HAL
open science

Rôle du tissu adipeux dans les infections respiratoires par le virus Influenza ou la bactérie streptococcus pneumoniae

Asma Ayari

To cite this version:

Asma Ayari. Rôle du tissu adipeux dans les infections respiratoires par le virus Influenza ou la bactérie streptococcus pneumoniae. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS009 . tel-01986561

HAL Id: tel-01986561

https://theses.hal.science/tel-01986561

Submitted on 18 Jan 2019

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

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

Université de Lille

Thèse en vue de l'obtention du

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

Spécialité : Immuno-métabolisme

Rôle du tissu adipeux dans les infections respiratoires par le virus Influenza ou la bactérie *Streptococcus pneumoniae*

Présentée par Asma AYARI

Soutenue publiquement le 28 Juin 2018

Devant les membres du jury :

Dr. Nadia NAFFAKH	**Rapporteur**
Dr. Béatrice COUSIN	**Rapporteur**
Dr. Manuel ROSA-CALATRAVA	**Examinateur**
Pr. Anne MUHR-TAILLEUX	**Présidente du jury**
Dr. Isabelle WOLOWCZUK	**Directeur de thèse**
Dr. François TROTTEIN	**Directeur du Laboratoire**

Remerciements,

Tout d'abord je voudrais remercier le Pr. *Anne Muhr-Tailleux* d'avoir accepté de présider ma soutenance de thèse. Je remercie également le Dr. *Nadia Naffakh* ainsi que le Dr. *Béatrice cousin* d'avoir accepté de relire ma thèse, d'en être rapporteurs et de s'être déplacé de Paris et de Toulouse, respectivement. Je tiens à remercier le Dr. *Manuel Rosa-Calatrava* d'avoir accepté d'être examinateur et d'avoir pris la peine de se déplacer de Lyon vers Lille pour répondre présent. Je remercie également tous les membres du jury d'avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail.

Une soutenance de thèse est l'aboutissement d'un travail d'équipe dont les bases sont la motivation, la persévérance, la positivité, le labeur, la reconnaissance, la bonne entente et l'amour d'autrui.

Ce fut une longue aventure, où à son commencement je n'en voyais pas la fin, et qui au cours de laquelle j'ai pu côtoyer de nouvelles personnes et personnalités, qui ont façonné, chacune à sa manière, ces trois ans et demi de ma vie, et qui ont gravé dans ma mémoire des souvenirs que je n'oublierai jamais.

Mes remerciements vont en premier lieu et de toute évidence à mon directeur de thèse, le Dr. *Isabelle Wolowczuk*, qui m'a initié à la recherche, m'a permis de découvrir et d'apprendre au fil du temps, m'a continuellement poussé vers l'avant et m'a prodigué les conseils judicieux pour pouvoir mener à bien cette recherche.

Je voudrais également remercier le Dr. *François Trottein*, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et au sein de son équipe, d'avoir cru en moi et en mes compétences, et en m'offrant cette opportunité de connaître de plus près le monde de la recherche.

Je remercie nos collaborateurs les Drs. *Manuel Rosa-Calatrava*, *Ronan Le Goffic*, *Steve Lancel*, *David Blum* et *Emilie Faivre*, d'avoir pu travailler et apprendre avec eux dans les meilleures conditions.

Je remercie le Dr. *Corinne Grangette* et son équipe, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire pour la manipulation *in vitro*. Je remercie en particulier le Dr. *Jeanne Alard* pour tous les moments et les discussions partagées ensemble.

Mes remerciements s'adressent également à tous les chercheurs et les collègues de notre laboratoire :
Le Dr. *Jean-Claude Sirard*, d'avoir été de tout ouïe et qui m'offrait de bons conseils professionnels et personnels ;

Le Dr. *Christophe Paget*, d'avoir participé à ma formation, de m'avoir poussé vers l'avant, et surtout pour ses blagues bien pensées (ne change surtout pas !!) ;

Le Dr. *Muriel Pichavant*, dont j'apprécie la compagnie, merci pour ta positivité et les boosts que tu me donnes quand ça ne va pas trop ;

Le Dr. *Christelle Faveeuw*, d'avoir également participé à ma formation, et pour tous les bons moments qu'on a partagés ;

Le Dr. *Philippe Gosset*, pour les moments partagés à table, et pour tous les happy Friday qui cassent la routine ; grâce à vous j'ai appris qu'il y avait comme pour les femmes des blondes, des brunes et

des rousses (je ne suis pas sûre de la dernière) même pour les bières ! c'est ma formation Happy Friday ;

Le Dr. *Christophe Carnoy*, pour votre gentillesse et votre sourire que vous offrez sans compter, je vous admire beaucoup ;

Le Dr. *Emilie Fréale* pour toutes les discussions motivantes et enrichissantes que nous avons pu avoir ;

Le Dr. *Gaëlle Remy*, je te remercie d'avoir été là pour me supporter et pour tous les fous rires incontrolables qui te hantent des fois ;

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à mon amie et ma petite sœur *Daphnée Soulard*, merci d'avoir été là et merci pour tous les beaux moments partagés ensemble au travail et en-dehors. Notre amitié est pour la vie ! Je remercie également ta moitié, *Pierre Maupilier*, dont la présence n'a fait que renforcer nos liens. Vous formez un très beau couple, je vous aime vraiment beaucoup !

A *Fahima Madouri*, Merci pour tout l'amour que tu portes pour moi et en particulier pour ma fille que tu aimes comme si c'était la tienne, comme tu le dis, ton petit bébé coeur.

Mélina Leroux, pour ta spontanéité et ta bonne humeur et pour les petits éclats de bonheur que tu nous apportes avec ton gâteau breton à la framboise ! (Une tuerie)

Je remercie le Dr. *Bachirou Koné*, 'Awnisorama', tu ne diras pas que je ne fais pas d'efforts pour apprendre à parler la langue du Mali. Merci pour ta bonne humeur et pour toutes les discussions constructives que nous avons pu partager ;

Je remercie *Olivia Barada*, ma voisine de bureau, pour tous les moments partagés ensemble, également *Valentin Sencio*, *Laura Matarazzo*, *Claire Davos*, *Delphine Cayet*, mes collègues de bureau vous allez me manquer.

A *Maya Hassane*, *Reem Ghinaghow* et *Ranin Bichara* j'ai adoré parler libanais et syrien avec vous les filles, comme si j'étais dans un film.

A *Sandra Weller*, ma petite Sandra, je te remercie pour tous les moments que nous avons partagé ensemble, j'ai vraiment une sacrée chance de t'avoir connu !

A *Maxime Paluche*, Tu ne me battras jamais en pâtisserie, quoi que tu te débrouilles pas mal!

Stéphanie Lejeune, *Lucie Deryuiter*, *Gwenola kervoaze* merci pour tout. A *Josette Fontaine* (Jo), notre maman du labo! A *Marie-José Ghoris*, pour toutes les fois où tu étais là, ta présence est suffisante.

Et pour terminer, je voudrais remercier toutes les personnes qui, au service de la scolarité de l'Université de Lille, en particulier Mme *Laurence Fofana*, Mme *Marion Beguin*, Mme *Hélène Herminet*, Mr. *François Delcroix* et Le président de l'école doctorale Mr. *Bernard Sablonnière*, qui ont permis que ce travail soit soutenu dans les meilleures conditions.

Je dédie cette thèse à ma famille, et à toutes les personnes qui sont chères à mon cœur.

A ma Tunisie, d'hier, d'aujourd'hui et de demain, je sais que le futur sera meilleur !

A ma mère, qui sans ses efforts, ses encouragements et son dévouement je ne serais pas arrivée là où je suis aujourd'hui. Tu es l'atout positif dans ma vie.

A mon défunt père, j'espère que tu es fier de moi là où tu es.

A mon mari, mon amour et mon ami, qui m'a soutenu tout au long de ce parcours.

A ma fille Eline, j'espère que tu seras fière de ta maman ma chérie !

A mon frère, qui est pour moi un ami et un père, tu es mon appui solide, qui je sais ne me lâchera jamais.

A ma sœur, tu es ma source d'inspiration et ma complice !

A mes neveux et nièces, vous êtes le plus beau cadeau de la vie !

A mes beaux parents, merci de m'avoir accueilli dans votre famille comme votre propre fille.

A mes belles sœurs et mes beaux frères, je vous aime.

Résumé

Longtemps décrit comme un simple tissu de réserve énergétique, le tissu adipeux blanc est, depuis l'identification de la leptine en 1994, considéré comme un véritable organe endocrine. En effet, ce tissu secrète de nombreuses hormones et cytokines agissant de manière paracrine et endocrine pour contrôler le métabolisme énergétique. Par ailleurs, en plus des préadipocytes et des adipocytes, le tissu adipeux blanc contient également des cellules immunes innées et adaptatives ; lui conférant ainsi un rôle important dans le développement et le contrôle de l'immunité. Cependant, le rôle joué par le tissu adipeux blanc dans les infections - notamment pulmonaires - reste encore peu étudié. C'est dans ce cadre général que s'est inscrit ce travail de Thèse.

La susceptibilité accrue des individus obèses (expansion du tissu adipeux blanc) à l'infection par le virus de la grippe (influenza) est largement étayée dans la littérature. Nous avons évalué l'impact de l'infection par le virus influenza sur le tissu adipeux blanc, chez des souris minces et des souris obèses. Nos résultats montrent que, de manière inattendue, le virus est détecté dans les tissus adipeux, sous-cutané (inguinal) et viscéral (périgonadique), de souris infectées par voie intra-nasale (détection du génome viral par RT-qPCR). La présence de virus dans le tissu adipeux est associée à l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires, à la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la lipolyse et la lipogénèse, et à l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'induction d'une réponse immune anti-virale. De manière intéressante, l'infection par le virus influenza est associée au brunissement du tissu adipeux sous-cutané chez les souris minces. Chez les souris obèses, l'infection par le virus de la grippe n'induit pas l'effet dépôt spécifique observé chez la souris mince et ne montre pas de brûnissement au niveau du tissu adipeux sous-cutané 7 jours p.i. *In vitro*, nous montrons que le virus influenza peut infecter les préadipocytes et les adipocytes (lignée murine et cellules primaires humaines). Cependant, alors que le virus effectue la totalité de son cycle dans l'adipocyte, le préadipocyte libère très peu, voire pas, de nouveaux virions infectieux (PCR, transcriptomique, technique de plages de lyse, microscopie confocale et électronique). Ainsi nos résultats, très originaux, identifient le tissu adipeux blanc comme un nouveau tissu cible de l'infection par le virus de la grippe, *in vivo*. Au sein de ce tissu, les préadipocytes et les adipocytes sont potentiellement infectés par le virus, comme le montrent nos données *in vitro*, les adipocytes seuls permettant la production de nouvelles particules infectieuses.

Contrairement à l'infection grippale, les données épidémiologiques et/ou expérimentales concernant la susceptibilité des obèses à l'infection par la bactérie *Streptococcus pneumoniae* sont contradictoires, du fait de l'utilisation de différents modèles d'obésité d'origine génétique et de sérotypes de pneumocoques. Dans ce projet, nous avons utilisé un modèle d'obésité d'origine nutritionnelle ; le modèle de souris nourries par un régime enrichi en lipides. Nous montrons que les souris obèses infectées (sérotype Sp1) développent un syndrome de type méningite, mortel, tandis que les souris minces contrôlent l'infection. Si les réponses pulmonaires à l'infection sont comparables entre les souris minces et obèses (dénombrement des colonies bactériennes, histologie, PCR, ELISA, cytométrie en flux), le nombre de bactéries dans le cerveau est significativement plus élevé chez les souris obèses, associé à une altération de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. L'analyse plus fine des cerveaux de souris obèses infectées par *Streptococcus pneumoniae* apportera des connaissances très précieuses quant à la physiopathologie de la méningite à streptocoque, infection très grave, voire mortelle, chez les jeunes enfants et les personnes âgées.

Mots clés : Tissu adipeux, virus Influenza, Grippe, *Streptococcus pneumoniae*, Obésité.

Summary

Since the identification of leptin in 1994, the white adipose tissue (WAT) is no longer considered to solely be an inert tissue storing fat. As an endocrine organ, the adipose tissue synthesizes and secretes several hormones and cytokines involved in the control of whole-body metabolism. In addition, besides preadipocytes and adipocytes, WAT also contains innate and adaptive immune cells; thereby contributing to the development and control of immunity. However, the role played by the adipose tissue during infections - notably during pulmonary infections, such as those resulting from influenza virus or *Streptococcus pneumoniae* infections - has barely been investigated. This defines the general scope of this work.

Epidemiological and experimental data convincingly report that obese individuals are more susceptible to influenza infection. During this project, we therefore questioned whether influenza infection may impact on adipose tissues, both subcutaneous (inguinal, SCAT) and visceral (perigonadal, EWAT) depots, in lean and high-fat diet-induced obese mice. We unexpectedly showed that influenza virus is detected in SCAT and EWAT (quantification of the viral genome by RT-qPCR) and that this was associated with drastic changes in the tissue such as: increased secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines, decreased expression of genes involved in lipogenesis and lipolysis, as well as increased expression of genes related to the induction of anti-viral immunity. Interestingly enough, influenza infection was associated with the development of brown-like adipocytes in the SCAT, only in lean animals. Moreover, we demonstrated *in vitro* that preadipocytes and adipocytes (murine cell-line and human primary cells) are permissive to infection, yet with different outcomes. Indeed, only adipocytes allowed the release of new infectious particles (RT-qPCR, transcriptomics, quantification of infectious particules on MDCK cells, confocal and transmission electron microscopy). Altogether, our findings revealed, for the first time, that the white adipose tissue, an organ at the crossroads of metabolism and immunity, is deeply affected by influenza infection and might thus be undervalued in influenza pathophysiology.

In opposite to influenza infection, the impact of obesity on the outcome of *Streptococcus pneumoniae* (*S.p.*) infection remains uncertain, due to the different models (genetically-based obesity, and bacterial strains) used. During this work, we investigated *S. pneumoniae* (Sp1 strain, sublethal dose) infection in lean and high-fat diet-induced obese mice. We showed that obese mice died from sublethal *S. pneumoniae* infection, compared to lean animals. The increased mortality induced by infection did not result from impaired pulmonary response but rather from the development of a meningitis-like syndrom likely resulting from an increased bacterial dissemination through the blood-brain barrier into the brain. We propose that the model of dietary obesity induced by consumption of fat-enriched diet, may be envisaged as a novel and valuable experimental model of memingitis to study *Streptococcus pneumoniae* travel through the blood-brain barrier and the subsequent immune consequences.

Key words: Adipose tissue, Influenza virus, *Streptococcus pneumoniae*, Obesity

Table des matières

Remerciements, ... **2**

Résumé **5**

Introduction **12**

Chapitre I : Les infections respiratoires

A. Infection respiratoire d'origine virale : Exemple de l'infection par le virus influenza A **14**

I. Généralités sur l'infection par le virus influenza **14**
1. Epidémies et pandémies 14
2. Evolution du virus de la grippe : glissement et cassure antigénique 15
3. Transmission et Symptômes 17
4. Tropisme cellulaire du virus influenza 18

II. Classification des virus influenza en types et sous-types **20**

III. Structure des virus influenza **22**

IV. Cycle de réplication des virus influenza **24**
1. Attachement du virus à la cellule hôte et entrée du virus 24
2. Libération et entrée dans le noyau des RNPv 24
3. Transcription et réplication du génome viral 25
4. Traduction des protéines virales 25
5. Export des RNPv du noyau vers le cytoplasme 25
6. Assemblage et bourgeonnement du virus 25

V. Les facteurs de l'hôte essentiels à la réplication virale **26**

VI. Réponse de l'hôte à l'infection virale **29**
1. Reconnaissance du virus par les récepteurs de l'immunité innée 29
2. Immunité innée 32
3. Immunité adaptative 33

VII. Conséquences de l'infection par le virus influenza sur l'hôte **35**
1. Influenza et mitochondrie 35
2. Influenza et réticulum endoplasmique 37
3. Influenza et métabolisme cellulaire 37

B. Infection respiratoire d'origine bactérienne : Exemple de l'infection par *Streptococcus pneumoniae* **40**

I. Généralités sur l'infection par *Streptococcus pneumoniae* **40**
1. Epidémiologie 40
2. Transmission 40

II. Classification **41**

III. Structure de la bactérie **41**

IV. Les facteurs de virulence **43**
1. Les polysaccharides capsulaires 43
2. La pneumolysine et les autres facteurs de virulence 43

V. Colonisation des poumons par *Streptococcus pneumoniae* **44**

VI. Réponse pulmonaire à l'infection par le streptocoque **45**
1. Les senseurs de l'immunité innée 45
2. Les cellules de l'immunité innée 47
3. Les cellules de l'immunité adaptative 48

VII. L'invasion du système nerveux central par *Streptococcus pneumoniae* (Méningite) 49
1. La barrière hématoencéphalique (BHE) 49
2. Perméabilisation de la BHE et translocation cérébrale de *Streptococcus pneumoniae*. 50
3. Immunité dans le cerveau 52

Chapitre II. Le tissu adipeux blanc

I. Généralités sur le tissu adipeux blanc 54
II. Distribution anatomique du tissu adipeux blanc 55
III. Composition cellulaire du tissu adipeux blanc 57
1. Fraction adipocytaire 58
2. Fraction stromavasculaire 59
a. Les préadipocytes et l'adipogenèse 59
b. Les cellules immunes du tissu adipeux blanc 60
IV. Fonctions métaboliques du tissu adipeux blanc 60
1. La lipogenèse et la synthèse des triglycérides 60
2. La lipolyse 61
3. Régulation de la lipolyse et de la lipogenèse 62
V. Fonctions endocrines du tissu adipeux blanc 63
VI. Pathologies du tissu adipeux blanc : Exemple de l'obésité 66
1. Causes de l'obésité 64
2. Modifications du tissu adipeux blanc associées à l'obésité 65
3. Perturbations du système nerveux central associées à l'obésité 67
VII. Conversion du tissu adipeux blanc en tissu adipeux beige 68
1. Généralités 68
2. Rôle des cellules immunes dans le brûnissement du tissu adipeux blanc 69
3. Perspectives thérapeutiques du brunissement du tissu adipeux 73

Chapitre III. Tissu adipeux blanc et infections

I. Obésité et pathologies respiratoires d'origine infectieuse 75
II. Interaction entre le tissu adipeux blanc et les agents pathogènes 80
1. Parasites et tissu adipeux blanc 81
2. Bactéries, virus et tissu adipeux blanc 82

Matériels et Méthodes 85
I. Obésité et infection par la bactérie *Streptococcus pneumonia* 88
1. Modèle d'infection de souris minces ou obèses par *Streptococcus pneumonia* 88
2. Dénombrement des colonies bactériennes par la technique des CFUs 88
3. Analyse quantificative de l'expression des gènes par RT-qPCR 89
4. Quantification des protéines par ELISA 89
5. Dissection des différentes régions du cerveau 89
6. Préparation des organes pour la cytométrie en flux 90
7. Histologie des poumons 91
II. Tissu adipeux et infection par le virus de la grippe 91
1. Modèle d'infection de souris minces ou obèses par le virus Influenza, in vivo 91
2. Modèle d'infection de préadipocytes et d'adipocytes murins par le virus Influenza, *in vitro* 92
3. Quantification des particules virales infectieuses 93

4. Extraction d'ARN, rétrotranscription et PCR quantitative 93
5. Cytométrie en flux sur les cellules immunes du tissu adipeux 95
6. Analyse de la consommation d'oxygène et détermination des paramètres respiratoires des préadipocytes et adipocytes murins infectés 95
7. ELISA 97
8. Histologie du tissu adipeux 97
9. Western Blot 98
10. Microscopie confocale sur préadipocytes et adipocytes infectés ou non infectés 98
11. Analyse transcriptomique des préadipocytes et adipocytes infectés ou non infectés 99
12. Microscopie éléctronique sur les préadipocytes et adipocytes infectés ou non infectés 99
13. Analyses statistiques 100

Partie 1.Impact de l'obésité sur l'infection par la bactérie *Streptococcus pneumoniae* .. 102
1. Les souris obèses sont plus susceptibles à l'infection par la bactérie *Streptococcus pneumoniae* 103
2. Les souris obèses infectées par *S. pneumoniae* développent un syndrome de type méningite 106

Partie 2. Effets de l'infection par le virus de la grippe sur le tissu adipeux blanc 112
A. EFFET DE L'INFECTION PAR IAV SUR LE TISSU ADIPEUX DE SOURIS MINCES 113
I. L'infection de souris par le virus de la grippe modifie la masse et le profil sécrétoire du tissu adipeux blanc ainsi que l'expression des gènes clés du métabolisme lipidique 113
II. L'infection de souris par le virus de la grippe induit le brunissement ou « *browning* » du tissu adipeux sous-cutané 115
III. L'infection de souris par le virus de la grippe modifie sélectivement la nature des cellules immunes présentes dans le tissu adipeux sous-cutané 117
IV. Impact de l'infection par le virus de la grippe sur le métabolisme glucidique de la souris 118
V. Le virus de la grippe est détectable dans le tissu adipeux de souris infectées 121
VI. Les préadipocytes et les adipocytes murins sont permissifs à l'infection par le virus de la grippe *in vitro* 122
VII. Impact de l'infection par le virus de la grippe sur le métabolisme des préadipocytes et des adipocytes 126
VIII. Les préadipocytes et des adipocytes humains sont également permissifs à l'infection par le virus de la grippe *in vitro* 130
B. EFFET DE L'INFECTION PAR IAV SUR LE TISSU ADIPEUX DE SOURIS OBESES 133

Discussion 138

Liste des figures

Figure 1. Représentation des mécanismes d'évolution du virus influenza 16
Figure 2. Classification des virus de la famille des *Orthomyxoviridae* 21
Figure 3: Représentation schématique de la structure du virus influenza. 23
Figure 4. Schéma récapitulatif du cycle de réplication du virus influenza 26
Figure 5: Les facteurs de l'hôte intervenants dans la réplication du virus de la grippe, schéma proposé par Watanabe *et al.*, 2014. 28
Figure 6. Les trois classes de de PRRs impliqués dans la reconnaissance des l'ARN viral. 30
Figure 7. Induction de la réponse interféron par le virus de la grippe 31
Figure 8 Induction de l'immunité humorale et cellulaires 35
Figure 9. Morphologie et structure de la bactérie *S. pneumoniae* 42
Figure 10. Représentation des PRRs impliqués dans la reconnaissance de *Streptococcus pneumoniae* 46
Figure 11. Mécanisme de production d'IL-17A par les cellules T-γδ dans le modèle d'infection par *Streptococcus pneumoniae* 48
Figure 12. Localisation et organisation anatomique de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la barrière entre la circulation sanguine et le liquide céphalo-rachidien et le portail olfactif 50
Figure 13. L'invasion de *S. pneumoniae* et les différentes stratégies adoptées pour traverser la BHE 51
Figure 14. Activation de l'immunité dans le parenchyme cérébral : cas de l'infection par *Streptococcus pneumoniae* 53
Figure 15. Comparaison entre les différents dépôts de tissu adipeux blancs entre la souris (A) et l'Homme (B) 56
Figure 16. Le métabolisme lipidique contrôlé par le tissu adipeux 62
Figure 17. Les fonctions physiologiques des adipokines 66
Figure 18. Schéma représentatif des modulations immunes induites dans le tissu adipeux blanc au cours du développement de l'obésité 69
Figure 19. Représentation des différents types d'adipocytes de tissu adipeux blanc, beige et brun 73
Figure 20. Remodelage de la population immune dans le tissu adipeux blanc sous-cutané suite à l'induction par le froid 74
Figure 21. La susceptibilité accrue des obèses aux infections respiratoires virales, fongiques et bactériennes 77
Figure 22. Altération des défenses immunes contre le virus de la grippe en condition d'obésité. 79
Figure 23. Différentes localisations de certains parasites dans le tissu adipeux blanc. 81
Figure 24. Protocole expérimental d'infection de souris minces et obèses par *S. pneumoniae*.. 88
Figure 25. Localisation des différentes parties du cerveau étudiées. 90
Figure 26. Procédure expérimentale d'infection par le virus de la grippe H3N2 *in vivo* 91
Figure 27. Procédure expérimentale d'infection par le virus de la grippe H3N2 *in vitro* 92
Figure 28. Respirométrie sur cellules intactes : cinétique d'ajouts des substrats. 96
Figure 29. Respirométrie sur cellules perméabilisées : cinétique d'ajouts des substrats et inhibiteurs. 97
Figure 30. Les souris obèses sont plus susceptibles à l'infection par *S. pneumoniae* que les souris minces. 104
Figure 31. Réponse pulmonaire des souris minces ou obèses à l'infection par *S. pneumoniae*. 105

Figure 32. Quantification de la charge bactérienne et des sécrétions des cytokines pro-inflammatoires dans le broyat de cerveau des souris minces et obèses infectées par *S. pneumoniae*. 107
Figure 33. Quantification de l'expression de la jonction serrée *Clau 5* et de la *Gfap* et *Aif-1* dans le cerveau total. 108
Figure 35. Expression du gène *Clau5* dans les différentes zones du cerveau. 110
Figure 36. Expression des gènes *Aif1* et *GFAP* dans les différentes zones du cerveau. 111
Figure 37. Effet de l'infection par le virus Influenza sur le poids des souris etla masse du tissu adipeux sous-cutané et viscéral. 113
Figure 38. Effet de l'infection par le virus Influenza sur les secrétions de cytokines par le tissu adipeux blanc et l'expression des marqueurs métaboliques majeurs. 114
Figure 39. Analyse histomorphométrique du SCAT et de l'EWAT de souris non infectées ou infectées par le virus de la grippe. 115
Figure 40. Mise en évidence du brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané des souris infectées. 116
Figure 41. Détermination du pourcentage de cellules immunes innées (macrophages, neutrophiles et éosinophiles) dans le SCAT et l'EWAT. 118
Figure 42. Conséquences métaboliques de l'infection par le virus de la grippe. 120
Figure 43. Détection du génome viral et induction des senseurs viraux dans le tissu adipeux blanc. 121
Figure 44. Mise en évidence de la permissivité des préadipocytes et des adipocytes à l'infection par virus influenza, *in vitro*. 124
Figure 45. Comparaison de la mortalité, de l'expression des protéines virales et de la libération de nouveaux virions entre les préadipocytes et les adipocytes. 125
Figure 46. Comparaison de la respiration cellulaire et mitochondriale des préadipocytes des adipocytes non infectés. 127
Figure 47. Effets de l'infection par le virus influenza sur la respiration des préadipocytes et des adipocytes 128
Figure 48. Comparaison des profils d'expression entre préadipocytes et des adipocytes infectés et non-infectés. 130
Figure 49. Les adipocytes et les préadipocytes humains sont permissifs à l'infection par le virus de la grippe. 132
Figure 50. Effet de l'infection de souris obèses par le virus Influenza sur les secrétions de cytokines par le tissu adipeux blanc et l'expression des marqueurs métaboliques majeurs. 134
Figure 51. Analyse histomorphométrique du SCAT et de l'EWAT de souris obèses non infectées et infectées par le virus de la grippe. 135
Figure 52. Détection du génome viral et induction des senseurs viraux dans le tissu adipeux blanc des souris obèses. 136
Figure 53. Schéma récapitulatif hypothétique de l'effet de l'infection par le virus de la grippe sur les deux dépôts de tissu adipeux blanc. 155

Introduction

Chapitre I : Les infections respiratoires

Les infections des voies respiratoires constituent l'un des problèmes cliniques et de santé publique les plus importants à l'échelle mondiale. Leur prise en charge est généralement inadéquate compte tenu de l'administration parfois inappropriée d'antibiotiques associée à un mauvais pronostic médical, à la possible transmissions des pathogènes en milieu hospitalier et à la résistance aux antibiotiques. Les infections respiratoires aigues, notamment les pneumonies, peuvent être fatales en particulier pour les enfants âgés de moins de 5 ans (en 2017, 1,9 millions d'enfants sont décédés à la suite d'infections pulmonaires aigues dans le monde, dont 70% en Afrique et en Asie) **(Williams *et al*., 2002 ; Cox *et al*., 2017)**. Les infections du tractus respiratoire supérieur, telles que la nasopharyngite, la pharyngite et l'otite, sont responsables de plus de 80% des cas d'infections respiratoires et les personnes les plus sujettes au développement des formes sévères de l'infection sont les jeunes enfants (<5 ans) et les personnes âgées (>60 ans).

Les infections du tractus respiratoire supérieur sont majoritairement d'origine virale (rhinovirus, coronavirus, parainfluenza, influenza) et ne nécessitent donc pas de traitement par des antibiotiques **(Cotton *et al*., 2008)**. A l'inverse, les infections respiratoires d'origine bactérienne, qui résultent de l'infection par *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus Pyrogenes,* sont responsables de formes sévères de la maladie (pneumonie, bronchites) et nécessitent une antibiothérapie **(Jain *et al*., 2001)**.

Dans ce projet de thèse, nous avons travaillé sur deux modèles d'infections respiratoires : l'infection par le virus influenza de type A (IAV), et plus spécifiquement le sous-type H3N2, responsable de la grippe saisonnière, et l'infection par la bactérie *Streptococcus pneumoniae,* et plus spécifiquement le type 1 (Sp1). Au sein du laboratoire, les modèles d'infection de souris par IAV et Sp1 sont en effet parfaitement caractérisés, à la fois au niveau infectieux et immunologique.

Nous avons questionné, au cours de nos travaux, l'impact éventuel de l'infection par H3N2 ou Sp1 sur le métabolisme et/ou sur le tissu adipeux blanc, régulateur majeur du métabolisme.

A. Infection respiratoire d'origine virale : Exemple de l'infection par le virus influenza A

Le virus influenza de type A est responsable de pathologies respiratoires très contagieuses et est à l'origine de plusieurs épidémies et pandémies au cours de l'histoire. Le mot influenza dérive du mot italien « influence », ce qui est en lien avec la cause de la maladie, initialement attribuée à une influence astrologique négative. Les avancées en médecine ont fait que cet intitulé a changé pour devenir « *Influenza del Freddo* » ([sous] l'influence du froid) puis grippe ou influenza au cours des XIVème et XVème siècles **(Potter, 2001)**.

I. Généralités sur l'infection par le virus influenza

1. Epidémies et pandémies

La grippe est une maladie très contagieuse qui évolue sur un mode épidémique, voire pandémique (surtout en hiver). Les symptômes associés à la grippe ont été décrits pour la première fois par Hippocrate, il y a 2400 ans. Malgré la présence d'évidences historiques d'infection par le virus de la grippe, il est toutefois difficile de réaliser une traçabilité exacte du fait que les symptômes provoqués par la grippe sont similaires à ceux induits par d'autres infections respiratoires. Les pandémies continuaient à apparaitre de façon sporadique au cours des XVIIème et XVIIIème siècles **(Pappas *et al.*, 2008)**. L'épidémie la plus documentée et la plus létale depuis, fut la grippe espagnole, causée par le virus influenza A de sous-type H1N1 (1918-1919) et qui a été responsable de la mort de 40 à 50 millions de personnes (Taux de mortalité 2-2,5%) **(Laver et Garman, 2002 ; Medina, 2018)**. Cette épidémie avait été décrite comme « *le plus grand Holocauste Médical de l'histoire humaine* » **(Barry, 2004 ; Krammer *et al.*, 2018)**. Cette forte mortalité (en particulier chez les jeunes adultes (20-40 ans)) résultait d'un taux d'infection supérieur à 50% et à la sévérité des symptômes associés. En effet, les symptômes étaient si inhabituels, qu'ils avaient été confondus avec ceux associés à la dengue, le choléra ou la typhoïde. Il a été également rapporté que les personnes atteintes présentaient des hémorragies des muqueuses particulièrement au niveau du nez, des intestins, de l'estomac et des saignements au niveau des oreilles et de la peau. La majorité des décès étaient dus à la surinfection bactérienne, mais aussi au virus qui, à lui seul, a causé beaucoup de décès suite aux œdèmes et à l'hémorragie qu'il causait **(Taubenberger et Morens, 2006)**.

Les pandémies grippales qui ont suivi n'ont pas été aussi virulentes : la grippe asiatique, 1957 (type A, H2N2) et la grippe de Hong Kong, 1968 (type A, H3N2). En effet, l'utilisation des antibiotiques a permis d'atténuer la sévérité de la maladie en contrôlant la surinfection bactérienne qui survient souvent après l'infection grippale. Cependant, la découverte la plus significative pour la prévention

contre la grippe fut celle du vaccin antigrippal élaborée par *Thomas Francis* **(Francis, 1953)** et basé sur les travaux de l'australien *Frank Macfarlane Burnet* **(Burnet, 1940)**, qui a montré que le virus de influenza pouvait perdre sa virulence après avoir été cultivé dans des œufs de poule embryonnés. Le virus de la grippe a été isolé pour la première fois chez l'humain en 1933 par le groupe mené par *Patrick Laidlaw* dans le *Medical Research Council* en Grande-Bretagne et ce n'est qu'en 1935 que la nature non cellulaire du virus a été recensée **(Potter, 2001 ; Barberis *et al*., 2016)**.

La première pandémie du XXIème siècle a été causée par le virus H1N1. Survenue en Avril 2009, entre 46 à 86 millions de personnes ont été infectées et 556 décès ont été dénombrés en Août 2009 (0,056% de mortalité) **(Simonsen *et al*., 2013; Al-Muharrmi, 2010)**.

Les épidémies de grippe saisonnière affectent de 3 à 5 millions de personnes et sont responsables de 250000 à 500000 décès annuels dans le monde. La transmission du virus influenza se fait le plus souvent en hiver (dans les régions tempérées de l'hémisphère nord), et la saison du déclenchement de la grippe saisonnière peut commencer très tôt en Octobre pour atteindre son maximum entre Janvier et Février **(WHO, 2016)**.

2. Evolution du virus de la grippe : glissement et cassure antigénique

Les virus de la grippe, surtout les virus de type A, est doté d'une très grande variabilité génétique. Il en résulte que les virus changent continuellement leurs antigènes de surface, ce qui est à l'origine des vagues de grippes saisonnières, des épidémies et des pandémies. Sous la pression de sélection de la réponse anticorps, les glycoprotéines majeures de surface (HA (hémagglutinine) et NA (neuraminidase)) évoluent, ce qui assure la diversification antigénique des sous-types du virus de la grippe. Les hémagglutinines et les neuraminidases sont soumises à des variations antigéniques indépendantes. Il existe deux mécanismes distincts : le glissement antigénique (dérive génétique, *shift*) et la cassure antigénique (réassortiment, *drift*).

Les glissements antigéniques surviennent tous les ans ou tous les deux ans et correspondent à des modifications légères de HA ou NA. Ils déterminent l'apparition de nouveaux variants qui échappent aux anticorps induits dans la population humaine par les virus précédents, et définissent donc la variabilité génétique des virus grippaux. Le glissement antigénique résulte essentiellement de mutations ponctuelles qui surviennent à la suite d'erreurs aléatoires (1/10000 nucléotides) de l'ARN-polymérase ARN dépendante, laquelle n'est pas dotée d'une fonction de correction **(Lowen *et al*., 2017)**. Parmi les virus influenza de type A, le virus H5N1 présente une forte dérive génétique **(Su *et al*., 2015)**.

Les pandémies, quant à elles, résultent de modifications beaucoup plus importantes que l'on appelle cassure (ou saut) antigénique qui est rendue possible par le caractère segmenté du génome des virus grippaux. La cassure antigénique est à l'origine de l'apparition de nouveaux sous-types de HA ou NA (16 HA et 9 NA) du virus et est généralement le résultat d'un phénomène de recombinaison génétique qui correspond à des échanges de segments de génome viral entre deux ou plusieurs sous-types de virus lors de la co-infection du même hôte. L'apparition de la grippe asiatique (H2N2) en 1957 et de la grippe de Hong Kong (H3N2) en 1968 est le résultat de ce type de recombinaisons génétiques **(Van de Sandt *et al.*, 2012)**.

L'accumulation de mutations peut également être à l'origine de l'apparition de nouveaux sous-types de virus, comme pour le virus H1N1 (qui a causé la pandémie de 1918 (grippe espagnole)), qui est avant tout un virus réassortant, initialement identifié comme étant d'origine aviaire **(Watanabe *et al.*, 2014)**. Cependant, des analyses phylogénétiques plus récentes ont montré que ce virus serait plutôt le résultats de multiples réassortiments entre virus porcins et virus humains circulant avant 1918 **(Anhlan *et al.*, 2011)**.

Le sous-type H3N2 (qui a émergé en 1968) est, quant à lui, le résultat d'un glissement antigénique à partir du sous-type H2N2 et d'un réassortiment de différents sous-types viraux **(Guan *et al.*, 2010)**. Il est identifié comme un virus responsable de grippe saisonnière à cause de sa récurrence, et il est capable d'infecter les espèces aviaires et mammifères **(Zhou *et al.*, 1999 ; Nelson *et al.*, 2012)**.

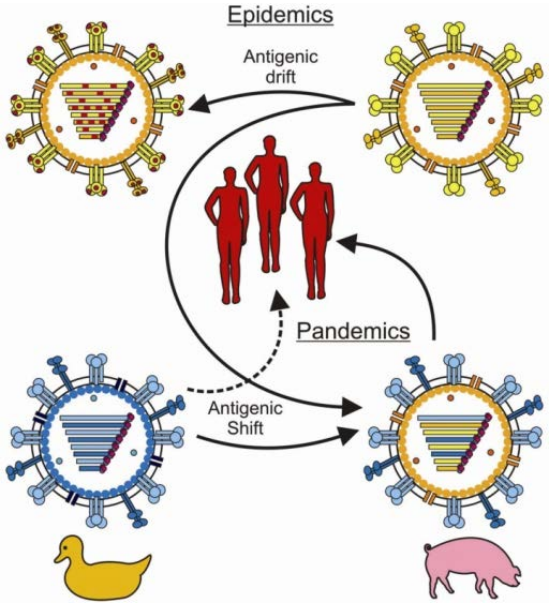

Figure 1. Représentation des mécanismes d'évolution du virus influenza (Van de Sandt *et al.*, 2012).

Les mécanismes d'échappement viral correspondent au glissement (*shift*) ou à la cassure (*drift*) antigéniques. Le glissement antigénique consiste en l'accumulation des mutations au niveau de la protéine de surface HA, permettant ainsi au virus d'échapper à la reconnaissance par les anticorps neutralisants. L'introduction de nouvelles souches virales dans la population humaine correspond au phénomène de cassure antigénique qui est à l'origine des pandémies.

3. Transmission et Symptômes

Les virus influenza sont très contagieux et facilement transmis. La transmission se fait par l'intermédiaire des aérosols, ou de projections de sécrétions respiratoires (goutelettes) générées par la personne infectée **(Couch *et al.*, 1996)**. Le virus influenza atteint son pic de réplication 48h après l'infection puis la réplication diminue graduellement sur une durée de 6 jours en moyenne. La période entre la phase d'infection jusqu'à la résolution de l'inflammation et la clairance virale peut s'étendre sur une durée de 10 à 14 jours selon les cas **(Mulder et Hers, 1972)**.

Les complications respiratoires associées à l'infection par le virus influenza sont différentes selon que l'infection touche le tractus respiratoire supérieur ou inférieur. L'infection du tractus respiratoire supérieur, qui implique généralement les virus influenza humains, s'accompagne de fièvre, courbatures, migraines, écoulement nasal, inflammation de la trachée, toux et éternuement **(Taubenberger et Morens, 2008 ; Boyd *et al.*, 2006)**. Cependant, cette infection peut toucher le poumon en profondeur induisant une pneumonie virale chez les personnes présentant une susceptibilité augmentée à l'infection grippale (personnes agées et immunodéprimées) **(Rello et Pop-Vicas, 2009)**.

Les virus aviaires qui affectent majoritairement les voies respiratoires inférieures sont responsables de formes plus sévères de l'infection et se manifestent par des symptômes spécifiques à l'infection profonde du parenchyme pulmonaire (pneumonies virales), tels que la bronchite, l'œdème, la fatigue et l'essoufflement **(Sellers *et al.*, 2017)**. Du fait de la barrière d'espèce, les pneumonies virales dues à un virus aviaire (cas d'infection par les virus aviaires H5N1 et H7N9) demeurent sporadiques. Les complications souvent associées à l'infection grippale sont les surinfections bactériennes et dans certains cas plus rares le développement d'encéphalites **(Banning, 2005)**.

La majorité des manifestations extra-pulmonaires surviennent durant la phase aigue de l'infection. Cependant, dans certains cas rares, ces complications peuvent se présenter à distance de l'infection, après des semaines ou même des mois (syndrôme de Guillain-Barré, cardiopathies ischémiques, maladies cardiovasculaires, infections oculaires (conjonctivite), infections gastro-intestinales (diarrhées)) **(Dell et Schulman, 1997 ; Fujimoto *et al.*, 1998)**. Une rhabdomyolyse associée à des complications hépatiques et rénales ont été rapportées chez une jeune patiente hospitalisée à la suite d'une infection par le virus H1N1, qui s'est suivie ultérieurement par le développement d'un syndrome d'encéphalopathie postérieure réversible **(Fearnley *et al.*, 2011)**. Suite à l'épidémie de 2009 causée par H1N1, plusieurs études ont mis en évidence des liens *a priori* surprenants entre l'infection et le diabète de type 2, avec une exacerbation de la maladie grippale chez les personnes diabétiques **(Reading *et al.*, 1998 ; Allard *et al.*, 2010 ; Wilking *et al.*, 2010)** qui pourrait

s'expliquer par une plus grande susceptibilité aux surinfections bactériennes chez ces patients **(Hulme *et al*., 2017)**.

