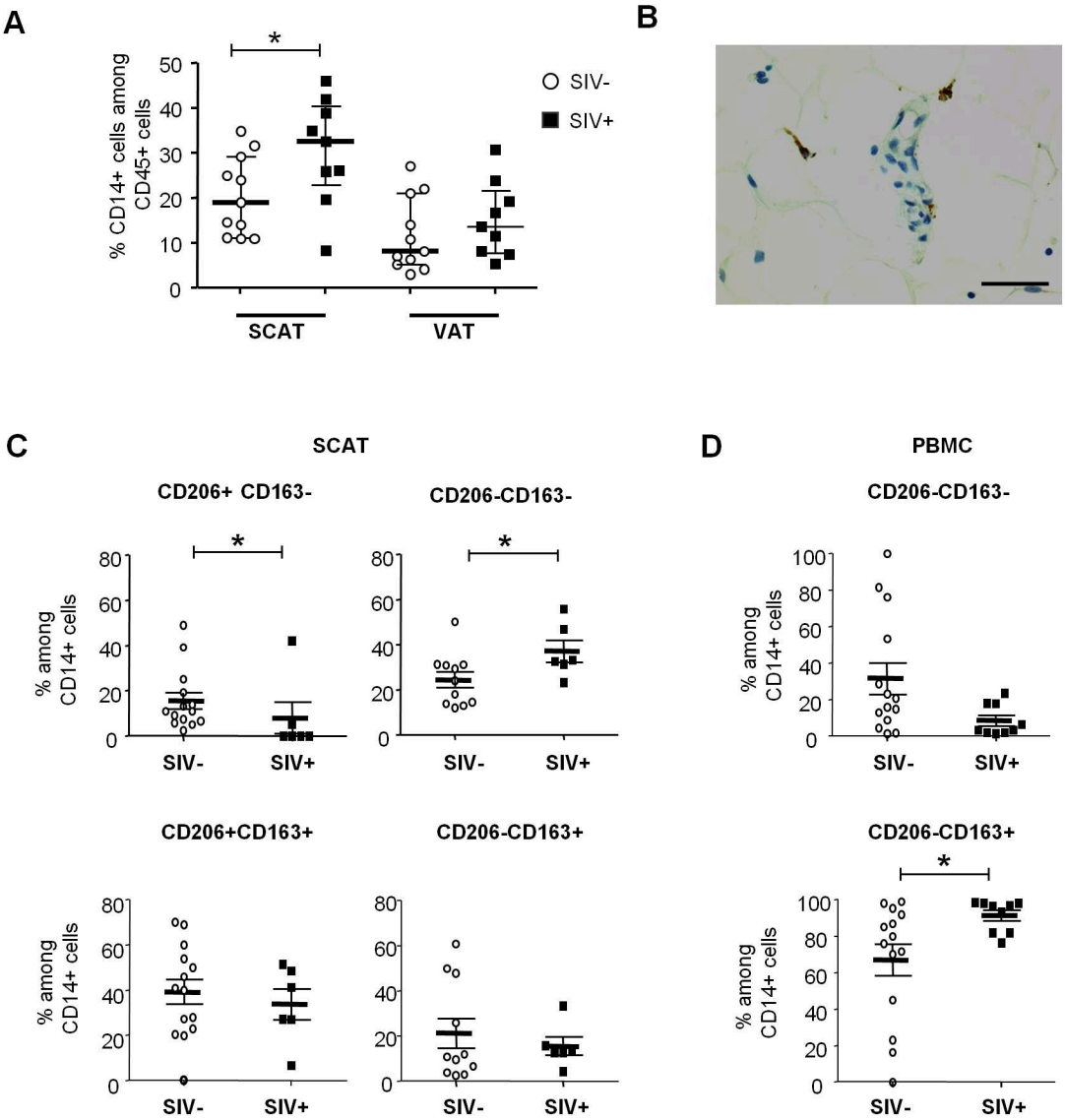


Fig 5. The influence of SIV infection on adipose tissue macrophage numbers and phenotypes. (A) The percentage of CD14-expressing cells among $CD45^{+}$ cells recovered in the SVF from SCAT and VAT from non-infected animals (open circles, n = 13) and SIV-infected animals (filled squares, n = 9). (B) Representative adipose tissue sections, confirming the presence of macrophages in adipose tissue in immunochemical preparations (CD68 staining). Scale bar: 50 μm, magnification x400. (C, D) Analyses of CD206 and CD163 expression on adipose-resident CD14-expressing cells recovered from SCAT (C) and PBMCs (D) from non-infected animals (open circles, n = 11) and SIV-infected animals (filled squares, n = 9). CD206-expressing fractions were not detected in PBMCs. Gating strategies are shown in S4 Fig. Data are quoted as the median [interquartile range]. Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as * $p<0.05$.

doi:10.1371/journal.ppat.1005153.g005

The proportion of macrophages among $CD45^+$ cells in SCAT was greater in SIV-infected animals than in non-infected animals (Fig 5A). A similar trend was observed in VAT. These findings are in line with the macrophage accumulation previously described in the context of adipose inflammation [26]. We confirmed the presence of macrophages in adipose tissue by performing immunohistochemical analyses (CD68 staining) of tissue sections (Fig 5B).

We next evaluated the activation profile of adipose tissue macrophages by screening for so-called M2 markers (CD206 and CD163) associated with anti-inflammatory activity. Due to the tissue macrophages' high level of auto-fluorescence, analyses were performed using isotype controls for both CD206 and CD163 staining, and "fluorescence minus one" (FMO) strategies were applied to accurately identify the different subsets (S4A Fig). In non-infected animals, most adipose tissue macrophages were found to express both CD206 and CD163 in SCAT and VAT—suggesting that anti-inflammatory M2 macrophages were predominant in non-infected adipose tissue, as previously reported for humans and mice [24,59] (Fig 5C). Importantly, CD206 expression on CD14-expressing cells was restricted to adipose-resident cells and was not detected in PBMCs. In contrast, the $CD206^-CD163^+$ fraction was predominant in PBMCs (73.9% [62.3%-92.6%]) but extremely rare in SCAT and VAT SVF (S4B Fig).

When considering SIV-infected animals, the $CD206^+CD163^+$ populations were highly predominant in adipose tissue. However, the frequency of the anti-inflammatory $CD206^+CD163^-$ fraction was significantly lower in SIV-infected animals than in non-infected animals for both SCAT ($p = 0.0258$) and VAT ($p = 0.0187$) (Fig 5C and S5 Fig). Conversely, the $CD206^-CD163^-$ fraction of adipose-resident macrophages (which presumably corresponds to pro-inflammatory macrophages) was elevated in SIV-infected animals ($p = 0.0269$). It is noteworthy that opposite changes were observed for CD14-expressing cells in PBMCs (Fig 5D): SIV infection was associated with a lower $CD206^-CD163^-$ fraction and a higher $CD206^-CD163^+$ fraction. Taken as a whole, our results demonstrated that chronic SIV infection skews both adipose tissue T cell and macrophage populations towards a more activated profile.

Adipose tissue as a site of SIV infection

To date, assays for HIV DNA in adipose tissue have been performed on both whole tissue samples and adipocytes. No consensus has emerged from these studies, although it is currently assumed that adipocytes are not a major target for HIV *in vivo*. In the present work, we focused on the SVF and potential HIV/SIV target cells in particular ($CD4^+$ T cells and macrophages). We looked for cell-associated SIV DNA and RNA in total SVF ($n = 8$) and sorted $CD4^+$ T cell and macrophage fractions ($n = 5$ each) from SIV-infected animals. As shown in Fig 6A, SIV DNA was detected in SVF samples from SCAT and VAT in all animals tested and no significant difference between the two sites was detected. Sorted $CD4^+$ T cell fractions from all SCAT and VAT samples ($n = 10$) were positive for SIV DNA. The observations for adipose $CD14^+$ cells were more heterogeneous: 3 of the 5 animals were positive for SIV DNA in both SCAT and VAT. The median SIV DNA levels were 3.7 log DNA copies/10^6 cells in total SVF and 3.2 log SIV DNA copies/10^6 cells in PBMCs. Additionally, 4.3 and 2.3 log viral DNA copies/10^6 cells were detected respectively in the sorted $CD4^+$ fraction and $CD14^+$ cells recovered from adipose tissue.

We analyzed viral RNA in a total of 11 animals by performing an RT-PCR assay on cell suspensions ($n = 8$) (Fig 6B) and *in situ* SIV RNA hybridization ($n = 3$) (Fig 6C). SIV RNA was detected in the SVF from all animals tested (except for one SCAT sample). SIV RNA levels in SVF collected from SCAT and VAT (4.5 log SIV RNA copies/10^6 cells) were similar to those observed in PBMCs (5.3 log SIV RNA copies/10^6 cells). Quantitative assays of SIV RNA were also performed in $CD4^+$ and $CD14^+$ cell subsets from 5 animals. The mean level of SIV RNA (in log copies per million cells) was 4.1 in a sorted adipose $CD4^+$ fraction and 4.5 in adipose

CD14$^+$ cells. *In situ* hybridization was performed on SCAT and VAT samples and confirmed the presence of SIV RNA in both tissues as shown in one of the three animals tested (Fig 6C). We next compared SIV DNA and RNA contents in CD4$^+$ T cells and CD14$^+$ cells recovered from various tissues/cell sources: adipose tissue, PBMCs and mesenteric lymph nodes (LNs) (S6 Fig). Levels of SIV DNA and RNA within the CD4$^+$ T cell fractions were similar in all tissues tested—suggesting that the proportion of CD4$^+$ T cells in infected adipose tissue was equivalent to that in other tissues where viral replication is known to occur extensively. The same observation applied to CD14$^+$ cells. In conclusion, we demonstrated that the SVF fraction from chronically SIV-infected animals included SIV-infected CD4$^+$ T lymphocytes and macrophages. SIV RNA was detected in both the total SVF fraction and adipose CD4$^+$ and CD14$^+$ fraction—suggesting that viral production occurs in adipose immune cells.

HIV-infected cells are present in adipose tissue samples from ART-treated, aviremic patients

To ascertain whether adipose tissue may constitute a viral reservoir, we collected adipose tissue samples from 13 ART-treated HIV-infected patients who had undergone elective visceral

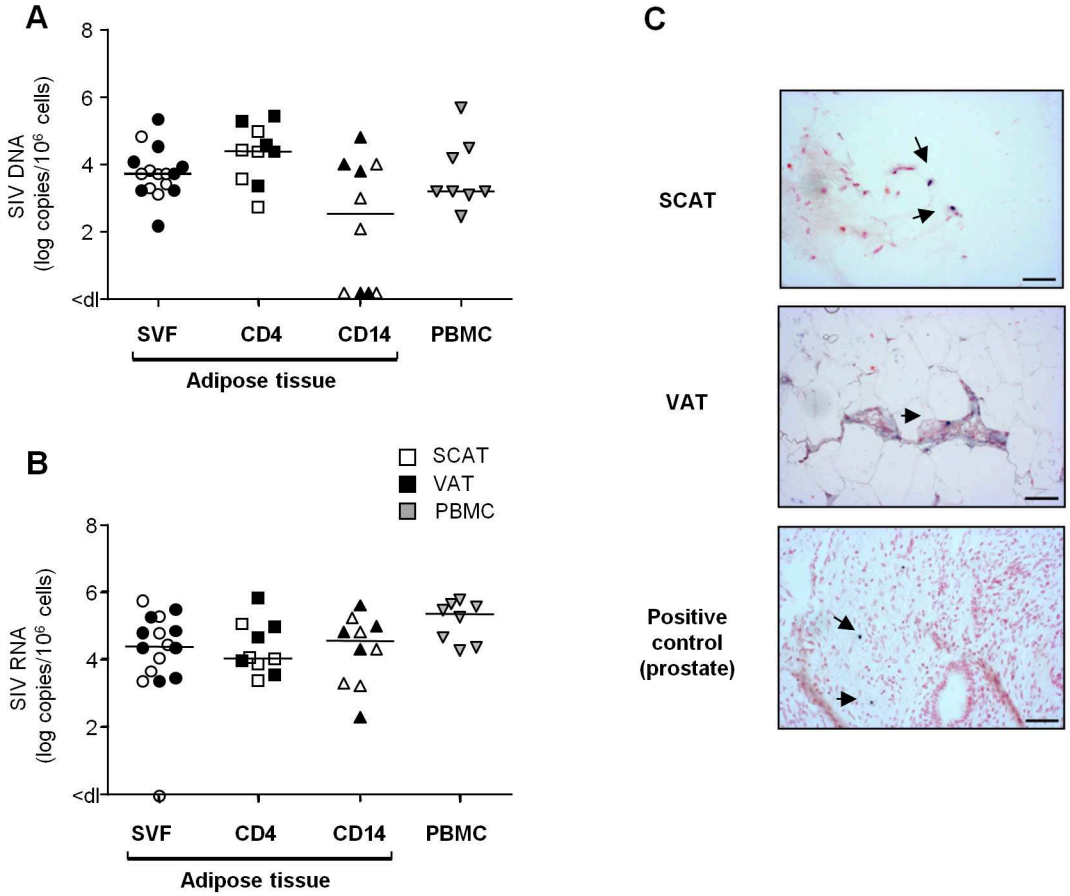


Fig 6. Quantification of SIV DNA and RNA in adipose tissue cells. (A, B) Quantification of SIV DNA (A) and RNA (B) was performed on SVF (n = 8), sorted adipose CD4$^+$ T cells (CD4) or CD14-expressing cells (CD14) (n = 5) and PBMCs (n = 8) from SIV-infected animals. SIV DNA and RNA assays were performed in duplicate and the results are expressed in log SIV DNA copies per million cells. Data are quoted as the median [interquartile range]. Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as * $p<0.05$. (C) *In situ* hybridization for SIV RNA was performed on SCAT and VAT recovered from one macaque. Prostate tissue from a viremic SIV-infected macaque was used as positive control. One slide was analyzed for each sample. SIV RNA staining is shown at each site. Scale bar: 50 μm.

doi:10.1371/journal.ppat.1005153.g006

Table 1. Study population.

ID	Gender	Age (year)	CD4 Nadir (/μL)	Treatment duration (year)	Treatment at sampling	VL at sampling (RNA copies/mL)	CD4 count at sampling (/μL)
1	M	41	55	5	tenofovir/ emtricitacine/ darunavir	<40	272
2	M	45	371	4	Efavirenz/ tenofovir / emtricitabine	<40	371
3	F	48	23	22	Raltegravir/ abacavir/ lamuvidine/ darunavir	<40	381
4	F	34	262	11	Truvada/ darunavir	<20	525
5	F	47	280	16	Zidovudine/ lamivudine/ nevirapine	<20	788
6	F	34	162	6	Zidovudine/ lamivudine/ nevirapine	<40	162
7	M	48	206	8	Rilpivirine/Tenofovir/ Emtricitabine	<20	464
8	M	48	296	5	Efavirenz/ tenofovir / emtricitabine	<40	673
9	M	75	177	18	Truvada/nevirapine	<20	423
10	F	75	NA	20	Tritherapy not communicated	<40	NA
11	F	38	3	16	zidovudine/lamivudine/ lopinavir	<40	597
12	F	51	80	26	Truvada/ fosamprenavir/ ritonavir	<40	232
13	F	38	237	16	Truvada/ darunavir/ ritonavir	<40	613
Median and interquartile range							
	8F/5M	**47**	**192**	**16**		**<40**	**444**
		[38–49,5]	[61–276]	[5–19]			[297–609]

doi:10.1371/journal.ppat.1005153.t001

surgery for non-HIV related causes (Table 1). In 11 patients, we searched for viral DNA in SVF cells and PBMCs. Even after clinically effective ART treatment, HIV DNA was detected in the SVF of all samples tested (11 from VAT and 4 from SCAT) (Fig 7A). The median level of HIV DNA in SVF from VAT (2.15 [2.01–2.47] log DNA copies/million cells) was significantly lower than in PBMCs (2.94 [2.25–3.28]). However, this low level of infection in adipose tissue might primarily reflect the low proportion of hematopoietic cells in adipose tissue. We therefore quantified HIV DNA in sorted $CD4^+$ T cells and sorted $CD206^+$ $CD14^+$ cells from three patients. Contamination by circulating monocytes was controlled for by measuring CD206 expression on $CD14^+$ cells. In one sample, HIV DNA could not be detected in adipose $CD4^+$ T cells—presumably because of low DNA input. In the samples with detectable virus, the median level of HIV DNA in $CD4^+$ T cell fractions recovered from adipose tissue was 3.83 log DNA copies/million cells (compared with 3.56 in sorted peripheral blood $CD4^+$ T cells). We failed to detect HIV DNA in the three sorted $CD14^+$ $CD206^+$ samples tested. Therefore, in patients on long-term ART with no detectable viremia, we confirmed that HIV-infected cells are present in the SVF (mainly tissue-resident $CD4^+$ T cells). Given that the detected HIV DNA might have been replication-defective, we also screened for viral RNA in adipose tissue sections using *in situ* hybridization. Two SCAT samples and one VAT sample were obtained from ART-treated HIV-infected patients. As shown in Fig 7C, cells expressing HIV RNA were detected (albeit in low numbers) in the three adipose tissue samples studied. We therefore demonstrated that productive, HIV-infected cells are present in the adipose tissue of ART-treated patients.

The *ex vivo* induction of viral replication in sorted cells is a further means of demonstrating that HIV is replication-competent. In six long-term ART-treated patients, we performed an *in*

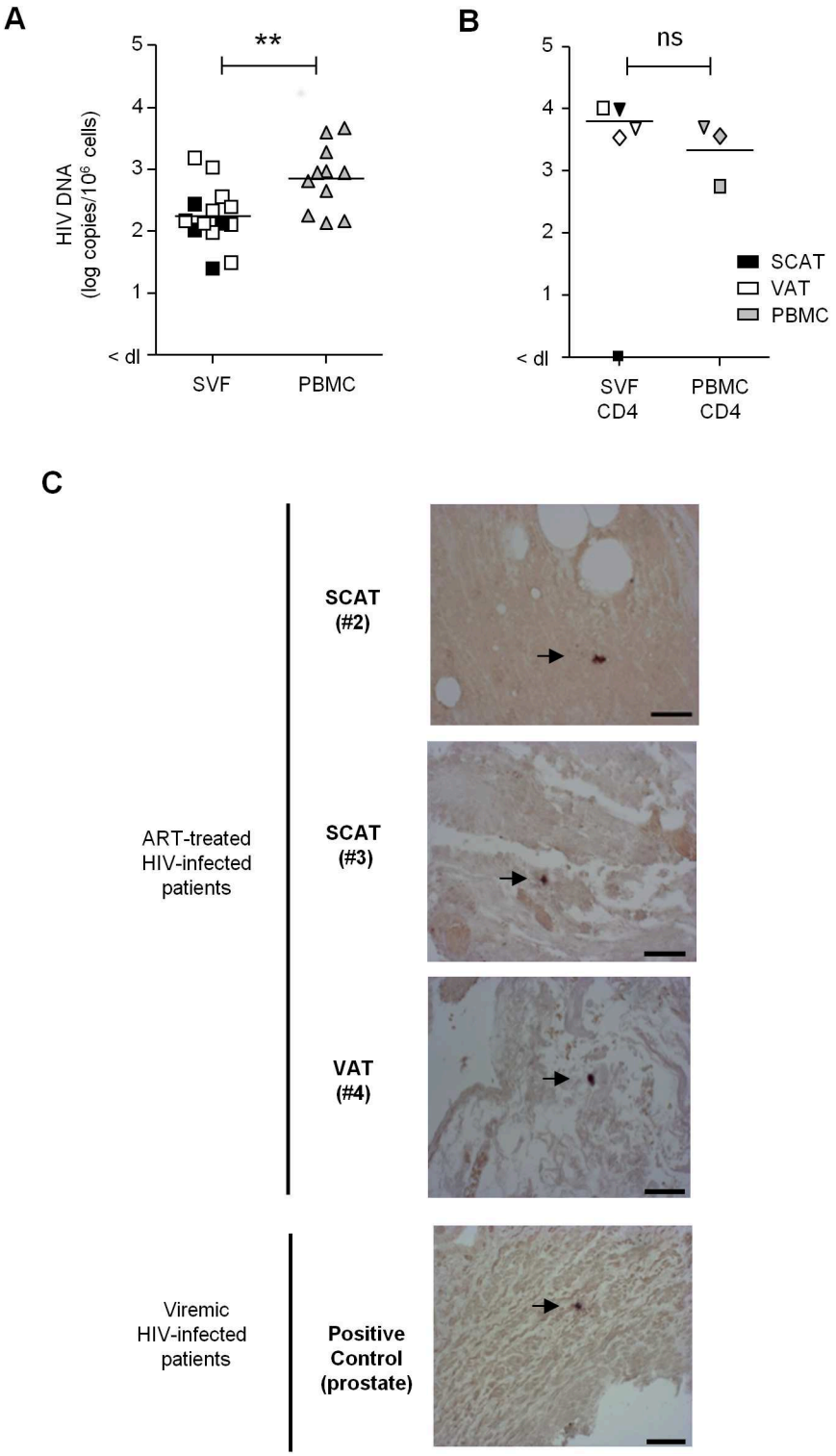


Fig 7. Detection of HIV DNA and RNA in adipose tissue. (A) Detection of HIV DNA in SVF cells and PBMCs from 11 ART-treated, HIV-infected patients. Each patient is represented by a symbol, and the shading represents the type of adipose tissue: SCAT (open symbols), VAT (filled symbols). (B) HIV DNA detection in sorted $CD4^+$ T cells recovered from adipose tissue and PBMCs from 3 ART-treated, HIV-infected patients. The HIV DNA detection assay was performed in duplicate and is expressed in log copies per million cells. The detection limit differed as a function of the numbers of cells tested and is indicated as <dl on the

graph. (C) An *in situ* hybridization assay for HIV RNA was performed on three samples of adipose tissue recovered from ART-treated, HIV-infected patients (1 VAT and 2 SCAT samples). Positive control: a prostate tissue sample from a viremic patient. One slide was analyzed for each sample. HIV RNA staining for each positive patient is shown. Scale bar: 50 μm.

doi:10.1371/journal.ppat.1005153.g007

vitro viral reactivation assay on total SVF cells, sorted adipose $CD4^+$ and $CD206^+CD14^+$ cells and sorted peripheral blood $CD4^+$ or $CD14^+$ cells in the presence of allogeneic pre-activated $CD4^+$ T cells and phytohemagglutinin (Fig 8). In order to obtain sufficient numbers of cells, SCAT and VAT samples were pooled when both were available. Although small numbers of

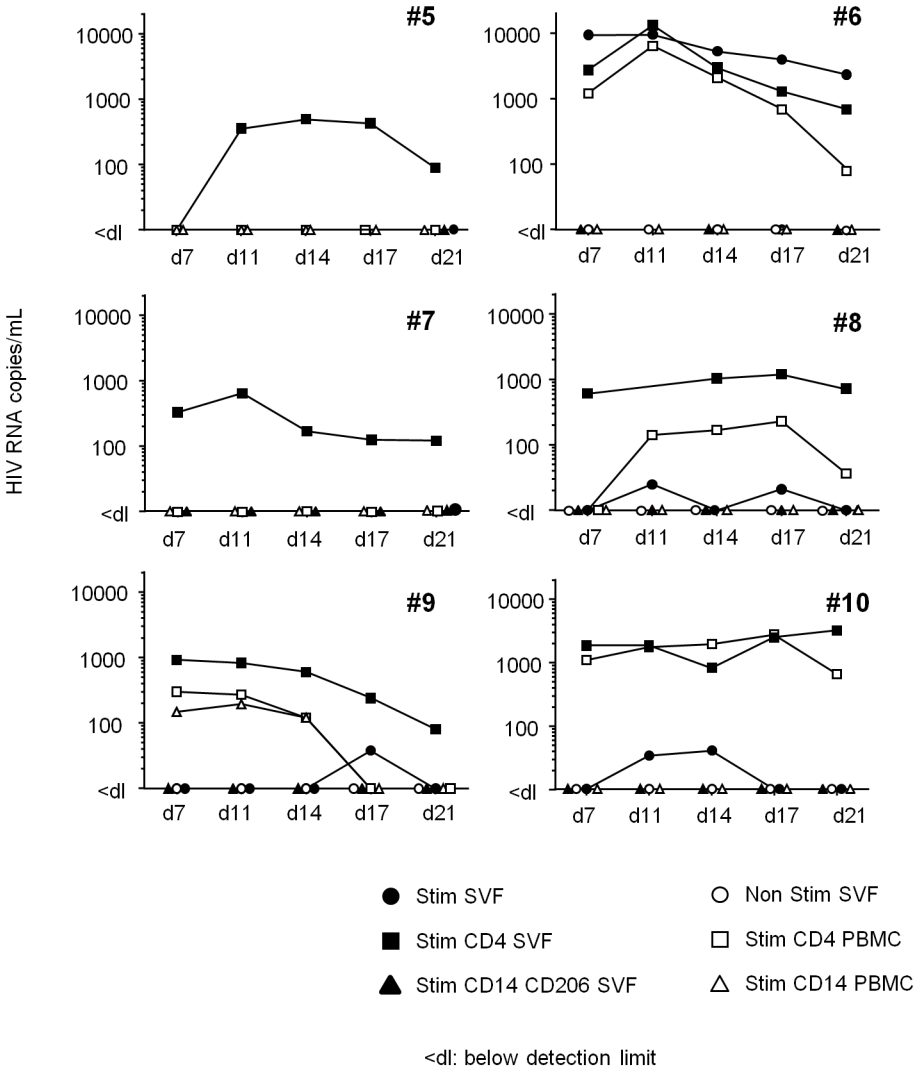


Fig 8. HIV RNA production following *in vitro* reactivation. Total SVF (filled circles), sorted $CD4^+CD3^+$ (filled squares) and $CD14^+CD206^+$ cells (filled triangles) from adipose tissue, and sorted $CD4^+CD3^+$ (open squares) and $CD14^+$ cells (open triangles) from PBMCs were co-cultured with allogeneic, pre-activated $CD4^+$ T cells and then stimulated. The cell number differed according to the cell fraction: $1x10^6$ for the total SVF fraction, $1x10^5$ to $5x10^5$ for sorted $CD4^+$ T cells, and $5x10^4$ to $2x10^5$ for sorted, CD14-expressing cells. HIV RNA was detected in supernatants collected at D7, 11, 14, 17 and 21. As a negative control, $1x10^6$ SVF cells were cultured in the absence of allogeneic, pre-activated $CD4^+$ T cells (Ns SVF open circles). Samples from six ART-treated HIV infected patient were tested and the HIV RNA detection assay was performed five times for each sample.

doi:10.1371/journal.ppat.1005153.g008

cells (5 10^4 to 5 10^5) were used for this reactivation assay, we detected the induction of viral replication in the sorted $CD4^+$ T cell fraction from the SVF of all six patients. HIV RNA in supernatants from the *ex vivo*-activated, sorted SVF $CD4^+$ T cells was detected from day 7 to day 21 in nearly all patients. In two patients (#5, 7), HIV RNA was detected solely after the reactivation of sorted SVF $CD4^+$ T cells but not in total SVF or in PBMCs—probably because of the small number of infected cells in the culture. In the four other patients (#6, 8, 9, 10), HIV RNA was detected in similar numbers of *ex vivo*-activated $CD4^+$ T cells recovered from both adipose tissue and PBMCs. Induction of HIV replication from SVF was detected in these four patients (albeit at low levels in three—probably due to the small number of infected cells). No HIV RNA was detected in cultures of activated adipose $CD14^+CD206^+$ fractions. Importantly, HIV RNA was not detected in non-activated SVF cell cultures (except in one patient), meaning that we could rule out the amplification of non-latent, pre-existing HIV. Our results show that adipose $CD4^+$ T cells were infected by replication-competent HIV.

In conclusion, we performed three levels of detection: (i) HIV DNA using PCRs, (ii) HIV RNA using *in situ* hybridization and (iii) HIV RNA in supernatants in an *in vitro* reactivation assay based on ultrasensitive RT-PCR. We demonstrated that latently HIV-infected cells were present in the SVF from both SCAT and VAT in 6 ART-treated patients. HIV DNA was consistently detected in adipose $CD4^+$ T cells—strongly suggesting that adipose tissue is an HIV reservoir in aviremic patients on long-term ART.

Discussion

Residual chronic inflammation and viral persistence are two key features of ART-treated, HIV-infected patients. Although several mechanisms have been described, the establishment and persistence of low-grade inflammation are not fully understood and remain to be characterized. Given that adipose tissue is a major site of inflammation in a context of obesity, we hypothesized that the adipose tissue changes associated with HIV infection may drive low-grade inflammation. Indeed, the literature data reveal a strongly pro-inflammatory profile of adipose tissue during HIV infection—although most of these studies were performed on ART-treated patients [36,41,60]. In order to rule out the potential confounding role of ART and to collect sufficient amounts of tissue, we studied the SIV/macaque infection model. Chronic SIV infection *in vivo* was associated with a markedly higher adipocyte density (i.e. cell numbers per field) and SVF cell count (expressed per gram of adipose tissue). The elevated adipocyte density has been linked to an abnormally low adipocyte size, which in turn may reflect drastic alterations of adipogenesis [61,62] and/or lipolysis [48,60]. The massive increase in SVF cells in adipose tissue in chronically infected animals essentially reflected the accumulation of $CD45^-$ cells. The $CD45^-$ cells recovered in the SVF of infected animals need to be identified more accurately. Those in the SVF included pre-adipocytes, the accumulation of which may be related to changes in adipocyte differentiation. These striking changes in CD45- proportion need to be further investigated and could relate to multiple defects affecting adipose tissue during SIV infection such as lipodystrophy, inflammation or viral persistence. The SVF also contains mesenchymal stem cells [63–65], and it remains to be established whether these cells can also be infected. When focusing on immune cells, there was no major change in total leukocyte counts. However, the percentage of $CD4^+$ T cells was severely lower in adipose tissue from SIV-infected animals than in non-infected animals, whereas the $CD8^+$ T cell percentage was markedly higher. We demonstrated that the change in the CD4/CD8 ratio reflected the accumulation of $CD8^+$ T cells, in accordance with previous reports of massive CD8 accumulation during adipose tissue inflammation [27]. Intense recruitment of $CD8^+$ T cells was confirmed by the perivascular location of $CD8^+$ T cells. However, a direct impact of SIV in adipose tissue cannot be ruled out [53,54].

The fact that $CD4^+$ T cell counts were generally unaffected was not expected in the context of SIV infection—especially given the high percentage of central memory $CD4^+$ T cells (a major HIV/SIV target) in adipose tissue. Organ-dependent differences in the direction and amplitude of cell depletion have been described [66,67]: $CD4^+$ T cell depletion is rapid and massive in the intestinal mucosa, whereas the follicular helper subset (also a major HIV target) even expands in secondary lymphoid organs [68]. Importantly, $CD4^+$ T cells were mainly found recovered in the vicinity of adipocytes and far from capillaries. This remote site may favor viral persistence, as was recently described in follicular $CD4^+$ T cells [69]. It thus appears that adipose tissue may constitute an additional site for the accumulation of $CD4^+$ T cells. Phenotypic analysis revealed that the Tcm $CD4^+$ T cells fraction was predominant in both SCAT and VAT, thus confirming the high potential for viral persistence of adipose tissue. The predominance of central memory $CD4^+$ T cells, which usually identifies inductive lymphoid site, also raises the question of the lymphoid definition of the adipose tissue: Does adipose tissue constitute a lymphoid site and if so is it an inductive or effector lymphoid site?

We also found that phenotypic changes can be detected in both lymphocytes and macrophages during chronic SIV infection of adipose tissue. Expression levels of the activation marker HLA-DR on adipose tissue T lymphocytes were higher in SIV-infected animals. Macrophages displayed a moderate change in phenotype. SIV infection was associated with an increase in the proportion of $CD206^-CD163^-$ adipose tissue macrophages and a concomitant decrease in the $CD206^+CD163^-$ fraction—suggesting a shift from an anti-inflammatory profile towards a more activated profile or the recruitment of migrating blood monocytes. Overall, we observed features commonly associated with obesity-related inflammation: elevated SVF numbers, the specific recruitment of $CD8^+$ T cells, a higher proportion of macrophages and greater expression of activation markers. These observations strongly suggest that adipose tissue is involved in inflammation during SIV infection.

We next investigated the mechanisms that might underlie the increase in adipose tissue inflammation in chronically SIV-infected animals. There is increasing evidence to show that HIV infection *per se* interferes with adipose tissue homeostasis, although the mechanisms remains to be defined [34]. Adipose inflammation may be a consequence of systemic inflammation, with in turn is worsened by adipose inflammation in a vicious circle. Adipose inflammation may also be related to the spread of viral proteins [48–50], $CD4^+$ T cell lymphopenia [70] and/or microbial translocation [71,72], all of which are known to alter adipocyte homeostasis. Furthermore, SIV may directly infect adipose-resident immune cells. Importantly, previous reports essentially failed to demonstrate consistent infection of adipocytes and did not provide any information on adipose immune cells. In the present study, SVF fractions were positive for SIV DNA and SIV RNA in all animals tested. SIV DNA was also detected in all sorted adipose $CD4^+$ T lymphocytes. SIV DNA was detected less consistently in sorted CD14-expressing cells (3 out of 5 in both SCAT and VAT). The results for cell-associated SIV RNA essentially corroborated those for SIV DNA. We demonstrated that in SVF fractions, SIV was consistently present in $CD4^+$ T lymphocytes and less frequently present in macrophages. Our detection of viral DNA and RNA in stromal vascular cells collected from adipose tissue of chronically viremic animals thus confirms that adipose tissue is a site of infection.

We next sought to confirm the presence of viral infection in human adipose tissue and, more importantly, to characterize viral persistence in ART-suppressed HIV-infected patients. Three different assays were performed: (i) detection of viral DNA in SVF (in 11 patients) and in sorted $CD4^+$ T cell fractions (from 3 patients), (ii) *in situ* RNA hybridization on fixed sections of adipose tissue (in 3 patients), and (iii) *in vitro* viral reactivation (in 6 patients). HIV DNA was detected in all SVF samples tested; this finding is in line with Couturier et al.'s report of HIV DNA in the SVF of 5 ART-treated, HIV-infected patients [73]. Importantly, we were

able to detect HIV DNA in sorted adipose $CD4^+$ T cell fractions but not in $CD206^+$ CD14-expressing cells. It is noteworthy that sorted $CD4^+$ T cells recovered from adipose tissue had much the same levels of HIV DNA as PBMCs. These results suggest that the proportion of infected cells is similar in adipose tissue $CD4^+$ T cells and in peripheral blood $CD4^+$ T cells. In contrast to the situation in chronically viremic macaques (in which SIV DNA was detected in a $CD14^+$ fraction recovered from the SVF), we did not detect HIV DNA in $CD14^+CD206^+$ cells recovered from the SVF in aviremic patients. We checked whether this discrepancy was related to the difference in macrophage selection (i.e. $CD14^+$ cells vs. $CD14^+CD206^+$ cells). $CD14^{+-}$ $CD206^+$ cells sorted from viremic macaques were still positive for SIV DNA, suggesting that viral DNA may be present in macrophage subsets in viremic stages but might not persist during long-term ART. One can reasonably presume that the half-life of macrophages is shorter than that of Tcm $CD4^+$ T cells. Alternatively, the small number of macrophages collected may have prevented us from detecting a small proportion of infected cells. This aspect will be investigated further. Lastly, six samples were reserved for a viral replication assay. Although only small numbers of sorted adipose cells were available, we were able to monitor *in vitro* viral replication by detecting HIV RNA in supernatants after the incubation of adipose tissue $CD4^+$ T cells with allogeneic pre-activated $CD4^+$ T cells. HIV RNA was consistently detected in cultures of $CD4^+$ T cells sorted from the SVF, suggesting that adipose $CD4^+$ T cells are infected by replication-competent HIV. In four patients, *ex vivo* HIV replication was induced to the same extent in sorted $CD4^+$ T cells from the SVF and from PBMCs. These results suggest that the proportion of infected cells is much the same among adipose tissue $CD4^+$ T cells and peripheral blood $CD4^+$ T cells; this hypothesis is supported by the fact that sorted $CD4^+$ T cells from adipose tissue and PBMCs had similar HIV DNA contents. In contrast, replication-competent HIV was detected in the SVF only in two patients. The high frequency of memory $CD4^+$ T cells in adipose tissue (relative to PBMCs) may explain the high proportion of latently infected cells. Otherwise the number of latently infected $CD4^+$ T cells in adipose tissue might be higher than in PBMCs in some patients on ART. These findings emphasize the need to sample several tissues when studying HIV reservoirs in patients on ART. Further investigation (using limiting dilution assays) is necessary but would be technically challenging (given the low numbers of resident tissue $CD4^+$ T cells in patients).

Overall, we were able to demonstrate the persistence of HIV DNA and RNA within stromal vascular cells in adipose tissue recovered from ART-treated HIV-infected patients. These observations were supported by the results of *in vitro* reactivation experiments, showing that adipose $CD4^+$ T cells contained replication-competent HIV. This dataset strongly supports the hypothesis whereby adipose tissue constitutes an important viral reservoir. Adipose tissue may thus constitute a favorable environment for viral persistence for several reasons: (a) constant inflammation favors viral replication, (b) the presence of elevated fractions of activated and central memory $CD4^+$ T cells, which are HIV's natural targets, (c) the potentially insufficient distribution of some antiretroviral drugs into adipose tissue [44], which may favor viral persistence, and (d) the specific metabolic and immune activity of adipose tissue, which may affect the effectiveness of immune responses [74].

In the present work, our analyses of SCAT and VAT from SIV-infected macaques and ART-suppressed patients, showed that (i) SIV infection induced immune activation and a pro-inflammatory profile in adipose tissue immune cells and (ii) these immune cells were indeed infected by SIV/HIV. These results indicate that adipose tissue constitutes a new, relatively large reservoir for the virus that could be involved in chronic immune activation and low-grade inflammation. Our observations have major implications in the context of HIV disease. Firstly, they emphasize the crucial requirement for the broad diffusion of antiretroviral drugs within tissues; combination therapy must include drugs that diffuse not only into adipose

tissues but also into tissue $CD4^+$ T cells and macrophages. Two main mechanisms may prevent efficient activity of ART on adipose infected cells: (i) low accessibility of ART to fat tissue [44], (ii) sequestration of drugs inside the lipid droplets at the expense of adipose infected immune cells [75]. Secondly, they provide an interesting rationale for the use of drugs with metabolic activity. It might be interesting to reconsider the anti-inflammatory impact of statins [76,77] by focusing on adipose sites and addressing the drugs' potential impact on viral reservoirs. Thirdly, gender differences in adipose tissue distribution, the inflammatory profile and immune cell content [78] may underlie differential susceptibility to the establishment of viral reservoirs. Fourthly, our results open up new therapeutic strategies for limiting the size of viral reservoirs, chronic inflammation and associated comorbidities (via the modulation of adipose tissue related pathways rather than strictly immune pathways).

Materials and Methods

Animals, infection and sample collection

Twenty-three adult cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) were infected via the intravenous, intravaginal or intrarectal route with 0.5 to 5,000 50% animal infectious doses (AID50) of SIVmac251 biological isolate and monitored for 15 months (median value, interquartile range: [11–18]). SIV infection in cynomolgus macaques closely recapitulates the major features of HIV infection, including progression towards AIDS. At sacrifice, the plasma viral load in SIV-infected animals was $4.4x10^4$ [$0.7x10^4$-$6.7x10^4$] RNA copies/mL. Twenty one non-SIV-infected animals were used as controls. At sacrifice, blood samples and 10 to 35g samples of abdominal subcutaneous adipose tissue (SCAT) and visceral adipose tissue (VAT) were collected. Adipose tissues were devascularized to prevent blood contamination. PBMCs were isolated from EDTA-anticoagulated blood by Ficoll density gradient centrifugation.

Ethics statement

Adult cynomolgus macaques were imported from Mauritius and housed in the animal facility at the *Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives* (CEA, Fontenay-aux-Roses, France). Non-human primates (NHPs, which include cynomolgus macaques) are housed and handled in accordance with French national regulations and subject to inspection by the veterinary authorities (CEA Permit Number A 92-032-02). The CEA facility complies with the Standards for Human Care and Use of Laboratory of the Office for Laboratory Animal Welfare (OLAW, USA) under OLAW assurance number #A5826-01. The use of NHPs at CEA is also in line with the European Directive (2010/63, recommendation Nu9). The animals were used under the supervision of the veterinarians in charge of the animal facility. The study protocols were reviewed by the CEA's Animal Care and Handling Committee (*Comité d'Ethique en Expérimentation Animale*, registered with the French Ministry of Research). Animals were housed in adjoining, individual cages (allowing social interactions) and under controlled humidity, temperature and light conditions (12-hour light/12-hour dark cycles). Water was available ad libitum. Animals were monitored and fed with commercial monkey chow and fruits once or twice daily by trained personnel. Macaques were provided with environmental enrichment, including toys, novel foodstuffs and music under the supervision of the CEA's Animal Care and Handling Committee.

After sedation with ketamine chlorhydrate, animals were sacrificed by intracardiac injection of sodium pentobarbital (Vetoquinol, Paris, France; 180 mg/kg).

Human samples

All 13 patients provided their written, informed consent to participation. The study protocol was approved by the regional investigational review board (*Comité de Protection des Personnes Ile-de-France VII* (Paris, France)). Adipose tissue samples from 13 ART-treated HIV-1-infected patients were recovered during elective abdominal surgery for non-AIDS-related indications. SVF was isolated from fresh samples. The 13 patients were on long-term ART and had displayed an undetectable viral load for over four years. In eleven patients, SVF samples were screened for HIV DNA. Five SVF samples were reserved for an HIV DNA assay in sorted fractions and 6 were reserved for the *in vitro* reactivation assay. *In situ* hybridization was performed on fixed adipose sections from three patients on ART and on a prostate sample (from a viremic patient) as a positive control.

Isolation of the stromal vascular fraction (SVF)

SCAT and VAT were weighed, washed twice in PBS 1X 5% fetal bovine serum (FBS), cut into pieces of 2 to 3 mm and then digested in a bath of collagenase (C2139, Sigma) at a concentration of 0.33 mg /mL in DMEM supplemented with 5% FBS for 30 min at 37°C with constant shaking. Mechanical dissociation by suction/discharge with a 10 mL syringe was then performed. Next, the adipose suspension was filtered through a 100 micron mesh. Following an initial low-speed centrifugation (300*g*, 10 min), adipocytes (the upper phase) were separated and the lower phase (comprising the SVF cells) was centrifuged further. After two additional washes, the pellet containing the SVF was resuspended in PBS with 5% FBS. SVF cell suspensions were then counted in Malassez counting chambers (C-chip, NanoEntek, Seoul, Korea) under the microscope, using Trypan blue to exclude dead cells. SVF was either directly frozen for molecular analyses, frozen in FBS 10% DMSO for cell preservation, and/or sorted or analyzed immediately by flow cytometry.

Phenotypic characterization of macrophages and T lymphocytes from adipose tissue

Staining was performed after the saturation of Fc receptors by incubation with FC block (BD), mouse serum (eBiosciences) and healthy macaque serum (an in-house preparation) for 30 min at 4°C. Amine-reactive blue dye (Live/dead Fixable, Life Technologies) was used to assess cell viability and exclude dead cells from the analysis. Cells were stained with monoclonal antibodies (incubation for 15 min at 4°C), washed in PBS 1X/10% FBS and fixed in commercial fixative solution (CellFIX, BD Biosciences).

A variety of antibody panels were used to study adipose tissue T lymphocytes and macrophages [55]. Macrophages were identified using the following panel: CD16 V450 (Clone 3G8)/ CD206 FITC (Clone 19.2)/ CD14 PerCPCy5.5 (M5E2)/ CD163 APC (GHI/61)/ CD11b PECY7 (BEAR1)/ HLA-DR PECF574 (G46-6)/ CD3 AF700 (SP34-2). Corresponding isotype controls for CD163 and CD206 were used at the same concentrations as the reference antibody, in accordance with the manufacturer's instructions. Lymphocyte subsets were analyzed as follows: CD45 V500 (D058-1283 for macaques, HI-30 for humans)/ CD4 PerCPCy5.5 (L200) / CD8 V450 (leu2a)/ CD95 APC (DX-2)/ CD28 PE (CD28.2) / HLA-DR PECY7 (G46-6)/ CD20 AF700 (2H7)/ Ki-67 FITC (B56). Additional combinations with CCR5 APC (3A9), CD69 PECY7 (FN50) antibodies were also applied. All antibodies were purchased from BD Biosciences, with the exception of anti-CD11b (Beckman-Coulter). Data were acquired with an LSR Fortessa cell analyzer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Treestar).

Microscopy and immunochemistry

Samples of SCAT and VAT were fixed in 4% buffered formalin and embedded in paraffin. Sections (thickness: 3 microns) were stained with hematoxylin/eosin/saffron reagent. Adipocytes were counted in an average of 10 high-power fields (HPFs). Parallel sections were immunostained for CD3 (clone F.2.38, Dako), CD4 (clone 4B12, Leica Biosystem), TIA1 (TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein, clone 2G9, Immunotech) and CD68 (clone PG-M1, Dako), in order to identify $CD4^+$ T lymphocytes, cytotoxic T cells and macrophages. Unless otherwise stated, intravascular leucocytes were excluded from counting, although T cells located in the vicinity of capillaries or far from capillaries were also studied.

Sorting of adipose $CD4^+$ T cells and $CD14^+$ macrophages

SVF cells from SCAT and VAT were stained as described above, using amine-reactive blue dye to identify the dead cells. $CD4^+CD3^+CD45^+L/D^-$ cells ($CD4^+$ T cells) in macaques and humans, $CD14^+CD3^-CD20^-CD45^+L/D^-$ cells in macaques and $CD14^+CD206^+CD3^-CD20^-CD45^+L/D^-$ cells (macrophages) in humans were sorted on a FACS ARIA cell sorter (BD Biosciences). The gating strategy for macrophage isolation used CD14 fluorescence minus one (FMO) control staining to eliminate contamination due to potential auto-fluorescence of SVF cells. Sorting purity profile are presented in S7 Fig. In both NHPs and humans, sorting purity was consistently greater than 95% (CD14-expressing cells: 97.2% [95.1–98.7], $CD4^+$ T cells: 96.9% [96.1–99.1]).

SIV DNA and RNA detection

RNA and DNA were extracted from cells as follows: $1x10^6$ PBMCs or SVF cells and various numbers of sorted $CD4^+$ and $CD14^+$ cell numbers (ranging from 50000 to 200000) were resuspended in 350 μL of RLT buffer (Qiagen, France). 200 μL of TE buffer were added. Next, NaCl (5M) was added. The mixture was incubated at 4°C for between 15 and 60 min, followed by centrifugation for 15 min at 3000 rpm and 4°C. RNA was precipitated from the supernatant using pH 4.5 phenol/chloroform (Sigma-Aldrich) at a v/v ratio of 5:1. 200 μl of TE buffer was added to the pellet. DNA was then precipitated from the mixture in phenol/chloroform/isoamyl alcohol 25:24:1 (pH = 8, Sigma Aldrich). Cell-associated viral DNA and RNA were measured by qPCR as described previously, using primers and probes designed specifically for SIVmac251 isolates [79]. PCRs were performed in duplicate; the detection limits were 35 SIV DNA copies/10^6 cells and 50 SIV RNA copies/10^6 CCR5 copies. Only reactions for which duplicates gave consistent results were included. Positive and negative controls were used to rule out sample contamination. SIVmac plasmids were used as standards to calculate SIV DNA copy numbers. Primers and plasmids for CCR5 were used to normalize the viral levels against the number of cells [80]. Plasma SIV RNA was quantified as previously described [81].

Ultrasensitive total HIV-DNA and HIV-RNA quantification

Total HIV DNA was quantified in an ultrasensitive real-time PCR assay of frozen SVF cells, sorted adipose $CD4^+$ and $CD14^+$ cells in SVF, and PBMCs using the GENERIC HIV-DNA assay from Biocentric (Bandol, France), as previously described [82,83]. Total DNA was extracted with a QIAamp All prep DNA/RNA microkit or minikit (Qiagen), depending on the number of cells available (less than and more than 1 million cells, respectively). The entire HIV-DNA extract was tested in two to four replicates, with a threshold of 2 HIV-DNA copies per PCR. The thresholds varied according to the available cell numbers and were calculated for each sample. $1x10^6$ cells were analyzed for total SVF and PBMC samples. Sorted SVF $CD4^+$ and $CD14^+CD206^+$ cell numbers were consistently lower (from 14000 to 320000), and so the

detection limit was set to <3.23 log copies/10^6 cells. Following *in vitro* reactivation, HIV-RNA was quantified in culture supernatants using an ultrasensitive real-time PCR assay (GENERIC HIV, Biocentric, Bandol, France). The extracts were tested in two to five replicates [84].

In situ hybridization

Paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissues were assayed for SIVmac and HIV-1 RNA expression using a digoxigenin-antidigoxigenin technique, as previously described [67,85]. The digoxigenin-UTP-labeled riboprobe spanned the whole SIVmac or HIV-1 genome (Lofstrand Labs Ltd, Gaithersburg, MD, USA). Nitroblue tetrazolium-5-bromo-4-chloro-3-indollylphosphate toluidinium revelation was used to detect infected cells in the tissues. The specificity of the hybridization signal was always checked by hybridizing sense probes on parallel sections and anti-sense probes on non-infected adipose tissues. Prostate tissues from a viremic SIV-infected macaque and from HIV-infected patients were used as positive controls, as previously described [86–88].

In vitro reactivation assay

Cell fractions recovered from ART-treated, HIV-infected patients were stimulated with phytohemagglutinin (0.3 μg/mL, Sigma), IL-2 (25 μg/mL, Immunotools) (for SVF and T cell fractions) and LPS (1 μg/mL, Sigma) (for CD14-expressing cells) and co-cultured with allogeneic pre-activated $CD4^+$ T cells at a ratio of 1:2.5. Allogeneic $CD4^+$ T cells were purified from PBMCs from healthy donors by positive selection using magnetic beads (Miltenyi). At day (D) 7 and D14, reactivation was sustained by novel addition of pre-activated $CD4^+$ T cells. Supernatants were collected at D3, 7, 11, 14, 17 and 21 and cell pellets were collected at D21. The number of cells used in the reactivation assay depending on the cell fraction isolated from adipose tissue SVF: $1x10^6$ for the total SVF fraction, $1x10^5$ to $5x10^5$ for sorted $CD4^+$ T cells, and $5x10^4$ to $2x10^5$ for sorted, CD14-expressing cells. As negative controls, $1x10^6$ SVF cells were cultured in the absence of allogeneic, pre-activated $CD4^+$ T cells.