L'implication de l'infection grippale dans le développement d'hépatites est expliquée par l'effet de l'inflammation systémique induite par l'infection aigue ou encore par le développement d'un syndrome de défaillance multi-organe **(Bal *et al*., 2012)** et non pas par un effet direct du virus sur le foie **(Papic *et al*., 2012 ; Whitworth *et al*., 2006 ; Sellers *et al*., 2017)**. Ces affections sont soit en lien avec le type de virus, ce qui est le cas avec le virus H5N1, ou avec l'hôte (comorbidités, âge, sexe, prédisposition génétique) **(Fouchier *et al*., 2004 ; Banning *et al*., 2005)**.

4. Tropisme cellulaire du virus influenza

Le tropisme viral est déterminant pour l'infection, la transmission et la sévérité des symptômes et est étroitement dépendant des caractéristiques de l'hôte et du virus.

Sont considérés hôtes pour le virus influenza les mammifères terrestres (homme, porc, cheval, vison), les mammifères marins (phoques, baleines, requins) et les espèces aviaires (en particulier Chez les oiseaux sauvages, considérés comme réservoir pour le virus de la grippe, l'infection, rârement pathogène, s'initie par une infection orale puis digestive et une grande quantité de virus est ainsi libérée dans les selles **(Taubenberger et Kash, 2010)**.

Les acides sialiques, exprimés à la surface de la cellule hôte, sont les récepteurs des virus influenza. Ainsi, la capacité d'infecter tel ou tel hôte, le tropisme du virus pour un type cellulaire ou pour un organe est étroitement dépendant de la présence de ces récepteurs.

Chez l'homme, au niveau de la partie supérieure du tractus respiratoire, incluant la muqueuse nasale, le sinus paranasal, la trachée, le pharynx, le larynx et les bronches, les récepteurs cellulaire de type SAα2,6 (acides sialiques couplé à du galactose en position 2,6) sont majoritairement exprimés **(Yao *et al*., 2008 ; Nelli *et al*., 2010)**. Ces récepteurs sont reconnus par les virus influenza humains **(Mansfield, 2007 ; Zhang, 2009 ; Gamblin et Skehel, 2010 ; Nelli *et al*., 2010)**. Les acides sialiques de type SAα2,3 sont, quant à eux, majoritairement localisés plus profondément dans les poumons au niveau des alvéoles et sont reconnus par les virus aviaires **(Kumlin *et al*., 2008 ; Ramos *et al*., 2011 ; Reperant, 2012 ; Samji, 2009)**. Plus précisément, **Zeng *et al*., (2012)** rapportent que les acides sialiques SAα2,6 sont prédominants au niveau des cellules ciliées (plus permissives aux virus influenza humains), alors que les récepteurs du type SAα2,3 s'expriment à la surface des cellules non-ciliées (ciblées par le virus aviaire hautement pathogène H5N1) **(Zeng *et al*., 2012)**. La mort des cellules épithéliales infectées est responsable de la rupture de la barrière épithéliale pulmonaire, contribuant ainsi aux risques de surinfection bactérienne associés au développement des

formes sévères de la maladie (desquamation et œdème) **(Kuiken et Taubenberger, 2008)**. Les cellules endothéliales pulmonaires semblent également jouer un rôle important durant l'infection par le virus de la grippe, puisqu'elles participent à l'induction de la réponse antivirale. Cette réponse, parfois appelée « choc (ou tempête) cytokinique », est observée dans le cas de développement des formes sévères lié à l'infection par des virus hautement pathogènes tels que H5N1, H1N1/1918 ou H1N1/2009 **(Peiris *et al*., 2010 ; Hui *et al*., 2016 ; Perrone *et al.*, 2008)**. Elle manifeste suite à une réponse inflammatoire intense, impliquant des facteurs viraux et de l'hôte, produisant ainsi des effets délétères intervenant dans la sévérité de l'infection. Ce phénomène n'est cependant pas observé dans le cas de l'infection par des virus moins pathogènes tels que H1N1 ou H3N2, responsables de grippes saisonnières qui évoluent rarement en formes sévères (**Guarner *et al*., 2009).**

Le virus de la grippe ne prend pas uniquement pour cible dans le tractus respiratoire les cellules épithéliales et endothéliales mais également d'autres types cellulaires. Le marquage par cytométrie en flux de l'hémagglutinine à la surface de différentes sous-populations de monocytes humains (caractérisées par différents niveaux d'expression des marqueurs de surface CD14 et du CD16 ; à savoir les populations $CD14^{++}/CD16^{-}$, $CD14^{++}/CD16^{+}$ et $CD14^{dim}CD16^{++}$) a permis de montrer que les monocytes sont permissifs à l'infection par le virus de la grippe A/Udorn/72 (Udorn) (avec une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires : IL-6, IL-8, IP-10 et TNF-α) mais relativement résistants à l'effet cytopathique en début d'infection (pas données concernant la production de particules infectieuses) **(Hoeve *et al*., 2012)**.

Les macrophages alvéolaires sont également susceptibles à l'infection par le virus de la grippe, ils produisent les protéines virales, mais la réplication est abortive **(Hoeve *et al*., 2012)**. En effet, très peu de nouveaux virions sont libérés **(Perrone *et al.*, 2008)**, voire aucun **(Rodgers et Mims, 1981)**. Cependant, l'infection induit une sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et des interférons de type I par les macrophages alvéolaire, ce qui permet de limiter la réplication virale et la dissémination au niveau du tractus respiratoire **(Herold *et al*., 2016)**. En 2009, **Mao *et al*.** ont pu montrer pour la première fois la permissivité des cellules NK pulmonaires chez l'homme à l'infection par le virus influenza dans une stratégie d'échappement viral. Leurs données montrent que l'entrée du virus de la grippe dans les cellules NK se fait à travers une endocytose Clathrine/ Cavéoline dépendante et à travers les acides sialiques de la surface cellulaire **(Mao *et al*., 2009, Mahmoud *et al.*, 2016 ; Mao *et al*., 2017)**. Le virus influenza est également capable d'infecter les cellules dendritiques et d'altérer ainsi leur capacité à présenter les antigènes aux lymphocytes T CD8 **(Smed-Sörensen *et al*., 2012)**.

Plus rarement, les cellules épithéliales de la conjonctive de l'œil et les neurones cérébraux peuvent être ciblés par le virus influenza. En effet, environ 80% des infections par le virus influenza de sous-type H7 sont associés à des complications oculaires **(Belser *et al*., 2018 ; Fouchier *et al*., 2004)**.

En dehors des poumons, un tropisme du virus influenza pour les ilôts du pancréas a également été mis en évidence chez la souris associé au développement d'une pancréatite (augmentation de l'expression des cytokines (IL-6 et IL-8) et des chimiokines (CCL4/5/9/10)) et d'une détection des protéines virales au niveau des ilôts pancréatiques **(Capua *et al.*, 2013)**.

Des données *in vitro* ont montré que la réplication du virus H1N1 induit la mortalité des neurones 6 heures après infection avec une augmentation des niveaux d'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines et de l'interféron de type I (α et β) 6 heures et 24 heures post-infection (**Wang *et al.*, 2016).** Aussi, des analyses menées sur des lignées cellulaires pancréatiques humaines ont permis de mettre en évidence un tropisme du virus influenza pour ce type cellulaire **(Capua *et al.*, 2013).**

Ainsi, le virus de la grippe peut infecter des cellules en dehors de l'arbre respiratoire, induisant ainsi des complications extra-pulmonaires, certes rares, mais qui peuvent se manifester majoritairement au cours de la phase aigue des infections sévères.

II. Classification des virus influenza en types et sous-types

Les virus sont des pathogènes intracellulaires obligatoires. La plupart des virus ont un génome de petite taille qui leur permet de se répliquer rapidement, mais ils ont besoin de détourner la machinerie cellulaire à leur profit pour y parvenir.

Les virus peuvent être classifiés selon différents critères biochimiques et/ou morphologiques. Selon la classification proposée par **Lwoff** en 1962, les virus sont classés selon, dans l'ordre décroissant des critères : *1*) leur génome (sa nature : ARN, ADN ; sa structure : mono- ou bi-caténaire ; sa forme : linéaire, circulaire, non segmentée ou segmentée), *2*) leur enveloppe (présence : virus enveloppé ou absence : virus nu) et *3*) la symétrie de leur capside (hélicoïdale, icosaédrale, ou non déterminée). La classification proposée par **Baltimore**, en 1971, est basée sur le type d'acides nucléiques composant le génome viral (à ADN ou à ARN, simple brin, double-brin), la synthèse de l'ARN messager viral, ainsi que le procédé de réplication de l'ADN **(Baltimore, 1971)**. Plus récemment, une initiative de classification des virus nommée ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) a été proposée en 1977 et se base sur les mêmes critères que la classification de Baltimore auxquels

s'ajoutent l'analyse de l'expression génique des protéines virales, de l'hôte ciblé par le virus, de la pathogénicité, et des similarités de séquences **(Aiewsakun et Simmonds, 2018 ; Lefkowitz *et al.*, 2018)**.

Le virus de la grippe (ou influenza) est un virus à ARN simple brin de polarité négative (-), segmenté (7-8 segments), dont la capside est à symétrie hélicoïdale, enveloppé, et qui donc appartient à la famille des *Orthomyxoviridae* et à la classe V selon la classification de Baltimore **(Gelderblom, 1996)**. Il existe 3 types de virus influenza : A, B et C. Les virus de types B et C se distinguent du type A par des critères génétiques et antigéniques, notamment au niveau de la nucléoprotéine et de la protéine de la matrice (M1) **(Munster *et al.*, 2009)**. Alors que pour les types A et B, les glycoprotéines de surface subissent des variations génétiques à l'origine de l'émergence de nouvelles souches virales, les virus de type C sont considérés comme étant relativement stables **(Couch *et al.*, 1996)**. Généralement, les humains sont infectés par les virus de type A mais ils peuvent l'être également par les virus de type B.

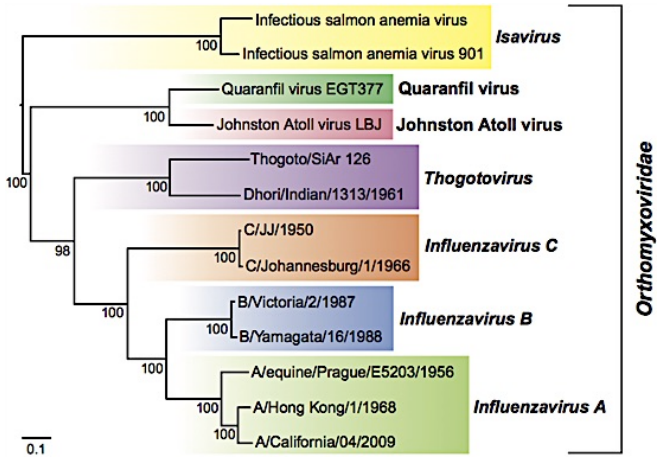

Figure 2. Classification des virus de la famille des *Orthomyxoviridae*
(ICTV, 9ème rapport, 2011).

La classification des virus se base sur le type de génome viral (ADN ou ARN, simple ou double brin) et son mode d'expression dans la synthèse de l'ARN messager viral, ainsi que le procédé de réplication de l'ADN (Baltimore, 1971). La classification fournie par l'ICTV. Le virus de la grippe appartient à la famille des *Orthomyxoviridae* et à la classe V selon la classification de Baltimore.

Enfin, les sous-types d'hémagglutunine A (HA) et neuraminidase (NA) serviront à nommer plus précisément les virus **(Lowen *et al.*, 2017)**. Par exemple, le virus influenza de type A et de sous-type H3N2 (notre modèle d'étude) possède l'HA de type 3 (il en existe 16) et la NA de type 2 (il en existe 9).

III. Structure des virus influenza

Les virus influenza peuvent être de forme sphérique ou filamenteuse. Les virus filamenteux présentent le même diamètre que les virus sphériques (~ 100 nm), cependant leur longueur peut atteindre 30 µm **(Bruce *et al*., 2009)**. L'enveloppe virale consiste en une bicouche lipidique, acquise au moment du bourgeonnement à partir de la membrane plasmique de la cellule hôte. A la surface de l'enveloppe virale sont enchâssées deux glycoprotéines : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). L'enveloppe et la membrane sont traversées de part en part par des protéines virales M2, qui forment des canaux ioniques) **(Rossman et Lamb, 2011)**. Comme mentionné précédemment, la classification des différents sous-types de virus se fait en se basant sur la nature des deux glycoprotéines de surface (HA et NA) **(Lowen *et al*., 2017)**.

La **Figure 3** schématise la structure du virus influenza.

La glycoprotéine HA est un homo-trimère inséré dans l'enveloppe virale par son extrémité C-terminale tandis que son extrémité N-terminale est extracellulaire. La glycoprotéine HA permet l'ancrage du virus à la membrane cellulaire en s'attachant aux acides sialiques de surface (récepteurs cellulaires) et son internalisation dans la cellule hôte.

La neuraminidase (NA) est un homo-tetramère inséré dans la membrane du virus par son extrémité N-terminale tandis que son extrémité C-terminale est extracellulaire. La neuraminidase intervient en fin de cycle, *via* son activité sialidase, pour éliminer l'acide sialique des sialyl-oligosaccharideq libérant ainsi les nouveaux virions tout en évitant leur auto-agrégation **(Watanabe *et al*. 2010, Samji, 2009 ; Medina et García-Sastre, 2011).**

En dessous de la membrane, la protéine structurale majeure est la protéine de matrice M1. La protéine M1 s'homo-oligomérise pour former une superstructure hélicoïdale recouvrant l'intérieur de l'enveloppe virale. La protéine M1 intervient dans la phase d'assemblage en se liant d'une part à la partie cytoplasmique des glycoprotéines de surface HA et NA et, d'autre part, avec les ribonucléoprotéines virales (RNPv) présentes dans le virion **(Rossman et Lamb, 2011 ; Chlanda *et al*., 2015 ; Zhao *et al*., 2017)**.

Le génome du virus influenza est fractionné en 8 segments indépendants d'ARN simple brin négatif, codant dans leur ensemble 10 protéines essentielles, et pour des protéines accessoires en nombre variable selon les virus.

Ainsi, le virion renferme en son sein le matériel génétique du virus présent sous forme de 8 ribonucléoprotéines virales (RNPv). Chaque RNPv est composée du génome viral, de la nucléoprotéine (NP) et du complexe ARN-polymérase-ARN dépendante lui-même constitué de 2

enzymes basiques (appelées PB1 et PB2 (*Polymerase Basic Proteins*)) et d'une enzyme acide (appelée PA (*Polymerase acidic protein*)).

La protéine NS1 est pléiotrope, en effet, elle permet de contrer la réponse interféron déclenchée par l'infection dans la cellule hôte et elle agit également pour contrôler d'autres aspects de la réplication virale comme la réplication de l'ARN et la synthèse des protéines virales **(Lin *et al*., 2007 ; Hale *et al*., 2008)**.

La protéine NS2, régule la transcription et la réplication virale **(Robb *et al*., 2009)** et assure l'exportation, à partir du noyau, de la RNPv grâce au signal NEP (*nuclear export protein*) qu'elle porte **(O'Neill *et al*., 1998 ; Shimisu *et al*., 2011)**.

La protéine PB1-F2 semble jouer un rôle dans la pathogénicité virale en augmentant l'activité de NF-κB **(Le Goffic *et al*., 2011)** et montre une activité pro-apoptotique **(Watanabe *et al.* 2010 ; Bouvier et Palese, 2008)**.

Au sein de la ribonucléoprotéine virale (RNPv), la protéine NP est une protéine basique qui recouvre l'ARN viral. La protéine NP est capable d'interagir avec plusieurs protéines de l'hôte et du virus. Elle est essentielle pour assurer la réplication du génome viral, puisque quand elle est liée à l'ARN, elle le maintient dans une conformation adéquate lui permettant d'être transcrit par la polymérase et empaqueté dans de nouveaux virions **(Portela et Digard, 2002 ; Turrell *et al*., 2013)**. Mise à part sa fonction structurelle, la protéine NP joue également un rôle important dans l'importation (impliquant l'importin α) de la RNPv à travers le signal NLS (*nuclear localization signal*) **(Neumann *et al*., 1997 ; Hu *et al*., 2017)**.

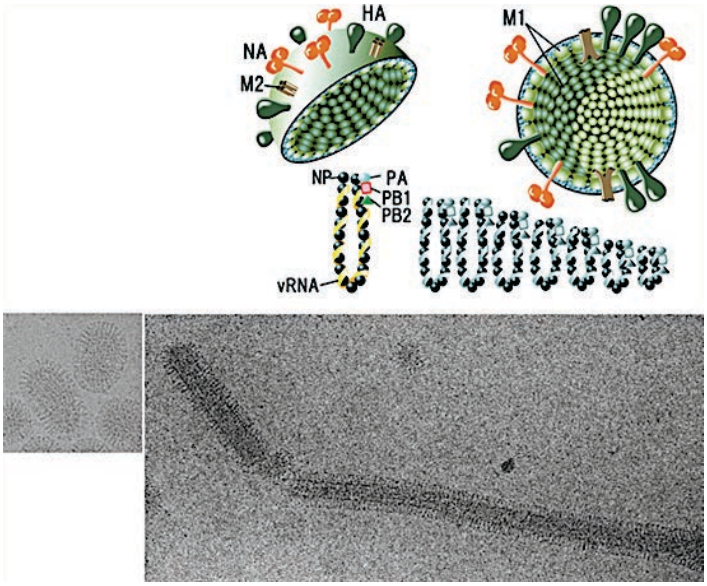

Figure 3. Représentation schématique de la structure du virus influenza. (ICTV, 9ème rapport, 2011).

(En haut) Les glycoprotéines enchâssées dans la membrane de bicouches lipidique correspondent à l'hémagglutinine trimérique (HA) qui est la plus abondante à la surface virale et la neuraminidase tetramérique (NA). L'enveloppe virale renferme également la protéine du canal ionique M2. Les composants internes correspondent à la protéine de la matrice M1 et la ribonucléoprotéine virale (RNP) formée de segments d'ARN associés à la nucléoprotéine (NP), et les polymérases PA, PB1 et PB2. La protéine NS2 (NEP) qui est également une protéine virale n'est pas représentée.
(En bas) Observation en microscopique électronique d'un virus influenza de forme sphérique A/Aichi/2/68 X-31 virion (à gauche) et d'un virus influenza A filamenteux A/Udorn/72 virion (à droite).

IV. Cycle de réplication des virus influenza

Le cycle réplicatif du virus influenza comporte 6 étapes principales : (1) Attachement du virus à la cellule hôte et entrée du virus, (2) fusion membrabaire, libération du génome et entrée du génome dans le noyau, (3) Expression du génome et réplication des RNPv, (4) Transcription des ARNv en ARNm et traduction en protéines virales, (5) Exportation des RNPv à partir du noyau et (6) Assemblage et bourgeonnement des nouveaux virions **(Figure 4)**.

1. Attachement du virus à la cellule hôte et entrée du virus

Les glycoprotéines HA, qui se présentent sous forme de spicules à la surface de la membrane virale, sont très importantes à ce stade puisqu'elles se lient aux acides sialiques exprimés à la surface de la cellule hôte. Le virus pénètre alors dans la cellule par endocytose (essentiellement médiée par des molécules de clathrine) et se retrouve dans un endosome **(Matlin *et al.*, 1981)**. Il a également été rapporté que les virus filamenteux pourraient entrer par micropinocytose **(De Vries *et al.*, 2011 ; Rossman *et al.*, 2011)**. Les facteurs de l'hôte Rab 5 et Rab 7 **(Sieczkarsky et Whittaker, 2003)** et IFITM (*interferon-inducible transmembrane protein*) **(Feeley *et al.*, 2011)** interviennent durant la phase d'internalisation virale.

2. Libération et entrée dans le noyau des RNPv

Le canal ionique M2 présent dans l'enveloppe virale permet l'influx de protons de l'endosome vers l'intérieur de la particule virale. Cette acidification de l'intérieur du virus aboutit à la dissociation entre les protéines M1 et la RNPv **(Bouvier et Palese, 2008)**.

Les membranes de l'endosome et du virus vont également fusionner pour former des pores de fusion par lesquels les RNPv, préalablement dissociés des protéines de la matrice, seront libérées dans le cytosol. Le processus est initié par un changement conformationnel qui aboutit à l'exposition d'un peptide fusogène de la HA.

Enfin, les RNPv ainsi libérés dans le cytoplasme seront transportés vers le noyau par les facteurs d'import nucléaire cellulaires, les importines α et β **(Cros *et al.*, 2005)**.

3. Transcription et réplication du génome viral

La transcription et la réplication du génome viral se font dans le noyau et font intervenir le complexe polymérase formé par les protéines virales PB1, PB2 et PA. La réplication du génome viral consiste en la synthèse d'ARN complémentaire simple brin positif (ARNc) qui servira de matrice pour la synthèse de l'ARN génomique viral (ARNv) **(Hu *et al*., 2017)**.

4. Traduction des protéines virales

L'ARN messager (ARNm) viral synthétisé est transporté vers le cytoplasme où il sera traduit par la machinerie cellulaire en protéines virales. Les ARNm viraux générés lors de l'infection grippale présentent une terminaison 5' en coiffe et une queue polyA à l'extrêmité 3'. La traduction des protéines virales fait intervenir les facteurs eIF4F (*eukaryotic initiation factor-4A*) composé de trois sous-unités (eIF4A, eIF4E et eIF4G) qui interagit avec l'ARNm assurant le recrutement des ribosomes qui vont former le complexe 48S et ainsi initier la traduction de l'ARNm une fois le codon d'initiation détecté **(Yangüez *et al*., 2011)**. Le virus influenza, *via* la protéine non-structurale NS1, bloque la traduction de l'ARNm cellulaire en altérant l'export des ARNm cellulaires du noyau vers le cytoplasme **(Walsh *et al*., 2013)**. La synthèse des protéines virales se fait par le détournement de la machinerie cellulaire, limitant ainsi la traduction des protéines de l'hôte en faveur des protéines virales **(Matsuoka *et al*., 2013)**.

5. Export des RNPv du noyau vers le cytoplasme

L'export nucléaire des RNPv nouvellement synthétisés nécessite l'intervention des protéines NS2/NEP **(Iwatsuki-Horimoto *et al*., 2004)**, de la protéine M1 **(Bui *et al*., 2000)** et de l'exportin 1 de l'hôte (CRM1 ou Xpo1) **(Neumann *et al*., 2000)**. La partie C-terminale de la protéine M1 interagit directement avec la RNPv, alors que la partie N-terminale se lie à NS2/NEP. Ainsi, la RNPv est exportée du noyau vers le cytoplasme sous forme d'un complexe M1-NEP-CRM1 **(Watanabe *et al.*, 2010 ; Hu *et al*., 2017)**.

6. Assemblage et bourgeonnement du virus

Suite à la synthèse de son génome viral et des protéines qui lui sont indispensables, le virus entre dans une phase d'assemblage et de bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte. Le bourgeonnement au niveau des cellules épithéliales polarisées s'effectue au niveau de la région apicale **(Matsuoka *et al*., 2013)**. Ainsi, les protéines de surface du virus sont transportées et insérées au niveau de la membrane plasmique de l'hôte. Deux modèles hypothétiques ont été suggérés pour expliquer le processus d'assemblage et de bourgeonnement du virus :

1. Le modèle d'assemblage au hasard (*random packaging model*) **(Nayak *et al.*, 2009)**;
2. Le modèle d'assemblage spécifique (*specific packaging model*). Selon ce modèle, les signaux portés par les segments viraux contrôlent l'assemblage du virus **(Gao *et al.*, 2012 ; Gerber *et al.*, 2014).**

La protéine M2 joue un rôle essentiel durant la formation des nouvelles particules virales. La protéine M1 intervient en dernière phase pour le bourgeonnement de la particule virale. De plus, M1 et NP interagissent avec les composants du cytosquelette de la cellule hôte, tels que l'actine, stimulant ainsi le transport des RNPv vers le site de bourgeonnement. La libération des nouvelles particules virales par la cellule hôte est finalisée par l'action de la NA qui va cliver le résidu de l'acide sialique **(Rossman et Lamb, 2011 ; Shim *et al.*, 2017)**.

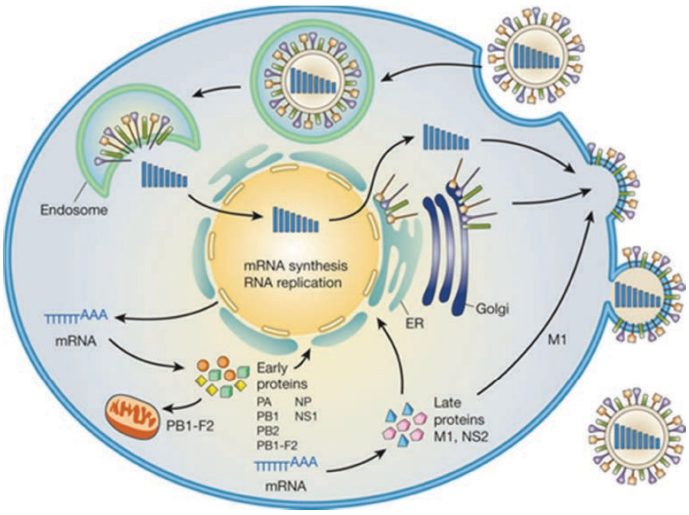

Figure 4. Schéma récapitulatif du cycle de réplication du virus influenza (Arias *et al.*, 2009).

Cycle de réplication des virus grippaux A. Après endocytose, les complexes ribonucléoprotéiques viraux (RNPv) sont libérés dans le cytoplasme et transportés ensuite vers le noyau où la réplication et la transcription ont lieu. Les ARN messagers sont exportés vers le cytoplasme pour être traduits. Les protéines virales précoces nécessaires à la réplication et à la transcription, sont renvoyées vers le noyau. Plus tard dans le cycle d'infection, les protéines M1 et NS2 facilitent l'exportation nucléaire des RNPv nouvellement synthétisés. PB1-F2 s'associe aux mitochondries. L'assemblage et le bourgeonnement des virions de la progéniture se produisent au niveau de la membrane plasmique.

V. Les facteurs de l'hôte essentiels à la réplication virale

L'identification des facteurs essentiels à la réplication virale exprimés par l'hôte fut le sujet d'étude de plusieurs équipes scientifiques. **Hao *et al.* (2008)** ont utilisé la technique de l'ARN interférence (ARNi) dans un modèle de drosophile infectée par H_1N_1 génétiquement modifiée. Le criblage réalisé sur une bibliothèque d'ARNi dirigées contre 13,071 gènes (90% des gènes de la drosophile), a permis de montrer qu'il y a 110 gènes dont la déplétion chez la drosophile altère significativement l'expression du gène rapporteur de l'ARN du virus influenza-like. Parmi les 110 gènes, ils ont

rapporté le rôle des protéines de l'hôte suivantes : ATP6V0D1 (ATPase), COX6A1 (sous-unité de la cytochrome c oxydase), et NXF1 dans la réplication des virus Influenza H_5N_1 et H_1N_1. **Karlas *et al.* 2010** ont travaillé sur un système d'ARNi qui permet de cibler plus de 17000 gènes humains dans la lignée de cellules pulmonaire A549. En évaluant l'expression de la protéine virale ou du gène rapporteur associé, ils ont pu identifier 287 gènes intervenant dans le cycle viral, de l'internalisation jusqu'au bourgeonnement. D'autres ont pu identifier une liste de gènes dont la déplétion affecte fortement l'efficacité d'expression de la protéine HA et l'expression du gène rapporteur respectivement (**Brass *et al.*, 2009 ; König *et al.*, 2010 ; Shapira *et al.*, 2009)**.

Parmi les facteurs de l'hôte qui interviennent dans l'internalisation du virus on peut citer :

- Les GTPases Rab5 et Rab7/ PKCbII qui contrôlent le fonctionnement précoce et tardif des endosomes **(Sieczkarski et Whittaker, 2003)**.
- La GTPase Rab10 qui contrôle le transport des endosomes **(Watanabe *et al.*, 2010)**.
- Les 4 sous-unités du complexe de transport vésiculaire *Coatamer 1*, qui permet la formation de vésicules intermédiaires entre l'endosome précoce et tardif.
- Les sous-unités de la V-type ATPase, qui sont indispensables pour le transport de protons, l'acidification du virion et la fusion des compartiments cellulaires **(Stevens et Forgac, 1997).**

Parmi les facteurs qui interviennent dans le transport de la vRNP vers le noyau on peut citer chez l'Homme la famille des importines α (*i.e*. NPI-1/ importin α5, Qip1/ importin α3, Rch1/ importin α1). Ces protéines interagissent et se lient à la nucléoprotéine NP pour réguler le transport de la vRNP et la réplication virale. Enfin, les protéines du complexe du pore nucléaire, Nup98 et Nup153, interviennent dans l'import nucléaire de la vRNP **(Hagiwara *et al*., 2010).**

Les facteurs de l'hôte qui favorisent la synthèse de l'ARN viral sont :

- BAT1/ UAP56 ; ces deux protéines jouent un rôle important dans l'export de l'ARNm cellulaire du noyau. Cependant, dans un contexte d'infection par le virus de la grippe, ils interagissent séparément avec la nucléoprotéine (NP) pour respectivement, assurer la liaison entre l'ARN viral à NP et former un pont entre les ARNm et les facteurs d'export nucléaires (NXF1).

- Tat/SF1 ; qui stimulent la liaison entre NP et les différentes particules de la vRNP, permettant ainsi d'initier l'action de l'ARN polymérase.

- Hsp90 interagit avec PB2 et stimule la synthèse de l'ARNm viral.

- MCM (*Minichromosome maintenance complex*) permet de stabiliser le complexe

d'élongation impliqué dans la réplication **(Watanabe *et al.*, 2010).**

Cependant, une analyse comparative entre ces différentes études montre de faibles intersections entre les groups de protéines de l'hôte identifiées pour intervenir dans le cycle viral, ce qui pourrait s'expliquer par des différences dans les contrôles positifs et négatifs, dans les souches virales, les types cellulaires et les modèles animaux étudiées et dans les algorithmes d'analyse utilisé **(Zhao *et al.*, 2017)**. Cependant quatres études **(Watanabe *et al.*, 2014 ; Tripathi *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2017 ; et Heaton *et al.*, 2016)** ont montré l'implication de la protéine de transport TRAPPC (*transport protein particle complex*) qui interagit avec la protéine virale M2 pour assurer son transport vers la partie apicale de la membrane plasmique assurant ainsi la réplication virale (**Zhu *et al.*, 2017)**. Ainsi, afin de parvenir à identifier les protéines de l'hôte jouant un rôle important dans la réplication virale, à des fins thérapeutiques, une analyse comparative des différentes études menées sur l'interaction hôte-pathogène s'avère essentielle, compte-tenu des différents modèles et des outils utilisés.

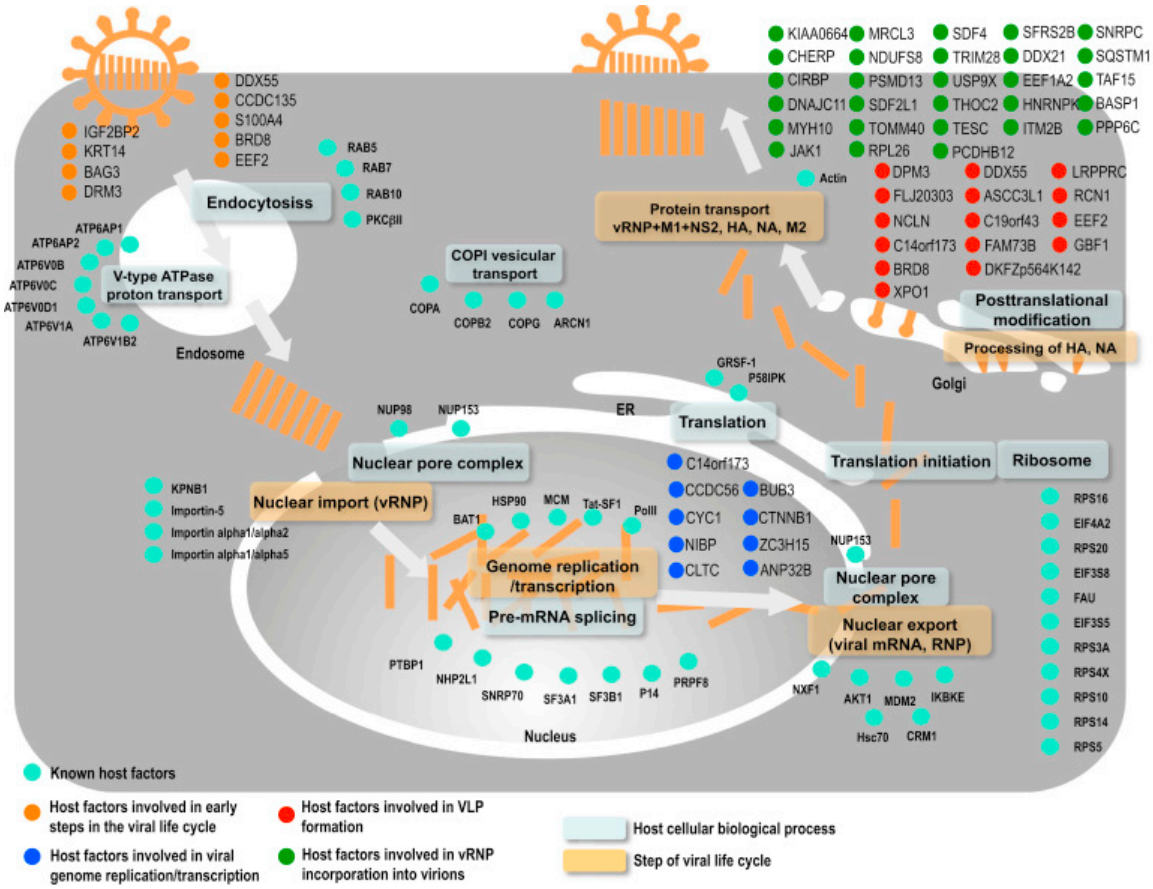

Figure 5. Les facteurs de l'hôte intervenants dans la réplication du virus de la grippe, schéma proposé par Watanabe *et al.*, 2014.

Le virus de la grippe est internalisé par endocytose et le cycle viral se déroule comme décrit précédemment dans la **Figure 4**. Les rectangles orange indiquent les étapes de la réplication virale, les rectangles gris indiquent les étapes pour lesquelles l'hôte joue un rôle dans le cycle viral. Les cercles orange, correspondent aux facteurs de l'hôte intervenant dans les étapes précoces du cycle viral, les cercles bleu-foncés interviennent dans la réplication du génome viral et sa transcription, les cercles rouges interviennent dans

l'assemblage des composantes virale, les cercles vert-foncés favorisent l'incorporation de la vRNP dans les virions.

VI. Réponse de l'hôte à l'infection virale

1. Reconnaissance du virus par les récepteurs de l'immunité innée

L'infection virale des cellules hôtes est susceptible d'initier une cascade de signalisation pour limiter la réplication virale et prévenir la propagation de l'infection à travers l'expression et la synthèse de protéines antivirales. Les cellules épithéliales qui tapissent le tractus respiratoire constituent la première cible du virus influenza et ainsi le site d'initiation de la réponse immune antivirale suite à la détection du virus. La première ligne de défense antivirale correspond au système de l'immunité innée qui est rapide mais qui manque de spécificité et qui correspond à la barrière physique (*i.e.* mucus, collectines) et aux cellules de l'immunité innée **(Holt *et al*., 2008)**.

La reconnaissance des antigènes du virus influenza ou encore les PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*), se fait essentiellement par les macrophages et les cellules dendritiques à travers les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) qui peuvent être de trois types différents : les TLRs (*Toll Like Receptors*), les NLRs (*Nod Like Receptors*) et les RLRs (*Rig Like Receptor*).

Plusieurs TLRs sont identifiés selon les motifs qu'ils reconnaissent et selon leur localisation au niveau cellulaire. L'infection par le virus de la grippe implique les TLR3 et TLR7/8 qui reconnaissent l'ARN viral au niveau de l'endosome, activent les voies de signalisation TRIF et Myd 88 respectivement, qui activent NF-kB, IRF 3 et 7 aboutissant à l'induction de la réponse antivirale et à la sécrétion de cytokines **(Kawai et Akira, 2011)**. L'implication du TLR3 dans la réponse antivirale est controversée. En effet, alors que **Le Goffic *et al.* (2006)** ont montré une survie améliorée chez des souris *TLR3*(-/-) comparées aux souris contrôles infectées par le virus de la grippe **(Le Goffic *et al*., 2006),** d'autres ont montré que l'activation des TLR3 par l'IL-24 est associée à une diminution de la charge virale **(Weiss *et al*., 2015)**. Une étude menée sur des patients atteints par le virus de la grippe (A/H_3N_2 ou A/H_1N_1pdm09) montre une augmentation de l'expression des TLR3/7/8/9 et de la sécrétion des cytokines inflammatoires (IL-6, sTNFR-1, CCL2/MCP-1; CXCL10/IP-10, IFN-γ) comparé à des contrôles sains **(Lee *et al*., 2013 ; Takeuchi et Akira, 2009 ; Pulendran et Maddur, 2015)**.

Les TLRs coopèrent avec d'autres PRRs tels que les RLRs comprenant RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene I*) et MDA-5 (*melanoma differentiation-associated protein-5*) qui sont impliqués dans la reconnaissance de l'ARN double brin et l'induction de la réponse interféron de type I **(Kato *et al*., 2006 ; Akira *et al*., 2006 ; Ichinohe, 2010)**. Cependant, dans le contexte d'infection par le virus de la grippe, RIG-I reconnaît l'ARN simple brin viral à travers son extrémité 5'-phosphate (**Pichlmail *et al*., 2006 ; Reikine *et al*., 2014)**. L'infection par le virus influenza augmente l'expression du RLR

AIM2 (*absent in melanoma 2*). Cette augmentation est associée à une stimulation de l'activité de la caspase-1 et la libération de la cytokine IL-1 β. Chez des souris *AIM2*(-/-) infectées par le virus influenza, l'expression de la caspase-1 et de l'IL-1β n'est pas affectée, la charge virale est comparable à celle des souris contrôles infectées, cependant, la survie est améliorée **(Zhang *et al.*, 2017)**. Ces résultats montrent que l'inflammasome AIM2 pourrait servir de cible thérapeutique pour améliorer la survie sans altérer la réponse immune **(Chen et Ichinohe, 2015)**.

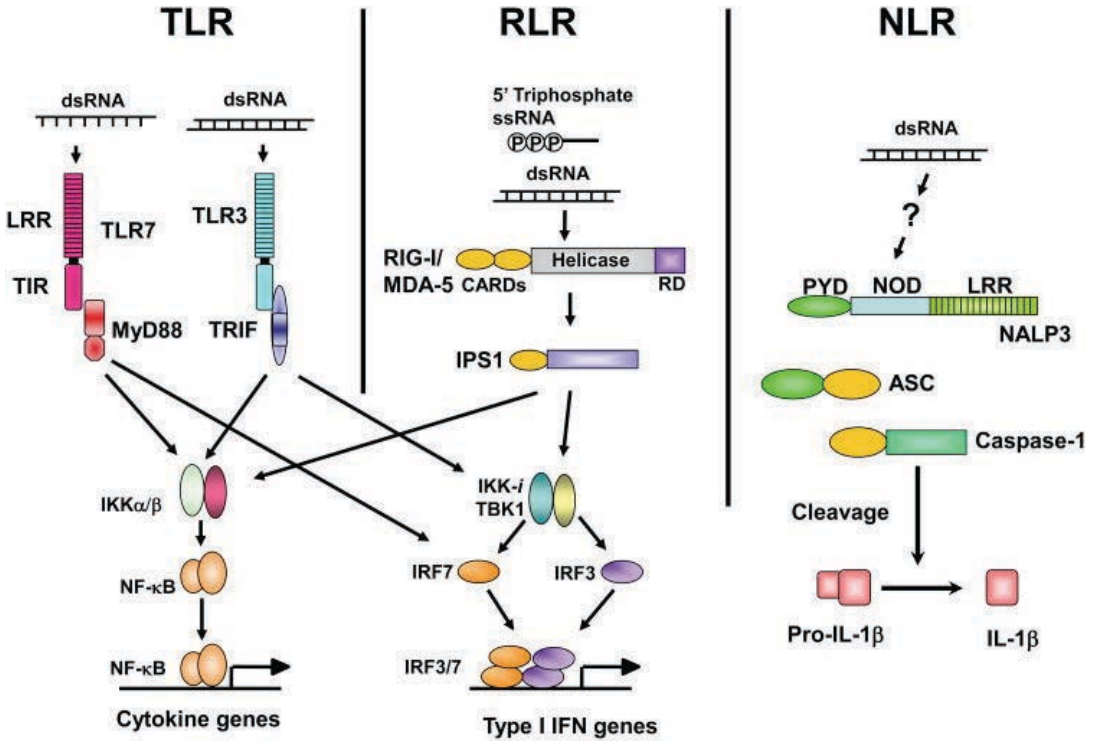

Figure 6. Les trois classes de de PRRs impliqués dans la reconnaissance des l'ARN viral (Takeuchi et Akira, 2009).

Les ARNsb sont reconnu par les TLR7 au niveau des cellules dendritiques, cependant, l'ARNdb est reconnu par les TLR3. TLR7 et TLR3 activent une cascade de signalisation à travers MyD88 and TRIF, respectivement. RIG-I et MDA5 activent une autre protéine, IPS-1. TRIF et IPS-1 sont capables de phosphoryler IRF-3 et IRF-7 par TBK1/IKK/*i*. La voie de signalisation dépendante de MyD88 active IRF-7. IRF-3 et IRF-7 une foie phosphorylées activent l'expression des gènes IFN de type I. TLRs et RLRs induisent la translocation de NF-κB qui à son tour induit l'expression des gènes cytokiniques. Parmi les protéines NLRs, NALP3 (NLRP3), détecte l'ARNdb et induit l'activité catalytique de la caspase-1 essentielle pour le clivage du pro-IL-1β en IL-1β.

Dans un contexte d'infection par le virus de la grippe, les NLRs déclenchent la réponse inflammatoire à travers l'activation de l'inflammasome NLRP3 qui aboutit à la maturation des pro-IL-1β et pro-IL-18 en respectivement IL-1β et IL-18 à travers le clivage assuré par la caspase-1 **(Tripathi *et al.*, 2015 ; Takeuchi et Akira, 2010 ; Ichinohe *et al.*, 2010)**. La réponse antivirale dépendant de l'inflammasome NLRP3 intervient dans la régulation de la réponse immune et dans la réparation tissulaire dans le poumon infecté (**Kuriakose et Kanneganti, 2017)**. En effet, les souris *NLRP3*(-/-) présentent un défaut dans l'activation des lymphocytes TCD4+ et TCD8+ spécifiques du virus **(Ichinohe *et al.*, 2010)**. La reconnaissance de la protéine virale PB1-F2 se fait *via* l'inflammasome NLRX1 **(Allen *et al.*, 2011)**. **Jaworska *et al.* (2014)** ont montré que NLRX1 agit

pour protéger les macrophages de l'apoptose induite par la protéine PB1-F2 préservant ainsi la réponse antivirale **(Jaworska *et al.*, 2014)**. Chez des souris *Cryopyrin* (-/-) ou *caspase* (-/-) une nécrose épithéliale précoce et une mortalité augmentée ont été observées, associées à un recrutement réduit de neutrophiles et de monocytes au niveau du site de l'infection ainsi qu'une diminution de la production des cytokines et des chimiokines habituellement détectée chez des souris infectées par le virus influenza A. Cependant, l'inactivation de la voie de l'inflammasome NLRP3 dans ce modèle ne semble pas avoir un effet ni sur la charge virale ni sur la réponse immune adaptative **(Thomas *et al.*, 2009)**.

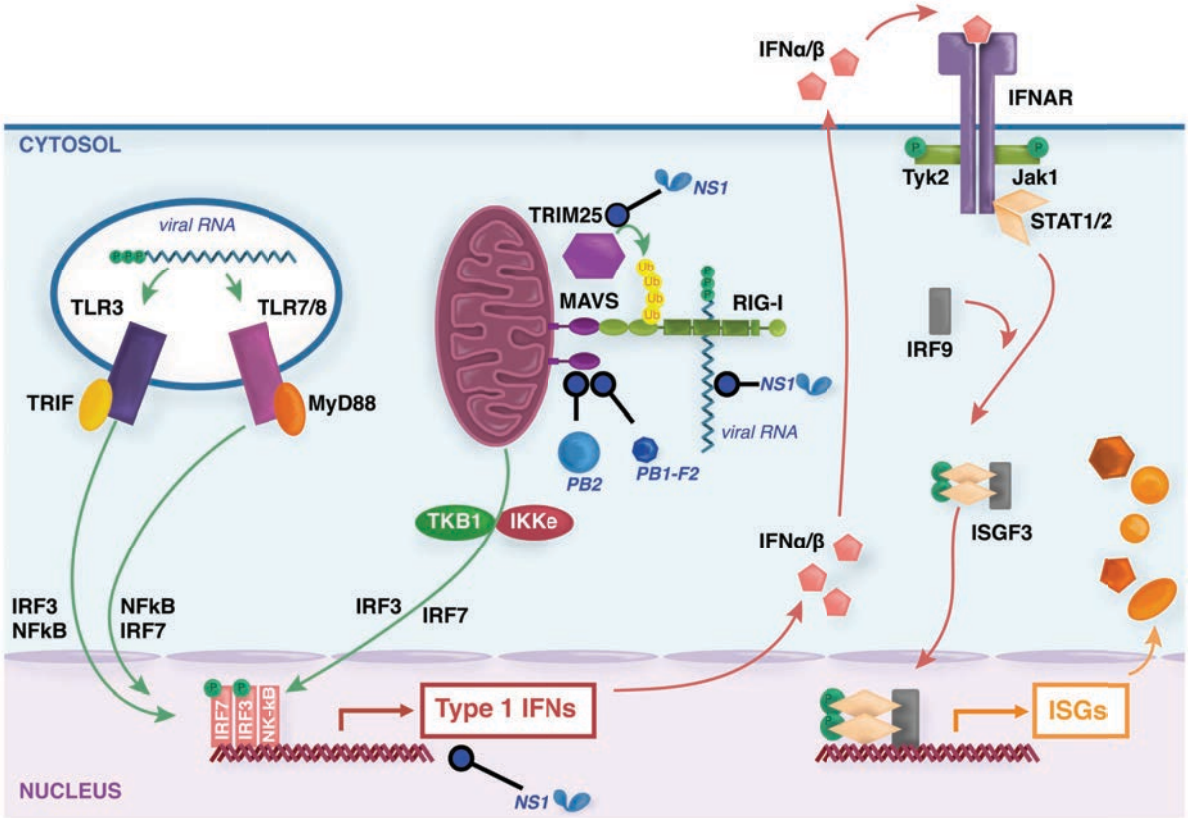

Figure 7. Induction de la réponse interféron par le virus de la grippe (Villalón-Letelier *et al.*, 2017).

Suite à l'infection de sa cellule hôte, les virions dans les endosomes exposent leur ARN aux TLR (3/7/8). La réplication virale produit des ARN viraux triphosphorylés et des ARNdb qui sont reconnu par RIG-I. La signalisation du TLR via la voie TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*) ou Myd88 (*myeloid differentiation factor*) et la signalisation RIG-I via MAVS (mitochondrial antiviral signaling) déclenchent une cascade de transduction qui résulte en l'activation des IRF3/7 (*IFN regulatory factor*) et des facteurs NF-κB qui transloquent dans le noyau pour induire la synthèse des ARNm de l'IFN de type I. L'interféron de type I secrété fait sa signalisation à travers les récepteur IFNAR (*IFN-α/β receptor complex*) via l'activation des kinases intracellulaire Jak1 et Tyk2, qui phosphoryle les facteurs de transcription STAT et IRF-9, forment l'ISGF3 (*interferon-stimulated gene factor 3*) qui transloque dans le noyau activant la transcription des ISGs. Dans les cellules infectées par le virus de la grippe, la protéine non-structurale NS1 séquestre les ARNdb pour contrer l'activation de RIG-I et inhiber la transcription, le modulation post-transcriptionnelles et l'export nucléaire de l'ARNm. NS1 se lie à TRIM25 et inhibe l'ubiquitination essentielle de RIG-I. Les protéines virales PB1-F2 et PB2 inhibent la fonction de MAVS au niveau de la mitochondrie.

2. Immunité innée

La réponse immune innée développée face à l'infection grippale est essentielle pour contrôler rapidement la prolifération virale. L'infection par le virus influenza induit la sécrétion des chimiokines CCL5/Rantes, CCL2/MCP-1 ; et CXCL8/IL-8 et les cytokines antivirales IFN-α-β-γ. La sécrétion de CCL2 par les cellules épithéliales est associée à un recrutement des macrophages et des monocytes au le site de l'infection **(Herold *et al*., 2006)**. Les macrophages alvéolaires ainsi recrutés et activés sécrètent majoritairement les cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IL-6 **(Van Riel *et al.*, 2011)** et limitent la charge virale en phagocytant les cellules apoptotiques **(Hashimoto *et al*., 2007)** et les particules virales opsonisées **(Huber *et al*., 2001)**. Malgré leur rôle important dans la clairance virale, l'activation des macrophages est associée à la production de *NOS2* (*Nitric Oxide synthase 2*) qui contribue à la sévérité de l'infection. En effet, les souris *NOS2* (-/-) sont moins susceptibles à l'infection par le virus influenza **(Jayasekera *et al*., 2006)**. D'autres facteurs interviennent également dans la sévérité de l'infection par le virus influenza, tels que le récepteur CD200, qui est un régulateur négatif de l'inflammation. Les souris déficientes en CD200R montrent une inflammation plus importante, une susceptibilité augmentée à l'infection et un retard dans la résolution de l'inflammation **(Snelgrove *et al*., 2008).**

Les neutrophiles jouent un rôle important dans le contrôle de la charge virale durant les phases précoces et tardives de l'infection **(Tate *et al*., 2008)**. En effet, plusieurs études rapportent un rôle important des neutrophiles au cours de l'infection virale à travers une mortalité et une charge virale augmentée chez les souris déplétées en neutrophiles **(Tumpey *et al*., 2005)**. L'infection par le virus influenza semble également altérer la fonction des neutrophiles qui produisent une quantité moindre de G-CSF (*granulocyte-colony-stimulating factor*) qui se traduit par une altération de la phagocytose des bactéries dans un modèle de coinfection IAV/Sp **(Ishikawa *et al*., 2016 ; Pulendran et Maddur, 2015).**

Les cellules NK (*natural killer*) sont les lymphocytes cytotoxiques de l'immunité innée. Elles sont capables de lyser les cellules infectées indépendamment du CMH-I (Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I). En effet, les récepteurs NKp44 et NKp46 sont capables de se lier à l'HA exprimée à la surface des cellules infectées par le virus influenza et de les lyser **(Mendelson *et al*., 2010)**. Des souris déficiente en NCR1 (équivalent du NKp46) montrent une mortalité et une morbidité augmentée comparativement aux souris contrôles **(Gazit *et al*., 2006)**. Les cellules NK *via* leur récepteur CD16 (FcγRIII) reconnaissent la partie Fc des anticorps fixés à la surface des cellules

infectées et induisent leur lyse selon un processus appelé ADCC (*antibody-dependent cell cytotoxicity*) **(Hashimoto *et al*., 1983)**.

La réponse immune contre le virus de la grippe implique également les cellules dendritiques (DC) qui jouent le rôle de cellules présentatrices d'antigènes servant ainsi de lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'initiation de la réponse adaptative se fait suite à la présentation des antigènes viraux aux cellules T et B naïves **(McGill *et al*., 2009)**. Suite à l'infection virale, les cellules dendritiques entrent en contact avec l'antigène de deux manières différentes :

a. Le virus infecte directement les cellules dendritiques, les protéines virales seront ainsi dégradées par le protéasome en peptides qui seront transportés au réticulum endoplasmique où ils seront associés à des molécules CMH de classe I, transportés à travers l'appareil de Golgi vers la membrane cellulaire où ils seront reconnus par les $TCD8^+$ cytotoxiques **(Banchereau et Steinman, 1998)**.

b. Les cellules dendritiques acquièrent les antigènes viraux à travers la phagocytose des particules virales ou des cellules épithéliales apoptotiques, elles dégradent ainsi les protéines en peptides qu'elles associent au CMH de classe II reconnu par les cellules $TCD4^+$ helper **(Mori *et al*., 1995)**.

Les $TCD4^+$ helper assurent ainsi la prolifération et la maturation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps **(Van de Sandt *et al*., 2012)**.

3. Immunité adaptative

Suite à la première réponse immune innée, se met en place une réponse adaptative, qui répond de manière plus spécifique et plus efficace aux infections induites par le même type de pathogène. La réponse immune adaptative correspond à une réponse humorale, à travers les anticorps spécifiques du virus, et une réponse cellulaire, via les cellules $TCD4^+$ et $TCD8^+$. Une primo-infection par le virus de la grippe est associée à l'acquisition d'anticorps spécifiques du virus produit par les plasmocytes **(Waffarn *et al*., 2011)**. Le taux d'anticorps dirigés contre l'HA et la NA sont corrélés au degré de protection. En effet, en se liant à l'HA, l'anticorps empêche l'attachement du virus à la surface des cellules cibles, limitant ainsi la réplication virale **(Yu *et al*., 2008)**. La protection générée par ces anticorps n'est pas efficace contre les virus d'autres sous-types générés par des mutations ou un réassortiment génétique, cependant, une fois acquise, cette immunisation peut-être de longue durée, en particulier vis-à-vis du premier virus influenza contracté. Ceci est mis en évidence lors de la pandémie de 2009 causée par un sous-type du virus H_1N_1, où les personnes âgées étaient les plus

protégées, de part le fait qu'ils possèdent les anticorpsissus de leur exposition à un virus H1N1 dans leur jeune âge (virus H1N1 circulant de 1918 à 1957) capables de reconnaître les antigène du virus H1N1 de 2009 **(Hancock *et al.*, 2009 ; Ikonen *et al.*, 2010)**. Les nouveaux nés peuvent également être protégés des infections par le virus influenza si leurs mères possèdent les anticorps spécifiques au sous-type viral en question à travers la vaccination ou une infection spontanée **(Zuccotti *et al.*, 2010 ; Steinhoff *et al.*, 2010)**.

La réponse immune induite suite à l'infection par le virus influenza implique les cellules $TCD4^+$ et $TCD8^+$ qui régulent la réponse immune et participent à la clairance virale. Les cellules TCD8+ naïves sont activées par les cellules dendritiques via le CMH-I au niveau des ganglions lymphatiques et maturées en lymphocytes T cytotoxiques (LTc). Les LTc sont ainsi recrutés au site de l'infection pour participer à l'élimination du virus **(Nakanishi *et al.*, 2009)** et pour exercer leur activité lytique en sécrétant perforine et granzyme, induisant ainsi l'apoptose des cellules infectées **(Topham *et al.*, 1997).** Les granzymes stimulent également la sécrétion de cytokines pro-inflamatoires (IL-6, IL-1β et TNF-α) à partir des monocytes par une voie caspase-1 dépendante **(Metkar *et al.*, 2008)**. Suite à l'infection, des cellules $TCD8^+$ mémoires sont formées pour donner une réponse plus rapide et plus efficace lors des infections suivantes **(Lalvani, 1997)**. Les cellules $TCD4^+$ sont activées suite à la reconnaissance de l'antigène viral associé au CMH de classe II, et selon l'environnement cytokinique, elles se différencient en T $CD4^+$ helper 1 (Th1) ou T $CD4^+$ helper 2 Th2 qui se distinguent par leur profil sécrétoire **(Zhu et Paul, 2010)**. Les cellules Th2 produisent les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 et participent à la maturation des lymphocytes B et ainsi à la production d'anticorps **(Eichelberger *et al.*, 1991)**. Les Th1 produisent essentiellement de l'IL-2 et de l'IFN-γ, qui stimulent la réponse Tc **(Mosmann *et al.*, 1986)**. Les $TCD4^+$ résidants dans le poumon jouent un rôle très important de protection contre les infections récurrentes. En plus des $TCD4^+$ et des $TCD8^+$, les Treg (LT régulateurs, FOXP3+) contrôlent la réponse immune en agissant sur les cellules $TCD4^+$ et les Tc pour prévenir les pathologies immunes des tissus infectés **(León *et al.*, 2014)**. En effet, les Treg produisent précocement au cours de l'infection par le virus influenza de l'amphiréguline, facteur de réparation tissulaire, par une voie IL-18 et IL-33 dépendante **(Arpaia *et al.*, 2015)**. Les lymphocytes T helper 17 (Th17) stimulent l'activité des cellules Th1 et Th2 via la sécrétion d'IL-6 **(Campbell et Koch, 2011)**. Les cellules Th17 jouent un rôle important dans la clairance bactérienne (*Staphylococcus aureus*), et l'infection par le virus influenza induit une suppression de la réponse Th17, favorisant ainsi la surinfection bactérienne **(Kudva *et al.*, 2011)**.

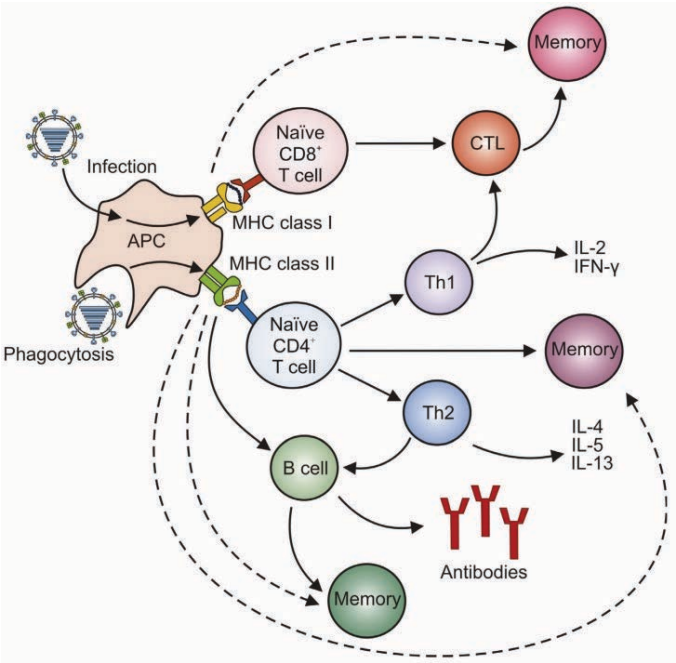

Figure 8 Induction de l'immunité humorale et cellulaires (Van de Sandt et al., 2012)

L'induction des réponses immunitaires suite à une primo-infection par le virus grippal A est indiquée par des flèches pleines. L'activation plus rapide de populations de cellules mémoire spécifiques d'un virus lors d'une rencontre secondaire avec un virus de la grippe A est indiquée par des flèches en pointillés.

VII. Conséquences de l'infection par le virus influenza sur l'hôte

En piratant la machinerie cellulaire, l'infection par le virus de la grippe ne demeure pas sans conséquences sur la fonction cellulaire globale. En effet, la réplication virale induit des modifications au niveau des différents compartiments de la cellule hôte, en particulier au niveau de la mitochondrie, qui correspond au site énergétique de la cellule, au niveau nucléaire, pour assurer la transcription du génome viral et la synthèse des ARNm et au niveau cytoplasmique, site de traduction et de maturation des protéines.

1. Influenza et mitochondrie

Les mitochondries sont présentes dans le cytosol des cellules eucaryotes. Elles constituent le foyer de la synthèse de l'énergie, en fournissant la cellule en ATP (Adénosine tri-phosphate). La mitochondrie est composée d'une membrane externe, une membrane interne, un espace inter-membranaire et une matrice. L'énergie est produite suite au transfert passif des ions hydrogène H^+ de l'espace inter-membranaire vers la matrice à travers la membrane interne dans le sens du gradient. Ce transfert s'effectue *via* l'ATP synthase, qui est une enzyme composée de deux parties ; une partie polaire enchâssée dans la membrane mitochondriale interne et une partie globulaire en contact avec la matrice **(Chan, 2006)**. L'ATP synthase assure le rôle de synthèse de l'Adénosine triphosphate (ATP)

à partir du gradient électrochimique de protons (ADP + Pi → ATP); appelée aussi phosphorylation oxydative (OXPHOS) **(El-Bacha et Da Poian, 2013)**.

La mitochondrie participe à la défense immune cellulaire contre les virus à ARN. L'immunité innée qui fait intervenir la mitochondrie est régulée par les molécules de signalisation qui sont recrutées au niveau de la membrane mitochondriale et dépend du potentiel mitochondrial de la membrane interne. Les MAVS (*Mitochondrial Associated Viral sensors*) sont des protéines de signalisation activées par les senseurs d'ARN viral, RIG-1 et MDA-5 **(Kato *et al.*, 2006 ; Akira *et al.*, 2006)** . Ceci permet d'activer des voies de régulation du facteur de transcription NF-κB et des IRFs. La production de l'oxyde nitrique (NO) induit une diminution de la production d'ATP par la mitochondrie des cellules dendritiques et des macrophages stimulés par du LPS ou d'autres molécules associées aux pathogènes **(Mills *et al.*, 2017)**.

L'initiation des dommages au niveau de la mitochondrie ainsi que l'apoptose sont les principales atteintes induites par le virus de la grippe. Les mitochondries peuvent être facilement endommagées induisant des conséquences sur la fonction cellulaire. Ce qui est connu à l'heure actuelle, est que les conditions pathologiques qui provoquent une altération de la perméabilité de la membrane mitochondriale affectent la phosphorylation oxydative et la synthèse de l'ATP mitochondrial. Ainsi, comme proposé par **Chance et William (1965)** l'état respiratoire et le ratio du contrôle respiratoire mesuré sur des cellules intactes ou perméabilisées est utile pour l'évaluation de la fonction mitochondriale dans différentes pathologies, notamment les infections virales. Toutes ces mesures permettent d'évaluer la phosphorylation, le système de transport d'électrons, l'activité des complexes respiratoires, l'efficacité de couplage permettant de mettre en relief l'effet de l'infection virale sur la fonction mitochondriale.

La protéine PB1-F2 du virus Influenza est adressée à la mitochondrie, transloque *via* le canal Tom40 vers la membrane mitochondriale interne, où elle interagit avec la protéine VDAC1 (au niveau de la membrane externe, *Voltage dependent Anionic Channel*) et ANT3 (au niveau de la membrane interne, *Adenine nucleotide translocase*) **(Bruns *et al.*, 2007)**, aboutissant à la diminution du potentiel membranaire mitochondrial et ainsi la libération de protéines pro-apoptotiques induisant la mort cellulaire **(Zamarin *et al.*, 2005)**. D'autres travaux suggèrent que PB1-F2 et M2, forment des pores au niveau de la membrane mitochondriale, aboutissant à l'altération de la morphologie mitochondriale, à la dissipation du potentiel mitochondrial membranaire et à la mort cellulaire **(Henkel *et al.*, 2010 ; Yoshizumi *et al.*, 2014 ; Ohman *et al.*, 2009 ; Anand et Tikoo, 2013)**.

2. Influenza et réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est le compartiment cytoplasmique où se déroulent la synthèse (par association aux ribosomes) et les remaniements des protéines sécrétoires. Dans cet organite se déroulent plusieurs modifications post-traductionnelles importantes pour assurer un fonctionnement adéquat des protéines. Le RE est le site majeur de stockage du calcium intracellulaire et contribue également à la biosynthèse des lipides (cholestérol chez les animaux). Il contient un nombre de protéines chaperonnes et des enzymes de repliement (foldases) qui catalysent les remaniements des protéines nouvellement synthétisées, participent à la formation des ponts disulfures, contrôlent les modifications post-traductionnelles et assurent le contrôle-qualité des protéines en vue de maintenir l'homéostasie subcellulaire **(Simon et Blobel, 1991)**. Les stress biotiques ou abiotiques activent les molécules chaperonnes et les enzymes de remaniement. En vue de maintenir la capacité de remaniements protéiques dans le RE, l'atténuation relative de la traduction protéique et l'activation du contrôle-qualité dans le RE s'avère essentielle. Une fois le contrôle-qualité validé, les protéines proprement remaniées sont délivrées aux différents organites, à la surface cellulaire et dans l'espace extracellulaire. Une altération de la fonction du RE induit la réponse de non-remaniement protéique (UPR, *Unfolded protein Response*) pour réduire la surcharge en protéines non remaniées. Cependant, si la fonction du RE est profondément altérée, la voie de l'apoptose est activée **(Schwarz et Blower, 2016)**.

Le virus de la grippe est connu pour induire un état de stress au niveau du RE, une apoptose et une production de TGF-β dans différents types cellulaires **(Shultz-Cherry et Hinshaw, 1996)**. Les protéines virales utilisent les protéines chaperonnes cellulaires telles que la protéine du RE ERp57 (*endoplasmic reticulum protein 57*) pour le repliement des protéines. L'augmentation de la production protéique induit une réponse UPR **(Zhang et Wang, 2012)** et active ainsi des facteurs de transcription impliqués dans le stress du RE, tel que ATF6 (*Activating Transcription Factor-6*) et X-box Binding protein **(Hassane *et al*., 2012)**. Ces facteurs de transcription augmentent l'expression de la protéine chaperonne et des enzymes anti-oxydantes pour faire face au stress induit par la synthèse protéique. Quand l'UPR devient trop important, la protéine homologue C/EBP (CHOP, *C/EBP homologous protein*), qui est un inducteur de mort cellulaire, s'active **(Roberson *et al*., 2012)**.

3. Influenza et métabolisme cellulaire

Comme toute réponse induite par l'organisme, l'infection mobilise les ressources de l'hôte pour assurer sa défense. Dans les conditions de croissance normale, les cellules de mammifères utilisent essentiellement le glucose pour assurer l'OXPHOS dans la mitochondrie. Le glucose ainsi métabolisé

en pyruvate en plusieurs étapes, passe vers la mitochondrie, où il intègre le cycle de Krebs. Dans des conditions d'anaérobie, le glucose est utilisé en premier lieu pour la glycolyse où il est métabolisé en pyruvate puis convertit en lactate pour être par la suite pompé en dehors de la cellule. Dans les cellules cancéreuses, le glucose est utilisé en premier lieu pour la production d'acide lactique même dans un milieu riche en oxygène, ce processus est appelé la glycolyse anaérobie ou le « *effet Warburg* » **(Liberti et Locasale, 2016)**.

Plusieurs virus semblent affecter la glycolyse dans leur cellule hôte : La propagation du poliovirus dans les cellules HeLa est inhibée dans un milieu pauvre en glucose **(Eagle et Habel, 1956)**, le HSV-1 est capable de pénétrer dans ses cellules cibles dans un milieu pauvre en glucose mais ne produit pas de nouveaux virions, idem pour les *pseudorabies* **(Ludwig et Rott, 1975).** L'administration de concentrations élevée de glucose induit une augmentation de la charge virale. Dans le même sens, un traitement par des inhibiteurs glycolitiques réduit significativement la production virale, qui se rétablit par l'ajout d'ATP extracellulaire suggérant qu'une altération du métabolisme de glucose pourrait être ciblée comme approches thérapeutiques contre l'infection grippale **(Kohio et Adamson, 2013)**.

L'infection par le virus de la grippe est associée à une augmentation de l'absorption du glucose. Il a été rapporté en 1961 que le virus Influenza A, dans un modèle d'infection d'embryon de poulet, augmentait l'absorption du glucose, la glycolyse et la production d'acide lactique à partir de 3h après l'infection **(Klemperer, 1961)**. Une étude plus récente **(Ritter *et al.*, 2010)** a montré que le virus IAV H_1N_1 induisait l'absorption du glucose, l'activité glycolytiques des enzymes ainsi que la production de l'acide lactique entre 8 et 12h après l'infection. Comme la réplication virale avait lieu, ils en concluaient que l'augmentation de la glycolyse coïncidait avec l'apoptose. Cependant, il n'est pas encore clair si c'est l'apoptose qui induit une augmentation de la glycolyse ou si c'est l'inverse **(Sanchez et Lagunoff, 2015)**. L'infection par le virus de la grippe semble avoir un effet sur le métabolisme cellulaire en augmentant de 20% l'activité d'enzymes clés dans la production du NADPH et de l'acétyl-CoA, précurseurs essentiels pour la biosynthèse des lipides et du cholestérol essentiel à la fabrication des enveloppes virales. Le dysfonctionnement cellulaire induit par l'infection virale, présente un impact direct sur le métabolisme cellulaire. Des différences significatives de l'activité enzymatique de 9 enzymes ont été rapportées entre les cellules infectées et non-infectées : Glucose-6-phosphate déshydrogénase, 6-phosphogluconate déshydrogénase de la voie des pentoses phosphates, la glutaminase, l'enzyme malique de la voie de la glutaminolyse, PC, la citrate synthase, la NADH du cycle de l'acide citrique et la ligase acétate-CoA. Ceci suggère une augmentation de l'activité métabolique au cours de la réplication virale précoce **(Janke *et al.*, 2011)**. Une étude clinique menée par Smallwood *et al*. (2017) montre que l'absorption du glucose était plus

importante chez les patients infectés par le virus influenza et que les voies métaboliques les plus affectées sont le cycle de krebs, la glycolyse et la phosphorylation oxydative **(Smallwood *et al.*, 2017)**.

B. Infection respiratoire d'origine bactérienne : Exemple de l'infection par *Streptococcus pneumoniae*

L'infection par le streptocoque demeure, mondialement, l'une des causes principales de pneumonies et de méningites chez l'enfant et l'adulte. Tous les isolats correspondent à des souches encapsulées, et, à l'heure actuelle, 91 sérotypes différents ont été identifiés. Les streptocoques sont des bactéries commensales dont la présence est bénéfique dans certaines conditions, puisqu'elles inhibent la croissance et le développement d'agents pathogènes **(Kadioglu *et al*., 2008)**.

I. Généralités sur l'infection par *Streptococcus pneumoniae*

1. Epidémiologie

L'infection par *S. pneumoniae* est responsable chez l'humain du développement d'infections sévères, notamment chez les enfants. La mortalité induite par l'infection à *S. pneumoniae* a été estimée dans les années 1990 à 1,8 millions d'enfants âgés de moins de 5 ans **(Van der Poll et Opal, 2009 (revue))**. L'avancée médicale la plus importante a été le développement d'un vaccin heptavalent conjugué (7vPCV, Prevenar 7, Wyeth Pharmaceuticals), enregistré dans 70 pays et commercialisé en France depuis 2001 dans le cadre d'une procédure européeenne centralisée. En effet, depuis l'introduction de ce vaccin, l'incidence de l'infection et la mortalité induite ont été considérablement réduites : de 55% en 2004 à moins de 20% à partir de 2005 **(Mehr et Hood, 2012)**.

2. Transmission

Streptococcus pneumoniae, également appelé pneumocoque, est une bactérie commensale du nasopharynx hautement adaptée à son milieu avec d'autres bactéries encapsulées telles que *Haemophilus influenza* and *Moraxella catarrhalis*. Cependant, ces bactéries peuvent parfois causer des maladies sévères, voire mortelles, lorsque les conditions de l'hôte et de la bactérie permettent l'invasion de sites tels que l'oreille moyenne, les poumons, la circulation sanguine ou les méninges **(Khan *et al*., 2017)**.

La transmission de l'infection se fait par contact avec des sécrétions respiratoires : par projection de gouttelettes transportées dans l'air, contact direct ou indirect. Les enfants de moins de 5 ans sont la source majeure de contamination de l'adulte. En effet, ils sont plus porteurs du streptocoque (40-60%) que les enfants plus âgés (12%), les adolescents (6-10%) et les adultes (3-4%) **(Cardozo *et al.*, 2008)**. Les taux les plus élevés de colonisation (>50%) ont été rapportés dans des situations de surpeuplement (essentiellement les moyens de transport en commun et les crèches), en hiver, à la

suite d'une infection virale récente (notamment par le virus influenza), chez une mère porteuse de l'infection et en cas tabagisme passif. La prise d'antibiotiques préalable ne semble pas affecter le taux de colonisation, mais augmenterait plutôt le taux de portage de bactéries multi-résistantes, en particulier aux antibiotiques ß-lactamines. La colonisation du nasopharynx par la bactérie lui assure un échange génétique, une potentielle acquisition de virulence et le développement de la résistance aux antibiotiques **(Sulikowska *et al*., 2004).**

II. Classification

Les bactéries sont des organismes unicellulaires procaryotes de structure relativement simple.

La majorité des bactéries peuvent être classées en se basant sur leur structure (ronde, en tige ou spirale) et sur la composition de leurs parois. En 1874, le chirurgien autrichien **Théodore Billroth** utilise pour la première fois le terme *Streptococcus* pour identifier des bactéries présentant des chaines de cocci. La bactérie sera isolée par **Louis Pasteur** en 1881 et ce n'est que dans les années 1990, suite à l'isolement d'un grand nombre de souches résistantes à la pénicilline **(Fenoll *et al*., 1998)**, que l'importance des bactéries gram-positive à chainettes a été relevée. Le terme *Streptococcus* a été utilisé par **Rosenbash** en 1884 dans le sens générique du terme pour identifier les bactéries isolées de lésions suppuratives chez l'homme (*S. pyrogène*).

Par la suite, la classification numérique établie par **Bridge et Sneath** en 1983 a permis la division du genre *Streptococcus* en pyogenic, parapyogenic, pneumococci, thermophilic, viridans, paraviridans, enterococcal et lactic en se basant sur leurs caractéristiques physicochimiques respectives.

Plus récemment, une identification basée sur la structure de la paroi bactérienne, l'analyse chimique des lipides, l'appariement des bases ADN-ADN, l'hybridation ADN-ARNr et la classification de l'ARNr 16S a abouti à des changements notables dans la classification. Cette nouvelle classification du genre *Streptococcus* est ainsi détaillée dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* **(Hardie et Wiley, 1997)**.

III. Structure de la bactérie

Le pneumocoque a été identifié il y a plus de 130 ans. Il s'agit d'une bactérie à paroi Gram-positif ($Gram^+$), alpha-hémolytique, soluble dans la bile et généralement encapsulée. La capsule est alors de forme ovale, de 1-2 micromètre de diamètre, typiquement en paires mais parfois isolée ou organisée en chainettes. La croissance des colonies à pneumocoque est centrale sur gélose de sang, les colonies

formées sont circulaires, et acquièrent généralement une capsule après le premier isolement **(Figure 9)**.

Les pneumocoques sont des bactéries catalase négatives, facultativement anaérobies, mais qui peuvent également croître en condition aérobie **(Hardie et Wiley, 1997)**, notamment en milieu solide. Dans des conditions aérobies, la bactérie en utilisant l'O_2 et par l'action de l'oxydase pyruvate, est capable de produire du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène est toxique pour la culture des cellules épithéliales alvéolaires, pour les bactéries du nasopharynx, en particulier *Haemophilus influenzae*, mais il est également capable de détruire la paroi du pneumocoque ; ainsi le pneumocoque est capable de s'autodétruire **(Pericone *et al*., 2000)**.

Le génome du streptocoque D39, le plus couramment étudié, correspond à un seul chromosome circulaire composé d'environ 2 millions de paires de bases, dont 39,7% GC, codant pour 1914 protéines et 73 ARNs. La résistance aux antibiotiques de *S. pneumoniae* est croissante en raison des transformations bactériennes continues résultant d'échanges de matériel génétique **(Kaijalainen, 2006)**.

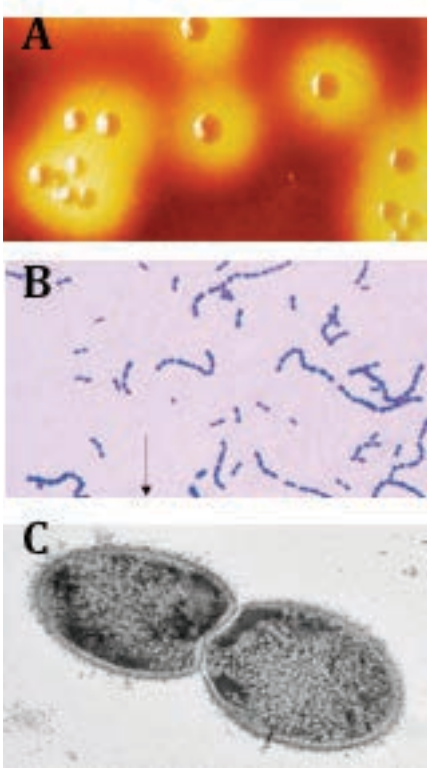

Figure 9. Morphologie et structure de la bactérie *S. pneumoniae* (Kadioglu *et al*., 2008).
(A) Morphologie des colonies de *S. pneumoniae* en culture sur une gélose sang. Les colonies sont circulaires, luisantes, incrustées à la surface de la gélose et entourées par un halo d'hémolyse, **(B)** Forme des cocci de *S. pneumoniae* en paires ou chainettes obtenues après culture dans un milieu liquide, **(C)** Visualisation en microscopie électronique à transmission des cocci de *S. pneumoniae*.

IV. Les facteurs de virulence

Les facteurs de virulence bactérienne font partie des MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*), et sont reconnus par les senseurs cellulaires comme des signaux de danger. Les facteurs de virulence de *S. pneumoniae* sont nombreux mais les plus étudiés sont les polysaccharides capsulaires et la protéine pneumococcique pneumolysine **(Rubins *et al*., 1993)**.

1. Les polysaccharides capsulaires

Les bactéries pathogènes présentent une capsule polysaccharidique. Nous l'avons déjà évoqué, les pneumococcoques ont la particularité d'être soit non encapsulés, soit encapsulés, ils deviennent alors pathogènes. La capsule protège la bactérie de manière très efficace contre la phagocytose des macrophages et des neutrophiles et inhibe l'activation du complément, permettant ainsi la colonisation *in vivo*. La capside protège également le pneumocoque des facteurs environnementaux, et lui permet d'entrer en compétition avec d'autres bactéries pour la colonisation du nasopharynx tels que *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* et *Neisseria meningitidis* **(Pericone *et al*., 2000)**. L'épaisseur de la capsule et la composition de ses polysaccharides permettent d'identifier plusieurs sérotypes et l'induction d'une réponse anticorps spécifiques chez le lapin est à la base du sérotypage **(Henrichsen, 1999)**. Il existe deux systèmes de sérotypages différents, le danois se basant sur les similarités des antigènes, et l'américain se basant sur l'ordre de définition des sérotypes **(Henrichssen, 1999)**. La nomenclature danoise s'avère plus efficace et est celle qui est le plus couramment utilisée dans le domaine médical et la recherche. Les changements de sérotypes sont dus aux échanges recombinants effectués au niveau du locus responsable de la biosynthèse de la capsule.

2. La pneumolysine et les autres facteurs de virulence

La pneumolysine (Ply) est une toxine intracellulaire capable de lyser toute cellule eucaryote dont la membrane est composée de cholestérol. La Ply est un intervenant majeur lors de l'infection par le streptocoque. Il s'agit d'une chaine de polypeptide de 53kDa capable de former des pores dans les membranes cellulaires **(Mitchell et Mitchell, 2010)**. Elle est produite tardivement durant la phase exponentielle de la courbe de croissance. Elle assure plusieurs fonctions, en particulier au cours de la phase précoce de l'infection, en induisant un effet cytotoxique sur les cellules respiratoires épithéliales et endothéliales et une activité pro-inflammatoire **(Jedrzejas, 2001)**. **Karlstrom *et al*. (2011)**, suggèrent que la Ply est essentielle pour le développement de la surinfection bactérienne après une primo-infection par le virus de la grippe (**Karlstrom *et al*., 2011**).

Outre la pneumolysine, d'autres protéines pneumococciques jouent un rôle important dans la virulence. Ce sont notamment les protéines liées aux peptidoglycanes (*i.e.* la Hyaluronidase, la neuraminidase), à la choline (*i.e.* la protéine A de surface des pneumocoques (PspA)) ainsi que les macromolécules attachées à la bicouche lipidique cytoplasmique (*i.e.* adhésine A de surface des pneumocoques (PsaA)). La protéine PspA est la plus étudiée des protéines liées à la choline. En effet, elle joue un rôle important dans la protection du pneumocoque vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte. Sa capacité à contrôler la pathogénicité de la bactérie en se liant à la lactoferrine peut jouer un rôle dans la colonisation des muqueuses de l'hôte **(Jedrzejas, 2001)**.

Les autolysines sont des enzymes qui détruisent les parois à peptidoglycanes des bactéries. L'autolysine majeure du pneumocoque est la N-acétyl-muramoyl-L-alanine-Amidase (LytA amidase) qui appartient au groupe des protéines extracellulaires liées à la choline. Le rôle précis de LytA est mal élucidé, cependant, une mutation au niveau du gène *LytA* réduit la virulence de la bactérie **(Jedrzejas, 2001)**.

La protéine PsaA est également un facteur de virulence important, et appartient au système de transport bactérien. Tous les 91 sérotypes expriment le gène *PsaA*. Des travaux menés sur l'immunisation intra-nasale de souris par la sous-unité B de la toxine cholérique de la protéine de fusion PspA, protège les souris contre la colonisation à pneumocoque **(Pimenta *et al*., 2006)**.

V. Colonisation des poumons par *Streptococcus pneumoniae*

Pour pouvoir survivre et se multiplier dans son hôte, la bactérie doit être capable de (1) coloniser son hôte, (2) trouver une niche nutritionnelle dans son hôte, (3) échapper aux défenses immunes innées et adaptatives de l'hôte, (4) se multiplier en utilisant les ressources de l'hôte et (5) quitter son hôte pour en infecter d'autres. Sous l'effet d'une pression de sélection sévère, les pathogènes développent des mécanismes d'adaptation et d'échappement leur permettant d'exploiter au maximum le métabolisme de leur hôte **(Alberts *et al*., 1994)**.

La colonisation et la persistance de la bactérie dans le tractus respiratoire supérieur fait intervenir plusieurs facteurs. Le peptidoglycane PgdA (*N-acetylglucosamine deacetylase*) ainsi que l'Adr (*attenuator of drug resistance*) sont deux enzymes qui modifient les peptidoglycanes, rendant ainsi la bactérie plus résistante à l'effet lytique des lysozymes des muqueuses respiratoires. Les caractéristiques majeures de la colonisation sont : l'adhérence aux cellules et aux tissus de l'hôte, le bouleversement de la réponse immune innée et adaptative et l'échappement (ou l'évasion) du flux de clairance muco-ciliaire. Grâce aux mucines riches en glycanes, la bactérie est capable d'adhérer au niveau du nasopharynx, milieu lui servant de niche et lui fournissant ses nutriments.

S. pneumoniae utilise différentes stratégies pour adhérer aux cellules de son hôte, faisant intervenir plusieurs adhésines dont les plus étudiées sont la protéine de virulence et d'adhérence pneumococcique en surface A (PavA), PavB et l'énolase (Eno) qui adhèrent à la surface cellulaire *via* les protéines de matrice extracellulaire, la fibronectine et le plasminogène **(Holmes *et al*., 2001)**. Egalement, la phosphorylcholine (ChoP), localisée au niveau de la paroi cellulaire et la choline-binding protein A (CbpA; également dénommée PspC) peuvent se lier aux facteurs protéiques de l'hôte, renforçant l'adhérence bactérienne **(Cundell *et al*., 1995)**. Dans un contexte pro-inflammatoire, le streptocoque est capable d'augmenter l'expression de ses facteurs d'adhérence. Pour parvenir à coloniser le nasopharynx, *S. pneumoniae* interagit avec la flore bactérienne, soit par compétition ou par coopération. Certains travaux rapportent une augmentation de la variabilité et de l'hétérogénéité de la flore bactérienne au niveau du nasopharynx suite à une infection par *S. pneumoniae*. Les pneumococci en co-colonisation sont en compétition en synthètisant plusieurs bactériocines et peptides antimicrobiens et ainsi les souches les plus susceptibles sont éliminées.