Statistical analysis

Data are quoted as the median [interquartile range]. Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism 5.03 software (GraphPad Software Inc.). A Mann-Whitney non-parametric test was used to compare data from SIV-infected and non-infected macaques. A Wilcoxon matched-pair signed rank test was used to compare different tissues from the same animal. In graphs, the thresholds for statistical significance are indicated as follows: * $p<0.05$; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Supporting Information

S1 Fig. The influence of SIV infection on $CD8^+$ T cell differentiation. Representative dot plots showing the gating strategies used to define Tn, Tcm, Ttm and Tem subsets among CD8 T cells (based on CD28, CD95 and CCR5 staining) in SCAT and VAT. The right-hand panels show the distribution of $CD8^+$ T cells among the different subsets in non-infected animals (n = 5, open column) and SIV-infected animals (n = 7, filled column). Data are quoted as the median [interquartile range]. A Mann-Whitney non-parametric test was used.
(TIF)

S2 Fig. Differences in cell composition and phenotype between SVF cells and PBMCs. (A) The percentages of Tn $CD4^+$ T cells ($CD95^+CD28^{int}$) in SCAT, VAT and PBMCs from pooled infected animals (n = 8) animals and non-infected animals (n = 8). (B) The percentage of Tm $CD4^+$ T cells ($CD95^+CD28^+CCR5^{+/-}$) in SCAT, VAT and PBMCs from infected and non-

infected animals. (C) The percentage of CD20-expressing cells among the $CD45^+$ fraction in SCAT, VAT and PBMCs from pooled infected animals (n = 5) and non-infected animals (n = 7). Datasets from SIV-infected animals (n = 7) and non-infected animals (n = 5–7) were pooled, since there was no apparent difference between the two groups.
(TIF)

S3 Fig. The lack of a significant influence of SIV infection on Ki67 expression on adipose tissue T cells. The percentage of Ki67-expressing cells among $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells recovered from SCAT and/or VAT from 7 infected animals (filled symbols) and 7 non-infected animals (open symbols). Values from peripheral blood T cells are shown when available (n = 5–6).
(TIF)

S4 Fig. Difference in the proportion of CD14-expressing cells and their phenotype in SVF cells and PBMCs. (A) Dot plots showing the co-expression of CD206 and CD163 on CD14-expressing cells. Due to high levels of auto-fluorescence, the gating strategy was defined using isotype controls for either anti-CD163 or anti-CD206 antibodies and an unstained approach for the CD163 and CD206 fractions. (B) Graphs showing the percentage of each fraction in CD14-expressing cells recovered from SCAT, VAT and PBMCs from 8 non-infected animals. Similar observations were made in SIV-infected animals. Data are quoted as the median [interquartile range]. Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.
(TIF)

S5 Fig. The influence of SIV infection on macrophage phenotype in VAT. Expression of CD206 and CD163 on adipose-resident CD14-expressing cells recovered from VAT from non-infected animals (open circles, n = 8) and SIV-infected animals (filled squares, n = 6). Gating strategies are shown in S4 Fig. Data are quoted as the median [interquartile range]. Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as * $p<0.05$.
(TIF)

S6 Fig. Comparison of SIV DNA and RNA contents in $CD4^+$ T cells and CD14-expressing cells from different tissues (adipose tissue, PBMCs and lymph nodes). Comparison of SIV DNA and RNA levels in sorted $CD4^+$ T cell and $CD14^+$ cell fractions recovered from different organs (adipose tissue, PBMCs and lymph nodes) in four SIV-infected animals. SIV DNA and RNA assays were performed in duplicate and the results are expressed in log SIV DNA copies per million cells. Due to the low numbers of $CD14^+$ cells recovered from lymph node, $CD14^+$ cells were sorted from spleen for two animals. Data are quoted as the median [interquartile range]. A Mann-Whitney non-parametric test was used.
(TIF)

S7 Fig. Sorting purity. A representative sorting strategy used for $CD14^+$ cells and $CD4^+$ T cells. Dot plots of cells from a non-infected animal before and after sorting are shown. In both NHPs and humans, sorting purity was consistently over 95% ($CD14^+$ cells: 97.2% [95.1–98.7], $CD4^+$ T cells: 96.9% [96.1–99.1]).
(TIF)

Acknowledgments

We thank C. Joubert and J.M. Helies for veterinary assistance and the IDMIT (National Center for Infectious Diseases Models and Innovative Therapies) core facilities for excellent technical assistance. We thank Professor Marc Tardieu and Professor Jean-François Delfraissy for their

support, Dr. Marc Lombès and Dr. Louis Casteilla for their expertise in metabolic and adipose tissue analyses and their help with the initiation of this project. We also thank Camille Lécuroux for critical reading of the manuscript and helpful discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AD OL CB. Performed the experiments: AD TL NH APS LD CG AM JG NN GP VM SB VB. Analyzed the data: AD TL NH NDR VAF NN AC BF BV CR JC MMT NDB RLG OL CB. Contributed reagents/materials/analysis tools: TL NH NDR VAF JG GP VM SB NDB. Wrote the paper: CB OL.

References

1. Kuller LH, Tracy R, Belloso W, Wit S De, Drummond F, Lane HC, et al. Inflammatory and Coagulation Biomarkers and Mortality in Patients with HIV Infection. PLoS Med. 2008; 5: 1496–1508. doi: 10.1371/journal.pmed.0050203
2. Deeks SG. HIV Infection, Inflammation, and Aging. Annu Rev Med. 2011; 62: 141–055. doi: 10.1146/annurev-med-042909-093756 PMID: 21090961
3. Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. Immunity. 2013; 39: 633–45. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.001 PMID: 24138880
4. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, Mccune JM, Roland M, Page-shafer K, et al. Relationship between T Cell Activation and CD4+ T Cell Count in HIV-Seropositive Individuals with Undetectable Plasma HIV RNA Levels in the Absence of Therapy. J Infect Dis. 2008; 197: 126–133. doi: 10.1086/524143 PMID: 18171295
5. Noel N, Boufassa F, Lécuroux C, Saez-Cirion A, Bourgeois C, Dunyach-Remy C, et al. Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low $CD4^+$ T-cell counts in HIV controller patients. AIDS. 2014; 28: 467–76. doi: 10.1097/QAD.0000000000000174 PMID: 24378753
6. Eisele E, Siliciano RF. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. Immunity. 2012; 37: 377–88. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.010 PMID: 22999944
7. Lambert-Niclot S, Tubiana R, Beaudoux C, Lefebvre G, Caby F, Bonmarchand M, et al. Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma on a 2002–2011 survey. AIDS. 2012; 26: 971–5. doi: 10.1097/QAD.0b013e328352ae09 PMID: 22382146
8. Zink MC, Brice AK, Kelly KM, Queen SE, Gama L, Li M, et al. Simian immunodeficiency virus-infected macaques treated with highly active antiretroviral therapy have reduced central nervous system viral replication and inflammation but persistence of viral DNA. J Infect Dis. 2010; 202: 161–70. doi: 10.1086/653213 PMID: 20497048
9. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. Nat Med. 2006; 12: 1365–1371. PMID: 17115046
10. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection : causes and consequences. J Pathol. 2008; 214: 231–241. doi: 10.1002/path.2276 PMID: 18161758
11. Paiardini M, Müller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation. Immunol Rev. 2013; 254: 78–101. doi: 10.1111/imr.12079 PMID: 23772616
12. Costiniuk CT, Angel JB. Human immunodeficiency virus and the gastrointestinal immune system: does highly active antiretroviral therapy restore gut immunity? Mucosal Immunol. 2012; 5: 596–604. doi: 10.1038/mi.2012.82 PMID: 22929559
13. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89: 2548–2556. PMID: 15181022
14. Madani R, Karastergiou K, Ogston NC, Miheisi N, Bhome R, Haloob N, et al. RANTES release by human adipose tissue in vivo and evidence for depot-specific differences. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009; 296: E1262–8. doi: 10.1152/ajpendo.90511.2008 PMID: 19240255
15. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Release Is Higher in Visceral than Subcutaneous Human Adipose Tissue (AT): Implication of Macrophages Resident in the AT. 2005; 90: 2282–2289. doi: 10.1210/jc.2004-1696 PMID: 15671098
16. Maury E, Ehala-Aleksejev K, Guiot Y, Detry R, Vandenhooft A, Brichard SM. Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007; 293: E656–65. PMID: 17578888

17. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82: 4196–200. doi: 10.1210/jcem.82.12.4450 PMID: 9398739

18. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83: 847–50. doi: 10.1210/jcem.83.3.4660 PMID: 9506738

19. Stofkova A. Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. Endocr Regul. 2009; 43: 157–68. PMID: 19908934

20. Procaccini C, Lourenco E V, Matarese G, La Cava A. Leptin signaling: A key pathway in immune responses. Curr Signal Transduct Ther. 2009; 4: 22–30. doi: 10.2174/157436209787048711 PMID: 19774101

21. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat Publ Gr. Nature Publishing Group; 2011; 11: 85–97. doi: 10.1038/nri2921

22. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. 2006; 444. doi: 10.1038/nature05485 PMID: 17167474

23. Mathis D, Shoelson SE. Immunometabolism: an emerging frontier. Nat Rev Immunol. 2011; 11: 81. doi: 10.1038/nri2922 PMID: 21469396

24. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. 2007; 117. doi: 10.1172/JCI29881 both PMID: 17200717

25. Hruskova Z, Biswas SK. Previews A New "' Immunological '" Role for Adipocytes in Obesity. CMET. Elsevier; 2013; 17: 315–317. doi: 10.1016/j.cmet.2013.02.015

26. Weisberg SP, Mccann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest. 2003; 112: 1796–1808. doi: 10.1172/JCI200319246 Introduction PMID: 14679176

27. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. Nat Med. 2009; 15: 914–920. doi: 10.1038/nm.1964 PMID: 19633658

28. Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Decaunes P, Maumus M, Chiotasso P, et al. Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. Arter Thromb Vasc Biol. 2009; 29: 1608–1614.

29. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. Nat Med. Nature Publishing Group; 2009; 15: 1–11. doi: 10.1038/nm.2002

30. Deng T, Lyon CJ, Minze LJ, Lin J, Zou J, Liu JZ, et al. Article Class II Major Histocompatibility Complex Plays an Essential Role in Obesity-Induced Adipose Inflammation. Cell Metab. Elsevier Inc.; 2013; 17: 411–422. doi: 10.1016/j.cmet.2013.02.009 PMID: 23473035

31. Guilherme A, Virbasius J V, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008; 9: 367–77. doi: 10.1038/nrm2391 PMID: 18401346

32. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25: 2062–8. doi: 10.1161/01.ATV.0000183883.72263.13 PMID: 16123319

33. Giralt M, Domingo P, Guallar JP, Rodriguez de la Concepción ML, Alegre M, Domingo JC, et al. HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV- 1/HAART-associated lipodystrophy. Antivir Ther. 2006; 11: 729–40. PMID: 17310817

34. Giralt M, Domingo P, Villarroya F. Adipose tissue biology and HIV-infection. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. Elsevier Ltd; 2011; 25: 487–99. doi: 10.1016/j.beem.2010.12.001 PMID: 21663842

35. Capel E, Auclair M, Caron-Debarle M, Capeau J. Effects of ritonavir-boosted darunavir, atazanavir and lopinavir on adipose functions and insulin sensitivity in murine and human adipocytes. Antivir Ther. 2012; 17: 549–56. doi: 10.3851/IMP1988 PMID: 22293506

36. Caron-Debarle M, Lagathu C, Boccara F, Vigouroux C, Capeau J. HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. Trends Mol Med. Elsevier Ltd; 2010; 16: 218–29. doi: 10.1016/j.molmed.2010.03.002 PMID: 20400373

37. Díaz-Delfín J, Domingo P, Wabitsch M, Giralt M, Villarroya F. HIV-1 Tat protein impairs adipogenesis and induces the expression and secretion of proinflammatory cytokines in human SGBS adipocytes. Antivir Ther. 2012; 17: 529–40. doi: 10.3851/IMP2021 PMID: 22301094

38. Díaz-Delfín J, Domingo P, Mateo MG, Gutierrez MDM, Domingo JC, Giralt M, et al. Effects of rilpivirine on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56: 3369–75. doi: 10.1128/AAC.00104-12 PMID: 22430974

39. Lindegaard B, Hansen A-BE, Pilegaard H, Keller P, Gerstoft J, Pedersen BK. Adipose tissue expression of IL-18 and HIV-associated lipodystrophy. AIDS. 2004; 18: 1956–8. PMID: 15353983

40. Jan V, Cervera P, Maachi M, Baudrimont M, Kim M, Vidal H, et al. Altered fat differentiation and adipocytokine expression are inter-related and linked to morphological changes and insulin resistance in HIV-1-infected lipodystrophic patients. Antivir Ther. 2004; 9: 555–64. PMID: 15456087

41. Johnson JA, Albu JB, Engelson ES, Fried SK, Inada Y, Ionescu G, et al. Increased systemic and adipose tissue cytokines in patients with HIV-associated lipodystrophy. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004; 286: E261–71. doi: 10.1152/ajpendo.00056.2003 PMID: 14532165

42. Gallego-Escuredo JM, Villarroya J, Domingo P, Targarona EM, Alegre M, Domingo JC, et al. Differentially altered molecular signature of visceral adipose tissue in HIV-1-associated lipodystrophy. J Acquir Immune Defic Syndr. 2013; 64: 142–8. doi: 10.1097/QAI.0b013e31829bdb67 PMID: 23714743

43. Shikuma CM, Gangcuangco LMA, Killebrew DA, Libutti DE, Chow DC, Nakamoto BK, et al. The role of HIV and monocytes/macrophages in adipose tissue biology. J Acquir Immune Defic Syndr. 2014; 65: 151–9. doi: 10.1097/01.qai.0000435599.27727.6c PMID: 24091690

44. Dupin N, Buffet M, Marcelin A-G, Lamotte C, Gorin I, Ait-Arkoub Z, et al. HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV-infected patients with lipodystrophy. AIDS. 2002; 16: 2419–24. PMID: 12461415

45. Hazan U, Romero IA, Cancello R, Valente S, Perrin V, Mariot V, et al. Human adipose cells express CD4, CXCR4, and CCR5 [corrected] receptors: a new target cell type for the immunodeficiency virus-1? FASEB J. 2002; 16: 1254–6. doi: 10.1096/fj.01-0947fje PMID: 12153994

46. Munier S, Borjabad A, Lemaire M, Mariot V, Hazan U. In vitro infection of human primary adipose cells with HIV-1: a reassessment. AIDS. 2003; 17: 2537–9. doi: 10.1097/01.aids.0000096866.36052.84 PMID: 14600528

47. Maurin T, Saillan-Barreau C, Cousin B, Casteilla L, Doglio A, Pénicaud L. Tumor necrosis factor-alpha stimulates HIV-1 production in primary culture of human adipocytes. Exp Cell Res. 2005; 304: 544–51. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.12.003 PMID: 15748898

48. Agarwal N, Iyer D, Patel SG, Sekhar R V, Phillips TM, Schubert U, et al. HIV-1 Vpr induces adipose dysfunction in vivo through reciprocal effects on PPAR/GR co-regulation. Sci Transl Med. 2013; 5: 213ra164. doi: 10.1126/scitranslmed.3007148

49. Otake K, Omoto S, Yamamoto T, Okuyama H, Okada H, Okada N, et al. HIV-1 Nef protein in the nucleus influences adipogenesis as well as viral transcription through the peroxisome proliferator-activated receptors. AIDS. 2004; 18: 189–98. PMID: 15075535

50. Cui HL, Ditiatkovski M, Kesani R, Bobryshev Y V, Liu Y, Geyer M, et al. HIV protein Nef causes dyslipidemia and formation of foam cells in mouse models of atherosclerosis. FASEB J. 2014; 28: 2828–39. doi: 10.1096/fj.13-246876 PMID: 24642731

51. Kaminski DA, Randall TD. Adaptive immunity and adipose tissue biology. Trends Immunol. 2010; 31: 384–390. doi: 10.1016/j.it.2010.08.001 PMID: 20817556

52. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. Obes Rev. 2010; 11: 11–18. doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x PMID: 19656312

53. Chéret A, Le Grand R, Caufour P, Neildez O, Matheux F, Théodoro F, et al. Chemoattractant factors (IP-10, MIP-1alpha, IL-16) mRNA expression in mononuclear cells from different tissues during acute SIVmac251 infection of macaques. J Med Primatol. 1997; 26: 19–26. PMID: 9271185

54. Chéret A, Le Grand R, Caufour P, Neildez O, Matheux F, Théodoro F, et al. RANTES, IFN-gamma, CCR1, and CCR5 mRNA expression in peripheral blood, lymph node, and bronchoalveolar lavage mononuclear cells during primary simian immunodeficiency virus infection of macaques. Virology. 1999; 255: 285–93. doi: 10.1006/viro.1998.9558 PMID: 10069954

55. Bernard-Stoecklin S, Gommet C, Corneau AB, Guenounou S, Torres C, Dejucq-Rainsford N, et al. Semen CD4+ T cells and macrophages are productively infected at all stages of SIV infection in macaques. PLoS Pathog. 2013; 9: e1003810. doi: 10.1371/journal.ppat.1003810 PMID: 24348253

56. Leone A, Rohankhedkar M, Okoye A, Legasse A, Axthelm MK, Villinger F, et al. Increased CD4+ T cell levels during IL-7 administration of antiretroviral therapy-treated simian immunodeficiency virus-positive macaques are not dependent on strong proliferative responses. J Immunol. 2010; 185: 1650–9. doi: 10.4049/jimmunol.0902626 PMID: 20622118

57. Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, Turner D, Camp P, Thome JJC, et al. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. Immunity. Elsevier Inc.; 2013; 38: 187–97. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.020 PMID: 23260195

58. Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR, Carbone FR. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. Nat Immunol. 2009; 10: 524–30. doi: 10.1038/ni.1718 PMID: 19305395

59. Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. Trends Immunol. 2011; 32: 307–14. doi: 10.1016/j.it.2011.04.008 PMID: 21616718

60. Vidal F, Domingo P, Villarroya F, Giralt M, López-Dupla M, Gutiérrez M, et al. Adipogenic/lipid, inflammatory, and mitochondrial parameters in subcutaneous adipose tissue of untreated HIV-1-infected long-term nonprogressors: significant alterations despite low viral burden. J Acquir Immune Defic Syndr. 2012; 61: 131–7. doi: 10.1097/QAI.0b013e31825c3a68 PMID: 22580565

61. Muthumani K, Choo AY, Premkumar A, Hwang DS, Thieu KP, Desai BM, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr-regulated cell death: insights into mechanism. Cell Death Differ. 2005; 12 Suppl 1: 962–70. doi: 10.1038/sj.cdd.4401583 PMID: 15832179

62. Shrivastav S, Kino T, Cunningham T, Ichijo T, Schubert U, Heinklein P, et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-1 viral protein R suppresses transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor {gamma} and inhibits adipocyte differentiation: implications for HIV-associated lipodystrophy. Mol Endocrinol. 2008; 22: 234–47. doi: 10.1210/me.2007-0124 PMID: 17932108

63. Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. World J Stem Cells. 2011; 3: 25–33. doi: 10.4252/wjsc.v3.i4.25 PMID: 21607134

64. Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, et al. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. doi: 10.1096/fj.08-126946

65. Nazari-Shafti TZ, Freisinger E, Roy U, Bulot CT, Senst C, Dupin CL, et al. Mesenchymal stem cell derived hematopoietic cells are permissive to HIV-1 infection. Retrovirology. 2011; 8: 3. doi: 10.1186/1742-4690-8-3 PMID: 21226936

66. Mannioui A, Bourry O, Sellier P, Delache B, Brochard P, Andrieu T, et al. Dynamics of viral replication in blood and lymphoid tissues during SIVmac251 infection of macaques. Retrovirology. 2009; 6: 106. doi: 10.1186/1742-4690-6-106 PMID: 19930655

67. Moreau M, Le Tortorec A, Deleage C, Brown C, Denis H, Satie A-P, et al. Impact of short-term HAART initiated during the chronic stage or shortly post-exposure on SIV infection of male genital organs. PLoS One. 2012; 7: e37348. doi: 10.1371/journal.pone.0037348 PMID: 22615988

68. Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, Kranias G, et al. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. J Clin Invest. 2012; 122: 3271–80. doi: 10.1172/JCI64314 PMID: 22922259

69. Fukazawa Y, Lum R, Okoye AA, Park H, Matsuda K, Bae JY, et al. B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. Nat Med. 2015; 21: 132–9. doi: 10.1038/nm.3781 PMID: 25599132

70. Lucas S, Taront S, Magnan C, Fauconnier L, Delacre M, Macia L, et al. Interleukin-7 regulates adipose tissue mass and insulin sensitivity in high-fat diet-fed mice through lymphocyte-dependent and independent mechanisms. PLoS One. 2012; 7: e40351. doi: 10.1371/journal.pone.0040351 PMID: 22768283

71. Lam YY, Mitchell AJ, Holmes AJ, Denyer GS, Gummesson A, Caterson ID, et al. Role of the gut in visceral fat inflammation and metabolic disorders. Obesity (Silver Spring). 2011; 19: 2113–20. doi: 10.1038/oby.2011.68

72. Gregor MF, Hotamisligil S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. Annu Rev Immunol. 2011; 29: 415–445. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322 PMID: 21219177

73. Couturier J, Suliburk JW, Brown JM, Luke DJ, Agarwal N, Yu X, et al. Human adipose tissue as a reservoir for memory CD4+ T cells and HIV. AIDS. 2015; 29: 667–74. doi: 10.1097/QAD.0000000000000599 PMID: 25849830

74. Duffaut C, Zakaroff-girard A, Bourlier V, Decaunes P, Maumus M, Chiotasso P, et al. Interplay Between Human Adipocytes and T Lymphocytes. 2009; 1608–1614. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.192583 PMID: 19644053

75. Vernochet C, Azoulay S, Duval D, Guedj R, Cottrez F, Vidal H, et al. Human immunodeficiency virus protease inhibitors accumulate into cultured human adipocytes and alter expression of adipocytokines. J Biol Chem. 2005; 280: 2238–43. doi: 10.1074/jbc.M408687200 PMID: 15525648

76. De Wit S, Delforge M, Necsoi CV, Clumeck N. Downregulation of CD38 activation markers by atorvastatin in HIV patients with undetectable viral load. AIDS. 2011; 25: 1332–3. doi: 10.1097/QAD.0b013e328347c083 PMID: 21508802

77. Calza L, Trapani F, Bartoletti M, Manfredi R, Colangeli V, Borderi M, et al. Statin therapy decreases serum levels of high-sensitivity C-reactive protein and tumor necrosis factor-α in HIV-infected patients treated with ritonavir-boosted protease inhibitors. HIV Clin Trials. 13: 153–61. doi: 10.1310/hct1303-153 PMID: 22592095

78. Fuente-Martín E, Argente-Arizón P, Ros P, Argente J, Chowen JA. Sex differences in adipose tissue: It is not only a question of quantity and distribution. Adipocyte. 2013; 2: 128–34. doi: 10.4161/adip.24075 PMID: 23991358

79. Hofmann-Lehmann R, Swenerton RK, Liska V, Leutenegger CM, Lutz H, McClure HM, et al. Sensitive and robust one-tube real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to quantify SIV RNA load: comparison of one- versus two-enzyme systems. AIDS Res Hum Retroviruses. 2000; 16: 1247–57. doi: 10.1089/08892220050117014 PMID: 10957722

80. Kornfeld C, Ploquin MJ-Y, Pandrea I, Faye A, Onanga R, Apetrei C, et al. Antiinflammatory profiles during primary SIV infection in African green monkeys are associated with protection against AIDS. J Clin Invest. 2005; 115: 1082–91. doi: 10.1172/JCI23006 PMID: 15761496

81. Karlsson I, Malleret B, Brochard P, Delache B, Calvo J, Le Grand R, et al. Dynamics of T-cell responses and memory T cells during primary simian immunodeficiency virus infection in cynomolgus macaques. J Virol. 2007; 81: 13456–68. doi: 10.1128/JVI.01619-07 PMID: 17913797

82. Avettand-Fenoel V, Prazuck T, Hocqueloux L, Melard A, Michau C, Kerdraon R, et al. HIV-DNA in rectal cells is well correlated with HIV-DNA in blood in different groups of patients, including long-term non-progressors. AIDS. 2008; 22: 1880–2. doi: 10.1097/QAD.0b013e32830fbdbc PMID: 18753926

83. Avettand-Fènoël V, Chaix M-L, Blanche S, Burgard M, Floch C, Toure K, et al. LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). J Med Virol. 2009; 81: 217–23. doi: 10.1002/jmv.21390 PMID: 19107966

84. Bacchus C, Cheret A, Avettand-Fenoël V, Nembot G, Mélard A, Blanc C, et al. A single HIV-1 cluster and a skewed immune homeostasis drive the early spread of HIV among resting CD4+ cell subsets within one month post-infection. PLoS One. 2013; 8: e64219. doi: 10.1371/journal.pone.0064219 PMID: 23691172

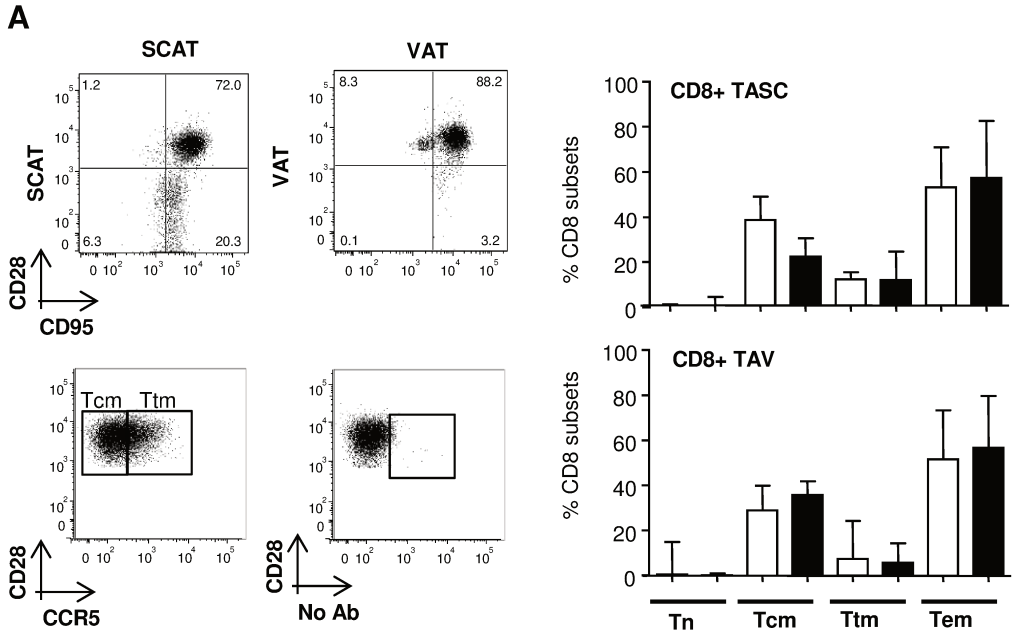
85. Canaud G, Dejucq-Rainsford N, Avettand-Fenoël V, Viard J-P, Anglicheau D, Bienaimé F, et al. The kidney as a reservoir for HIV-1 after renal transplantation. J Am Soc Nephrol. 2014; 25: 407–19. doi: 10.1681/ASN.2013050564 PMID: 24309185

86. Pudney J, Anderson D. Orchitis and human immunodeficiency virus type 1 infected cells in reproductive tissues from men with the acquired immune deficiency syndrome. Am J Pathol. 1991; 139: 149–60. PMID: 1853930

87. Le Tortorec A, Satie A-P, Denis H, Rioux-Leclercq N, Havard L, Ruffault A, et al. Human prostate supports more efficient replication of HIV-1 R5 than X4 strains ex vivo. Retrovirology. 2008; 5: 119. doi: 10.1186/1742-4690-5-119 PMID: 19117522

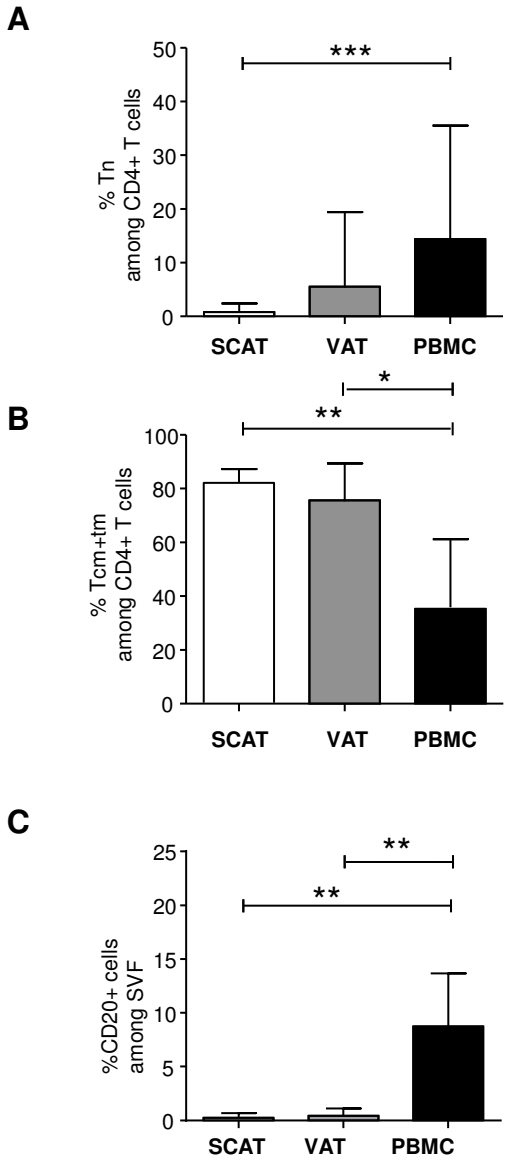
88. Matusali G, Dereuddre-Bosquet N, Le Tortorec A, Moreau M, Satie A-P, Mahé D, et al. Detection of Simian Immunodeficiency Virus in Semen, Urethra, and Male Reproductive Organs during Efficient Highly Active Antiretroviral Therapy. J Virol. 2015; 89: 5772–87. doi: 10.1128/JVI.03628-14 PMID: 25833047

Supporting figure 1



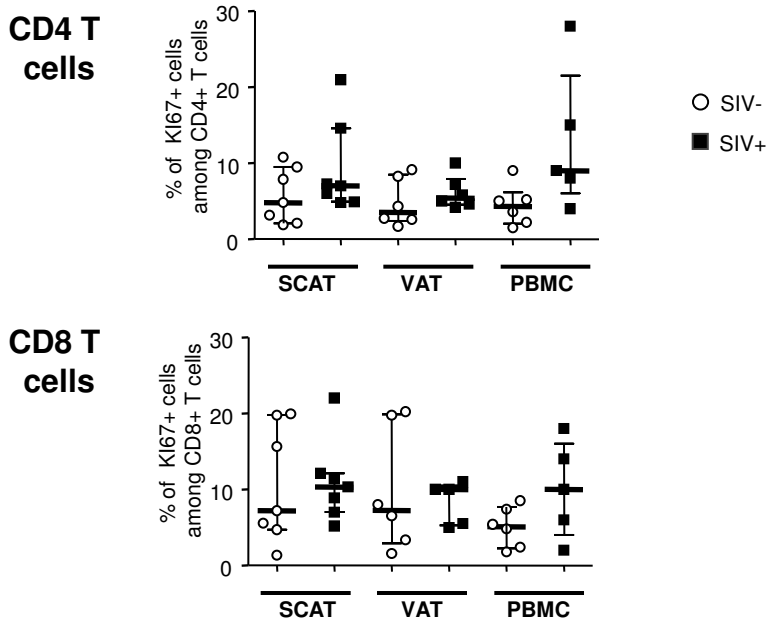
Sup Figure 1. The influence of SIV infection on CD8⁺ T cell differentiation.
Representative dot plots showing the gating strategies used to define Tn, Tcm, Ttm and Tem subsets among CD8 T cells (based on CD28, CD95 and CCR5 staining) in SCAT and VAT. The right-hand panels show the distribution of CD8⁺ T cells among the different subsets in non-infected animals (n = 5, open column) and SIV-infected animals (n = 7, filled column). Data are quoted as the median [interquartile range]. A Mann-Whitney non-parametric test was used.

Supporting figure 2



Sup Figure 2. Differences in cell composition and phenotype between SVF cells and PBMCs. (A) The percentages of Tn $CD4^+$ T cells ($CD95^+CD28^{int}$) in SCAT, VAT and PBMCs from pooled infected animals (n = 8) animals and non-infected animals (n = 8). (B) The percentage of Tm $CD4^+$ T cells ($CD95^+CD28^+CCR5^{+/-}$) in SCAT, VAT and PBMCs from infected and non-infected animals. (C) The percentage of CD20-expressing cells among the $CD45^+$ fraction in SCAT, VAT and PBMCs from pooled infected animals (n = 5) and non-infected animals (n = 7). Datasets from SIV-infected animals (n = 7) and non-infected animals (n = 5–7) were pooled, since there was no apparent difference between the two groups.

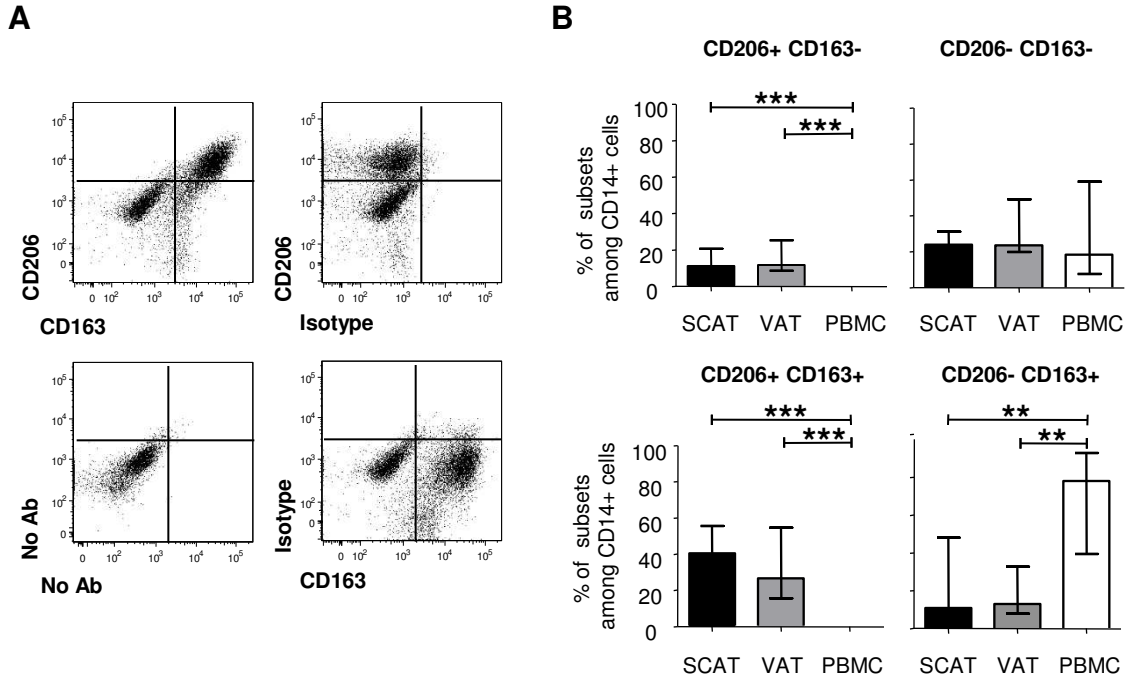
Supporting figure 3



Sup Figure 3. The lack of a significant influence of SIV infection on Ki67 expression on adipose tissue T cells.

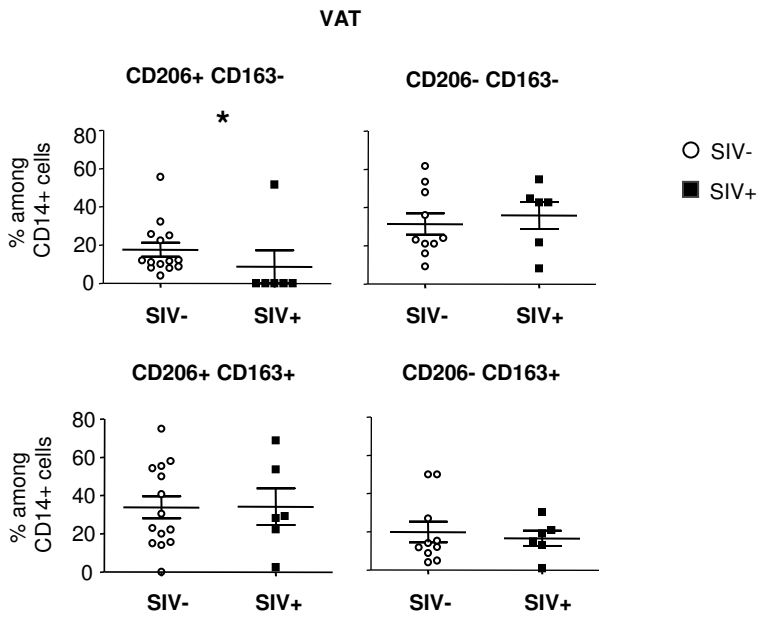
The percentage of Ki67-expressing cells among $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells recovered from SCAT and/or VAT from 7 infected animals (filled symbols) and 7 non-infected animals (open symbols). Values from peripheral blood T cells are shown when available (n = 5–6).

Supporting figure 4



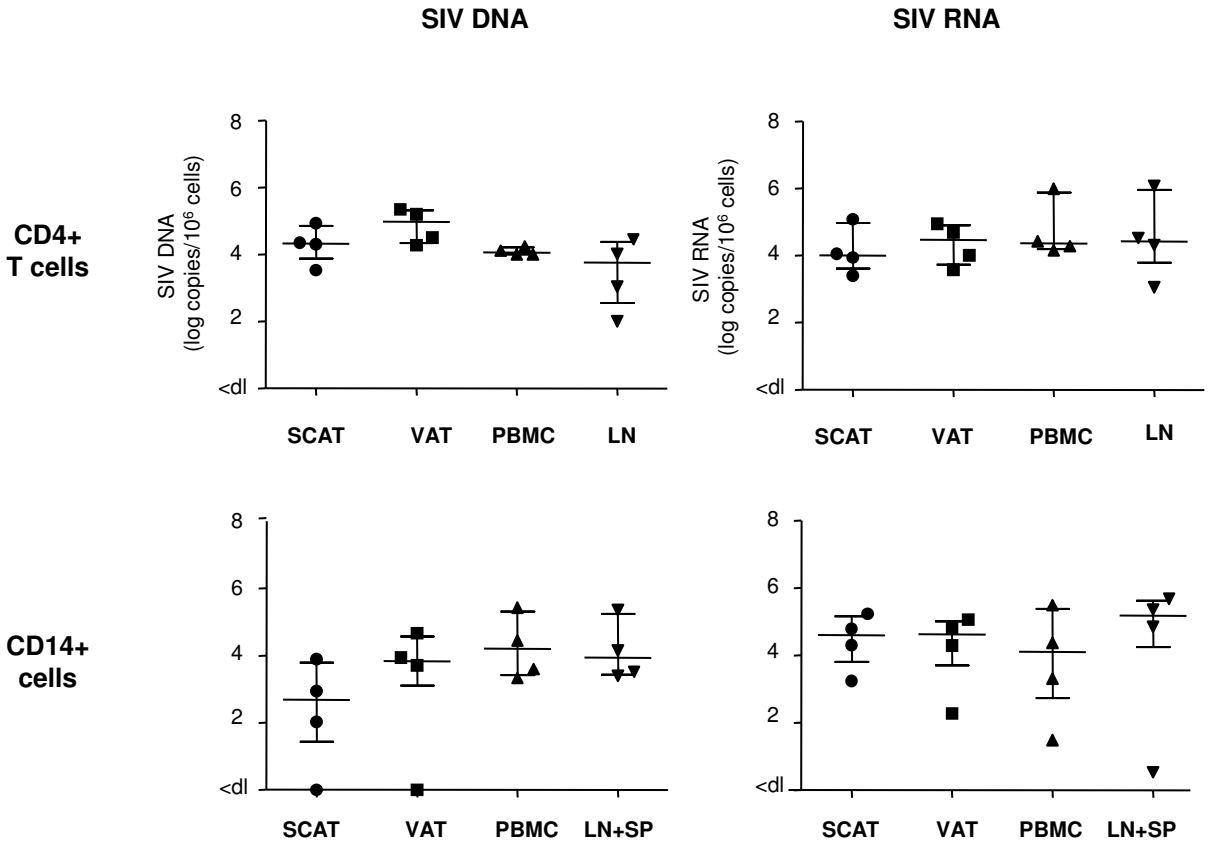
Sup Figure 4. Difference in the proportion of CD14-expressing cells and their phenotype in SVF cells and PBMCs.
(A) Dot plots showing the co-expression of CD206 and CD163 on CD14-expressing cells. Due to high levels of auto-fluorescence, the gating strategy was defined using isotype controls for either anti-CD163 or anti-CD206 antibodies and an unstained approach for the CD163 and CD206 fractions. (B) Graphs showing the percentage of each fraction in CD14-expressing cells recovered from SCAT, VAT and PBMCs from 8 non-infected animals. Similar observations were made in SIV-infected animals. Data are quoted as the median [interquartile range]. Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Supporting figure 5



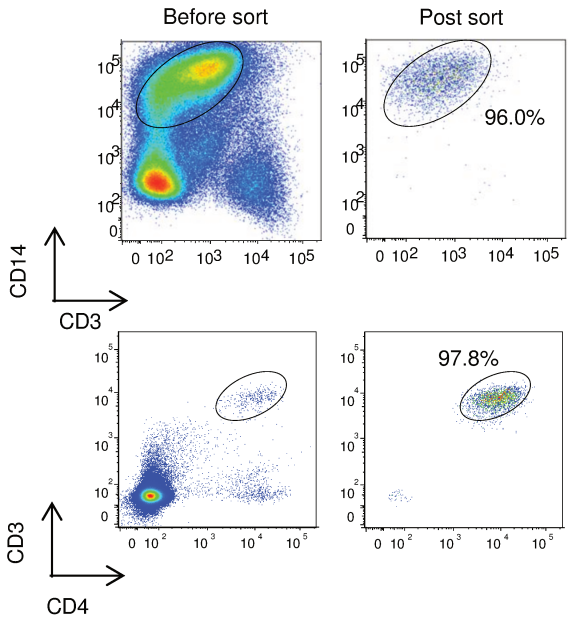
Sup Figure 5. The influence of SIV infection on macrophage phenotype in VAT.
Expression of CD206 and CD163 on adipose-resident CD14-expressing cells recovered from VAT from non-infected animals (open circles, n = 8) and SIV-infected animals (filled squares, n = 6). Gating strategies are shown in S4 Fig. Data are quoted as the median [interquartile range]. Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as * $p<0.05$.

Supporting figure 6



Sup Figure 6. Comparison of SIV DNA and RNA contents in CD4⁺ T cells and CD14-expressing cells from different tissues (adipose tissue, PBMCs and lymph nodes).
Comparison of SIV DNA and RNA levels in sorted CD4⁺ T cell and CD14⁺ cell fractions recovered from different organs (adipose tissue, PBMCs and lymph nodes) in four SIV-infected animals. SIV DNA and RNA assays were performed in duplicate and the results are expressed in log SIV DNA copies per million cells. Due to the low numbers of CD14⁺ cells recovered from lymph node, CD14⁺ cells were sorted from spleen for two animals. Data are quoted as the median [interquartile range]. A Mann-Whitney non-parametric test was used.

Supporting figure 7



Sup Figure 7. Sorting purity.
A representative sorting strategy used for CD14⁺ cells and CD4⁺ T cells. Dot plots of cells from a non-infected animal before and after sorting are shown. In both NHPs and humans, sorting purity was consistently over 95% (CD14⁺ cells: 97.2% [95.1–98.7], CD4⁺ T cells: 96.9% [96.1–99.1]).

Réponse aux évaluateurs lors de la soumission à Plos Pathogens.

Reviewer #1:

1. There is no discussion about the different distribution of the adipose tissue between sexes. However, such differences may have a potentially significant impact on the adipose reservoir. I assume that these aspects should be included in the manuscript. Based on the description provided, included monkeys are of both sexes, so it should be no problem to stratify data. Anyway, if the groups cannot be split, these aspects should at least be discussed, as well as their potential implication sex-related differences in reservoir distribution.

Indeed, gender may modify immune contents, inflammatory profile in addition to adipose distribution (Fuente-Martín et al. 2013) leading to a potential impact on HIV/SIV reservoir.
In macaques, the quantitative detection of SIV DNA and RNA was performed on 8 animals, 6 being males. We are thus unable to provide a direct comparison of SIV content in male versus female adipose tissue. Because gender induces differences in fat distribution (female predominantly accumulate subcutaneous fat whereas males amass significantly more visceral fat), we compared DNA content recovered from SCAT or VAT. Based on the value presented in Fig. 6 (where both SCAT and VAT of 8 animals were presented), we observed that SIV DNA contents in SVF recovered from SCAT and VAT were not different (p=0.8125, Wilcoxon paired test on the 8 animals presented) suggesting that the virus is present in both tissues at similar extent. This observation thus suggests that gender related change in fat distribution may not drastically affect HIV persistence. We introduced this observation in the results section: "As shown in **Fig. 6A**, SIV DNA was detected in SVF samples from SCAT and VAT in all animals tested (n=8) and no significant difference between the two sites was detected."
In HIV infected treated patients, we did not detect any significant difference in HIV DNA contents between the 7 males and 4 females tested. However, we believe that the number of individuals tested in the female group does not allow us to properly conclude on this question. We thus introduce a comment on the gender and its potential impact on adipose reservoir in the last part of the discussion. "Thirdly, gender differences in adipose tissue distribution, the inflammatory profile and immune cell content [78] may underlie differential susceptibility to the establishment of viral reservoirs."

2. I think that the authors should investigate whether or not the cells harboring HIV/SIV in the adipose tissue are resting cells. This is actually the HIV reservoir. In the current format, there is minimal discussion regarding the resting cells. Also, I think it is also important to better discriminate the sources of the virus. Central memory cells appear to be a/the major source, but data should be more clearly presented. Characterization of the memory subsets of CD4+ T cells should include transitional memory cells. If samples are also available, stem cell memory cell should also be phenotyped, as they are an important reservoir. It is critical to better characterize the reservoir.

We agree with the reviewer: this information was lacking in the first version. We now provide a more detailed characterization of adipose $CD4^+$ T cell differentiation profile in non-infected animals and infected animals. Based on CD28, CD95 and CCR5 expression, we demonstrated that $CD4^+$ T cells recovered from adipose tissue were essentially central memory T cells. Naïve T cells were virtually absent and Ttm and Tem $CD4^+$ T cell fractions mildly represented in adipose tissue. Interestingly, this profile was specific to $CD4^+$ T cells since $CD8^+$ T cells from adipose tissue were essentially Tem cells (Fig. S1). Because CD69 is also a marker of resident memory cells in non-lymphoid tissue (which indeed are present in adipose tissue (Fig 4 and Couturier et al) (Couturier

et al. 2015a), we used HLA-DR expression to demonstrate that the vast majority of $CD4^+$ T cells recovered in adipose tissue were HLA-DR negative, suggesting predominant resting status. Additionally, Ki67 staining also confirmed the low level of activation of adipose T cell. In conclusion, the majority of $CD4^+$ T cells in the adipose tissue are resting central memory T cells, which is the subset containing most of the latently infected $CD4^+$ T cells in blood in humans (Chomont, El-far, et al. 2009).
We fully agree with the reviewer that a more exhaustive analysis of $CD4^+$ T cell subset in adipose tissue need to be completed although technical limitation in term of numbers of cells may preclude direct evaluation of HIV content in each respective subset. The limit in the number of cells available precluded also the characterization of stem cell memory subset in the current study.
We thus modified the manuscript to introduce a more detailed study of $CD4^+$ T differentiation and activation. **Figure 4 is now dedicated to the characterization of adipose $CD4^+$ T cells and the observation of the predominant Tcm fraction among adipose $CD4^+$ T cells is now more clearly formulated and discussed.**

3. Is the adipose tissue an inductive or an effector site? The authors discuss differences between LNs and mucosal sites, but they have to state this clearly.
How to define adipose tissue is a challenging question. One could consider adipose tissue as a lymphoid tissue because it indeed includes lymphocyte. But the distinction between inductive and effector site as currently described in mucosa associated lymphoid tissue (MALT) (Brandtzaeg et al. 2008) may not easily be applied to adipose tissue. Microscopy did not reveal any organized lymphoid structure in adipose tissue. No B cell or T cell zone were identified but rather T lymphocytes scattered diffusely. Essentially no naïve T cells are present in adipose tissue. These three observations support the notion that adipose tissue is an effector site rather than an inductive site. However, adipose tissue share interesting features with lymph nodes / inductive site: (i) a predominant central memory phenotype for $CD4^+$ (but not $CD8^+$) T cells, (ii) the separate location of $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells, (iii) preferential preservation of CD4 T cells in SIV infection compared to effector site. We believe we need to further dissect the immune compartment, both in non-infected and infected context to properly address this question. Because we could not better substantiate one or the other hypothesis, we introduce the following sentence in the text. **"Phenotypic analysis revealed that the Tcm $CD4^+$ T cells fraction was predominant in both SCAT and VAT, thus confirming the high potential for viral persistence of adipose tissue. The predominance of central memory $CD4^+$ T cells, which usually identifies inductive lymphoid site, also raises the question of the lymphoid definition of the adipose tissue: Does adipose tissue constitute a lymphoid site and if so is it an inductive or effector lymphoid site?"**

4. Do the authors have any data regarding ARV biodistribution in the adipose tissue? The issue is mentioned somewhere in the discussion, but I believe it should be better emphasized. A lower drug penetrability might increase the significance of the presented results, as this would be a tissue in which virus is present, that contains relatively abundant target cells, but which is resistant to drug penetrability.
This is an important point that we will extend as suggested by the reviewer. Only one study, to our knowledge, has directly measured the level of different antiretrovirals in fat. Dupin et al (Dupin et al. 2002a) measured antiretroviral drug concentration in fat withdrawn from subcutaneous abdominal adipose tissue of HIV-infected patients for Coleman plastic surgery. They found that the different NRTIs levels (d4T, ZDV, DDI, 3TC, ABC) were below the limit of quantification. This suggests that the accessibility of these NRTI to fat cells could be reduced. Regarding PI, they observed in these fat samples that the concentrations of the lipophilic PIs (all except indinavir) was about 0.5-1µmol/kg while the circulating Cmin were in the range of 4 µmol/l, suggesting lower concentrations in adipose tissue than in blood. Interestingly, in an in vitro study, Vernochet (Vernochet et al. 2005a) observed, by using fluorescent PI, that lipophilic PIs accumulated inside

the lipid droplet and that was not the case for the hydrophobic indinavir, suggesting that, even if PI are present in adipose tissue, most lipophilic drugs could be sequestered inside the lipid droplet. Again this suggests that effective antiretroviral concentration could be low in adipose tissue. Regarding NNRTI, in the work of Dupin, both efavirenz and nevirapine were accumulating in adipose tissue with concentrations in the range of about 100 µmol/kg as compared to 10-20 µmol/l Cmin concentrations in the blood. Again, the authors suggest that these high concentrations could be due to accumulation in the lipid droplet. Thus, accessibility to adipose tissue and sequestration of drugs inside the lipid droplets could be responsible for a lower efficacy of ART in fat which could favor the persistence of infected immune cells. In addition, in the studied patients, obesity and expanded fat could even enhance drug sequestration and, thereby, further lower their efficiency. We are currently developing a project to quantify ARV concentration in adipose tissue and more specifically among $CD4^+$ T cells recovered from adipose tissue. We have introduced these two notions in the manuscript (discussion section).
"Our observations have major implications in the context of HIV disease. Firstly, they emphasize the crucial requirement for the broad diffusion of antiretroviral drugs within tissues; combination therapy must include drugs that diffuse not only into adipose tissues but also into tissue $CD4^+$ T cells and macrophages. **Two main mechanisms may prevent efficient activity of ART on adipose infected cells: (i) low accessibility of ART to fat tissue [44], (ii) sequestration of drugs inside the lipid droplets at the expense of adipose infected immune cells [75]."**

5. I am a bit confused by the strategy employed for macrophage phenotyping. CD14 is a monocyte marker and it is not working very well in tissues. On the other hand, new markers are used to discriminate major macrophage populations, most notably CD16. There are reports that CD16 macrophage subsets are more susceptible to HIV and might represent the major source of "macrophage" virus. It would be highly recommendable that the authors phenotype the macrophages using this marker. Are samples available to do so?

We have indeed used different strategies and markers to characterize adipose tissue macrophages (CD14, CD11b, HLA-DR, CD163, CD206 and CD16) due to the phenotypic heterogeneity of macrophages depending on tissue microenvironments. CD14 expression largely corroborates CD11b and HLA-DR expression, a common strategy used for macrophages identification. Because HLA-DR expression has been shown to be modulated on macrophages during inflammation, we used CD14 expression to identify macrophages. We confirmed by microscopy that CD14 and CD68 co-localized and identify macrophages. In our hands, CD14 expression was the most reliable marker to identify macrophages in adipose tissue. However, we tested CD16 expression as requested by the reviewer (Fig. R1). In non-infected animals, CD16 was expressed only by a small proportion of CD14 expressing cells: 12.4% [3.4-20.2] and 6.3% [1.4-12.3] among SCAT and VAT $CD14^+$ cells respectively. CD16 expression did not allow us to identify the whole macrophage population and we thus maintain the use of CD14 expression to identify macrophages. Interestingly, CD16 expression was significantly higher on CD14 expressing cells recovered from infected animals compared to non-infected animals (28.1% [13.8-47.0] and 26.3% [6.3-38.0] in SCAT and VAT respectively; p 0.0350 for both sites). Because CD16 expression has been shown to identify inflammatory profile in monocytes (Ancuta et al. 2006; Ziegler-Heitbrock 2007), we checked whether $CD16^+$ exhibited a more inflammatory phenotype. However, we did not observe difference in CD206 and CD163 expression when comparing $CD16^+$ and $CD16^-$ $CD14^+$ cells. Because we were unable to ascertain the pro-inflammatory profile of $CD16^+$ CD14 expressing subset recovered from adipose tissue, we did not introduce this data in the manuscript. However, we thank the reviewer to have risen this question, we will continue to work on this cell subset to ascertain its pro-inflammatory profile.