Les infections virales, notamment par le virus influenza, facilitent l'infection par *S. pneumoniae* des voies respiratoires supérieures. En effet, l'infection par le virus de la grippe module l'expression des chimiokines pro-inflammatoires et entraine la sur-expression des récepteurs épithéliaux utilisés par la bactérie pour augmenter son adhérence **(Weiser *et al*., 2018)**. Les sujets atteints par le virus VIH montrent une capacité réduite à se défendre contre les infections, notamment les infections respiratoires. En effet, l'infection précoce par VIH induit des modulations de la réponse immune et favorise le développement d'une septicémie à pneumocoque chez les patients atteints **(Huson *et al*., 2014)**.

VI. Réponse pulmonaire à l'infection par le streptocoque

La première ligne de défense contre la bactérie est le mucus du nasopharynx. En effet, les cellules épithéliales respiratoires sont tapissées d'un mucus sous forme de gel qui contient des peptides antimicrobiens et des immunoglobulines. De plus, l'augmentation de la température faisant suite à l'infection est également un facteur de défense de première ligne permettant l'inhibition de la croissance bactérienne **(Alberts *et al*., 2002)**. Une réponse immune innée et adaptative est déclenchée pour assurer la clairance bactérienne et la défense de l'hôte **(Figure 10)**.

1. Les senseurs de l'immunité innée

Comme nous l'avons décrit pour le virus influenza, la reconnaissance des bactéries se fait *via* les PRRs (*Pattern Recognition Factors*), qui incluent les TLRs (Toll Like Recpeptors), les NLRs

(NOD-like receptors), et les RLRs (RIG-1 Like Receptors) ainsi que de nombreux senseurs cytosoliques de l'ADN **(Koppe *et al*., 2012)**.

Des travaux chez la souris suggèrent que la clairance bactérienne met en jeu une réponse TLR2-dépendante qui induit un recrutement plus important des macrophages vers le nasopharynx (**Dessing *et al*., 2008)**. La Ply joue également un rôle très important dans la défense immune en stimulant le recrutement des macrophages. En effet, des bactéries Ply mutantes montrent une capacité de colonisation relativement prolongée et ne déclenchent pas la synthèse des médiateurs inflammatoires clés pour la clairance bactérienne (IL-1β, les chimiokines de type CXC et CC). Cette réponse liée à l'activité des macrophages est atténuée chez les jeunes enfants et les personnes âgées, ce qui pourrait être en lien avec leur susceptibilité accrue **(Plowden *et al*., 2004)**. Comme il s'agit de bactéries à capsule, leur paroi est dépourvue de LPS ; reconnu par TLR4. Cependant, certains travaux ont pu montrer que la Ply du pneumocoque interagissait avec TLR4 **(Srivastava *et al*., 2005)**.

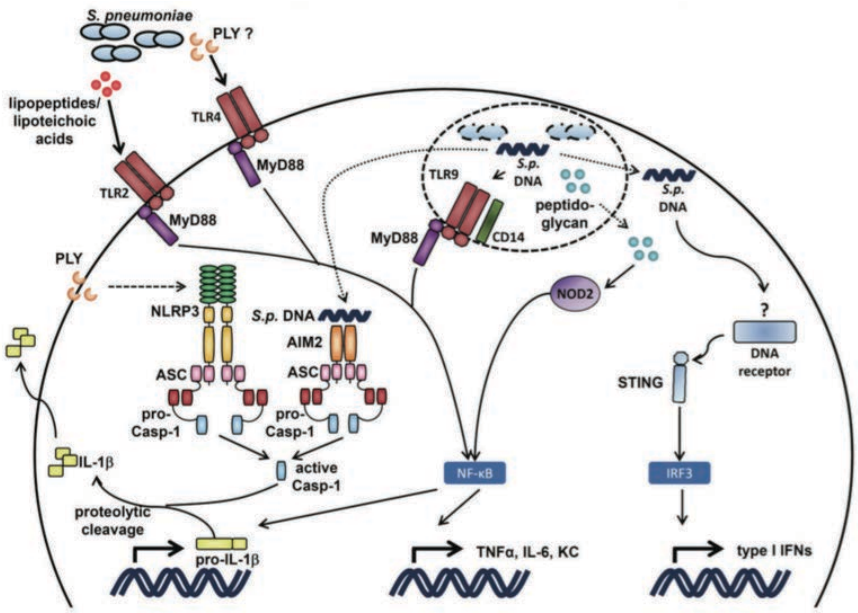

Figure 10. Représentation des PRRs impliqués dans la reconnaissance de *Streptococcus pneumoniae* (Koppe *et al*., 2012).

Les composants de la paroi cellulaire du pneumocoque et la pneumolysine (PLY) sont respectivement reconnus par TLR2 et TLR4. *S. pneumoniae* est phagocytée et dégradée dans les phagosomes libérant ainsi du peptidoglycane bactérien et des acides nucléiques. Le TLR9 détecte l'ADN non méthylé riche en CpG dans les endosomes, alors que d'autres composants bactériens peuvent avoir accès au cytosol à la suite de la rupture de la membrane dépendante de PLY. L'ADN pneumococcique est détecté par AIM2. Les TLRs, ainsi que NOD2, stimulent la production de TNFα, IL-6, KC et pro-IL-1β. TNFα, IL-6 et KC sont produits directement après le processus de traduction alors que la production d'IL-1β requiert un deuxième signal. Les inflammasomes NLRP3 et AIM2 sont activés par la pneumolysine et l'ADN bactérien respectivement, entrainant le clivage des pro-IL-1β et pro-IL-18 en IL-1β et IL-18, respectivement.

2. Les cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée se concentrent au niveau du site de l'infection pour assurer la clairance bactérienne. Il s'agit des macrophages alvéolaires au niveau des poumons, des neutrophiles, des NK (*natural killer*) et des ILC-3 (cellules lymphoïdes innées de type 3).

Les macrophages sont dotés de PRRs leur permettant de détecter la présence de signaux de dangers (PAMPs) et ainsi d'augmenter leur activité de phagocytose, généralement améliorée par l'opsonisation des bactéries par le complément **(Arredouani *et al.*, 2004)**. Si les macrophages ne parviennent pas à contrôler l'infection, ils produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF-α et IL-1β) et des chimiokines qui stimulent le recrutement des neutrophiles au site de l'infection pour éliminer les pneumococci par la libération d'enzymes lytiques (cathepsine, défensines, lactoferrine, lysozymes) associée à la phagocytose **(Snäll *et al.*, 2016)**. Le recrutement des neutrophiles au niveau du parenchyme pulmonaire active les cellules Tγδ par une voie NLRP3-dépendante, aboutissant ainsi à la production d'IL-17-A augmentant ainsi la réponse anti-bactérienne **(Figure 11) (Hassane *et al.*, 2017)**. Cependant la bactérie est capable de détourner ce système *via* ses facteurs de virulence, en inhibant la phagocytose, les facteurs du complément et en piégeant les neutrophiles **(Wartha *et al.*, 2007; Hyams *et al.*, 2010)**. Les cellules NK sont également impliquées dans la défense antibactérienne, et leur activité est stimulée par les cytokines IL-12p70 et IL-18. Une fois activées, les NK constituent la source majeure d'IFNγ **(Mitchell *et al.*, 2010)**. Enfin, les ILC-3, qui sont des cellules de l'immunité innée capables de s'activer *via* des cytokines de la famille IL-17, présentent une activité antimicrobienne au niveau des muqueuses intestinales, mais également au niveau des poumons **(Van Maele *et al.*, 2014)**.

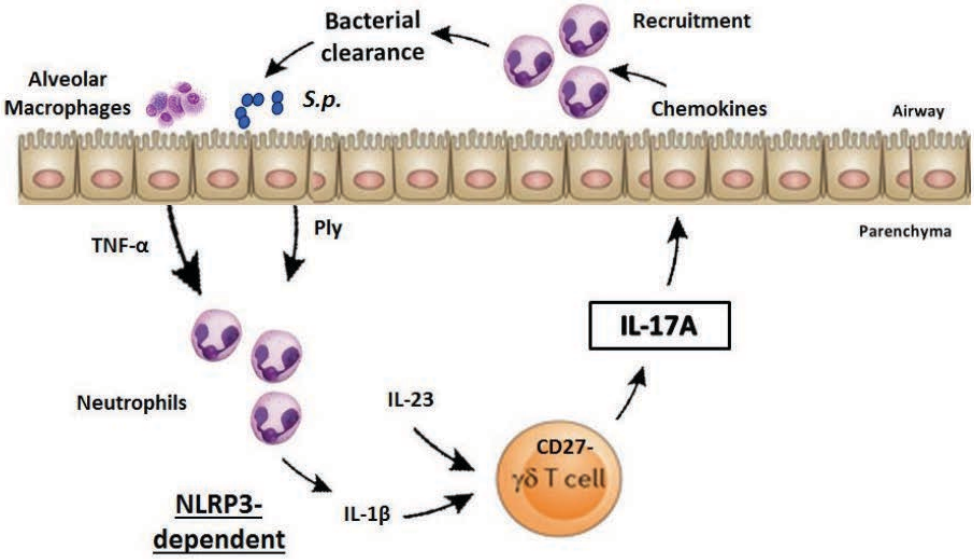

Figure 11. Mécanisme de production d'IL-17A par les cellules T-γδ dans le modèle d'infection par *Streptococcus pneumoniae* (Rapport de thèse Hassane M., 2014).

3. Les cellules de l'immunité adaptative

Les cellules de l'immunité adaptative qui interviennent dans la défense contre *S. pneumoniae* sont : les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, les lymphocytes B (LB), les cellules NKT (*Natural Killer T cells*) et les LTγδ.

Les LT $CD8^+$ présentent une capacité cytotoxique qui leur permet d'éliminer les bactéries invasives. De part leur rôle dans le recrutement des neutrophiles au site de l'infection et dans la maturation des LB en plasmocytes producteurs d'anticorps, les LT $CD4^+$ favorisent la clairance bactérienne. Les LB produisent des IgA, qui correspondent à l'une des premières lignes de défense contre les pathogènes et leurs toxines associées, ainsi que d'autres classes d'immunoglobulines qui permettent l'opsonisation des bactéries empêchant ainsi leur adhérence aux cellules cibles. Ces cellules sont également capables de produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1β et TNF-α) **(Fieber et Kovarik, 2014)**. Les cellules NKT sont des cellules qui, contrairement aux lymphocytes conventionnels, reconnaissent les antigènes lipidiques tels que les glycolipides **(Kinjo *et al.*, 2011)**. Ces cellules assurent la défense contre le pneumocoque, et leur déficience cause une altération de la clairance bactérienne et une exacerbation de l'infection **(Ivanov *et al.*, 2012)**. **Hassane *et al.*** ont récemment décrit l'implication des LTγδ dans la régulation de la réponse de l'hôte contre les infections bactériennes **(Hassane *et al.*, 2017)**. L'augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires induit une augmentation de la perméabilité endothéliale ainsi qu'une vasodilatation et une augmentation de l'expression des protéines d'adhésion (P-selectine, E-selectine, VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*)), ce qui assure un influx des neutrophiles et des lymphocytes de la circulation sanguine vers le site d'infection **(Grenier et Bodet, 2008)**.

VII. L'invasion du système nerveux central par *Streptococcus pneumoniae* (Méningite)

Le pneumocoque est en effet la cause la plus commune de méningites bactériennes communautaires chez l'adulte. Chez les enfants de moins de 2 ans, les infections invasives à pneumocoque peuvent conduire à des méningites, particulièrement fatales.

Les méninges constituent une enveloppe qui entoure et protège le système nerveux central. Certaines bactéries, dont *Streptococcus pneumoniae*, peuvent accéder aux méninges en franchissant la barrière hématoencéphalique, que nous allons brièvement décrire dans le paragraphe qui suit.

1. La barrière hématoencéphalique (BHE)

La BHE, décrite pour la première fois par **Goldman** en 1913, est composée essentiellement de trois couches qui régulent les échanges moléculaires à l'interface entre le sang et le tissu neuronal : 1) La BHE au niveau des cellules endothéliales cérébro-vasculaires, 2) La barrière entre le sang et le liquide cérébrospinal, et 3) La barrière de la membrane arachnoïde, qui entourent la dure-mère et le cerveau **(Figure 12)**. Ces trois barrières sont à la fois des barrières physiques (les jonctions serrées entre les cellules assurent une certaine imperméabilité), de transport (le mécanisme de transport qui assure le flux des solutés) et métaboliques (les enzymes qui métabolisent les molécules en transit) **(Abott *et al*., 2010)**.

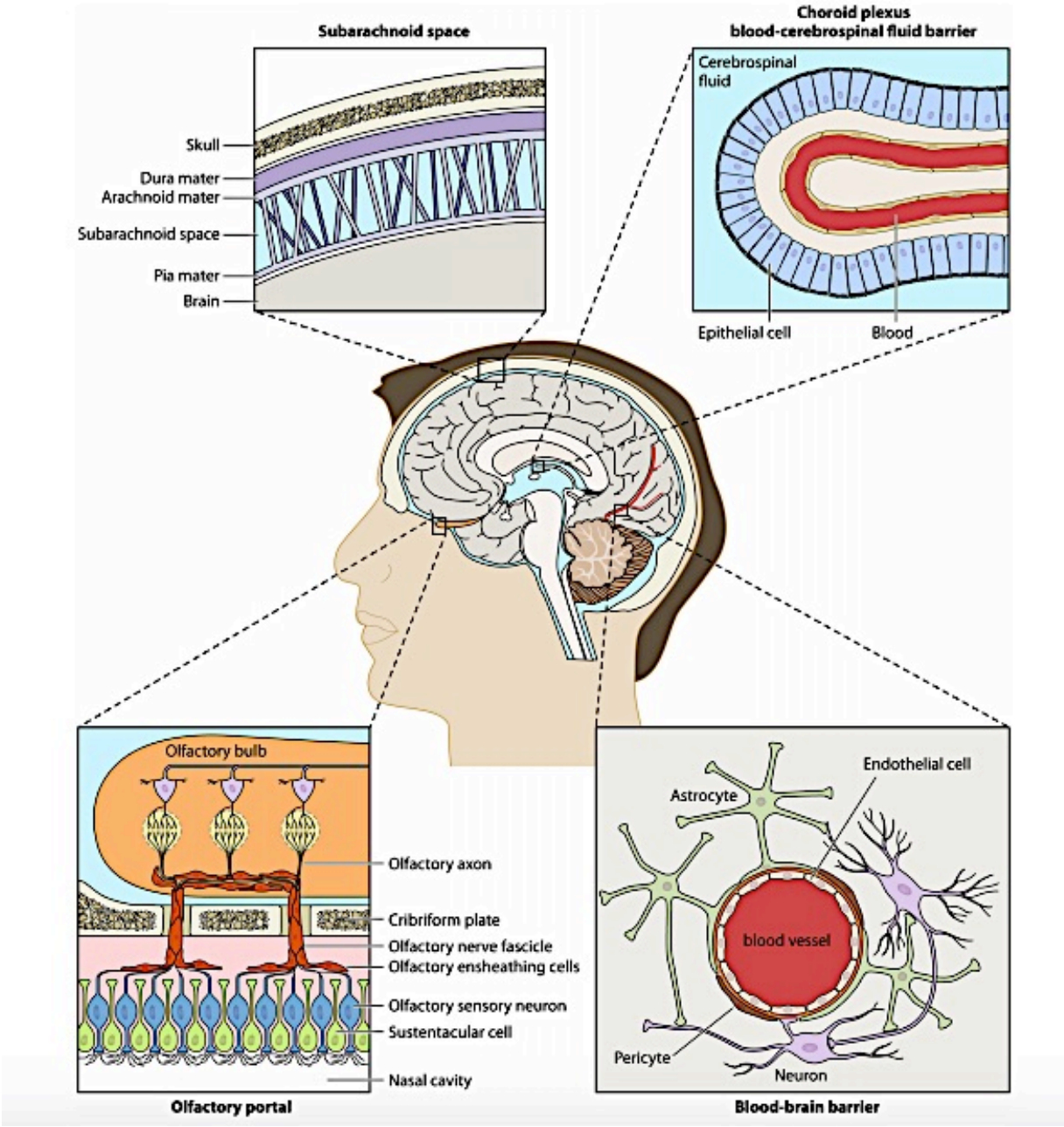

Figure 12. Localisation et organisation anatomique de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la barrière entre la circulation sanguine et le liquide céphalo-rachidien et le portail olfactif (Dando *et al*., 2014).

Le crâne et les méninges, qui consistent en la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère, protègent le cerveau. L'arachnoïde et la dure-mère sont connectées par les trabécules arachnoïdiennes. Ces barrières permettent de maintenir l'homéostasie dans le cerveau. La BHE est formée par des jonctions serrées entre les cellules endothéliales, les micro-vaisseaux cérébraux, les péricytes et les astrocytes. La barrière entre la circulation sanguine et le liquide céphalo-rachidien est formée par des jonctions serrées entre : (i) les cellules épithéliales du plexus choroïde, (ii) les cellules endothéliales des veines et veinules dans l'espace sub-arachnoïde, et (iii) les cellules épithéliales de l'arachnoïde.

2. Perméabilisation de la BHE et translocation cérébrale de *Streptococcus pneumoniae*

L'infection invasive à pneumocoque nécessite l'altération de la barrière épithéliale et endothéliale des tissus pour donner *in fine* un accès à la circulation sanguine. La Ply fait partie des facteurs de virulence qui, non seulement joue un rôle dans l'induction de la réponse pro-inflammatoire, mais

induit l'apoptose ou la lyse directe des cellules épithéliales et endothéliales au niveau du poumon et de la BHE. Ainsi, le transport à travers la barrière se fait essentiellement par un transport trans-cellulaire, *via* les transporteurs et un système de vésicules (vésicules « coatées » de clathrine et les cavéoles) **(Doran *et al.*, 2016).**

A l'heure actuelle, l'adhésion bactérienne au niveau des cellules endothéliales micro-vasculaires du cerveau est le mécanisme majeur identifié qui explique la translocation de *S. pneumoniae* de la circulation sanguine vers le système nerveux central à travers la BHE. Ainsi, l'adhésion bactérienne à la surface des cellules de l'hôte aboutit soit à l'internalisation de la bactérie par la cellule ou à l'altération de la perméabilité de la BHE **(Figure 13)**. Différentes études ont permis de montrer l'implication de certaines molécules bactériennes tels que l'acide lipotéichoïque, les peptidoglycanes et les CBP A (*choline binding protein*) dans le développement de la méningite **(Tuomanen *et al.*, 1985)**. Une analyse protéomique a permis d'identifier parmi 22 protéines une dizaine de protéines bactériennes capables de se lier aux protéines de la BHE, dont Ply, Pspc et ZmpB déjà identifiées comme intervenant dans la méningite **(Ricci *et al.*, 2013)**.

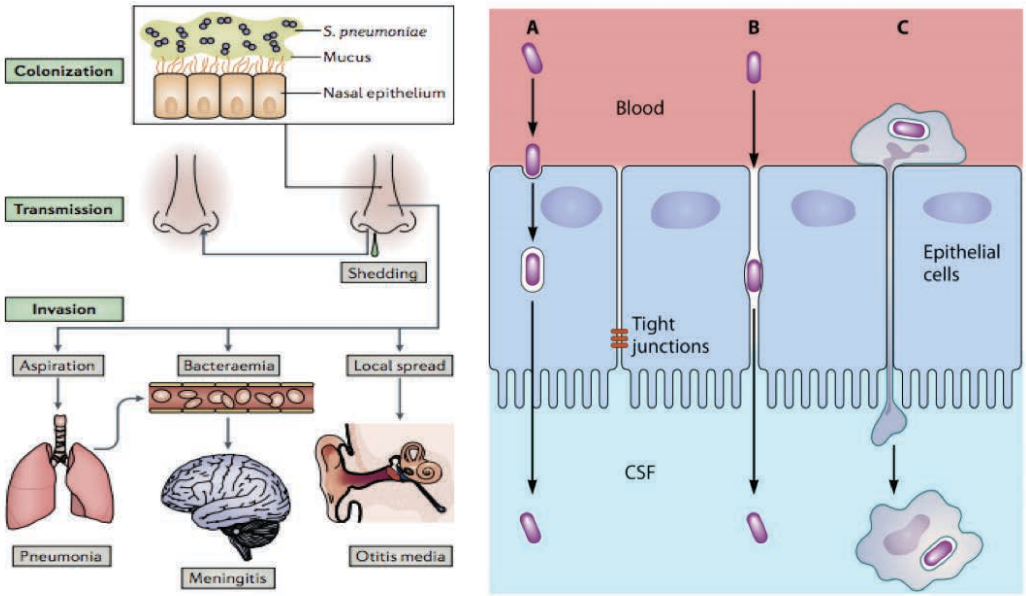

Figure 13. L'invasion de *S. pneumoniae* et les différentes stratégies adoptées pour traverser la BHE (Dando *et al.*, 2014).

A gauche, *S. pneumoniae* colonise le tractus respiratoire supérieur, pour assurer d'une part sa transmission vers d'autres hôtes, et d'autre part assurer l'invasion des autres organes de son hôte. La dissémination au delà de sa niche à travers l'épithélium nasal, par aspiration, bactériémie, ou dissémination locale, peut aboutir à un état invasif de la maladie causant ainsi pneumonies, méningites et otites **(Weiser *et al.*, 2018)**. A droite, les mécanismes adoptés par la bactérie pour traverser la BHE et atteindre le liquide cérébro-spinal. La bactérie (en violet) peut ainsi traverser la BHE par : **(A)** voie intracellulaire (pinocytose ou *via* les récepteurs de surface), **(B)** voie paracellulaire suite à l'interruption des jonctions serrées et adhérentes entre les cellules épithéliales choroïdales, les cellules endothéliales des veines et veinules dans l'espace sub-arachnoïde et les cellules de la membrane arachnoïde, ou **(C)** par le mécanisme du « cheval de Troie », dans lequel les microbes transmigrent avec les macrophages infectés.

VIII. Immunité dans le cerveau

1. Les senseurs de l'immunité innée

L'infection à streptocoque au niveau du cerveau implique une reconnaissance des composants bactériens par TLR2 - qui reconnait les peptidoglycanes et les acides polytéichoiques -, TLR4 - qui reconnait la pneumolysine - et TLR9, qui est intracellulaire et reconnait les motifs CpG de l'ADN bactérien **(Hemmi *et al*., 2000)**. Cette reconnaissance des motifs bactériens active la voie Myd88 qui à son tour active le NF-kb ce qui aboutit au déclenchement de la cascade pro-inflammatoire **(Klein *et al*., 2008)**. Il a été également démontré que les TLR2 et 4 sont plus efficaces dans l'induction de la réponse inflammatoire au niveau du cerveau comparé au TLR9 **(Figure 14.B) (Barichello *et al*.,2012)**.

2. Immunité innée et adaptative

L'infiltration des neutrophiles dans le cerveau est normalement très faible, comparé aux autres organes et ce, en raison de la présence de la BHE. Cependant, lorsque la perméabilité de la BHE augmente, les neutrophiles circulants, les monocytes et les macrophages peuvent pénétrer le système nerveux central et, ainsi, jouer un rôle complémentaire à celui exercé par les cellules de la microglie **(Bechman *et al*., 2001).**

Dans les organes périphériques, l'infection est détectée en premier par les cellules dendritiques innées qui vont « éduquer » les LT spécifiques du pathogène à travers la libération de médiateurs immuns. Dans le système nerveux central, le déroulement n'est pas le même. En effet, dans le SNC : 1) les péricytes vasculaires assurent la fonction des cellules dendritiques matures (du fait de l'absence de cellules dendritiques résidentes et de macrophages péri-vasculaires (cellules présentatrices d'antigènes) dans le parenchyme du cerveau, 2) cellules microgliales, astrocytes et mastocytes jouent le rôle des cellules de l'immunité innée dans le parenchyme du SNC, 3) et à cause de la présence de la BHE, le phénomène d'extravasation des grosses molécules et des cellules du sang est très réduite **(Marc *et al*., 2013)**. Ainsi, l'activation du complément et le recrutement des cellules de l'immunité adaptative s'avèrent difficile. Cependant, quand la bactérie parvient à s'infiltrer dans le cerveau induisant une libération de cytokines pro-inflammatoires, à ce moment, le complément, les anticorps et les neutrophiles s'infiltrent dans le cerveau, opsonisent la bactérie et l'éliminent par phagocytose **(Mook-Kanamori et al., 2011)**.

Il existe deux catégories de microglies : les microglies du parenchyme et les microglies périvasculaires. La phagocytose assurée par ces cellules constitue la première ligne de défense du système nerveux central face aux infections et aux maladies chroniques neurologiques **(Kettenmann**

***et al*., 2011)**. Une cellule microgliale au repos présente un corps de petite taille avec des ramifications allongées et fines, ce qui correspond à son état vigile capable de reconnaitre les perturbations de l'homéostasie du cerveau **(Kreutzberg ; 1996)**. Dans des conditions pathologiques, les microglies présentent une forme amiboïde résultant de la résorption des ramifications (**Kim et Vellis, 2005)**. Il a été rapporté que l'activation des microglies et également la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, TNFα en particulier, aboutissent à l'altération de l'intégrité de la BHE **(Nishioku *et al*., 2010)**.

Les astrocytes sont idéalement situés pour assurer la communication neuro-vasculaire. Ils entourent les synapses et avec, leurs extrémités, entourent les vaisseaux sanguins. Leur rôle majeur dans l'immunité du cerveau consiste en la libération de cytokines anti-inflammatoires **(Nash *et al*., 2011)**. A la suite de leur activation dans un contexte d'inflammation, les astrocytes synthétisent et libèrent une panoplie de neuromédiateurs inflammatoires incluant, le complément, les cytokines (IL-1β ; IL-6) et les chimiokines **(Figure 14.A) (Kim, 2011)**.

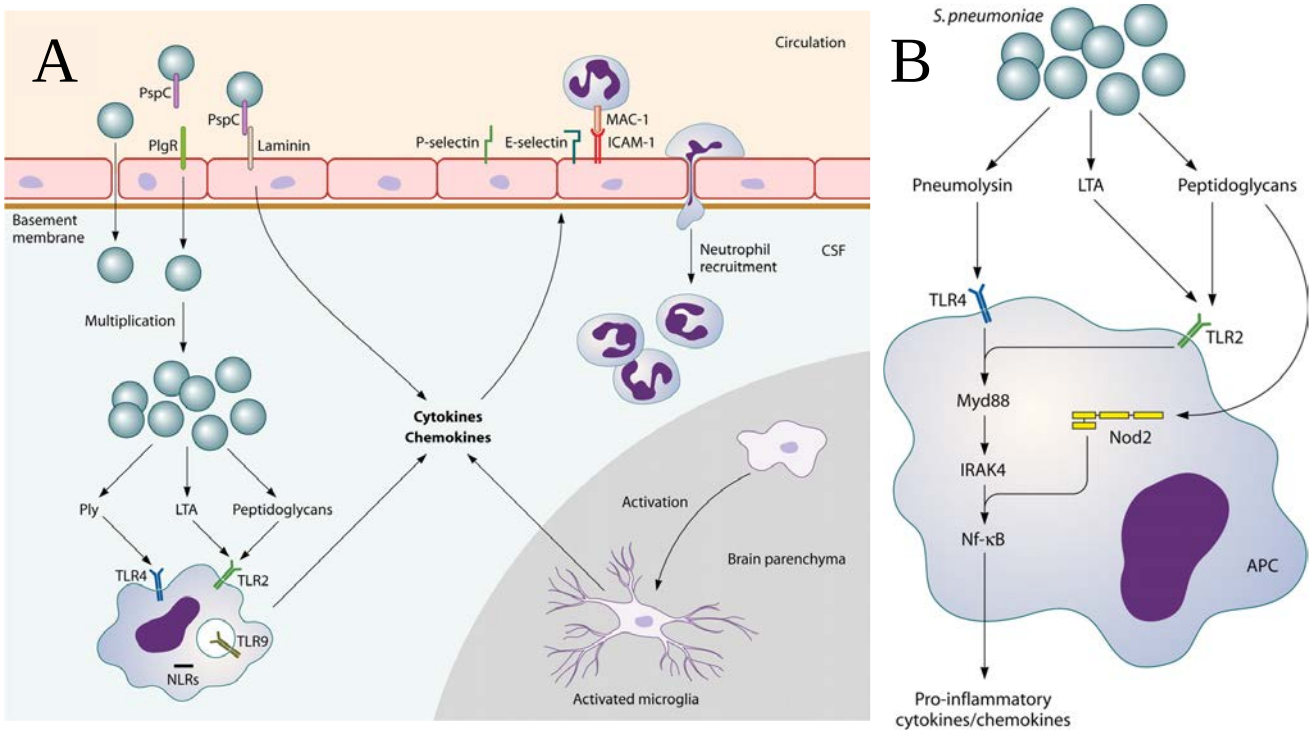

Figure 14. Activation de l'immunité dans le parenchyme cérébral : cas de l'infection par *Streptococcus pneumoniae* (Mook-Kanamori *et al*., 2011).

(A) L'adhérence de *S. pneumoniae* aux cellules endothéliales en utilisant PspC, qui se lie à la laminine et pIgR pour assurer une transcytose à travers l'endothélium. Une fois dans le SNC, le pneumocoque se multiplie librement et libère des produits bactériens tels que la Ply, reconnue par TLR2 et TLR4 présents au niveau des cellules circulantes présentatrices d'antigènes. **(B)** Les PRRs impliqués dans la reconnaissance et l'activation du système immunitaire local dans le cerveau après une infection par *S. pneumoniae*.

Chapitre II : Le tissu adipeux blanc

Il existe plusieurs types de tissus adipeux : le tissu adipeux brun (dont la fonction principale est de favoriser la dépense énergétique par production de chaleur lors de la thermogénèse adaptative), le tissu adipeux blanc (dont la fonction principale est d'assurer le stockage ou la libération de l'énergie), et le tissu adipeux médullaire (qui joue un rôle essentiel dans le microenvironnement osseux). Dans ce chapitre, nous décrirons principalement le tissu adipeux blanc, qui a fait l'objet de nos travaux de Thèse. Par commodité, nous parlerons simplement du « tissu adipeux ».

Le tissu adipeux blanc joue un rôle central dans le contrôle de l'équilibre énergétique de l'organisme. Cependant, comme nous allons le voir, les fonctions du tissu adipeux blanc ne se limitent pas à l'accumulation/libération de l'énergie. En effet, les conséquences d'un excès de tissu adipeux blanc (surpoids et obésité), d'une déficience (lipoatrophie), ou d'une répartition inadéquate de ce tissu (lipodystrophie) ont permis de mettre en évidence son rôle-clé dans le métabolisme et l'immunité.

I. Généralités sur le tissu adipeux blanc

Outre sa fonction de protection thermique et mécanique, le tissu adipeux a, jusqu'en 1987 **(Siiteri, 1987)**, été considéré comme un organe inerte de stockage ou libération des lipides, selon les besoins de l'organisme **(Rosen et Spiegelamn, 2014)**. Cependant, la découverte en 1994 que le tissu adipeux produit de la leptine a changé notre vision de ce tissu **(Zhang *et al.*, 1994)**. De nombreuses autres hormones et cytokines sécrétées par le tissu adipeux ont ensuite été identifiées, permettant à présent de considérer ce tissu comme un véritable organe endocrine capable de contrôler le métabolisme et la balance énergétique **(Kershaw et Flier, 2004 ; Ahima et Flier, 2000)**. Le tissu adipeux peut de plus recevoir et répondre aux signaux provenant d'autres organes, tissus ou cellules (comme, entre autres ; le cerveau, le pancréas, les muscles squelettiques, le foie, les intestins ou les cellules immunes) *via* les récepteurs qu'il exprime **(Margetic *et al.*, 2002 ; Bartelt et Heeren, 2014)**.

L'une des propriétés les plus remarquables des tissus adipeux, et en particulier du tissu adipeux blanc, est leur plasticité. Par exemple, en réponse à des changements d'ordre nutritionnel (alimentation plus ou moins riche en lipides), ce tissu subit des modifications qui affectent sa

composition cellulaire (recrutement de cellules immunes) et/ou sa structure (hypertrophie et hyperplasie des adipocytes) (Choe *et al*., 2016). Du fait de son rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie énergétique ainsi que, comme nous le décrirons dans un prochain paragraphe, de la présence de cellules immunes, le tissu adipeux blanc est à l'interface du métabolisme et de l'immunité (Lolmède *et al.*, 2011 ; Ferrante, 2013).

II. Distribution anatomique du tissu adipeux blanc : différents dépôts ayant différentes fonctions

Le tissu adipeux blanc se développe dans de nombreux sites anatomiques de l'organisme, appelés dépôts **(Bartelt et Heereen, 2014 ; Kwock *et al*., 2016)**. En effet, ce tissu peut se localiser sous le derme, dans la moelle osseuse, au niveau des articulations et au niveau viscéral **(Zwick *et al*., 2018) (Figure 17)**.

Deux types majeurs de dépôts sont identifiés : les dépôts viscéraux et les dépôts sous-cutanés **(Ibrahim, 2010)**. Le tissu adipeux viscéral entoure les organes vitaux et correspond au tissu adipeux omental, mésentérique, rétropéritonéal, gonadique et péricardique **(Wajchenberg, 2000)**. Il est important de noter que de nombreux dépôts présents chez l'homme n'ont pas de transposition anatomique chez la souris, et réciproquement. Ainsi, le tissu adipeux viscéral, chez l'homme, est majoritairement contenu dans l'épiploon, peu présent chez les rongeurs. A l'inverse, le tissu adipeux épididymaire des souris mâles, n'existe pas chez l'homme. Le tissu adipeux sous-cutané est localisé sous la peau au niveau de l'abdomen et au niveau de la région glutéofumorale **(Kwock *et al*., 2016 ; Bartelt et Heereen, 2014)**.

L'évaluation de la masse du tissu adipeux se fait par des mesures anthropométriques telles que la mesure de l'épaisseur de la peau ou encore le rapport du tour de taille et des hanches. Ce rapport est d'intérêt pour des études épidémiologiques ou pour l'évaluation du développement du tissu adipeux dans la partie abdominale, cependant, il ne permet pas de distinguer entre le développement profond (viscéral) et superficiel (sous-cutané) du tissu adipeux **(Brundavani *et al*., 2006)**. Il existe actuellement la tomographie computationnelle qui permet de distinguer clairement le tissu adipeux des autres organes, et ainsi le sous-cutané du viscéral **(Shuster *et al*., 2012)**.

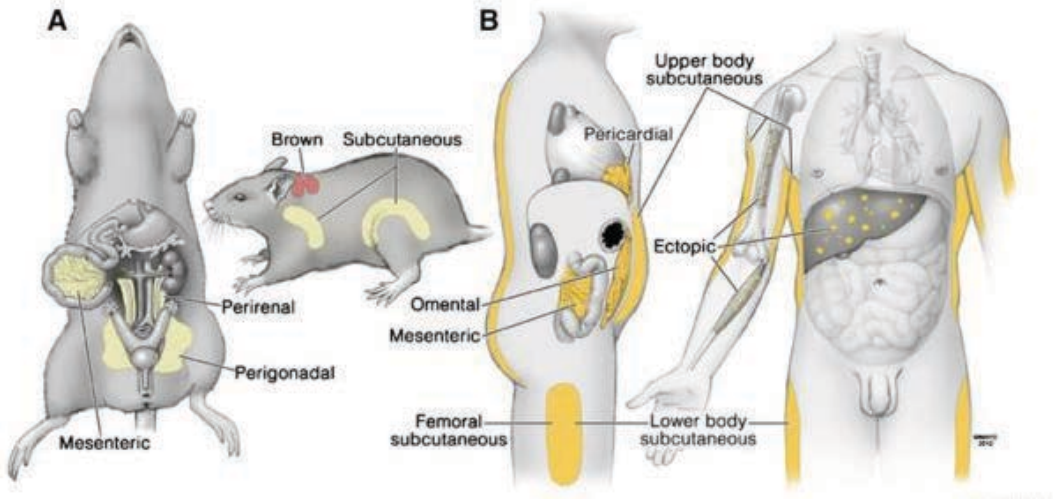

Figure 15. Anatomie des dépôts majeurs de tissu adipeux blanc chez l'Homme et la souris (Tchkonia *et al*., 2013).

Différents dépôts de tissu adipeux blanc et leur nomenclature chez les rongeurs (A) et les humains (B).

Il est essentiel de noter que les dépôts de tissu adipeux sous-cutanés et viscéraux diffèrent sur de nombreux aspects. L'une des principales différences entre ces dépôts repose sur l'augmentation du risque métabolique associé à l'expansion du tissu viscéral, contrairement au tissu sous-cutané. Cette notion a été introduite pour la première fois par **Jean Vague** en 1947, qui rapportait que l'obésité ne se développe pas de la même manière chez toutes les personnes et que la distribution anatomique du tissu adipeux est importante pour comprendre le lien entre l'obésité et les perturbations du métabolisme lipidique et glucidique associées **(Vague, 1947)**. Depuis, de nombreuses études ont montré que l'excès de tissu adipeux dans la partie supérieure du corps ; correspondant à l'expansion du dépôt viscéral (dénommée par **Vague** « obésité masculine » ou « androïde »), corrèle fréquemment avec un risque élevé de mortalité ou de développer des désordres métaboliques (diabète, hyperlipidémie, hypertension et athérosclérose coronaire, cérébrale et vasculaire), à l'inverse de l'excès de tissu adipeux dans la partie inférieure du corps ; qui correspond à l'expansion du tissu adipeux sous-cutané (« obésité féminine » ou « gynoïde », selon **Vague**) **(Marin *et al*., 1992 ; Lafontan *et al*., 2014 ; Lee *et al*., 2013)**. En effet, le développement excessif du tissu adipeux viscéral corréle avec l'hyper-insulinémie et l'intolérance au glucose **(Tulloch-Reid *et al*., 2004 ; Shuster *et al*., 2012)**. Il a été également décrit que l'excès de tissu adipeux dans la région intra-abdominale est associé à une diminution de la sensibilité à l'insuline et à une altération des taux plasmatiques des lipides/lipoprotéines **(Wajchenberg, 2000)**. Une étude corrélative menée par **McLaughlin *et al*. (2011)** montre que les personnes qui développent une insulinorésistance, sont celles qui présentent un taux et une masse de tissu adipeux viscéral les plus élevés **(McLaughlin *et al*., 2011)**.

A l'inverse, le dépôt sous-cutané est généralement associé à des effets métaboliques bénéfiques. En effet, une analyse de régression logistique montre que chaque variation de la déviation standard du tissu adipeux sous-cutané est associée à 48% de diminution de l'insulino-résistance, contrairement au tissu adipeux viscéral, pour lequel chaque variation est associée à 80% d'augmentation **(McLanghlin *et al.*, 2011)**. Dans le même ordre d'idée, **Tran *et al.* (2008)** montrent que la transplantation de tissu adipeux sous-cutané dans la région du tissu adipeux viscéral, chez la souris, conduit à l'amélioration de l'insulino-sensibilité, à l'augmentation de l'absorption du glucose et à une perte de poids corporel **(Tran *et al.*, 2008)**.

Les effets métaboliques différents entre le dépôt sous-cutané et le dépôt viscéral sont associés à des différences structurales et fonctionnelles entre les tissus. En effet, une analyse comparative entre les dépôts de tissu adipeux sous-cutané (*i.e.* inguinal) et viscéral (*i.e.* mésentérique, épidydimal et rétropéritonéal) montre que la taille des adipocytes (en moyenne) est plus petite dans le dépôt inguinal et le dépôt mésentérique que dans le dépôt épidydimal **(Sackmann-Sala *et al.*, 2012)**, et que le profil protéomique du tissu adipeux inguinal est différent de celui des dépôts mésentérique et épidydimal, ce qui pourrait expliquer son activité métablique réduite **(Cinti, 2012)**. Des différences au niveau de l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse (processus de synthèse des lipides), la lipolyse (processus de dégradation des lipides), et l'oxydation des acides gras ont également été rapportées **(Arner *et al.*, 1995 ; Lemieux et Deprès, 1994)** (*cf.* la description plus précise de ces mécanismes dans le paragraphe, page(s) 60-61-62). Alors que l'expression des gènes de la lipogenèse et de la lipolyse est plus importante au niveau des dépôts mésentériques et rétropéritonéaux comparé aux dépôts inguinaux chez le rat, l'expression des gènes de l'oxydation des acides gras est au contraire plus importante dans les dépôts inguinaux et mésentériques comparés aux dépôts retropéritonéaux. Ces variations pourraient expliquer les effets métaboliques délétères associés à l'excès de tissu adipeux viscéral (**Palou *et al.*, 2009)**.

III. Composition cellulaire du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est composé d'adipocytes majoritairement uniloculaires entourés de fibres de collagène, de vaisseaux sanguins, de fibroblastes, de préadipocytes et de cellules immunes **(Ahima et Flier, 2000)**. De plus en plus de données montrent que le tissu adipeux blanc n'est pas un tissu sans anatomie spécifique, mais plutôt un organe avec une anatomie discrète, une vascularisation et une innervation spécifiques, une très haute plasticité physiologique et une cytologie complexe, comme nous allons le voir **(Coelho *et al.*, 2013**).