Due to the low proportion of CD16$^+$ macrophages, we were unable to sort this subset and evaluate their SIV DNA content.

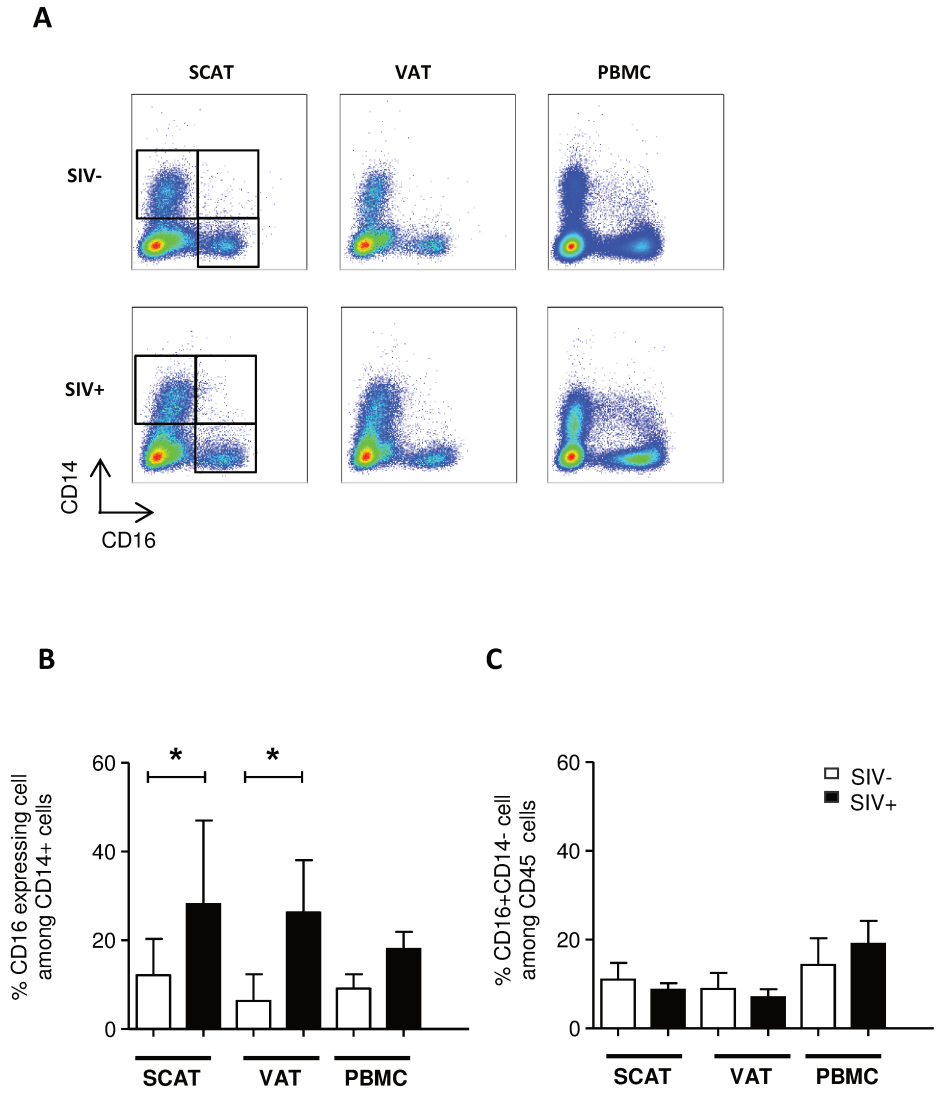


Figure R1. CD16 expression among adipose tissue macrophages
CD16 expression among cell subset in SCAT and VAT from SIV-infected animals or non-infected animals. (A) Representative dot plots showing the gating strategies used to define CD14$^+$ and CD14$^+$ CD16$^+$ cells in SCAT, VAT and PBMC. (B) Proportion of CD16$^+$ cells among CD14$^+$ macrophages and (C) proportion of CD16$^+$CD14$^-$ cells in non-infected animals (n=6, open column) and SIV-infected animals (n=4, filled column).
Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as * $p<0.05$.

Reviewer #2:
They find SIV DNA and RNA in tissue resident cells in adipose tissue. This is not particularly surprising, and quantitative comparisons to equivalent numbers of cells of the same types in lymphoid or other tissues is lacking.
We agree with the reviewer that determining whether the level of infection of the adipose tissue is close to those of infected lymphoid organs is an important information. As requested by the reviewer, we are now providing in Fig. S6 the comparison of SIV DNA and RNA contents in sorted CD4$^+$ T cells and CD14$^+$ cells recovered from SCAT, VAT, PBMC and LN from 4 animals.

This comparison confirms that adipose tissue $CD4^+$ T cells are infected to a similar extent than other well described sites of viral persistence such as PBMC and LN. Similar results were obtained for macrophages. In two animals, we gained access to spleen samples and found similar amounts of SIV DNA. These results showed that in viremic animals, SIV infection spread in lymphoid cells from adipose tissue (a non-lymphoid tissue) to the same extent than those observed in LN. However, we fully agree with the reviewer that the most important result was those obtained in "aviremic" ART-treated, HIV- infected patients.

However the paper is confusing, as it then delves in to a completely different area, that of reservoirs of latent/persistent infection. In viremic animals the measurements of HIV DNA or RNA demonstrate only prior infection of cell types (DNA), and current expression of viral genomes (RNA) be they replication-competent or defective. Extremely scanty data is shown in Table 2 which attempts to ask if replication-competent viral genomes persist in CD4 cells harvested from fat *stroma of a treated HIV+ patient. […] While this data from a single culture of a single patient* is *tantalizing, numerous controls are missing: 1) cultures without activation, […]; 2) data over time, […]; 3) genetic sequence data […]. Obviously more than a single subject should also be studied.*

We completely agree with the reviewer. This part which is one of the cornerstones of the study was weak. The major points to be able to show that adipose tissue is a reservoir for HIV are

- to study several HIV-infected patients on ART with undetectable viremia
- To repeatedly show that the $CD4^+$ T cells sorted from the adipose tissue contain HIV DNA, HIV RNA, and above all, contain replication competent HIV.

We showed only the results from one patient in the viral reactivation assay in the prior version of the manuscript. We have now strengthened the part of the manuscript dealing with ART treated HIV infected patients. 13 ART treated HIV infected patients have been studied.
1/ We now provide HIV DNA detection in SVF and PBMC from 11 patients.
We showed in Figure 7A that the **HIV DNA was detected in the SVF of all samples tested (11 from VAT and 4 from SCAT). The median level of HIV DNA in visceral adipose tissue SVF (2.15 [2.01-2.47] log DNA copies/million cells) was significantly lower than in PBMCs (2.94 [2.25-3.28]). However, this low level of infection in adipose tissue might primarily reflect the low proportion of hematopoietic cells in adipose tissue**. We therefore quantified HIV DNA in sorted $CD4^+$ T cells from three patients (5 samples). **In the four samples with detectable virus, the median level of HIV DNA in $CD4^+$ T cell fractions recovered from adipose tissue was 3.83 (compared with 3.56 in sorted peripheral blood $CD4^+$ T cells).**

2/ Reactivation assay has been performed in 6 patients to test for replication competent virus. Data are presented with the negative control (SVF cells without activation) and time course from D7 to D21 (Fig. 8). We performed an in vitro viral reactivation assay on total SVF cells, sorted adipose $CD4^+$ and sorted peripheral blood $CD4^+$ T cells in the presence of allogeneic pre-activated $CD4^+$ T cells and phytohemagglutinin (Fig. 8). W**e detected the induction of viral replication in the sorted $CD4^+$ T cell fraction from the SVF of all six patients. Detection of HIV RNA in supernatants of the ex vivo-activated, sorted SVF $CD4^+$ T cells was observed from day 7 to day 21 in nearly all patients.** In two patients (#5, 7), HIV RNA was detected solely after the reactivation of sorted SVF $CD4^+$ T cells but not in total SVF or in PBMCs, probably because of the limited number of infected cells in the culture. In the four other patients (#6, 8, 9, 10), HIV RNA was detected in similar numbers of $CD4^+$ T cells recovered from both adipose tissue and PBMCs. Induction of HIV replication from total SVF was detected in four patients. No HIV RNA was detected in cultures of activated adipose $CD14^+CD206^+$ fractions. Importantly, non-activated SVF cell cultures did not lead to detection of HIV RNA (except in one patient), meaning that we could rule out the amplification of non-latent, pre-existing HIV. **Our results show that adipose $CD4^+$ T cells were infected by replication-competent HIV.**

In conclusion, we performed three levels of detection: (i) HIV DNA using PCRs, (ii) HIV RNA using in situ hybridization and (iii) HIV RNA in supernatants in an in vitro reactivation assay based on ultrasensitive RT-PCR. We demonstrated that latently HIV-infected cells were present in the SVF from both SCAT and VAT in **6 ART-treated patients**. HIV DNA was consistently detected in adipose $CD4^+$ T cells - strongly suggesting that adipose tissue is an HIV reservoir in aviremic patients on long-term ART.
The manuscript has been modified accordingly to introduce these novel sets of data both in the figures (Fig. 7 and Fig. 8) and the text.

We agree that performing genetic sequencing is obviously an important aspect that we aim to address to compare HIV strains isolated from blood or LN $CD4^+$ T cells versus those isolated from the fat to determine whether there is a residual viral replication in the adipose tissue with compartmentalization of HIV or whether the virus circulates. However, the material has been used for HIV DNA quantification or cell sorting. Due to the limited number of cells recovered from ART treated patients, we were unable to perform simultaneously in vitro reactivation assay and genetic sequencing. However, we have planned to perform these comparative sequencing studies in the human samples that will be collected in 2015-2016.

The revised manuscript now includes analysis of 13 ART treated HIV infected patients and 6 in vitro reactivation assay.

Reviewer #3:
Altogether, the data from this study make the important point that adipose tissue can be a tissue sanctuary for lentiviral infection and persistence as well as a site for active immune activation and inflammation.
This interesting and novel study underscores the need to explore multiple tissue sanctuaries for the presence of SIV/HIV as well as viral-associated immune activation and inflammation, especially since such tissues might then also be potential reservoirs of viral persistence in the context of treated disease. A strong point of this study is that it has been carried out with a variety of complementary techniques, convincingly presenting the case and setting the stage for more work in this arena in the future.

We thank the reviewer for his/her positive comments.

Major points:
1. The important data in Table 1 should be better described. In particular: What is meant by the "quantifications" that are designated "+/+", "+/-", or "-/-"*? Was "viral status assessed by* ... DNA detection in PBMC" in terms of "DNA copies/million cells" or "log copies/million cells?" What was the sort purity of the cell fractions (CD3, CD14) that were analysed?
We acknowledge that the Table was not very clear because of the presentation of qualitative results. Aiming to increase the number of individuals studied (both in macaques and humans), we have discarded the qualitative detection assay that was not sufficiently informative and replace it by quantitative SIV (and HIV) DNA detection assay. We now present in Fig. 6 the graphs showing SIV DNA and RNA contents in total stromal vascular fraction, sorted $CD4^+CD3^+$ and $CD14^+$ cells from adipose tissue and PBMC. Because we could study more animals and have improved our sorting capacities, we have decided to not show, preliminary analyses performed on sorted $CD3^+$ cells. We show now only quantitative data on $CD4^+CD3^+$ cells. All data are expressed as log DNA (or RNA) copies per million cells.
Dot plots of sorting purity are now presented in Fig. S7 and purity percentages are now indicated in the materials and methods section: "**In both NHPs and humans, sorting purity was**

consistently greater than 95% (CD14-expressing cells: 97.2% [95.1-98.7], CD4$^+$ T cells: 96.9% [96.1-99.1]).”

2. Given the importance of the data in Table 2, this experiment should be carried out on additional (e.g., a minimum of three) ARV-suppressed subjects so that it is possible to discern the generalizability of the observations. As above, it will also be important to know more about (i) the purity of the sorted cell populations (ii) the low HIV RNA signals in the positive control (sorted PBMC CD4+ T cells) (iii) confirmation that five independent replicates run on day 17 (iv) the cell viability and recovery

We have strengthened the part of the manuscript dealing with ART treated HIV infected patients. 13 ART treated HIV infected patients have been studied and we now provide HIV DNA detection in SVF and PBMC from 11 patients. **Reactivation assay has now been carried out on 6 patients to test for replication competent virus. Table 2 has been replaced by figure 8 showing the time course of viral reactivation from d7 to d21. Data are presented with the negative control: SVF cells without activation.**

Additional information requested are now provided.

(i) The purity of sorting is indicated in the material and methods as stated above.

(ii) For each patient, the same number of CD4$^+$ T cells sorted from adipose tissue and blood were cultured in presence of PHA and allogenic CD4$^+$ T cells as described in Material and Methods.

(iii) HIV-RNA was quantified in plasma by real-time RT-PCR with the Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 assay (Roche Diagnostics), according to the manufacturer’s recommendations. HIV-RNA was quantified in culture supernatants by ultrasensitive real-time PCR using the GENERIC HIV assay (Biocentric, Bandol, France). The extracts were tested in two to five replicates. A previous reference detailing this protocol is now provided in the materials and methods (Bacchus et al. 2013). A negative result means 5 negative tests on the same supernatant.

(iv) Cell viability was assessed at day 17 and 80% viability was consistently observed. However, we were unable to distinguish pre-activated CD4$^+$ T cells and the initial sorted cell fraction and this information was not included in the manuscript.

We have therefore clarified this aspect in the manuscript (see in material and methods). The different results obtained for the different patients are now more clearly described in the result section, and discussed in the last part of the manuscript.

“**we detected the induction of viral replication in the sorted CD4$^+$ T cell fraction from the SVF of all six patients. Detection of HIV RNA in supernatants of the ex vivo-activated, sorted SVF CD4$^+$ T cells was observed from day 7 to day 21 in nearly all patients. In two patients (#5, 7), HIV RNA was detected solely after the reactivation of sorted SVF CD4$^+$ T cells but not in total SVF or in PBMCs, probably because of the limited number of infected cells in the culture. In the four other patients (#6, 8, 9, 10), HIV RNA was detected in similar numbers of CD4$^+$ T cells recovered from both adipose tissue and PBMCs. Induction of HIV replication from SVF was detected in four patients. No HIV RNA was detected in cultures of activated adipose CD14$^+$CD206$^+$ fractions. Importantly, non-activated SVF cell cultures did not lead to detection of HIV RNA (except in one patient), meaning that we could rule out the amplification of non-latent, pre-existing HIV. Our results show that adipose CD4$^+$ T cells were infected by replication-competent HIV.”**

3. The cohort of HIV+ ARV-suppressed subjects should be better described, perhaps in a table, indicating at least: gender, age, the duration of time each was infected prior to treatment, the CD4 nadir at the time of treatment, and the duration of treatment with complete suppression. Each of these parameters might conceivably contribute to inter-individual variation in the observed

results.

As suggested by the reviewer, we have added a table describing the population study (see in materials and methods). The duration of infection prior to treatment is not available for these patients as none were diagnosed in primary infection. All the other parameters requested are presented.

4. The conclusion that there is an "enhanced adipose inflammatory profile" (p.10) appears to be based solely on an observed increase in MIP-1α mRNA. This conclusion should be confirmed by the analysis of protein, e.g., by ELISA, and of other pro-inflammatory cytokines.

We completely agree with the reviewer. Our suggestion that there was an enhanced adipose inflammatory profile relied on the increase of MIP-1 RNA levels. As the reviewer suggested, we have performed protein analysis of different cytokines by Luminex assay in blood and adipose tissue lysates. But no significant difference was observed. Different technical aspects could explain the absence of convincing results: variability between the animals, the few animals studied, and/or the questionable quality of the lysates. This observation was similar to what has been described in the context of obesity in which pro-inflammatory profile was not easily detected from ex vivo adipose tissue explants both at mRNA and protein levels (Fain 2010b; Dolinková et al. 2008). Interestingly, most results obtained in the context of obesity determine cytokine release after in vitro culture. Due to the presence of viral infected cells that can alter cell viability, we did not use this approach, which probably prevent the detection of significant amount of cytokines. We chose to remove this set of mRNA data because it was not confirmed by Luminex analysis. We plan to develop a different approach using transcriptomic analysis integrating the diversity of cells capable of pro-inflammatory cytokine production within adipose tissue.
However, we continue to think that the adipose tissue is an inflammatory site in the setting of HIV/SIV infection as suggested by the change in cellular composition of the adipose tissue ($CD8^+$ T cell infiltration, macrophage infiltration, activated and pro-inflammatory profile of these cells). However, we can easily re-insert MIP-1alpha data in the manuscript as supporting figure if the reviewer wishes.

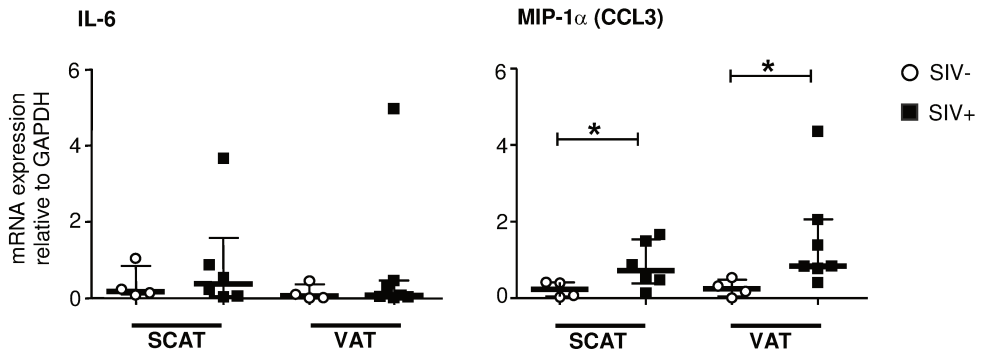


Figure 6. Impact of chronic SIV infection on adipose tissue cytokine production
Analysis of mRNA coding for IL-6, MIP-1□ (CCL3) was performed on adipose tissues from 5 SIV non-infected and 5 SIV-infected animals. Cytokine/chemokine mRNA expression was reported to GAPDH mRNA values and mean of duplicates values are presented. Significant differences are shown using Mann-Whitney non-parametric test: * $p<0.05$.

5. Discussion points

a. What, for instance, might drive these [CD45-] cells to increase in number in the context of SIV infection? Might this be related to the cellular changes typically seen in instances of lipodystrophy?
We did not find clear information about the CD45- fraction in context of lipodystrophy. But obviously the decreased adipocyte size and the sign of inflammation (macrophage infiltration) are features classically described in lipoatrophic adipose tissue (Giralt, Domingo, and Villarroya 2011a). We thus cannot exclude an impact of lipoatrophy (including decreased adipocyte size, but also at larger extent, fibrosis, hypoxia, apoptotic adipocytes), inflammation or viral persistence on this accumulation. We modified the discussion to introduce the various hypotheses suggested by the reviewer.
"The $CD45^-$ cells recovered in the SVF of infected animals need to be identified more accurately. Those in the SVF included pre-adipocytes, the accumulation of which may be related to changes in adipocyte differentiation. **These striking changes in CD45- proportion need to be further investigated and could relate to multiple defects affecting adipose tissue during SIV infection such as lipodystrophy, inflammation or viral persistence.** However, the SVF also contains mesenchymal stem cells [63-65], and it remains to be established whether these cells can also be infected**."**

Might it represent the production/proliferation of new cells?
We did not detect any difference in Ki67 among CD45- cells (Fig. R2). However the high heterogeneity among the $CD45^-$ cells may preclude the detection of changes of specific $CD45^-$ fractions. Due to this limitation, we did not include this information in the manuscript.

Also, can the authors propose a hypothesis as to why the increase of adipocytes and SVF density and number is higher in visceral than in subcutaneous adipose tissue (Figure 1)?
We did observe higher density of adipocytes and stromal vascular cells in VAT compared to SCAT recovered from non-infected animals. This observation was in line with previous observations (Maurin et al. 2005b; Ibrahim 2010) demonstrating that adipose tissues differ in their metabolic and immune activity depending on the location, i.e. subcutaneous versus visceral adipose tissue. To note, this difference between SCAT and VAT was not observed in infected animals although a similar trend appeared. The loss of statistical difference probably relies on the high variability induced by SIV infection and we did not emphasize this aspect in the manuscript. We have modified the manuscript accordingly in the result section: "In line with previous publications [47, 52] we found that non-infected animals had significantly higher numbers of SVF cells in VAT than in SCAT (p=0.009)."

b. The authors state in the Results section (p.7) that "adipose tissue CD4+ T cells were only mildly affected by SIV infection and that most of the CD4+ T cells recovered in SVF were not cells recently migrating from peripheral blood." If that is the case, then how does this finding relate to the actual role of adipose tissue as a reservoir of persistent HIV/SIV? If those adipose CD4+ T cells are tissue-resident cells, then how can they have become infected? What do the authors propose as a mechanism for HIV persistence in the long run, e.g., local self-renewal or continued emigration of cells from the periphery?

We agree with the reviewer. This is an important point, also pointed by reviewer one. The question is to know whether the adipose tissue is an inductive or effector site. The question of lymphocyte migration is a part of this debate.
One could consider adipose tissue as a lymphoid tissue because it includes lymphocytes. But the distinction between inductive and effector site as currently described in mucosa associated lymphoid tissue (MALT) (Brandtzaeg et al. 2008) may not easily be applied to adipose tissue. Microcopy did not reveal any organized lymphoid structure in adipose tissue. No B cell or T cell

zone were identified but rather T lymphocytes scattered diffusely. Essentially no naïve T cell are present in adipose tissue. These three observations support the notion that adipose tissue is an effector site rather than an inductive site. This suggests T cell migration from blood to the adipose tissue. $CD4^+$ T cells could be infected at any step from their exit of the thymus to their residency in adipose tissue.

However, adipose tissue share interesting features with lymph nodes / inductive site: (i) a predominant central memory phenotype, (ii) the separate location of $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells, (iii) preferential preservation of $CD4^+$ T cells in SIV infection compared to effector site.

We are currently unable to provide robust insight about the relative contribution of local self-renewal compared to continued emigration of cells to the viral persistence in adipose tissue. We detected a mild correlation between HIV viral load in SVF and PBMC (r=0.5401, but not statistically significant) suggesting that viral persistence in adipose tissue is mildly related to viral load in PBMC. We aim to further dissect the immune compartment, both in non-infected and infected context to properly address this question. This aspect has been added in the discussion:

"Phenotypic analysis revealed that the Tcm $CD4^+$ T cells fraction was predominant in both SCAT and VAT, thus confirming the high potential for viral persistence in adipose tissue. The predominance of central memory $CD4^+$ T cells, which usually identifies inductive lymphoid site, also raises the question of the lymphoid definition of the adipose tissue: Does adipose tissue constitute a lymphoid site and if so is it an inductive or effector lymphoid site?"

c. Given the observation that there is a large increase in CD8 T cells, it would be interesting to further discuss the finding that "the change in activation profile was not associated with massive in situ proliferation." (p.8) How can the authors explain this increase then? Is the increase seen the blood as well? Could it have been driven by local viral antigens?

Based on our data on $CD8^+$ T cell location, we believe that $CD8^+$ T cell accumulation in adipose tissue of SIV infected animals is essentially driven by peripheral recruitment. No significant increase of $CD8^+$ T cell was detected in blood in these animals. Similar $CD8^+$ T cell accumulation in adipose tissue has been described in the context of obesity. We are currently unable to distinguish between specific recruitment by local viral antigens or due to inflammation related recruitment. The two hypothesis are formulated in the discussion as follows:

"We demonstrated that the change in the CD4/CD8 ratio reflected the accumulation of CD8+ T cells, in accordance with previous reports of massive CD8 accumulation during adipose tissue inflammation [27]. Intense recruitment of CD8+ T cells was confirmed by the perivascular location of CD8+ T cells. However, a direct impact of SIV in adipose tissue cannot be ruled out [53,54]."

d. The finding that adipose tissue has high frequencies of Tcm cells is very interesting. Might this cell subpopulation harbor the highest frequency of infection? It would also be interesting to determine if the CD14+CD206-CD163- cells that are increased in subcutaneous adipose tissue with SIV infection are more infected than other macrophage subpopulations.

We agree that this aspect will be extremely interesting to address. However, it would be more relevant when considering ART treated aviremic HIV infected patients but the quantity of adipose tissue collected from these patient will not allow us to sort sufficient numbers of these particular subsets Tcm $CD4^+$ T cells and $CD206^-CD163^-$ macrophage subset)

e. Could the authors comment on whether the location of the adipose tissue in the body might impact on its propensity to harbor HIV/SIV and sustained immune activation/inflammation? For instance, might adipose tissues adjacent to lymph nodes be more likely to harbor persistently infected cells than subcutaneous adipose tissue?

This is a very interesting discussion. Based on the value presented in Fig. 6 (where both SCAT and VAT of 8 animals were presented), we observed that SIV DNA contents in SVF recovered

from SCAT and VAT were not different ((p=0.8125, Wilcoxon paired test on the 8 animals presented) suggesting that the virus is present in both tissues at similar extent. We introduce this observation in the results section: **"As shown in Fig. 6A, SIV DNA was detected in SVF samples from SCAT and VAT in all animals tested (n=8) and no significant difference between the two sites was detected."**

However, the suggestion of a higher level of infection in $CD4^+$ T cells residing in the adipose tissue near lymph-nodes is very interesting even if difficult to address.

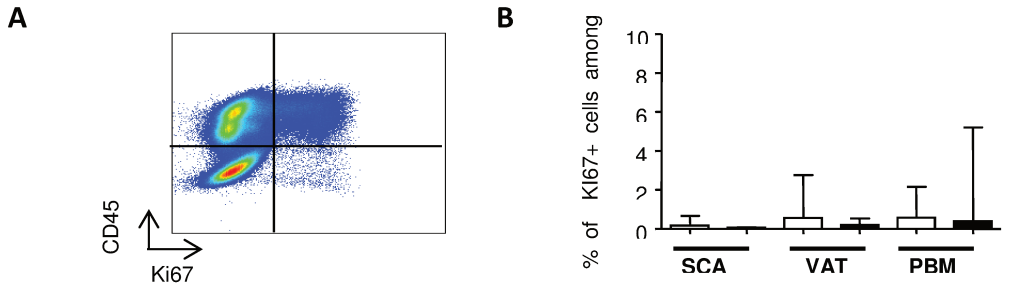


Figure R2. Low level of proliferation among CD45- SVF cells
(A) Representative dot plot showing Ki67 expression among $CD45^+$ and $CD45^-$ SVF cells in SCAT from SIV infected animal. (B) Distribution of $Ki67^+$ cells among non-infected animals (n=6, open column) and SIV-infected animals (n=6, filled column).
Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as * p<0.05.

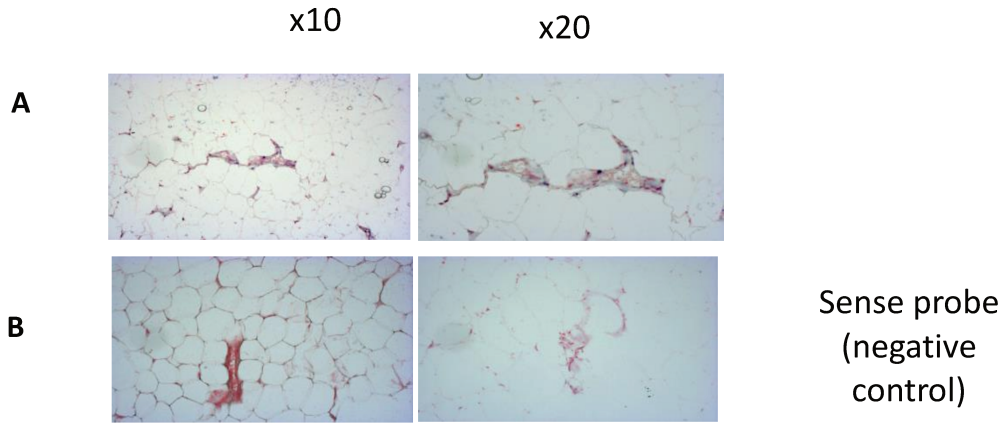


Figure R3. Specificity of the in situ hybridization
Example of staining obtained using (A) anti-sense probes and (B) sense probe on parallel sections. Sections are presented at magnification x10 and x20

References

Ancuta, Petronela et al. 2006. "CD16+ Monocyte-Derived Macrophages Activate Resting T Cells for HIV Infection by Producing CCR3 and CCR4 Ligands." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176(10):5760–71.

Bacchus, Charline et al. 2013. "A Single HIV-1 Cluster and a Skewed Immune Homeostasis Drive the Early Spread of HIV among Resting CD4+ Cell Subsets within One Month Post-Infection." PloS one 8(5):e64219.

Brandtzaeg, P., H. Kiyono, R. Pabst, and M. W. Russell. 2008. "Terminology: Nomenclature of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue." Mucosal immunology 1(1):31–37.

Chéret, A. et al. 1999. "RANTES, IFN-Gamma, CCR1, and CCR5 mRNA Expression in Peripheral Blood, Lymph Node, and Bronchoalveolar Lavage Mononuclear Cells during Primary Simian Immunodeficiency Virus Infection of Macaques." Virology 255(2):285–93.

Chéret, A. et al. n.d. "Chemoattractant Factors (IP-10, MIP-1alpha, IL-16) mRNA Expression in Mononuclear Cells from Different Tissues during Acute SIVmac251 Infection of Macaques." Journal of medical primatology 26(1-2):19–26.

Chomont, Nicolas et al. 2009. "HIV Reservoir Size and Persistence Are Driven by T Cell Survival and Homeostatic Proliferation." 15(8).

Couturier, Jacob et al. 2015. "Human Adipose Tissue as a Reservoir for Memory CD4+ T Cells and HIV." AIDS (London, England) 29(6):667–74.

Dolinková, M. et al. 2008. "The Endocrine Profile of Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue of Obese Patients." Molecular and cellular endocrinology 291(1-2):63–70.

Dupin, Nicolas et al. 2002. "HIV and Antiretroviral Drug Distribution in Plasma and Fat Tissue of HIV-Infected Patients with Lipodystrophy." AIDS (London, England) 16(18):2419–24.

Fain, John N. 2010. "Release of Inflammatory Mediators by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily by the Nonfat Cells: A Review." Mediators of inflammation 2010:513948.

Fuente-Martín, Esther, Pilar Argente-Arizón, Purificación Ros, Jesús Argente, and Julie A. Chowen. 2013. "Sex Differences in Adipose Tissue: It Is Not Only a Question of Quantity and Distribution." Adipocyte 2(3):128–34.

Giralt, Marta, Pere Domingo, and Francesc Villarroya. 2011. "Adipose Tissue Biology and HIV-Infection." Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism 25(3):487–99.

Ibrahim, M. M. 2010. "Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Structural and Functional Differences." Obes Rev 11(1):11–18.

Maurin, T. et al. 2005. "Tumor Necrosis Factor-Alpha Stimulates HIV-1 Production in Primary Culture of Human Adipocytes." Experimental cell research 304(2):544–51.

Nishimura, S. et al. 2009. "CD8+ Effector T Cells Contribute to Macrophage Recruitment and Adipose Tissue Inflammation in Obesity." Nat Med 15(8):914–20.

Vernochet, Cécile et al. 2005. "Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitors Accumulate into Cultured Human Adipocytes and Alter Expression of Adipocytokines." The Journal of biological chemistry 280(3):2238–43.

Ziegler-Heitbrock, Loems. 2007. "The CD14+ CD16+ Blood Monocytes: Their Role in Infection and Inflammation." Journal of leukocyte biology 81(3):584–92.

Article 2. A high proportion of PD-1 expressing CD4 T cells in adipose tissue constitutes an immunomodulatory microenvironment that may favour HIV persistence. Eur Journal of immunology, (en révision).

Abstract:

We and others have demonstrated that adipose tissue is a reservoir for HIV. Evaluation of the mechanisms responsible for viral persistence may lead to ways of reducing these reservoirs.
Here, we evaluated the immune characteristics of adipose tissue in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy (ART) and in non-HIV-infected patients. We notably sought to determine whether adipose tissue's intrinsic properties and/or HIV induced alteration of the tissue environment may favour viral persistence. ART-controlled HIV infection was associated with a difference in the CD4/CD8 ratio and an elevated proportion of Tregs in subcutaneous adipose tissue. No changes in Th1, Th2 and Th17 cell proportions or activation markers expression on T cell (Ki-67, HLA-DR) could be detected, and the percentage of CD69-expressing resident memory CD4 T cells was not affected. Overall, our results indicate that adipose-tissue-resident CD4 T cells are not extensively activated during HIV infection. PD-1 was expressed by a high proportion of tissue-resident memory CD4 T cells in both HIVinfected patients and non-HIV-infected patients. Our findings suggest that adipose tissue's intrinsic immunomodulatory properties may limit immune activation and thus may strongly contribute to viral persistence.

A high proportion of PD-1-expressing CD4 T cells in adipose tissue constitutes an immunomodulatory microenvironment that may favour HIV persistence.

Journal:	*European Journal of Immunology - 2*
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Damouche, Abderaouf; Universite Paris-Sud, UMR INSERM 1184; CEA, Fontenay-aux-Roses, F-92265, DSV/iMETI, IDMIT Pourcher, Guillaume; Institut Mutualiste Montsouris, Department of digestive diseases, Obesity center Pourcher, Valérie; Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Service de maladies infectieuses et tropicales, UPMC université Paris 6 Benoist, Stéphane; Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Service de Chirurgie Digestive et Oncologique Busson, Elodie; Hopital d'Instruction des Armees Percy, Centre de transfusion sanguine des Armées Lataillade, Jean-Jacques; Hopital d'Instruction des Armees Percy, Centre de transfusion sanguine des Armées Le Van, Mélanie; Universite Paris-Sud, UMR INSERM 1184; CEA, Fontenay-aux-Roses, F-92265, DSV/iMETI, IDMIT Lazure, Thierry; Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Service d'anatomo-pathologie Adam, Julien; Gustave Roussy, Plateforme d'évaluation préclinique Favier, Benoit; Universite Paris-Sud, UMR INSERM 1184; CEA, Fontenay-aux-Roses, F-92265, DSV/iMETI, IDMIT Vaslin, Bruno; Universite Paris-Sud, UMR INSERM 1184; CEA, Fontenay-aux-Roses, F-92265, DSV/iMETI, IDMIT Müller-Trutwin, Michaela; Institut Pasteur, Unité HIV, Inflammation et persistance Lambotte, Olivier; Universite Paris-Sud, UMR INSERM 1184; Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Service de Médecine interne et Immunologie clinique Bourgeois, Christine; Universite Paris-Sud, UMR INSERM 1184; CEA, Fontenay-aux-Roses, F-92265, DSV/iMETI, IDMIT
Keywords:	Immune regulation, Infectious diseases, Inflammation, Inhibitory receptors, T cells

SCHOLARONE™
Manuscripts

A high proportion of PD-1-expressing CD4 T cells in adipose tissue constitutes an immunomodulatory microenvironment that may favour HIV persistence.

Abderaouf Damouche[1,2], Guillaume Pourcher[3], Valérie Pourcher[4], Stéphane Benoist[5], Elodie Busson[6], Jean Jacques Lataillade[6], Mélanie Le Van[1,2], Thierry Lazure[7], Julien Adams[8], Benoit Favier[1,2], Bruno Vaslin[1,2], Michaela Müller-Trutwin[9], Olivier Lambotte[1,2,10]* and Christine Bourgeois[1,2]*

[1] Univ Paris Sud, UMR INSERM 1184, F-94276 Le Kremlin-Bicêtre, France
[2] CEA, DSV/iMETI, IDMIT, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France
[3] Department of Digestive Diseases, Obesity center, Institut Mutualiste Montsouris, Paris-sud University, F-75014 Paris, France
[4] Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, France
[5] Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service de Chirurgie Digestive et Oncologique, F-94275 Le Kremlin-Bicêtre, France
[6] Hôpital d'Instruction des Armées Percy, Centre de Transfusion Sanguine des Armées, F-92140 Clamart, France
[7] Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service d'anatomo-pathologie, F-94275 Le Kremlin-Bicêtre, France
[8] Institut Gustave Roussy, Plateforme d'évaluation préclinique, F-94805 Villejuif, France
[9] Institut Pasteur, Unité HIV, Inflammation et Persistance, F-75015 Paris, France
[10] Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service de Médecine Interne et Immunologie clinique, F-94275 Le Kremlin-Bicêtre, France

Keywords: adipose tissue, fat, PD-1, CD4 T cell, HIV, HIV persistence

Corresponding author: Dr Christine Bourgeois

Phone: +33 149 596759 / Fax: +33 149 596753 / christine.bourgeois@u-psud.fr

List of abbreviations: VAT: visceral adipose tissue; SCAT: subcutaneous adipose tissue; SVF: stromal vascular fraction; ART: antiretroviral therapy, PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; cART-HIV patients/infection: controlled ART HIV-infected patients/infection.

* These two authors contributed equally to the work

For Peer Review

Abstract

We and others have demonstrated that adipose tissue is a reservoir for HIV. Evaluation of the mechanisms responsible for viral persistence may lead to ways of reducing these reservoirs. Here, we evaluated the immune characteristics of adipose tissue in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy (ART) and in non-HIV-infected patients. We notably sought to determine whether adipose tissue's intrinsic properties and/or HIV induced alteration of the tissue environment may favour viral persistence. ART-controlled HIV infection was associated with a difference in the CD4/CD8 ratio and an elevated proportion of Tregs in subcutaneous adipose tissue. No changes in Th1, Th2 and Th17 cell proportions or activation markers expression on T cell (Ki-67, HLA-DR) could be detected, and the percentage of CD69-expressing resident memory CD4 T cells was not affected. Overall, our results indicate that adipose-tissue-resident CD4 T cells are not extensively activated during HIV infection. PD-1 was expressed by a high proportion of tissue-resident memory CD4 T cells in both HIV-infected patients and non-HIV-infected patients. Our findings suggest that adipose tissue's intrinsic immunomodulatory properties may limit immune activation and thus may strongly contribute to viral persistence.

For Peer Review

Introduction

Although adipose tissue is an important site for metabolism, it also exhibits immune properties - as exemplified by the local presence of a large number of immune cells and the production of pro-and anti-inflammatory cytokines [1]. It has been shown that adipose tissue immune cells (notably macrophages and CD4 T cells) have a pivotal role in metabolic homeostasis in both lean individuals and during the onset of obesity and diabetes [2]–[4]. However, little attention has been paid to the role of adipose immune cells in infectious disease [5]–[8]. We and others have identified adipose tissue as a site of viral persistence during chronic SIV and HIV infection [9]–[11], which is suggestive of an inefficient local immune response.

Studies of obesity and diabetes in both murine models and humans have generated important data on immune cells in adipose tissue. In humans, obesity is associated with the recruitment of CD8 T cells and the rapid modulation of the CD4 T cell subsets; this includes a decrease in Treg count (in some studies [12],[13] but not others [14]–[17]), and an increase in Th1 [15] and Th17 fractions [18]. In a context of infectious disease, the data are much more scarce [9]–[11]. In experiments on viremic, SIV-infected cynomolgus macaques, we demonstrated that the number of CD4 T cells in fat was not affected by the viral infection (5). We detected an increase in the percentage of activated HLA-DR^{+} T cells (5). Although a change in the CD4/CD8 T cell ratio has been reported in the context of chronic, ART-treated HIV infections, [10] the properties of CD4 T cell subsets in adipose tissue have not been extensively described.

In the present study, we sought to determine the impact of chronic HIV infection on the immune properties of adipose tissue. Given that the persistence of anatomical reservoirs of HIV in ART-controlled patients is a major clinical challenge [19], it is essential to evaluate

eer Review

the immune mechanisms that might contribute to the persistence of HIV-infected cells in adipose tissue. There are two possible explanations for this persistence in adipose tissue: HIV infection may induce significant immune dysfunction and thus render the tissue more susceptible to viral persistence, or adipose tissue may constitute an intrinsically favourable site for viral persistence (regardless of the host's infection status). We therefore decided to characterize the immune cell composition of adipose tissue in ART-controlled, HIV-infected (cART-HIV) patients and in non-HIV-infected patients.

We found that the CD4 T cell compartment in adipose tissue was not markedly disturbed (apart from an increase in the FOXP3 Treg percentage) during long-term, ART-controlled HIV infections. Neither the proportion of resident memory CD4 T cells nor the expression of activation markers was modified - suggesting that chronic HIV infection had a limited impact on adipose CD4 T cells. Remarkably, we observed high levels of PD-1 expression on adipose CD4 T cells in both cART-HIV patients and non-HIV-infected patients. These high levels of PD-1 expression may explain (i) the adipose immune cells' weak activation profile, and (ii) the viral persistence observed in adipose tissue.

For Peer Review

Materials and methods

Human samples

Adipose tissue samples from 11 ART-controlled, HIV-1-infected (cART-HIV) patients and from 19 non-HIV-infected patients were collected during planned, elective, abdominal surgery. The main exclusion criteria were inflammatory bowel disease, ischemic colitis, cancer, AIDS-related pathologies, and medical emergencies. The 11 cART-HIV patients were receiving long-term ART. They had displayed HIV control for more than 4 years and had an undetectable viral load at the time of surgery. The main indication for surgery in HIV-infected patients was weight loss surgery, although abdominal visceral adipose tissue (VAT) was also recovered in surgery unrelated to weight disorders (e.g. cholecystectomy). Accordingly, non-HIV-infected patients were selected among those undergoing surgery for either cholecystectomy or weight loss surgery. As shown in Table 1, the cART-HIV patients and non-HIV-infected patients did not differ significantly with regard to age, gender and body mass index (BMI). Written, informed consent was provided by all participants. The study protocol was approved by the local independent ethics committee (*Comité de Protection des Personnes Ile-de-France VII*, PP12-021, Paris, France). Abdominal subcutaneous adipose tissue (SCAT), VAT and/or blood samples (when available) were collected. The stromal vascular fraction (SVF) was isolated from fresh SCAT and/or VAT samples. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from EDTA-anticoagulated blood using Ficoll density gradient centrifugation.

Isolation of the SVF

Adipose tissue samples were treated as previously described [9]. SCAT and VAT samples were weighed, washed twice in PBS 1X supplemented with 5% foetal bovine serum (FBS), cut finely, and then digested in a collagenase bath (C2139, Sigma), at a concentration of 0.33 mg/mL in DMEM supplemented with 5% FBS) for 30 min at 37°C with constant shaking.

For Peer Review

Lastly, mechanical dissociation (by suction/discharge into a 10 mL syringe) was performed. The suspensions were then filtered through a 100-micron mesh. After an initial low-speed centrifugation (300*g*, 10 min) to isolate adipocytes (in the upper phase), the lower phase (comprising the SVF cells) was further centrifuged (500g, 10 min). The SVF cells were stained with Trypan blue (to identify dead cells) and then counted under a light microscopy using Malassez counting chambers (C-chip, NanoEntek, Seoul, Korea).

Phenotypic characterization of the adipose tissue SVF

After the saturation of Fc receptors by incubation with Fc block reagent (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 30 min at 4°C, cells were stained with monoclonal antibodies by incubation for 15 min at 4°C, washed in PBS 1X with 10% FBS, and fixed or permeabilized when required (Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer). Cell viability was assessed using Live/dead Fixable dye (Life Technologies, CA, USA).

The major immune subsets in adipose tissue were identified by cytometry using antibodies against CD45 (clone HI-30), CD3 (SP34-2), CD4 (L200), CD8 (leu2a), CD20 (2H7), CD14 (M5E2), CD11b (ICRF44) and HLA-DR (G46.6). Further characterization of adipose tissue CD4 T lymphocytes was performed by using antibodies against CD25 (2A3), Ki-67 (Clone B56), CD127 (MB15-18C9), CD69 (FN50), CD45RA (HI100), CD45RO (UCHL1), CTLA-4 (BNI3), PD-1 (EH12.2H7), TIGIT (MBSA43). The differentiation profile of adipose CD4 T cells was assessed by intracellular detection of the transcription factors T-BET (4B10), GATA-3 (L50-823), ROR-γ (Q21-559R1), FOXP-3 (236A/E7) and BCL-6 (K112-91). Corresponding isotype controls for CD69 and PD-1 were used at the same concentrations as the reference antibody. All antibodies were purchased from BD Biosciences, with the exception of CD11b (Beckman-Coulter). Data were collected on an LSR Fortessa cell analyzer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Treestar, Ashland, OR, USA).

For Peer Review

Statistical analysis

Data are summarized as the median [interquartile range (IQR)]. Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism software (version 7.02, GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA). A nonparametric, unpaired Mann-Whitney test was used to compare SCAT vs. VAT data (due to the low proportion of patients providing both SCAT and VAT samples) and to compare cART-HIV patients and non-HIV-infected patients. In graphs, p values are indicated as follows: * <0.05; ** <0.01; *** <0.001.

For Peer Review

Results

Low proportions of hematopoietic stromal vascular cells in adipose tissue

In our analysis of SCAT and/or VAT from adipose surgical samples recovered from cART-HIV patients and non-HIV-infected patients, we first determined the relative proportion of CD45-expressing cells in the SVF (Fig. 1A). $CD45^+$ cells accounted for a low proportion of SVF cells in both SCAT and VAT recovered from non-HIV-infected patients, as we previously reported for a non-human primate model [9]. The percentage of $CD45^+$ cells in VAT SVF was significantly lower in cART-HIV patients than in non-HIV-infected patients (Fig. 1A). To determine whether these low percentages reflected a loss of $CD45^+$ cells or the recruitment/expansion of $CD45^-$ cells, we counted CD45-expressing cells. The cART-HIV patients and non-HIV-infected patients had similar $CD45^+$ cell counts in both SCAT and VAT. Hence, these data suggest that the lower percentage of $CD45^+$ cells in the cART-HIV patients reflects an increase in the $CD45^-$ cell fraction.

We next counted adipose macrophages, T and B lymphocytes as a proportion of the total $CD45^+$ cell population in the two patient groups (Fig 1B). Adipose tissue macrophages, T lymphocytes and B lymphocytes were respectively identified as $CD45^+CD3^-CD14^+$, $CD45^+CD14^-CD3^+$ and $CD45^+CD14^-CD20^+$ cells. In non-HIV-infected patients, macrophages accounted for 30.1% [17.6-37.2] and 24.5% [9.8-31.8] of $CD45^+$ cells in SCAT and VAT, respectively. T lymphocytes accounted for 31.5% [23.4-45.5] in SCAT and 48.4% [40.0-60.1] in the VAT, revealing a SCAT vs. VAT difference in the percentage of $CD3^+$ cells. There was no difference between cART-HIV patients and non-HIV-infected patients with regard to percentage of macrophages among $CD45^+$ cells. There was a non-significant trend ($p=0.066$) towards a higher percentage of $CD3^+$ cells in the SCAT. Accordingly, the lower proportion of T cells detected in SCAT (compared with VAT) in non-HIV-infected patients was not observed in cART-HIV patients. B cells were essentially absent from all samples, as

For Peer Review

previously reported in non-human primates [9]; this constitutes a reliable marker of the absence of blood contamination of adipose tissue samples (Sup Fig. 1). In summary, we found that cART-HIV patients had normal macrophage proportions and a trend for elevated proportion of T cell in the SCAT.

A lower CD4/CD8 ratio in the SCAT of cART-HIV patients compared to non-HIV-infected patients

The CD4/CD8 ratio (a common marker of HIV infection) is also a guide to immune status and the development of inflammation in adipose tissue [21]. We evaluated the numbers of CD4 and CD8 T lymphocytes as a proportion of the total adipose tissue and PBMC $CD3^+$ cell (Fig. 2). In non-HIV-infected subjects, CD4 T cells were more predominant than CD8 T cells in SCAT (55.0% [48.2-66.7] vs. 25.2% [21.1-44.6], respectively). In VAT, CD4 and CD8 T cell subsets were equally represented (43.0% [38.0-53.7] and 41.0% [34.9-57.5], respectively). In the SCAT of cART-HIV patients, the CD4 T cell percentage was significantly lower (40% [32.7-49.3], p=0.0071) while CD8 T cell percentages were significantly higher (50% [42.0-59.3], p=0.0085) than in non-HIV-infected patients (25.2% [21.1-44.6]). No difference was observed in VAT of cART-HIV patients compared to non-infected patients. To determine whether the differences in CD4 and CD8 percentages in the SCAT of cART-HIV patients were related to a low CD4 T cell count and/or the recruitment of CD8 T cells in adipose tissue, we evaluated the CD4 and CD8 T cell counts per gram of SCAT and VAT (Fig. 2C). The measurements suggested that cART-HIV patients and non-HIV-infected patients have similar numbers of CD4 and CD8 T cells in their adipose tissues. However, these data should be interpreted with caution, given the low numbers of cells recovered and the large dispersion observed in the VAT samples. Regardless of the mechanisms responsible for the change in the CD4/CD8 ratio, SCAT was more drastically affected than VAT in cART-HIV patients (Fig. 2D).

For Peer Review

An elevated proportion of CD25$^+$ FOXP3$^+$ Tregs in the SCAT of cART-HIV patients

Given that a change in the CD4/CD8 ratio in adipose tissue might reflect CD8 T cell recruitment and *in situ* inflammation [20]–[22], we next evaluated the differentiation profiles of adipose CD4 T cells in general and the Treg and Th17 fractions in particular (Fig. 3A). In non-HIV-infected patients, adipose Treg cells (defined as CD25$^+$ FOXP3$^+$ CD4 T cells) accounted for 1.7% [0.9-6.4] of the CD4 T cells in SCAT and 2.2% [0.9-4.8] in VAT. We observed a significantly higher proportion of CD25$^+$ FOXP3$^+$ Tregs in the SCAT of cART-HIV patients (7.2% [6-11.3], p=0.0381). A similar trend was observed in the VAT. The Th17 population was evaluated through its expression of ROR-γ transcription factors. Similar, low percentages of Th17 CD4 T cells were detected in SCAT and VAT from non-HIV-infected patients and cART-HIV patients, although there was a non-significant trend towards a lower Th17 fraction in SCAT from cART-HIV patients. Accordingly, the Treg/Th17 ratio was significantly higher in the SCAT (Fig. 3B) - suggesting the development of immunosuppressive processes within adipose tissue in HIV-infected patients.

To further analyze if the environment is rather pro-or anti-inflammatory, we thus evaluated the proportions of Th1 CD4 T cells (including cells with intermediate or high levels of T-BET expression) and Th2 CD4 T cells (expressing GATA-3) (Fig. 3C). It is noteworthy that no co-expression of FOXP3, ROR-γ, T-BET and/or GATA-3 was observed in the adipose CD4 T cell population. T-BET$^+$ CD4 T cells were highly prevalent in the adipose tissue of both non-HIV-infected patients and cART-HIV patients. In non-HIV-infected patients, T-BET$^+$ cells accounted for 43.1% [24.5-61.7] of the CD4$^+$ T cells in SCAT and 31.7% [8.2-70] of the CD4$^+$ T cells in VAT. There was no significant difference between SCAT and VAT. Likewise, cART-HIV patients and non-HIV-infected patients had similar proportions of Th1 cells in adipose tissue. It is noteworthy that our analyses of CD4 T cells expressing intermediate levels of T-BET and cells expressing high levels of T-BET led to a similar

For Peer Review

conclusion: cART-HIV patients and non-HIV-infected patients had a similar percentage of Th1 cells. Virtually no Th2 GATA-3 CD4 T cells were detected in adipose tissue from either non-HIV-infected patients or cART-HIV patients Taken as a whole, our data on the inflammatory profile of adipose CD4 T cells did not reveal major changes in pro-inflammatory subsets (Th1 and Th17) but did indicate a slight increase in the proportion of Tregs in SCAT from cART-HIV patients.

No sign of activation nor change in resident memory proportion on adipose CD4$^+$ T in cART-HIV patients

We next evaluated the proliferation and activation profiles of adipose CD4 and CD8 T lymphocytes by determining the expression of Ki-67 (identifying cells in non-resting phases) and HLA-DR (a standard marker of T cell activation) (Fig. 4 and Sup Fig 2). The percentage of Ki-67$^+$ cells was relatively low (median value: below 2%) in both SCAT and VAT from non-HIV-infected patients. Non-HIV-infected patients and cART-HIV patients did not differ significantly with regard to the proportion of Ki-67$^+$ CD4 T cells or Ki-67$^+$ CD8 T cells - suggesting that T cell proliferation was fairly limited in adipose tissue. Similarly, the proportion of CD4 T cells expressing HLA-DR was similar in SCAT and in VAT (respectively 24.1% [16.6-36] and 21.1% [16.7-38] in non-HIV-infected patients. There were no significant differences between cART-HIV patients and non-HIV-infected patients. Similar profiles were observed for CD8 T cells (Sup Fig. 2).

Overall, we did not detect any signs of local immune cell activation during cART-HIV infection. We therefore decided to evaluate the memory differentiation profile of adipose CD4 T cells on the basis of CD45RA/RO discrimination and CD69 expression, as a marker of tissue resident memory T cell [23],[24]. Changes in the proportions of resident memory cell may indicate a disruption of adipose-specific memory homeostasis and the recruitment of activated cells. The adipose CD4 T cells were essentially CD45RO$^+$ in SCAT and VAT of

For Peer Review

both non-HIV-infected and cART HIV patients (Sup Fig. 3). In non-HIV-infected patients, CD69 was highly expressed on adipose CD4 T cells (76.7% [60.2-86] in VAT and 63.5% [44.6-70.6] in SCAT) when compared with CD4 T cells recovered from PBMCs (0.5% [0.3-0.6]); this difference suggests that the vast majority of T cells found in adipose tissue are resident memory cells, rather than circulating T cells (Fig. 5A). The percentages in both SCAT and VAT differed significantly from those in PBMCs. The proportions of resident CD4 T cells in SCAT and VAT were similar in cART-HIV patients and non-HIV-infected controls, although a trend towards a lower proportion in patients was detected (Fig. 5A).

Given that both activated and resident memory T cells in non-lymphoid tissue can express CD69, we screened a few samples for the expression of CD25 and/or Ki-67 (to ensure that CD69 expression was indeed a marker of resident cells). Due to the low quantity of cART-HIV samples, only samples from non-HIV-infected patients were analysed. As shown in Fig. 5B, Ki-67 or CD25-expressing cells were essentially detected in the CD69$^-$ negative fraction - a subset that we considered to be mainly composed of non-resident memory cells. In both SCAT and VAT, the proportion of Ki-67$^+$ cells was significantly higher for non-resident T cells than for CD69$^+$ resident memory CD4 T cells (SCAT: 6% [4.8-16.5] for non-resident T cells vs. 1.3% [1.4-3.2] for resident T cells; VAT: 5.2% [4.4-14] for non-resident T cells vs. 1.6% [0.8-2.8] for resident T cells). In parallel, CD25 expression was higher on non-resident CD4 T cells than on resident memory CD4 T cells - especially in the SCAT (5.2% [3.8-13] for CD69$^-$ T cells vs. 2.1% [1.3-3.6] for CD69$^+$ T cells). These observations of non-HIV-infected patients confirmed that the adipose tissue CD4 T cell population includes a high proportion of resident memory T cells with limited activation.

High PD-1 expression on adipose tissue CD4 T cells

We next sought to determine whether the limited T cell proliferation and activation in adipose tissue could be explained by T cell exhaustion [25]. Hence, we first evaluated the expression

For Peer Review

of PD-1 - a crucial marker of T cell exhaustion and a marker for a CD4 T subset that is enriched in HIV-infected CD4 T cells [26]. We observed PD-1 expression on a very high proportion of adipose tissue CD4 T cells (Fig. 6A): 45.4% [27.3-55.2] in SCAT and 61.6% [54.5-79] in VAT, vs. only 2.7% [2.7-2.8] in PBMCs. The latter value agrees with the literature data on PBMCs [27]. There were no statistically significant differences in PD-1 expression between SCAT and VAT or between non-HIV-infected patients and cART-HIV patients. We next applied the same strategy as previously above for distinguishing PD-1 expression on resident vs. non-resident adipose tissue CD4 T cells (Fig. 6B). Due to the small number of samples, this analysis was again only performed on non-HIV-infected patients. The proportion of PD-1$^+$ cells was significantly higher in resident CD69$^+$ CD4 T cells than in CD69$^-$ CD4 T cells in both SCAT and VAT (SCAT: 58.3% [44.5-71.8] vs. 33.5% [26.5-45.9], p=0.028; VAT: 71% [53.2-84] vs. 39.0% [32.7-58.5], p=0.007). Overall, we showed that high proportions of adipose tissue CD4 T cells (and more specifically adipose-tissue-resident CD69$^+$ CD4 T cells) express PD-1.

Co-expression of immune checkpoints on AT CD4 T cells

We next assessed the expression of other immune checkpoints, such as TIGIT and CTLA-4 (Fig. 7). Due to limited access to samples from cART-HIV patients, this analysis was again only performed in non-HIV-infected patients. TIGIT expression was detected on adipose CD4 T cells and significantly differed when comparing SCAT (20.5% [19.3-23.9] of total CD4 T cells) and VAT (10.8% [7.7-15.9]; p=0.0109). CTLA-4 was detected at relatively low levels on CD4 T cells from both SCAT and VAT. Given that the co-expression of immune checkpoints may identify exhausted cells (which are more prone to viral latency) [27], we looked at whether TIGIT expression was preferentially observed in PD-1 expressing cells. As shown in Fig 7C, we observed a the higher proportion of TIGIT expression in PD-1$^+$ CD4 T cells than in PD-1$^-$ cells in SCAT. A similar trend was observed for VAT. Importantly, the

For Peer Review

proportion of TIGIT expression in PD-1^{+} CD4 T cells differed in SCAT vs. VAT, with higher values in SCAT. In contrast, no heterogeneity in CTLA-4 expression was observed with regard to PD-1 expression. Overall, we observed heterogeneity in TIGIT expression among adipose PD-1^{+} CD4 T cells recovered from SCAT and VAT; this is suggestive of tissue differences in their immunoregulation profile.

For Peer Review

Discussion

We and others have identified adipose tissue as a site of viral persistence during chronic SIV and HIV infections [9]–[11]. There are two possible explanations for the persistence of HIV in adipose tissue: (i) exposure to HIV may induce significant immune dysfunction and thus render adipose tissue more susceptible to HIV persistence, or (ii) adipose tissue may constitute an intrinsically favourable site for viral persistence, regardless of the host's infection status. When focusing on surface marker expression in the CD4 T compartment, we did not observe any major differences between cART-HIV patients and non-HIV-infected patients for CD69 (a marker of tissue resident memory cells), HLA-DR or Ki-67. The same results were seen for CD8 T cells. The lack of higher activation in adipose tissue during cART is in contrast to what has been described for other body compartments (blood, lymph nodes) and underlines the potential immunosuppressive environment of the adipose tissue.

With regard to the differentiation profile, the adipose T cells' non-activated status in SCAT and VAT was associated with a relatively low proportion of $FOXP3^{+}$ CD4 T cells; this was true for both infected and non-HIV-infected subjects. To our knowledge, the present study is the first to have used cytometry to detect intracellular FOXP3 (and thus quantify Tregs) in human adipose tissue. This approach differs from Foxp3 mRNA detection strategies [12]–[17]. Our present results contrast with the observations made in murine models, in which Tregs are highly represented [28]–[30] but are also highly dependent on the animal's dietary regimen, age, gender, microbiota and inflammatory status [12],[31],[32]. Obesity, age and inflammation (all of which downregulate the proportion of Tregs in adipose tissue) were factors present in our study population, and may therefore explain the low proportion of Tregs seen in both infected and non-HIV-infected patients. Despite these low overall values, the Treg frequency was higher in HIV-infected cART patients. This increase is noteworthy because Tregs might limit the antiviral activity of HIV-specific CD4 and CD8 T cells.

For Peer Review

Given that PD-1 expression on T cells in HIV-infected hosts is associated with immune defects [33],[34], we evaluated the expression of PD-1 on adipose CD4 T cells. In non-HIV-infected patients, 60% to 75% of the adipose-tissue-resident $CD69^+$ CD4 T cells expressed PD-1. This high proportion of $PD1^+$ cells in non-HIV-infected patients may limit the development of a potent antiviral response. The higher frequency of Tregs in the SCAT of HIV-infected patients and the SCAT and VAT's intrinsic, high proportions of $PD1^+$ CD4 T cells suggest that the persistence of HIV-infected cells in adipose tissue is due to both extrinsic and intrinsic mechanisms.

Lastly, it has been shown that SCAT and VAT differ with regard to their metabolic properties and immune cell contents [35]–[39]. Here, we demonstrated that SCAT and VAT also differ in their immunoregulatory properties. Although the proportions of CD4 T cells expressing PD-1 were equivalent in VAT and SCAT, the CD4 T cells in SCAT included a significantly higher proportion of PD-1/TIGIT co-expressing cells. This observation prompts two conclusions. Given that CD4 T cells co-expressing immune checkpoints are enriched in HIV-infected CD4 T cells, the SCAT may be a useful (and easily accessible) source of material for studying HIV persistence [40]. Secondly, the preferential co-expression of PD-1 and TIGIT in CD4 T cells in SCAT (regardless of the host's HIV infection status) suggest that the immune response is regulated differently in SCAT vs. VAT.

The present study had several limitations. Firstly, the small quantities of adipose tissue recovered from surgical procedures prevented us from performing functional assays on adipose immune cells. Secondly, most of the non-HIV-infected patients in our "control" group were suffering from metabolic disease because the cART-HIV group predominantly comprised patients undergoing surgery for weight loss. Had the study restricted to non-HIV-infected and cART-HIV patients not exhibiting metabolic disorders, the results might have been different. However, lipodystrophy and metabolic disorders are frequently observed in cART-HIV patients [41],[42], and thus should be taken into account. Lastly, it will be

For Peer Review

important to determine the availability of PD-ligands in adipose tissue. Unfortunately, we were unable to detect PD-L1 in an immunohistochemical analysis of fixed adipose tissue sections; this might reflect low numbers of PD-L1$^+$ stromal cells or low levels of PD-L1 expression on these cells.

In conclusion, we observed a strikingly high proportion of PD-1 expressing adipose tissue T cells in both cART-HIV patients and non-HIV-infected patients. This high susceptibility to immunosuppression may be required to protect the adipose tissue's metabolic functions. However, the high proportion of PD-1-expressing CD4 T cells may be detrimental to immune responses. In the context of HIV infection, infected CD4 T cells are preferentially present in PD-1$^+$ CD4 T cell subsets [26],[27]. In the field of cancer, invasive tumours may infiltrate surrounding adipose tissue. The presence of PD-1$^+$ T cells in the vicinity of the tumour might prevent the activation of immune effectors. This observation also raises the question of the potential impact of anti-PD-1 strategies (used in a variety of clinical settings) on the adipose tissue's immune and metabolic properties.

For Peer Review

Acknowledgments

We thank the study participants and the staff collecting adipose tissue samples in the departments of surgery at Hôpital du Kremlin-Bicêtre, Percy and Montsouris. We thank the Sidaction charity and the ANRS (French National Agency for AIDS research) for funding this work. The Sidaction provided salary support for AD and MLV, the ANRS providing functioning support to UMR1184 (OL, CB)) as well as the Fondation L'Oréal (HIV unit in Pasteur, MMT).

.

For Peer Review

References

1. **Ferrante AW**. The immune cells in adipose tissue. *Diabetes. Obes. Metab.* 2013; **15 Suppl 3**:34–8.
2. **Weisberg SP**, **Mccann D**, **Desai M**, **Rosenbaum M**, **Leibel RL**, **Ferrante AW**. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003; **112**:1796–1808.
3. **Deng T, Lyon CJ, Minze LJ, Lin J, Zou J, Liu JZ, Ren Y, *et al.*** Article Class II Major Histocompatibility Complex Plays an Essential Role in Obesity-Induced Adipose Inflammation. *Cell Metab.* 2013; **17**:411–422.
4. **Wernstedt Asterholm I**, **Tao C**, **Morley TS**, **Wang QA**, **Delgado-Lopez F**, **Wang Z V**, **Scherer PE**. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metab.* 2014; **20**:103–18.
5. **Seboek D**, **Linscheid P**, **Zulewski H**, **Langer I**, **Christ-Crain M**, **Keller U**, **Müller B**. Somatostatin is expressed and secreted by human adipose tissue upon infection and inflammation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; **89**:4833–9.
6. **Smith AG**, **Sheridan PA**, **Tseng RJ**, **Sheridan JF**, **Beck MA**. Selective impairment in dendritic cell function and altered antigen-specific CD8+ T-cell responses in diet-induced obese mice infected with influenza virus. *Immunology*. 2009; **126**:268–79.
7. **Desruisseaux MS**, **Trujillo ME**, **Tanowitz HB**, **Scherer PE**. Disease Adipocyte , Adipose Tissue , and Infectious Disease ▪ . 2007; **75**.DOI: 10.1128/IAI.01455-06.
8. **Zhang L -j. L**, **Guerrero-Juarez CF**, **Hata T**, **Bapat SP**, **Ramos R**, **Plikus M V.**, **Gallo RL**. Innate immunity. Dermal adipocytes protect against invasive Staphylococcus aureus skin infection. *Science*. 2015; **347**:67–71.
9. **Damouche A, Lazure T, Avettand-Fènoël V, Huot N, Dejucq-Rainsford N, Satie A-P, Mélard A, *et al.*** Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection Silvestri G, ed. *PLOS Pathog.* 2015; **11**:e1005153.
10. **Couturier J, Suliburk JW, Brown JM, Luke DJ, Agarwal N, Yu X, Nguyen C, *et al.*** Human adipose tissue as a reservoir for memory CD4+ T cells and HIV. *AIDS*. 2015; **29**:667–74.
11. **Couturier J, Agarwal N, Nehete PN, Baze WB, Barry MA, Jagannadha Sastry K, Balasubramanyam A, *et al.*** Infectious SIV resides in adipose tissue and induces metabolic defects in chronically infected rhesus macaques. *Retrovirology*. 2016; **13**:30.
12. **Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, *et al.*** Lean , but not obese , fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009; **15**:1–11.
13. **Deiuliis J, Shah Z, Shah N, Needleman B, Mikami D, Narula V, Perry K, *et al.*** Visceral Adipose Inflammation in Obesity Is Associated with Critical Alterations in Tregulatory Cell Numbers Brusic V, ed. *PLoS One*. 2011; **6**:e16376.
14. **Zeyda M**, **Huber J**, **Prager G**, **Stulnig TM**. Inflammation correlates with markers of T-cell subsets including regulatory T cells in adipose tissue from obese patients. *Obesity (Silver Spring)*. 2011; **19**:743–8.
15. **Goossens GH**, **Blaak EE**, **Theunissen R**, **Duijvestijn AM**, **Clément K**, **Tervaert J-WC**, **Thewissen MM**. Expression of NLRP3 inflammasome and T cell population markers in adipose tissue are associated with insulin resistance and impaired glucose metabolism in humans. *Mol. Immunol.* 2012; **50**:142–9.
16. **Pereira S, Teixeira L, Aguilar E, Oliveira M, Savassi-Rocha A, Pelaez JN, Capettini L, *et al.*** Modulation of adipose tissue inflammation by FOXP3+ Treg cells, IL-10, and TGF-β in metabolically healthy class III obese individuals. *Nutrition*. 2014; **30**:784–790.
17. **Travers RL**, **Motta AC**, **Betts JA**, **Bouloumié A**, **Thompson D**. The impact of adiposity on adipose tissue-resident lymphocyte activation in humans. *Int. J. Obes.* 2015; **39**:762–769.
18. **Bertola A, Ciucci T, Rousseau D, Bourlier V, Duffaut C, Bonnafous S, Blin-Wakkach C, *et al.*** Identification of Adipose Tissue Dendritic Cells Correlated With Obesity-Associated Insulin-Resistance and Inducing Th17 Responses in Mice and Patients. *Diabetes*. 2012; **61**:2238–2247.
19. **Melkova Z**, **Shankaran P**, **Madlenakova M**, **Bodor J**. Current views on HIV-1 latency, persistence, and cure. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2017; **62**:73–87.
20. **Cildir G**, **Akıncılar SC**, **Tergaonkar V**. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends Mol. Med.* 2013; **19**:487–500.

21. **Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, *et al.*** CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009; **15**:914–920.
22. **Nishimura S**, **Manabe I**, **Nagai R**. Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. *Discov Med*. 2009; **8**:55–60.
23. **Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, Turner D, Camp P, Thome JJC, Bickham KL, *et al.*** Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity*. 2013; **38**:187–97.DOI: 10.1016/j.immuni.2012.09.020.
24. **Gebhardt T**, **Wakim LM**, **Eidsmo L**, **Reading PC**, **Heath WR**, **Carbone FR**. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* 2009; **10**:524–30.DOI: 10.1038/ni.1718.
25. **Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, *et al.*** Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 2000; **192**:1027–34.
26. **Chomont N, El-far M, Ancuta P, Trautmann L, Boulassel M, Procopio FA, Yassine-diab B, *et al.*** HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. 2009; **15**.
27. **Fromentin R, Bakeman W, Lawani MB, Khoury G, Hartogensis W, DaFonseca S, Killian M, *et al.*** CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLoS Pathog.* 2016; **12**:e1005761.
28. **Cipolletta D**, **Kolodin D**, **Benoist C**, **Mathis D**. Seminars in Immunology Tissular T regs : A unique population of adipose-tissue-resident Foxp3 + CD4 + T cells that impacts organismal metabolism. *Semin. Immunol.* 2011; **23**:431–437.
29. **Cipolletta D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, Shoelson SE, Benoist C, *et al.*** PPAR-γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature*. 2012; **486**:549–53.
30. **Cipolletta D**. Adipose tissue-resident regulatory T cells: phenotypic specialization, functions and therapeutic potential. *Immunology*. 2014; **142**:517–25.
31. **Cipolletta D**, **Cohen P**, **Spiegelman BM**, **Benoist C**, **Mathis D**. Appearance and disappearance of the mRNA signature characteristic of Treg cells in visceral adipose tissue: age, diet, and PPARγ effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015; **112**:482–7.
32. **Kolodin D, van Panhuys N, Li C, Magnuson AM, Cipolletta D, Miller CM, Wagers A, *et al.*** Antigen- and cytokine-driven accumulation of regulatory T cells in visceral adipose tissue of lean mice. *Cell Metab.* 2015; **21**:543–57.
33. **Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, *et al.*** PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006; **443**:350–4.
34. **Porichis F**, **Kaufmann DE**. Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 2012; **9**:81–90.
35. **Ibrahim MM**. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*. 2010; **11**:11–18..
36. **Bruun JM**, **Lihn AS**, **Pedersen SB**, **Richelsen B**. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Release Is Higher in Visceral than Subcutaneous Human Adipose Tissue (AT): Implication of Macrophages Resident in the AT. 2005; **90**:2282–2289.
37. **Wajchenberg B**. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue : their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* 2000; **21**:697–738.
38. **Fried SK**, **Bunkin DA**, **Greenberg AS**. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; **83**:847–50.
39. **Cancello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, Coussieu C, *et al.*** Increased Infiltration of Macrophages in Omental Adipose Tissue Is Associated With Marked Hepatic Lesions in Morbid Human Obesity. *Diabetes*. 2006; **55**:1554–1561.
40. **Olesen R**, **Leth S**, **Nymann R**, **Østergaard L**, **Søgaard OS**, **Denton PW**, **Tolstrup M**. Immune checkpoints and the HIV-1 reservoir: proceed with caution. *J. virus Erad.* 2016; **2**:183–6.
41. **Caron-Debarle M**, **Lagathu C**, **Boccara F**, **Vigouroux C**, **Capeau J**. HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol. Med.* 2010; **16**:218–29.
42. **Capeau J, Bouteloup V, Katlama C, Bastard J-P, Guiyedi V, Salmon-Ceron D, Protopopescu C, *et al.*** Ten-year diabetes incidence in 1046 HIV-infected patients started on a combination antiretroviral treatment. *AIDS*. 2012; **26**:303–14.

Table

HIV status	n	M/F ratio	Age (years)	BMI	Viral load (copies/mL)	Duration of treatment (years)
HIV-	19	8M/11F	53 [34-68]	25 [22-29]	*not applicable*	*not applicable*
ART+ HIV+	11	3M/8F	48 [48-58]	27 [24-43]	<40	17 [8-20]

Table 1. Characteristics of the study population

Data are presented as the median [IQR]. The two groups did not differ significantly with regard to age and BMI.

For Peer Review

Legends

Figure 1. Limited impact of cART- HIV infection on adipose tissue CD45$^+$ cells

Flow cytometry analyses of the SVF isolated from abdominal SCAT and/or VAT in non-HIV-infected and cART-HIV patients. (A) The number and percentage of CD45-expressing cells per gram of tissue. Analyses were performed on 14 SCAT samples and 11 VAT samples recovered from non-HIV-infected patients (n=19) and on 6 SCAT samples and 5 VAT samples from cART-HIV patients (n=11). (B) A representative dot plot showing CD3 and CD14 expression among CD45$^+$ cells in non-HIV-infected patients. (C) The percentage of CD14- and CD3- expressing cells among CD45$^+$ cells from SCAT and VAT in non-HIV-infected patients and cART-HIV patients. Measurements were performed on 13 to 15 samples from non-HIV-infected patients and 7 to 8 samples from cART-HIV-infected patients. Median [IQR] values are indicated. Significant differences were determined in a non-parametric Mann-Whitney test: ** $p<0.01$.

Figure 2. Impact of cART- HIV infection on adipose CD4 and CD8 T cell subsets

(A) Representative dot plots showing the proportion of CD4- and CD8-expressing CD3$^+$ T cells recovered from SCAT, VAT and PBMCs in non-HIV-infected patients. (B) Percentage of CD4- and CD8-expressing CD3$^+$ cells in SCAT and VAT recovered from non-HIV-infected patients and cART-HIV patients. Measurements were performed on 11 to 14 samples from non-HIV-infected patients and 6 to 7 cART-HIV patients. (C) CD4 and CD8 T cell counts per gram of adipose tissue in SCAT and VAT from cART-HIV and non-HIV-infected patients. Measurements were performed on 4 VAT and 6 SCAT samples from non-HIV-infected patients and 3 VAT and 5 SCAT samples from cART-HIV patients. (D) The CD4/CD8 ratio in SCAT and VAT from cART-HIV patients and non-HIV-infected patients. Ratios are based on the CD4 and CD8 percentages recovered in (B). Median [IQR] values are

For Peer Review

indicated. Significant differences were determined in a non-parametric Mann-Whitney test: ** $p<0.01$.

Figure 3. The impact of cART- HIV infection on the differentiation profile of adipose CD4 T cells

(A) Proportions of Treg and Th17 CD4 T cells in adipose tissue. Left, representative dot plots showing CD25 and FOXP3 co-expression and ROR-γ expression among CD4 T cells in SCAT samples from non-HIV-infected patients. Right, Tregs and Th17 cells as a percentage of CD4 T cells in SCAT, VAT and PBMC samples from non-HIV-infected patients and cART-HIV patients. (B) The percentage of T-BET$^+$ CD4 T cells in adipose tissue. Left panel: representative dot plots showing the percentage of T-BET$^+$ cells among CD4 T cells in SCAT from non-HIV-infected patients. FMO staining (indicated as "no Ab") was used to define the gating strategy. Right panel: the percentage of T-BET$^+$ cells among CD4 T cells in SCAT, VAT and PBMC samples from non-HIV-infected and cART-HIV patients. Depending on the type of adipose tissue and the staining method, measurements were made for 10 to 14 non-HIV-infected patients and 3 to 5 cART-HIV patients. Median [IQR] values are indicated. Significant differences were determined in a non-parametric Mann-Whitney test: * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Figure 4. No changes in the activation profile of adipose CD4 T cells during cART- HIV infection

Dot plots and graphs showing the percentage of CD4 T cells expressing Ki-67 and HLA-DR. Left: representative dot plots showing Ki-67 (or HLA-DR) and CD4 expression among CD3$^+$ in SCAT from non-HIV-infected patients. The graphs show the percentages of Ki-67 or HLA-DR expressing CD4 T cells in SCAT and VAT from non-HIV-infected patients and cART-HIV patients. The analysis was performed on 12 SCAT and 9 VAT samples from non-HIV-

For Peer Review

infected patients and on 5 SCAT and 4 VAT samples from cART-HIV patients. Median [IQR] values are indicated.

Figure 5. The predominantly resident memory profile of adipose CD4 T cells

(A) Representative dot plots showing the proportion of CD69 and CD4 expression among $CD3^+$ cell in SCAT from non-HIV-infected patients. Isotype antibody staining was used to define the gating strategy, as shown on the right dot plot. The graphs shows the percentage of CD69-expressing CD4 T cells in SCAT, VAT and PBMCs from non-HIV-infected and cART-HIV patients. (B) Percentages of Ki-67- and CD25-expressing cells, as a function of CD69 expression. The representative dot plots combine CD69 expression with Ki67 or CD25 expression among total CD4 T cells in non-HIV-infected patients. The percentage of Ki67- or CD25-expressing cells is indicated for $CD69^+$ vs. $CD69^-$ adipose tissue CD4 T cells. Combined Ki67/CD69 analyses were performed on SCAT (n=5) and VAT (n=5) samples from non-HIV-infected patients. Combined CD25/CD69 analyses were performed on SCAT (n=8) and VAT (n=6) samples from non-HIV-infected patients. Median [IQR] values are indicated. Significant differences were determined in a non-parametric Mann-Whitney test: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Figure 6. PD-1 expression on adipose CD4 T cells

(A) Representative dot plots showing CD4 and PD-1 co-expression among $CD3^+$ cell in SCAT from non-HIV-infected patients. Isotype staining was used to define the gating strategy. Below, the percentage of PD-1 expressing CD4 T cells recovered from SCAT (n=9) and VAT (n=6) in non-HIV-infected and cART-HIV patients (n=5) is shown. (B) Left panel: representative dot plots showing CD69 and PD-1 (or isotype) co-expression among total CD4 T cells recovered from non-HIV-infected patients. Right panel: percentages of PD-1-expressing $CD69^+$ or $CD69^-$ adipose CD4 T cells recovered from SCAT (n=6) and VAT (n=7)

For Peer Review

in non-HIV-infected patients. Median [IQR] values are indicated. Significant differences were determined in a non-parametric Mann-Whitney test: * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

Figure 7. Expression of immune checkpoints other than PD-1 on adipose CD4 T cells in non-HIV-infected patients

(A) A dot plot and graph showing the percentage of TIGIT-expressing CD4 T cells recovered from SCAT (n=5) and VAT (n=8) in non-HIV-infected patients (circles and squares, respectively). The dot plots show CD69 and TIGIT co-expression by CD4 T cells recovered from SCAT. (B) A dot plot and graph showing the percentage of CTLA-4^+ cells (intracellular detection) among the CD4 T cell fraction recovered from SCAT (n=4) and VAT (n=5) in non-HIV-infected patients (circles and squares, respectively). (C) The percentages of TIGIT- and CTLA-4-expressing PD-1^+ and PD-1^- CD4 T cells recovered from SCAT and VAT in non-HIV-infected patients. Median [IQR] values are indicated. Significant differences were determined in a non-parametric Mann-Whitney test: ** $p<0.01$.

For Peer Review

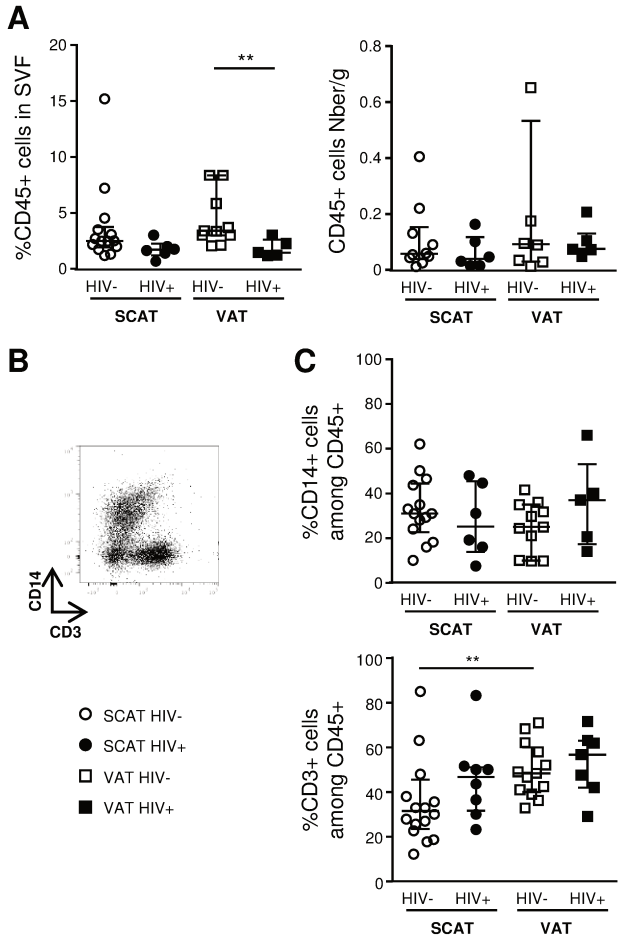

A
%CD45+ cells in SVF
20
15
10
5
0
**
HIV-
HIV+
HIV-
HIV+
SCAT
VAT
CD45+ cells Nber/g
0.8
0.6
0.4
0.2
0
B
CD14
CD3
SCAT HIV-
SCAT HIV+
VAT HIV-
VAT HIV+
C
%CD14+ cells among CD45+
100
80
60
40
20
0
%CD3+ cells among CD45+

Figure 1

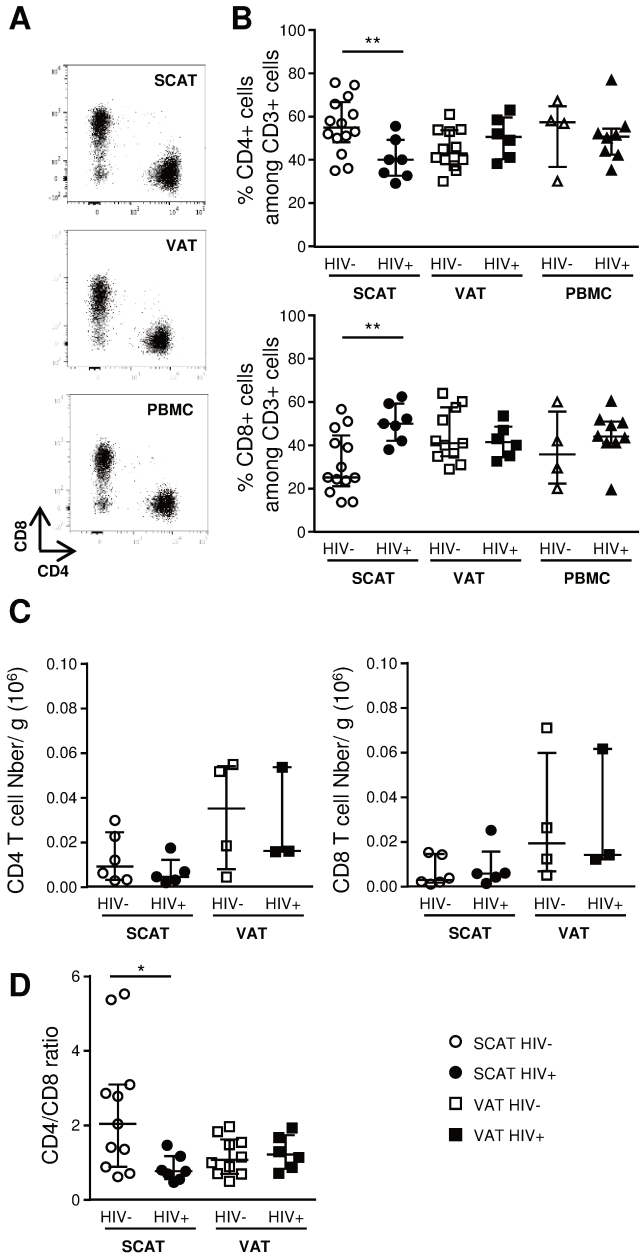

A
SCAT
VAT
PBMC
CD8
CD4
B
% CD4+ cells among CD3+ cells
% CD8+ cells among CD3+ cells
**
HIV-
HIV+
SCAT
VAT
PBMC
C
CD4 T cell Nber/ g (10^6)
CD8 T cell Nber/ g (10^6)
D
CD4/CD8 ratio
*
SCAT HIV-
SCAT HIV+
VAT HIV-
VAT HIV+

Figure 2

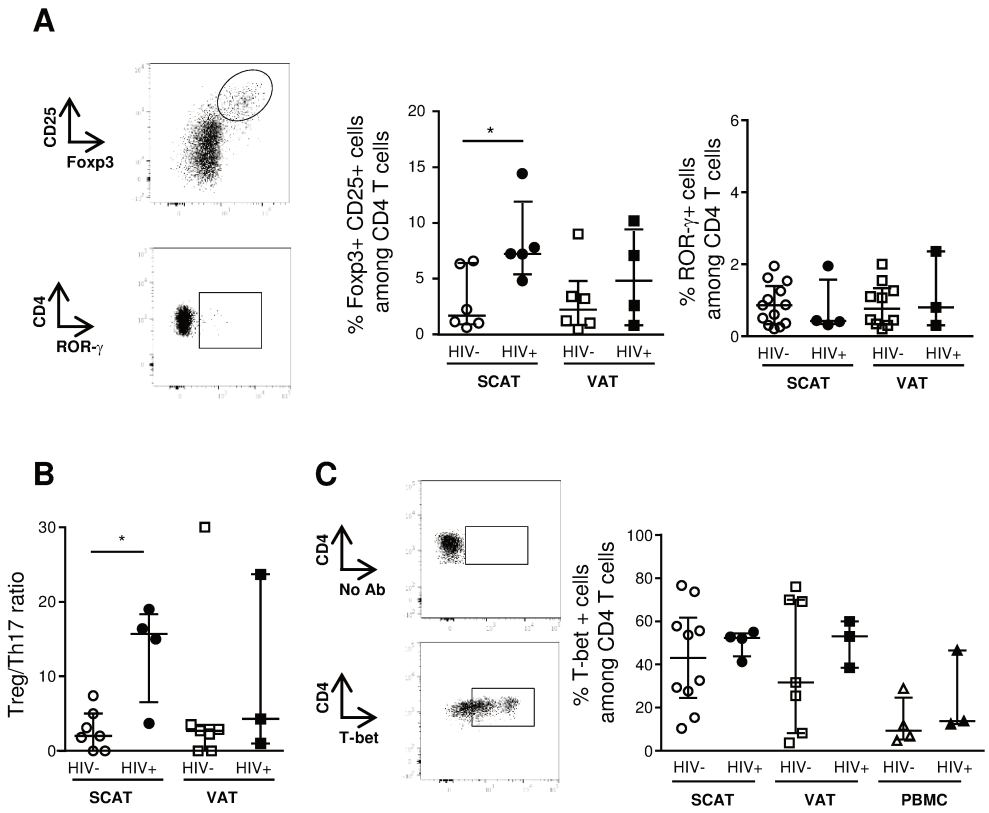

A
CD25
Foxp3
CD4
ROR-γ
% Foxp3+ CD25+ cells among CD4 T cells
% ROR-γ+ cells among CD4 T cells
HIV-
HIV+
SCAT
VAT
B
Treg/Th17 ratio
C
CD4
No Ab
T-bet
% T-bet + cells among CD4 T cells
PBMC

Figure 3

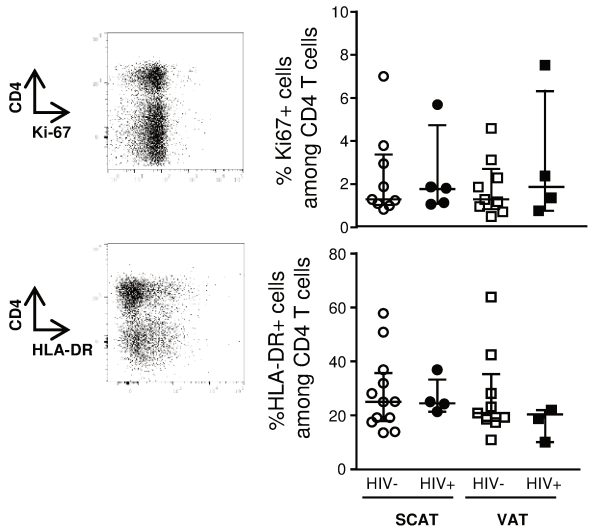

CD4
Ki-67
% Ki67+ cells among CD4 T cells
10
8
6
4
2
0
CD4
HLA-DR
%HLA-DR+ cells among CD4 T cells
80
60
40
20
0
HIV-
HIV+
HIV-
HIV+
SCAT
VAT

Figure 4

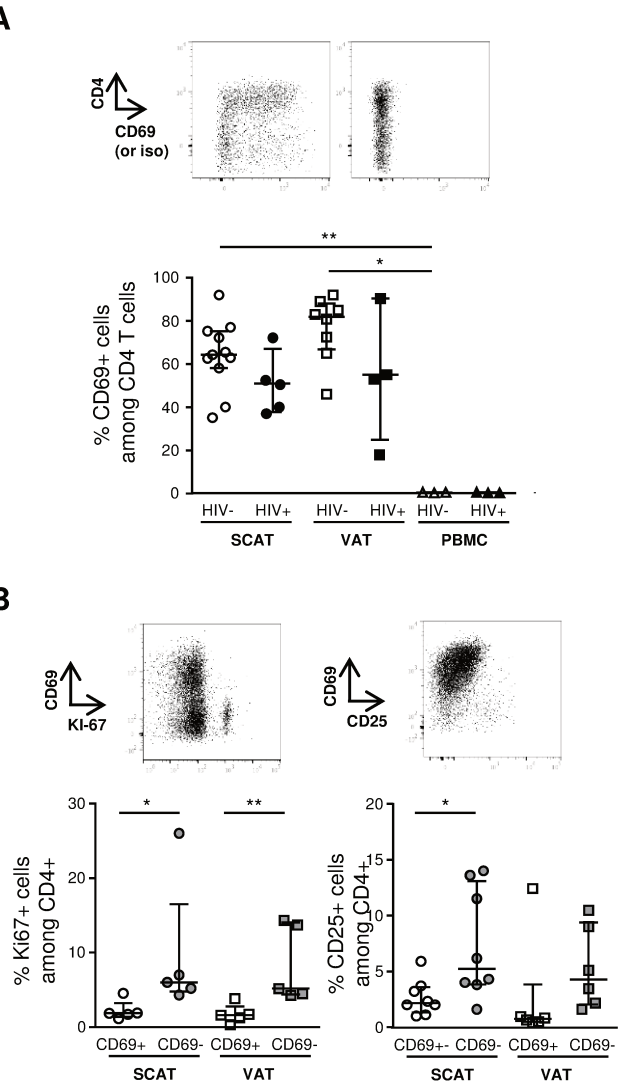

A
CD4
CD69
(or iso)
**
*
% CD69+ cells
among CD4 T cells
100
80
60
40
20
0
HIV-
HIV+
HIV-
HIV+
HIV-
HIV+
SCAT
VAT
PBMC
B
CD69
KI-67
CD69
CD25
% Ki67+ cells
among CD4+
30
20
10
0
*
**
CD69+
CD69-
CD69+
CD69-
SCAT
VAT
% CD25+ cells
among CD4+
20
15
10
5
0
*
CD69+-
CD69-
CD69+
CD69-
SCAT
VAT

Figure 5

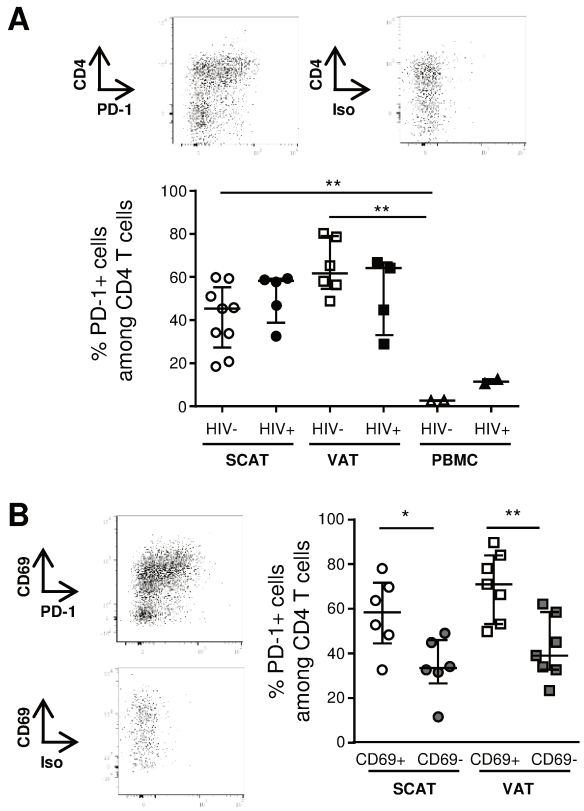

A
CD4
PD-1
CD4
Iso
% PD-1+ cells among CD4 T cells
100
80
60
40
20
0
**
**
HIV-
HIV+
HIV-
HIV+
HIV-
HIV+
SCAT
VAT
PBMC
B
CD69
PD-1
CD69
Iso
% PD-1+ cells among CD4 T cells
100
80
60
40
20
0
*
**
CD69+
CD69-
CD69+
CD69-
SCAT
VAT

Figure 6

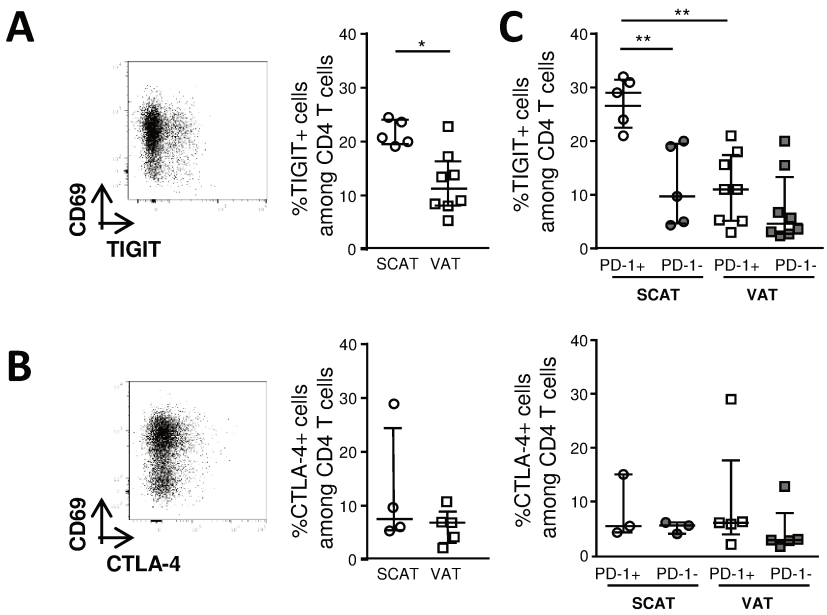
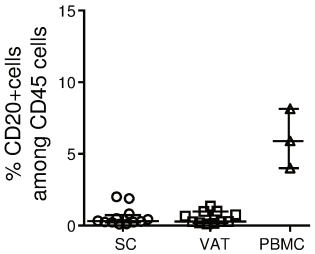

A
CD69
TIGIT
%TIGIT+ cells among CD4 T cells
SCAT VAT
B
CD69
CTLA-4
%CTLA-4+ cells among CD4 T cells
SCAT VAT
C
%TIGIT+ cells among CD4 T cells
PD-1+ PD-1- PD-1+ PD-1-
SCAT VAT
%CTLA-4+ cells among CD4 T cells
PD-1+ PD-1- PD-1+ PD-1-
SCAT VAT

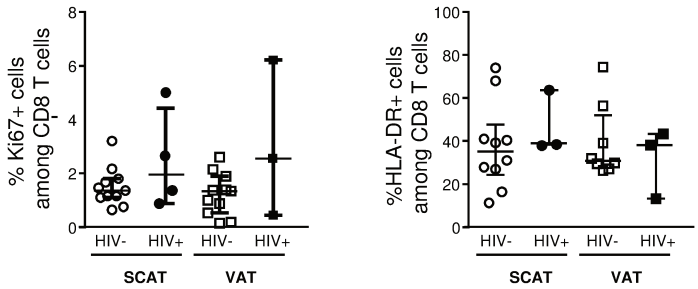
Figure 7

Supplemental Information

Sup Figure 1. No significant proportion of B cells in adipose tissue stromal vascular fraction

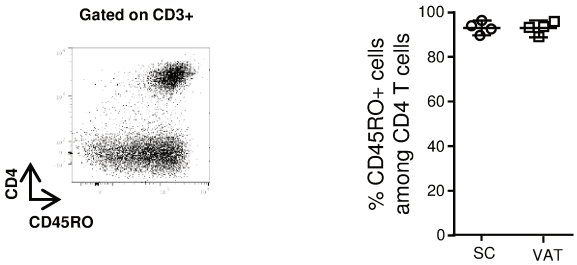
Percentage of CD20 expressing cells among CD45+ cells from SCAT and VAT of non-HIV-infected and cART-HIV patients. When considering the proportion of CD45 expressing cells in adipose tissue, the percentage of CD20+ cells among SVF cells is negligible. Percentages recovered from non-infected patients and cART-HIV patients were pooled. Median value and interquartile ranges are indicated.





Sup Figure 2. No change in activation profile (CD8 T cell fraction)

Graph showing the percentage of cells expressing Ki-67 and HLA-DR among CD8 T cells (as shown for CD4 T cells in Fig 4). Analysis performed on 11 SCAT and 8 VAT samples for non-infected patients and on 4 SCAT and 3 VAT samples for cART-HIV patients. Median value and interquartile ranges are indicated.



Sup Figure 3. Predominant CD45RO expression on adipose CD4 T cell

Dot plot and graph showing the percentage of cells expressing CD45RO among CD4 T cells. Representative dot plot showing CD4 and CD45RO expression on CD3+ cells obtained from SCAT of non-infected patients. Graph showing CD45RO+ percentages among CD4 T cells recovered from SCAT and VAT recovered from HIV non-infected and cART-HIV patients. Percentages recovered from non-infected patients and cART-HIV patients were pooled. Median value and interquartile ranges are indicated.

Annexe 1. Analyse du potentiel pro- ou anti-inflammatoire du tissu adipeux chez le singe infecté virémique, approche cytokinique.

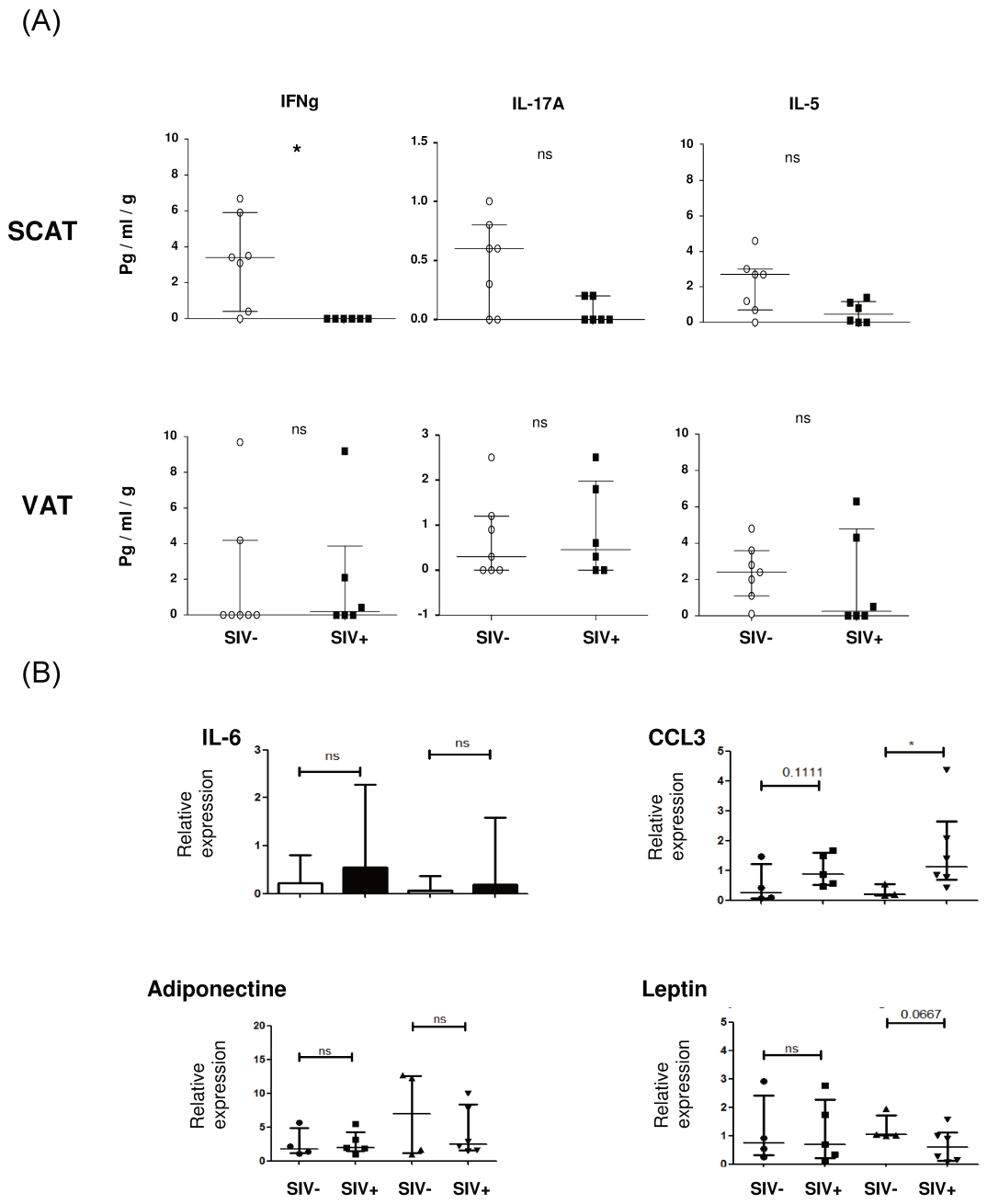


Fig A1. Pro-inflammatory cytokines detection at the protein and mRNA levels in adipose tissue
(A) Protein extracts were obtained from SCAT and VAT of 6 healthy macaques and 6 chronically SIV infected macaques. Concentrations of various pro-inflammatory cytokines were measured by Luminex (sCD40L, TNF-A, MCP-1, IL-1B, IL-2,IL-4, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, MiP1a, MIP1B, VEGF, G-CSF, GM-CSF, TGF-a). Significant differences were observed solely for IFN-γ, IL-17A, IL-5 levels and are presented. (B) Detection of mRNA coding for IL-6, CCL3, adiponectin and leptin was performed on total SCAT and VAT samples recovered from 4 healthy macaques and 6 chronically SIV infected macaques. Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Annexe 2. Proportion de lymphocytes Tγδ dans le TA de patients infectés par le VIH

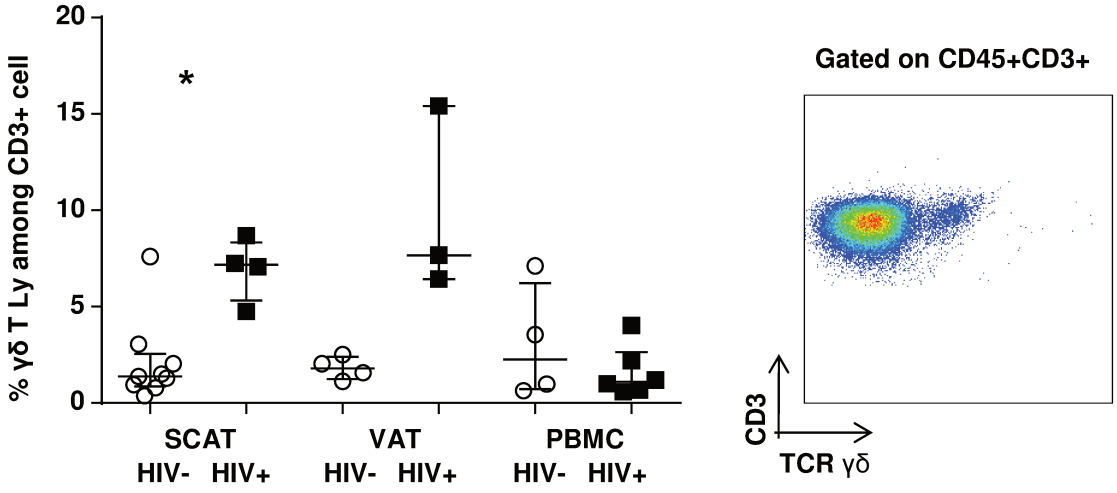


Fig A2. Difference in the proportion of γδT lymphocytes between HIV non-infected and HIV infected patients.