Un traitement du tissu adipeux par la collagénase permet de séparer les cellules du tissu en fraction adipocytaire ; contenant les adipocytes, et fraction stroma-vasculaire (FSV) ; composée essentiellement de préadipocytes (précurseurs des adipocytes), fibroblastes, cellules endothéliales vasculaires et cellules immunes **(Malcolm *et al.*, 1989)**.

1. La fraction adipocytaire

La fraction adipocytaire du tissu adipeux blanc contient les adipocytes, qui sont des cellules sphériques, immuno-réactives à la leptine et au S-100B, et dont 90% du volume est occupé par une gouttelette lipidique uniloculaire **(Dugail et Luley, 2013)**. Ces cellules sont également caractérisées par leur réactivité à l'insuline **(Shepherd *et al.*, 1993)**.

Ainsi que nous le décrirons lorsque nous aborderons les fonctions du tissu adipeux (*cf.* page(s) X), les principales fonctions physiologiques des adipocytes sont, d'une part, leurs propriétés anaboliques caractérisées par leur capacité à synthétiser et stocker des triglycérides (TG), et d'autre part, leurs propriétés cataboliques caractérisées par la voie lipolytique, c'est-à-dire l'hydrolyse des TG et la libération d'acides gras non estérifiés. Par ailleurs, l'adipocyte est capable de produire et sécréter de nombreux facteurs exerçant des fonctions endocrines, autocrine et paracrine.

2. La fraction stromavasculaire

Bien que les adipocytes soient le composant cellulaire majeur du tissu adipeux blanc de par leur nombre, ce tissu est également composé d'un mélange hétérogène de cellules dénommé « fraction stromavasculaire » (FSV).

La FSV est principalement composée de cellules souches mésenchymateuses et de préadipocytes (qui formeront des adipocytes en fonction de la balance énergétique, des conditions hormonales ou nutritionnelles), de fibroblastes (qui assurent le renouvellement de la matrice extracellulaire), de cellules endothéliales et péricytes (qui ont un rôle essentiel dans le vascularisation et l'angiogénèse tissulaire) **(Silva *et al.*, 2017 ; Han *et al.*, 2015)**, et de cellules immunes (qui participent au maintien de l'homéostasie du tissu). Nous allons à présent décrire plus précisément les préadipocytes et les cellules immunes.

a. Les préadipocytes et l'adipogenèse

Lorsque les besoins énergétiques le nécessitent, de nouveaux adipocytes sont formés grâce à la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en préadipocytes puis en adipocytes, selon un processus appelé adipogenèse **(Tang et Lane, 2012)**. Ce processus de différenciation a été particulièrement bien étudié *in vitro*, grâce à la lignée préadipocytaire murine 3T3-L1 (que nous

avons utilisé lors de nos études) ou aux fibroblastes embryonnaires murins dont on induit la différenciation en adipocytes par l'ajout d'un mélange de dexaméthasone, d'IBMX et d'insuline **(Tang et Lane, 2012)**. L'adipogenèse est un processus complexe qui inclue des modifications morphologiques (d'une forme fibroblastique à une forme ronde), l'accumulation de lipides en gouttelettes, et l'expression d'un large panel de gènes spécifiques des adipocytes matures. Plusieurs facteurs de transcription jouent un rôle essentiel dans l'adipogenèse, parmi lesquels PPAR-γ (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ*), qui est l'acteur central du processus, C/EBP (*CCAAT/Enhancer-Binding Protein*) α, β, γ et δ et les KLFs (*Krüppel-Like factors*) **(Rosen *et al*., 2000 ; Wang *et al*., 1995)**.

b. Les cellules immunes du tissu adipeux blanc

Depuis plus de 10 ans, il a été mis en évidence la présence de cellules immunes, à la fois innées et adaptatives, au sein du tissu adipeux. Le nombre, et la nature des cellules immunes présentes dans le tissu peuvent varier en fonction des conditions physiologiques ou pathophysiologiques, et ceci a été particulièrement étudié dans le cadre de l'obésité (*cf*. page 61).

La première démonstration de la présence de cellules immunes dans le tissu adipeux blanc date de 2003, il s'agissait des macrophages, détectés en plus grand nombre dans le tissu d'individus obèses que dans celui d'individus minces, cette accumulation étant plus importante dans le dépôt viscéral **(Weisberg *et al*., 2003)**. Depuis cette date, pratiquement tous les types ou sous-types de cellules immunes ont été identifés dans le tissu adipeux blanc, avec, cependant, des caractéristiques différentes de celles rapportées dans les tissus lymphoides traditionnels.

Chez un individu (homme ou souris) normopondéral, les cellules immunes présentes au sein du tissu adipeux sont le lymphocytes T $CD4^+$ **(Winer *et al*., 2009)**, les lymphocytes B **(Winer *et al*., 2011)**, les lymphocytes T régulateurs (Treg) **(Burzyn *et al*., 2013)**, les iNKT **(Lynch *et al*., 2009)**, les mastocytes **(Liu *et al*., 2009)**, les éosinophiles **(Wu *et al*., 2011)**, les macrophages **(Boutens et Stienstra, 2016)** et les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2) **(Flash et Dievenbash, 2015)**. Ces populations immunes présentent un profil anti-inflammatoire entretenu essentiellement par les cytokines IL-4 et IL-13 **(Van Dyken et Locksley, 2013)**. Les éosinophiles constituent la source majeure d'IL-4 dans le tissu adipeux, cytokine indispensable pour maintenir l'homéostasie et protéger contre le développement de l'insulinorésistance locale et systémique **(Wu *et al*., 2011 ; Kita *et al*., 2011)**. Les ILC2s sont les régulateurs majeurs de l'activité des éosinophiles *via* l'IL-5 qu'ils produisent **(Nussbaum *et al*., 2013)**. Les Treg, qui correspondent à la population de lymphocytes qui limite l'excès de la réponse immune et assure l'homéostasie et la réparation

tissulaire, jouent un rôle important dans le maintien et la régulation du profil anti-inflammatoire du tissu adipeux, et s'avèrent essentiels pour l'homéostasie métabolique **(Burzyn *et al.*, 2013)**. De plus, les Treg du tissu adipeux sont uniques du fait qu'ils présentent un répertoire de TCR remarquablement redondant **(Mathis 2013)**. Les iNKT sécrètent les cytokines anti-inflammatoires IL-2 et IL-10, leur permettant d'induire un profil anti-inflammatoire des macrophages et de contrôler la prolifération des Treg **(Lynch *et al.*, 2015)**. Les Treg et iNKT sont des populations particulièrement enrichies dans les tissus adipeux humain et murin d'individus minces, et expriment une combinaison de récepteurs de surface et un profil de sécrétion de cytokines uniques, comparativement aux autres organes **(Feuerer *et al.*, 2009)**.

Chez un individu obèse, nous le verrons dans le Paragraphe sur l'obésité (page 61), la composition en cellules immune du tissu adipeux change ; aboutissant à un tissu présentant un profil inflammatoire, insulinorésistant.

IV. Fonctions métaboliques du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux est un réservoir d'énergie qui joue un rôle vital en tamponnant les flux de lipides, la résistance à l'insuline et la régulation de la clairance plasmatique des triglycérides évitant ainsi leur dépôt délétère dans d'autres organes (lipotoxicité) **(Frayn *et al.*, 2002)**. Les fonctions phares du tissu adipeux sont la lipolyse et la lipogenèse **(Figure 16)**, qui sont assurées par l'adipocyte et essentiellement régulées par des signaux provenant de l'hypothalamus.

1. La lipogenèse et la synthèse des triglycérides

Le stockage des lipides dans les adipocytes se fait sous forme de triglycérides (TG), permettant une mise en réserve de l'énergie **(Sethi et Vidal-Puig, 2007)**. La synthèse des TG se fait à partir de 2 principaux substrats : les acides gras non estérifiés et le glucose, préalablement activés en acyl-CoA et en glycérol-3-phosphate, respectivement.

La principale source de lipides des adipocytes provient des lipides plasmatiques circulants (soit des acides gras non estérifiés liés à l'albumine, soit des TG incorporés dans des lipoprotéines ; principalement des lipoprotéines de très basse densité ; les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) ou des chylomicrons). Les TG contenus dans les VLDL sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme sécrétée par les adipocytes. Les acides gras non estérifiés sont alors captés par les adipocytes grâce à des protéines de transport (FATP) et à la protéine CD36. Dans le cytosol, les acides gras sont liés aux protéines de transport FABP telles que la protéine aP2 qui est le produit du gène *Fabp4*. Enfin, les acides gras non estérifiés sont activés en acyl-CoA par l'acyl-

CoA synthase et peuvent être réestérifiés en TG en présence de glycérol-3-phosphate et être ainsi stockés dans les gouttelettes lipidiques. Le glycérol-3-phosphate provient de la phosphorylation (par une hexokinase) du glucose, entré dans l'adipocyte par un mécanisme de diffusion facilité par la protéine GLUT4, en glucose-6-phosphate lequel entre alors dans la voie de la glycolyse pour donner le glycérol-3-phosphate **(Witte *et al*., 2015)**. La glycolyse fournit également du pyruvate, qui sera transformé en acétyl-CoA (par la pyruvate deshydrogénase) puis en malonyl-CoA (par l'ACC (*Acetyl-CoA Carboxylase*)), lui-même ensuite polymérisé en acide gras à chaine longue saturé par FAS (*Fatty Acid Synthase*). Plusieurs enzymes désaturases pourront ensuite intervenir pour former des acides gras plus ou moins saturés. Les acides gras ainsi néosynthétisés pourront être estérifiés en présence de glycérol-3-phosphate afin d'assurer le stockage des lipides sous forme de TG.

Il est cependant important de noter que la lipogenèse à partir du glucose reste débattue quant à son importance dans l'accumulation des TG dans l'adipocyte, tout au moins chez l'homme.

2. La lipolyse

Lorsqu'une demande énérgétique le nécessite (comme lors d'un jeûne), la libération des acides gras non estérifiés se fait par l'hydrolyse des TG de la gouttelette lipidique par le processus de lipolyse. La lipolyse est pricipalement due à l'action de deux lipases : la triglycéride lipase (ATGL ; *Adipocyte Triglycéride Lipase*) et la lipase hormonosensible (HSL ; *Hormone-sensitive Lipase*), respectivement responsables de la conversion des triglycérides en diglycérides et de l'hydrolyse des diglycérides en monoglycérides. Outre ces 2 enzymes, la lipoprotéine lipase (LPL) joue également un rôle important pour faciliter l'entrée des acides gras dans les adipocytes **(Kersten, 2014)**.

In fine, le processus de lipolyse aboutit au relargage des acides gras non estérifiés dans le sang, et ils seront alors utilisés par les cellules d'autres tissus/organes de l'organisme **(Frayn, 2002** ; **Kuriyama *et al*., 2002)**.

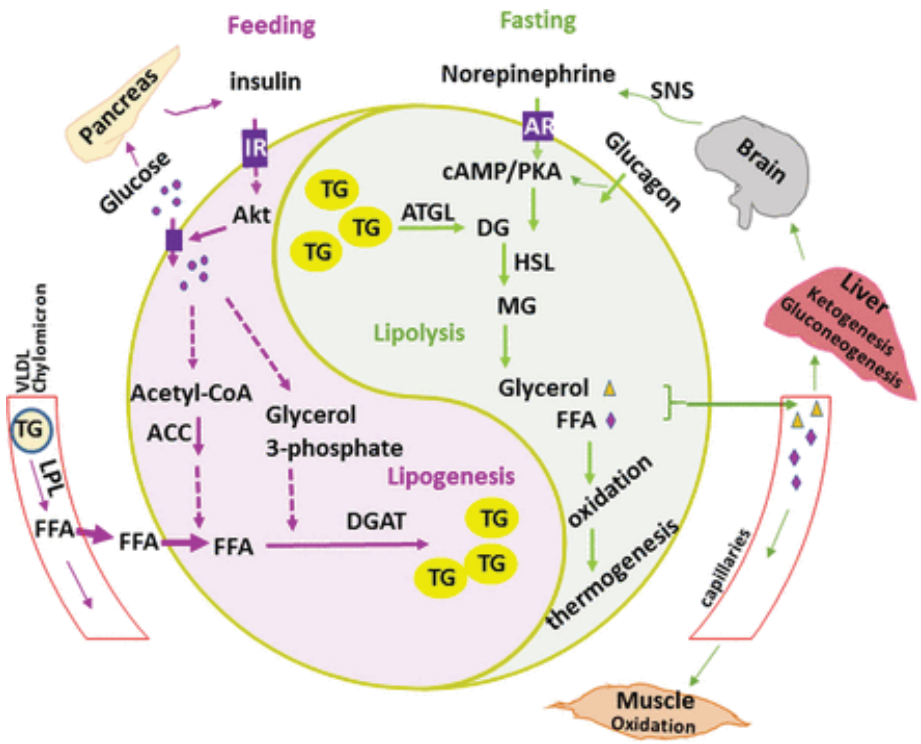

Figure 16. Le métabolisme lipidique contrôlé par le tissu adipeux (Luo *et al*., 2016).

La lipogenèse est un processus qui permet la conversion des carbohydrates en acides gras permettant ainsi la synthèse des triglycérides et l'expansion des gouttelettes lipidiques dans les adipocytes. La lipolyse, à l'opposé, réduit les triglycérides en acides gras libres et glycérol qui peuvent être oxydés ou libérés. L'absorption des acides gras libres par le foie, le muscle et les autres tissus correspond au métabolisme principal des lipides. La régulation de la balance lipolyse-lipogenèse est essentielle pour préserver l'homéostasie énergétique et la sensibilité à l'insuline. AR, *adrenergic receptor*; cAMP, *cyclic adenosine monophosphate*; IR, *insulin receptor*; PKA, *protein kinase A*.

3. Régulation de la lipolyse et de la lipogenèse

En plus d'être soumis à un contrôle nutritionnel, le stockage des triglycérides dans les adipocytes est également sensible à certaines hormones, notamment l'insuline ou la leptine.

L'insuline est en effet un régulateur majeur de presque toutes les fonctions de l'adipocyte **(Dimitriadis *et al*., 2011)**. En effet, l'insuline augmente l'expression du transporteur de glucose, favorise la lipogenèse, et à l'inverse, inhibe la lipolyse **(Louveau et Gondret, 2004 ; Smith et Kahn, 2016 ; Kershaw et Flier, 2004 ; (Picard *et al*., 1999)**.

La leptine intervient également dans le contrôle de la balance entre lipolyse et lipogenèse. En effet, une exposition d'adipocytes porcins à la leptine a pour effet d'inhiber la lipogenèse **(Ramsay et Richards, 2005)**.

Parmi les protéines associées aux gouttelettes lipidiques, la périlipine, ainsi que les protéines Cidea, Cidec et Cideb jouent un rôle important dans le métabolisme lipidique et dans le contrôle de la morphologie des gouttelettes lipidiques. Cidea et Cidec sont localisées à la surface des gouttelettes lipidiques et assurent leur fusion et leur croissance par des échanges et des transferts lipidiques **(Luo et Jia, 2016)**.

V. Fonctions endocrines du tissu adipeux blanc

Ainsi que nous l'avons évoqué en introduction à ce Chapitre, depuis la découverte de la leptine (**Zhang *et al.*, 1994)**, de nombreux autres facteurs sécrétés par le tissu adipeux ont été décrits, permettant de considérer le tissu adipeux blanc comme un véritable organe endocrine interagissant avec les autres organes/tissus comme les muscles, le foie, les intestins, le pancréas ou le cerveau, régulant ainsi de nombreuses fonctions physiologiques **(Lago *et al*., 2009)** (**Figure 17**).

Les sécrétions majeures du tissu adipeux sont la leptine et l'adiponectine ; toutes deux produites par les adipocytes **(Ahima et Flier, 2000)**. La sécrétion des cytokines pro- ou anti-inflammatoires est également assurée par des cellules non-adipocytaires telles que les cellules immunes et les préadipocytes **(Fain *et al*., 2004)**.

La leptine, sécrétée majoritairement par le tissu adipeux, est une protéine de 16kDa et 167 acides aminés. Le gène codant pour la leptine (*Ob*) a été découvert en 1994 **(Zhang *et al.*, 1994)** et ses récepteurs ($Lepr^{db}$, $Lepr^{fa}$) en 1995 et 1996 **(Tartaglia *et al.*, 1995)**. La leptine présente une structure homologue à celle des cytokines et est sécrétée en quantités proportionnelles à la masse du tissu adipeux **(Wajchenberg, 2000)**. Le tissu adipeux sous-cutané sécrète des quantités plus importantes que le dépôt viscéral **(Von Harmelen *et al*., 1998)**. L'expression et la sécrétion de la leptine sont modulées par divers facteurs. Par exemple, la sécrétion de la leptine est augmentée par l'insuline, les glucocorticoïdes, le TNF-α, ou les estrogènes et, à l'inverse, diminuée par la signalisation induite par les acides gras non -estérifiés **(Margetic *et al*., 2002 ; Fried *et al*., 2000)**.

La leptine agit sur le cerveau comme un adipostat. Transportée à travers la barrière hémato-encéphalique, la leptine se fixe à ses récepteurs, présents essentiellement au niveau des neurones anorexigènes du noyau arqué de l'hypothalamus, permettant ainsi d'inhiber l'appétit via la sécrétion du neuropeptide Y (NPY) et de l'agouti-related protein (AgRP) **(Schwartz *et al*. 1996 ; Sahu, 2003 ; Zhang *et al*., 1994 ; Van Swieten *et al*., 2014)**. De fait, les souris déficientes pour la leptine (*ob/ob)* ou son récepteur (*db/db*) sont obèses et hyperphagiques **(Drel *et al*., 2006)**. Les taux de leptine décroissent très rapidement à la suite d'une restriction calorique ou d'une perte de poids, ce qui permet de stimuler l'appétit et de réduire les dépenses énergétiques **(Bjorbaek et Kahn, 2004)**. Cependant, ni des taux élevés de leptine ni des traitements par de la leptine exogène ne permettent d'améliorer l'état d'obésité, ce qui s'explique par le développement d'une résistance à la leptine **(Myers *et al*., 2010)**, dont le mécanisme reste mal connu, même si certains travaux l'associent à un défaut de transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique **(Banks *et al*., 1999)**.

En plus de son rôle métabolique, la leptine présente également d'autres fonctions essentielles. En effet, elle stimule la prolifération, la différenciation et la fonction des cellules immunes, stimule la croissance des cellules endothéliales, induit l'angiogenèse et accélère la réparation tissulaire **(Margetic, 2002)**. Le rôle crucial de la leptine dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire est conforté par la description d'une atrophie thymique, d'une réduction de la diversité des lymphocytes T et de l'immunodéficience chez les souris déficientes **(Hick *et al.*, 2006)**.

L'adiponectine est une protéine de 30 kDa sécrétée par les adipocytes qui appartient structurellement à la famille du complément 1q **(Sowers, 2008)**. Elle présente des propriétés anti-inflammatoires, insulinosensibilisatrices et cardio-protectrices **(Lihn *et al.*, 2005)**. Les taux d'adiponectine dans le sang sont très élevés chez un individu normopondéral, représentant 0,01% des protéines plasmatiques totales **(Pajvani *et al.*, 2013)**. Contrairement aux autres adipokines, les niveaux de l'expression de l'ARN messager et la sécrétion de l'adiponectine sont réduits chez un sujet obèse ou diabétique **(Nigro *et al.*, 2014)**. Les souris déficientes en adiponectine sont insulinorésistantes, et celles qui la surexpriment, montrent une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose **(Maeda *et al.*, 2002)**. Les cibles de l'adiponectine sont le foie (qui exprime le récepteur AdipoR2) et le muscle squelettique (qui exprime le récepteur AdipoR1), deux tissus insulinosensibles **(Kadowaki et Yamauchi, 2005)**. L'adiponectine active la voie de la protéine kinase AMPK et réduit l'expression des enzymes de la néoglucogenèse comme la carboxylase phosphoénolpyruvate et la glucose-6-phosphatase, aboutissant à la suppression de la néoglucogenèse **(Sowers, 2008)**.

La résistine est une protéine de 12 kDa sécrétée par le tissu adipeux impliquée dans la résistance à l'insuline **(Beltowski, 2003)**. La déficience en résistine protège les souris de l'hyperglycémie induite par la consommation d'un régime riche en graisses. La résistine inhibe les voies impliquées dans la signalisation de l'insuline en augmentant l'expression de SOCS-3 (*Suppressor of Cytokine Signaling-3*) *in vitro* et *in vivo* **(Steppan *et al.*, 2005)**. La résistine a été longuement considérée comme un facteur exclusivement sécrété par le tissu adipeux et qui a un lien direct avec l'obésité et la résistance à l'insuline. Les taux de résistine plasmatique augmentent chez les souris obèses et sont associés à la résistance à l'insuline et au développement du diabète de type 2 **(Benomar *et al.*, 2016)**. Cependant, certains travaux montrent l'expression de cette protéine modérément par les cellules mononuclées, chez l'homme **(Jamaluddin *et al.*, 2012)** et d'autres n'associent pas l'insulinorésistance développée au cours de l'obésité à une augmentation importante de l'expression de la résistine. En effet, des analyses statistiques et corrélatives ne

montrent pas un lien direct entre les taux de résistine et l'insulinorésistance, ce qui pourrait s'expliquer par la nature des dépôts de tissus adipeux analysés dans ces études **(Way *et al.*, 2001, Degawa-Yamauchi *et al.*, 2003)**. La molécule FGF21 (*fibroblast growth factor 21*) est essentiellement considérée comme une hépatokine (produite par le foie) et une myokine (produite par le muscle) mais elle peut également être produite par le tissu adipeux dans certaines conditions, telles que l'exposition au froid **(Hondares *et al.*, 2011)**.

L'expression et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α, l'IL-6 et ou le MCP-1 sont augmentées lors de l'obésité **(Minihane, 2015 ; Schmidt *et al.*, 2015)**. L'augmentation de l'expression du TNF-α dans l'obésité est associée à la résistance à l'insuline résultant de l'altération de la signalisation de l'insuline. Le TNF-α active le facteur nucléaire NF-κb induisant une série de changements inflammatoires au niveau du tissu adipeux viscéral **(Tzanavari *et al.*, 2010)**. La sécrétion de l'IL-6, qui est une cytokine pléiotrope circulante, participe à la mise en place de l'inflammation, l'altération de la défense immune de l'hôte et l'altération tissulaire **(Eder *et al.*, 2009)**. L'augmentation de la concentration de l'IL-6 localement au niveau du tissu adipeux (sous-cutané et viscéral) est capable d'augmenter l'expression et la production de la leptine en particulier en combinaison avec un glucocorticocoïde (la dexaméthasone) chez l'Homme **(Trujillo *et al.*, 2004)**. Le tissu adipeux est également caractérisé par la sécrétion de la chimiokine MCP-1 (*Macrophage Chemoattractant Protein*) qui favorise la migration et l'infiltration des monocytes/macrophages au sein du tissu adipeux obèse ; participant ainsi à la mise en place de l'inflammation chronique à bas bruit qui accompagne le développement de l'obésité. En effet, les taux de MCP-1 corrèlent avec l'adiposité, et la surexpression de MCP-1 dans le tissu adipeux augmente le recrutement des macrophages et aggrave les altérations métaboliques **(Kanda *et al.*, 2006)**. La source de MCP-1 a longtemps été associée aux macrophages infiltrés dans le tissu adipeux. Cependant, l'analyse des préadipocytes a permis de montrer que ces derniers sont la source majeure de MCP-1 dans un contexte d'obésité (**Kaplan *et al.*, 2015)**. Cependant, il existe d'autres chimiokines (CCL-2, CCL-5, CXCL-5 et CXCL-14) qui sont impliquées dans le recrutement de macrophages dans le tissu adipeux amplifiant l'inflammation **(WesterBacka *et al.*, 2006)**.

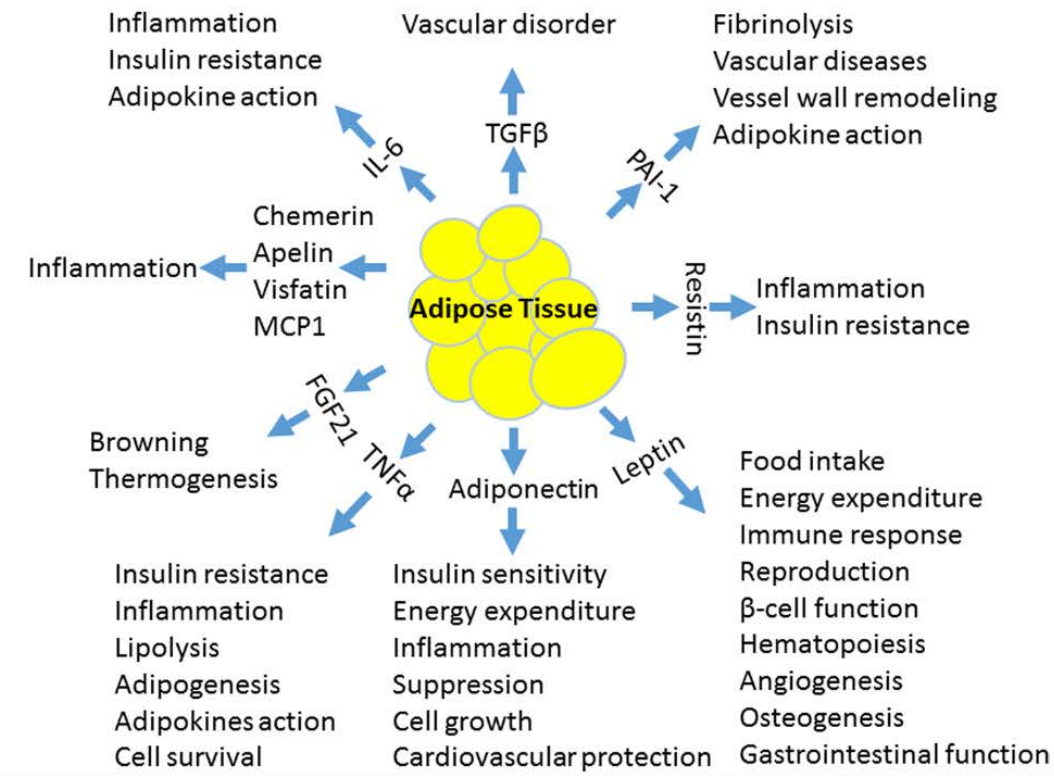

Figure 17. Les fonctions physiologiques des adipokines (Luo *et al.*, 2016).

ASP, *acylating simulation protein*; FGF21, *fibroblast growth factor 21*; IL6, *interleukin 6*; MCP1, *monocyte chemoattractant protein* 1; PAI1, *plasminogen activator inhibitor* 1; TNFα, *tumour necrosis factor alpha*.

VI. Pathologies du tissu adipeux blanc : Exemple de l'obésité

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'obésité se définit comme une « *accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé et réduire l'espérance de vie* » **(OMS, 2014)**. L'évaluation du sous-poids, du sur-poids, et de l'obésité chez l'adulte se base sur l'indice de masse corporelle (IMC). L'IMC est calculé par le rapport du poids de l'individu (exprimé en kg) sur le carré de sa taille (exprimée en mètre) (kg/m^2). Selon le *National Institute of Health* (NIH), l'obésité est considérée comme la seconde cause de mortalité aux Etats-Unis, et environ deux millions de personnes sont considérées en surpoids ou obèses. En Grande Bretagne et aux Etats-Unis, il a été montré que le nombre de personnes obèses a plus que doublé depuis 1980.

1. Causes de l'obésité

La surcharge pondérale résulte d'une dérégulation de l'homéostasie énergétique, intrinsèquement liée au bilan d'énergie. Le bilan énergétique est classiquement symbolisé par une balance dont les deux points de bascule sont les apports et les dépenses d'énergie. Les apports énergétiques proviennent de l'alimentation tandis que les dépenses dépendent de trois facteurs : le métabolisme

basal, l'activité physique, et la thermogénèse adaptative, une notion dont nous reparlerons à la fin de ce chapitre.
La première cause évidente de l'obésité est le déséquilibre entre les calories consommées (trop importantes) et les calories dépensées (trop faibles).

Les facteurs génétiques et hormonaux peuvent également jouer un rôle très important dans le développement de l'obésité. En effet, plusieurs mutations géniques ont été identifiées pour leur rôle dans le développement de l'obésité. Ces gènes sont surtout impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et donc de la voie leptine/ mélanocortine au niveau du système nerveux central **(Crowle et Turner, 2010)**. En 2007, des études d'associaton génétique pangénomique (GWAS) ont permis d'identifier le gène *FTO* (*Fat mass and obesity associated gene*), responsable du contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique **(Grant, 2008 ; Haupt, 2008)**. La découverte du gène *FTO* a été suivie de la mise en évidence du gène *MC4R* (*melanocortin-4 receptor*), dont la mutation est associée à une obésité sévère chez les enfants **(Loos *et al.*, 2008)**. Une mutation au niveau du gène *POMC* (*Pro-opiomelanocortin*) est également associée à une obésité sévère **(Krude *et al.*, 1998 ; Flickinger et salz, 1994)**. A l'heure actuelle, 20 loci différents ont été identifiés comme jouant un rôle dans le développement de l'obésité **(Herrera et Lindgren, 2010)**.

2. Modifications du tissu adipeux blanc associées à l'obésité

Contrairement à l'inflammation aiguë qui est rapide, qui se déclenche en réponse à un signal de danger et qui se caractérise par l'apparition de symptômes tels que la rougeur, le gonflement, et la fièvre ; l'inflammation du tissu adipeux dans un contexte d'obésité se caractérise par la mise en place d'une inflammation chronique à bas bruit **(Figure 18) (Neels et Olefsky, 2006 ; Jung et Choi, 2014)**. Cette inflammation est à l'origine des dysfonctionnements métaboliques associés à l'obésité, tels que la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 **(Hotamisligil, 2006 ; Chandalia et Abate, 2007)**.

Lors du développement de l'obésité, le tissu adipeux s'expand du fait de l'augmentation de la taille des adipocytes (hypertrophie) et/ou de l'augmentation de leur nombre (hyperplasie). Lorsque l'hypertrophie des adipocytes dépasse la limite de diffusion de l'oxygène dans la cellule et que l'angiogenèse est inhibée, des zones hypoxiques se forment entrainant la mort des adipocytes **(Wood *et al.*, 2009 ; Trayhurn, 2013 ; Kern *et al.*, 1995 ; Hotamisligil, 2006)**. Les débris des adipocytes morts activent l'inflammasome NLRP3 induisant la sécrétion d'IL-1ß et IL-18 **(Nguyen *et al.*, 2007 ; Vandanmagsar *et al.*, 2011 ; Junghyo *et al.*, 2009)**.

L'hypoxie mise en place dans ce contexte est classiquement associée à l'attraction des monocytes et à leur différenciation en macrophages **(He *et al.*, 2011 ; Krishnan *et al.*, 2012)**. De fait, l'obésité est associée à (*i*) une augmentation très importante du nombre de macrophages dans le tissu adipeux, (*ii*) une augmentation de l'expression du marqueur de surface $CD11c^+$, ainsi qu'à (*iii*) des changements de morphologie et de localisation des macrophages qui se présentent sous forme de couronne autour des adipocytes **(Ferrante, 2013 ; Cinti *et al.*, 2005 ; Chawla *et al.*, 2011 ; Muir *et al.*, 2018)**.

L'inflammation chronique à bas bruit associée à l'obésité est principalement liée à l'infiltration et la prolifération de cellules immunes proinflammatoires (macrophages de type M1, lymphocytes $CD8^+$, lymphocytes Th1), tandis qu'à l'inverse, les cellules immunes anti-inflammatoires (éosinophiles, lymphocytes Th2, ILC, lymphocytes T régulateurs) émigrent du tissu. Ainsi, d'un tissu « sain », présentant un profil anti-inflammatoire et insulino-sensible, le tissu adipeux obèse présente progressivement un profil inflammatoire, insulinorésistant. De plus, il est intéressant de noter que les macrophages recrutés dans le tissu adipeux dans un contexte d'obésité ne sont pas tout à fait identiques aux macrophages de type M1 recrutés dans d'autres tissus **(Medzhitov, 2008 ; Fain *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2003)**. En effet, les macrophages M1 recrutés dans le tissu adipeux obèse se caractérisent par une forte expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, ce qui permet de les qualifier de macrophages à activité métabolique **(Kratz *et al.*, 2014 ; Xu *et al.*, 2013)**.

Les neutrophiles sont minoritaires dans le tissu adipeux (<1% de la fraction stromavasculaire) et leur nombre augmente dans un contexte d'obésité (2% de la FSV) **(Ferrante, 2013)**.
Bertola *et al.* montrent qu'une sous-population de cellules dendritiques ($CD11c^+$, $F4/80^{dim}$) est significativement augmentée dans le tissu adipeux obèse **(Bertola *et al.*, 2012)**.
Contrairement aux macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques, la proportion d'éosinophiles est diminuée dans le tissu obèse, ce qui entraine une chute très importante de la sécrétion d'IL-4, contribuant au changement du phénotype des macrophages d'un profil de type 2 (M2, anti-inflammatoire), vers un profil de type 1 (M1, proinflammatoire) **(Wu *et al.*, 2011)**.
Le nombre de lymphocytes du tissu adipeux est également modifié par l'obésité, à la fois les lymphocytes T ($CD4^+$ et $CD8^+$) et les lymphocytes B. L'augmentation du nombre de lymphocytes T $CD8^+$ joue par ailleurs un rôle important dans le recrutement massif des macrophages au cours du développement de l'obésité **(Nishimura *et al.*, 2009)**. La population des lymphocytes B du tissu adipeux est très peu représentée et étudiée. Cependant, le transfert (par voie intrapéritonéale) d'immunoglobulines provenant de souris obèses diabétiques entraine à un état d'insulinorésistance

chez des souris minces receveuses. Inversement, des souris obèses déplétées en lymphocytes B ne présentent pas de maladies métaboliques. Ces données suggèrent l'existence, dans le tissu adipeux de souris obèses, de lymphocytes B délétères car produisant des anticorps favorisant le développement d'un diabète de type 2 **(Winer *et al*., 2011)**. Le pourcentage des cellules immunes impliquées dans la réponse anti-inflammatoire tels que les lymphocytes T régulateurs (Treg) est diminué **(Feuerer *et al*., 2009)**. Enfin, le nombre de cellules iNKT est diminué dans un contexte d'obésité et leur restauration chez la souris est associée à une perte de poids et à une amélioration de la sensibilité à l'insuline **(Lynch *et al*., 2012).**

Les modifications du nombre et de la fonction (notamment les sécrétions) des cellules immunes présentes dans le tissu adipeux conduisent à la mise en place progressive d'une inflammation du tissu, qui va progressivement s'étendre à de nombreux autres tissus/organes de l'organisme **(Hotamisligil, 2006 ; Sartipy *et al*., 2003** ; **Strissel *et al*., 2007 ; Shi *et al*., 2006 ; Lumeng *et al*., 2007 ; Nguyen *et al*., 2007 ; Vandanmagsar *et al*., 2011)**, tel que le cerveau ainsi que nous allons le voir dans le paragraphe suivant.

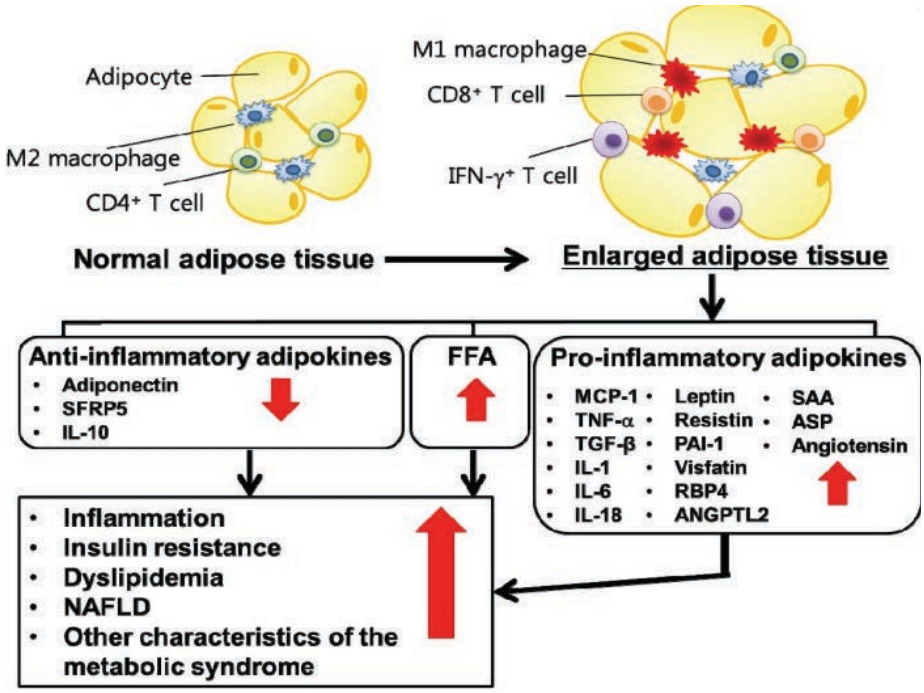

Figure 18. Schéma représentatif des modulations immunes induites dans le tissu adipeux blanc au cours du développement de l'obésité (Jung et Choi, 2014).

Le développement de l'obésité est associé à des modulations importantes des populations de cellules immunes du tissu adipeux, caractérisées par la transition progressive d'un état anti-inflammatoire à un état proinflammatoire.

3. Perturbations du système nerveux central associées à l'obésité

L'obésité est également associée à une inflammation au niveau hypothalamique qui aboutit à l'altération de la signalisation de la leptine **(Banks *et al.*, 1999)** et de l'insuline **(De Souza *et al.*, 2005 ; Howard et al., 2004 ; Picardi *et al.*, 2008, Dorfman et Thaler, 2015)**. L'inflammation est également marquée par l'infiltration de macrophages à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) et à une activation des cellules de la microglie **(Buckman *et al.*, 2014 ; Stranahan *et al.*, 2016)**. Ainsi l'inhibition de l'inflammation hypothalamique conduit à une diminution de la prise alimentaire et une perte de poids **(Howard et al., 2004 ; De Souza *et al.*, 2005 ; Xue *et al.*, 2007 ; Picardi *et al.*, 2008)**. De plus, l'obésité induit l'apoptose des neurones et l'altération de la signalisation synaptique au niveau du noyau arqué et de l'hypothalamus latéral et une augmentation de l'ARNm et de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1β et TNFα **(Moraes *et al.*, 2009)**. Des études menées chez le rat montrent que l'obésité altère les fonctions cognitives, en particulier la mémoire spatiale, augmente la perméabilité de la BHE au niveau de l'hippocampe (caractérisée par la diminution de l'expression des protéines de jonction serrées Claudine 5 et 12) **(Kanoski *et al.*, 2010)** et diminue l'activité métabolique assurée par les microvaisseaux de la BHE **(Ouyang *et al.*, 2014 ; Rhea *et al.*, 2017).**

VII. Conversion du tissu adipeux blanc en tissu adieux beige

Ainsi que nous l'avons évoqué à plusieurs reprises dans ce Chapitre, le tissu adipeux blanc est doté d'une plasticité remarquable lui permettant de s'adapter aux modifications environnementales.

Par exemple, certaines conditions comme l'exposition au froid, favorisent le développement, au sein du tissu adipeux blanc, d'adipocytes exprimant la protéine de découplage UCP-1 (*Uncoupling Protein-1*), classiquement associée aux adipocytes bruns (**Cousin *et al.*, 1992**). Ces adipocytes sont démommés BRITE (pour *BRown in WhITE*) ou beiges.

Dans le présent chapitre, nous allons résumer les principales caractéristiques du tissu adipeux beige puisque, lors de nos travaux, nous avons observé la conversion du tissu adipeux blanc en tissu adipeux beige, dans certaines de nos conditions expérimentales et ce, de manière inattendue.

1. Généralités

La thermogenèse est directement liée à la respiratoire mitochondriale. Au sein de l'adipocyte brun ou de l'adipocyte beige, la protéine UCP-1, située dans la membrane interne de la mitochondrie,

permet de découpler la respiratoire cellulaire ce qui favorise le retour des protons dans la matrice mitochondriale sans s'accompagner de la synthèse d'ATP **(Nedergaard *et al.*, 2001)**. Outre la protéine UCP-1, les adipocytes beiges expriment spécifiquement les marqueurs Tbx-1, Tmem-26 et CD137 **(Wu *et al.*, 2013)**.

Comparativement aux adipocytes blancs, les adipocytes beiges sont multiloculaires, expriment UCP-1 et présentent un contenu mitochondrial et une capacité oxydative plus élevés, ce qui confère à ce type cellulaire un potentiel thermogénique ; à savoir un potentiel de dissipation de l'énergie sous forme de chaleur **(Seale *et al.*, 2011)**. Il a également été rapporté que le tissu adipeux beige est plus vascularisé que le tissu adipeux blanc **(Park *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2018)**.

Comparativement aux adipocytes bruns, qui composent le tissu adipeux brun dont la fonction principale est de favoriser la dépense énergétique par thermogénèse, les adipocytes beiges ont moins de gouttelettes lipidiques et présentent un contenu mitochondrial et une activité thermogénique moindres **(Figure 19) (Kwok *et al.*, 2016)**.

L'origine des adipocytes beiges n'est pas encore parfaitement élucidée. Certains travaux suggèrent que ces cellules pourraient provenir directement des précurseurs des cellules musculaires lisses $Myh11^+$ ou encore $Myf5^+$ **(Long *et al.*, 2014)**, des préadipocytes dérivés des cellules souches d'origine mésodermique ou encore de la trans-différenciation des adipocytes blancs en adipocytes beiges **(Asano, *et al.* 2014; Carey, *et al.* 2014; Symonds *et al.* 2015)**. Les adipocytes beiges pourraient également provenir de l'engagement/différenciation des cellules $Pdgfr\alpha^+/CD34^+/Sca1^+$ qui présentent le potentiel de pouvoir se différencier en adipocytes beiges ou en adipocytes blancs **(Lee *et al.*, 2012)**. Cependant, le mécanisme moléculaire qui contrôle l'engagement d'une différenciation ou d'une trans-différenciation cellulaire n'est pas bien élucidé, notamment chez l'homme.