(A) Graphs showing the percentage of γδ T lymphocytes among CD3+ T lymphocytes recovered from SCAT, VAT and PBMCs from 9 non-infected patients and 4 HIV infected patients under ART. Significant differences in a Mann-Whitney non-parametric test are shown as * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. (B) Dot plots showing the expression TCR γδ among CD3 expressing cells.

Discussion

"De la discussion jaillit la lumière."

Proverbe indien

DISCUSSION

I. Persistance du VIH dans le tissu adipeux et identification d'un site réservoir

Jusqu'ici, très peu d'études se sont intéressées à la question de la présence du virus dans le TA du fait des résultats relativement contradictoires obtenus sur la fraction adipocytaire. Ces études avaient conduit à considérer que le TA n'était pas une cible privilégiée pour le VIH in vivo et ne constituait probablement pas un réservoir pour le virus (Munier et al. 2003), bien que les cellules adipocytaires soient infectables in vitro. Ces études s'étaient limitées à la recherche du virus au niveau des adipocytes ou de lysats de TA (Hazan et al. 2002). Les travaux sur l'obésité est la meilleure caractérisation de la composante immunitaire du TA, démontrant la présence de LT CD4+ et macrophages dans le TA nous ont conduit à reconsidérer le rôle réservoir du TA. Notre étude s'est focalisée sur les cibles classiques de l'infection par le SIV/HIV (macrophages et LT CD4+) et nous a permis de démontrer que le TA doit être considéré comme une cible du VIH.

I. 1. Détection du virus dans le TA

Pour valider notre hypothèse, nous avons travaillé initialement sur le TA d'animaux infectés virémiques chroniques. Nous avons ainsi détecté la présence d'ADN et d'ARN viral dans la FSV, dans les LT CD4+ et les macrophages du TASC et TAV. Le virus était détecté dans toutes les FSV testées, toutes les fractions LT CD4+ et certains échantillons des fractions macrophagiques. Dans un second temps, nous avons confirmé nos observations dans le TA de patients infectés traités efficacement, c'est-à-dire présentant une charge virale plasmatique indétectable. Chez les patients traités efficacement, nous avons été capables de détecter le virus uniquement dans les FSV totales et LT CD4+ et non dans les macrophages. La détection du virus dans ces deux fractions sera donc discutée séparément.

Les LT CD4+

Le virus est détectable à la fois dans les fractions LT CD4+ du TA viscéral et sous-cutané. La présence du virus dans le TA ne semble donc pas strictement liée à la proximité de la muqueuse intestinale puisque les deux tissus sont également infectés. Ceci reflète la capacité du virus à disséminer. Nous avons montré que la quantité d'ADN viral retrouvée dans les cellules de la FSV du TASC et du TAV des patients était inférieure à celle retrouvée dans les PBMC. Cependant, la proportion de cellules hématopoiétiques est très différente entre le TA et le sang et explique cette plus faible quantité de virus détectée. En réalisant une analyse complémentaire sur les seules

fractions LT CD4+ du TA et des PBMC respectivement, nous avons retrouvé un niveau d'infection équivalent entre les compartiments adipeux et sanguins.

L'accès aux prélèvements tissulaires des patients infectés est difficile à obtenir. En utilisant le modèle macaque, nous avons pu comparer la quantité de virus détectée dans le TA par rapport aux ganglions lymphatiques et à la rate. Nos résultats démontrent que les quantités de virus retrouvés dans le TA de ces macaques étaient équivalentes à celle retrouvées dans les ganglions mésentériques et la rate, deux réservoirs importants. Nous n'avons pas eu l'occasion lors de cette étude d'évaluer la quantité d'ADN viral en comparaison à l'intestin, un organe qui est une cible majeure de l'infection.

Si le TA présente une proportion de cellules infectées relativement similaire aux autres tissus testés, il nous semble important d'évaluer si les mêmes séquences virales étaient présentes dans le TA et les autres sites réservoirs. Nous n'avons pu mener cette stratégie de séquences que pour un seul patient en comparant les fractions LT CD4+ du TA et du sang circulant. Chez cet unique patient, la séquence virale présentait un degré d'hétérogénéité confirmant que les séquences virales isolées du sang circulant et du TA n'étaient pas les mêmes.

Pour identifier le TA et/ou la fraction LT CD4+ du TA comme un réservoir viral, il fallait enfin montrer que le virus était capable de se répliquer. Nous avons donc réalisé un test de réactivation ex vivo soit sur cellules de FSV totales, soit sur fractions triées de LT CD4+ (ou macrophages). L'importance de ce test est lié au fait que l'ADN proviral intégré n'est capable de se répliquer que dans une petite fraction de LT CD4+ mémoires quiescents (Perelson et al. 1997; Chun et al. 1995). Nous avons pu démontrer la capacité de réactivation des souches virales chez les 6 patients infectés par le VIH et sous traitement antirétroviral efficace que nous avons étudié.

Les macrophages

Nous avons pu montrer que les macrophages provenant de TA de macaques virémiques étaient infectés par le SIV, cependant nous n'avons pas pu confirmer ces résultats chez les patients infectés mais sous ARV. Cette absence de détection du virus dans les macrophages entre singes virémiques et patients traités pourrait être liée au traitement et au contrôle de la charge virale plasmatique qui en découle. Néanmoins, elle pourrait aussi être expliquée par les stratégies de tri de macrophages différentes utilisées entre les deux espèces. En effet, chez le macaque, le virus a été détecté dans la fraction CD14+ totale, par contre chez les patients cela a été fait sur la fraction CD14+ CD206+ (résidente). L'objectif de cette stratégie de gating plus resserrée chez les patients était d'éviter une éventuelle contamination par des monocytes circulants (CD14+). Cependant, une différence d'infectabilté des macrophages M1 et M2 est décrite (Cassol, Cassetta, et al. 2010), les fractions

M1 étant plus infectées que les fractions M2 (au profil plus anti-inflammatoire). En choisisant la stratégie d'une sélection stricte des cellules CD14+ CD206+ pour le tri, nous avons pu artificiellement exclure la fraction de macrophages préférentiellement infectés. Un tri de la totalité des macrophages du TA chez l'homme nous permettra de confirmer ou d'infirmer la persistance du virus dans cette fraction. Un dernier aspect technique est aussi lié au faible nombre de macrophages triés dans le TA, limitant la sensibilité de détection.

Si ces doutes techniques sont levés, il sera possible de discuter l'hypothèse de l'effet des ARV plus spécifiquement sur les macrophages du TA. Envisager un effet des ARV sur les macrophages du TA n'est pas intuitif puisque les ARV ne permettent pas l'éradication du virus dans les LT CD4+. Il faudrait donc envisager : (a) un effet indirect et/ou à distance des ARV affectant plus spécifiquement les macrophages du TA. On peut envisager une infection des macrophages dans les singes infectés, très directement liée à la charge virale haute dans le sang circulant, et une sensibilité des monocytes et/ou macrophages du TA au virus circulant; (b) l'absence de macrophages infectés dans le TA du fait d'un renouvellement plus important, assurant une élimination rapide des macrophages infectés; (c) une diffusion des ARV dans le TA, avec un impact préférentiel sur les macrophages (lié à l'expression de différents transporteurs cellulaires, de propriétés de séquestration des ARV différentes).

Nos tests de réactivation virale ont échoué à démontrer la pathogénicité du virus au sein des macrophages du TA humain. Différentes hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette absence de réplication : (a) les molécules utilisées pour la réactivation (LPS, IL-6, TNF-α) favorisent un profil M1 qui pourrait empêcher la réactivation des macrophages M2 du TA (Cassol, Cassetta, et al. 2010); (b) le virus n'est pas présent : nous n'avons pas pu démontrer formellement la présence de virus dans les macrophages du TA; (c) on peut imaginer que les macrophages du TA ont besoin de stimuli particuliers pour être activés. Il a été décrit que les macrophages du TA sont activés lors de la lipolyse (Kosteli et al. 2010). On pourra envisager d'activer les macrophages du TA par des lysats d'adipocytes ex vivo pour essayer d'activer le virus.

Les adipocytes

Nous avons aussi voulu étudier si les adipocytes sont infectés. Nous avons pu détecter la présence du SIV sur les fractions adipocytaires de deux singes chroniquement infectés par le SIV. Ce résultat mérite d'être plus affiné puisque la technique de séparation des adipocytes (simple centrifugation pour prélever les adipocytes qui restent en surface) n'est pas aussi rigoureuse que celle utilisée pour collecter les cellules de la FSV. On ne peut exclure une fraction de contamination par des macrophages et LT CD4+ qui seraient restés en contact étroit avec les

adipocytes. Un tri d'adipocytes sera la meilleure façon de purifier ces cellules mais reste très difficile à mettre en place techniquement du fait de la taille et de la fragilité de ces cellules.

II. Impact de l'infection par le VIH sur les propriétés immunologiques du TA

Faible déplétion des LT CD4+ dans le TA des animaux infectés virémiques

De manière surprenante, la détection du virus dans le TA est associée à une préservation du nombre de LT CD4+ du TA dans le modèle macaque infecté virémique mais aussi chez les patients infectés par le VIH et traités efficacement (même si l'effectif plus restreint et la forte variabilité chez l'homme nous impose d'être plus mesuré pour les données chez l'homme). Une telle préservation du nombre de LT CD4+ dans le TA suggère qu'il existe des mécanismes locaux, spécifiques au TA ou non, qui limitent l'efficacité des réponses immunitaires. Un autre site où les LT CD4+ (et notamment les LT CD4+ infectés) sont préservés, a été récemment décrit : il s'agit des LT CD4+ des centres germinatifs au sein des GL et plus particulièrement des LT CD4 Tfh. Les travaux de Fukazawa et col., démontrent que la persistance des LT CD4+ infectés dans les centres germinatifs est associée à un éloignement des LT CD8+ qui ne migrent pas dans les zones folliculaires des GL. Fait intéressant, le TA présente ces deux caractéristiques, à savoir la préservation du nombre des LT CD4+ et l'éloignement des LT CD8+ (localisés en périvasculaire, même lors de l'infection où la proportion de LT CD8+ est augmentée) et des LT CD4+ (qui sont situés plus en profondeur dans le TA, entre les adipocytes). L'absence ou la faible fréquence de contact entre LT CD8+ effecteur et LT CD4+ cible est un mécanisme extrêmement efficace pour empêcher l'élimination des cellules infectées. Il semble donc que pour ces deux tissus, le virus utilise à son profit les propriétés anatomiques de ces tissus et persiste spécifiquement dans des sites peu accessibles aux cellules effectrices. Il est tentant d'envisager que les mécanismes responsables de la non-colocalisation des LT CD4+ et LT CD8+ dans les GL et le TA soient similaires et reposent sur un profil chimioattractant très spécifique des LT CD4+ et/ou d'autres cellules de ces tissus. Pour aborder cette hypothèse, une étude comparative des LT CD4+ du TA (et notamment de leur potentiel chimioattractant) et des LT CD4+ Tfh des GL est actuellement en cours dans le laboratoire.

Peu de signes d'activation dans le TA

Lors de l'analyse des paramètres immunologiques, nous avons observé à la fois dans le modèle macaque infecté virémique et chez les patients infectés sans charge virale plasmatique détectable, une modification du ratio CD4/CD8 dans le TA. Comme vu précédemment, cette diminution du ratio n'était pas associée à une dépletion des LT CD4+ (pas de modification significative en

nombre dans les deux modèles) mais reflète plus probablement une augmentation significative du nombre de LT CD8+. L'augmentation en nombre est significative dans le modèle macaque, mais n'est pas retrouvée chez les patients infectés sous traitement efficace ce qui suggère un effet « normalisant » du traitement ARV. La modification du ratio et la probable accumulation de LT CD8+, même modérée, peuvent être considérées comme un signe d'activation : le recrutement de LT CD8+ dans le TA est en effet un élément précoce au cours du processus inflammatoire se développant dans le TA dans les modèles d'obésité.

Nous avons ensuite étudié plus directement l'expression des marqueurs d'activation et de prolifération (HLA-DR, CD25, Ki-67). Chez le macaque infecté et virémique, nous avions observé une augmentation faible mais significative de la proportion de cellules activées sur la base de l'expression d'HLA-DR et de Ki-67. A l'inverse, le niveau d'activation et de prolifération des LT CD4+ n'est pas différent entre les patients infectés traités efficacement et les témoins sains. Cette faible activation des LT du TA au cours de l'infection chez les patients peut suggérer à nouveau le retour à un niveau basal du fait des ARV ou être expliquée par des caractéristiques immunorégulatrices du TA. Selon les données de la littérature, nous avons initialement privilégié l'hypothèse d'une forte proportion de LT CD4+ Treg qui pourrait limiter l'activation des cellules effectrices. Cependant, lors de nos études menées chez le macaque et chez l'homme, nous avons observé une proportion relativement faible de LT CD4+ Tregs. Nous avons cependant pu démontrer une proportion plus élevée des Tregs dans le TA chez les patients infectés. Un rôle potentiel des LT CD4+ Treg dans le maintien d'une activation contrôlée ne peut donc pas être exclu puisque ce pourcentage est significativement plus élevé chez les patients infectés. Néanmoins, la faible proportion de LT CD4+ Treg mesurée à l'état basal suggère un potentiel immunorégulateur bien plus limité qu'initialement envisagé. A l'inverse, nous avons observé un fort niveau d'expression de PD-1 à la surface de la majorité des LT du TA, suggérant une capacité de réponse affaiblie des LT dans le TA. Ces deux aspects seront discutés plus longuement dans le paragraphe suivant.

Indépendamment de la composante cellulaire, nous avons aussi voulu étudier le profil de sécrétion des cytokines pro- et anti-inflammatoires induit chez les macaques infectés par le SIV et les macaques non infectés. Cela a été fait par deux différentes méthodes : par quantification des ARN codant pour un large panel de cytokines sur du TA entier et par détection des protéines (par technique luminex) sur des extraits protéiques isolés du TA (Annexe 1). Aucune différence n'a été détectée après infection, suggérant à nouveau que le potentiel immunitaire du TA était modérément altéré au cours de l'infection. Il faut néanmoins noter la grande variabilité des résultats obtenus et

l'existence potentielle de biais techniques associés à ces analyses. L'analyse en TA entier ne nous permet pas de dissocier l'impact de la composante adipocytaire de la composante immunitaire et pourrait expliquer la grande variabilité de résultats entre les échantillons. C'est un problème important puisque la densité adipocytaire est affectée au cours de l'infection. Le travail sur fraction après dissociation pose le problème d'une activation de l'inflammation lors du traitement par la collagénase (Fain 2010a). Puisque nous n'avions pas de différence dans le modèle macaque où les deux groupes infectés virémiques et non infectés auraient pu permettre de détecter des différences, nous n'avons pas poursuivi cette analyse.

Les éléments d'informations concernant l'inflammation chronique sont donc essentiellement liés dans notre étude, à l'analyse cellulaire des fractions mono-macrophagiques, pour lequel nous avons observé une orientation légèrement plus marquée vers la différenciation en macrophages M1 pro-inflammatoires dans le groupe d'animaux infectés. A nouveau, cette stratégie d'analyse doit aussi être discutée puisque la classification M1/M2 classiquement utilisée et relativement fiable chez la souris, est probablement plus difficilement applicable chez l'homme et le macaque. Il semble exister un continum de différenciation plutôt qu'une différence franche entre macrophages M2 et M1 (Martinez and Gordon 2014).

Collectivement, nous n'avons donc pas observé de signes d'activation majeure dans le TA au cours de l'infection, tant sur la composante immunitaire adaptative qu'innée, à la fois dans un contexte d'infection chronique à charge virale maintenue (modèle macaque) ou contrôlée (patients traités). Néanmoins une activation existe : l'infection chronique virémique chez le macaque se traduit par une modification du ratio CD4/CD8, une augmentation significative mais limitée de la proportion de LT activés, une plus forte proportion de cellules macrophagiques et une modification du profil phénotypique de ces macrophages vers un profil pro-inflammatoire. Il est difficile en l'état de savoir si ce profil d'activation est le signe d'une activation tronquée ou reflète une activation spécifique de tissu ou même spécifique du TA. Il est en effet possible d'envisager un profil d'activation plus limité dans le TA, visant à préserver les fonctions métaboliques dont on sait qu'elles peuvent être fortement modulées par le contexte inflammatoire. Néanmoins, cette hypothèse est fragile puisque des défauts de la composante adipocytaire sont déjà détectables chez les macaques virémiques (sur la base des quelques tests très préliminaires que nous avons réalisés (densité des adipocytes) et des données de la littérature.
Un des mécanismes qui pourrait expliquer ce manque d'activation immunitaire sur les LT du TA au cours de l'infection par le VIH est un défaut de présentation des antigènes par les CPA. Il a déjà

été montré que le VIH peut réduire globalement la capacité à présenter efficacement les antigènes par les CPA (Piguet et al. 2014). Le TA présente une faible proportion de CPAg mais une forte proportion d'adipocytes qui expriment le CMH de classe II qui peuvent ainsi procurer un signal d'activation, sans les costimulations nécessaires à une activation efficace. Une meilleure caractérisation des cellules de l'immunité innée et des fractions présentatrices de l'Ag pourrait permettre de répondre à cette question.

Fraction CD45-

Une modification importante du TA suite à l'infection par le SIV/VIH était l'augmentation de la cellularité dans le TA, une augmentation essentiellement portée par la fraction CD45-. Cette fraction non hématopoïètique contient principalement des pré-adipocytes, des cellules souches mésenchymateuses et des cellules endothéliales. Une telle accumulation qui touche la fraction CD45- est aussi décrite chez la souris au cours du vieillissement. Dans les rats âgés, une accumulation des pré-adipocytes est décrite et celle-ci est associée à une altération de la différentiation adipocytaire (Kirkland et al. 1994). Nous pouvons envisager un mécanisme équivalent au cours de l'infection par le SIV/VIH : nous avons mis en évidence par immunohistochimie l'altération du compartiment adipocytaire dans le modèle macaque. En complément, nous avons détecté une augmentation de la proportion de progéniteurs adipocytaires chez les animaux infectés comparativement aux animaux non infectés. Ces résultats démontrent l'impact de l'infection par le SIV sur la fraction non hématopoïétique et plus particulièrement sur les précurseurs adipocytaires, en accord avec les nombreuses données de la littérature montrant un défaut de l'adipogenèse chez les individus infectés (J. P. Bastard et al. 2002; Villarroya, Domingo, and Giralt 2007). Des études complémentaires seraient néanmoins nécessaires pour évaluer d'éventuelles perturbations d'autres fractions non hématopoiétiques mais aussi la nature des défauts qualitatifs touchant ces progéniteurs.

Il est à noter que cette augmentation en nombre de la fraction CD45- n'a pas été observée chez les patients infectés et traités efficacement. Cette absence d'impact pourrait être liée à un effet « normalisant » des ARV mais on ne peut exclure que l'effet ne soit pas détecté du fait d'une plus grande variabilité au sein de nos patients dont l'effectif est plus hétérogène et plus réduit. Néanmoins, une diminution en proportion de la fraction CD45+ reste détectable dans le TAV des patients traités en comparaison aux sujets non infectés, suggérant qu'une altération de la fraction CD45- persiste.

III. Quels mécanismes d'infection et de persistance du VIH dans le tissu adipeux ?

III. 1. Infection du TA par le VIH

Nous avons peu d'éléments pour définir si le TA est le site d'infection ou un site d'accumulation des cellules infectées. Le faible profil d'activation des LT du TA est plutôt en défaveur d'une infection locale dans le TA. A l'inverse, le faible taux de renouvellement des LT CD4 du TA suggère une forte compartimentalisation du TA et serait plutôt en faveur d'une infection locale. Nous avons pu détecter le virus dans le TA dès les temps précoces de l'infection suggérant que l'infection du TA est rapidement établie.

III. 2. Mécanismes de persistance du VIH dans le TA

S'il est difficile de déterminer les mécanismes par lesquels les LT CD4+ (et les macrophages) du TA sont infectés, différentes hypothèses peuvent être formulées concernant la persistance du virus dans le TA.

- Axe pharmacologique : une distribution potentiellement insuffisante de certains ARV dans le TA (Dupin et al. 2002b) pourrait favoriser la persistance du virus.
- Axe immunologique : le TA est classiquement décrit comme un tissu riche en cellules immunorégulatrices qui pouraient favoriser la persistance du virus en limitant l'efficacité des réponses effectrices. Indépendamment des propriétés intrinsèques du TA, l'infection in situ par le VIH pourrait conduire à une perte d'efficacité des réponses immunitaires du TA.
- Axe métabolique : les propriétés intrinsèques du TA pourraient moduler les propriétés de réplication du virus et la qualité des réponses immunitaires (Duffaut, Zakaroff-Girard, et al. 2009).

III. 2. 1. Hypothèse d'une mauvaise diffusion des ARV dans le TA

Deux mécanismes principaux peuvent empêcher une activité efficace des ARV sur les cellules infectées dans le TA: (i) une faible accessibilité de l'ART au TA (Dupin et al. 2002b), (ii) la séquestration de médicaments à l'intérieur des gouttelettes lipidiques au détriment des cellules immunitaires infectées par le VIH (Vernochet et al. 2005b). Les ARV doivent diffuser non seulement dans les TA mais aussi dans les LT CD4+ et les macrophages. L'existence d'un réservoir viral dans le TA souligne l'exigence cruciale pour l'utilisation de combinaisons d'ARV à large diffusion dans les tissus et notamment dans les tissus lipophiles. Cet aspect fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe de pharmacologie d'AM Taburet pour étudier la diffusion

tissulaire mais aussi cellulaire des ARV notamment l'étude des transporteurs d'influx et d'efflux sur les macrophages et les LT du TA.

III. 2. 2. Hypothèse de propriétés immunologiques intrinsèques du TA favorisant la persistance du TA

Le TA présente un certain nombre de propriétés intrinsèques qui pourrait favoriser la persistance du virus : (a) c'est un tissu riche en LT CD4+ mémoires, une fraction classiquement enrichie en cellules infectées ; (b) il existe une faible proportion de LT CD8+ effecteurs, susceptibles d'éliminer les cellules infectées, et au cours de l'infection, l'augmentation du nombre de LT CD8+ observée est associée à une accumulation dans les zones périvasculaires et donc à distance des LT CD4+ infectés (ce point a été discuté plus haut). (c) la littérature attribue au TA « sain » un fort potentiel immunorégulateur, théoriquement porté par les LT CD4+ Tregs. Pour aborder cette question, nous avons réalisé chez l'homme infecté et non infecté une caractérisation des LT CD4+ du TA.

Faible proportion de cellules Treg dans le TA des sujets étudiés

Le TA est caractérisé, en particulier dans les modèles murins, par la grande proportion de Treg résidant dans le tissu (50 à 70% des LT CD4+ du TA). Cette observation pourrait être particulièrement importante dans le contexte de l'infection par le VIH puisque les Treg sont décrits comme cibles cellulaires et réservoir de l'infection (T.-A. Tran et al. 2008). Elles assurent d'autre part une activité immunorégulatrice, protégeant de l'inflammation et participant au maintien des fonctions métaboliques du TA. Nous avons dans un premier temps évalué les proportions relatives des différentes sous-fractions LT CD4+ (Th1, Th2, Th17, Tfh et Treg) chez les sujets non infectés et infectés par le VIH. De manière surprenante, nous avons observé une proportion relativement faible de LT CD4+ Treg dans le TASC et TVA des patients infectés et non infectés. La fraction de LT CD4+ prédominante dans le FSV était la sous-population Th1 plutôt que la sous-population Treg. A notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir caractérisé et quantifié les Treg du TA humain par détection intra-cellulaire de FoxP3 en cytométrie de flux. Nos résultats ne peuvent être comparés aux analyses effectuées dans les autres études qui se sont focalisées sur la détection de l'ARNm codant pour Foxp3 soit sur le TA total, les cellules de FSV ou les CD3+ du TA. Ces résultats sont en contradiction apparente avec l'observation réalisée dans les modèles murins. Cependant, le pourcentage de Tregs dans le TA dépend fortement du régime alimentaire, de l'âge, du sexe, du microbiote et de l'état inflammatoire : l'obésité, l'âge et l'inflammation sont associés à la réduction des pourcentages de Treg (Cipolletta et al. 2012; Feuerer et al. 2009). Ces paramètres

peuvent expliquer pourquoi, chez les patients étudiés, nous avons observé une telle proportion réduite de Tregs. En effet, les patients infectés inclus dans notre étude ont subi pour une grande proportion des chirurgies bariatriques et présentent des troubles métaboliques associés. Afin de réaliser une comparaison fiable, le groupe de patients non infectés que nous avons sélectionné inclut lui aussi des patients en surcharge pondérale et soumis à une chirurgie bariatrique. Les pourcentages de LT CD4+ Treg retrouvés chez ces témoins sains ou chez les patients infectés par le HIV sont de fait significativement plus bas que ceux retrouvés dans le modèle souris. Il faut néanmoins noter que certains patients ont été prélevés pour d'autres causes que des pathologies métaboliques (cholécystectomie) et présentent eux aussi une proportion faible de LT CD4+ Tregs. Ces resultats posent la question de différences de composition immunitaire du TA chez la souris et l'homme. Les LT CD4+ Treg semblent jouer un rôle crucial dans les modèles murins d'obésité puisqu'elles sont cruciales au maintien du TA « sain » et de ses fonctions métaboliques. Le rôle des Tregs pourrait néanmoins être moins crucial dans l'homéostasie du TA humain du fait de la faible proportion de ces cellules à l'état basal.

Expression constitutive de PD-1 sur les LT CD4+ du TA

Au cours de l'infection par le VIH, l'expression de PD-1 sur les LT CD4+ dans le sang est associée à des défauts immunitaires (tels que la production d'IL-2 dans les LT CD4+ ou une cytotoxicité réduite dans les LT CD8+) (Day et al. 2006; Porichis and Kaufmann 2012). Il a été montré également que dans les ganglions lymphatiques, les LT CD4+ exprimant PD-1 sont la principale source de cellules infectées par rapport à toute autre population de LT CD4+ PD-1- des GL ou du sang circulant (Banga et al. 2016). Des niveaux plus élevés d'ARN VIH-1 sont présents dans les LT CD4+ PD-1+ des GL que dans d'autres sous-populations de LT CD4+ mémoires même après un traitement ARV à long terme (jusqu'à 12 ans) (Banga et al. 2016).

Nous avons pu démontrer dans ce travail que 60 à 75% des LT CD4+ CD69+, soient les LT CD4+ résidants du TA, expriment PD-1, que les patients soient infectés ou non. Cette proportion est très significativement supérieure à celle retrouvée dans le sang circulant. La forte expression de PD-1 à la surface des LT CD4+ constitue donc une propriété intrinsèque des LT CD4+ du TA. L'impact de cette forte proportion de LT PD-1+ est double.

- Elle pourrait limiter le développement de réponse immunitaire adaptative exacerbée. La faible activation et la faible prolifération des LT chez les patients infectés par le VIH pourraient être expliquées par l'expression de PD-1, qui freine l'activation. L'expression de PD-1 est aussi associée à l'identification de populations directement immuno-modulatrices. Des études fonctionnelles complémentaires de ces LT PD-1+ seront nécessaires pour pouvoir déterminer leur

potentiel immuno-modulateur, en le comparant avec les LT CD4+ PD-1+ du sang circulant ou ceux provenant d'autres organes.
- Les cellules mémoires PD-1+ représentent une cellule cible parfaite permettant la persistance du virus.

Cette forte expression de PD-1+ au sein des LT CD4+ du TA reste à disséquer. Différents facteurs régulent l'expression de PD-1 : la présence de cytokines pro-inflammatoires mais aussi l'environnement métabolique. Il serait important de mieux caractériser l'environnement tissulaire dans lequel les cellules du TA vivent. La forte proportion de LT exprimant PD-1 pourrait être un mécanisme d'adaptation à l'environnement métabolique et pro-inflammatoire du TA permettant de limiter l'activation des réponses immunes adaptatives dans l'environnement adipeux. Nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse de l'accumulation dans le TA de LT présentant un profil d'exhaustion. Dans les études d'exhaustion, l'expression de PD-1 est aussi discutée en fonction de l'intensité d'expression de PD-1, attribuant aux LT PD-1 low une possibilité de réversion de l'exhaustion tandis que les LT PD-1 high seraient irrémédiablement orientés vers l'exhaustion. Nous observons effectivement deux niveaux d'intensité d'expression de PD-1 sur les LT CD4+ du TA. Le nombre restreint de LT CD4+ dans le TA ne nous a pas permis jusqu'ici d'évaluer leur potentiel fonctionnel respectif.

Un point important sera de déterminer la disponibilité des ligands du PD-1 dans ces tissus. Malheureusement, nous avons été incapables de détecter le PD-L1 par immuno-microscopie sur des coupes fixées de TA suggérant que les adipocytes n'expriment pas PD-L1. L'expression de PD-L1 sur la FSV, en particulier chez les macrophages, peut ne pas apparaître en raison de la faible fréquence de ces cellules dans le TA. Cet aspect sera abordé dans les prochaines études par une stratégie de détection des ARN codant pour PD-L1 et PD-L2 sur tissu entier.

Profils d'exhaustion différents des LT CD4+ du TASC et TAV

Nous avons aussi observé deux profils d'exhaustion dans les LT CD4+ du TA sur la base des différents marqueurs d'immunorégulation testés (CTLA-4, TIGIT, Tim-3, …) : les LT CD4+ exprimant uniquement le PD-1 et les LT CD4+ co-exprimant PD-1 et TIGIT. Il est difficile d'évaluer les propriétés fonctionnelles respectives de ces deux populations. On peut envisager que la coexpression pourrait correspondre à des cellules plus fortement exhaustées et épuisées ou plus enrichies en cellules infectées. Plusieurs groupes ont montré que les LT CD4+ qui co-expriment des molécules de checkpoints sont enrichis en cellules infectées par le VIH (Olesen et al. 2016).

Une observation importante était la différence d'expression selon le TA considéré : la proportion de LT CD4+ TIGIT+ PD-1+ est dans notre étude plus importante dans le TASC que le TAV, suggérant que les propriétés immunorégulatrices ne soient pas strictement les mêmes dans les deux TA considérés.

En conclusion, nous n'avons pas observé de fraction LT CD4 Treg prédominante dans le TA, contrairement aux données de la littérature obtenues chez la souris. Chez l'homme, nous avons néanmoins observé une signature phénotypique très spécifique du TA avec une forte proportion de LT CD4+ exprimant PD-1. L'expression de PD-1 n'était pas modifiée chez les patients infectés traités efficacement et restait très majoritaire. A l'inverse, nous avons observé une faible proportion de LT CD4+ Treg dans le TA chez les patients non infectés mais cette proportion était significativement augmentée chez les patients infectés. Collectivement, ces résultats suggèrent que la persistance virale dans le TA pourrait reposer sur les propriétés intrinsèques du TA mais aussi sur des altérations liées au virus.

III. 2. 3. Hypothèse d'un environnement métabolique favorisant la faible efficacité des réponses immunitaires et la persistance du virus

Cross talk entre les cellules adipocytaire et les cellules immunitaire du tissu adipeux

Récemment Couturier et col. ont démontré qu'in vitro les cellules adipocytaires mises en culture avec des LT CD4+ du TA augmentent la durée de vie des LT CD4+. La présence d'adipocytes favorise l'activation des LT CD4+ mais aussi la production du VIH en synergie avec les cytokines IL-2, IL-7 ou IL-15. Ces effets sont atténués par des anticorps neutralisants contre l'IL-6 et l'intégrine α1β1 (Couturier et al. 2015b). En conclusion, les adipocytes, par leur capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires, pourraient favoriser la persistance du VIH dans le TA. Nous avons démontré dans notre travail que les adipocytes sont affectés au cours de l'infection par le SIV. Nous avons observé une augmentation de leur densité avec une réduction de leur taille. Les perturbations métaboliques des adipocytes au cours de l'infection par le VIH sont relativement bien décrites mais peu d'informations sont disponibles sur d'éventuelles perturbations de leur activité immunitaire. Est-ce que les modifications de la fraction adipocytaires influencent la qualité des réponses immunitaires qui se développent dans TA ? Est ce que leur densité plus importante au cours de l'infection modifie les capacités de migration et recrutement des cellules immunitaires dans le tissu ?

III. 2. 4. Conclusions

En conclusion différents mécanismes peuvent expliquer la persistance du VIH dans le TA, à savoir : la mauvaise diffusion des ARV dans le TA, l'aspect et les caractéristiques immuno-modulatrices du TA, et enfin l'environnement adipeux particulier. Une synergie de ces mécanismes est totalement envisageable, surtout dans le contexte actuel où il ya beaucoup de preuves d'une interaction entre l'axe immunologique et métabolique dans le TA. Ce travail de thèse s'est focalisé sur la composante immunitaire du TA mais le lien entre environnnement métabolique et cellules de l'immunité mérite d'être encore détaillé, particulièrement dans le contexte du TA. Cette étude d'immuno-métabolisme devrait intégrer d'une part les interactions entre adipocytes et cellules de l'immunité, mais aussi la composante extracellulaire du TA, c'est-à-dire le contenu lipidique, le potentiel oxydatif, l'hypoxie et la fibrose potentielle qui peuvent également affecter le TA.

IV. Quelles conséquences liées à l'infection in situ du TA ?

IV. 1. Lien TA / troubles métaboliques et cardiovasculaires.

Perturbation des fonctions métaboliques adipocytaires

Les premières études qui se sont intéressées aux perturbations des fonctions métaboliques et adipocytaires au cours de l'infection par le VIH, étaient principalement des études in vitro qui ont confirmé l'effet des protéines virales sur les adipocytes (Díaz-Delfín et al. 2012; Shrivastav et al. 2008). Mais aucune étude n'a permis de montrer clairement la présence du virus dans le TA, contrairement aux protéines virales qui ont été identifiées dans le TA. La présence de protéines virales dans le TA est classiquement expliquée par la diffusion de ces protéines à partir des sites d'infection. Notre travail apporte une claire démonstration d'une présence virale à proximité des adipocytes qui pourrait constituer une source locale de production de protéines virales affectant les cellules adipocytaires et les fonctions métaboliques du TA (N. Agarwal and Balasubramanyam 2015).

Perturbation des interactions cellules métaboliques/ cellules immunitaires du fait de l'infection

Il sera important de déterminer l'impact des cellules immunitaires infectées sur le métabolisme des adipocytes et inversement, évaluer comment les adipocytes affectés par la présence virale pourrait affecter les cellules immunitaires. Mieux définir ce lien est d'autant plus important que le TA peut aussi infiltrer certains sites lymphoïdes majeurs, tels que le thymus, la moelle osseuse, ou envelopper certains sites ganlionnaires (tissu adipeu péri-nodal).

IV. 2. Quelle influence du statut métabolique sur l'évolution de l'infection par le VIH ?

L'impact de l'infection par le VIH et des traitements ARV sur les propriétés métaboliques du TA ont été bien étudiés, mais les aspects inverses tels que l'impact d'un IMC élevé ou de l'obésité sur la réplication du VIH et la pathogenèse ont été moins étudiés. Il est difficile d'évaluer l'impact d'une inflammation du TA liée à des troubles métaboliques sur la progression de l'infection locale. Les modifications de la composante immunitaire liée à l'obésité pourraient favoriser le développement de réponses effectrices plus efficaces en limitant la composante immunorégulatrice. A l'inverse, un plus fort niveau d'activation pourrait favoriser l'infection des cellules du TA. Il est intéressant de noter que plusieurs études corrélant l'obésité et l'IMC avec les charges virales et le statut immunologique des patients atteints du VIH indiquent que des niveaux plus élevés d'IMC sont associés à des charges virales inférieures et à l'amélioration du nombre de LT CD4+. Une étude incluant 875 femmes infectées (cohorte HER) a montré que les femmes ayant des IMC plus élevés présentaient un nombre de LT CD4+ plus élevé dans le sang circulant et qu'elles avaient une progression plus lente vers les maladies liées au SIDA et la mort par rapport à des femmes avec un poids normal ou avec un IMC plus faible (C. Y. Jones et al. 2003). En outre, dans une étude sur 125 hommes et femmes infectés par le VIH qui sont des utilisateurs de drogues (cohorte MIDAS), un IMC élevé et l'obésité ont été associés à un taux de LT CD4+ plus élevé et à une mortalité plus faible (Shor-Posner et al. 2000). Une autre étude menée auprès de 711 hommes et femmes infectés aux États-Unis (étude sur le dépistage du VIH - étude HOPS) a également observé que les patients obèses avaient des charges virales de base inférieures par rapport aux patients ayant un poids normal (Tedaldi et al. 2006). Ces résultats semblent également être cohérents avec une étude de 83 femmes sud-africaines infectées par le VIH qui démontrent une corrélation inverse entre le taux sérique de la leptine (une adipokine principalement liée à une augmentation de l'IMC) et la charge virale d'ARN plasmatique (Azzoni et al. 2010). Ces résultats suggèrent que l'obésité ou le gain de poids pourrait être un élément protecteur contre la progression de la maladie.

Cependant, une autre étude menée auprès de 158 hommes et femmes infectés et sous traitement antirétroviral efficace n'a montré aucune différence de charge virale et de taux de LT CD4+ entre patients maigres et obèses (Koethe et al. 2013).

Collectivement, ces études suggèrent que l'augmentation de l'adiposité peut modérer la pathogenèse du VIH, mais l'influence de l'adiposité, du métabolisme et de la pathogenèse du VIH définit une relation complexe qui est probablement influencée par de nombreux facteurs tels que la démographie, les traitements antirétroviraux, le statut immunologique et pathologique.

Une étude utilisant le modèle macaque s'est intéressée à l'effet d'un régime athérogénique, c'est-à-dire un régime riche en acides gras saturés et en cholestérol, sur la progression de la maladie et l'inflammation systémique chez des macaques SIV+. Les macaques nourris avec un régime riche présentaient une progression significativement plus rapide de la maladie, ce qui entraînait un risque accru de décès lié au SIV par rapport à celui des macaques témoins (Mansfield et al. 2007). Ce résultat démontre clairement un lien entre le régime alimentaire, et suggère un effet délétère d'un régime athérogène sur la qualité des réponses. Toutefois, dans les stades précoces de l'infection, un bénéfice pouvait être observé pour les animaux soumis à un régime athérogénique.

IV. 3. TA : Identification d'un site réservoir jusqu'ici négligée. Quelles conséquences ?

IV. 3. 1. Importance et taille du réservoir viral du tissu adipeux

Compte tenu notamment de sa prévalence anatomique (le TA représente 30 à 50% du poids de l'individu), de sa large dispersion et de sa localisation à proximité des barrières d'entrée (dont la muqueuse intestinale, un tissu riche en LT CD4+), le TA pourrait constituer un réservoir anatomique majeur. Il est d'autre part bien vascularisé et largement réparti dans tout l'organisme. La persistance virale dans le TA pourrait avoir une grande incidence sur les charges virales et la possibilité de rebond viral suite à un arrêt de traitement.

IV. 3. 2. Stratégies thérapeutiques pour éradiquer le réservoir adipeux ?

L'identification du TA comme réservoir viral amène à réfléchir à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour limiter la taille du réservoir. On peut aussi envisager une stratégie métabolique ciblant de manière indirecte le TA. De ce point de vue, les statines sont un exemple intéressant de l'influence de médicaments ciblant le métabolisme sur l'activité virale. Les statines sont des médicaments hypocholestérolémiant puissants avec des effets anti-inflammatoires et immuno-modulateurs mais qui ont également la propriété de perturber directement l'infection virale. Une étude a montré que l'entrée et la sortie virale étaient réduites dans les cellules traitées par les statines (del Real et al. 2004) . L'impact spécifique des statines sur la taille des réservoirs du VIH dans le TA semble donc important à évaluer. Définir des stratégies « métaboliques » visant à réduire le réservoir requiert néanmoins de mieux comprendre les différences immunologiques du TA et notamment les propriétés des LT CD4+ du TA chez les sujets infectés présentant ou non des perturbations métaboliques. Indépendamment de stratégies visant à réduire la taille du réservoir, des stratégies métaboliques visant à limiter l'inflammation du TA pourrait participer à réduire l'inflammation chronique et les comorbidités qui y sont associées. Néanmoins, l'existence

d'une inflammation spécifique au TA et la contribution de cette inflammation locale à l'inflammation systémique reste à mieux définir.

IV. 3. 3. Un site réservoir relativement accessible

Le TA, et particulièrement le TA sous-cutané, est facilement accessible avec une procédure de prélèvement peu invasive. Cette particularité est un atout technique permettant potentiellement d'utiliser ce tissu comme reflet des réservoirs anatomiques plus profonds et plus difficiles d'accès. Le TA est le premier site réservoir accesible et facile à étudier et devrait permettre d'étudier les mécanismes de persistance tissulaire du VIH chez l'homme.

V. Potentiel anti-infectieux du TA hors infection par le VIH

Il existe beaucoup de données sur l'influence des cellules immunitaires du TA dans le développement des troubles métaboliques (obésité, diabète, …). Leur rôle régulateur sur les populations adipocytaires dans le TA sain, ou pro-inflammatoires dans le TA pathologique est bien décrit mais leur rôle immunitaire, au sens anti-infectieux, reste à définir.

L'ensemble des données collectées jusqu'ici amène à s'interroger sur le potentiel anti-infectieux du TA. En effet, celui-ci est localisé à proximité des sites d'interface avec l'environnement et pourait donc constituer un tissu de support. Mais la nature exacte de l'activité immunitaire du TA reste à mieux définir :

- **Partenaire de la réponse par sa composante inflammatoire et effectrice ?**

Il est clairement montré que le TA est un partenaire majeur de l'inflammation associée à l'obésité : le TA est aussi un organe endocrinien capable de sécréter une panoplie d'adipokines pro- ou anti-inflammatoires. Mais le TA produit aussi des défensines. Ces résultats récents, démontrant le potentiel anti-microbien du TA, conduisent à reconsidérer le TA comme un élément de défense anti-infectieuse et pas seulement comme un organe métabolique.

Un autre argument en faveur d'un rôle anti-infectieux actif du TA est le fait que les personnes souffrant d'une perte excessive de poids (malnutrition) souffrent d'une susceptibilité accrue aux infections. Ces questions méritent d'être approfondies en évaluant l'apport de la composante cellulaire et sécrétoire du TA au cours des processus infectieux.

- Partenaire de la réponse par sa composante régulatrice ?

Les résultats obtenus chez la souris montrent que la composante lymphocytaire principale du TA est la population LT CD4+ Treg. Une autre caractéristique immuno-régulatrice, démontrée par notre travail est la forte expression de molécules inhibitrices (PD-1) au sein des LT. Le TA semble présenter soit par des mécanismes différents selon les espèces, soit par de multiples mécanismes un fort potentiel immunorégulateur. Limiter le développement d'une réponse immunitaire pourrait potentiellement prévenir la dissémination de la réponse inflammatoire et assurer le développement d'une réponse forte mais localisée sur le site d'infection. Cette stratégie pourrait permettre de limiter la surstimulation du système immunitaire central en garantissant une zone tampon autour des sites majeurs de contact avec l'environnement extérieur.

- par sa capacité d'hématopoïèse ?

Le TA contient une grande proportion de cellules souches mésenchymateuses, celles-ci sont capables de se différencier en adipocytes, chondrocytes, et myocytes. Mais le TA contient une forte proportion de cellules souches hématopoïètiques (CD45+ CD34+) qui est significativement plus élévée que dans le sang circulant.

La première étude qui a révélé un potentiel de régénération hématopoïétique à partir des cellules souches du TA a été réalisée par Cousin et col. (Cousin et al. 2003), qui ont démontré que la transplantation des cellules souches hématopoïétiques CD45+ CD34+ dérivées de la FSV peut favoriser la reconstitution endogène fonctionnelle de l'hématopoïèse chez les souris irradiées létalement. À la suite de cette découverte, d'autres études ont continué à soutenir ce concept au cours de la dernière décennie et ont démontré que la FSV humaine contient de multiples progéniteurs de cellules sanguines qui, dans diverses conditions in vitro, peuvent se différencier en cellules endothéliales et / ou hématopoïétiques (Miñana et al. 2008; Poglio et al. 2010).

Ainsi, le TA pourrait être considéré comme une source importante et pratique de cellules capables de supporter l'hématopoïèse et participer indirectement et/ou localement à l'efficacité des réponses immunitaires et à la réparation de lésions tissulaires.

VI. Perspectives et conclusions

Une caractérisation des sous-populations immunitaires à poursuivre

Nous avons principalement axé ce travail de thèse sur la caractérisation virologique et immunologique des LT CD4+ du TA. Ces analyses requièrent un nombre important de cellules et l'accès au modèle macaque a été crucial pour mener à bien cette étude. Néanmoins, la caractérisation des différentes fractions reste à approfondir.

Les LT CD4+

Quelques aspects de la caractérisation des LT CD4+ doivent être poursuivis.

- Etude transcriptomique des LT CD4+ du TA

Le profil transcriptionnel des LT CD4+ sera analysé grâce à la technique Fluidigm. Cette technique permet au niveau de la cellule unique l'analyse concomitante d'un grand nombre d'ARNm ce qui permettera une analyse plus large de l'expression de chimiokines et de leurs récepteurs. Par ailleurs, elle nous permettra d'analyser d'autres aspects fonctionnels au sein des LT CD4+ qui ne seront pas abordés par cytometrie, à savoir l'expression de molécules de survie, de stress et des marqueurs de l'état métabolique des cellules.

- Etude fonctionnelle de leurs propriétés immuno-régulatrices ou pro-inflammatoires

La quantité de cellules obtenues ne nous a pas permis d'étudier fonctionnellement les LT CD4+ du TA. Nous posons l'hypothèse d'un fort potentiel immuno-régulateur et inhibiteur de ces cellules. L'étude de la capacité suppressive de ces cellules in vitro permettera d'avoir des réponses sur leurs fonctionnalités. Ces études seront réalisées chez le macaque non infecté dans un premier temps.

Les LT CD8+

Un aspect manquant de ce travail est la caractérisation plus fine des populations LT CD8+. C'est l'autre versant important, pour comprendre la persistance de LT CD4+ infectés dans le TA. Nous avons démontré une accumulation des LT CD8+ dans le TA de macaques chroniquement infectés par le SIV. Une question majeure est de savoir si ces LT cytotoxiques sont spécifiques du virus ou s'accumulent en réponse à des stimuli inflammatoires dans le TA. Des études récentes ont montré que les LT, en particulier les LT CD8+, s'accumulent très précocément dans le TA au cours de l'obésité. Dans ces contextes, les LT CD8+ présentent un phénotype activé (Nishimura et al. 2009; Winer et al. 2009) et participent au développement de l'inflammation par le recrutement des macrophages responsables de la plupart des événements inflammatoires dans le TA (Weisberg et

al. 2003; Lumeng, Bodzin, and Saltiel 2007). La spécificité des LT CD8+ accumulé dans le TA au cours de l'infection n'est pas connue et permettrait d'évaluer la capacité potentielle de ces LT CD8+ à éliminer le virus.

Indépendamment de ces deux fractions cruciales, il serait important d'élargir cette étude à d'autres fractions. Parmi nos analyses, différentes sous-populations ont retenu notre attention.

Les cellules de l'immunité innée

Phénotype et profil anti ou pro-inflammatoire des macrophages du TA

Les macrophages sont des acteurs majeurs de l'inflammation, notamment dans le TA au cours des altérations métaboliques. Des perturbations quantitatives et qualitatives des macrophages sont observées : le profil de différenciation des macrophages s'oriente vers un profil pro-inflammatoire au cours de l'obésité. Comme pour les LT, nous nous sommes focalisés sur l'étude phénotypique de ces cellules dans le contexte de l'infection par le VIH sans pouvoir évaluer leur potentiel fonctionnel. L'aspect phénotypique des macrophages n'est malheureusement pas une approche suffisante pour caractériser leur activité pro- ou anti-inflammatoire. L'analyse de l'expression des ARN codant pour les molécules pro- ou anti-inflammatoires permettra de mieux les caractériser, et de vérifier leur activité au cours de l'infection par le SIV.

iNKT

Dans l'obésité, les cellules iNKT sont considérablement réduites. Comme les cellules iNKT constitue un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, leur réduction au cours de l'obésité représente la perte d'une population de régulation majeure. La restauration des cellules iNKT, ou leur activation dans des souris obèses entraîne une meilleure glycémie, une sensibilité à l'insuline et même une perte de poids, ce qui représente une option thérapeutique passionnante à explorer pour restaurer l'homéostasie dans le TA de sujets obèses (Huh et al. 2017; Lynch 2014; Mookerjee-Basu and Kappes 2017). Cette population mérite d'être plus étudiée dans le TA dans le contexte de l'infection par le VIH. Son augmentation au cours de l'infection pourra contribuer à la mise en place d'un environnement immuno-régulateur ce qui favoriserait la persistance du VIH dans le TA.

Lymphocytes Tγδ

Un résultat intéressant dans notre étude est l'augmentation de la proportion des LTγδ au cours de l'infection par le VIH (Annexe 02). L'étude approfondie de cette population et de leur fonctionnalité permettra de mieux évaluer leur rôle.

La fraction non hématopoïétique CD45-

Nous avons démontré que chez les macaques chroniquement infectés par le SIV, il existait une augmentation massive des cellules de la FSV du TA. Celle-ci était essentiellement liée à l'accumulation de cellules CD45-. Cette fraction qui contient les progéniteurs adipocytaires doit être identifiée plus en détail. L'équipe initie des études portant plus spécifiquement sur les cellules souches mésenchymateuses (Casteilla et al. 2011; Nazari-Shafti et al. 2011).

Un site crucial d'étude de l'immuno-métabolisme

L'immuno-métabolisme est une discipline en pleine expansion qui démontre les liens étroits entre réponse immunitaire et activité métabolique et conduit à reconsidérer l'efficacité des réponses immunitares en intégrant la composante métabolique nécessaire au bon fonctionnement des cellules de l'immunité. Déterminer les liens spécifiques entre métabolisme et immunité au sein du tissu adipeux est une perspective à plus long terme de ce travail. Il faut envisager l'hypothèse que le tissu adipeux par ses caractéristiques métaboliques puisse moduler très spécifiquement et localement la qualité des réponses immunitaires.

BIBLIOGRAPHIE

Abraham, Soman N., and Ashley L. St John. 2010. "Mast Cell-Orchestrated Immunity to Pathogens." Nature Reviews. Immunology 10 (6): 440–52. doi:10.1038/nri2782.

Ackerman, Anne L., and Peter Cresswell. 2004. "Cellular Mechanisms Governing Cross-Presentation of Exogenous Antigens." Nature Immunology 5 (7): 678–84. doi:10.1038/ni1082.

Agarwal, N., and A. Balasubramanyam. 2015. "Viral Mechanisms of Adipose Dysfunction: Lessons from HIV-1 Vpr." Adipocyte 4 (1): 55–59. doi:10.4161/adip.29852.

Agarwal, Neeti, Dinakar Iyer, Sanjeet G. Patel, Rajagopal V. Sekhar, Terry M. Phillips, Ulrich Schubert, Toni Oplt, et al. 2013. "HIV-1 Vpr Induces Adipose Dysfunction in Vivo through Reciprocal Effects on PPAR/GR Co-Regulation." Science Translational Medicine 5 (213): 213ra164. doi:10.1126/scitranslmed.3007148.

Agarwal, Pooja, Shaheb R. Khan, Subash C. Verma, Muheeb Beg, Kavita Singh, Kalyan Mitra, Anil N. Gaikwad, Md Sohail Akhtar, and Manju Y. Krishnan. 2014. "Mycobacterium Tuberculosis Persistence in Various Adipose Depots of Infected Mice and the Effect of Anti-Tubercular Therapy." Microbes and Infection 16 (7): 571–80. doi:10.1016/j.micinf.2014.04.006.

Aggarwal, Sudeepta, Nico Ghilardi, Ming-Hong Xie, Frederic J. de Sauvage, and Austin L. Gurney. 2003. "Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17." The Journal of Biological Chemistry 278 (3): 1910–14. doi:10.1074/jbc.M207577200.

Ananworanich, Jintanat, Karine Dubé, and Nicolas Chomont. 2015. "How Does the Timing of Antiretroviral Therapy Initiation in Acute Infection Affect HIV Reservoirs?" Current Opinion in HIV and AIDS 10 (1): 18–28. doi:10.1097/COH.0000000000000122.

Ananworanich, Jintanat, Alexandra Schuetz, Claire Vandergeeten, Irini Sereti, Mark de Souza, Rungsun Rerknimitr, Robin Dewar, et al. 2012. "Impact of Multi-Targeted Antiretroviral Treatment on Gut T Cell Depletion and HIV Reservoir Seeding during Acute HIV Infection." PloS One 7 (3): e33948. doi:10.1371/journal.pone.0033948.

Ancuta, Petronela, Patrick Autissier, Alysse Wurcel, Tauheed Zaman, David Stone, and Dana Gabuzda. 2006. "CD16+ Monocyte-Derived Macrophages Activate Resting T Cells for HIV Infection by Producing CCR3 and CCR4 Ligands." Journal of Immunology (Baltimo*re, Md. : 1950)* 176 (10): 5760–71.

Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. 2010. "Causes of Death in HIV-1-Infected Patients Treated with Antiretroviral Therapy, 1996-2006: Collaborative Analysis of 13 HIV Cohort Studies." Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America 50 (10): 1387–96. doi:10.1086/652283.

Anzala, A. O., J. N. Simonsen, J. Kimani, T. B. Ball, N. J. Nagelkerke, J. Rutherford, E. N. Ngugi, J. J. Bwayo, and F. A. Plummer. 2000. "Acute Sexually Transmitted Infections Increase Human Immunodeficiency Virus Type 1 Plasma Viremia, Increase Plasma Type 2 Cytokines, and Decrease CD4 Cell Counts." The Journal of Infectious Diseases 182 (2): 459–66. doi:10.1086/315733.

Archin, N. M., A. L. Liberty, A. D. Kashuba, S. K. Choudhary, J. D. Kuruc, A. M. Crooks, D. C. Parker, et al. 2012. "Administration of Vorinostat Disrupts HIV-1 Latency in Patients on Antiretroviral Therapy." Nature 487 (7408): 482–85. doi:10.1038/nature11286.

Archin, Nancie M., Naveen K. Vaidya, Joann D. Kuruc, Abigail L. Liberty, Ann Wiegand, Mary F. Kearney, Myron S. Cohen, et al. 2012. "Immediate Antiviral Therapy Appears to Restrict Resting CD4+ Cell HIV-1 Infection without Accelerating the Decay of Latent Infection." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109 (24): 9523–28. doi:10.1073/pnas.1120248109.

Arita, Y., S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, et al. 1999. "Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity." Biochemical and Biophysical Research Communications 257 (1): 79–83.

Armah, Kaku A, Kathleen McGinnis, Jason Baker, Cynthia Gibert, Adeel A Butt, Kendall J Bryant, Matthew Goetz, et al. 2012. "HIV Status, Burden of Comorbid Disease, and Biomarkers of Inflammation, Altered Coagulation, and Monocyte Activation." Clinical *Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 55 (1): 126–36. doi:10.1093/cid/cis406.

Arthos, James, Claudia Cicala, Elena Martinelli, Katilyn Macleod, Donald Van Ryk, Danlan Wei, Zhen Xiao, et al. 2008. "HIV-1 Envelope Protein Binds to and Signals through Integrin alpha4beta7, the Gut Mucosal Homing Receptor for Peripheral T Cells." Nature Immunology 9 (3): 301–9. doi:10.1038/ni1566.

Artis, David, and Hergen Spits. 2015. "The Biology of Innate Lymphoid Cells." Nature 517 (7534): 293–301. doi:10.1038/nature14189.

Asten, Liselotte van, Figen Danisman, Sigrid A. Otto, José A. M. Borghans, Mette D. Hazenberg, Roel A. Coutinho, Maria Prins, and Frank Miedema. 2004. "Pre-Seroconversion Immune Status Predicts the Rate of CD4 T Cell Decline Following HIV Infection." AIDS (London, England) 18 (14): 1885–93.

Avram, Alison Sharpe, Mathew M Avram, and William D James. 2005. "Subcutaneous Fat in Normal and Diseased States: 2. Anatomy and Physiology of White and Brown Adipose Tissue." Journal of the American Academy of Dermatology 53 (4): 671–83. doi:10.1016/j.jaad.2005.05.015.

Azzoni, Livio, Nigel J. Crowther, Cynthia Firnhaber, Andrea S. Foulkes, Xiangfan Yin, Deborah Glencross, Robert Gross, et al. 2010. "Association between HIV Replication and Serum Leptin Levels: An Observational Study of a Cohort of HIV-1-Infected South African Women." Journal of the International AIDS Society 13 (September): 33. doi:10.1186/1758-2652-13-33.

Bacchus, Charline, Antoine Cheret, Véronique Avettand-Fenoël, Georges Nembot, Adeline Mélard, Catherine Blanc, Caroline Lascoux-Combe, et al. 2013. "A Single HIV-1 Cluster and a Skewed Immune Homeostasis Drive the Early Spread of HIV among Resting CD4+ Cell Subsets within One Month Post-Infection." PloS One 8 (5): e64219. doi:10.1371/journal.pone.0064219.

Bäckhed, Fredrik, Hao Ding, Ting Wang, Lora V. Hooper, Gou Young Koh, Andras Nagy, Clay F. Semenkovich, and Jeffrey I. Gordon. 2004. "The Gut Microbiota as an Environmental Factor That Regulates Fat Storage." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101 (44): 15718–23. doi:10.1073/pnas.0407076101.

Badley, A. D., D. Dockrell, M. Simpson, R. Schut, D. H. Lynch, P. Leibson, and C. V. Paya. 1997. "Macrophage-Dependent Apoptosis of CD4+ T Lymphocytes from HIV-Infected Individuals Is Mediated by FasL and Tumor Necrosis Factor." The Journal of Experimental Medicine 185 (1): 55–64.

Baldanti, F., S. Paolucci, R. Gulminetti, R. Maserati, G. Migliorino, A. Pan, F. Maggiolo, G. Comolli, A. Chiesa, and G. Gerna. 2001. "Higher Levels of HIV DNA in Memory and Naive CD4(+) T Cell Subsets of Viremic Compared to Non-Viremic Patients after 18 and 24 Months of HAART." Antiviral Research 50 (3): 197–206.

Banga, Riddhima, Francesco Andrea Procopio, Alessandra Noto, Georgios Pollakis, Matthias Cavassini, Khalid Ohmiti, Jean-Marc Corpataux, Laurence de Leval, Giuseppe Pantaleo, and Matthieu Perreau. 2016. "PD-1(+) and Follicular Helper T Cells Are Responsible for Persistent HIV-1 Transcription in Treated Aviremic Individuals." Nature Medicine, May. doi:10.1038/nm.4113.

Bastard, Jean Philippe, Martine Caron, Hubert Vidal, Véronique Jan, Martine Auclair, Corinne Vigouroux, Jacqueline Luboinski, et al. 2002. "Association between Altered Expression of

Adipogenic Factor SREBP1 in Lipoatrophic Adipose Tissue from HIV-1-Infected Patients and Abnormal Adipocyte Differentiation and Insulin Resistance." Lancet (London, England) 359 (9311): 1026–31. doi:10.1016/S0140-6736(02)08094-7.

Bastard, Jean-Philippe, Mustapha Maachi, Claire Lagathu, Min Ji Kim, Martine Caron, Hubert Vidal, Jacqueline Capeau, and Bruno Feve. 2006. "Recent Advances in the Relationship between Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance." European Cytokine Network 17 (1): 4–12.

Bastard, J.-P., S. Fellahi, C. Couffignal, F. Raffi, G. Gras, L. Hardel, A. Sobel, et al. 2015. "Increased Systemic Immune Activation and Inflammatory Profile of Long-Term HIV-Infected ART-Controlled Patients Is Related to Personal Factors, but Not to Markers of HIV Infection Severity." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 70 (6): 1816–24. doi:10.1093/jac/dkv036.

Bautista-Amorocho, Henry, Yeny Zulay Castellanos-Domínguez, Laura Andrea Rodríguez-Villamizar, Sindi Alejandra Velandia-Cruz, Jeysson Andrey Becerra-Peña, and Ana Elvira Farfán-García. 2014. "Epidemiology, Risk Factors and Genotypes of HBV in HIV-Infected Patients in the Northeast Region of Colombia: High Prevalence of Occult Hepatitis B and F3 Subgenotype Dominance." PloS One 9 (12): e114272. doi:10.1371/journal.pone.0114272.

Beaupere, Carine, Marie Garcia, Jerome Larghero, Bruno Fève, Jacqueline Capeau, and Claire Lagathu. 2015. "The HIV Proteins Tat and Nef Promote Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Senescence and Alter Osteoblastic Differentiation." Aging Cell 14 (4): 534–46. doi:10.1111/acel.12308.

Bechah, Yassina, Christopher D. Paddock, Christian Capo, Jean-Louis Mege, and Didier Raoult. 2010. "Adipose Tissue Serves as a Reservoir for Recrudescent Rickettsia Prowazekii Infection in a Mouse Model." PloS One 5 (1): e8547. doi:10.1371/journal.pone.0008547.

Beignon, Anne-Sophie, Kelli McKenna, Mojca Skoberne, Olivier Manches, Ida DaSilva, Daniel G. Kavanagh, Marie Larsson, Robert J. Gorelick, Jeffrey D. Lifson, and Nina Bhardwaj. 2005. "Endocytosis of HIV-1 Activates Plasmacytoid Dendritic Cells via Toll-like Receptor-Viral RNA Interactions." The Journal of Clinical Investigation 115 (11): 3265–75. doi:10.1172/JCI26032.

Bellora, Francesca, Roberta Castriconi, Alessandra Dondero, Paolo Carrega, Alberto Mantovani, Guido Ferlazzo, Alessandro Moretta, and Cristina Bottino. 2014. "Human NK Cells and NK Receptors." Immunology Letters 161 (2): 168–73. doi:10.1016/j.imlet.2013.12.009.

Bellora, Francesca, Roberta Castriconi, Alessandra Dondero, Anna Pessino, Alessio Nencioni, Giovanni Liggieri, Lorenzo Moretta, Alberto Mantovani, Alessandro Moretta, and Cristina Bottino. 2014. "TLR Activation of Tumor-Associated Macrophages from Ovarian Cancer Patients Triggers Cytolytic Activity of NK Cells." European Journal of Immunology 44 (6): 1814–22. doi:10.1002/eji.201344130.

Berg, R. D. 1995. "Bacterial Translocation from the Gastrointestinal Tract." Trends in Microbiology 3 (4): 149–54.

Bertola, Adeline, Thomas Ciucci, Déborah Rousseau, Virginie Bourlier, Carine Duffaut, Stéphanie Bonnafous, Claudine Blin-Wakkach, et al. 2012. "Identification of Adipose Tissue Dendritic Cells Correlated with Obesity-Associated Insulin-Resistance and Inducing Th17 Responses in Mice and Patients." Diabetes 61 (9): 2238–47. doi:10.2337/db11-1274.

Blackard, Jason T., Gang Ma, Christina M. Martin, Susan D. Rouster, M. Tarek Shata, and Kenneth E. Sherman. 2011. "HIV Variability in the Liver and Evidence of Possible Compartmentalization." AIDS Research and Human Retroviruses 27 (10): 1117–26. doi:10.1089/aid.2010.0329.

Blankson, Joel N., Deborah Persaud, and Robert F. Siliciano. 2002. "The Challenge of Viral Reservoirs in HIV-1 Infection." Annual Review of Medicine 53: 557–93. doi:10.1146/annurev.med.53.082901.104024.

Blüher, M. 2009. "Adipose Tissue Dysfunction in Obesity." Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes 117 (06): 241–50. doi:10.1055/s-0029-1192044.

Bonneville, Marc, Rebecca L. O'Brien, and Willi K. Born. 2010. "Gammadelta T Cell Effector Functions: A Blend of Innate Programming and Acquired Plasticity." Nature Reviews. Immunology 10 (7): 467–78. doi:10.1038/nri2781.

Boothby, Meg, Kirsty C. McGee, Jeremy W. Tomlinson, Laura L. Gathercole, Philip G. McTernan, Fariba Shojaee-Moradie, A. Margot Umpleby, Peter Nightingale, and Mohsen Shahmanesh. 2009. "Adipocyte Differentiation, Mitochondrial Gene Expression and Fat Distribution: Differences between Zidovudine and Tenofovir after 6 Months." Antiviral Therapy 14 (8): 1089–1100. doi:10.3851/IMP1457.

Bosque, Alberto, and Vicente Planelles. 2009. "Induction of HIV-1 Latency and Reactivation in Primary Memory CD4+ T Cells." Blood 113 (1): 58–65. doi:10.1182/blood-2008-07-168393.

Boulenouar, Selma, Xavier Michelet, Danielle Duquette, David Alvarez, Andrew E. Hogan, Christina Dold, Donal O'Connor, et al. 2017. "Adipose Type One Innate Lymphoid Cells Regulate Macrophage Homeostasis through Targeted Cytotoxicity." Immunity 46 (2): 273–86. doi:10.1016/j.immuni.2017.01.008.

Bourin, Philippe, Bruce A. Bunnell, Louis Casteilla, Massimo Dominici, Adam J. Katz, Keith L. March, Heinz Redl, J. Peter Rubin, Kotaro Yoshimura, and Jeffrey M. Gimble. 2013. "Stromal Cells from the Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction and Culture Expanded Adipose Tissue-Derived Stromal/Stem Cells: A Joint Statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)." Cytotherapy 15 (6): 641–48. doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.006.

Bouwman, J. J. M., F. L. J. Visseren, K. P. Bouter, and R. J. A. Diepersloot. 2008. "Infection-Induced Inflammatory Response of Adipocytes in Vitro." International Journal of Obesity (2005) 32 (6): 892–901. doi:10.1038/ijo.2008.36.

Brady, Troy, Luis M. Agosto, Nirav Malani, Charles C. Berry, Una O'Doherty, and Frederic Bushman. 2009. "HIV Integration Site Distributions in Resting and Activated CD4+ T Cells Infected in Culture." AIDS (London, England) 23 (12): 1461–71. doi:10.1097/QAD.0b013e32832caf28.

Brand, Stephan, Florian Beigel, Torsten Olszak, Kathrin Zitzmann, Sören T. Eichhorst, Jan-Michel Otte, Helmut Diepolder, et al. 2006. "IL-22 Is Increased in Active Crohn's Disease and Promotes Proinflammatory Gene Expression and Intestinal Epithelial Cell Migration." American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology 290 (4): G827-838. doi:10.1152/ajpgi.00513.2005.

Brandtzaeg, P, H Kiyono, R Pabst, and M W Russell. 2008. "Terminology: Nomenclature of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue." Mucosal Immunology 1 (1): 31–37. doi:10.1038/mi.2007.9.

Brar, Indira, Jonathan Shuter, Avis Thomas, Eric Daniels, Judith Absalon, and Minorities and Women's Task Force of Terry Beirn Community Programs for Clinical Research on AIDS. 2007. "A Comparison of Factors Associated with Prevalent Diabetes Mellitus among HIV-Infected Antiretroviral-Naive Individuals versus Individuals in the National Health and Nutritional Examination Survey Cohort." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999) 45 (1): 66–71. doi:10.1097/QAI.0b013e318031d7e3.

Breen, Elizabeth Crabb, Shehnaz K. Hussain, Larry Magpantay, Lisa P. Jacobson, Roger Detels, Charles S. Rabkin, Richard A. Kaslow, et al. 2011. "B-Cell Stimulatory Cytokines and Markers of Immune Activation Are Elevated Several Years prior to the Diagnosis of

Systemic AIDS-Associated Non-Hodgkin B-Cell Lymphoma." Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 20 (7): 1303–14. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0037.

Brenchley, Jason M., Mirko Paiardini, Kenneth S. Knox, Ava I. Asher, Barbara Cervasi, Tedi E. Asher, Phillip Scheinberg, et al. 2008. "Differential Th17 CD4 T-Cell Depletion in Pathogenic and Nonpathogenic Lentiviral Infections." Blood 112 (7): 2826–35. doi:10.1182/blood-2008-05-159301.

Brenchley, Jason M., David A. Price, Timothy W. Schacker, Tedi E. Asher, Guido Silvestri, Srinivas Rao, Zachary Kazzaz, et al. 2006. "Microbial Translocation Is a Cause of Systemic Immune Activation in Chronic HIV Infection." Nature Medicine 12 (12): 1365–71. doi:10.1038/nm1511.

Brenchley, Jason M., Timothy W. Schacker, Laura E. Ruff, David A. Price, Jodie H. Taylor, Gregory J. Beilman, Phuong L. Nguyen, et al. 2004. "CD4+ T Cell Depletion during All Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract." The Journal of Experimental Medicine 200 (6): 749–59. doi:10.1084/jem.20040874.

Brestoff, Jonathan R., and David Artis. 2015. "Immune Regulation of Metabolic Homeostasis in Health and Disease." Cell 161 (1): 146–60. doi:10.1016/j.cell.2015.02.022.

Brown, Kevin N., Anita Trichel, and Simon M. Barratt-Boyes. 2007. "Parallel Loss of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells from Blood and Lymphoid Tissue in Simian AIDS." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 178 (11): 6958–67.

Brown, Todd T., Stephen R. Cole, Xiuhong Li, Lawrence A. Kingsley, Frank J. Palella, Sharon A. Riddler, Barbara R. Visscher, Joseph B. Margolick, and Adrian S. Dobs. 2005. "Antiretroviral Therapy and the Prevalence and Incidence of Diabetes Mellitus in the Multicenter AIDS Cohort Study." Archives of Internal Medicine 165 (10): 1179–84. doi:10.1001/archinte.165.10.1179.

Brown, Todd T., Katherine Tassiopoulos, Ronald J. Bosch, Cecilia Shikuma, and Grace A. McComsey. 2010. "Association between Systemic Inflammation and Incident Diabetes in HIV-Infected Patients after Initiation of Antiretroviral Therapy." Diabetes Care 33 (10): 2244–49. doi:10.2337/dc10-0633.

Bruno, Raffaele, Sara Galastri, Paolo Sacchi, Serena Cima, Alessandra Caligiuri, Raffaella DeFranco, Stefano Milani, et al. 2010. "gp120 Modulates the Biology of Human Hepatic Stellate Cells: A Link between HIV Infection and Liver Fibrogenesis." Gut 59 (4): 513–20. doi:10.1136/gut.2008.163287.

Bruun, Jens M., Aina S. Lihn, Steen B. Pedersen, and Bjørn Richelsen. 2005. "Monocyte Chemoattractant Protein-1 Release Is Higher in Visceral than Subcutaneous Human Adipose Tissue (AT): Implication of Macrophages Resident in the AT." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 90 (4): 2282–89. doi:10.1210/jc.2004-1696.

Bull, Marta E., Gerald H. Learn, Scott McElhone, Jane Hitti, David Lockhart, Sarah Holte, Joan Dragavon, Robert W. Coombs, James I. Mullins, and Lisa M. Frenkel. 2009. "Monotypic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genotypes across the Uterine Cervix and in Blood Suggest Proliferation of Cells with Provirus." Journal of Virology 83 (12): 6020–28. doi:10.1128/JVI.02664-08.

Burcelin, Rémy, Matteo Serino, Chantal Chabo, Lucile Garidou, Celine Pomié, Michael Courtney, Jacques Amar, and Anne Bouloumié. 2013. "Metagenome and Metabolism: The Tissue Microbiota Hypothesis." Diabetes, Obesity & Metabolism 15 Suppl 3 (September): 61–70. doi:10.1111/dom.12157.

Burdo, Tricia H., Margaret R. Lentz, Patrick Autissier, Anitha Krishnan, Elkan Halpern, Scott Letendre, Eric S. Rosenberg, Ronald J. Ellis, and Kenneth C. Williams. 2011. "Soluble CD163 Made by Monocyte/Macrophages Is a Novel Marker of HIV Activity in Early and

Chronic Infection prior to and after Anti-Retroviral Therapy." The Journal of Infectious Diseases 204 (1): 154–63. doi:10.1093/infdis/jir214.

Burdo, Tricia H., Allison Weiffenbach, Steven P. Woods, Scott Letendre, Ronald J. Ellis, and Kenneth C. Williams. 2013. "Elevated sCD163 in Plasma but Not Cerebrospinal Fluid Is a Marker of Neurocognitive Impairment in HIV Infection." AIDS (London, England) 27 (9): 1387–95. doi:10.1097/QAD.0b013e32836010bd.

Burton, Gregory F., Brandon F. Keele, Jacob D. Estes, Tyler C. Thacker, and Suzanne Gartner. 2002. "Follicular Dendritic Cell Contributions to HIV Pathogenesis." Seminars in Immunology 14 (4): 275–84.

Butt, Adeel A., Kathleen McGinnis, Maria C. Rodriguez-Barradas, Stephen Crystal, Michael Simberkoff, Matthew Bidwell Goetz, David Leaf, Amy C. Justice, and Veterans Aging Cohort Study. 2009. "HIV Infection and the Risk of Diabetes Mellitus." AIDS (London, England) 23 (10): 1227–34. doi:10.1097/QAD.0b013e32832bd7af.

Buzon, Maria J., Enrique Martin-Gayo, Florencia Pereyra, Zhengyu Ouyang, Hong Sun, Jonathan Z. Li, Michael Piovoso, et al. 2014. "Long-Term Antiretroviral Treatment Initiated at Primary HIV-1 Infection Affects the Size, Composition, and Decay Kinetics of the Reservoir of HIV-1-Infected CD4 T Cells." Journal of Virology 88 (17): 10056–65. doi:10.1128/JVI.01046-14.

Buzon, Maria J., Hong Sun, Chun Li, Amy Shaw, Katherine Seiss, Zhengyu Ouyang, Enrique Martin-Gayo, et al. 2014. "HIV-1 Persistence in CD4+ T Cells with Stem Cell-like Properties." Nature Medicine 20 (2): 139–42. doi:10.1038/nm.3445.

Cameron, Paul U., Suha Saleh, Georgina Sallmann, Ajantha Solomon, Fiona Wightman, Vanessa A. Evans, Genevieve Boucher, et al. 2010. "Establishment of HIV-1 Latency in Resting CD4+ T Cells Depends on Chemokine-Induced Changes in the Actin Cytoskeleton." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107 (39): 16934–39. doi:10.1073/pnas.1002894107.

Cao, Wei, Vikram Mehraj, Daniel E Kaufmann, Taisheng Li, and Jean-Pierre Routy. 2016. "Elevation and Persistence of CD8 T-Cells in HIV Infection: The Achilles Heel in the ART Era." Journal of the International AIDS Society 19 (1). doi:10.7448/IAS.19.1.20697.

Capeau, Jacqueline, Vincent Bouteloup, Christine Katlama, Jean-Philippe Bastard, Vincent Guiyedi, Dominique Salmon-Ceron, Camelia Protopopescu, et al. 2012. "Ten-Year Diabetes Incidence in 1046 HIV-Infected Patients Started on a Combination Antiretroviral Treatment." AIDS (London, England) 26 (3): 303–14. doi:10.1097/QAD.0b013e32834e8776.

Capeau, Jacqueline, Jocelyne Magré, Martine Caron-Debarle, Claire Lagathu, Bénédicte Antoine, Véronique Béréziat, Olivier Lascols, Jean-Philippe Bastard, and Corinne Vigouroux. 2010. "Human Lipodystrophies: Genetic and Acquired Diseases of Adipose Tissue." Endocrine Development 19: 1–20. doi:10.1159/000316893.

Carbone, Francis R. 2015. "Tissue-Resident Memory T Cells and Fixed Immune Surveillance in Nonlymphoid Organs." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 195 (1): 17–22. doi:10.4049/jimmunol.1500515.

Carding, Simon R., and Paul J. Egan. 2002. "Gammadelta T Cells: Functional Plasticity and Heterogeneity." Nature Reviews. Immunology 2 (5): 336–45. doi:10.1038/nri797.

Caron, Martine, Martine Auclairt, Anais Vissian, Corinne Vigouroux, and Jacqueline Capeau. 2008. "Contribution of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress to Cellular Premature Senescence Induced by Antiretroviral Thymidine Analogues." Antiviral Therapy 13 (1): 27–38.

Caron, Martine, Corinne Vigouroux, Jean Philippe Bastard, and Jacqueline Capeau. 2007. "Adipocyte Dysfunction in Response to Antiretroviral Therapy: Clinical, Tissue and in-Vitro Studies." Current Opinion in HIV and AIDS 2 (4): 268–73. doi:10.1097/COH.0b013e32814b1638.

Caron-Debarle, Martine, Claire Lagathu, Franck Boccara, Corinne Vigouroux, and Jacqueline Capeau. 2010. "HIV-Associated Lipodystrophy: From Fat Injury to Premature Aging." Trends in Molecular Medicine 16 (5): 218–29. doi:10.1016/j.molmed.2010.03.002.

Carr, A., and D. A. Cooper. 1998. "Images in Clinical Medicine. Lipodystrophy Associated with an HIV-Protease Inhibitor." The New England Journal of Medicine 339 (18): 1296. doi:10.1056/NEJM199810293391806.

Carr, A., K. Samaras, A. Thorisdottir, G. R. Kaufmann, D. J. Chisholm, and D. A. Cooper. 1999. "Diagnosis, Prediction, and Natural Course of HIV-1 Protease-Inhibitor-Associated Lipodystrophy, Hyperlipidaemia, and Diabetes Mellitus: A Cohort Study." Lancet (London, England) 353 (9170): 2093–99. doi:10.1016/S0140-6736(98)08468-2.

Carr, Andrew, and David A. Cooper. 2000. "Adverse Effects of Antiretroviral Therapy." The Lancet 356 (9239): 1423–30. doi:10.1016/S0140-6736(00)02854-3.

Carter, Carol A., and Lorna S. Ehrlich. 2008. "Cell Biology of HIV-1 Infection of Macrophages." Annual Review of Microbiology 62: 425–43. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162758.

Caspar-Bauguil, S., B. Cousin, A. Galinier, C. Segafredo, M. Nibbelink, M. André, L. Casteilla, and L. Pénicaud. 2005. "Adipose Tissues as an Ancestral Immune Organ: Site-Specific Change in Obesity." FEBS Letters 579 (17): 3487–92. doi:10.1016/j.febslet.2005.05.031.

Cassol, Edana, Luca Cassetta, Massimo Alfano, and Guido Poli. 2010. "Macrophage Polarization and HIV-1 Infection." Journal of Leukocyte Biology 87 (4): 599–608. doi:10.1189/jlb.1009673.

Cassol, Edana, Susan Malfeld, Phetole Mahasha, Schalk van der Merwe, Sharon Cassol, Chris Seebregts, Massimo Alfano, Guido Poli, and Theresa Rossouw. 2010. "Persistent Microbial Translocation and Immune Activation in HIV-1–Infected South Africans Receiving Combination Antiretroviral Therapy." The Journal of Infectious Diseases 202 (5): 723–33. doi:10.1086/655229.

Casteilla, Louis, Valérie Planat-Benard, Patrick Laharrague, and Béatrice Cousin. 2011. "Adipose-Derived Stromal Cells: Their Identity and Uses in Clinical Trials, an Update." World Journal of Stem Cells 3 (4): 25–33. doi:10.4252/wjsc.v3.i4.25.

Cava, Antonio La, and Giuseppe Matarese. 2004. "The Weight of Leptin in Immunity." Nature Reviews Immunology 4 (5): 371–79. doi:10.1038/nri1350.

Cencig, Sabrina, Nicolas Coltel, Carine Truyens, and Yves Carlier. 2011. "Parasitic Loads in Tissues of Mice Infected with Trypanosoma Cruzi and Treated with AmBisome." PLoS Neglected Tropical Diseases 5 (6): e1216. doi:10.1371/journal.pntd.0001216.

Chahroudi, Ann, Steven E. Bosinger, Thomas H. Vanderford, Mirko Paiardini, and Guido Silvestri. 2012. "Natural SIV Hosts: Showing AIDS the Door." Science (New York, N.Y.) 335 (6073): 1188–93. doi:10.1126/science.1217550.

Chase, Amanda J., Ahmad R. Sedaghat, Jennifer R. German, Lucio Gama, M. Christine Zink, Janice E. Clements, and Robert F. Siliciano. 2007. "Severe Depletion of CD4+ CD25+ Regulatory T Cells from the Intestinal Lamina Propria but Not Peripheral Blood or Lymph Nodes during Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection." Journal of Virology 81 (23): 12748–57. doi:10.1128/JVI.00841-07.

Chen, Yin, Philip Thai, Yu-Hua Zhao, Ye-Shih Ho, Mary M. DeSouza, and Reen Wu. 2003. "Stimulation of Airway Mucin Gene Expression by Interleukin (IL)-17 through IL-6 Paracrine/Autocrine Loop." The Journal of Biological Chemistry 278 (19): 17036–43. doi:10.1074/jbc.M210429200.

Chomont, Nicolas, Mohamed El-far, Petronela Ancuta, Lydie Trautmann, Mohamed-rachid Boulassel, Francesco A Procopio, Bader Yassine-diab, et al. 2009. "HIV Reservoir Size and Persistence Are Driven by T Cell Survival and Homeostatic Proliferation" 15 (8). doi:10.1038/nm.1972.

Chomont, Nicolas, Mohamed El-Far, Petronela Ancuta, Lydie Trautmann, Francesco A Procopio, Bader Yassine-Diab, Geneviève Boucher, et al. 2009. "HIV Reservoir Size and Persistence Are Driven by T Cell Survival and Homeostatic Proliferation." Nature Medicine 15 (8): 893–900. doi:10.1038/nm.1972.

Chomont, Nicolas, Hakim Hocini, Gérard Grésenguet, Céline Brochier, Hicham Bouhlal, Laurent Andréoletti, Pierre Becquart, et al. 2007. "Early Archives of Genetically-Restricted Proviral DNA in the Female Genital Tract after Heterosexual Transmission of HIV-1." AIDS (London, England) 21 (2): 153–62. doi:10.1097/QAD.0b013e328011f94b.

Chun, T W, L Carruth, D Finzi, X Shen, J A DiGiuseppe, H Taylor, M Hermankova, et al. 1997. "Quantification of Latent Tissue Reservoirs and Total Body Viral Load in HIV-1 Infection." Nature 387 (6629): 183–88. doi:10.1038/387183a0.

Chun, T. W., R. T. Davey, M. Ostrowski, J. Shawn Justement, D. Engel, J. I. Mullins, and A. S. Fauci. 2000. "Relationship between Pre-Existing Viral Reservoirs and the Re-Emergence of Plasma Viremia after Discontinuation of Highly Active Anti-Retroviral Therapy." Nature Medicine 6 (7): 757–61. doi:10.1038/77481.

Chun, T. W., D. Engel, M. M. Berrey, T. Shea, L. Corey, and A. S. Fauci. 1998. "Early Establishment of a Pool of Latently Infected, Resting CD4(+) T Cells during Primary HIV-1 Infection." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95 (15): 8869–73.

Chun, T. W., D. Finzi, J. Margolick, K. Chadwick, D. Schwartz, and R. F. Siliciano. 1995. "In Vivo Fate of HIV-1-Infected T Cells: Quantitative Analysis of the Transition to Stable Latency." Nature Medicine 1 (12): 1284–90.

Chung, Doo Ryeon, Dennis L. Kasper, Ronald J. Panzo, Tanuja Chitnis, Michael J. Grusby, Mohamed H. Sayegh, Arthur O. Tzianabos, and Tanuja Chtinis. 2003. "CD4+ T Cells Mediate Abscess Formation in Intra-Abdominal Sepsis by an IL-17-Dependent Mechanism." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 170 (4): 1958–63.

Cieri, Nicoletta, Barbara Camisa, Fabienne Cocchiarella, Mattia Forcato, Giacomo Oliveira, Elena Provasi, Attilio Bondanza, et al. 2013. "IL-7 and IL-15 Instruct the Generation of Human Memory Stem T Cells from Naive Precursors." Blood 121 (4): 573–84. doi:10.1182/blood-2012-05-431718.

Cipolletta, Daniela, Markus Feuerer, Amy Li, Nozomu Kamei, Jongsoon Lee, Steven E. Shoelson, Christophe Benoist, and Diane Mathis. 2012. "PPAR-γ Is a Major Driver of the Accumulation and Phenotype of Adipose Tissue Treg Cells." Nature 486 (7404): 549–53. doi:10.1038/nature11132.

Cipolletta, Daniela, Dmitriy Kolodin, Christophe Benoist, and Diane Mathis. 2011. "Tissular T(regs): A Unique Population of Adipose-Tissue-Resident Foxp3+CD4+ T Cells That Impacts Organismal Metabolism." Seminars in Immunology 23 (6): 431–37. doi:10.1016/j.smim.2011.06.002.

Clarke, P. R., and H. I. Williams. 1975. "Ossification in Extradural Fat in Paget's Disease of the Spine." The British Journal of Surgery 62 (7): 571–72.

Cohen, Jon. 2011. "Tissue Says Blood Is Misleading, Confusing HIV Cure Efforts." Science 334 (6063): 1614–1614. doi:10.1126/science.334.6063.1614.

Coleman, Christopher M, and Li Wu. 2009. "HIV Interactions with Monocytes and Dendritic Cells: Viral Latency and Reservoirs." Retrovirology 6 (June): 51. doi:10.1186/1742-4690-6-51.

Combs, Terry P., null Nagajyothi, Shankar Mukherjee, Cecilia J. G. de Almeida, Linda A. Jelicks, William Schubert, Ying Lin, et al. 2005. "The Adipocyte as an Important Target Cell for Trypanosoma Cruzi Infection." The Journal of Biological Chemistry 280 (25): 24085–94. doi:10.1074/jbc.M412802200.

Cook, K. S., D. L. Groves, H. Y. Min, and B. M. Spiegelman. 1985. "A Developmentally Regulated mRNA from 3T3 Adipocytes Encodes a Novel Serine Protease Homologue."

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82 (19): 6480–84.

Cooper, Arik, Mayra García, Constantinos Petrovas, Takuya Yamamoto, Richard A. Koup, and Gary J. Nabel. 2013. "HIV-1 Causes CD4 Cell Death through DNA-Dependent Protein Kinase during Viral Integration." Nature 498 (7454): 376–79. doi:10.1038/nature12274.

Cousin, Béatrice, Mireille André, Emmanuelle Arnaud, Luc Pénicaud, and Louis Casteilla. 2003. "Reconstitution of Lethally Irradiated Mice by Cells Isolated from Adipose Tissue." Biochemical and Biophysical Research Communications 301 (4): 1016–22.

Couturier, Jacob, James W Suliburk, Jeremy M Brown, David J Luke, Neeti Agarwal, Xiaoying Yu, Chi Nguyen, et al. 2015a. "Human Adipose Tissue as a Reservoir for Memory CD4+ T Cells and HIV." AIDS (London, England) 29 (6): 667–74. doi:10.1097/QAD.0000000000000599.

Couturier, Jacob, James W. Suliburk, Jeremy M. Brown, David J. Luke, Neeti Agarwal, Xiaoying Yu, Chi Nguyen, et al. 2015b. "Human Adipose Tissue as a Reservoir for Memory CD4+ T Cells and HIV." AIDS (London, England) 29 (6): 667–74. doi:10.1097/QAD.0000000000000599.

Crowe, S. M., J. Mills, J. Kirihara, J. Boothman, J. A. Marshall, and M. S. McGrath. 1990. "Full-Length Recombinant CD4 and Recombinant gp120 Inhibit Fusion between HIV Infected Macrophages and Uninfected CD4-Expressing T-Lymphoblastoid Cells." AIDS Research and Human Retroviruses 6 (8): 1031–37. doi:10.1089/aid.1990.6.1031.

Crum-Cianflone, Nancy, Angelica Dilay, Gary Collins, Dean Asher, Richard Campin, Sheila Medina, Zach Goodman, et al. 2009. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease among HIV-Infected Persons." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999) 50 (5): 464–73. doi:10.1097/QAI.0b013e318198a88a.

Curat, C. A., V. Wegner, C. Sengenès, A. Miranville, C. Tonus, R. Busse, and A. Bouloumié. 2006. "Macrophages in Human Visceral Adipose Tissue: Increased Accumulation in Obesity and a Source of Resistin and Visfatin." Diabetologia 49 (4): 744. doi:10.1007/s00125-006-0173-z.

Curat, Cyrile A, Alexandra Miranville, Coralie Sengenès, Michael Diehl, Carolin Tonus, Rudi Busse, and Anne Bouloumié. 2004. "From Blood Monocytes to Adipose Tissue-Resident Macrophages: Induction of Diapedesis by Human Mature Adipocytes." Diabetes 53 (5): 1285–92.

Currier, Judith S., Anne Taylor, Felicity Boyd, Christopher M. Dezii, Hugh Kawabata, Beth Burtcel, Jen-Fue Maa, and Sally Hodder. 2003. "Coronary Heart Disease in HIV-Infected Individuals." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999) 33 (4): 506–12.

Dai, Jihong, Luis M. Agosto, Clifford Baytop, Jianqing J. Yu, Matthew J. Pace, Megan K. Liszewski, and Una O'Doherty. 2009. "Human Immunodeficiency Virus Integrates Directly into Naive Resting CD4+ T Cells but Enters Naive Cells Less Efficiently than Memory Cells." Journal of Virology 83 (9): 4528–37. doi:10.1128/JVI.01910-08.

Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss. 1984. "The CD4 (T4) Antigen Is an Essential Component of the Receptor for the AIDS Retrovirus." Nature 312 (5996): 763–67.

Davey, R. T., N. Bhat, C. Yoder, T. W. Chun, J. A. Metcalf, R. Dewar, V. Natarajan, et al. 1999. "HIV-1 and T Cell Dynamics after Interruption of Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) in Patients with a History of Sustained Viral Suppression." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96 (26): 15109–14.

Day, Cheryl L., Daniel E. Kaufmann, Photini Kiepiela, Julia A. Brown, Eshia S. Moodley, Sharon Reddy, Elizabeth W. Mackey, et al. 2006. "PD-1 Expression on HIV-Specific T Cells Is Associated with T-Cell Exhaustion and Disease Progression." Nature 443 (7109): 350–54. doi:10.1038/nature05115.

De Pasquale, Maria Pia, Andrew J. Leigh Brown, Susan Cu Uvin, Jessica Allega-Ingersoll, Angela M. Caliendo, Lorraine Sutton, Shannon Donahue, and Richard T. D'Aquila. 2003. "Differences in HIV-1 Pol Sequences from Female Genital Tract and Blood during Antiretroviral Therapy." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999) 34 (1): 37–44.

De Wit, Stephane, Caroline A. Sabin, Rainer Weber, Signe Westring Worm, Peter Reiss, Charles Cazanave, Wafaa El-Sadr, et al. 2008. "Incidence and Risk Factors for New-Onset Diabetes in HIV-Infected Patients: The Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (D:A:D) Study." Diabetes Care 31 (6): 1224–29. doi:10.2337/dc07-2013.

Deeks, Steven G., Christina M. R. Kitchen, Lea Liu, Hua Guo, Ron Gascon, Amy B. Narváez, Peter Hunt, et al. 2004. "Immune Activation Set Point during Early HIV Infection Predicts Subsequent CD4+ T-Cell Changes Independent of Viral Load." Blood 104 (4): 942–47. doi:10.1182/blood-2003-09-3333.

Deeks, Steven G. G, Russell Tracy, and Daniel C. C Douek. 2013. "Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection." Immunity 39 (4): 633–45. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.001.

Denton, Paul W., and J. Víctor García. 2011. "Humanized Mouse Models of HIV Infection." AIDS Reviews 13 (3): 135–48.

Desai, Seema, and Alan Landay. 2010. "Early Immune Senescence in HIV Disease." Current HIV/AIDS Reports 7 (1): 4–10. doi:10.1007/s11904-009-0038-4.

Descours, Benjamin, Gaël Petitjean, José-Luis López-Zaragoza, Timothée Bruel, Raoul Raffel, Christina Psomas, Jacques Reynes, et al. 2017. "CD32a Is a Marker of a CD4 T-Cell HIV Reservoir Harbouring Replication-Competent Proviruses." Nature 543 (7646): 564–67. doi:10.1038/nature21710.

Dhurandhar, Nikhil V., Leah D. Whigham, David H. Abbott, Nancy J. Schultz-Darken, Barbara A. Israel, Steven M. Bradley, Joseph W. Kemnitz, David B. Allison, and Richard L. Atkinson. 2002. "Human Adenovirus Ad-36 Promotes Weight Gain in Male Rhesus and Marmoset Monkeys." The Journal of Nutrition 132 (10): 3155–60.

Diamond, Tracy L., Mikhail Roshal, Varuni K. Jamburuthugoda, Holly M. Reynolds, Aaron R. Merriam, Kwi Y. Lee, Mini Balakrishnan, et al. 2004. "Macrophage Tropism of HIV-1 Depends on Efficient Cellular dNTP Utilization by Reverse Transcriptase." The Journal of Biological Chemistry 279 (49): 51545–53. doi:10.1074/jbc.M408573200.

Díaz-Delfín, Julieta, Pere Domingo, Martin Wabitsch, Marta Giralt, and Francesc Villarroya. 2012. "HIV-1 Tat Protein Impairs Adipogenesis and Induces the Expression and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Human SGBS Adipocytes." Antiviral Therapy 17 (3): 529–40. doi:10.3851/IMP2021.

Dillon, S. M., E. J. Lee, C. V. Kotter, G. L. Austin, Z. Dong, D. K. Hecht, S. Gianella, et al. 2014. "An Altered Intestinal Mucosal Microbiome in HIV-1 Infection Is Associated with Mucosal and Systemic Immune Activation and Endotoxemia." Mucosal Immunology 7 (4): 983–94. doi:10.1038/mi.2013.116.

Dinh, Duy M., Gretchen E. Volpe, Chad Duffalo, Seema Bhalchandra, Albert K. Tai, Anne V. Kane, Christine A. Wanke, and Honorine D. Ward. 2015. "Intestinal Microbiota, Microbial Translocation, and Systemic Inflammation in Chronic HIV Infection." The Journal of Infectious Diseases 211 (1): 19–27. doi:10.1093/infdis/jiu409.

Doisne, Jean-Marc, Alejandra Urrutia, Christine Lacabaratz-Porret, Cécile Goujard, Laurence Meyer, Marie-Laure Chaix, Martine Sinet, and Alain Venet. 2004. "CD8+ T Cells Specific for EBV, Cytomegalovirus, and Influenza Virus Are Activated during Primary HIV Infection." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 173 (4): 2410–18.

Dolinková, M, I Dostálová, Z Lacinová, D Michalský, D Haluzíková, M Mráz, M Kasalický, and M Haluzík. 2008. "The Endocrine Profile of Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue of

Obese Patients." Molecular and Cellular Endocrinology 291 (1–2): 63–70. doi:10.1016/j.mce.2008.05.001.

Domínguez, Pilar M., and Carlos Ardavín. 2010. "Differentiation and Function of Mouse Monocyte-Derived Dendritic Cells in Steady State and Inflammation." Immunological Reviews 234 (1): 90–104. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00876.x.

Dowell, P., C. Flexner, P. O. Kwiterovich, and M. D. Lane. 2000. "Suppression of Preadipocyte Differentiation and Promotion of Adipocyte Death by HIV Protease Inhibitors." The Journal of Biological Chemistry 275 (52): 41325–32. doi:10.1074/jbc.M006474200.

Drancourt, M., C. Bollet, A. Carlioz, R. Martelin, J. P. Gayral, and D. Raoult. 2000. "16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates." Journal of Clinical Microbiology 38 (10): 3623–30.

Drolet, R., C. Richard, A. D. Sniderman, J. Mailloux, M. Fortier, C. Huot, C. Rhéaume, and A. Tchernof. 2008. "Hypertrophy and Hyperplasia of Abdominal Adipose Tissues in Women." International Journal of Obesity (2005) 32 (2): 283–91. doi:10.1038/sj.ijo.0803708.

D'Souza, Michelle, Andrew P. Fontenot, Doug G. Mack, Catherine Lozupone, Stephanie Dillon, Amie Meditz, Cara C. Wilson, Elizabeth Connick, and Brent E. Palmer. 2007. "Programmed Death 1 Expression on HIV-Specific CD4+ T Cells Is Driven by Viral Replication and Associated with T Cell Dysfunction." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 179 (3): 1979–87.

Duffaut, Carine, Jean Galitzky, Max Lafontan, and Anne Bouloumié. 2009. "Unexpected Trafficking of Immune Cells within the Adipose Tissue during the Onset of Obesity." Biochemical and Biophysical Research Communications 384 (4): 482–85. doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.002.

Duffaut, Carine, Alexia Zakaroff-Girard, Virginie Bourlier, Pauline Decaunes, Marie Maumus, Patrick Chiotasso, Coralie Sengenès, Max Lafontan, Jean Galitzky, and Anne Bouloumié. 2009. "Interplay between Human Adipocytes and T Lymphocytes in Obesity: CCL20 as an Adipochemokine and T Lymphocytes as Lipogenic Modulators." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 29 (10): 1608–14. doi:10.1161/ATVBAHA.109.192583.

Duncan, Christopher J. A., Rebecca A. Russell, and Quentin J. Sattentau. 2013. "High Multiplicity HIV-1 Cell-to-Cell Transmission from Macrophages to CD4+ T Cells Limits Antiretroviral Efficacy." AIDS (London, England) 27 (14): 2201–6. doi:10.1097/QAD.0b013e3283632ec4.

Dupin, Nicolas, Marc Buffet, Anne-Geneviève Marcelin, Claire Lamotte, Isabelle Gorin, Zaina Ait-Arkoub, Jean-Marc Tréluyer, Patrick Bui, Vincent Calvez, and Gilles Peytavin. 2002a. "HIV and Antiretroviral Drug Distribution in Plasma and Fat Tissue of HIV-Infected Patients with Lipodystrophy." AIDS (London, England) 16 (18): 2419–24.

El Hadri, Khadija, Martine Glorian, Christelle Monsempes, Marie-Noëlle Dieudonné, René Pecquery, Yves Giudicelli, Marise Andreani, Isabelle Dugail, and Bruno Fève. 2004. "In Vitro Suppression of the Lipogenic Pathway by the Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Efavirenz in 3T3 and Human Preadipocytes or Adipocytes." The Journal of Biological Chemistry 279 (15): 15130–41. doi:10.1074/jbc.M312875200.

Else, Laura J., Stephen Taylor, David J. Back, and Saye H. Khoo. 2011. "Pharmacokinetics of Antiretroviral Drugs in Anatomical Sanctuary Sites: The Male and Female Genital Tract." Antiviral Therapy 16 (8): 1149–67. doi:10.3851/IMP1919.

Emilie, D., M. Peuchmaur, M. C. Maillot, M. C. Crevon, N. Brousse, J. F. Delfraissy, J. Dormont, and P. Galanaud. 1990. "Production of Interleukins in Human Immunodeficiency Virus-1-Replicating Lymph Nodes." The Journal of Clinical Investigation 86 (1): 148–59. doi:10.1172/JCI114678.

Eriksson, Susanne, Erin H. Graf, Viktor Dahl, Matthew C. Strain, Steven A. Yukl, Elena S. Lysenko, Ronald J. Bosch, et al. 2013. "Comparative Analysis of Measures of Viral Reservoirs in HIV-1 Eradication Studies." PLoS Pathogens 9 (2): e1003174. doi:10.1371/journal.ppat.1003174.

Estes, Jacob D., Qingsheng Li, Matthew R. Reynolds, Stephen Wietgrefe, Lijie Duan, Timothy Schacker, Louis J. Picker, et al. 2006. "Premature Induction of an Immunosuppressive Regulatory T Cell Response during Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection." The Journal of Infectious Diseases 193 (5): 703–12. doi:10.1086/500368.

Estes, Jacob D., Tyler C. Thacker, Denise L. Hampton, Sariah A. Kell, Brandon F. Keele, Emily A. Palenske, Kirk M. Druey, and Gregory F. Burton. 2004. "Follicular Dendritic Cell Regulation of CXCR4-Mediated Germinal Center CD4 T Cell Migration." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 173 (10): 6169–78.

Esteve Ràfols, Montserrat. n.d. "Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity." Endocrinología y Nutrición (English Edition), 100–112. doi:10.1016/j.endoen.2014.02.001.

Eugenin, Eliseo A., and Joan W. Berman. 2013. "Cytochrome c Dysregulation Induced by HIV Infection of Astrocytes Results in Bystander Apoptosis of Uninfected Astrocytes by an IP3 and Calcium-Dependent Mechanism." Journal of Neurochemistry 127 (5): 644–51. doi:10.1111/jnc.12443.

Fabre-Mersseman, Véronique, Jacques Dutrieux, Anne Louise, Sandra Rozlan, Aurélia Lamine, Raphaëlle Parker, Magali Rancez, et al. 2011. "$CD4^+$ Recent Thymic Emigrants Are Infected by HIV in Vivo, Implication for Pathogenesis." AIDS (London, England) 25 (9): 1153–62. doi:10.1097/QAD.0b013e3283471e89.

Fain, John N. 2010a. "Release of Inflammatory Mediators by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily by the Nonfat Cells: A Review." Mediators of Inflammation 2010: 513948. doi:10.1155/2010/513948.

Fain, John N. 2010b. "Release of Inflammatory Mediators by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily by the Nonfat Cells: A Review." Mediators of Inflammation 2010 (January): 513948. doi:10.1155/2010/513948.

Fain, John N, Atul K Madan, M Lloyd Hiler, Paramjeet Cheema, and Suleiman W Bahouth. 2004. "Comparison of the Release of Adipokines by Adipose Tissue, Adipose Tissue Matrix, and Adipocytes from Visceral and Subcutaneous Abdominal Adipose Tissues of Obese Humans." Endocrinology 145 (5): 2273–82. doi:10.1210/en.2003-1336.

Fantuzzi, Giamila. 2005. "Adipose Tissue, Adipokines, and Inflammation." The Journal of Allergy and Clinical Immunology 115 (5): 911–919; quiz 920. doi:10.1016/j.jaci.2005.02.023.

Faust, I. M., P. R. Johnson, J. S. Stern, and J. Hirsch. 1978. "Diet-Induced Adipocyte Number Increase in Adult Rats: A New Model of Obesity." The American Journal of Physiology 235 (3): E279-286.

Favre, David, Sharon Lederer, Bittoo Kanwar, Zhong-Min Ma, Sean Proll, Zeljka Kasakow, Jeff Mold, et al. 2009. "Critical Loss of the Balance between Th17 and T Regulatory Cell Populations in Pathogenic SIV Infection." PLoS Pathogens 5 (2): e1000295. doi:10.1371/journal.ppat.1000295.

Feuerer, Markus, Laura Herrero, Daniela Cipolletta, Afia Naaz, Jamie Wong, Ali Nayer, Jongsoon Lee, et al. 2009. "Lean, but Not Obese, Fat Is Enriched for a Unique Population of Regulatory T Cells That Affect Metabolic Parameters." Nature Medicine 15 (8): 930–39. doi:10.1038/nm.2002.

Février, Michèle, Karim Dorgham, and Angelita Rebollo. 2011. "CD4+ T Cell Depletion in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection: Role of Apoptosis." Viruses 3 (5): 586–612. doi:10.3390/v3050586.

Finkel, T. H., G. Tudor-Williams, N. K. Banda, M. F. Cotton, T. Curiel, C. Monks, T. W. Baba, R. M. Ruprecht, and A. Kupfer. 1995. "Apoptosis Occurs Predominantly in Bystander

Cells and Not in Productively Infected Cells of HIV- and SIV-Infected Lymph Nodes." Nature Medicine 1 (2): 129–34.

Finzi, D., J. Blankson, J. D. Siliciano, J. B. Margolick, K. Chadwick, T. Pierson, K. Smith, et al. 1999. "Latent Infection of CD4+ T Cells Provides a Mechanism for Lifelong Persistence of HIV-1, Even in Patients on Effective Combination Therapy." Nature Medicine 5 (5): 512–17. doi:10.1038/8394.

Fletcher, Courtney V., Kathryn Staskus, Stephen W. Wietgrefe, Meghan Rothenberger, Cavan Reilly, Jeffrey G. Chipman, Greg J. Beilman, et al. 2014. "Persistent HIV-1 Replication Is Associated with Lower Antiretroviral Drug Concentrations in Lymphatic Tissues." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111 (6): 2307–12. doi:10.1073/pnas.1318249111.

Franke-Fayard, Blandine, Chris J. Janse, Margarida Cunha-Rodrigues, Jai Ramesar, Philippe Büscher, Ivo Que, Clemens Löwik, et al. 2005. "Murine Malaria Parasite Sequestration: CD36 Is the Major Receptor, but Cerebral Pathology Is Unlinked to Sequestration." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (32): 11468–73. doi:10.1073/pnas.0503386102.

Frayn, K. N. 2002. "Adipose Tissue as a Buffer for Daily Lipid Flux." Diabetologia 45 (9): 1201–10. doi:10.1007/s00125-002-0873-y.