Il a été montré chez le porc, que le beiging (ou brunissement) du tissu adipeux blanc se développe à la suite de l'exposition de l'animal au froid pendant une courte durée (4°C, 10 heures) mais pas à la suite d'une exposition de longue durée (8°C, 15 jours) **(Gao *et al.*, 2018)**. Chez l'Homme, une exposition quotidienne au froid à raison de 2 heures par jour pendant 6 semaines est accompagnée d'une perte de poids et du brunissement du tissu adieux blanc **(Van den Berg *et al.*, 2017)**. Une étude menée chez la souris a montré que la thermoneutralité réduit la capacité du tissu adipeux sous-cutané à brunir et augmente la prédisposition au développement de l'obésité **(Cui *et al.*, 2016)**. Le brunissement du tissu adipeux blanc se développe également à la suite d'exercices physiques **(Stanford, 2015 ; Aldiss *et al.*, 2018)**, après stimulation des récepteurs noradrénergiques **(Warner et Mittag, 2016)**, à la suite d'une restriction calorique **(Fabbiano *et***

***al*., 2016),** ou encore à la suite d'une consommation quotidienne de thé vert **(Chen *et al*., 2017)**. Chez l'homme, du brunissement a été observé au niveau du tissu adipeux sous-cutané chez les sujets brûlés **(Patsouri *et al*., 2015 ; Sidossis *et al*., 2016)**, dans un contexte de cachexie reliée au cancer **(Petruzzelli *et al*., 2014)**, et au niveau du tissu adipeux épicardique de patients présentant une athéroslérose coronaire sévère ou une maladie cardiaque valvulaire **(Sacks, *et al*. 2013)**.

Lorsque l'on compare la capacité à brunir des différents dépôts de tissus adipeux blancs, la littérature rapporte plus d'exemples de brunissement dans le dépôt sous-cutané que dans le dépôt viscéral. Cette différence pourrait en partie s'expliquer par l'expression plus importante des marqueurs du brunissement (*Cidea*, *Prdm-16*, *Ucp-1*), des marqueurs d'adipoytes beiges (*Tbx-1*, *P2rx5)* et des marqueurs mitochondriaux (*Cox8b*, *Ppargc1a*, *Atp5a*, *Ndufa1*) dans le tissu adipeux sous-cutané que dans le dépôt viscéral chez la souris, en condition de thermoneutralité **(Seale *et al*., 2011 ; Zuriaga *et al*., 2017 ; Shabalina, *et al*. 2013 ; Wu *et al*., 2013)**. Il a également été montré que les progéniteurs du dépôt sous-cutané (dans des conditions de thermoneutralité) présentent, après différentiation, un profil transcriptomique proche de celui des adipocytes bruns **(Wu *et al*., 2013)**. Cependant, les données concernant la nature des dépôts de tissu adipeux blanc ayant la plus forte capacité à brunir demeurent controversées, notamment lorsque l'on cherche à transposer les données obtenues chez la souris à l'homme. Nous l'avons en effet déjà évoqué, le dépôt omental présent chez l'homme n'existe pas chez la souris, et les dépôts périgonadiques retrouvés chez la souris ne drainent pas directement le foie, ce qui n'en fait pas un tissu adipeux viscéral au sens propre du terme **(Zuriaga *et al*., 2017)**. De plus, chez l'homme, l'expression des gènes du brunissement est plus importante dans le tissu adipeux viscéral que dans le dépôt sous-cutané ; suggérant ainsi une prédisposition plus importante au développement du brunissement dans le tissu adipeux viscéral que le tissu adipeux sous-cutané, contrairement au modèle murin **(Zuriaga *et al*., 2017)**.

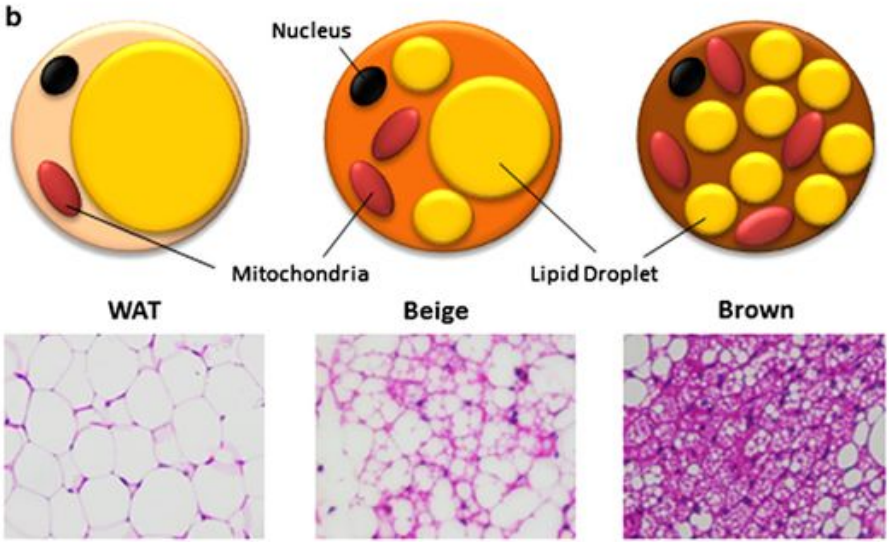

Figure 19. Représentation des différents types d'adipocytes de tissu adipeux blanc, beige et brun (Kwok *et al*., 2016).

Les différences morphologiques entre les adipocytes du tissu adipeux beige et brun, comme le montrent les schémas et la coloration à l'hématoxyline / éosine (grossissement x 40).

2. Rôle des cellules immunes dans le brunissement du tissu adipeux blanc

Le rôle du système immunitaire dans l'induction du brunissement du tissu adipeux blanc a récemment été mis en évidence **(Figure 20)**. **Machida *et al*.** montrent, chez la souris, que le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané résultant d'une exposition au froid est associée à l'augmentation du nombre de macrophages M1 dans le dépôt viscéral. L'élimination des macrophages par injection de clodronate de sodium conduit au brunissement du tissu adipeux viscéral. Ceci suggère que les macrophages pro-infammatoires M1 sont impliqués dans la résistance de ce dépôt au développement d'adipocytes beiges suite à l'exposition au froid **(Machida *et al.*, 2017)**. L'analyse du rôle des macrophages anti-inflammatoires M2 dans l'induction de la thermogenèse suite à une stimulation par le froid, montre que ces cellules s'activent dans le tissu adipeux blanc et libèrent des catécholamines qui activent des voies similaires à celles de la stimulation sympathique **(Nguyen *et al*., 2011 ; Qiu *et al.*, 2014)**. D'autres auteurs ont pu montrer que le brunissement était étroitement dépendant du marqueur RIP140, impliqué dans le contrôle de la balance M1/M2 des macrophages dans le tissu adipeux blanc (**Liu *et al*., 2015)**. L'augmentation de l'expression de RIP140 dans un contexte d'obésité (induite par un régime hyperlipidique) est associée à la polarisation des macrophages vers un profil proinflammatoire (M1) dans le tissu adipeux blanc et au développement de la résistance à l'insuline **(Ho et Wei, 2012)**. Inversement, la diminution de l'expression de RIP140, non seulement réduit le nombre de macrophages M1, mais augmente la proportion des macrophages M2 anti-inflammatoires dans le tissu adipeux sous-cutané. En conséquence, le tissu adipeux sous-

cutané brunit et il y a restauration de la sensibilité à l'insuline **(Ho et Wei, 2012 ; Liu *et al.*, 2015)**.

L'induction du brunissement du tissu adipeux blanc par le froid fait également intervenir les éosinophiles **(Flach et Diefenbach 2015)**. L'activation des éosinophiles et des macrophages M2 du tissu adipeux blanc est assurée en partie par la météorine, qui est une myokine et adipokine dont l'expression et la sécrétion sont augmentées suite à une stimulation par le froid ou après un exercice physique (**Rao *et al.*, 2014)**. **Lee *et al.*** et **Brestoff *et al.*** montrent que l'activation des cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2) par l'IL-33 est suffisante pour induire le brunissement du tissu adipeux blanc dans des conditions de thermoneutralité **(Lee *et al.*, 2015 ; Brestoff *et al.*, 2015)**. Activées par l'IL-33, les ILC2 produisent de l'IL-5 et de la méthionine-enképhaline (MetEnk) qui augmentent l'expression d'*UCP-1* dans les adipocytes et activent les éosinophiles. Les éosinophiles activés sécrètent l'IL-4 qui agit sur les macrophages pour libérer la norépinephrine déclenchant ainsi le brunissement du tissu adipeux blanc **(Van Den Berg *et al.*, 2017)**. Ceci montre qu'en plus de leur rôle dans la réponse aux infections et dans la réparation tissulaire, les ILC2 jouent un rôle clé dans la régulation de l'activité du tissu adipeux blanc et dans le maintien de son homéostasie **(Flach et Diefenbach, 2015)**.

Les Treg sont également impliqués dans le processus de brunissement du tissu adipeux blanc *via* l'IL-33, capable de les activer pour sécréter l'IL-10 et le TGF-β ; participant ainsi à la mise en place d'un environnement anti-inflammatoire **(Becker *et al.*, 2017)**.

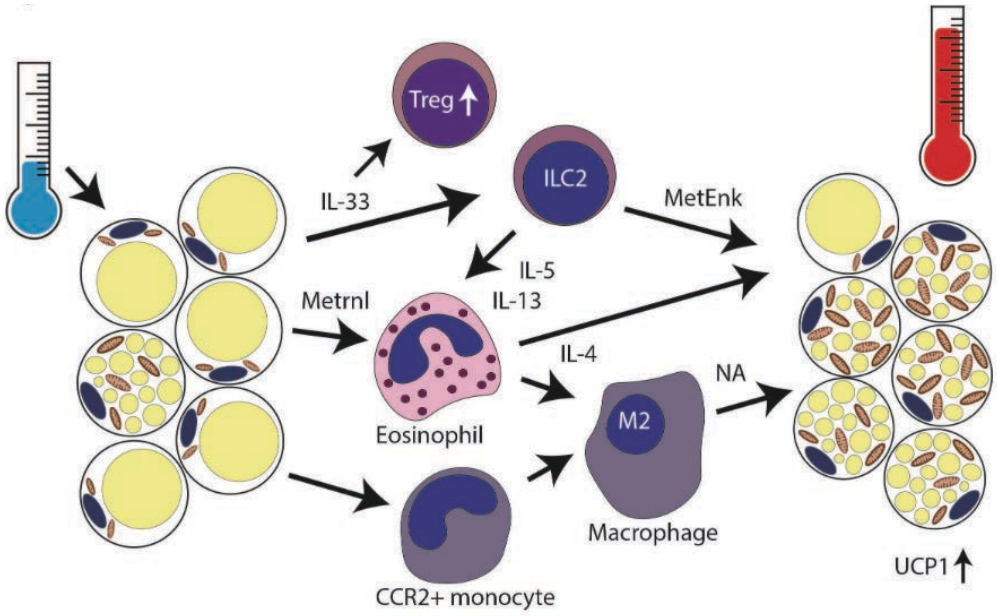

Figure 20. Remodelage de la population immune dans le tissu adipeux blanc sous-cutané suite à l'induction par le froid (Van Den Berg *et al.*, 2017).

Les ILC2 jouent un rôle central dans le développement du brunissement. Les ILC2 sont maintenues par IL-33 et produisent la MetEnk, qui régule UCP1 dans le tissu adipeux blanc. LIL-33 augmente également le pourcentage de cellules T régulatrices dans le tissu adipeux blanc. Les ILC2 sécrètent l'IL-5 et l'IL-13, qui stimulent les éosinophiles pour produire l'IL-4. LIL-4 peut directement agir sur les macrophages M2 qui, à leur tour, sécrètent la noradrénaline. L'augmentation du nombre de macrophages lors d'une exposition au froid dépend du recrutement de monocytes *via* CCR2. La sécrétion d'IL-4 dépendante des éosinophiles peut également se produire par l'intermédiaire de l'hormone Metrnl, libérée par le tissu adipeux lors d'une exposition au froid. Metrnl, météorine-like; NA, noradrénaline; Treg, cellules T régulatrices.

3. Perspectives thérapeutiques du brunissement du tissu adipeux blanc

Le brunissement du tissu adipeux blanc entraine des effets métaboliques bénéfiques du fait de l'augmentation de la dépense énergétique, notamment une amélioration de la tolérance au glucose et une diminution de l'inflammation du tissu adipeux **(Rao *et al.*, 2014)**. Dans les différents modèles d'induction de brunissement du tissu adipeux blanc, une protection contre le développement de l'obésité (induite par la consommation d'un régime hyperlipidique) et de ses complications métaboliques a été rapportée (**Chen *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2017)**, ainsi qu'une augmentation du métabolisme des acides gras **(Varela *et al.*, 2017)**, et une diminution de la masse de l'ensemble des dépôts de tissu adipeux blanc **(Neyrinck *et al.*, 2017)**.

C'est la raison pour laquelle l'induction du brunissement du tissu adipeux blanc est considérée comme une stratégie thérapeutique d'intérêt potentiel dans le traitement de l'obésité et des désordres métaboliques associés.

Cependant, il est important de noter que le brunissement du tissu adipeux blanc peut également être associé à des effets délétères. Lors de la cachexie associée au cancer, induite et maintenue par l'inflammation systémique, en particulier par les taux élevés d'IL-6, l'inhibition du brunissement du tissu adipeux blanc réduit la sévérité de la cachexie **(Petruzelli *et al.*, 2014)**. De même, le brunissement du tissu adipeux blanc peut parfois entrainer le développement d'athérosclérose et de stéatose hépatique par deux mécanismes différents **(Jeschke *et al.*, 2011)** :

- Le brunissement du tissu adipeux blanc est associé à une augmentation des taux de cholestérol dans le sang, en particulier, les lipoprotéines à faible densité (*low-density lipoprotein*-LDL) et des lipoprotéines à très faible densité (*very low density-lipoprotein*-VLDL), qui sont impliquées dans le développement de l'athérosclérose.
- Le brunissement du tissu adipeux blanc entraine une diminution des taux d'adiponectine circulante, diminuant ainsi la lipolyse et favorisant la formation des plaques d'athérosclérose **(Bogdanovic *et al.*, 2015)**.

Chapitre III : Tissu adipeux blanc et infections

I. Obésité et pathologies respiratoires d'origine infectieuse

L'excès de tissu adipeux blanc, caractérisant l'obésité, est ainsi que nous l'avons vu, une maladie inflammatoire chronique, classiquement associée au développement de maladies métaboliques telles que l'insulinorésistance ou le diabète de type 2 **(Grundy *et al.*, 2004)**. Cependant, l'obésité est également un facteur de risque pour le développement de nombreuses autres pathologies, comme certains types de cancers et démences, les maladies auto-immunes, ou les infections, notamment les infections inflammatoires pulmonaires.

L'obésité est associée à des altérations de la fonction respiratoire pouvant entrainer : apnée du sommeil, syndrome d'hypoventilation, asthme (qui est souvent plus sévère chez les obèses), ainsi que la broncho-pneumopathie obstructive (BPCO). En effet, les personnes obèses montrent une demande plus importante de 16% comparées aux individus minces en termes de ventilation et de consommation d'O_2 **(Zammit *et al.*, 2010)**. L'apnée du sommeil est très corrélée à la prise de poids, et l'obésité est connue pour exacerber les hypoxies nocturnes. L'obésité est également très fortement corrélée à l'asthme : 38% des patients en surpoids et 92% des patients obèses présentent une prévalence plus élevée de développer de l'asthme **(Beuther and Sutherland, 2007)**. Les causes de ces atteintes sont dues soit à des effets mécaniques liés à l'accumulation de tissu adipeux autour des poumons, ou à l'inflammation chronique à bas bruit induite par l'obésité **(Zammit *et al.*, 2010)**.

Les pneumonies les plus fréquemment rapportées chez les individus diabétiques et les obèses sont la tuberculose, la grippe, et les infections par le pneumocoque, le staphylocoque et les pathogènes opportunistes **(Figure 21) (Fisher-Hoch *et al.*, 2013)**. Concernant les infections respiratoires d'origine bactérienne, **Wieland *et al.*, (2005)** ont observé chez des souris génétiquement obèses (déficientes en leptine, *ob/ob*), des niveaux bas d'IFN-γ suite à l'infection par *Mycobacterium Tuberculosis*. Dans ce même modèle, **Ordaway *et al.* (2008)** ont noté un retard du recrutement des lymphocytes T $CD4^+$ productrices d'IFN-γ dans le poumon, ainsi qu'une charge bactérienne plus élevée chez les souris obèses infectées.

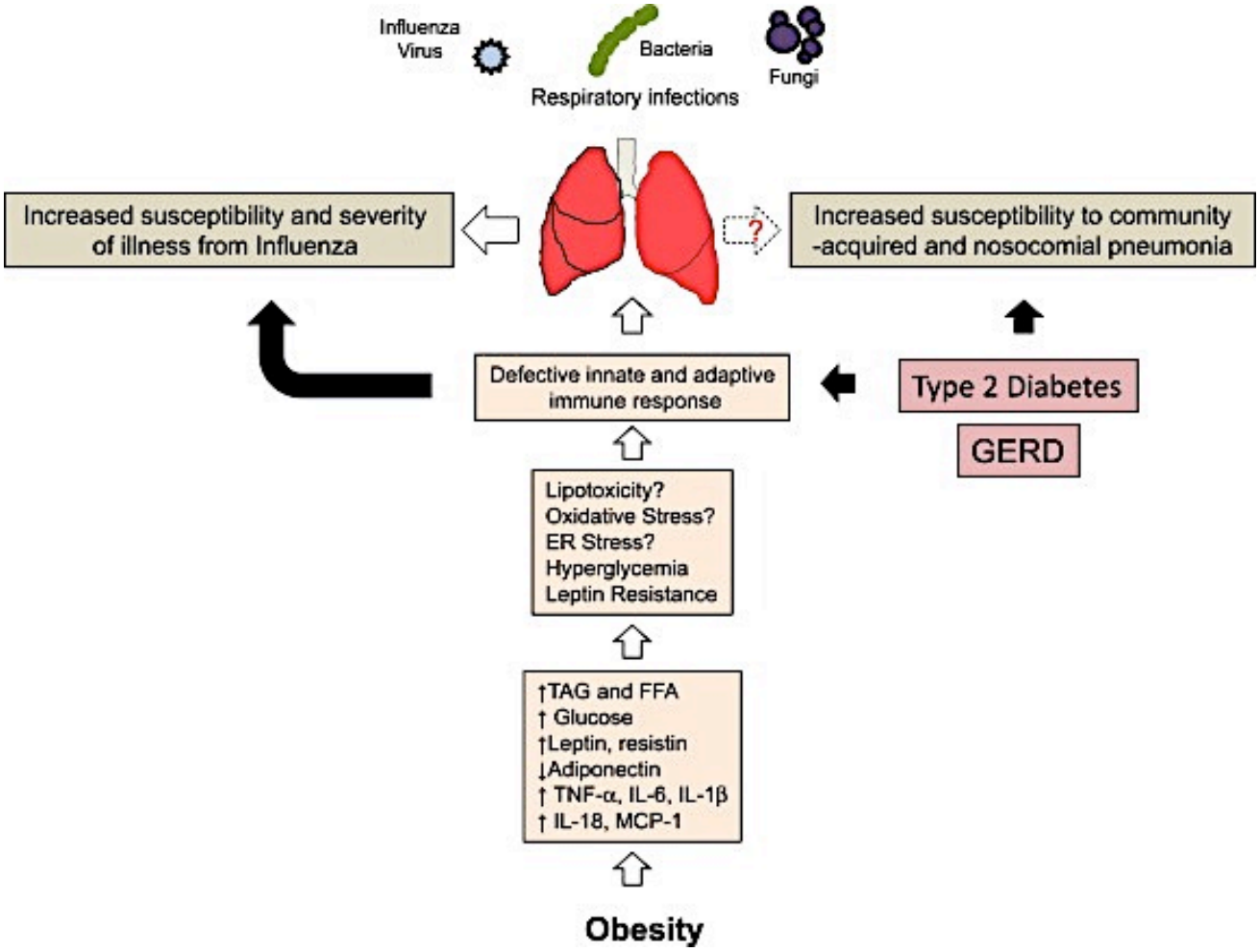

Figure 21. La susceptibilité accrue des obèses aux infections respiratoires virales, fongiques et bactériennes (Mancuso, 2013).

L'obésité altère la défense de l'hôte contre la grippe et éventuellement les pathogènes bactériens et fongiques. L'excès de tissu adipeux chez les obèses entraîne de nombreuses perturbations métaboliques qui contribuent à un état d'inflammation chronique de bas bruit. Ceci est due à un taux élevé de triacylglycérol (TAG), d'acides gras libres (FFA), d'hyperglycémie et à une augmentation des adipokines pro-inflammatoires telles que la leptine et la résistine. TNFα, IL-6, IL-1β, IL-18 et MCP-1 sont produits en plus grande quantité lorsque le tissu adipeux s' expant. Ces altérations entraînent une fonction immunitaire innée et adaptative défectueuse qui altère la défense de l'hôte contre l'infection grippale. Cependant, les données concernant la défense des obèses contre les agents pathogènes bactériens demeure controversée. De plus, les complications de l'obésité telles que le diabète de type II et le reflux gastro-œsophagien (GERD) sont connues pour altérer la défense de l'hôte contre les agents pathogènes viraux, bactériens et fongiques.

Les données concernant l'infection pulmonaire par *Streptococcus pneumoniae* sont controversées. **Corrales-Medina *et al.*** montrent, chez des patients hospitalisés pour une pneumonie et classés selon leur indice de masse corporelle, une mortalité réduite dans le groupe des patients obèses (**Corrales-Medina *et al.*, 2009)**. **Mancuso *et al.***, utilisant le modèle très particulier de souris dont l'obésité résulte de la déficience en carboxypeptidase (les souris *CPEfat/fat*), ne trouvent pas de différence entre la réponse immune anti-infectieuse des souris minces et celle des souris obèses (**Mancuso *et al.*, 2013)**. A l'inverse, d'autres travaux rapportent une susceptibilité accrue des souris obèses à la surinfection bactérienne par *S. pneumoniae* suivant

une infection par le virus influenza (100% de mortalité dans le groupe des obèses *vs* pas de moralité dans le groupe contrôle), avec une charge virale équivalente entre les souris minces et obèses mais une charge bactérienne significativement plus élevée chez les obèses **(Karlsson *et al*., 2013)**.

Concernant l'infection par le virus influenza, les données épidémiologiques et expérimentales concernant le lien avec l'obésité sont plus beaucoup claires que celles concernant l'infection par *S. pneumoniae*. En effet, les données épidémiologiques obtenues au décours de la pandémie de 2009 (H1N1) ont mis en évidence une susceptibilité accrue des individus obèses de développer des formes sévères, voire mortelles, de l'infection, avec 574 décès dans le monde **(Vaillant *et al*., 2009)** et 758 cas d'hospitalisation en France **(Fuhrman *et al*., 2011)**. Depuis l'obtention de ces données épidémiologiques, la vaccination grippale des personnes obèses est à présent fortement conseillée. Cependant, les travaux de **Sheridan *et al*.** montrent une diminution du titre d'anticorps induit par la vaccination et une fonction altérée des lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques du virus de la grippe chez les individus obèses **(Sheridan *et al*., 2012)**, suggèrant qu'une nouvelle stratégie vaccinale devrait être adoptée pour protéger les patients obèses. Des travaux menés sur des souris rendues obèses par l'administration d'un régime enrichi en lipides puis infectées par le virus de la grippe sont nombreux et montrent une mortalité augmentée, une altération de la fonction cytotoxique des cellules NK, un retard dans la production d'IL-6 et de TNFα, et une faible induction des IFN de type 1, comparativement aux souris minces **(Smith *et al*., 2007)**. Un défaut de recrutement des LT $CD8^+$ dans les poumons, une diminution de la présentation des antigènes par les cellules dendritiques et une atténuation de la sécrétion d'IL-2 et d'IL-12 chez des souris obèses (obésité induite par un régime riche en lipides) infectées par le virus de la grippe ont également été rapportés **(Smith *et al*., 2007 ; Mancuso, 2009 ; Karlsson et Beck, 2010)**. **Eastbrook *et al*. (2011)** ont montré une réponse IFN-β et une réponse pro-inflammatoire réduite dans le groupe des souris obèses comparées aux souris minces infectées **(Figure 22)**.

Radigan *et al*. ont mis en évidence le rôle joué par la leptine dans la défense contre le virus de la grippe. En effet, ils ont associés la perte du récepteur à la leptine à une diminution de la clairance bactérienne et à des altérations plus profondes au niveau pulmonaire **(Radigan *et al*., 2014)**.

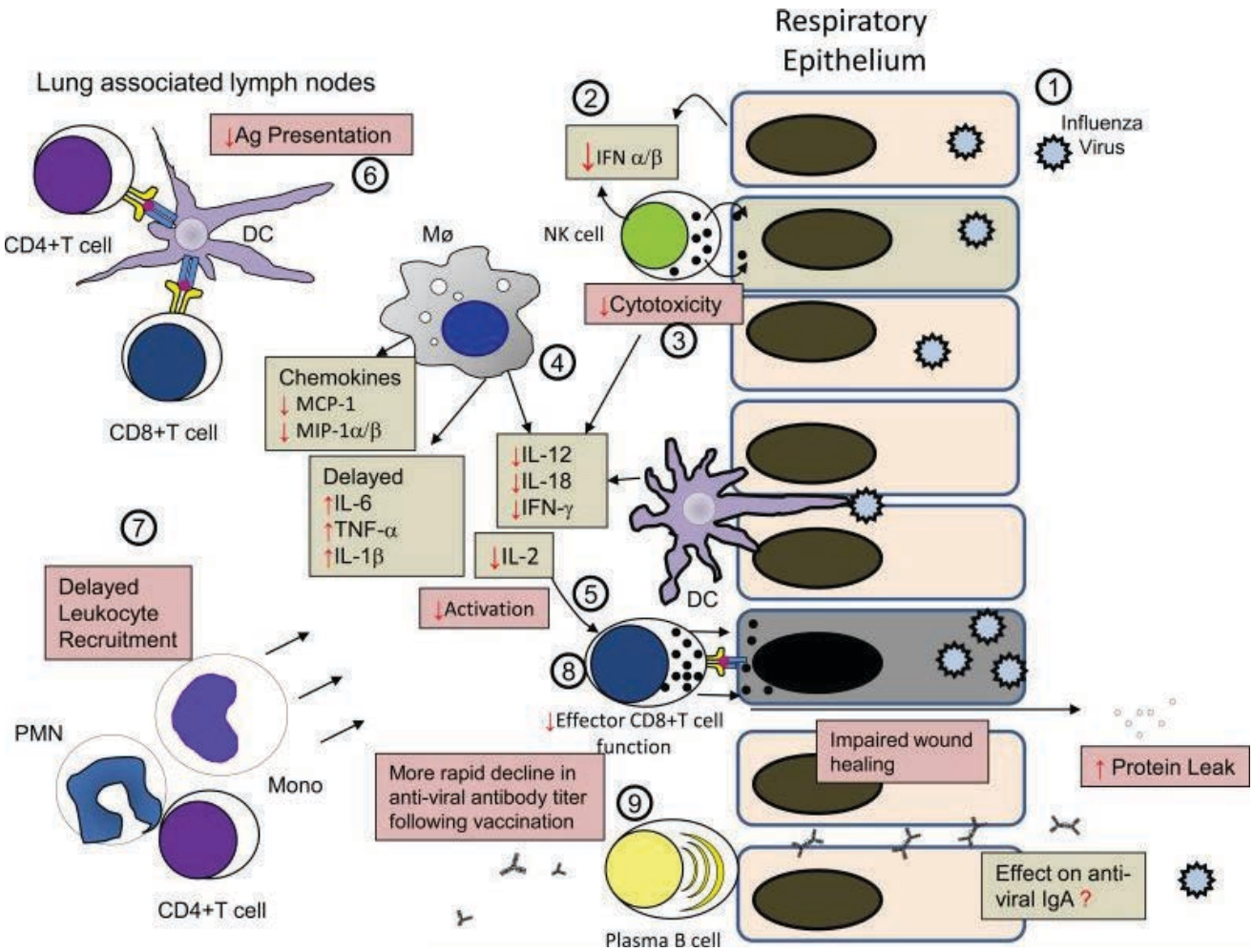

Figure 22. Altération des défenses immunes contre le virus de la grippe en condition d'obésité (Mancuso, 2013, modifiée selon les données de Karlsson *et al*., 2010).

Suite à l'infection des cellules épithéliales respiratoires par le virus de la grippe (1), l'induction de la réponse interféron de type 1 (IFN-α/β) est réduite et retardée (2), et la réponse cytotoxique des cellules NK est atténuée chez les souris obèses (3). La production des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6, et TNF-α est retardée (4) et la production des cytokines par les NK (IL-12, IL-18, IFN-γ), les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4+ , est réduite (5). La présentation des antigènes par les cellules dendritiques aux cellules T *helper* $CD4^+$ et T $CD8^+$ est également altérée (6). Le retard de la production de chimiokines (MCP-1 et MIP-1α/β) fait que le recrutement des polynucléaires, des T CD4+ et des monocytes (mono) est retardé (7). La capacité des cellules T $CD8^+$ à contrôler l'infection virale est réduite et la réparation des cellules épithéliales pulmonaire est altérée ; aboutissant à une augmentation de la perméabilité microvasculaire et ainsi au passage des protéines (albumine) dans l'espace alvéolaire (8). La diminution du titre des anticorps chez les personnes obèses suite à la vaccination contre le virus de la grippe a été rapportée par **Karlsson *et al*., 2010**, cependant, il n'est pas connu si l'obésité affecte la concentration des IgA dans le poumon (9).

A. Interaction entre le tissu adipeux blanc et les agents pathogènes

Il est décrit dans la littérature que certains agents pathogènes ; parasites, bactéries ou virus, peuvent interagir avec le tissu adipeux blanc, l'infecter, voire même s'en servir comme réservoir.

1. Parasites et tissu adipeux blanc

Le terme parasite vient du latin-*parasites*, du Grec -*parasitos*, (*para*-, à coté de) + (*sitos*, nourriture) « personne qui mange à la table d'autrui ». Les parasites sont caractérisés par le fait qu'ils mènent leur cycle de vie dans un autre organisme pour utiliser ses ressources **(Vannier-Santos et Lenzi, 2011)**. Plusieurs études relatent la présence de certains parasites dans le tissu adipeux d'individus infectés (**Figure 23**).

Le parasite le plus étudié pour son lien avec le tissu adipeux blanc est *Trypanosoma cruzi*, responsable de la maladie de Chagas dont l'incidence et la sévérité sont particulièrement élevées au Mexique, en Amérique centrale et en Amérique du sud **(Garcia *et al.*, 2015)**. L'association entre l'infection par *T. cruzi* et le tissu adipeux blanc a été évoquée pour la première fois en 1970 **(Shoemaker *et al.*, 1970)**. L'infection du tissu adipeux et des adipocytes par *T. cruzi* a également été mise en évidence aux stades amastigote et trypomastigote **(Andrade et Silva, 1995 ; Combs *et al.*, 2005, Ferreira *et al.*, 2011)**. La présence du parasite dans le tissu adipeux est associée à une augmentation de l'expression des *Tlr4*, *Tlr9*, des protéines de la voie MAP Kinase, de *Pparγ*, des cytokines IL-6 et TNFα, de certaines chimiokines (tel que MCP-1), ainsi qu'une diminution du contenu lipidique et de l'expression de l'adiponectine et de la leptine par les adipocytes. Une évaluation de la charge parasitaire dans le tissu adipeux, 300 jours post-infection, supporte le rôle de réservoir assuré par le tissu adipeux blanc pour ce parasite **(Nagajyothi *et al.*, 2012)**. L'infection de la lignée murine préadipovytaire 3T3-L1 par *T. cruzi*, induit une diminution de la sécrétion d'adiponectine et une augmentation des niveaux d'expression de *Tlr2* et *9*, *Tnfα*, *Ifnγ*, and *Il1β* **(Combs *et al.*, 2005)**. Toutes ces modulations montrent que l'infection par *T. cruzi* affecte la fonction et les sécrétions du tissu adipeux blanc **(Combs *et al.*, 2005 ; Nagajyothi *et al.*, 2012)**.

Trypanosoma brucei, quant à lui, est un parasite unicellulaire extracellulaire responsable de la trypanosomiase africaine, également appelée maladie du sommeil **(Franco *et al.*, 2014)**. Ce parasite est connu pour son tropisme pour le cerveau, les testicules, et la peau mais également pour le tissu adipeux blanc **(Trindade *et al.*, 2016 ; Kennedy, 2006)**. Dans le tissu adipeux, il se

localise au niveau de l'espace interstitiel entre les adipocytes lui offrant un milieu propice pour assurer sa réplication **(Trindade *et al.*, 2016**). Le stade trypomastigote de *T. Cruzi* est capable d'infecter toutes les cellules de l'organisme hôte, y compris les préadipocytes et les adipocytes. Au stade amastigote, *T. Cruzi* échappe à la défense immune et se trouve libre dans le cytoplasme ce qui lui permet d'infecter les cellules avoisinnantes et reprendre un nouveau cycle de réplication **(Johndrow *et al.*, 2014)**.

Un autre exemple de parasites pouvant être détecté dans le tissu adipeux blanc sont ceux de la famille *Plasmidium spp*., parasites obligatoires intracellulaires responsables du paludisme.

Plasmodium falciparum infecte les globules rouges et des analyses *post-mortem* des tissus des individus infectés révèlent, qu'en dehors des sites principaux d'accumulation du parasite (à savoir la rate et les poumons), *P. falciparum* s'accumule également dans le tissu adipeux blanc **(Wilairatana *et al.*, 2000 ; Tanowitz *et al.*, 2017)**.

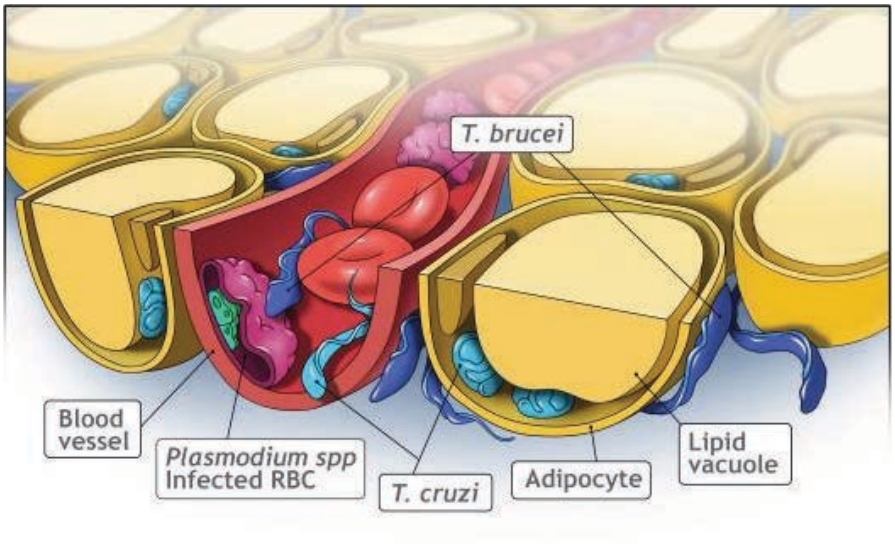

Figure 23. Différentes localisations de certains parasites dans le tissu adipeux blanc (Tanowitz *et al.*, 2017).

Les adipocytes sont les composants majeurs du tissu adipeux et sont caractérisés par les gouttelettes lipidiques qu'ils renferment. *Trypanosoma cruzi* (coloré en bleu clair) est capable de survivre dans le sang sous forme de trypomastigote ou dans le cytoplasme des cellules (dont celui des adipocytes) au stade amastigote. *Trypanosoma brucei* (bleu foncé) se trouve soit dans le sang ou dans l'espace interstitiel des tissus. Dans le tissu adipeux, *T. brucei* se localisent entre les adipocytes. *Plasmodium* spp. (vert) est présent dans les globules rouges qui, une fois infectés, adhèrent aux vaisseaux sanguins irriguant les tissus.

Des parasites beaucoup plus complexes que les trypanosomes ou le plasmodium, tels que les vers helminthes, parasites extracellulaires, peuvent également interagir avec le tissu adipeux blanc. Contrairement aux infections intracellulaires induisant une réponse inflammatoire, l'infection par les helminthes induit une réponse immune anti-inflammatoire. Or, nous l'avons vu,

le profil anti-inflammatoire est favorable au brunissement du tissu adipeux blanc **(Brestoff *et al.*, 2014)**. Des études portant sur les conséquences métaboliques des infections parasitaires, notamment au niveau du tissu adipeux blanc, montrent que l'infection par *Nippostrongylus brasiliensis* induit une amélioration de la sensibilité à l'insuline, une induction de la réponse immune de type 2, et une diminution de l'adiposité chez des souris obèses (obésité induite par un régime hyperlipidique) **(Wu *et al*., 2011)**.

L'infection par un autre ver helminthe, *Schistosoma mansoni* ou le traitement par des antigènes parasitaires induisent l'immunité de type 2 dans le tissu adipeux gonadique et mésentérique et améliorent la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie glucidique en général **(Hussaart *et al.*, 2015)**.

2. Bactéries, virus et tissu adipeux blanc

Plusieurs travaux rapportent l'interaction entre des bactéries, des virus, ou leurs composantes avec le tissu adipeux blanc et les adipocytes. **Lin *et al.*** montrent que la stimulation de TLR4 au niveau de l'adipocyte, induit une augmentation de l'expression de TLR2 ; suggèrant l'existence d'une réponse antibactérienne dans l'adipocyte **(Lin *et al*., 2000)**. De même, l'injection de certaines endotoxines bactériennes à des doses subléthales induit la lipolyse dans les deux dépôts de tissu adipeux blanc, mais plus significativement dans le dépôt sous-cutané **(Sugawara *et al*., 2003)**. De même, l'injection de LPS au niveau du dépôt de tissu adipeux sous-cutané induit rapidement (1 heure) une activation de la lipolyse **(Pond et Mattacks, 1998)**. Ceci montre la capacité de l'adipocyte à détecter et répondre à des stimuli d'origine bactérienne. **Igarashi *et al.*** rapportent que la septicémie, qui est une syndrome d'infection générale et grave de l'organisme, affecte profondément la fonction des adipocytes chez le rat en inhibant le transport de glucose stimulé par l'insuline induisant un état de résistance à l'insuline **(Igarashi *et al*. (1992)**.

Parmi les virus pouvant interagir avec le tissu adipeux blanc. L'adénovirus humain Ad-36, connu pour induire des infections respiratoires et intestinales, est impliqué dans l'induction de l'obésité chez l'humain. En effet, l'Ad-36 présente une affinité atypique pour le tissu adipeux, et la quantité de son ADN détectée dans le tissu adipeux viscéral est proportionnelle à la masse du dépôt et 30% des personnes obèses et 11% de non-obèses possèdent les anticorps dirigés contre l'Ad-36. De plus, l'Ad-36 favorise la différenciation adipocytaire *in vitro* **(Whigham *et al*., 2006)**. Cependant, le mécanisme précis de l'induction de l'adipogenèse sur des cellules 3T3-L1 par l'Ad-36 n'est bien élucidé.

D’autres virus que le prion scarpie (**Shi *et al.*, 2016 ; Kim *et al.*, 1988 ; Vorbrot *et al.*, 2001)**, le *Canine Distemper virus* (CDV) **(Lyon *et al.*, 1982)**, le virus aviaire RAV-7 (*Rous-associated virus-7*) (**Carter *et al.*, 1984)**, et le virus BDV (*Borna disease virus*) **(Gosztonyi et Ludwig, 1995)** ont été également associés au développement de l’obésité, en plus des autres symptômes qu’ils induisent. L’obésité résultant de ces infections serait une conséquence d’altérations diverses concernant notamment, l’expression du transporteur de glucose GLUT-1 **(Vorbrot *et al.*, 2001)**, l’expression de la leptine au niveau hypothalamique **(Lyon *et al.*, 1982),** la sécrétion de l’hormone thyroïdienne **(Carter *et al.*, (1984**), la régulation du nombre des cellules du pancréas **(Gosztonyi et Ludwig, 1995)**. L’ensemble de ces altérations entrainent une prise de poids et une augmentation du nombre et de la taille des adipocytes.