Freiberg, Matthew S., Chung-Chou H. Chang, Lewis H. Kuller, Melissa Skanderson, Elliott Lowy, Kevin L. Kraemer, Adeel A. Butt, et al. 2013. "HIV Infection and the Risk of Acute Myocardial Infarction." JAMA Internal Medicine 173 (8): 614–22. doi:10.1001/jamainternmed.2013.3728.

French, Martyn A, Martin S King, Jean M Tschampa, Barbara A da Silva, and Alan L Landay. 2009. "Serum Immune Activation Markers Are Persistently Increased in Patients with HIV Infection after 6 Years of Antiretroviral Therapy despite Suppression of Viral Replication and Reconstitution of CD4+ T Cells." The Journal of Infectious Diseases 200 (8): 1212–15. doi:10.1086/605890.

Friguls, B., W. Coroleu, R. del Alcazar, P. Hilbert, L. Van Maldergem, and G. Pintos-Morell. 2009. "Severe Cardiac Phenotype of Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy in an Infant with Homozygous E189X BSCL2 Mutation." European Journal of Medical Genetics 52 (1): 14–16. doi:10.1016/j.ejmg.2008.10.006.

Friis-Møller, Nina, Rainer Weber, Peter Reiss, Rodolphe Thiébaut, Ole Kirk, Antonella d'Arminio Monforte, Christian Pradier, et al. 2003. "Cardiovascular Disease Risk Factors in HIV Patients--Association with Antiretroviral Therapy. Results from the DAD Study." AIDS (London, England) 17 (8): 1179–93. doi:10.1097/01.aids.0000060358.78202.c1.

Fuente-Martín, Esther, Pilar Argente-Arizón, Purificación Ros, Jesús Argente, and Julie A Chowen. 2013. "Sex Differences in Adipose Tissue: It Is Not Only a Question of Quantity and Distribution." Adipocyte 2 (3): 128–34. doi:10.4161/adip.24075.

Fukazawa, Yoshinori, Richard Lum, Afam A. Okoye, Haesun Park, Kenta Matsuda, Jin Young Bae, Shoko I. Hagen, et al. 2015. "B Cell Follicle Sanctuary Permits Persistent Productive Simian Immunodeficiency Virus Infection in Elite Controllers." Nature Medicine 21 (2): 132–39. doi:10.1038/nm.3781.

Fukazawa, Yoshinori, Haesun Park, Mark J. Cameron, Francois Lefebvre, Richard Lum, Noel Coombes, Eisa Mahyari, et al. 2012. "Lymph Node T Cell Responses Predict the Efficacy of Live Attenuated SIV Vaccines." Nature Medicine 18 (11): 1673–81. doi:10.1038/nm.2934.

Fuller, R., and D. J. Jayne-Williams. 1970. "Resistance of the Fowl (Gallus Domesticus) to Invasion by Its Intestinal Flora. II. Clearance of Translocated Intestinal Bacteria." Research in Veterinary Science 11 (4): 368–74.

Gallant, Joel E., Schlomo Staszewski, Anton L. Pozniak, Edwin DeJesus, Jamal M. A. H. Suleiman, Michael D. Miller, Dion F. Coakley, et al. 2004. "Efficacy and Safety of

Tenofovir DF vs Stavudine in Combination Therapy in Antiretroviral-Naive Patients: A 3-Year Randomized Trial." JAMA 292 (2): 191–201. doi:10.1001/jama.292.2.191.

Galli, Stephen J., Janet Kalesnikoff, Michele A. Grimbaldeston, Adrian M. Piliponsky, Cara M. M. Williams, and Mindy Tsai. 2005. "Mast Cells As 'tunable' effector and Immunoregulatory Cells: Recent Advances." Annual Review of Immunology 23: 749–86. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141025.

Gattinoni, Luca, Enrico Lugli, Yun Ji, Zoltan Pos, Chrystal M. Paulos, Máire F. Quigley, Jorge R. Almeida, et al. 2011. "A Human Memory T Cell Subset with Stem Cell-like Properties." Nature Medicine 17 (10): 1290–97. doi:10.1038/nm.2446.

Gavegnano, Christina, and Raymond F. Schinazi. 2009. "Antiretroviral Therapy in Macrophages: Implication for HIV Eradication." Antiviral Chemistry & Chemotherapy 20 (2): 63–78. doi:10.3851/IMP1374.

Gendelman, H. E., J. M. Orenstein, M. A. Martin, C. Ferrua, R. Mitra, T. Phipps, L. A. Wahl, H. C. Lane, A. S. Fauci, and D. S. Burke. 1988. "Efficient Isolation and Propagation of Human Immunodeficiency Virus on Recombinant Colony-Stimulating Factor 1-Treated Monocytes." The Journal of Experimental Medicine 167 (4): 1428–41.

Gianella, Sara, Matthew C. Strain, Steffney E. Rought, Milenka V. Vargas, Susan J. Little, Douglas D. Richman, Celsa A. Spina, and Davey M. Smith. 2012. "Associations between Virologic and Immunologic Dynamics in Blood and in the Male Genital Tract." Journal of Virology 86 (3): 1307–15. doi:10.1128/JVI.06077-11.

Giorgi, J. V., and R. Detels. 1989. "T-Cell Subset Alterations in HIV-Infected Homosexual Men: NIAID Multicenter AIDS Cohort Study." Clinical Immunology and Immunopathology 52 (1): 10–18.

Giorgi, J. V., L. E. Hultin, J. A. McKeating, T. D. Johnson, B. Owens, L. P. Jacobson, R. Shih, et al. 1999. "Shorter Survival in Advanced Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection Is More Closely Associated with T Lymphocyte Activation than with Plasma Virus Burden or Virus Chemokine Coreceptor Usage." The Journal of Infectious Diseases 179 (4): 859–70. doi:10.1086/314660.

Giorgi, J. V., Z. Liu, L. E. Hultin, W. G. Cumberland, K. Hennessey, and R. Detels. 1993. "Elevated Levels of CD38+ CD8+ T Cells in HIV Infection Add to the Prognostic Value of Low CD4+ T Cell Levels: Results of 6 Years of Follow-Up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes 6 (8): 904–12.

Giorgi, Janis V., Robert H. Lyles, Jose L. Matud, Traci E. Yamashita, John W. Mellors, Lance E. Hultin, Beth D. Jamieson, et al. 2002. "Predictive Value of Immunologic and Virologic Markers after Long or Short Duration of HIV-1 Infection." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999) 29 (4): 346–55.

Giralt, Marta, Pere Domingo, Jordi P. Guallar, M. Luísa Rodriguez de la Concepción, Marta Alegre, Joan C. Domingo, and Francesc Villarroya. 2006. "HIV-1 Infection Alters Gene Expression in Adipose Tissue, Which Contributes to HIV- 1/HAART-Associated Lipodystrophy." Antiviral Therapy 11 (6): 729–40.

Giralt, Marta, Pere Domingo, and Francesc Villarroya. 2011a. "Adipose Tissue Biology and HIV-Infection." Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism 25 (3): 487–99. doi:10.1016/j.beem.2010.12.001.

Gonzalez, Veronica D., Karolin Falconer, Kim G. Blom, Olle Reichard, Birgitte Mørn, Alex Lund Laursen, Nina Weis, Annette Alaeus, and Johan K. Sandberg. 2009. "High Levels of Chronic Immune Activation in the T-Cell Compartments of Patients Coinfected with Hepatitis C Virus and Human Immunodeficiency Virus Type 1 and on Highly Active Antiretroviral Therapy Are Reverted by Alpha Interferon and Ribavirin Treatment." Journal of Virology 83 (21): 11407–11. doi:10.1128/JVI.01211-09.

Gordon, Shari N., Nichole R. Klatt, Steven E. Bosinger, Jason M. Brenchley, Jeffrey M. Milush, Jessica C. Engram, Richard M. Dunham, et al. 2007. "Severe Depletion of Mucosal CD4+ T Cells in AIDS-Free Simian Immunodeficiency Virus-Infected Sooty Mangabeys." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 179 (5): 3026–34.

Gordon, Siamon, and Philip R Taylor. 2005. "Monocyte and Macrophage Heterogeneity." Nature Reviews. Immunology 5 (12): 953–64. doi:10.1038/nri1733.

Grinspoon, Steven, and Andrew Carr. 2005. "Cardiovascular Risk and Body-Fat Abnormalities in HIV-Infected Adults." New England Journal of Medicine 352 (1): 48–62. doi:10.1056/NEJMra041811.

Groot, Fedde, Sonja Welsch, and Quentin J. Sattentau. 2008. "Efficient HIV-1 Transmission from Macrophages to T Cells across Transient Virological Synapses." Blood 111 (9): 4660–63. doi:10.1182/blood-2007-12-130070.

Groux, H., G. Torpier, D. Monté, Y. Mouton, A. Capron, and J. C. Ameisen. 1992. "Activation-Induced Death by Apoptosis in CD4+ T Cells from Human Immunodeficiency Virus-Infected Asymptomatic Individuals." The Journal of Experimental Medicine 175 (2): 331–40.

Grunfeld, C., D. P. Kotler, J. K. Shigenaga, W. Doerrler, A. Tierney, J. Wang, R. N. Pierson, and K. R. Feingold. 1991. "Circulating Interferon-Alpha Levels and Hypertriglyceridemia in the Acquired Immunodeficiency Syndrome." The American Journal of Medicine 90 (2): 154–62.

Guadalupe, Moraima, Elizabeth Reay, Sumathi Sankaran, Thomas Prindiville, Jason Flamm, Andrew McNeil, and Satya Dandekar. 2003. "Severe CD4+ T-Cell Depletion in Gut Lymphoid Tissue during Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Substantial Delay in Restoration Following Highly Active Antiretroviral Therapy." Journal of Virology 77 (21): 11708–17.

Guaraldi, Giovanni, Stefania Cocchi, Alice Motta, Sara Ciaffi, Mauro Codeluppi, Stefano Bonora, Fabrizio Di Benedetto, et al. 2008. "A Pilot Study on the Efficacy, Pharmacokinetics and Safety of Atazanavir in Patients with End-Stage Liver Disease." The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 62 (6): 1356–64. doi:10.1093/jac/dkn383.

Hadigan, C., J. B. Meigs, C. Corcoran, P. Rietschel, S. Piecuch, N. Basgoz, B. Davis, et al. 2001. "Metabolic Abnormalities and Cardiovascular Disease Risk Factors in Adults with Human Immunodeficiency Virus Infection and Lipodystrophy." Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America 32 (1): 130–39. doi:10.1086/317541.

Halberg, Nils, Tayeba Khan, Maria E. Trujillo, Ingrid Wernstedt-Asterholm, Alan D. Attie, Shariq Sherwani, Zhao V. Wang, et al. 2009. "Hypoxia-Inducible Factor 1alpha Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue." Molecular and Cellular Biology 29 (16): 4467–83. doi:10.1128/MCB.00192-09.

Hasegawa, Atsuhiko, Huining Liu, Binhua Ling, Juan T. Borda, Xavier Alvarez, Chie Sugimoto, Heather Vinet-Oliphant, et al. 2009. "The Level of Monocyte Turnover Predicts Disease Progression in the Macaque Model of AIDS." Blood 114 (14): 2917–25. doi:10.1182/blood-2009-02-204263.

Hatano, Hiroyu, Ma Somsouk, Elizabeth Sinclair, Kara Harvill, Lee Gilman, Michelle Cohen, Rebecca Hoh, et al. 2013. "Comparison of HIV DNA and RNA in Gut-Associated Lymphoid Tissue of HIV-Infected Controllers and Noncontrollers." AIDS (London, England) 27 (14): 2255–60. doi:10.1097/QAD.0b013e328362692f.

Hattab, S, M Guiguet, G Carcelain, S Fourati, A Guihot, B Autran, F Caby, A-G Marcelin, D Costagliola, and C Katlama. 2015. "Soluble Biomarkers of Immune Activation and Inflammation in HIV Infection: Impact of 2 Years of Effective First-Line Combination Antiretroviral Therapy." HIV Medicine 16 (9): 553–62. doi:10.1111/hiv.12257.

Hazan, Uriel, Ignacio A Romero, Raffaella Cancello, Susana Valente, Virginie Perrin, Virginie Mariot, Julie Dumonceaux, et al. 2002. "Human Adipose Cells Express CD4, CXCR4, and CCR5 [Corrected] Receptors: A New Target Cell Type for the Immunodeficiency Virus-1?" FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 16 (10): 1254–56. doi:10.1096/fj.01-0947fje.

Hazenberg, Mette D., Sigrid A. Otto, Birgit H. B. van Benthem, Marijke Th L. Roos, Roel A. Coutinho, Joep M. A. Lange, Dörte Hamann, Maria Prins, and Frank Miedema. 2003. "Persistent Immune Activation in HIV-1 Infection Is Associated with Progression to AIDS." AIDS (London, England) 17 (13): 1881–88. doi:10.1097/01.aids.0000076311.76477.6e.

Heinrich, P. C., J. V. Castell, and T. Andus. 1990. "Interleukin-6 and the Acute Phase Response." The Biochemical Journal 265 (3): 621–36.

Hellerstein, M. K., C. Grunfeld, K. Wu, M. Christiansen, S. Kaempfer, C. Kletke, and C. H. Shackleton. 1993. "Increased de Novo Hepatic Lipogenesis in Human Immunodeficiency Virus Infection." The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 76 (3): 559–65. doi:10.1210/jcem.76.3.8445011.

Hellerstein, Marc K., Rebecca A. Hoh, Mary Beth Hanley, Denise Cesar, Daniel Lee, Richard A. Neese, and Joseph M. McCune. 2003. "Subpopulations of Long-Lived and Short-Lived T Cells in Advanced HIV-1 Infection." The Journal of Clinical Investigation 112 (6): 956–66. doi:10.1172/JCI17533.

Herbein, G., U. Mahlknecht, F. Batliwalla, P. Gregersen, T. Pappas, J. Butler, W. A. O'Brien, and E. Verdin. 1998. "Apoptosis of CD8+ T Cells Is Mediated by Macrophages through Interaction of HIV gp120 with Chemokine Receptor CXCR4." Nature 395 (6698): 189–94. doi:10.1038/26026.

Hernandez-Vallejo, Sandra J., Carine Beaupere, Jerome Larghero, Jacqueline Capeau, and Claire Lagathu. 2013. "HIV Protease Inhibitors Induce Senescence and Alter Osteoblastic Potential of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Beneficial Effect of Pravastatin." Aging Cell 12 (6): 955–65. doi:10.1111/acel.12119.

Higashino, Atsunori, Ryuichi Sakate, Yosuke Kameoka, Ichiro Takahashi, Makoto Hirata, Reiko Tanuma, Tohru Masui, Yasuhiro Yasutomi, and Naoki Osada. 2012. "Whole-Genome Sequencing and Analysis of the Malaysian Cynomolgus Macaque (Macaca Fascicularis) Genome." Genome Biology 13 (7): R58. doi:10.1186/gb-2012-13-7-r58.

Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R. H. Purcell, and P. R. Johnson. 1989. "An African Primate Lentivirus (SIVsm) Closely Related to HIV-2." Nature 339 (6223): 389–92. doi:10.1038/339389a0.

Hladik, Florian, Polachai Sakchalathorn, Lamar Ballweber, Gretchen Lentz, Michael Fialkow, David Eschenbach, and M. Juliana McElrath. 2007. "Initial Events in Establishing Vaginal Entry and Infection by Human Immunodeficiency Virus Type-1." Immunity 26 (2): 257–70. doi:10.1016/j.immuni.2007.01.007.

Ho, D. D., T. R. Rota, and M. S. Hirsch. 1986. "Infection of Monocyte/Macrophages by Human T Lymphotropic Virus Type III." The Journal of Clinical Investigation 77 (5): 1712–15. doi:10.1172/JCI112491.

Hofbauer, K. G., and J. R. Nicholson. 2006. "Pharmacotherapy of Obesity." Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association 114 (9): 475–84. doi:10.1055/s-2006-924241.

Horiike, Mariko, Shingo Iwami, Makoto Kodama, Akihiko Sato, Yuji Watanabe, Mika Yasui, Yuki Ishida, Takeshi Kobayashi, Tomoyuki Miura, and Tatsuhiko Igarashi. 2012. "Lymph Nodes Harbor Viral Reservoirs That Cause Rebound of Plasma Viremia in SIV-Infected Macaques upon Cessation of Combined Antiretroviral Therapy." Virology 423 (2): 107–18. doi:10.1016/j.virol.2011.11.024.

Hotamisligil, G S, N S Shargill, and B M Spiegelman. 1993. “Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor-Alpha: Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance.” Science (New York, N.Y.) 259 (5091): 87–91.

Hotamisligil, Gökhan S. 2006. “Inflammation and Metabolic Disorders.” Nature 444 (7121): 860–67. doi:10.1038/nature05485.

Huang, Weitao, Li Na, Paul L. Fidel, and Paul Schwarzenberger. 2004. “Requirement of Interleukin-17A for Systemic Anti-Candida Albicans Host Defense in Mice.” The Journal of Infectious Diseases 190 (3): 624–31. doi:10.1086/422329.

Huh, Jin Young, Jeu Park, Jong In Kim, Yoon Jeong Park, Yun Kyung Lee, and Jae Bum Kim. 2017. “Deletion of CD1d in Adipocytes Aggravates Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in Obesity.” Diabetes 66 (4): 835–47. doi:10.2337/db16-1122.

Hunt, Peter W. 2017. “Very Early ART and Persistent Inflammation in Treated HIV.” Clinical Infectious Diseases 64 (2): 132–33. doi:10.1093/cid/ciw697.

Hunt, Peter W., Jason Brenchley, Elizabeth Sinclair, Joseph M. McCune, Michelle Roland, Kimberly Page-Shafer, Priscilla Hsue, et al. 2008. “Relationship between T Cell Activation and CD4+ T Cell Count in HIV-Seropositive Individuals with Undetectable Plasma HIV RNA Levels in the Absence of Therapy.” The Journal of Infectious Diseases 197 (1): 126–33. doi:10.1086/524143.

Hunt, Peter W., Sulggi A. Lee, and Mark J. Siedner. 2016. “Immunologic Biomarkers, Morbidity, and Mortality in Treated HIV Infection.” Journal of Infectious Diseases 214 (suppl 2): S44–50. doi:10.1093/infdis/jiw275.

Hunt, Peter W., Jeffrey N. Martin, Elizabeth Sinclair, Barry Bredt, Elilta Hagos, Harry Lampiris, and Steven G. Deeks. 2003. “T Cell Activation Is Associated with Lower CD4+ T Cell Gains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Sustained Viral Suppression during Antiretroviral Therapy.” The Journal of Infectious Diseases 187 (10): 1534–43. doi:10.1086/374786.

Ibrahim, M M. 2010. “Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Structural and Functional Differences.” Obes Rev 11 (1): 11–18.

International AIDS Society Scientific Working Group on HIV Cure, Steven G. Deeks, Brigitte Autran, Ben Berkhout, Monsef Benkirane, Scott Cairns, Nicolas Chomont, et al. 2012. “Towards an HIV Cure: A Global Scientific Strategy.” Nature Reviews. Immunology 12 (8): 607–14. doi:10.1038/nri3262.

Iyasere, Christiana, John C. Tilton, Alison J. Johnson, Souheil Younes, Bader Yassine-Diab, Rafick-Pierre Sekaly, William W. Kwok, et al. 2003. “Diminished Proliferation of Human Immunodeficiency Virus-Specific CD4+ T Cells Is Associated with Diminished Interleukin-2 (IL-2) Production and Is Recovered by Exogenous IL-2.” Journal of Virology 77 (20): 10900–909.

Jaafoura, S., M. G. de Goër de Herve, E. A. Hernandez-Vargas, H. Hendel-Chavez, M. Abdoh, M. C. Mateo, R. Krzysiek, et al. 2014. “Progressive Contraction of the Latent HIV Reservoir around a Core of Less-Differentiated $CD4^+$ Memory T Cells.” Nature Communications 5: 5407. doi:10.1038/ncomms6407.

Jacobson, Denise L., Tamsin Knox, Donna Spiegelman, Sally Skinner, Sherwood Gorbach, and Christine Wanke. 2005. “Prevalence Of, Evolution Of, and Risk Factors for Fat Atrophy and Fat Deposition in a Cohort of HIV-Infected Men and Women.” Clinical Infectious Diseases 40 (12): 1837–45. doi:10.1086/430379.

Janiszewski, Peter M., Robert Ross, Jean-Pierre Despres, Isabelle Lemieux, Gabriella Orlando, Federica Carli, Pietro Bagni, Marianna Menozzi, Stefano Zona, and Giovanni Guaraldi. 2011. “Hypertriglyceridemia and Waist Circumference Predict Cardiovascular Risk among HIV Patients: A Cross-Sectional Study.” PloS One 6 (9): e25032. doi:10.1371/journal.pone.0025032.

Jiang, Erlie, Xiaoyuan Dai Perrard, Donglin Yang, Ilvira M. Khan, Jerry L. Perrard, C. Wayne Smith, Christie M. Ballantyne, and Huaizhu Wu. 2014. "Essential Role of CD11a in CD8+ T-Cell Accumulation and Activation in Adipose Tissue." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 34 (1): 34–43. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302077.

Jo, Junghyo, Oksana Gavrilova, Stephanie Pack, William Jou, Shawn Mullen, Anne E. Sumner, Samuel W. Cushman, and Vipul Periwal. 2009. "Hypertrophy And/Or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth." PLoS Computational Biology 5 (3). doi:10.1371/journal.pcbi.1000324.

Johansson-Lindbom, Bengt, Marcus Svensson, Marc-André Wurbel, Bernard Malissen, Gabriel Márquez, and William Agace. 2003. "Selective Generation of Gut Tropic T Cells in Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT): Requirement for GALT Dendritic Cells and Adjuvant." The Journal of Experimental Medicine 198 (6): 963–69. doi:10.1084/jem.20031244.

Jones, Clara Y., Joseph W. Hogan, Brad Snyder, Robert S. Klein, Anne Rompalo, Paula Schuman, Charles C. Carpenter, and HIV Epidemiology Research Study Group. 2003. "Overweight and Human Immunodeficiency Virus (HIV) Progression in Women: Associations HIV Disease Progression and Changes in Body Mass Index in Women in the HIV Epidemiology Research Study Cohort." Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America 37 Suppl 2: S69-80. doi:10.1086/375889.

Jones, Simon P., Catriona Waitt, Robert Sutton, David J. Back, and Munir Pirmohamed. 2008. "Effect of Atazanavir and Ritonavir on the Differentiation and Adipokine Secretion of Human Subcutaneous and Omental Preadipocytes." AIDS (London, England) 22 (11): 1293–98. doi:10.1097/QAD.0b013e3283021a4f.

Joos, Beda, Marek Fischer, Herbert Kuster, Satish K. Pillai, Joseph K. Wong, Jürg Böni, Bernard Hirschel, et al. 2008. "HIV Rebounds from Latently Infected Cells, rather than from Continuing Low-Level Replication." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105 (43): 16725–30. doi:10.1073/pnas.0804192105.

Josefsson, Lina, Martin S. King, Barbro Makitalo, Johan Brännström, Wei Shao, Frank Maldarelli, Mary F. Kearney, et al. 2011. "Majority of CD4+ T Cells from Peripheral Blood of HIV-1-Infected Individuals Contain Only One HIV DNA Molecule." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108 (27): 11199–204. doi:10.1073/pnas.1107729108.

Joy, Tisha, Hester M. Keogh, Colleen Hadigan, Hang Lee, Sara E. Dolan, Kathleen Fitch, James Liebau, et al. 2007. "Dietary Fat Intake and Relationship to Serum Lipid Levels in HIV-Infected Patients with Metabolic Abnormalities in the HAART Era." AIDS (London, England) 21 (12): 1591–1600. doi:10.1097/QAD.0b013e32823644ff.

Justice, A. C., M. S. Freiberg, R. Tracy, L. Kuller, J. P. Tate, M. B. Goetz, D. A. Fiellin, et al. 2012. "Does an Index Composed of Clinical Data Reflect Effects of Inflammation, Coagulation, and Monocyte Activation on Mortality Among Those Aging With HIV?" Clinical Infectious Diseases 54 (7): 984–94. doi:10.1093/cid/cir989.

Kahn, Steven E., Rebecca L. Hull, and Kristina M. Utzschneider. 2006. "Mechanisms Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes." Nature 444 (7121): 840–46. doi:10.1038/nature05482.

Kao, Cheng-Yuan, Yin Chen, Philip Thai, Shinichiro Wachi, Fei Huang, Christy Kim, Richart W. Harper, and Reen Wu. 2004. "IL-17 Markedly up-Regulates Beta-Defensin-2 Expression in Human Airway Epithelium via JAK and NF-kappaB Signaling Pathways." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 173 (5): 3482–91.

Kauder, Steven E., Alberto Bosque, Annica Lindqvist, Vicente Planelles, and Eric Verdin. 2009. "Epigenetic Regulation of HIV-1 Latency by Cytosine Methylation." PLoS Pathogens 5 (6): e1000495. doi:10.1371/journal.ppat.1000495.

Kaufmann, Daniel E., Daniel G. Kavanagh, Florencia Pereyra, John J. Zaunders, Elizabeth W. Mackey, Toshiyuki Miura, Sarah Palmer, et al. 2007. "Upregulation of CTLA-4 by HIV-Specific CD4+ T Cells Correlates with Disease Progression and Defines a Reversible Immune Dysfunction." Nature Immunology 8 (11): 1246–54. doi:10.1038/ni1515.

Kaul, M., G. A. Garden, and S. A. Lipton. 2001. "Pathways to Neuronal Injury and Apoptosis in HIV-Associated Dementia." Nature 410 (6831): 988–94. doi:10.1038/35073667.

Kaul, R., C. Pettengell, P. M. Sheth, S. Sunderji, A. Biringer, K. MacDonald, S. Walmsley, and A. Rebbapragada. 2008. "The Genital Tract Immune Milieu: An Important Determinant of HIV Susceptibility and Secondary Transmission." Journal of Reproductive Immunology 77 (1): 32–40. doi:10.1016/j.jri.2007.02.002.

Kelly, Jeremy, Margaret H. Beddall, Dongyang Yu, Subashini R. Iyer, Jon W. Marsh, and Yuntao Wu. 2008. "Human Macrophages Support Persistent Transcription from Unintegrated HIV-1 DNA." Virology 372 (2): 300–312. doi:10.1016/j.virol.2007.11.007.

Kim, Roy J., Camella G. Wilson, Martin Wabitsch, Mitchell A. Lazar, and Claire M. Steppan. 2006. "HIV Protease Inhibitor-Specific Alterations in Human Adipocyte Differentiation and Metabolism." Obesity (Silver Spring, Md.) 14 (6): 994–1002. doi:10.1038/oby.2006.114.

Kirkland, J. L., C. H. Hollenberg, S. Kindler, and W. S. Gillon. 1994. "Effects of Age and Anatomic Site on Preadipocyte Number in Rat Fat Depots." Journal of Gerontology 49 (1): B31-35.

Klatt, N. R., J. D. Estes, X. Sun, A. M. Ortiz, J. S. Barber, L. D. Harris, B. Cervasi, et al. 2012. "Loss of Mucosal CD103+ DCs and IL-17+ and IL-22+ Lymphocytes Is Associated with Mucosal Damage in SIV Infection." Mucosal Immunology 5 (6): 646–57. doi:10.1038/mi.2012.38.

Klatt, Nichole R., and Jason M. Brenchley. 2010. "Th17 Cell Dynamics in HIV Infection." Current Opinion in HIV and AIDS 5 (2): 135–40. doi:10.1097/COH.0b013e3283364846.

Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier. 1984. "T-Lymphocyte T4 Molecule Behaves as the Receptor for Human Retrovirus LAV." Nature 312 (5996): 767–68.

Klenerman, Paul, and Ann Hill. 2005. "T Cells and Viral Persistence: Lessons from Diverse Infections." Nature Immunology 6 (9): 873–79. doi:10.1038/ni1241.

Koethe, John R., Kevin Dee, Aihua Bian, Ayumi Shintani, Megan Turner, Sally Bebawy, Timothy R. Sterling, and Todd Hulgan. 2013. "Circulating Interleukin-6, Soluble CD14, and Other Inflammation Biomarker Levels Differ between Obese and Nonobese HIV-Infected Adults on Antiretroviral Therapy." AIDS Research and Human Retroviruses 29 (7): 1019–25. doi:10.1089/aid.2013.0016.

Kök, A., L. Hocqueloux, H. Hocini, M. Carrière, L. Lefrou, A. Guguin, P. Tisserand, et al. 2015. "Early Initiation of Combined Antiretroviral Therapy Preserves Immune Function in the Gut of HIV-Infected Patients." Mucosal Immunology 8 (1): 127–40. doi:10.1038/mi.2014.50.

Kolls, Jay K., and Anders Lindén. 2004. "Interleukin-17 Family Members and Inflammation." Immunity 21 (4): 467–76. doi:10.1016/j.immuni.2004.08.018.

Kopp, Andrea, Christa Buechler, Markus Neumeier, Johanna Weigert, Charalampos Aslanidis, Juergen Schölmerich, and Andreas Schäffler. 2009. "Innate Immunity and Adipocyte Function: Ligand-Specific Activation of Multiple Toll-like Receptors Modulates Cytokine, Adipokine, and Chemokine Secretion in Adipocytes." Obesity (Silver Spring, Md.) 17 (4): 648–56. doi:10.1038/oby.2008.607.

Koppensteiner, Herwig, Ruth Brack-Werner, and Michael Schindler. 2012. "Macrophages and Their Relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I Infection." Retrovirology 9: 82. doi:10.1186/1742-4690-9-82.

Kosteli, Aliki, Eiji Sugaru, Guenter Haemmerle, Jayne F. Martin, Jason Lei, Rudolf Zechner, and Anthony W. Ferrante. 2010. “Weight Loss and Lipolysis Promote a Dynamic Immune Response in Murine Adipose Tissue.” The Journal of Clinical Investigation 120 (10): 3466–79. doi:10.1172/JCI42845.

Kovacs, A., S. S. Wasserman, D. Burns, D. J. Wright, J. Cohn, A. Landay, K. Weber, et al. 2001. “Determinants of HIV-1 Shedding in the Genital Tract of Women.” Lancet (London, England) 358 (9293): 1593–1601. doi:10.1016/S0140-6736(01)06653-3.

Kovacs, Andrea, Lena Al-Harthi, Shawna Christensen, Wendy Mack, Mardge Cohen, and Alan Landay. 2008. “CD8(+) T Cell Activation in Women Coinfected with Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Hepatitis C Virus.” The Journal of Infectious Diseases 197 (10): 1402–7. doi:10.1086/587696.

Krastinova, Evguenia, Camille Lecuroux, Carole Leroy, Remonie Seng, Andre Cabie, Agathe Rami, Alain Venet, Laurence Meyer, and Cecile Goujard. 2015. “High Soluble CD14 Levels at Primary HIV-1 Infection Predict More Rapid Disease Progression.” The Journal of Infectious Diseases 212 (6): 909–13. doi:10.1093/infdis/jiv145.

Krebs, Kendall C., ZheYuan Jin, Richard Rudersdorf, Austin L. Hughes, and David H. O’Connor. 2005. “Unusually High Frequency MHC Class I Alleles in Mauritian Origin Cynomolgus Macaques.” Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 175 (8): 5230–39.

Krowka, J. F., D. P. Stites, S. Jain, K. S. Steimer, C. George-Nascimento, A. Gyenes, P. J. Barr, H. Hollander, A. R. Moss, and J. M. Homsy. 1989. “Lymphocyte Proliferative Responses to Human Immunodeficiency Virus Antigens in Vitro.” The Journal of Clinical Investigation 83 (4): 1198–1203. doi:10.1172/JCI114001.

Kuller, Lewis H, Russell Tracy, Waldo Belloso, Stephane De Wit, Fraser Drummond, H Clifford Lane, Bruno Ledergerber, et al. 2008. “Inflammatory and Coagulation Biomarkers and Mortality in Patients with HIV Infection.” PLoS Medicine 5 (10): 1496–1508. doi:10.1371/journal.pmed.0050203.

Kulpa, Deanna A., and Nicolas Chomont. 2015. “HIV Persistence in the Setting of Antiretroviral Therapy: When, Where and How Does HIV Hide?” Journal of Virus Eradication 1 (2): 59–66.

Kumar, Amit, and Georges Herbein. 2014. “The Macrophage: A Therapeutic Target in HIV-1 Infection.” Molecular and Cellular Therapies 2 (April). doi:10.1186/2052-8426-2-10.

Lackner, A. A., Michael M. Lederman, and Benigno Rodriguez. 2012. “HIV Pathogenesis: The Host.” Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 2 (9). doi:10.1101/cshperspect.a007005.

Lafontan, Max, and Dominique Langin. 2009. “Lipolysis and Lipid Mobilization in Human Adipose Tissue.” Progress in Lipid Research 48 (5): 275–97. doi:10.1016/j.plipres.2009.05.001.

Lagathu, Claire, Brenda Eustace, Matthieu Prot, Dan Frantz, Yong Gu, Jean-Philippe Bastard, Mustapha Maachi, et al. 2007. “Some HIV Antiretrovirals Increase Oxidative Stress and Alter Chemokine, Cytokine or Adiponectin Production in Human Adipocytes and Macrophages.” Antiviral Therapy 12 (4): 489–500.

Laue, Tobias, Christiane D. Wrann, Birgit Hoffmann-Castendiek, Daniel Pietsch, Lena Hübner, and Heike Kielstein. 2015. “Altered NK Cell Function in Obese Healthy Humans.” BMC Obesity 2 (1): 1. doi:10.1186/s40608-014-0033-1.

Lautenbach, Anne, Christiane D. Wrann, Roland Jacobs, Guenter Müller, Georg Brabant, and Heike Nave. 2009. “Altered Phenotype of NK Cells From Obese Rats Can Be Normalized by Transfer Into Lean Animals.” Obesity 17 (10): 1848–55. doi:10.1038/oby.2009.140.

Le Douce, Valentin, Georges Herbein, Olivier Rohr, and Christian Schwartz. 2010. “Molecular Mechanisms of HIV-1 Persistence in the Monocyte-Macrophage Lineage.” Retrovirology 7: 32. doi:10.1186/1742-4690-7-32.

Leclercq, Pascale, Cecile Goujard, Martin Duracinsky, François Allaert, Marianne L'henaff, Maeva Hellet, Jean Pierre Meunier, et al. 2013. "High Prevalence and Impact on the Quality of Life of Facial Lipoatrophy and Other Abnormalities in Fat Tissue Distribution in HIV-Infected Patients Treated with Antiretroviral Therapy." AIDS Research and Human Retroviruses 29 (5): 761–68. doi:10.1089/aid.2012.0214.

Lederman, Michael M, Nicholas T Funderburg, Rafick P Sekaly, Nichole R Klatt, and Peter W Hunt. 2013. "Residual Immune Dysregulation Syndrome in Treated HIV Infection." Advances in Immunology 119: 51–83. doi:10.1016/B978-0-12-407707-2.00002-3.

Lee, Byung-Cheol, and Jongsoon Lee. 2014. "Cellular and Molecular Players in Adipose Tissue Inflammation in the Development of Obesity-Induced Insulin Resistance." Biochimica Et Biophysica Acta 1842 (3): 446–62. doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.017.

Lee, Mi-Jeong, Yuanyuan Wu, and Susan K. Fried. 2013. "Adipose Tissue Heterogeneity: Implication of Depot Differences in Adipose Tissue for Obesity Complications." Molecular Aspects of Medicine 34 (1): 1–11. doi:10.1016/j.mam.2012.10.001.

Lee, Yun Sok, Pingping Li, Jin Young Huh, In Jae Hwang, Min Lu, Jong In Kim, Mira Ham, et al. 2011. "Inflammation Is Necessary for Long-Term but Not Short-Term High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance." Diabetes 60 (10): 2474–83. doi:10.2337/db11-0194.

Leligdowicz, Aleksandra, Louis-Marie Yindom, Clayton Onyango, Ramu Sarge-Njie, Abraham Alabi, Matthew Cotten, Tim Vincent, et al. 2007. "Robust Gag-Specific T Cell Responses Characterize Viremia Control in HIV-2 Infection." The Journal of Clinical Investigation 117 (10): 3067–74. doi:10.1172/JCI32380.

Lemieux, Isabelle, Agnès Pascot, Denis Prud'homme, Natalie Alméras, Peter Bogaty, André Nadeau, Jean Bergeron, and Jean-Pierre Després. 2001. "Elevated C-Reactive Protein." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 21 (6): 961–67. doi:10.1161/01.ATV.21.6.961.

Lewin, Sharon R., John M. Murray, Ajantha Solomon, Fiona Wightman, Paul U. Cameron, Damian J. Purcell, John J. Zaunders, et al. 2008. "Virologic Determinants of Success after Structured Treatment Interruptions of Antiretrovirals in Acute HIV-1 Infection." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999) 47 (2): 140–47.

Ley, Ruth E., Fredrik Bäckhed, Peter Turnbaugh, Catherine A. Lozupone, Robin D. Knight, and Jeffrey I. Gordon. 2005. "Obesity Alters Gut Microbial Ecology." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (31): 11070–75. doi:10.1073/pnas.0504978102.

Ley, Ruth E., Peter J. Turnbaugh, Samuel Klein, and Jeffrey I. Gordon. 2006. "Microbial Ecology: Human Gut Microbes Associated with Obesity." Nature 444 (7122): 1022–23. doi:10.1038/4441022a.

Li, Qingsheng, Lijie Duan, Jacob D. Estes, Zhong-Min Ma, Tracy Rourke, Yichuan Wang, Cavan Reilly, John Carlis, Christopher J. Miller, and Ashley T. Haase. 2005. "Peak SIV Replication in Resting Memory CD4+ T Cells Depletes Gut Lamina Propria CD4+ T Cells." Nature 434 (7037): 1148–52. doi:10.1038/nature03513.

Lin, Guiting, Maurice Garcia, Hongxiu Ning, Lia Banie, Ying-Lu Guo, Tom F. Lue, and Ching-Shwun Lin. 2008. "Defining Stem and Progenitor Cells within Adipose Tissue." Stem Cells and Development 17 (6): 1053–63. doi:10.1089/scd.2008.0117.

Lindqvist, Madelene, Jan van Lunzen, Damien Z. Soghoian, Bjorn D. Kuhl, Srinika Ranasinghe, Gregory Kranias, Michael D. Flanders, et al. 2012. "Expansion of HIV-Specific T Follicular Helper Cells in Chronic HIV Infection." The Journal of Clinical Investigation 122 (9): 3271–80. doi:10.1172/JCI64314.

Liovat, Anne-Sophie, Béatrice Jacquelin, Mickaël J. Ploquin, Françoise Barré-Sinoussi, and Michaela C. Müller-Trutwin. 2009. "African Non Human Primates Infected by SIV - Why Don't They Get Sick? Lessons from Studies on the Early Phase of Non-Pathogenic SIV Infection." Current HIV Research 7 (1): 39–50.

Liu, Lenna L., Jean M. Lawrence, Cralen Davis, Angela D. Liese, David J. Pettitt, Catherine Pihoker, Dana Dabelea, et al. 2010. "Prevalence of Overweight and Obesity in Youth with Diabetes in USA: The SEARCH for Diabetes in Youth Study." Pediatric Diabetes 11 (1): 4–11. doi:10.1111/j.1399-5448.2009.00519.x.

Liu, Rui, Lei Huang, Jingyi Li, Xianzhi Zhou, Haiyuan Zhang, Tao Zhang, Yunlong Lei, et al. 2013. "HIV Infection in Gastric Epithelial Cells." Journal of Infectious Diseases 208 (8): 1221–30. doi:10.1093/infdis/jit314.

Liu, Z., W. G. Cumberland, L. E. Hultin, A. H. Kaplan, R. Detels, and J. V. Giorgi. 1998. "CD8+ T-Lymphocyte Activation in HIV-1 Disease Reflects an Aspect of Pathogenesis Distinct from Viral Burden and Immunodeficiency." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology: Official Publication of the International Retrovirology Association 18 (4): 332–40.

Lord, G. M., G. Matarese, J. K. Howard, R. J. Baker, S. R. Bloom, and R. I. Lechler. 1998. "Leptin Modulates the T-Cell Immune Response and Reverses Starvation-Induced Immunosuppression." Nature 394 (6696): 897–901. doi:10.1038/29795.

Lumeng, Carey N., Jennifer L. Bodzin, and Alan R. Saltiel. 2007. "Obesity Induces a Phenotypic Switch in Adipose Tissue Macrophage Polarization." The Journal of Clinical Investigation 117 (1): 175–84. doi:10.1172/JCI29881.

Lynch, Lydia. 2014. "Adipose Invariant Natural Killer T Cells." Immunology 142 (3): 337–46. doi:10.1111/imm.12269.

Lynch, Lydia, Michael Nowak, Bindu Varghese, Justice Clark, Andrew E. Hogan, Vasillis Toxavidis, Steven P. Balk, Donal O'Shea, Cliona O'Farrelly, and Mark A. Exley. 2012. "Adipose Tissue Invariant NKT Cells Protect against Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorder through Regulatory Cytokine Production." Immunity 37 (3): 574–87. doi:10.1016/j.immuni.2012.06.016.

Lynch, Lydia, Donal O'Shea, Desmond C. Winter, Justin Geoghegan, Derek G. Doherty, and Cliona O'Farrelly. 2009. "Invariant NKT Cells and CD1d+ Cells Amass in Human Omentum and Are Depleted in Patients with Cancer and Obesity." European Journal of Immunology 39 (7): 1893–1901. doi:10.1002/eji.200939349.

Ma, Cindy S., Elissa K. Deenick, Marcel Batten, and Stuart G. Tangye. 2012. "The Origins, Function, and Regulation of T Follicular Helper Cells." The Journal of Experimental Medicine 209 (7): 1241–53. doi:10.1084/jem.20120994.

Ma, Dongzhu, Anna Jasinska, Jan Kristoff, J. Paul Grobler, Trudy Turner, Yoon Jung, Christopher Schmitt, et al. 2013. "SIVagm Infection in Wild African Green Monkeys from South Africa: Epidemiology, Natural History, and Evolutionary Considerations." PLoS Pathogens 9 (1): e1003011. doi:10.1371/journal.ppat.1003011.

Maartens, Gary, Connie Celum, and Sharon R. Lewin. 2014. "HIV Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Treatment, and Prevention." Lancet (London, England) 384 (9939): 258–71. doi:10.1016/S0140-6736(14)60164-1.

Maldarelli, F., X. Wu, L. Su, F. R. Simonetti, W. Shao, S. Hill, J. Spindler, et al. 2014. "HIV Latency. Specific HIV Integration Sites Are Linked to Clonal Expansion and Persistence of Infected Cells." Science (New York, N.Y.) 345 (6193): 179–83. doi:10.1126/science.1254194.

Mandel, M. A., and A. A. Mahmoud. 1978. "Impairment of Cell-Mediated Immunity in Mutation Diabetic Mice (Db/Db)." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 120 (4): 1375–77.

Mansfield, Keith G, Angela Carville, Lynn Wachtman, Barry R Goldin, Jennifer Yearley, Wenjun Li, Margo Woods, Lisa Gualtieri, Richard Shannon, and Chris Wanke. 2007. "A Diet High in Saturated Fat and Cholesterol Accelerates Simian Immunodeficiency Virus Disease Progression." The Journal of Infectious Diseases 196 (8): 1202–10. doi:10.1086/521680.

Marchetti, Giulia, Giusi M. Bellistrì, Elisa Borghi, Camilla Tincati, Stefania Ferramosca, Maria La Francesca, Giulia Morace, Andrea Gori, and Antonella D'Arminio Monforte. 2008. "Microbial Translocation Is Associated with Sustained Failure in CD4+ T-Cell Reconstitution in HIV-Infected Patients on Long-Term Highly Active Antiretroviral Therapy." AIDS (London, England) 22 (15): 2035–38. doi:10.1097/QAD.0b013e3283112d29.

Mårin, Per, Björn Andersson, Malin Ottosson, Lars Olbe, Badrul Chowdhury, Henry Kvist, Göran Holm, Lars Sjöström, and Per Björntorp. 1992. "The Morphology and Metabolism of Intraabdominal Adipose Tissue in Men." Metabolism - Clinical and Experimental 41 (11): 1242–48. doi:10.1016/0026-0495(92)90016-4.

Martinez, Fernando O., and Siamon Gordon. 2014. "The M1 and M2 Paradigm of Macrophage Activation: Time for Reassessment." F1000Prime Reports 6 (March). doi:10.12703/P6-13.

Masiá, Mar, Catalina Robledano, Victoria Ortiz de la Tabla, Pedro Antequera, Blanca Lumbreras, Ildefonso Hernández, and Félix Gutiérrez. 2014. "Coinfection with Human Herpesvirus 8 Is Associated with Persistent Inflammation and Immune Activation in Virologically Suppressed HIV-Infected Patients." PloS One 9 (8): e105442. doi:10.1371/journal.pone.0105442.

Mattapallil, Joseph J., Daniel C. Douek, Brenna Hill, Yoshiaki Nishimura, Malcolm Martin, and Mario Roederer. 2005. "Massive Infection and Loss of Memory CD4+ T Cells in Multiple Tissues during Acute SIV Infection." Nature 434 (7037): 1093–97. doi:10.1038/nature03501.

Maurin, T, C Saillan-Barreau, B Cousin, L Casteilla, A Doglio, and L Pénicaud. 2005a. "Tumor Necrosis Factor-Alpha Stimulates HIV-1 Production in Primary Culture of Human Adipocytes." Experimental Cell Research 304 (2): 544–51. doi:10.1016/j.yexcr.2004.12.003.

———. 2005b. "Tumor Necrosis Factor-Alpha Stimulates HIV-1 Production in Primary Culture of Human Adipocytes." Experimental Cell Research 304 (2): 544–51. doi:10.1016/j.yexcr.2004.12.003.

Mavigner, Maud, Michelle Cazabat, Martine Dubois, Fatima-Ezzahra L'Faqihi, Mary Requena, Christophe Pasquier, Pascale Klopp, et al. 2012. "Altered CD4+ T Cell Homing to the Gut Impairs Mucosal Immune Reconstitution in Treated HIV-Infected Individuals." The Journal of Clinical Investigation 122 (1): 62–69. doi:10.1172/JCI59011.

McElrath, M. J., K. Smythe, J. Randolph-Habecker, K. R. Melton, T. A. Goodpaster, S. M. Hughes, M. Mack, et al. 2013. "Comprehensive Assessment of HIV Target Cells in the Distal Human Gut Suggests Increasing HIV Susceptibility toward the Anus." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999) 63 (3): 263–71. doi:10.1097/QAI.0b013e3182898392.

McElrath, M. J., R. M. Steinman, and Z. A. Cohn. 1991. "Latent HIV-1 Infection in Enriched Populations of Blood Monocytes and T Cells from Seropositive Patients." The Journal of Clinical Investigation 87 (1): 27–30. doi:10.1172/JCI114981.

Medzhitov, Ruslan. 2008. "Origin and Physiological Roles of Inflammation." Nature 454 (7203): 428–35. doi:10.1038/nature07201.

Mehandru, Saurabh, Michael A. Poles, Klara Tenner-Racz, Amir Horowitz, Arlene Hurley, Christine Hogan, Daniel Boden, Paul Racz, and Martin Markowitz. 2004. "Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+ T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract." The Journal of Experimental Medicine 200 (6): 761–70. doi:10.1084/jem.20041196.

Miñana, María-Dolores, Francisco Carbonell-Uberos, Vicente Mirabet, Severiano Marín, and Araceli Encabo. 2008. "IFATS Collection: Identification of Hemangioblasts in the Adult

Human Adipose Tissue." Stem Cells (Dayton, Ohio) 26 (10): 2696–2704. doi:10.1634/stemcells.2007-0988.

Misra, Anoop, and Naval K Vikram. 2003. "Clinical and Pathophysiological Consequences of Abdominal Adiposity and Abdominal Adipose Tissue Depots." Nutrition 19 (5): 457–66. doi:10.1016/S0899-9007(02)01003-1.

Mookerjee-Basu, Jayati, and Dietmar J. Kappes. 2017. "iNKT Cells Do a Fat Lot of Good." Nature Immunology 18 (1): 10–12. doi:10.1038/ni.3639.

Mora, J. Rodrigo, Maria Rosa Bono, N. Manjunath, Wolfgang Weninger, Lois L. Cavanagh, Mario Rosemblatt, and Ulrich H. Von Andrian. 2003. "Selective Imprinting of Gut-Homing T Cells by Peyer's Patch Dendritic Cells." Nature 424 (6944): 88–93. doi:10.1038/nature01726.

Motoshima, Hiroyuki, Xiangdong Wu, Madhur K. Sinha, V. Elise Hardy, Ernest L. Rosato, Donna J. Barbot, Francis E. Rosato, and Barry J. Goldstein. 2002. "Differential Regulation of Adiponectin Secretion from Cultured Human Omental and Subcutaneous Adipocytes: Effects of Insulin and Rosiglitazone." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 87 (12): 5662–67. doi:10.1210/jc.2002-020635.

Moulin, Cristiane Martins, Ivo Marguti, Jean Pierre Schatzmann Peron, Alfredo Halpern, and Luiz Vicente Rizzo. 2011. "Bariatric Surgery Reverses Natural Killer (NK) Cell Activity and NK-Related Cytokine Synthesis Impairment Induced by Morbid Obesity." Obesity Surgery 21 (1): 112–18. doi:10.1007/s11695-010-0250-8.

Münch, Jan, Devi Rajan, Michael Schindler, Anke Specht, Elke Rücker, Francis J. Novembre, Eric Nerrienet, et al. 2007. "Nef-Mediated Enhancement of Virion Infectivity and Stimulation of Viral Replication Are Fundamental Properties of Primate Lentiviruses." Journal of Virology 81 (24): 13852–64. doi:10.1128/JVI.00904-07.

Munier, Sandie, Alejandra Borjabad, Morgane Lemaire, Virginie Mariot, and Uriel Hazan. 2003. "In Vitro Infection of Human Primary Adipose Cells with HIV-1: A Reassessment." AIDS (London, England) 17 (17): 2537–39. doi:10.1097/01.aids.0000096866.36052.84.

Narasipura, Srinivas D., Lisa J. Henderson, Sidney W. Fu, Liang Chen, Fatah Kashanchi, and Lena Al-Harthi. 2012. "Role of β-Catenin and TCF/LEF Family Members in Transcriptional Activity of HIV in Astrocytes." Journal of Virology 86 (4): 1911–21. doi:10.1128/JVI.06266-11.

Nazari-Shafti, Timo Z., Eva Freisinger, Upal Roy, Christine T. Bulot, Christiane Senst, Charles L. Dupin, Abigail E. Chaffin, et al. 2011. "Mesenchymal Stem Cell Derived Hematopoietic Cells Are Permissive to HIV-1 Infection." Retrovirology 8 (1): 3. doi:10.1186/1742-4690-8-3.

Neuhaus, Jacqueline, David R. Jacobs, Jr, Jason V. Baker, Alexandra Calmy, Daniel Duprez, Alberto La Rosa, Lewis H. Kuller, et al. 2010. "Markers of Inflammation, Coagulation, and Renal Function Are Elevated in Adults with HIV Infection." The Journal of Infectious Diseases 201 (12): 1788–95. doi:10.1086/652749.

Neyrolles, Olivier, Rogelio Hernández-Pando, France Pietri-Rouxel, Paul Fornès, Ludovic Tailleux, Jorge Alberto Barrios Payán, Elisabeth Pivert, et al. 2006. "Is Adipose Tissue a Place for Mycobacterium Tuberculosis Persistence?" PloS One 1 (December): e43. doi:10.1371/journal.pone.0000043.

Nicholson, J. K., G. D. Cross, C. S. Callaway, and J. S. McDougal. 1986. "In Vitro Infection of Human Monocytes with Human T Lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy-Associated Virus (HTLV-III/LAV)." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 137 (1): 323–29.

Nigam, Pragati, Suefen Kwa, Vijayakumar Velu, and Rama Rao Amara. 2011. "Loss of IL-17-Producing CD8 T Cells during Late Chronic Stage of Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infection." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 186 (2): 745–53. doi:10.4049/jimmunol.1002807.

Nishimura, Satoshi, Ichiro Manabe, Mika Nagasaki, Koji Eto, Hiroshi Yamashita, Mitsuru Ohsugi, Makoto Otsu, et al. 2009. "CD8+ Effector T Cells Contribute to Macrophage Recruitment and Adipose Tissue Inflammation in Obesity." Nature Medicine 15 (8): 914–20. doi:10.1038/nm.1964.