Le virus de l’immunodéficience humaine (VIH) est celui qui est le plus décrit dans la littérature comme exemple de virus capable d’interagir avec le tissu adipeux blanc. Le VIH échappe au système immunitaire en cessant sa réplication et en persistant sous forme latente dans les lymphocytes T $CD4^+$ et les macrophages. Les cellules immunes infectées permettent au virus de migrer dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes (comme le tissu adipeux blanc) et, en fonction du microenvironnement tissulaire, le virus reste latent ou reprend sa réplication. Comparé aux réservoirs principaux du VIH que sont les tissus lymphoïdes (ganglions lymphatiques, rate et tissus lymphoïdes associés aux intestins), la réplication virale peut également avoir lieu dans le tissu adipeux blanc, certes de manière moins efficace que dans les tissus lymphoïdes. Cependant, la compétence de réplication et l'infectiosité du virus latent dans le tissu adipeux sont comparables aux autres tissus **(Couturier et Lewis, 2018)**. L’infection par le VIH induit plusieurs anomalies métaboliques (dyslipidémie, résistance à l’insuline, perte de masse de tissu adipeux ou lipoatrophie). Les adipocytes jouent un rôle important dans l’infection par le VIH puisque des changements significatifs en termes de morphologie du tissu adipeux blanc sous-cutané (lipoatrophie) et de métabolisme global (profil lipidique sérique anormal) ont été observés dans le tissu adipeux des personnes atteintes, ainsi qu’une mort cellulaire des adipocytes révélée dans des biopsies tissulaires **(Domingo *et al.*, 1999)**. En effet, il a été rapporté que les lymphocytes T $CD4^+$, cibles majeures du VIH, s’accumulent dans le tissu adipeux chez l’humain et les singes macaques rhésus **(Couturier et Lewis, 2018)**. Certains travaux montrent que seule la masse du tissu adipeux sous-cutané est réduite dans l’infection par le VIH **(Grinspoon et Carr, 2005 ; Domingo *et al.*, 1999)**, alors que d’autres auteurs montrent que les deux types de dépôts sont affectés **(Bachetti *et al.*, 2005)**. L’adipocyte est une cible pour le virus VIH puisqu’il porte à sa surface les récepteurs

essentiels à l'entrée du virus (CD4, CXCR4, and CCR5) **(Shimomura *et al.*, 1998 ; Desruisseaux, 2007)**.

Objectifs du travail de Thèse

Tissu adipeux, organe complexe

Le tissu adipeux est un organe important, 1) quantitativement : sa masse représente ~ 20% du poids total d'un individu normopondéral (beaucoup plus s'il s'agit d'une personne obèse), et 2) qualitativement : en plus de son rôle essentiel dans le stockage et la libération des lipides, le tissu adipeux est également un organe endocrine sécrétant de nombreuses hormones et cytokines, dont certaines sont presque exclusivement produites par ce tissu (*e.g.* adiponectine, leptine, résistine). Ces facteurs peuvent agir au niveau local et au niveau systémique et influencer d'autres tissus ou organes, contribuant ainsi au maintien de l'équilibre énergétique.

Par ailleurs, le tissu adipeux est composé de deux fractions cellulaires : 1)la fraction adipocytaire, contenant les adipocytes matures, et 2) la fraction stroma-vasculaire, contenant de nombreux types cellulaires parmi lesquels les préadipocytes et les cellules immunes innées (principalement les macrophages) et adaptatives (principalement les lymphocytes T).

Ainsi, par l'intermédiaire des signaux qu'il émet et est capable de recevoir, le tissu adipeux se trouve au centre d'un réseau reliant l'immunité et le métabolisme.

Tissu adipeux et pathologies pulmonaires

Le rôle du tissu adipeux dans diverses pathologies ne cesse de se confirmer, particulièrement chez les personnes obèses, chez lesquelles sa masse est en excès. En effet, plusieurs études épidémiologiques et expérimentales rapportent que le sur-poids et l'obésité augmentent le risque de cancers, de maladies auto-immunes et d'infections. Dans le cas des infections pulmonaires, il est rapporté que les individus obèses sont plus sensibles aux infections virales (*e.g.* le virus de la grippe ou virus influenza) ou bactériennes (*e.g.* la bactérie *Streptococcus pneumoniae*). L'obésité est en effet associée à la mise en place progressive d'une inflammation chronique à bas bruit, entrainant d'importantes perturbations immunes et métaboliques **(Mancuso, 2013, Hauner *et al.*, 2004, Boden, 2008)**. Cependant, les mécanismes précis sous-tendant la plus grande susceptibilité des individus obèses aux infections respiratoires restent peu connus.

Dans ce travail de Thèse, nous avons :

1. Evalué la susceptibilité des souris obèses à l'infection par la bactérie Streptococcus pneumoniae dans un modèle d'obésité d'origine nutritionnelle

Les données de la littérature concernant la susceptibilité des souris obèses à l'infection par *S. pneumoniae* sont contradictoires. Alors que certains décrivent une plus grande susceptibilité des obèses aux infections à streptocoque d'autres ne montrent aucune différence entre les souris minces et les souris

obèses. La variété des modèles d'obésité utilisés (tous d'origine génétique) ainsi que les différentes souches de bactéries testées expliquent sans doute les résultats contrastés. Au cours de cette étude nous avons choisi d'utiliser un modèle d'obésité d'orgine nutritionnelle (*i.e.* consommation d'un régime alimentaire fortement enrichi en lipides), réflétant mieux la situation rencontrée chez l'homme. Le pneumocoque testé a été celui de sérotype 1 (Sp1).

Nous avons comparé les paramètres de l'infection par une dose (sublétale, administration intranasale) de Sp1 entre les souris minces et les souris obèses. Une analyse complète des réponses pulmonaires a été effectuée en vue d'évaluer la sévérité de l'infection dans les deux groupes de souris infectées. Nous avons également procédé à l'évaluation de l'effet de l'infection sur le cerveau des souris infectées notemment à travers la quantification de la charge bactérienne et l'estimation de la fragilisation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique.

Une analyse plus fine des différentes régions du système nerveux central (*i.e.* bulble olfactif, hippocampe, hypothalamus, cortex cérébelleux, cortex cérébral, et striatum) avant soumission pour publication est prévue.

2. Analysé l'effet de l'infection par le virus de la grippe sur le tissu adipeux de souris minces et obèses.

Contrairement aux données concernant l'infection par le pneumocoque, les résultats obtenus au décours d'études épidémiologiques ou expérimentales démontrent une plus grande susceptibilité des individus obèses à l'infection par le virus de la grippe (ou virus influenza).

Nous avons donc abordé la problèmatique différemment à travers l'estimation de l'impact potentiel de l'infection par le virus de la grippe sur le tissu adipeux. Ainsi, des souris minces ou obèses (obésité d'origine nutritionnelle) avaient été infectées par le virus influenza (dose sublétale du virus saisonnier H3N2, voie intranasale) et les dépôts de tissu adipeux sous-cutané (*i.e.* inguinal) et viscéral (*i.e.* périgonadique) ont été récupérés et analysés. Nos résultats montrent une modification de certains paramètres métaboliques et immunologiques du tissu adipeux blanc dans un contexte infectieux associé à la détection dans le tissu adipeux blanc du génome viral. Cette dernière observation nous a conduit à mettre en place un modèle d'infection de préadipocytes et adipocytes *in vitro* et à analyser les conséquences de cette infection, à la fois sur la cellule hôte et sur le cycle viral. Les résultats obtenus sont actuellement soumis pour publication.

Matériels et Méthodes

I. Obésité et infection par la bactérie *Streptococcus pneumonia*

1. Modèle d'infection de souris minces ou obèses par *Streptococcus pneumonia*

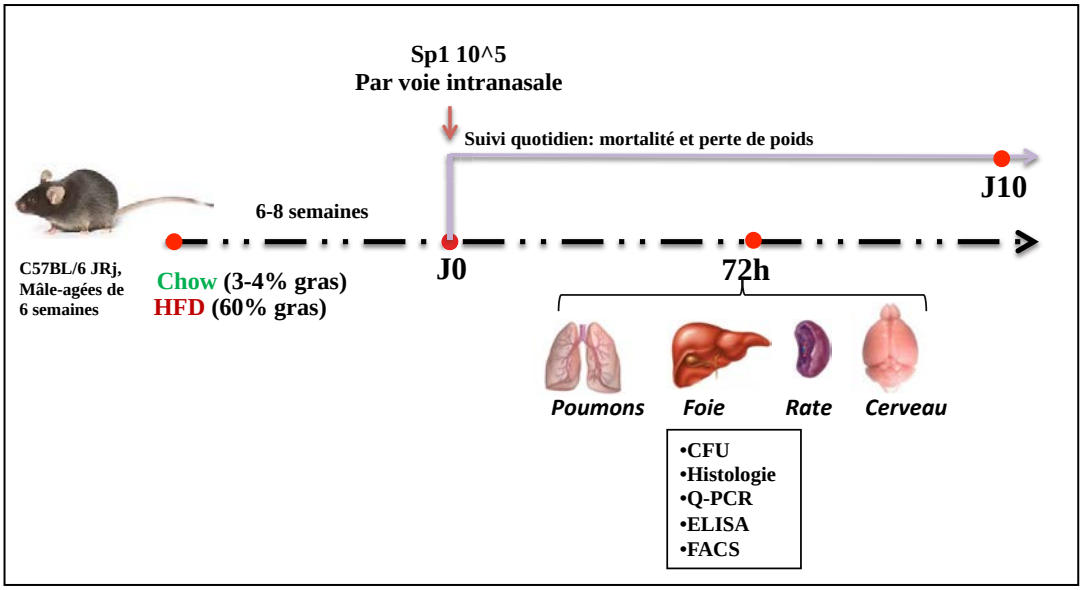

Figure 24. Protocole expérimental d'infection de souris minces et obèses par *S. pneumoniae*.

Des souris mâles C57BL/6, âgées de 6 semaines au début de l'expérimentation, sont nourries pendant 8 à 10 semaines avec le régime **Chow** (contenant 3-4% de lipides) ou avec le régime obésogène **High Fat** (contenant 60% de lipides). L'infection par *S. pneumoniae* à une dose de 10^5 est alors réalisée par voie intra-nasale sur les souris anesthésiées. La mortalité et la perte de poids corporel sont suivies quotidiennement. Poumons, rate, cerveau et foie sont récupérés 72h post-infection (p.i.) pour évaluer la charge bactérienne (technique de numération des *colony forming units* (CFUs)), les dommages tissulaires (histologie), la composition en cellules immunes (cytométrie en flux (FACS)), les sécrétions des cytokines *in situ* (ELISA sur extraits protéiques), ainsi que l'expression des gènes codant les protéines de jonctions serrées et les cytokines pro- et anti-inflammatoires (RT-qPCR) **(Figure 24).**

2. Dénombrement des colonies bactériennes par la technique des CFUs

Les poumons, la rate, le foie et le cerveau sont prélevés 72 p.i. et placés dans 1 mL de PBS. Les tissus sont broyés à l'Ultra-Turrax et les solutions obtenues sont diluées de 10^{-1} à 10^{-5}. Pour chaque dilution, 3 dépôts de 20 µL sont immédiatement réalisés sur une gélose contenant du sang de mouton (5%) puis laissés sécher. Les boites de Pétri ainsi ensemencées sont placées à 37°C pendant 24h. On procède alors au comptage des colonies bactériennes, qui présentent un aspect luisant et blanchâtre et sont entourées d'un halot d'hémolyse.

3. Analyse quantificative de l'expression des gènes par RT-qPCR

Les poumons et les cerveaux sont récupérés 72h p.i. congelés immédiatement en azote liquide, puis conservés à -80°C. Les échantillons sont par la suite transférés dans des tubes de 5 mL contenant 1 mL de Trizol puis homogénéisés à l'Ultra-Turrax. L'homogénat obtenu est utilisé pour une extraction d'ARN. Brièvement, après avoir rajouté 200 µL de chloroforme, les échantillons sont centrifugés à 12.000 rpm pendant 15 minutes permettant d'obtenir 2 phases et une interphase. La phase aqueuse, qui contient l'ARN, est délicatement récupérée. On rajoute 500 µL d'éthanol 70%, puis on transfère les échantillons sur colonnes. Des lavages successifs sont effectués avec les tampons fournis avec le *kit* d'extraction RW1 et RPE. L'élution se fait par la suite dans 30µL d'eau *RNase free*, et l'ARN obtenu est dosé avec le spectromètre (*NanoView*).

Nous procédons par la suite à une rétro-transcription de 10µg d'ARN en utilisant le *kit High capacity RNA to c-DNA* (Applied Biosystem, Thermofisher). Une PCR Quantitative est effectuée pour évaluer l'expression des gènes codant les protéines de jonction serrée et les marqueurs d'inflammation.

Le programme d'amplification débute par une étape de dénaturation (3 minutes à 95°C) suivie de 40 cycles alternant dénaturation (10 secondes à 95°C), hybridation (60°C pendant 15 secondes) et élongation (72°C pendant 30 secondes). Chaque échantillon est passé en triplicat. Pour s'assurer de la spécificité des primers, nous nous sommes basé sur l'aspect de la courbe de dissociation en fin de cycle, qui devait présenter un seul pic.

L'évaluation quantitative relative a été effectuée par la méthode comparative ΔΔCt. La moyenne des ΔCt des échantillons contrôles non infectés pour chaque gène a été utilisé comme calibrateur suite à la normalisation par rapport au gène de ménage contrôle (*Eef2*). Les résultats sont présentés en *fold-change* par rapport au gène de ménage et par rapport au contrôle (quantification relative = 2-ΔΔCt).

4. Quantification des protéines par ELISA

Pour obtenir des extraits protéiques, les organes ont été récupérés à sec dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C. Les échantillons sont par la suite directement placés dans du tampon de lyse (*Tissue Protein Extraction Reagent*, Thermo Fisher Scientific 78510) additionné à un cocktail d'anti-protéases (*Complete*™, Mini, *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, Roche). Après homogénéisation avec l'Ultra-Turrax, les échantillons sont centrifugés à 12000 rpm/5min pour éliminer les fragments de tissu non lysés.

5. Dissection des différentes régions du cerveau

Les cerveaux fraichement récupérés ont été disséqués pour séparer les différentes parties (*i.e.* cortex cérébral, cortex cérébelleux, hypothalamus, bulbes olfactifs, hippocampe, striatum) permettant ainsi

une étude plus élaborée et plus spécifique de l'effet de l'infection et l'obésité sur le système nerveux central. Nous avons procédé à la récupération des différentes parties du cerveau comme le montre le schéma qui suit **(Figure 25)**.

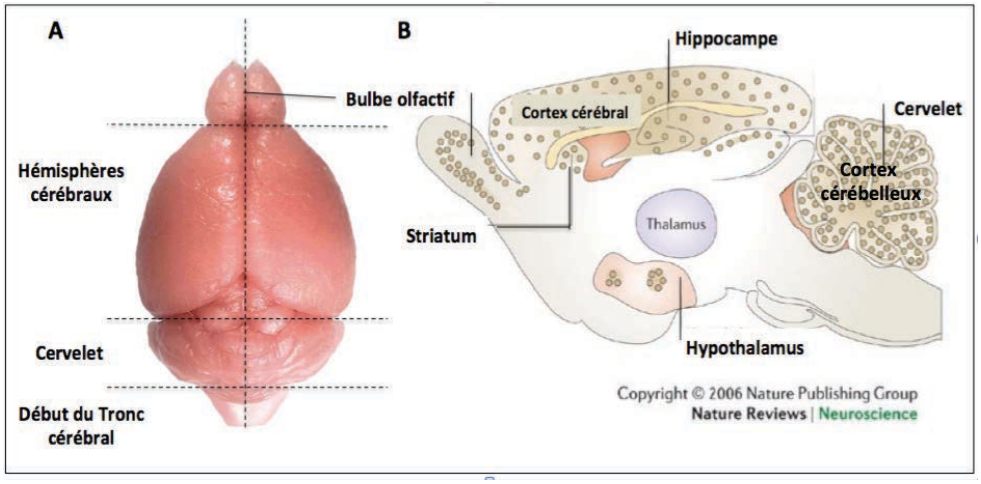

Figure 25. Localisation des différentes parties du cerveau étudiées.
(**A**) Vue d'ensemble du cerveau, (**B**) Coupe sagittale du cerveau de souris et localisation des différentes régions récupérées : hippocampe, cortex cérébelleux, cortex cérébral, hypothalamus, striatum, bulbe olfactif, et hippocampe.

6. Préparation des organes pour la cytométrie en flux

Traitement des poumons

Les souris sacrifiées sont perfusées avec du PBS froid jusqu'à ce que le foie soit bien blanc. Les poumons sont par la suite récupérés dans du PBS + SVF (2%) et maintenus sur glace jusqu'au traitement. Brièvement, les poumons sont coupés très finement puis incubés pendant 20 minutes à 37°C dans un cocktail composé de : milieu RPMI + Collagénase VIII + DNase. Après arrêt de la réaction (par addition de V/V de PBS + SVF (2%)) , la séparation des cellules s'effectue par passages multiples des échantillons à travers une aiguille G22 suivis d'une filtration à travers un filtre cellulaire. Les échantillons sont alors centrifugés pendant 5 minutes à 1400 rpm. Le culot est resuspendu dans une solution de Percoll à 20% puis centrifugés à 1400 rpm pendant 15 minutes pour ne garder en culot que les cellules immunes. La lyse des globules rouges est effectuée après incubation des échantillons pendant 5 minutes à température ambiante dans un tampon de lyse, suivie d'une centrifugation à 1400 rpm/ 5 minutes. Le culot est resuspendu dans 1 mL de PBS 2% SVF, et les cellules sont comptées après coloration avec du bleu de Trypan pour identifier les cellules mortes.

Traitement des cerveaux

Les cerveaux sont récupérés, après perfusion totale de la souris (sacrifiée au Pentobarbital), avec du PBS 2% SVF froid. Les échantillons sont par la suite homogénéisés à l'aide d'un Potter de 7 mL dans

une solution de Percoll 30%. Cet homogénat est délicatement déposé sur une solution de Percoll 70% de façon à obtenir deux phases. Une centrifugation à 500g pendant 30 minutes sans frein, permet d'obtenir une interphase qui contient la fraction de cellules immunes. Les cellules sont délicatement récupérées à l'aide d'une pipette de transfert, diluées dans PBS 2% SVF, filtrées avec un filtre cellulaire et centrifugée à 500g pendant 5 minutes. Une lyse des globules rouges est par la suite effectuée comme mentionné précédemment. Les cellules sont comptées après coloration au Bleu de Trypan.

7. Histologie des poumons

Les poumons des souris sacrifiées et perfusées avec du PFA sont délicatement récupérés et fixés dans du Paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 2 jours. Les poumons sont alors transférés dans de l'éthanol 70%. Une fois inclus en paraffine, les échantillons sont coupés à une épaisseur de 5 µm puis colorés à l'hématoxyline-éosine (H&E).

II. Tissu adipeux et infection par le virus de la grippe

1. Modèle d'infection de souris minces ou obèses par le virus Influenza, in vivo

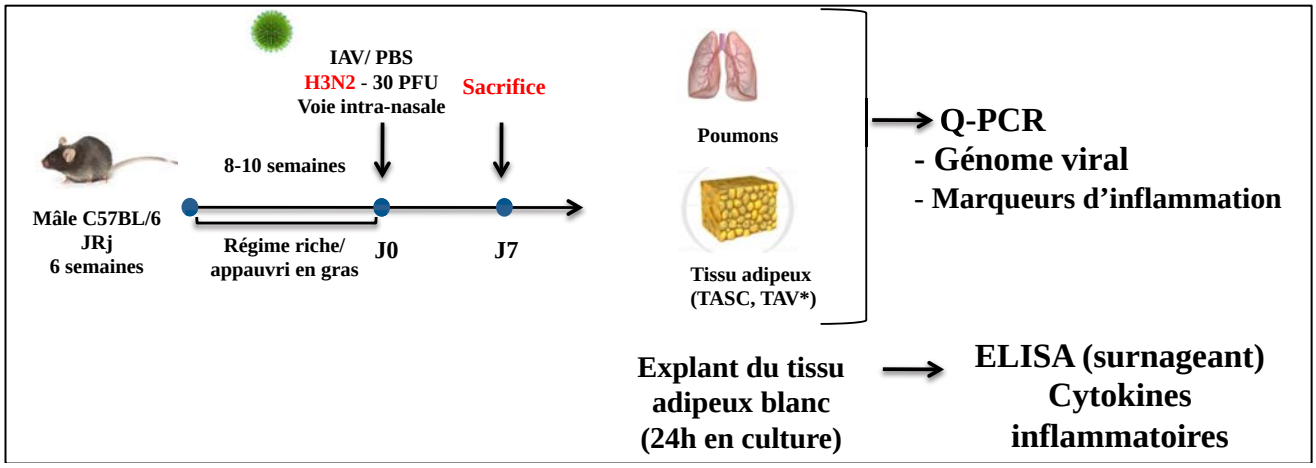

Figure 26. Procédure expérimentale d'infection par le virus de la grippe H3N2 *in vivo*

Des souris mâles C57/BL6 âgées de 6 semaines au début de l'expérimentation, sont nourries avec le régime *Low Fat Diet* (LFD, 10% gras) ou le régime obésogène *High Fat Diet* (HFD, 60% gras) pendant 8 à 10 semaines. Le virus influenza utilisé au cours de cette étude correponds à la souche de la grippe saisonnière (A/Scotland/20/74 H3N2) cultivé dans un œuf de poule embryoné adapté à la souris et titré sur une culture de la lignée cellumaire MDCK. L'infection par le virus de la grippe H3N2 est alors réalisée par voie intra-nasale (30 pfu). A 7 jours post-infection (p.i.), les poumons, le tissu adipeux sous-cutané (inguinal) et le tissu adipeux viscéral (périgonadique), sont récupérés pour

une analyse de l'expression du génome viral et de gènes relatifs à l'inflammation et à la réponse anti-virale. Des cultures d'explants de tissu adipeux (100 mg) sont également réalisées (cultures de 24h) afin de déterminer les profils de sécrétion par ELISA **(Figure 26)**.

2. Modèle d'infection de préadipocytes et d'adipocytes murins par le virus Influenza, *in vitro*

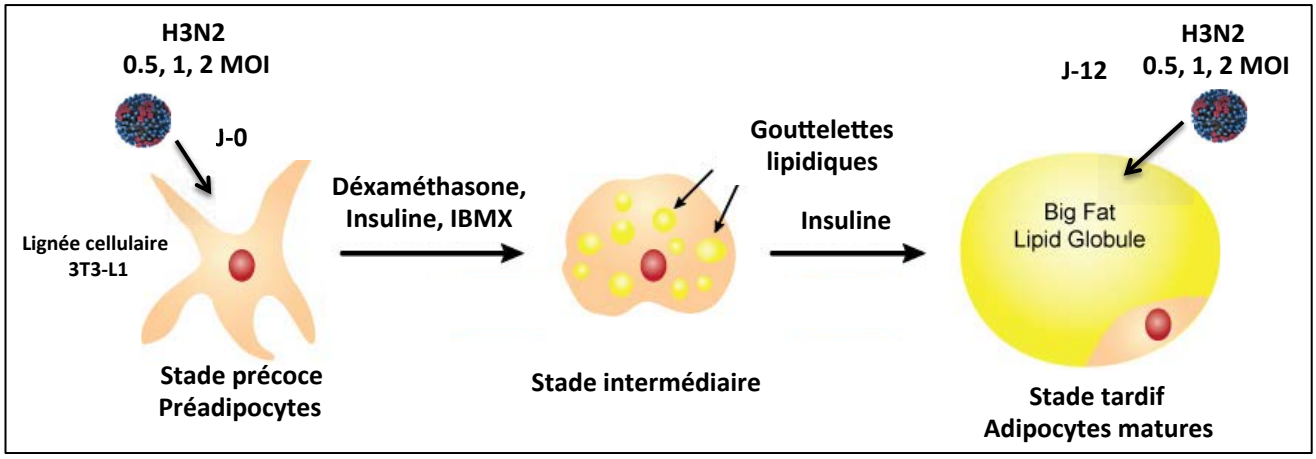

Figure 27. Procédure expérimentale d'infection par le virus de la grippe H3N2 *in vitro*

La lignée cellulaire 3T3-L1 (CL-173) a été obtenue auprès de l'ATCC, il s'agit d'une lignée de préadipocytes murins. Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM Glutamax additionné de 5% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% d'un cocktail d'antibiotiques (Pénicilline- Streptomycine (Gibco, *Life Technologies*, 15140122) à 37°C. La différenciation des préadipocytes en adipocytes matures est induite en additionnant au milieu de culture, deux jours post-confluence, un cocktail contenant de la déxaméthasone (Sigma, D4902), de l'IBMX (Sigma, I5879) et de l'insuline (Sigma, I9278) et maintenues en culture à 37°C. Deux jours après, le milieu de culture est remplacé par du milieu DMEM contenant de l'insuline.

Les cellules sont infectées au stade préadipocytes et au stade adipocytes matures. Les préadipocytes sont transférés dans des plaques de culture 6 puits, incubées pendant 24h à 37°C (400 000 cellules/puits). Préadipocytes et adipocytes matures sont ensuite lavés 3 fois avec du milieu de culture DMEM sans SVF. Le virus est par la suite introduit dans les puits à une concentration de 1 MOI (*multiplicity of infection*) et laissé incuber en contact avec les cellules pendant 1h à 37°C. Le tapis cellulaire est par la suite lavé 3 fois et remis en culture dans du milieu contenant du SVF pendant 1h, 24h et 48h **(Figure 27)**.

Les cellules sont par la suite récupérées dans 1 mL de trizol et conservées à -20°C pour évaluer l'expression du génome viral et des senseurs viraux. Le surnageant de culture est récupéré et

conservé à -80°C pour évaluer les sécrétions des cytokines, quantifier la charge virale et quantifier l'expression des protéines virales.

3. Quantification des particules virales infectieuses

Pour la quantification des particules virales infectieuses dans les surnageants de culture, nous avons utilisé une culture de cellules MDCK (NBL-2, ATCC, CCL-34). Les cellules sont maintenues en culture dans un milieu de culture MEM additionné de 5% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% d'un cocktail d'antibiotiques (Pénicilline- Streptomycine). Arrivées à confluence, les cellules sont repiquées dans des plaques de culture à 6 puits à une concentration de 10^6 cellules/mL et maintenues à 37°C pendant 24h. Le tapis cellulaire ainsi obtenu est lavé 3 fois avec du milieu MEM additionné de 1% du cocktail d'antibiotiques (Pénicilline- Streptomycine) sans SVF. Les surnageants à quantifier sont par la suite déposés sur le tapis cellulaire en vue d'estimer le nombre de particules virales infectieuses contenues, et laissé incuber pendant 1h à 37°C avec une agitation toutes les 10 minutes. Une solution constituée de : milieu MEM 10X (Gibco, 11430030), Bicarbonate de sodium (Thermo Fisher Scientific ; 25080094), Penicilline/Streptomycine, Agarose (1%), eau distillée stérile et de la trypsine de pancréas porcin (T4977 sigma), est délicatement déposée sur le tapis cellulaire qui est ensuite remis en culture à 37°C. Après 72h, une coloration au crystal violet (Sirchie, LV5021) permet de révéler la présence potentielle de plages de lyse qui seront alors comptées.

4. Extraction d'ARN, rétrotranscription et PCR quantitative

Les tissus récupérés (50-100 mg), homogénéisés dans 1 mL de Trizol, et les lysats cellulaires sont soumis à une extraction d'ARN utilisant un kit d'extraction spécifique des cellules et des tissus riches en lipides (Qiagen, *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit*, ID : 74804). Brièvement, après avoir rajouté 200 µL de chloroforme, les échantillons sont centrifugés à 12.000 rpm pendant 15 minutes. On obtient alors 2 phases (une phase aqueuse supérieure qui contient l'ARN, et une phase organique inférieure qui contient ADN et protéines) et une interphase. La phase aqueuse est délicatement récupérée. On rajoute 500 µL d'éthanol 70%, puis on transfère les échantillons sur colonnes. Des lavages successifs sont ensuite effectués avec les tampons fournis par le kit d'extraction RW1 et RPE. L'élution se fait par la suite dans 30 µL d'eau RNase free, et l'ARN est dosé (*NanoView*). Nous procédons par la suite à une rétro-transcription de 10µg d'ARN en utilisant le *kit High capacity RNA to c-DNA* (Applied Biosystem, ThermoFisher). Une PCR Quantitative est par la suite effectuée pour évaluer l'expression des senseurs viraux et des marqueurs d'inflammation en utilisant le mélage réactionnel suivant : 2,05µL d'eau RNase free, 5µL Sybrgreen et 1,25µL de chaque amorces par échantillons.

En vue d'évaluer l'expression du génome viral, une rétro-transcription spécifique a été effectuée. Pour 10µg d'ARN, nous avons rajouté 1µL d'amorce spécifique de la protéine virale (protéine de la matrice M1 localisée sur le segment 7) (5' TCT AAC CGA GGT CGA AAC GTA 3') à 2 µM et mis en incubation à 65°C pendant 5 minutes suivi d'une deuxième incubation de 5 minutes sur glace. Nous rajoutons par la suite 8µL d'un cocktail contenant : 1µL de mélange de dNTPs (10mM, Fermentas, R0192), 4µl de tampon RT 5X, 2µL de DTT 0,1M, 1µL de RNaseOUT (Invitrogen, 10777-019). Une incubation est ainsi lancée pendant 2 minutes à 25°C, puis, 1µL de l'enzyme Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, 18064-022) est rajouté. Le programme de rétro-transcription est lancé comme suit : 50 minutes à 42°C, 15 minutes à 70°C et 4°C en fin de cycle. L'utilisation d'amorces spécifiques pour la protéine M1 en Q-PCR permet d'estimer la charge virale. Une courbe standard est établie en utilisant un plasmide Puc18-ppol-M1. Le mélange réactionnel pour chaque échantillon est composé de : 2,5µL d'ADNc ; 0,225µL de chacune des amorces ; 2,05µL d'eau RNase free et 5µL de Taqman. Pour évaluer l'expression des senseurs viraux et des marqueurs d'inflammation, des couples d'amorces spécifiques à cible unique ont été utilisés (Eurofins), dont la séquence de nucléotides est détaillée dans le tableau suivant en utlisant le Sybergreen:

Tableau 1: Séquences d'oligonucléotides des amorces d'IAV et des senseurs viraux.

Gène cible	Amorce sens	Amorce anti-sens
IAV (M1)	5'-AAGACCAATCCTGTCACCTCTGA- 3'	5'-CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC- 3'
Oas1	5'-AAGCTGAAGCGCCTCATCC-3'	5'-GGCATAGACTGTGAGCAGCTCC- 3'
Mda5	5'-TGATGCACTATTCCAAGAACTAACA- 3'	5'-TCTGTGAGACGAGTTAGCCAAG- 3'
Tlr3	5'-TCATTCTCCCTTGCTCACTCTCA- 3'	5'-AAGGCCGAGATCAAGTATCCTGA- 3'
Mx1	5'-TGCAGAGGTCAGCAGGACATC- 3'	5'-GGCAGTTTGGACCATCTCTGAA- 3'
Mavs	5'-CAGCGCCATCAAAATTACCC- 3'	5'-AGGTGGTATTGTGTTGGCAGG- 3'

Le programme d'amplification débute par une étape de dénaturation (3 minutes à 95°C) suivie de 40 cycles alternant dénaturation (10 secondes à 95°C), hybridation (60°C pendant 15 secondes) et élongation (72°C pendant 30 secondes). Chaque échantillon est passé en triplicat. Pour s'assurer de la spécificité des amorces, nous nous sommes basé sur l'aspect de la courbe de dissociation en fin de cycle, qui devait présenter un seul pic. L'évaluation quantitative relative a été effectuée par la méthode comparative ΔΔCt. La moyenne des ΔCt des échantillons contrôles non infectés pour chaque gène a été utilisé comme calibrateur suite à la normalisation par rapport au gène de ménage control (EeF2). Les résultats sont présentés en *fold-change* par rapport au gène de ménage et par rapport au contrôle (quantification relative = 2-ΔΔCt).

5. Cytométrie en flux sur les cellules immunes du tissu adipeux

Les tissus adipeux sont récupérés à 7 jours p.i. dans du PBS 2% SVF froid. Les échantillons sont très finement coupés et digérés pendant 30-45 minutes dans du milieu DMEM contenant de la collagenase II (Sigma) puis centrifugés à 400g pendant 5 minutes. Le culot est par la suite repris dans du milieu pour être lavé, puis un tampon de lyse est rajouté pendant 5 minutes pour éliminer les globules rouges. Une fois les cellules lavées, elles sont comptées puis marquées pendant 30 minutes avec le mélange contenant les anticorps marqués avec des fluorochromes compatibles, CD45 (BV510), F4/80 (PE-Cy7), CD11b (PE-Cy5), Ly6G (APC-Cy7) (BioLegend), et Siglec F (BV421) (BD Biosciences). Les données ont été générées en utilisant le Fortessa et les analyses effectuées sur le logiciel BD FACSDiva (Bioscience).

6. Analyse de la consommation d'oxygène et détermination des paramètres respiratoires des préadipocytes et adipocytes murins infectés

Cellules intactes

La respiration des préadipocytes et des adipocytes infectés ou non infectés est déterminée par la mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène grâce à un oxygraph-2k à haute résolution (OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria), utilisant 2 chambres à 37°C sous une légère agitation pour limiter tout artefact relié à l'O_2. La mesure de la respiration des cellules intactes permet d'avoir une estimation générale de la capacité des cellules à respirer en utilisant les substrats endogènes.

La respiration est mesurée sur $1x10^6$ préadipocytes ou adipocytes non-infectés ou infectés (14 jours post différenciation *in vitro*) après 24, 48 and 72 heures. Les cellules ont été décollées par la trypsine, lavées deux fois et comptées avec du bleu de Trypan (Gibco, Life Technologies) pour évaluer la mortalité cellulaire. Les cellules sont par la suite introduites dans les chambres de respirométrie et la respiration basale (*Routine respiration*; R) a ainsi été mesurée dans un état de couplage. Par la suite, nous avons rajouté de l'oligomycine (oli) pour déterminer la respiration découplée (*Leak respiration*; L). La consummation d'O_2 en présence d'oligomycine représente la somme du flux de protons à travers la membrane mitochondriale interne avec toute consommation d'oxygène non-mitochondriale. En effet, l'oligomycine inhibe le système de phosphorylation mitochondriale, ainsi la fuite respiratoire correspond à la consommation d'oxygène non couplée à la synthèse d'ATP. Pour finir, la respiration mitochondriale découplée est mesurée en présence d'une concentration optimale d'un composé découplant : le CCCP (Carbonyl Cyanide *m*-ChloroPhenylhydrazone), qui permet d'obtenir le taux de respiration maximal en absence d'ADP. L'addition de l'antimycine A (AA) nous

permet d'évaluer la respiration résiduelle. La respiration maximale de découplage est une mesure de la capacité du système de transport d'électrons (Electron Transport System, ETS) **(Figure 28)**.

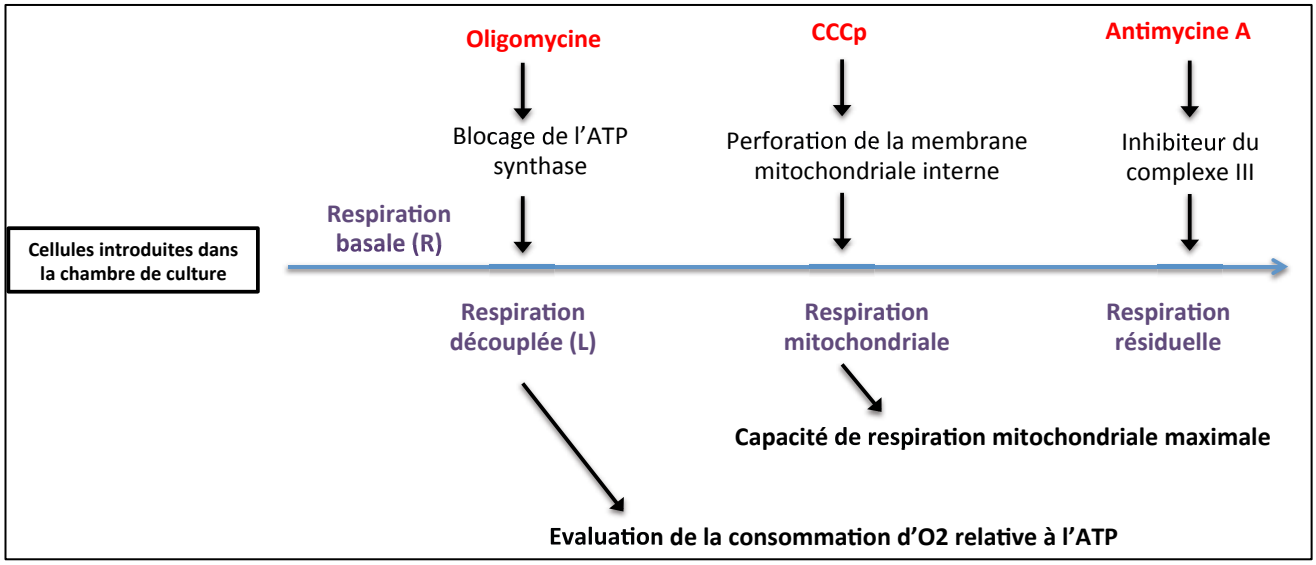

Figure 28. Respirométrie sur cellules intactes : cinétique d'ajouts des substrats.

La capacité ETS a été utilisée pour normaliser et calculer le ratio contrôle du flux respiratoire. Le ratio Routine par le flux contrôle (R/E) reflète l'activité mitochondriale en relation avec la capacité maximale ETS. Le ratio R/E exprime jusqu'à combien la respiration de routine affecte la capacité respiratoire ETS. Le ratio fuite par le flux controle (L/E) reflète la respiration comme une function ETS et correspond à l'ampleur du découplage intrinsèque. Le ratio net routine par le flux contrôle (netR), qui est calculé comme suit: (R-L)/E, correspond à la fraction de la capacité ETS utilisée pour contrôler la synthèse d'ATP. L'acquisition des données et l'analyse ont été effectuées avec le logiciel DatLab 4.3 (OROBOROS Instruments).

Cellules perméabilisées

Les préadipocytes et adipocytes infectés ou non infectés sont récupérés à différents temps après infection, comme précédemment mentionné. La perméabilisation des cellules se fait en introduisant de la **Digitonine** ($C_{56}H_{92}O_{29}$, Roth) dans la chambre de respirométrie ce qui permet de bloquer toute respiration en dehors de la respiration mitochondriale. Le rajout du **glutamate + malate** (GM), fournit du NADH aux cellules, glutamate et transaminases étant responsables du métabolisme de l'oxaloacétate, permettent ainsi de faire travailler le complex I. L'addition de l'**ADP** permet de mettre en route les complex I-III-IV et V. En vue d'évaluer l'activation du complexe II, nous avons rajouté du **Succinate** qui fournit du $FADH_2$ induisant ainsi la β-oxydation. L'ajout du **Octanoyl Carnitine** (Acide gras) permet de montrer si on pouvait augmenter encore plus la respiration,

puisqu'il s'agit d'un substrat qui rentre dans la mitochondrie par diffusion. **Le cytochrome C** permet de voir si les mitochondries sont intactes ou pas. La **Roténone** permet de bloquer le complexe I et l'**Antimycine A (AA)** bloque le complexe III. L'acquisition des données et l'analyse ont été effectuée avec le logiciel DatLab 4.3 (OROBOROS Instruments) **(Figure 29)**.

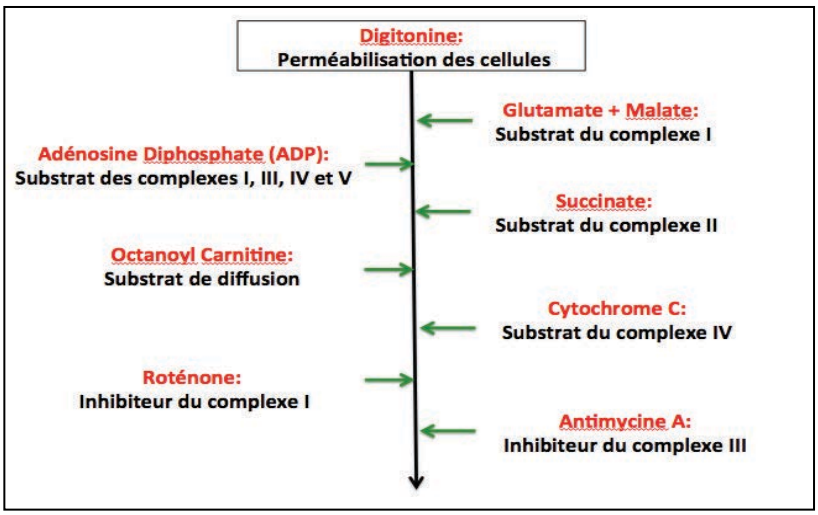

Figure 29. Respirométrie sur cellules perméabilisées : cinétique d'ajouts des substrats et inhibiteurs.

7. ELISA

Les surnageants de cultures de préadipocytes et adipocytes infectés ou non infectés sont récupérés et conservés à -80°C. Les explants de tissu adipeux sous-cutané et visceral provenant de souris minces ou obèses infectées ou non infectées sont récupérés et mis en culture dans du milieu DMEM pendant 24h. Le surnageant est par la suite récupéré et conservé à -20°C. Pour le dosage, nous utilisons deux trousses: e-bioscience (IL-6, IL-1β) et BD (IL-10 et TNF-α). La lecture de la densité optique est effectuée à 450 nm, en utilisant le logiciel skanit.

8. Histologie du tissu adipeux

Les tissus adipeux sous-cutanés (inguinaux) et viscéraux (péri-gonadiques) des souris sacrifiées et perfusées sont délicatement récupérés et fixés dans du ParaFormAldéhyde (PFA) 4% pendant 2 jours. Après 48h, les tissus sont transférés dans de l'éthanol 70%. Une fois inclus en paraffine, les échantillons sont coupés à une épaisseur de 5µm puis colorés avec de l'hématoxyline-éosine (H&E). Pour l'évaluation du nombre et de la taille des adipocytes par morphométrie, au moins 10 champs par lame ont été visualisés et les images ont été capturées avec une caméra (AxioCam HRc, Zeiss, Göttingen, Germany) connectée à un microscope optique (Axioplan 2 Imaging, Zeiss). L'aire des adipocytes (mm^2) est mesurée en utilisant une macro créée spécifiquement pour l'analyse d'image du tissu adipeux avec le logiciel Fiji-ImageJ.