Nutt, Stephen L., and David M. Tarlinton. 2011. "Germinal Center B and Follicular Helper T Cells: Siblings, Cousins or Just Good Friends?" Nature Immunology 12 (6): 472–77.

O'Brien, W. A. 1994. "HIV-1 Entry and Reverse Transcription in Macrophages." Journal of Leukocyte Biology 56 (3): 273–77.

Okoye, Afam A., and Louis J. Picker. 2013. "CD4+ T Cell Depletion in HIV Infection: Mechanisms of Immunological Failure." Immunological Reviews 254 (1): 54–64. doi:10.1111/imr.12066.

Olesen, Rikke, Steffen Leth, Rasmus Nymann, Lars Østergaard, Ole S. Søgaard, Paul W. Denton, and Martin Tolstrup. 2016. "Immune Checkpoints and the HIV-1 Reservoir: Proceed with Caution." Journal of Virus Eradication 2 (3): 183–86.

Olshansky, S. Jay, Douglas J. Passaro, Ronald C. Hershow, Jennifer Layden, Bruce A. Carnes, Jacob Brody, Leonard Hayflick, Robert N. Butler, David B. Allison, and David S. Ludwig. 2005. "A Potential Decline in Life Expectancy in the United States in the 21st Century." The New England Journal of Medicine 352 (11): 1138–45. doi:10.1056/NEJMsr043743.

O'Rourke, Robert W, Garen D Gaston, Kevin A Meyer, Ashley E White, and Daniel L Marks. 2013. "Adipose Tissue NK Cells Manifest an Activated Phenotype in Human Obesity." Metabolism: Clinical and Experimental 62 (11): 1557–61. doi:10.1016/j.metabol.2013.07.011.

O'Rourke, Robert W., Kevin A. Meyer, Christopher K. Neeley, Garen D. Gaston, Palak Sekhri, Marek Szumowski, Brian Zamarron, Carey N. Lumeng, and Daniel L. Marks. 2014. "Systemic NK Cell Ablation Attenuates Intra-Abdominal Adipose Tissue Macrophage Infiltration in Murine Obesity." Obesity (Silver Spring, Md.) 22 (10): 2109–14. doi:10.1002/oby.20823.

Ortblad, Katrina F., Rafael Lozano, and Christopher J. L. Murray. 2013. "The Burden of HIV: Insights from the Global Burden of Disease Study 2010." AIDS (London, England) 27 (13): 2003–17. doi:10.1097/QAD.0b013e328362ba67.

O'Shea, Donal, Tom J. Cawood, Cliona O'Farrelly, and Lydia Lynch. 2010. "Natural Killer Cells in Obesity: Impaired Function and Increased Susceptibility to the Effects of Cigarette Smoke." PLOS ONE 5 (1): e8660. doi:10.1371/journal.pone.0008660.

O'Sullivan, Timothy E., Moritz Rapp, Xiying Fan, Orr-El Weizman, Priya Bhardwaj, Nicholas M. Adams, Thierry Walzer, Andrew J. Dannenberg, and Joseph C. Sun. 2016. "Adipose-Resident Group 1 Innate Lymphoid Cells Promote Obesity-Associated Insulin Resistance." Immunity 45 (2): 428–41. doi:10.1016/j.immuni.2016.06.016.

Otake, Kaori, Shinya Omoto, Takuya Yamamoto, Harumi Okuyama, Hidechika Okada, Noriko Okada, Masahiro Kawai, Nitin K. Saksena, and Yoichi R. Fujii. 2004. "HIV-1 Nef Protein in the Nucleus Influences Adipogenesis as Well as Viral Transcription through the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors." AIDS (London, England) 18 (2): 189–98.

Ouchi, Noriyuki, Jennifer L Parker, Jesse J Lugus, and Kenneth Walsh. 2011. "Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease." Nature Reviews. Immunology 11 (2): 85–97. doi:10.1038/nri2921.

Paiardini, Mirko, Ian Frank, Ivona Pandrea, Cristian Apetrei, and Guido Silvestri. 2008. "Mucosal Immune Dysfunction in AIDS Pathogenesis." AIDS Reviews 10 (1): 36–46.

Palella, F. J., K. M. Delaney, A. C. Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Satten, D. J. Aschman, and S. D. Holmberg. 1998. "Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. HIV Outpatient Study Investigators." The New England Journal of Medicine 338 (13): 853–60. doi:10.1056/NEJM199803263381301.

Pallikkuth, Suresh, Mark Sharkey, Dunja Z. Babic, Sachin Gupta, Geoffrey W. Stone, Margaret A. Fischl, Mario Stevenson, and Savita Pahwa. 2015. "Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from Chronically HIV-Infected Individuals on Combination Antiretroviral Therapy." Journal of Virology 90 (6): 2718–28. doi:10.1128/JVI.02883-15.

Palmer, Brent E., Eli Boritz, and Cara C. Wilson. 2004. "Effects of Sustained HIV-1 Plasma Viremia on HIV-1 Gag-Specific CD4+ T Cell Maturation and Function." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 172 (5): 3337–47.

Pan, Xiaoyu, Hanna-Mari Baldauf, Oliver T. Keppler, and Oliver T. Fackler. 2013. "Restrictions to HIV-1 Replication in Resting CD4+ T Lymphocytes." Cell Research 23 (7): 876–85. doi:10.1038/cr.2013.74.

Pandrea, Ivona, Donald L. Sodora, Guido Silvestri, and Cristian Apetrei. 2008. "Into the Wild: Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Infection in Natural Hosts." Trends in Immunology 29 (9): 419–28. doi:10.1016/j.it.2008.05.004.

Pandrea, Ivona V., Rajeev Gautam, Ruy M. Ribeiro, Jason M. Brenchley, Isolde F. Butler, Melissa Pattison, Terri Rasmussen, et al. 2007. "Acute Loss of Intestinal CD4+ T Cells Is Not Predictive of Simian Immunodeficiency Virus Virulence." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 179 (5): 3035–46.

Pantaleo, G., C. Graziosi, and A. S. Fauci. 1993. "The Role of Lymphoid Organs in the Pathogenesis of HIV Infection." Seminars in Immunology 5 (3): 157–63. doi:10.1006/smim.1993.1019.

Pearce, Erika L., and Edward J. Pearce. 2013. "Metabolic Pathways In Immune Cell Activation And Quiescence." Immunity 38 (4): 633–43. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.005.

Pelletier, Martin, Laura Maggi, Alessandra Micheletti, Elena Lazzeri, Nicola Tamassia, Claudio Costantini, Lorenzo Cosmi, et al. 2010. "Evidence for a Cross-Talk between Human Neutrophils and Th17 Cells." Blood 115 (2): 335–43. doi:10.1182/blood-2009-04-216085.

Pelsers, Maurice M. A. L., Zbigniew Namiot, Wojciech Kisielewski, Andrzej Namiot, Marcin Januszkiewicz, Wim T. Hermens, and Jan F. C. Glatz. 2003. "Intestinal-Type and Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein in the Intestine. Tissue Distribution and Clinical Utility." Clinical Biochemistry 36 (7): 529–35.

Penton, Patricia K., and Jason T. Blackard. 2014. "Analysis of HIV Quasispecies Suggests Compartmentalization in the Liver." AIDS Research and Human Retroviruses 30 (4): 394–402. doi:10.1089/AID.2013.0146.

Pereira, L. E., F. Villinger, N. Onlamoon, P. Bryan, A. Cardona, K. Pattanapanysat, K. Mori, S. Hagen, L. Picker, and A. A. Ansari. 2007. "Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Infection Influences the Level and Function of Regulatory T Cells in SIV-Infected Rhesus Macaques but Not SIV-Infected Sooty Mangabeys." Journal of Virology 81 (9): 4445–56. doi:10.1128/JVI.00026-07.

Perelson, A. S., P. Essunger, Y. Cao, M. Vesanen, A. Hurley, K. Saksela, M. Markowitz, and D. D. Ho. 1997. "Decay Characteristics of HIV-1-Infected Compartments during Combination Therapy." Nature 387 (6629): 188–91. doi:10.1038/387188a0.

Peretz, Yoav, Zhong He, Yu Shi, Bader Yassine-Diab, Jean-Philippe Goulet, Rebeka Bordi, Ali Filali-Mouhim, et al. 2012. "CD160 and PD-1 Co-Expression on HIV-Specific CD8 T Cells Defines a Subset with Advanced Dysfunction." PLoS Pathogens 8 (8): e1002840. doi:10.1371/journal.ppat.1002840.

Pérez-Matute, Patricia, Laura Pérez-Martínez, José R. Blanco, and José A. Oteo. 2011. "Neutral Actions of Raltegravir on Adipogenesis, Glucose Metabolism and Lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes." Current HIV Research 9 (3): 174–79.

Perreau, Matthieu, Anne-Laure Savoye, Elisa De Crignis, Jean-Marc Corpataux, Rafael Cubas, Elias K. Haddad, Laurence De Leval, Cecilia Graziosi, and Giuseppe Pantaleo. 2013. "Follicular Helper T Cells Serve as the Major CD4 T Cell Compartment for HIV-1

Infection, Replication, and Production." The Journal of Experimental Medicine 210 (1): 143–56. doi:10.1084/jem.20121932.

Petrara, Maria Raffaella, Anna Maria Cattelan, Marisa Zanchetta, Lolita Sasset, Riccardo Freguja, Ketty Gianesin, Maria Grazia Cecchetto, Francesco Carmona, and Anita De Rossi. 2012. "Epstein-Barr Virus Load and Immune Activation in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients." Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology 53 (3): 195–200. doi:10.1016/j.jcv.2011.12.013.

Petrovas, Constantinos, David A. Price, Joseph Mattapallil, David R. Ambrozak, Christof Geldmacher, Valentina Cecchinato, Monica Vaccari, et al. 2007. "SIV-Specific CD8+ T Cells Express High Levels of PD1 and Cytokines but Have Impaired Proliferative Capacity in Acute and Chronic SIVmac251 Infection." Blood 110 (3): 928–36. doi:10.1182/blood-2007-01-069112.

Petrovas, Constantinos, Takuya Yamamoto, Michael Y. Gerner, Kristin L. Boswell, Kaska Wloka, Emily C. Smith, David R. Ambrozak, et al. 2012. "CD4 T Follicular Helper Cell Dynamics during SIV Infection." The Journal of Clinical Investigation 122 (9): 3281–94. doi:10.1172/JCI63039.

Piguet, Vincent, Stephan M. Caucheteux, Marco Iannetta, and Anne Hosmalin. 2014. "Altered Antigen-Presenting Cells during HIV-1 Infection." Current Opinion in HIV and AIDS 9 (5): 478–84. doi:10.1097/COH.0000000000000096.

Pillai, Satish K., Benjamin Good, Sergei Kosakovsky Pond, Joseph K. Wong, Matt C. Strain, Douglas D. Richman, and Davey M. Smith. 2005. "Semen-Specific Genetic Characteristics of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Env." Journal of Virology 79 (3): 1734–42. doi:10.1128/JVI.79.3.1734-1742.2005.

Podzamczer, Daniel, Elena Ferrer, Pochita Sanchez, José M. Gatell, Manel Crespo, Cesar Fisac, Montse Lonca, et al. 2007. "Less Lipoatrophy and Better Lipid Profile with Abacavir as Compared to Stavudine: 96-Week Results of a Randomized Study." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999) 44 (2): 139–47. doi:10.1097/QAI.0b013e31802bf122.

Poglio, Sandrine, Fabienne De Toni-Costes, Emmanuelle Arnaud, Patrick Laharrague, Eric Espinosa, Louis Casteilla, and Béatrice Cousin. 2010. "Adipose Tissue as a Dedicated Reservoir of Functional Mast Cell Progenitors." Stem Cells (Dayton, Ohio) 28 (11): 2065–72. doi:10.1002/stem.523.

Politch, Joseph A., Kenneth H. Mayer, Seth L. Welles, William X. O'Brien, Chong Xu, Frederick P. Bowman, and Deborah J. Anderson. 2012. "Highly Active Antiretroviral Therapy Does Not Completely Suppress HIV in Semen of Sexually Active HIV-Infected Men Who Have Sex with Men." AIDS (London, England) 26 (12): 1535–43. doi:10.1097/QAD.0b013e328353b11b.

Pope, Melissa, and Ashley T. Haase. 2003. "Transmission, Acute HIV-1 Infection and the Quest for Strategies to Prevent Infection." Nature Medicine 9 (7): 847–52. doi:10.1038/nm0703-847.

Popov, Sergei, Agnès-Laurence Chenine, Andreas Gruber, Pei-Lin Li, and Ruth M. Ruprecht. 2005. "Long-Term Productive Human Immunodeficiency Virus Infection of CD1a-Sorted Myeloid Dendritic Cells." Journal of Virology 79 (1): 602–8. doi:10.1128/JVI.79.1.602-608.2005.

Porichis, Filippos, and Daniel E. Kaufmann. 2012. "Role of PD-1 in HIV Pathogenesis and as Target for Therapy." Current HIV/AIDS Reports 9 (1): 81–90. doi:10.1007/s11904-011-0106-4.

Radebe, Mopo, Kamini Gounder, Mammekwa Mokgoro, Zaza M. Ndhlovu, Zenele Mncube, Lungile Mkhize, Mary van der Stok, Manjeetha Jaggernath, Bruce D. Walker, and Thumbi Ndung'u. 2015. "Broad and Persistent Gag-Specific CD8+ T-Cell Responses Are

Associated with Viral Control but Rarely Drive Viral Escape during Primary HIV-1 Infection." AIDS (London, England) 29 (1): 23–33. doi:10.1097/QAD.0000000000000508.

Real, Gustavo del, Sonia Jiménez-Baranda, Emilia Mira, Rosa Ana Lacalle, Pilar Lucas, Concepción Gómez-Moutón, Marta Alegret, et al. 2004. "Statins Inhibit HIV-1 Infection by down-Regulating Rho Activity." The Journal of Experimental Medicine 200 (4): 541–47. doi:10.1084/jem.20040061.

Reeves, R. Keith, Premeela A. Rajakumar, Tristan I. Evans, Michelle Connole, Jacqueline Gillis, Fay E. Wong, Yury V. Kuzmichev, Angela Carville, and R. Paul Johnson. 2011. "Gut Inflammation and Indoleamine Deoxygenase Inhibit IL-17 Production and Promote Cytotoxic Potential in NKp44+ Mucosal NK Cells during SIV Infection." Blood 118 (12): 3321–30. doi:10.1182/blood-2011-04-347260.

Reimann, Keith A., Robert A. Parker, Michael S. Seaman, Kristin Beaudry, Margaret Beddall, Lauren Peterson, Kenneth C. Williams, et al. 2005. "Pathogenicity of Simian-Human Immunodeficiency Virus SHIV-89.6P and SIVmac Is Attenuated in Cynomolgus Macaques and Associated with Early T-Lymphocyte Responses." Journal of Virology 79 (14): 8878–85. doi:10.1128/JVI.79.14.8878-8885.2005.

Restifo, Nicholas P, and Luca Gattinoni. 2013. "Lineage Relationship of Effector and Memory T Cells." Current Opinion in Immunology, Special section: Systems biology and bioinformatics / Immunogenetics and transplantation, 25 (5): 556–63. doi:10.1016/j.coi.2013.09.003.

Reus, S., E. Arroyo, V. Boix, and J. Portilla. 2000. "[Lipodystrophy and hyperglycemia produced by protease inhibitors]." Anales De Medicina Interna (Madrid, Spain: 1984) 17 (3): 123–26.

Richman, Douglas D., David M. Margolis, Martin Delaney, Warner C. Greene, Daria Hazuda, and Roger J. Pomerantz. 2009. "The Challenge of Finding a Cure for HIV Infection." Science (New York, N.Y.) 323 (5919): 1304–7. doi:10.1126/science.1165706.

Rotger, Margalida, Judith Dalmau, Andri Rauch, Paul McLaren, Steven E. Bosinger, Raquel Martinez, Netanya G. Sandler, et al. 2011. "Comparative Transcriptomics of Extreme Phenotypes of Human HIV-1 Infection and SIV Infection in Sooty Mangabey and Rhesus Macaque." The Journal of Clinical Investigation 121 (6): 2391–2400. doi:10.1172/JCI45235.

Rouzioux, Christine, and Douglas Richman. 2013. "How to Best Measure HIV Reservoirs?" Current Opinion in HIV and AIDS 8 (3): 170–75. doi:10.1097/COH.0b013e32835fc619.

Rowland-Jones, Sarah L. 2003. "AIDS Pathogenesis: What Have Two Decades of HIV Research Taught Us?" Nature Reviews Immunology 3 (4): 343–48. doi:10.1038/nri1058.

Saez-Cirion, A., B. Jacquelin, F. Barré-Sinoussi, and M. Müller-Trutwin. 2014. "Immune Responses during Spontaneous Control of HIV and AIDS: What Is the Hope for a Cure?" Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 369 (1645): 20130436. doi:10.1098/rstb.2013.0436.

Salehian, Behrouz, Stephen J. Forman, Fouad R. Kandeel, Denise E. Bruner, Jia He, and Richard L. Atkinson. 2010. "Adenovirus 36 DNA in Adipose Tissue of Patient with Unusual Visceral Obesity." Emerging Infectious Diseases 16 (5): 850–52. doi:10.3201/eid1605.091271.

Sandler, N. G., H. Wand, A. Roque, M. Law, M. C. Nason, D. E. Nixon, C. Pedersen, et al. 2011. "Plasma Levels of Soluble CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection." Journal of Infectious Diseases 203 (6): 780–90. doi:10.1093/infdis/jiq118.

Sandler, Netanya G., Handan Wand, Annelys Roque, Matthew Law, Martha C. Nason, Daniel E. Nixon, Court Pedersen, et al. 2011. "Plasma Levels of Soluble CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection." The Journal of Infectious Diseases 203 (6): 780–90. doi:10.1093/infdis/jiq118.

Sarjeant, Kelesha, and Jacqueline M. Stephens. 2012a. "Adipogenesis." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 4 (9): a008417. doi:10.1101/cshperspect.a008417.

Sauce, Delphine, Martin Larsen, Solène Fastenackels, Michèle Pauchard, Hocine Ait-Mohand, Luminita Schneider, Amélie Guihot, et al. 2011. "HIV Disease Progression despite Suppression of Viral Replication Is Associated with Exhaustion of Lymphopoiesis." Blood 117 (19): 5142–51. doi:10.1182/blood-2011-01-331306.

Schambelan, Morris, Constance A. Benson, Andrew Carr, Judith S. Currier, Michael P. Dubé, John G. Gerber, Steven K. Grinspoon, et al. 2002. "Management of Metabolic Complications Associated with Antiretroviral Therapy for HIV-1 Infection: Recommendations of an International AIDS Society-USA Panel." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999) 31 (3): 257–75.

Schindler, Michael, Jan Münch, Olaf Kutsch, Hui Li, Mario L. Santiago, Frederic Bibollet-Ruche, Michaela C. Müller-Trutwin, et al. 2006. "Nef-Mediated Suppression of T Cell Activation Was Lost in a Lentiviral Lineage That Gave Rise to HIV-1." Cell 125 (6): 1055–67. doi:10.1016/j.cell.2006.04.033.

Schipper, Henk S., Berent Prakken, Eric Kalkhoven, and Marianne Boes. 2012. "Adipose Tissue-Resident Immune Cells: Key Players in Immunometabolism." Trends in Endocrinology & Metabolism 23 (8): 407–15. doi:10.1016/j.tem.2012.05.011.

Schmid, Adrian, Sara Gianella, Viktor von Wyl, Karin J. Metzner, Alexandra U. Scherrer, Barbara Niederöst, Claudia F. Althaus, et al. 2010. "Profound Depletion of HIV-1 Transcription in Patients Initiating Antiretroviral Therapy during Acute Infection." PloS One 5 (10): e13310. doi:10.1371/journal.pone.0013310.

Scott-Algara, Daniel, Karl Balabanian, Lisa A. Chakrabarti, Luc Mouthon, Françoise Dromer, Céline Didier, Fernando Arenzana-Seisdedos, and Olivier Lortholary. 2010. "Idiopathic CD4+ T-Cell Lymphocytopenia Is Associated with Impaired Membrane Expression of the Chemokine Receptor CXCR4." Blood 115 (18): 3708–17. doi:10.1182/blood-2009-02-202796.

Sengenès, C., A. Miranville, K. Lolmède, C. A. Curat, and A. Bouloumié. 2007. "The Role of Endothelial Cells in Inflamed Adipose Tissue." Journal of Internal Medicine 262 (4): 415–21. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01853.x.

Serafini, Nicolas, Christian A. J. Vosshenrich, and James P. Di Santo. 2015. "Transcriptional Regulation of Innate Lymphoid Cell Fate." Nature Reviews Immunology 15 (7): 415–28. doi:10.1038/nri3855.

Sereti, Irini, Richard M. Dunham, John Spritzler, Evgenia Aga, Michael A. Proschan, Kathy Medvik, Catherine A. Battaglia, et al. 2009. "IL-7 Administration Drives T Cell-Cycle Entry and Expansion in HIV-1 Infection." Blood 113 (25): 6304–14.

Sereti, Irini, Shelly J Krebs, Nittaya Phanuphak, James L Fletcher, Bonnie Slike, Suteeraporn Pinyakorn, Robert J O'Connell, et al. 2017. "Persistent, Albeit Reduced, Chronic Inflammation in Persons Starting Antiretroviral Therapy in Acute HIV Infection." Clinical *Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 64 (2): 124–31. doi:10.1093/cid/ciw683.

Sethi, Jaswinder K., and Antonio J. Vidal-Puig. 2007. "Thematic Review Series: Adipocyte Biology. Adipose Tissue Function and Plasticity Orchestrate Nutritional Adaptation." Journal of Lipid Research 48 (6): 1253–62. doi:10.1194/jlr.R700005-JLR200.

Shackelford, G. D., L. L. Barton, and W. H. McAlister. 1975. "Calcified Subcutaneous Fat Necrosis in Infancy." Journal of the Canadian Association of Radiologists 26 (3): 203–7.

Shaw, Julia M., Peter W. Hunt, J. William Critchfield, Delandy H. McConnell, Juan Carlos Garcia, Richard B. Pollard, Ma Somsouk, Steven G. Deeks, and Barbara L. Shacklett. 2011. "Increased Frequency of Regulatory T Cells Accompanies Increased Immune Activation in Rectal Mucosae of HIV-Positive Noncontrollers." Journal of Virology 85 (21): 11422–34. doi:10.1128/JVI.05608-11.

Shehu-Xhilaga, Miranda, David Rhodes, Fiona Wightman, Hong B. Liu, Ajantha Solomon, Suha Saleh, Anthony E. Dear, Paul U. Cameron, and Sharon R. Lewin. 2009. "The Novel Histone Deacetylase Inhibitors Metacept-1 and Metacept-3 Potently Increase HIV-1 Transcription in Latently Infected Cells." AIDS (London, England) 23 (15): 2047–50. doi:10.1097/QAD.0b013e328330342c.

Shen, Wei, ZiMian Wang, Mark Punyanita, Jianbo Lei, Ahmet Sinav, John G. Kral, Celina Imielinska, Robert Ross, and Steven B. Heymsfield. 2003. "Adipose Tissue Quantification by Imaging Methods: A Proposed Classification." Obesity Research 11 (1): 5–16. doi:10.1038/oby.2003.3.

Sheth, Prameet M., Sherzana Sunderji, Lucy Y. Y. Shin, Anuradha Rebbapragada, Sanja Huibner, Joshua Kimani, Kelly S. Macdonald, et al. 2008. "Coinfection with Herpes Simplex Virus Type 2 Is Associated with Reduced HIV-Specific T Cell Responses and Systemic Immune Activation." The Journal of Infectious Diseases 197 (10): 1394–1401. doi:10.1086/587697.

Shoelson, Steven E., Jongsoon Lee, and Allison B. Goldfine. 2006. "Inflammation and Insulin Resistance." The Journal of Clinical Investigation 116 (7): 1793–1801. doi:10.1172/JCI29069.

Shor-Posner, G., A. Basit, Y. Lu, C. Cabrejos, J. Chang, M. Fletcher, E. Mantero-Atienza, and M. K. Baum. 1993. "Hypocholesterolemia Is Associated with Immune Dysfunction in Early Human Immunodeficiency Virus-1 Infection." The American Journal of Medicine 94 (5): 515–19.

Shor-Posner, G., A. Campa, G. Zhang, N. Persaud, M. J. Miguez-Burbano, J. Quesada, M. A. Fletcher, J. B. Page, and M. K. Baum. 2000. "When Obesity Is Desirable: A Longitudinal Study of the Miami HIV-1-Infected Drug Abusers (MIDAS) Cohort." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999) 23 (1): 81–88.

Shrivastav, Shashi, Tomoshige Kino, Tshaka Cunningham, Takamasa Ichijo, Ulrich Schubert, Peter Heinklein, George P. Chrousos, and Jeffrey B. Kopp. 2008. "Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 Viral Protein R Suppresses Transcriptional Activity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {gamma} and Inhibits Adipocyte Differentiation: Implications for HIV-Associated Lipodystrophy." Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.) 22 (2): 234–47. doi:10.1210/me.2007-0124.

Sigal, Alex, Jocelyn T. Kim, Alejandro B. Balazs, Erez Dekel, Avi Mayo, Ron Milo, and David Baltimore. 2011. "Cell-to-Cell Spread of HIV Permits Ongoing Replication despite Antiretroviral Therapy." Nature 477 (7362): 95–98. doi:10.1038/nature10347.

Silvestri, Guido, Donald L. Sodora, Richard A. Koup, Mirko Paiardini, Shawn P. O'Neil, Harold M. McClure, Silvija I. Staprans, and Mark B. Feinberg. 2003. "Nonpathogenic SIV Infection of Sooty Mangabeys Is Characterized by Limited Bystander Immunopathology despite Chronic High-Level Viremia." Immunity 18 (3): 441–52.

Smith, Phillip D., Gang Meng, Jesus F. Salazar-Gonzalez, and George M. Shaw. 2003. "Macrophage HIV-1 Infection and the Gastrointestinal Tract Reservoir." Journal of Leukocyte Biology 74 (5): 642–49. doi:10.1189/jlb.0503219.

Smith-Franklin, Beverly A., Brandon F. Keele, John G. Tew, Suzanne Gartner, Andras K. Szakal, Jacob D. Estes, Tyler C. Thacker, and Gregory F. Burton. 2002. "Follicular Dendritic Cells and the Persistence of HIV Infectivity: The Role of Antibodies and Fcgamma Receptors." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 168 (5): 2408–14.

Somsouk, Ma, Richard M. Dunham, Michelle Cohen, Rebecca Albright, Mohamed Abdel-Mohsen, Teri Liegler, Jeffrey Lifson, et al. 2014. "The Immunologic Effects of Mesalamine in Treated HIV-Infected Individuals with Incomplete CD4+ T Cell Recovery: A Randomized Crossover Trial." PloS One 9 (12): e116306. doi:10.1371/journal.pone.0116306.

Soriano-Sarabia, Natalia, Rosalie E. Bateson, Noelle P. Dahl, Amanda M. Crooks, JoAnn D. Kuruc, David M. Margolis, and Nancie M. Archin. 2014. "Quantitation of Replication-Competent HIV-1 in Populations of Resting CD4+ T Cells." Journal of Virology 88 (24): 14070–77. doi:10.1128/JVI.01900-14.

Sousa, Ana E., Jorge Carneiro, Martin Meier-Schellersheim, Zvi Grossman, and Rui M. M. Victorino. 2002. "CD4 T Cell Depletion Is Linked Directly to Immune Activation in the Pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but Only Indirectly to the Viral Load." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 169 (6): 3400–3406.

Spalding, Kirsty L., Erik Arner, Pål O. Westermark, Samuel Bernard, Bruce A. Buchholz, Olaf Bergmann, Lennart Blomqvist, et al. 2008. "Dynamics of Fat Cell Turnover in Humans." Nature 453 (7196): 783–87. doi:10.1038/nature06902.

Spiegel, H., H. Herbst, G. Niedobitek, H. D. Foss, and H. Stein. 1992. "Follicular Dendritic Cells Are a Major Reservoir for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Lymphoid Tissues Facilitating Infection of CD4+ T-Helper Cells." The American Journal of Pathology 140 (1): 15–22.

Stanley, Takara L., and Steven K. Grinspoon. 2012. "Body Composition and Metabolic Changes in HIV-Infected Patients." The Journal of Infectious Diseases 205 (Suppl 3): S383–90. doi:10.1093/infdis/jis205.

Stefanovic-Racic, Maja, Xiao Yang, Michael S. Turner, Benjamin S. Mantell, Donna B. Stolz, Tina L. Sumpter, Ian J. Sipula, et al. 2012. "Dendritic Cells Promote Macrophage Infiltration and Comprise a Substantial Proportion of Obesity-Associated Increases in CD11c+ Cells in Adipose Tissue and Liver." Diabetes 61 (9): 2330–39. doi:10.2337/db11-1523.

Steinman, Lawrence. 2007. "A Brief History of T(H)17, the First Major Revision in the T(H)1/T(H)2 Hypothesis of T Cell-Mediated Tissue Damage." Nature Medicine 13 (2): 139–45. doi:10.1038/nm1551.

Steinman, Ralph M. 2008. "Dendritic Cells In Vivo: A Key Target for a New Vaccine Science." Immunity 29 (3): 319–24. doi:10.1016/j.immuni.2008.08.001.

Stockenstrom, Susanne von, Lina Odevall, Eunok Lee, Elizabeth Sinclair, Peter Bacchetti, Maudi Killian, Lorrie Epling, et al. 2015. "Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool During Effective HIV Therapy." The Journal of Infectious Diseases 212 (4): 596–607. doi:10.1093/infdis/jiv092.

Strain, Matthew C., Susan J. Little, Eric S. Daar, Diane V. Havlir, Huldrych F. Gunthard, Ruby Y. Lam, Otto A. Daly, et al. 2005. "Effect of Treatment, during Primary Infection, on Establishment and Clearance of Cellular Reservoirs of HIV-1." The Journal of Infectious Diseases 191 (9): 1410–18. doi:10.1086/428777.

Strem, Brian M., Kevin C. Hicok, Min Zhu, Isabella Wulur, Zeni Alfonso, Ronda E. Schreiber, John K. Fraser, and Marc H. Hedrick. 2005. "Multipotential Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells." The Keio Journal of Medicine 54 (3): 132–41.

Sugimoto, Ken, Atsuhiro Ogawa, Emiko Mizoguchi, Yasuyo Shimomura, Akira Andoh, Atul K. Bhan, Richard S. Blumberg, Ramnik J. Xavier, and Atsushi Mizoguchi. 2008. "IL-22 Ameliorates Intestinal Inflammation in a Mouse Model of Ulcerative Colitis." The Journal of Clinical Investigation 118 (2): 534–44. doi:10.1172/JCI33194.

Swanstrom, Ronald, and John Coffin. 2012. "HIV-1 Pathogenesis: The Virus." Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 2 (12). doi:10.1101/cshperspect.a007443.

Swiggard, William J., Clifford Baytop, Jianqing J. Yu, Jihong Dai, Chuanzhao Li, Richard Schretzenmair, Ted Theodosopoulos, and Una O'Doherty. 2005. "Human Immunodeficiency Virus Type 1 Can Establish Latent Infection in Resting CD4+ T Cells in the Absence of Activating Stimuli." Journal of Virology 79 (22): 14179–88. doi:10.1128/JVI.79.22.14179-14188.2005.

Swingler, Simon, Angela M. Mann, Jin Zhou, Catherine Swingler, and Mario Stevenson. 2007. "Apoptotic Killing of HIV-1-Infected Macrophages Is Subverted by the Viral Envelope Glycoprotein." PLoS Pathogens 3 (9): 1281–90. doi:10.1371/journal.ppat.0030134.

Tabb, Brian, David R. Morcock, Charles M. Trubey, Octavio A. Quiñones, Xing Pei Hao, Jeremy Smedley, Rhonda Macallister, et al. 2013. "Reduced Inflammation and Lymphoid Tissue Immunopathology in Rhesus Macaques Receiving Anti-Tumor Necrosis Factor Treatment during Primary Simian Immunodeficiency Virus Infection." The Journal of Infectious Diseases 207 (6): 880–92. doi:10.1093/infdis/jis643.

Taiwo, B., R. M. Matining, L. Zheng, M. M. Lederman, C. R. Rinaldo, P. S. Kim, B. I. Berzins, et al. 2013. "Associations of T Cell Activation and Inflammatory Biomarkers with Virological Response to Darunavir/Ritonavir plus Raltegravir Therapy." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 68 (8): 1857–61. doi:10.1093/jac/dkt120.

Tan, Chong Yew, and Antonio Vidal-Puig. 2008. "Adipose Tissue Expandability: The Metabolic Problems of Obesity May Arise from the Inability to Become More Obese." Biochemical Society Transactions 36 (Pt 5): 935–40. doi:10.1042/BST0360935.

Tancrède, C. H., and A. O. Andremont. 1985. "Bacterial Translocation and Gram-Negative Bacteremia in Patients with Hematological Malignancies." The Journal of Infectious Diseases 152 (1): 99–103.

Tedaldi, Ellen M., John T. Brooks, Paul J. Weidle, James T. Richardson, Rose K. Baker, Kate Buchacz, Anne C. Moorman, Kathleen C. Wood, Scott D. Holmberg, and HOPS Investigators. 2006. "Increased Body Mass Index Does Not Alter Response to Initial Highly Active Antiretroviral Therapy in HIV-1-Infected Patients." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999) 43 (1): 35–41. doi:10.1097/01.qai.0000234084.11291.d4.

Tenorio, A. R., Y. Zheng, R. J. Bosch, S. Krishnan, B. Rodriguez, P. W. Hunt, J. Plants, et al. 2014. "Soluble Markers of Inflammation and Coagulation but Not T-Cell Activation Predict Non-AIDS-Defining Morbid Events During Suppressive Antiretroviral Treatment." Journal of Infectious Diseases 210 (8): 1248–59. doi:10.1093/infdis/jiu254.

Tough, D. F., and J. Sprent. 1998. "Lifespan of Gamma/Delta T Cells." The Journal of Experimental Medicine 187 (3): 357–65.

Tran, Khanh-Van, Olga Gealekman, Andrea Frontini, Maria Cristina Zingaretti, Manrico Morroni, Antonio Giordano, Arianna Smorlesi, et al. 2012. "The Vascular Endothelium of the Adipose Tissue Give Rise to Both White and Brown Fat Cells." Cell Metabolism 15 (2): 222–29. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.008.

Tran, Tu-Anh, Marie-Ghislaine de Goër de Herve, Houria Hendel-Chavez, Bamory Dembele, Emilie Le Névot, Karim Abbed, Coralie Pallier, et al. 2008. "Resting Regulatory CD4 T Cells: A Site of HIV Persistence in Patients on Long-Term Effective Antiretroviral Therapy." PLoS ONE 3 (10). doi:10.1371/journal.pone.0003305.

Trautmann, Lydie, Loury Janbazian, Nicolas Chomont, Elias A. Said, Sylvain Gimmig, Benoit Bessette, Mohamed-Rachid Boulassel, et al. 2006. "Upregulation of PD-1 Expression on HIV-Specific CD8+ T Cells Leads to Reversible Immune Dysfunction." Nature Medicine 12 (10): 1198–1202. doi:10.1038/nm1482.

Triant, Virginia A., Hang Lee, Colleen Hadigan, and Steven K. Grinspoon. 2007. "Increased Acute Myocardial Infarction Rates and Cardiovascular Risk Factors among Patients with Human Immunodeficiency Virus Disease." The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 92 (7): 2506–12. doi:10.1210/jc.2006-2190.

Turnbaugh, Peter J., Ruth E. Ley, Michael A. Mahowald, Vincent Magrini, Elaine R. Mardis, and Jeffrey I. Gordon. 2006. "An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest." Nature 444 (7122): 1027–31. doi:10.1038/nature05414.

Vabret, Nicolas, Marc Bailly-Bechet, Valérie Najburg, Michaela Müller-Trutwin, Bernard Verrier, and Frédéric Tangy. 2012. "The Biased Nucleotide Composition of HIV-1 Triggers Type

I Interferon Response and Correlates with Subtype D Increased Pathogenicity." PloS One 7 (4): e33502. doi:10.1371/journal.pone.0033502.

Vachharajani, Vidula, and D. Neil Granger. 2009. "Adipose Tissue: A Motor for the Inflammation Associated with Obesity." IUBMB Life 61 (4): 424–30. doi:10.1002/iub.169.

Veazey, R. S., M. DeMaria, L. V. Chalifoux, D. E. Shvetz, D. R. Pauley, H. L. Knight, M. Rosenzweig, R. P. Johnson, R. C. Desrosiers, and A. A. Lackner. 1998. "Gastrointestinal Tract as a Major Site of CD4+ T Cell Depletion and Viral Replication in SIV Infection." Science (New York, N.Y.) 280 (5362): 427–31.

Velu, Vijayakumar, Sunil Kannanganat, Chris Ibegbu, Lakshmi Chennareddi, Francois Villinger, Gordon J. Freeman, Rafi Ahmed, and Rama Rao Amara. 2007. "Elevated Expression Levels of Inhibitory Receptor Programmed Death 1 on Simian Immunodeficiency Virus-Specific CD8 T Cells during Chronic Infection but Not after Vaccination." Journal of Virology 81 (11): 5819–28. doi:10.1128/JVI.00024-07.

Vernochet, Cécile, Stéphane Azoulay, Daniele Duval, Roger Guedj, Françoise Cottrez, Hubert Vidal, Gérard Ailhaud, and Christian Dani. 2005a. "Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitors Accumulate into Cultured Human Adipocytes and Alter Expression of Adipocytokines." The Journal of Biological Chemistry 280 (3): 2238–43. doi:10.1074/jbc.M408687200.

———. 2005b. "Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitors Accumulate into Cultured Human Adipocytes and Alter Expression of Adipocytokines." The Journal of Biological Chemistry 280 (3): 2238–43. doi:10.1074/jbc.M408687200.

Viel, Sébastien, Laurie Besson, Emily Charrier, Antoine Marçais, Emmanuel Disse, Jacques Bienvenu, Thierry Walzer, and Charles Dumontet. 2017. "Alteration of Natural Killer Cell Phenotype and Function in Obese Individuals." Clinical Immunology. Accessed January 13. doi:10.1016/j.clim.2016.01.007.

Villaret, Aurélie, Romy Walther, Max Lafontan, and Anne Bouloumié. 2011. "Les Cellules Endothéliales Du Tissu Adipeux." Cahiers de Nutrition et de Diététique 46 (5): 234–39. doi:10.1016/j.cnd.2011.06.005.

Villar-Garcia, Judit, Juan J. Hernandez, Robert Gueerri-Fernandez, Alicia Gonzalez, Elisabet Lerma, Ana Guelar, David Saenz, et al. 2015. "Effect of Probiotics (Saccharomyces Boulardii) on Microbial Translocation and Inflammation in HIV-Treated Patients: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial." Jaids-Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes 68 (3): 256–63. doi:10.1097/QAI.0000000000000468.

Villarroya, F., P. Domingo, and M. Giralt. 2007. "Lipodystrophy in HIV 1-Infected Patients: Lessons for Obesity Research." International Journal of Obesity 31 (12): 1763–76. doi:10.1038/sj.ijo.0803698.

Villinger, F., T. Rowe, B. S. Parekh, T. A. Green, A. E. Mayne, B. Grimm, H. M. McClure, et al. 2001. "Chronic Immune Stimulation Accelerates SIV-Induced Disease Progression." Journal of Medical Primatology 30 (5): 254–59.

Vos, Alinda G., Annelieke Hulzebosch, Diederick E. Grobbee, Roos E. Barth, and Kerstin Klipstein-Grobusch. 2017. "Association between Immune Markers and Surrogate Markers of Cardiovascular Disease in HIV Positive Patients: A Systematic Review." Edited by Carmine Pizzi. PLOS ONE 12 (1): e0169986. doi:10.1371/journal.pone.0169986.

Wada, Nikolas Itaru, Lisa P Jacobson, Joseph B Margolick, Elizabeth Crabb Breen, Bernard Macatangay, Sudhir Penugonda, Otoniel Martínez-Maza, and Jay H Bream. 2015. "The Effect of HAART-Induced HIV Suppression on Circulating Markers of Inflammation and Immune Activation." AIDS (London, England) 29 (4): 463–71. doi:10.1097/QAD.0000000000000545.

Wagner, Thor A., Sherry McLaughlin, Kavita Garg, Charles Y. K. Cheung, Brendan B. Larsen, Sheila Styrchak, Hannah C. Huang, Paul T. Edlefsen, James I. Mullins, and Lisa M. Frenkel. 2014. "HIV Latency. Proliferation of Cells with HIV Integrated into Cancer Genes

Contributes to Persistent Infection." Science (New York, N.Y.) 345 (6196): 570–73. doi:10.1126/science.1256304.

Wajchenberg, Bernardo Léo. 2000. "Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome." Endocrine Reviews 21 (6): 697–738. doi:10.1210/edrv.21.6.0415.

Walensky, Rochelle P., A. David Paltiel, Elena Losina, Lauren M. Mercincavage, Bruce R. Schackman, Paul E. Sax, Milton C. Weinstein, and Kenneth A. Freedberg. 2006. "The Survival Benefits of AIDS Treatment in the United States." The Journal of Infectious Diseases 194 (1): 11–19. doi:10.1086/505147.

Weisberg, Stuart P., Daniel McCann, Manisha Desai, Michael Rosenbaum, Rudolph L. Leibel, and Anthony W. Ferrante. 2003. "Obesity Is Associated with Macrophage Accumulation in Adipose Tissue." The Journal of Clinical Investigation 112 (12): 1796–1808. doi:10.1172/JCI19246.

Wellen, Kathryn E., and Gökhan S. Hotamisligil. 2005. "Inflammation, Stress, and Diabetes." The Journal of Clinical Investigation 115 (5): 1111–19. doi:10.1172/JCI25102.

Wensveen, Felix M., Vedrana Jelenčić, Sonja Valentić, Marko Šestan, Tamara Turk Wensveen, Sebastian Theurich, Ariella Glasner, et al. 2015. "NK Cells Link Obesity-Induced Adipose Stress to Inflammation and Insulin Resistance." Nature Immunology 16 (4): 376–85. doi:10.1038/ni.3120.

Wherry, E. John. 2011. "T Cell Exhaustion." Nature Immunology 12 (6): 492–99.

Whitney, James B., Alison L. Hill, Srisowmya Sanisetty, Pablo Penaloza-MacMaster, Jinyan Liu, Mayuri Shetty, Lily Parenteau, et al. 2014. "Rapid Seeding of the Viral Reservoir prior to SIV Viraemia in Rhesus Monkeys." Nature 512 (7512): 74–77. doi:10.1038/nature13594.

Wightman, Fiona, Ajantha Solomon, Gabriela Khoury, Justin A. Green, Lachlan Gray, Paul R. Gorry, Yung Shwen Ho, et al. 2010. "Both CD31+ and CD31- Naive CD4+ T Cells Are Persistent HIV Type 1-Infected Reservoirs in Individuals Receiving Antiretroviral Therapy." Journal of Infectious Diseases 202 (11): 1738–48. doi:10.1086/656721.

Wijewardana, Viskam, Jan Kristoff, Cuiling Xu, Dongzhu Ma, George Haret-Richter, Jennifer L. Stock, Benjamin B. Policicchio, et al. 2013. "Kinetics of Myeloid Dendritic Cell Trafficking and Activation: Impact on Progressive, Nonprogressive and Controlled SIV Infections." PLoS Pathogens 9 (10): e1003600. doi:10.1371/journal.ppat.1003600.

Williams, James P., Jacob Hurst, Wolfgang Stöhr, Nicola Robinson, Helen Brown, Martin Fisher, Sabine Kinloch, et al. 2014. "HIV-1 DNA Predicts Disease Progression and Post-Treatment Virological Control." eLife 3: e03821. doi:10.7554/eLife.03821.

Williams, Kenneth C., and William F. Hickey. 2002. "Central Nervous System Damage, Monocytes and Macrophages, and Neurological Disorders in AIDS." Annual Review of Neuroscience 25: 537–62. doi:10.1146/annurev.neuro.25.112701.142822.

Wilson, Craig M., Jonas H. Ellenberg, Steven D. Douglas, Anna-Barbara Moscicki, Christie A. Holland, and Reach Project Of The Adolescent Medicine HIV/AIDS Research Network. 2004. "CD8+CD38+ T Cells but Not HIV Type 1 RNA Viral Load Predict CD4+ T Cell Loss in a Predominantly Minority Female HIV+ Adolescent Population." AIDS Research and Human Retroviruses 20 (3): 263–69. doi:10.1089/088922204322996482.

Windt, Gerritje J. W. van der, Bart Everts, Chih-Hao Chang, Jonathan D. Curtis, Tori C. Freitas, Eyal Amiel, Edward J. Pearce, and Erika L. Pearce. 2012. "Mitochondrial Respiratory Capacity Is a Critical Regulator of CD8+ T Cell Memory Development." Immunity 36 (1): 68–78. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.007.

Winer, Shawn, Yin Chan, Geoffrey Paltser, Dorothy Truong, Hubert Tsui, Jasmine Bahrami, Ruslan Dorfman, et al. 2009. "Normalization of Obesity-Associated Insulin Resistance through Immunotherapy." Nature Medicine 15 (8): 921–29. doi:10.1038/nm.2001.

Wolf, Anna M., Dominik Wolf, Holger Rumpold, Barbara Enrich, and Herbert Tilg. 2004. "Adiponectin Induces the Anti-Inflammatory Cytokines IL-10 and IL-1RA in Human

Leukocytes." Biochemical and Biophysical Research Communications 323 (2): 630–35. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.145.

Wolochow, H., G. J. Hildebrand, and C. Lamanna. 1966. "Translocation of Microorganisms across the Intestinal Wall of the Rat: Effect of Microbial Size and Concentration." The Journal of Infectious Diseases 116 (4): 523–28.

Xiao, L, X Yang, Y Lin, S Li, J Jiang, S Qian, Q Tang, R He, and X Li. 2016. "Large Adipocytes Function as Antigen-Presenting Cells to Activate CD4+ T Cells via Upregulating MHCII in Obesity." International Journal of Obesity (2005) 40 (1): 112–20. doi:10.1038/ijo.2015.145.

Xu, Younong, Haiying Zhu, Carrie K. Wilcox, Angélique van't Wout, Thomas Andrus, Nicholas Llewellyn, Leonidas Stamatatos, James I. Mullins, Lawrence Corey, and Tuofu Zhu. 2008. "Blood Monocytes Harbor HIV Type 1 Strains with Diversified Phenotypes Including Macrophage-Specific CCR5 Virus." The Journal of Infectious Diseases 197 (2): 309–18. doi:10.1086/524847.

Yang, Hyunwon, Yun-Hee Youm, Bolormaa Vandanmagsar, Anthony Ravussin, Jeffrey M. Gimble, Frank Greenway, Jacqueline M. Stephens, Randall L. Mynatt, and Vishwa Deep Dixit. 2010. "Obesity Increases the Production of Proinflammatory Mediators from Adipose Tissue T Cells and Compromises TCR Repertoire Diversity: Implications for Systemic Inflammation and Insulin Resistance." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 185 (3): 1836–45. doi:10.4049/jimmunol.1000021.

Ye, P., P. B. Garvey, P. Zhang, S. Nelson, G. Bagby, W. R. Summer, P. Schwarzenberger, J. E. Shellito, and J. K. Kolls. 2001. "Interleukin-17 and Lung Host Defense against Klebsiella Pneumoniae Infection." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 25 (3): 335–40. doi:10.1165/ajrcmb.25.3.4424.

Youngblood, Ben, Alessandra Noto, Filippos Porichis, Rama S. Akondy, Zaza M. Ndhlovu, James W. Austin, Rebeka Bordi, et al. 2013. "Cutting Edge: Prolonged Exposure to HIV Reinforces a Poised Epigenetic Program for PD-1 Expression in Virus-Specific CD8 T Cells." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 191 (2): 540–44. doi:10.4049/jimmunol.1203161.

Yukl, Steven A., Amandeep K. Shergill, Terence Ho, Maudi Killian, Valerie Girling, Lorrie Epling, Peilin Li, et al. 2013. "The Distribution of HIV DNA and RNA in Cell Subsets Differs in Gut and Blood of HIV-Positive Patients on ART: Implications for Viral Persistence." The Journal of Infectious Diseases 208 (8): 1212–20. doi:10.1093/infdis/jit308.

Zajac, A. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, D. J. Sourdive, M. Suresh, J. D. Altman, and R. Ahmed. 1998. "Viral Immune Evasion due to Persistence of Activated T Cells without Effector Function." The Journal of Experimental Medicine 188 (12): 2205–13.

Zeng, Ming, Peter J. Southern, Cavan S. Reilly, Greg J. Beilman, Jeffrey G. Chipman, Timothy W. Schacker, and Ashley T. Haase. 2012. "Lymphoid Tissue Damage in HIV-1 Infection Depletes Naïve T Cells and Limits T Cell Reconstitution after Antiretroviral Therapy." PLoS Pathogens 8 (1): e1002437. doi:10.1371/journal.ppat.1002437.

Zeve, Daniel, Wei Tang, and Jon Graff. 2009. "Fighting Fat with Fat: The Expanding Field of Adipose Stem Cells." Cell Stem Cell 5 (5): 472–81. doi:10.1016/j.stem.2009.10.014.

Zhang, Ji-Yuan, Zheng Zhang, Xicheng Wang, Jun-Liang Fu, Jinxia Yao, Yanmei Jiao, Liangen Chen, et al. 2007. "PD-1 up-Regulation Is Correlated with HIV-Specific Memory CD8+ T-Cell Exhaustion in Typical Progressors but Not in Long-Term Nonprogressors." Blood 109 (11): 4671–78. doi:10.1182/blood-2006-09-044826.

Zhang, Ling-juan, Christian F. Guerrero-Juarez, Tissa Hata, Sagar P. Bapat, Raul Ramos, Maksim V. Plikus, and Richard L. Gallo. 2015. "Dermal Adipocytes Protect against Invasive Staphylococcus Aureus Skin Infection." Science (New York, N.Y.) 347 (6217): 67–71. doi:10.1126/science.1260972.

Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman. 1994. “Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue.” Nature 372 (6505): 425–32. doi:10.1038/372425a0.

Zhong, Peng, Luis M. Agosto, Anna Ilinskaya, Batsukh Dorjbal, Rosaline Truong, David Derse, Pradeep D. Uchil, Gisela Heidecker, and Walther Mothes. 2013. “Cell-to-Cell Transmission Can Overcome Multiple Donor and Target Cell Barriers Imposed on Cell-Free HIV.” PloS One 8 (1): e53138. doi:10.1371/journal.pone.0053138.

Ziegler-Heitbrock, Loems. 2007. “The CD14+ CD16+ Blood Monocytes: Their Role in Infection and Inflammation.” Journal of Leukocyte Biology 81 (3): 584–92. doi:10.1189/jlb.0806510.

Zonios, Dimitrios I., Judith Falloon, John E. Bennett, Pamela A. Shaw, Doreen Chaitt, Michael W. Baseler, Joseph W. Adelsberger, et al. 2008. “Idiopathic CD4+ Lymphocytopenia: Natural History and Prognostic Factors.” Blood 112 (2): 287–94. doi:10.1182/blood-2007-12-127878.

Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz, and M. H. Hedrick. 2001. “Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies.” Tissue Engineering 7 (2): 211–28. doi:10.1089/107632701300062859.

Zuk, Patricia A. 2010. “The Adipose-Derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead.” Molecular Biology of the Cell 21 (11): 1783–87. doi:10.1091/mbc.E09-07-0589.

Zulian, Alessandra, Raffaella Cancello, Chiara Ruocco, Davide Gentilini, Anna Maria Di Blasio, Piergiorgio Danelli, Giancarlo Micheletto, Elisabetta Cesana, and Cecilia Invitti. 2013. “Differences in Visceral Fat and Fat Bacterial Colonization between Ulcerative Colitis and Crohn’s Disease. An in Vivo and in Vitro Study.” PloS One 8 (10): e78495. doi:10.1371/journal.pone.0078495.

Zúñiga, Luis A., Wen-Jun Shen, Barbara Joyce-Shaikh, Ekaterina A. Pyatnova, Andrew G. Richards, Colin Thom, Sofia M. Andrade, Daniel J. Cua, Fredric B. Kraemer, and Eugene C. Butcher. 2010. “IL-17 Regulates Adipogenesis, Glucose Homeostasis, and Obesity.” Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 185 (11): 6947–59. doi:10.4049/jimmunol.1001269.