9. Western Blot

La détection de l'hemagglutinine dans les préadipocytes et les adipocytes ($4x10^5$ cellules) infectés avec le virus influenza H_3N_2 (1 MOI) a été effectué à 24h p.i. en suivant la protocole suivant: Les cellules sont homogénisées dans du tampon de lyse (*RIPA lysis buffer*, Sigma-Aldrich) contenant des inhibiteurs de protéases (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich). Après la clarification de la solution par centrifugation, la concentration des proteines est déterminée (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). Ensuite, 40 mg de proteines totales sont séparées sur un gel de polyacrylamide 10% (*Mini-PROTEAN TGX Precast Gels*, Bio-Rad Laboratories) et puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (Transf-Blot-Turbo, Bio-Rad Laboratories). La membrane est par la suite bloquée avec une solution 5% BSA dans PBS/0.1% tween pendant 1 heure puis incubée sur la nuit avec l'anticorps polyclonal anti-H_3N_2 *HA* (1:500) (ThermoFisher Scientific) à 4°C. Après lavages, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire à temperature ambiante *goat anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody* (KPL, Milford, MA, USA) addition de *ECL Western Blotting Substrate* (Bio-Rad Laboratories). L'alpha-tubuline est utilisée comme contrôle pour normaliser le niveau d'expression des protéines.

Pour la detection d'UCP1 dans les tissus; le SCAT, l'EWAT, le BAT et les poumons sont broyés dans du tampon de lyse (*Tissue protein extraction reagent* (Tper), ThermoFisher Scientific) additionné d'anti-protéases (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich). Le lysat est centrifugé à 3,000 g /15 min à 4 °C, et les surnageants utilisés pour des analyses ultérieures. La concentration des protéines est déterminée avec le *Kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific) et les protéines totales (50 µg) sont séparées sur un gel 4-12% Bolt Bis-Tris Plus (Invitrogen) puis transférés sur une membrane PVDF (*iBlot2 PVDF regular stacks*, Invitrogen). Les membranes sont par la suite bloquées avec une solution de 5% BSA dans du PBS/0.1% Tween pendant 1 heure puis incubées sur la nuit à 4°C avec un anticorps polyclonal anti-UCP1 (1:500) (Abcam, Cambridge, UK). Après lavages, une incubation pendant une heure avec l'anticorps secondaire *goat anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody* (KPL) et de l'ECL *Western Blotting Substrate* (Bio-Rad Laboratories) a été effectuée. Les protéines marquées sont scannées et analysées par le logiciel *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). L'intensité des bandes est normalisée en se basant sur l'épaisseur de la bande de la GAPDH pour chaque échantillon.

10. Microscopie confocale sur préadipocytes et adipocytes infectés ou non infectés

Les cellules sont cultivées et infectées dans des chambres de culture sur lamelle utilisant le protocole mentionné précédemment. Par la suite, les cellules sont fixées avec du paraformaldehyde (PFA, 4%)

pendant 15 minutes. Trois lavages sont effectués avec du PBS 1X. Une perméabilisation est alors effectuée avec du tampon PBS 0,1% Tween suivie d'une étape de blocage avec du tampon PBS 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*). Les cellules sont marquées avec l'anticorps primaire, dirigé contre l'hémagglutinine (HA) (Abcam) pendant 24h à 4°C, puis avec l'anticorps secondaire *Goat Anti-rabbit Anti-IgG (H+L) AlexaFluor 488* (Thermofisher) pendant 1h à temperature ambiante à l'abri de la lumière, suivi d'une coloration des noyaux au Dapi (4′,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), Sigma-Aldrich, 32670) pendant 5 minutes. L'observation des cellules est effectuée avec un microscope confocal Zeiss LSM 880 associé au logiciel Zen 2.

11. Analyse transcriptomique des préadipocytes et adipocytes infectés ou non infectés

L'ARN cellulaire a été obtenu comme mentionné dans le paragraphe 4 (Extraction d'ARN, rétrotranscription et PCR quantitative). La qualité de l'ARN a été vérifiée en se basant sur le RIN (*RNA Integrity Number*). Le profil transcriptomique a été effectué en utilisant le kit d'expression génique spécifique aux souris *v2 8x60K Microarray Kit G4852B* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Le protocol a été realisé « *Centre de Ressources Biologiques pour la Génomique des Animaux Domestiques et d'Intérêt Economique* » (CRB GADIE), INRA Jouy-en-Josas, France. Ce micro-array design est référencé dans la base de données Gene Expression Omnibus (GEO) de la plateforme ID GPL15357. Un design à deux couleurs a été utilisé pour permettre une comparaison directe entre les adipocytes et les préadipocytes non-infectés ou infectés. Pour réduire la variabilité due aux échantillons, les ARN on été collectés de 4 expériences indépendantes. Les *Arrays* ont été hybridés selon les recommendations du fournisseur. Les informations concernant le microarray (MIAME) ont été déposées dans la base de données *Gene Expression Omnibus* (GEO) sous l'identifiant ID E-MTAB-6646. L'identification de l'expression des gènes et l'investigation fonctionnelle ont été effectuées en utilisant le logiciel Genespring (Version 14.8, Agilent Technologies). Les différences d'expression ont été identifiées en utilisant un T-test. Le ratio Benjamini-Hochberg False Discover Rate (FDR) a été utilisé comme méthode de correction multiple et une valeur limite de *p*-value à 1% a été appliquée. Un fold-change >2 a été rajouté pour sélectionner les gènes différemment exprimés entre la condition non infectée et la condition infectée. Pour les analyses fonctionnelles, nous avons utilisé le programme Gene Ontology (molecular function, biological process and cellular component) pour déterminer la liste des gènes dont l'expression est augmentée ou diminuée en condition d'infection.

12. Microscopie éléctronique sur les préadipocytes et adipocytes infectés ou non infectés

Après infection à 5 MOI les cellules (5. 10^6) sont fixées dans 4% glutaralaldéhyde pendant 15 minutes, puis conservées à 4°C dans du PBS jusqu'à utilisation. Elles ont par la suite été post-fixées

dans du cacodylate (0.2 M, pH 7.4)/4% glutaraldéhyde (1:1), pendant 30 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est par la suite enveloppé dans de la résine EPON^{TM} (Sigma-Aldrich) qui polymérise à 60°C pendant 48 heures. Des coupes ultra-fines ont été réalisées puis colorées avec 5% d'uranyl acétate et 5% de citrate puis déposées sur une grille à microscopie éléctronique en or; pour examination utilisant le microscope élétroniqe à transmission, JEOL 1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

13. Analyses statistiques

Les résultats de la qRT-PCR ont été exprimés en Moyenne ± l'erreur standard moyenne (SEM, *Standard Error Mean*) de au moins 3 expériences indépendantes. La signification statistique de la comparaison entre les groupes traités de façon simulée et ceux infectés par IAV a été déterminée en utilisant le test non paramétrique de Mann-Withney. Pour les comparaisons multiples, une analyse ANOVA a été réalisée. Pour les analyses de respirométrie, une analyse ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey a été effectuée lors de la comparaison de quatre groupes ou plus. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6. Les résultats ont été considérés statistiquement significatifs lorsque les valeurs de p étaient inférieures à 0,05 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Résultats

Partie 1

Impact de l'obésité sur l'infection par la bactérie *Streptococcus pneumoniae*

1. Les souris obèses sont plus susceptibles à l'infection par la bactérie *Streptococcus pneumoniae*

Les souris sont mises sous régime standard (*chow*) ou obésogène (HFD ; *high-fat diet*) pendant 8 à 10 semaines (*i.e.* jusqu'à ce que la différence de poids corporelle entre les deux groupes soit d'environ 10 g). Les souris sont alors infectées par *Streptococcus pneumoniae* (sérotype 1, dose sublétale de 10^5 CFU (*colony forming units*), administration intranasale). A 8 jours post-infection (p.i.), les souris obèses montrent une mortalité élevée (90,90%) comparativement aux souris minces (18,75%) **(Figure 30.A)**. La majorité des souris obèses commence à mourir à partir de 2 à 3 jours p.i. ; raison pour laquelle les expérimentations qui suivent sont effectuées à 48 heures (48h) et 72h p.i. De plus, alors que les souris minces ne perdent pas de poids corporel à la suite de l'infection (la perte de poids au jour 1 p.i. résulte de l'anesthésie utilisée le jour de l'infection), les souris obèses montrent quant à elles une diminution très importante de leur poids corporel entre le 2ème et le 6ème jour p.i. Les souris obèses survivant à l'infection, reprennent progressivement du poids pour retrouver leur poids initial **(Figure 30.B)**.

L'évaluation des taux de la leptine dans le sang montre une augmentation chez les souris obèses, comparées aux souris minces **(Figure 30.C**), ce qui est attendu puisqu'il est admis que la concentration de leptine sérique est proportionnelle à la masse de tissu adipeux blanc **(Zuriaga *et al.*, 2017)**. Par contre, les taux de leptine ne sont pas modifiés par l'infection, à la fois chez les souris minces et les souris obèses **(Figure 30.C)**. Cependant, l'infection par *S. pneumoniae* se traduit par une inflammation systémique, caractérisée par des taux élevés d'IL-6 et d'IFN-γ, qui est comparable chez les souris minces et obèses **(Figure 30.D)**.

Pour tenter de déterminer la cause de la mortalité importante des souris obèses infectées par *S. pneumoniae*, nous avons analysé les paramètres pulmonaires suivants : score pathologique des poumons (histologie), quantification des cytokines dans les extraits protéiques pulmonaires (ELISA) et détermination de la fréquence des neutrophiles pulmonaires (cytométrie en flux).

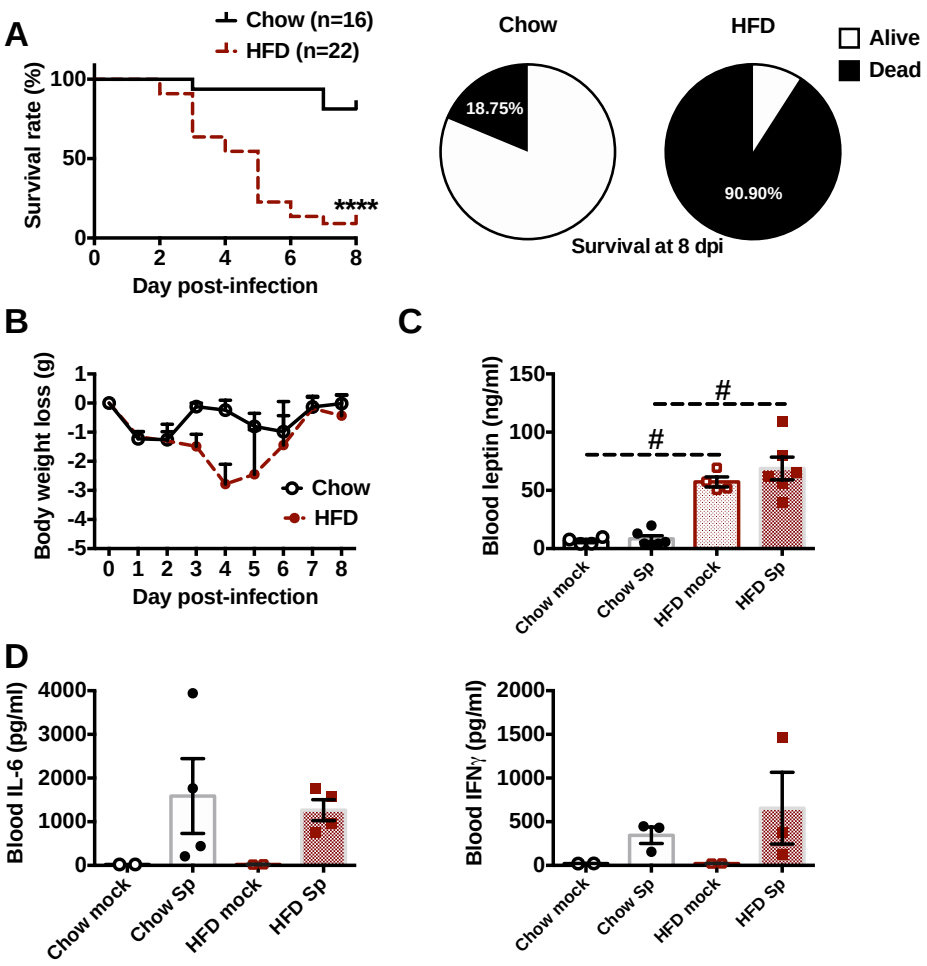

Figure 30. Les souris obèses sont plus susceptibles à l'infection par *S. pneumoniae* que les souris minces.

(**A**) Estimation de la mortalité des souris minces (*chow*) et des souris obèses (*HFD*) infectées par *S. pneumoniae*. (**B**) Suivi des pertes/reprises de poids corporel (en g) des souris minces ou obèses infectées par *S. pneumoniae* de J0 à J8 p.i. (**C**) Quantification (ELISA) des taux de leptine et (**D**) d'IL-6 et d'IFN-γ dans le sérum des souris minces et obèses, infectées, comparativement aux souris non infectées (*mock*). n=2-4 mock chow, n= 4-5 Sp chow, n=4 mock HFD et n=4-6 *S. pneumoniae* HFD.

L'observation des coupes histologiques des poumons montre des différences notables entre les souris minces et obèses non-infectées ou infectées. En dehors de toute infection (groupes *mock*) ; on observe un recrutement cellulaire plus important dans les poumons des souris obèses comparativement aux souris minces **(Figure 31.A, panels supérieurs)**, confirmé par le score histologique, deux fois plus élevé chez les souris obèses. Cet effet résulte probablement de l'état d'inflammation général accompagnant l'obésité **(Figure 31.A, droite)**. Dans un contexte infectieux, on constate que les souris minces et obèses présentent des altérations pulmonaires et des scores histologiques comparables **(Figure 31.A)**. De même, les taux des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNF-α augmentent de façon comparable dans les poumons des souris minces et obèses infectées ; traduisant une réponse inflammatoire pulmonaire identique **(Figure 31.B)**. L'évaluation de la

neutrophilie dans les poumons des souris à 16h et, surtout, à 48h post-infection montrent une tendance (cependant non significative) à l'augmentation du nombre de neutrophiles dans les poumons des souris infectés (comparativement aux poumons des souris non infectées) et ceci, à la fois chez les souris minces et obèses **(Figure 31.C)**. Enfin, la détermination de la charge bactérienne dans les poumons et la rate des souris minces ou obèses infectées montre une charge équivalente entre les deux groupes de souris à 72h p.i. **(Figure 31.D)**.

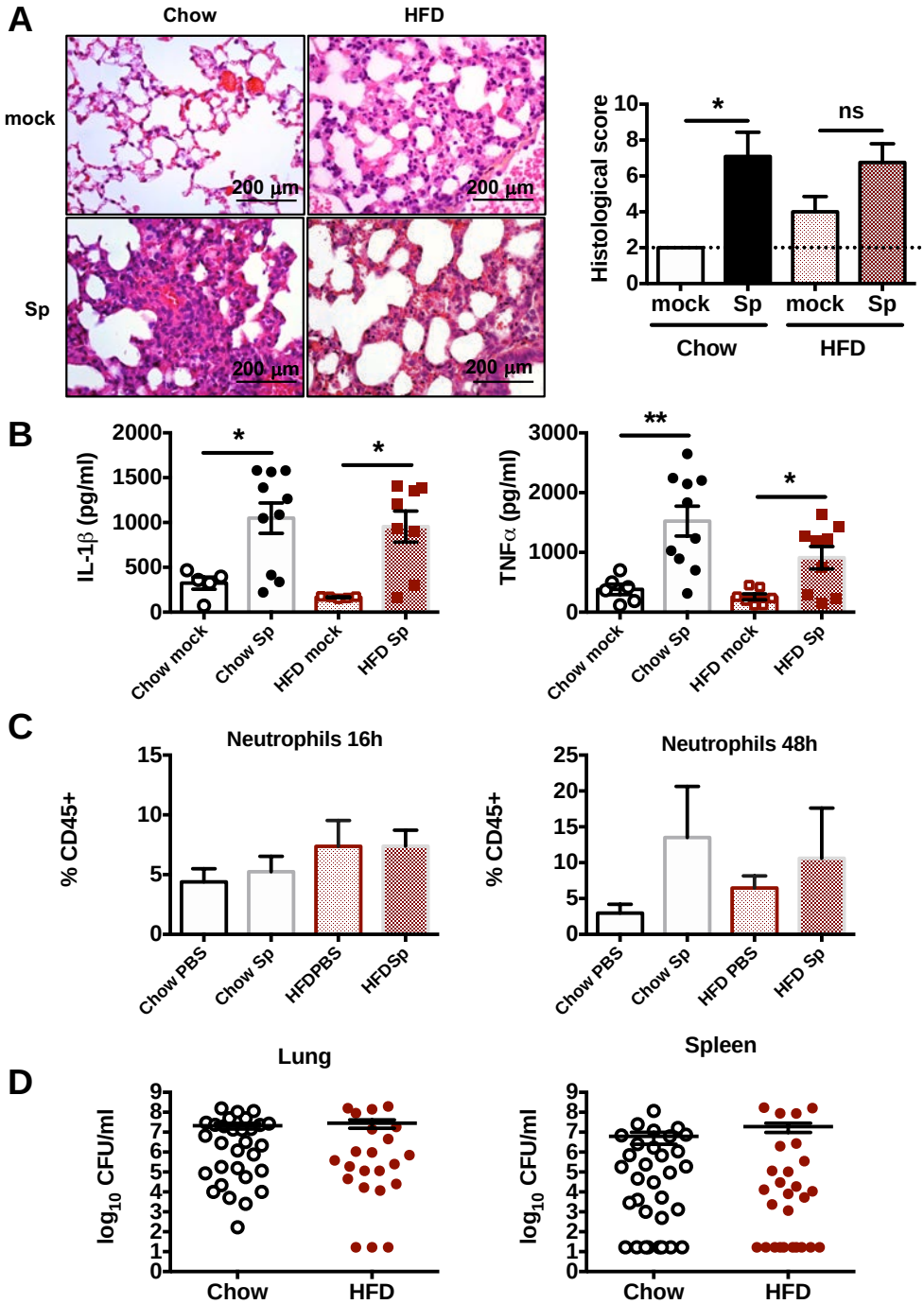

Figure 31. Réponse pulmonaire des souris minces ou obèses à l'infection par *S. pneumoniae*.

(**A**) Coupes histologiques de poumons de souris minces (*chow*) et obèses (*HFD*) infectées (*Sp*) *vs* non-infectées (*mock*) et score histologique correspondant. (**B**) Quantification (ELISA) des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNFα dans les extraits protéiques des poumons de souris minces ou obèses, infectées et non-infectées, n=6 *mock* et n=10 *Sp*. (**C**) Analyse par cytométrie en flux (FACS) du nombre de neutrophiles dans les poumons de souris minces et obèses à 16h et 48h p.i. n=3 *mock* et n=7 *Sp* (**D**) Dénombrement des bactéries dans les poumons et la rate de souris minces et obèses infectées, n=31 *Chow*, n =22 *HFD*.

Ainsi, la susceptibilité accrue des souris obèses à l'infection par *Streptococcus pneumoniae* n'est pas la conséquence d'une altération ou d'une réponse inflammatoire pulmonaire plus importante que celle se développant dans les poumons des souris minces infectées.

2. Les souris obèses infectées par *S. pneumoniae* développent un syndrome de type méningite

L'infection par *S. pneumoniae* est invasive et n'est donc pas confinée aux niveau des poumons, nous en détectons effectivement dans la rate (*cf*. **Figure 31.D**). En effet, en traversant la barrière pulmonaire, les bactéries transloquent vers la circulation sanguine induisant une septicémie. Dans certains cas, des bactéries peuvent même atteindre le cerveau, causant des méningites. Nous avons donc comparé les charges bactériennes dans le cerveau des souris minces et obèses infectées (72h p.i.). Les résultats montrent que le nombre de bactéries est significativement plus élevé dans le cerveau des souris obèses, comparativement aux souris minces **(Figure 32.A)**. Cependant, la quantification des cytokines dans les lysats protéiques du cerveau permet de montrer une réponse pro-inflammatoire induite par l'infection, marquée par l'augmentation de la production de l'IL-1β et du TNFα dans les cerveaux des 2 types de souris **(Figure 32.B)**.

L'obésité est associée à une altération de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Nous avons donc quantifié l'expression des gènes codant les protéines de jonction serrée *Zo-1*, *Occludine*, *VE-Cadhérine* et *Claudine-5* (RT-qPCR). Nos résultats montrent que l'obésité est associée à une diminution de l'expression de la *Claudine-5* (*Clau5*) **(Figure 33.A)** sans que celles de l'*Occludine* ou de la *VE-Cadhérine* ne soit altérée (résultats non montrés). Nos résultats sont en accord avec la littérature qui décrit une diminution de l'expression de *Clau5* en condition d'obésité **(Li *et al*., 2015)**. Cependant, l'infection n'a aucun effet sur l'expression de ces gènes, que ce soit chez les souris minces ou obèses.

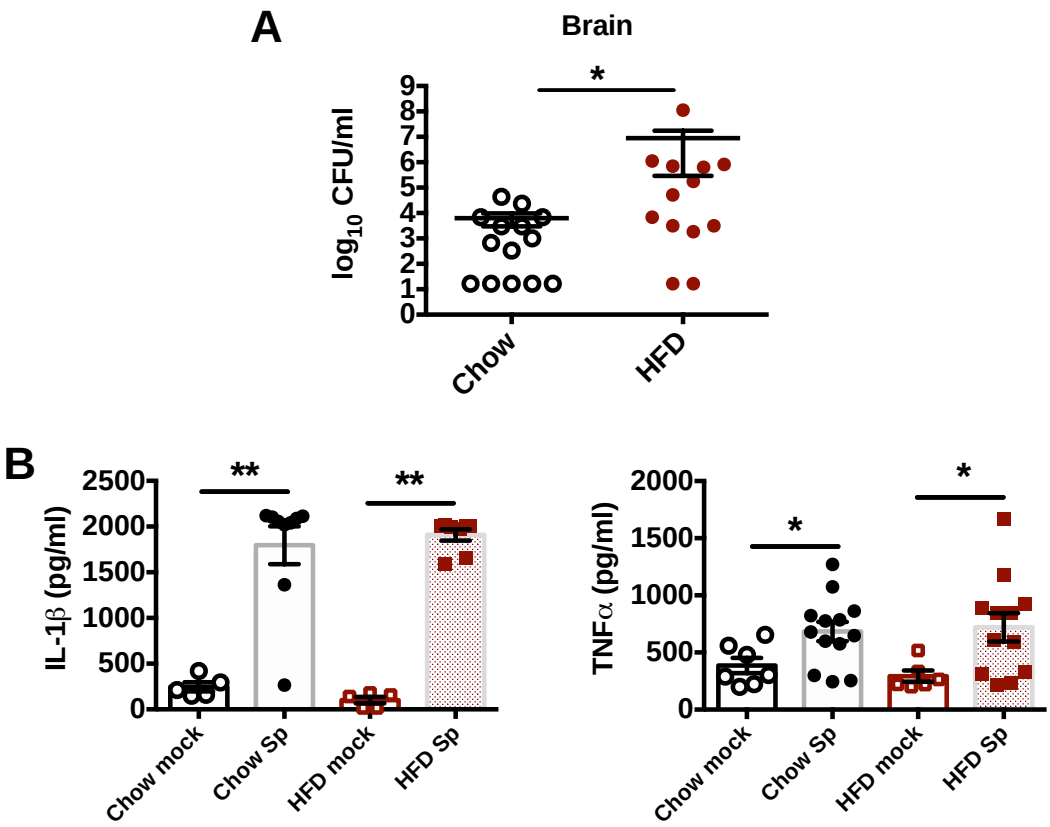

Figure 32. Quantification de la charge bactérienne et des sécrétions des cytokines pro-inflammatoires dans le broyat de cerveau des souris minces et obèses infectées par *S. pneumoniae*.

(**A**) Quantification de la charge bactérienne dans le cerveau de souris minces et obèses infectées par *S. pneumoniae*, n=15 *chow* et n=13 *HFD* (**B**) Quantification des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNF-α dans les extraits protéiques du cerveau de souris minces et obèses (mock *vs* infectées), n=5-7 *mock* et n=12-15 *Sp*.

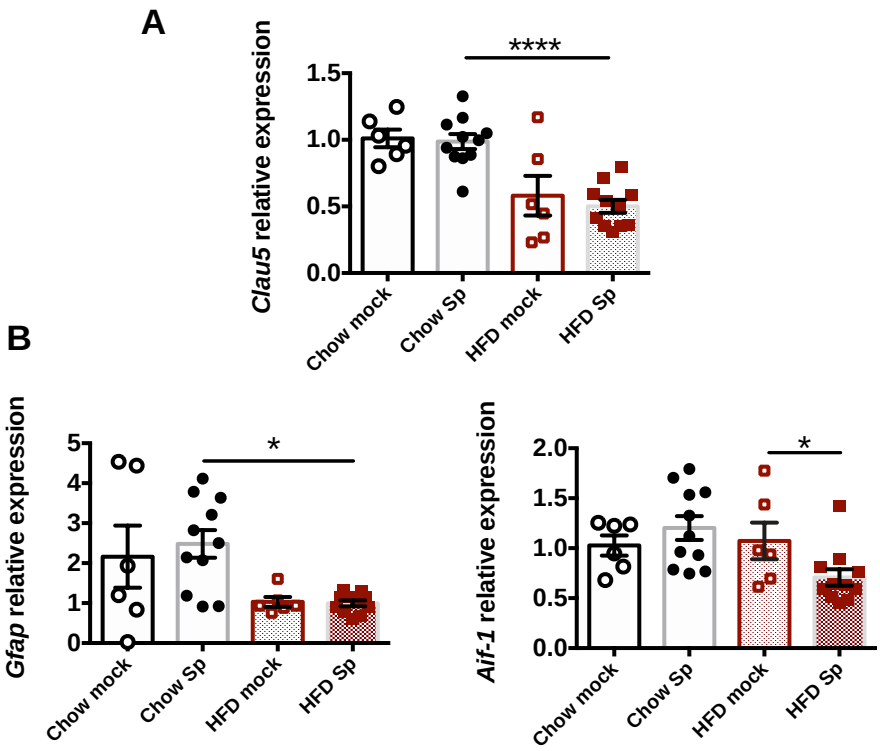

Figure 33. Quantification de l'expression de la jonction serrée *Clau 5* et de la *Gfap* et *Aif-1* dans le cerveau total.

(**A**) Expression par RT-qPCR de la protéine de jonction serrée Claudine-5 (*Clau-5*) dans le cerveau total des souris minces et obèses (mock *vs* infectées). (**B**) Expression de la *Gfap* (*Glial fibrillary acidic protein*) et *Aif-1* (*Allograft inflammatory factor-1*) par RT-qPCR, marqueurs respectifs de l'activation de l'astrocyte et de la microglie, n=6 *mock* et n=11 *Sp*.

Nous avons également comparé l'expression de gènes codant des marqueurs d'activation des astrocytes (*Gfap*) et de la microglie (*Aif-1*) **(Figure 33.B)**. Les résultats montrent une diminution significative de l'expression de *Gfap* en condition d'obésité. L'infection n'a par contre aucun effet sur l'expression de ce gène, ni chez les souris minces ni chez les souris obèses.

Contrairement à ce qui est observé pour *Gfap*, l'expression de *Aif-1* n'est pas modulée par l'obésité. De manière intéressante, l'infection diminue l'expression d'*Aif-1* uniquement chez les souris obèses.

Afin d'étudier plus précisément les effets de l'infection sur le système nerveux central, nous avons procédé à la dissection de différentes régions du cerveau : bulble olfactif, hippocampe, hypothalamus, cortex cérébelleux, cortex cérébral, et striatum (*cf.* Matériels et Méthodes).

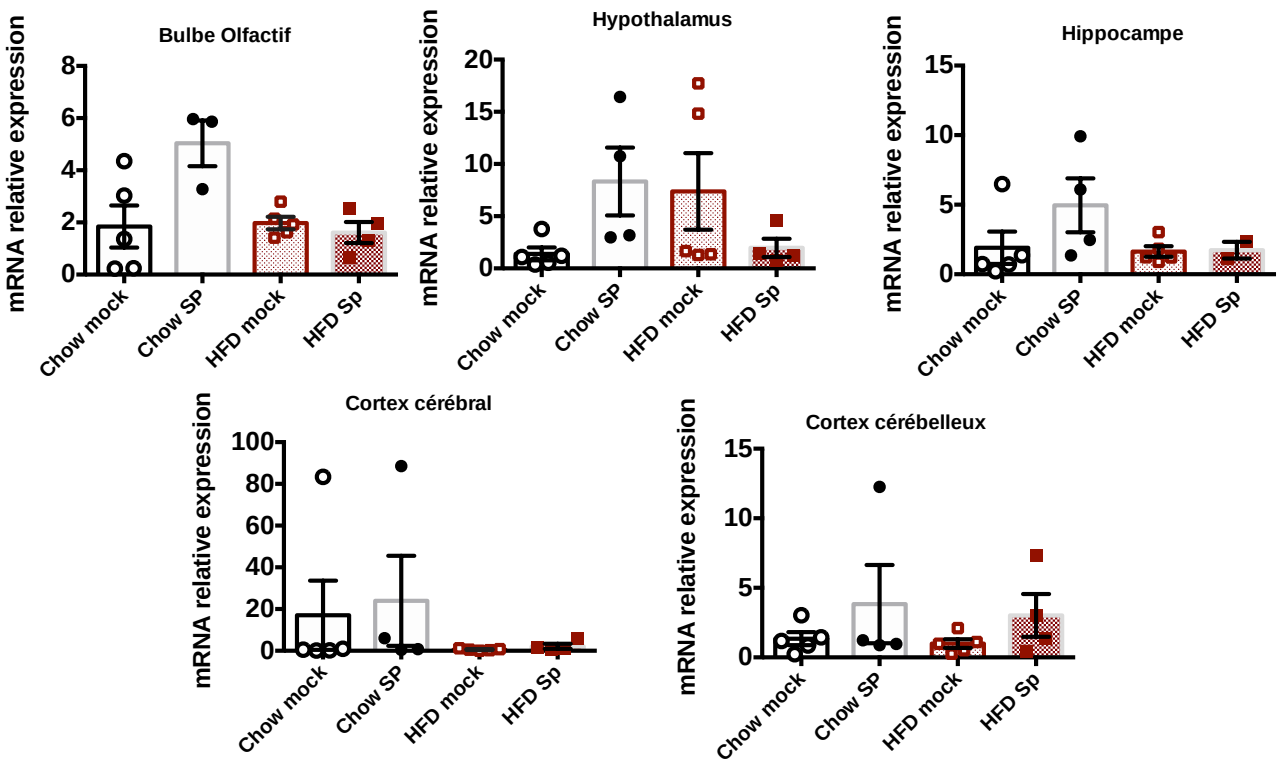

Figure 34. Expression du gène *Tnfα* dans les différentes zones du cerveau.

Les zones du cerveau ciblées sont le bulbe olfactif, l'hypothalamus, l'hippocampe, le cortex cérébral, le cortex cérébelleux.

La présence de la bactérie *S. pneumoniae* dans le cerveau entraine une inflammation, caractérisée par des taux accrus de TNF-α. Nous avons donc quantifié l'expression de cette cytokine dans les différentes régions du cerveau par RT-qPCR, afin de localiser la région qui est la plus affectée par l'infection **(Figure 34).** Les résultats montrent une faible tendance à l'induction de l'expression de *Tnfα* au niveau du bulbe olfactif, de l'hippocampe et l'hypothalamus chez la souris minces dans un contexte d'infection. De manière intéressante, chez la souris obèse, cette expression semble être réprimée.

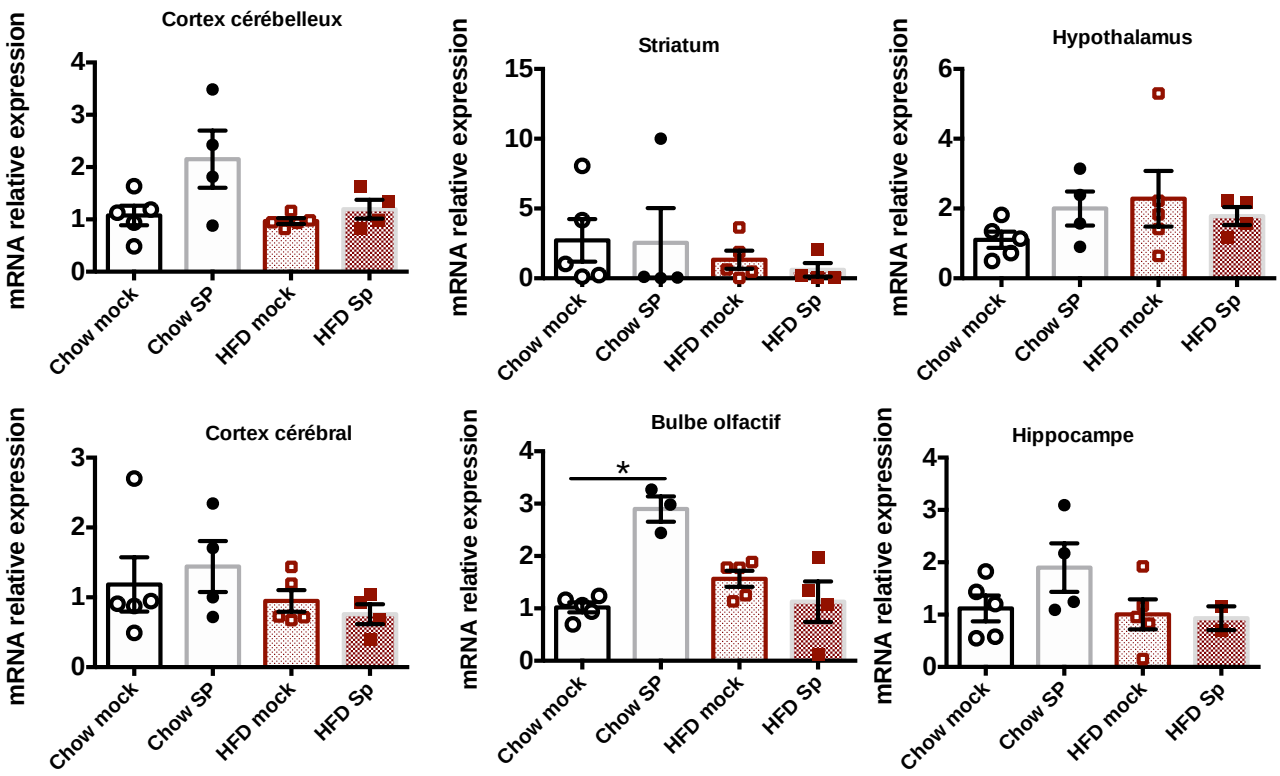

Figure 35. Expression du gène *Clau5* dans les différentes zones du cerveau.

Les zones du cerveau ciblées sont le bulbe olfactif, l'hypothalamus, l'hippocampe, le cortex cérébral, le cortex cérébelleux, n=5 *mock*, n=5 Sp.

Comme l'expression de la *Clau5* était intéressante dans les premières analyses d'expression sur cerveau total, nous avons voulu savoir si cet effet était localisé dans une région particulière du cerveau. Ainsi, les résultats obtenus **(Figure 35)** montrent que l'infection chez souris minces, induit une augmentation significative de l'expression de la *Clau5* uniquement au niveau du bulbe olfactif.

L'expression de *Aif1*, qui est un marqueur de l'activation de la microglie, n'est pas modulée par l'infection dans le groupe des souris minces et obèses au niveau du bulbe olfactif, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cortexe cérébelleux **(Figure 36.A)**.

L'analyse de l'expression de la *Gfap*, marqueur d'activation des astrocytes, ne montre pas de différences majeures entre les groupes de souris infectées comparées à leur contrôle correspondant **(Figure 36.B)**.

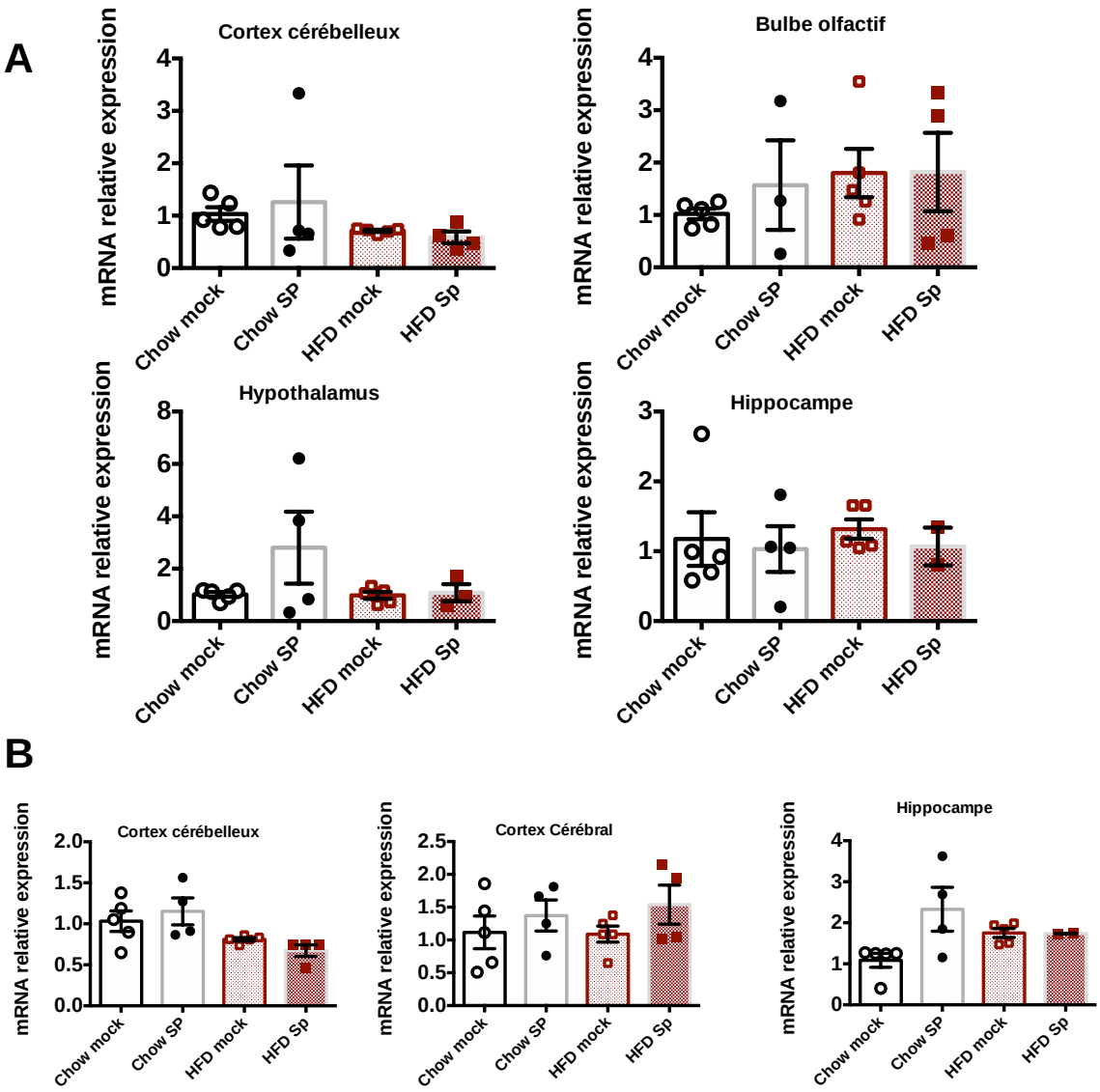

Figure 36. Expression des gènes *Aif1* et *GFAP* dans les différentes zones du cerveau.

Les zones du cerveau ciblées sont le bulbe olfactif , l'hypothalamus, l'hippocampe, le cortex cérébral, le cortex cérébelleux n=5 *mock*, n=5 Sp. (A) Expression de *Aif1* dans le cortex cérébelleux, le bulbe olfactif, l'hypothalamus et l'hippocampe, (B) Expression de la *GFAP* dans le cotex cérébelleux, le cortex cérébral et l'hippocampe.

Toutes ces analyses sont préliminaires et ne montrent pas, à quelques exceptions près, de résultats significatifs en termes d'expression entre les différentes régions du cerveau. Ainsi, nous avons changé de stratégie pour opter pour un criblage global, en réalisant des coupes flottantes sur nos échantillons de cerveaux suivi d'un immuno-marquage spécifiques des protéines GFAP, AIF-1 et de la bactérie *S. pneumoniae* qui nous permettra de localiser plus facilement et de manière plus précise les zones altérées par la bactérie. Une fois identifiées, ces zones seront étudiées plus en détail, par une analyse de l'expression des marqueurs inflammatoires et des marqueurs d'activation de la microglie et des astrocytes. Cette analyse est actuellement en cours de réalisation.

Partie 2

Effets de l'infection par le virus de la grippe sur le tissu adipeux blanc

B. EFFET DE L'INFECTION PAR IAV SUR LE TISSU ADIPEUX DE SOURIS MINCES

I. L'infection de souris par le virus de la grippe modifie la masse et le profil sécrétoire du tissu adipeux blanc ainsi que l'expression des gènes clés du métabolisme lipidique

L'infection de souris minces par le virus de la grippe (virus influenza A, sous-type H_3N_2, 30 PFU, voie intra-nasale) se traduit par une perte de poids qui atteint son maximum 14 jours post-infection (30%). La phase de récupération est marquée par une reprise progressive du poids corporel de la souris (**Figure 37.A**). A sept jours post-infection, le moment où la réponse inflammatoire pulmonaire atteint son apogée, la différence de perte de poids corporel entre les souris infectées et non-infectées est très significative (**Figure 37.C**). L'évaluation de la masse des tissus adipeux sous-cutané (SCAT ; *Subcutaneous white Adipose Tissue*) et viscéral (EWAT, *Epididymal White Adipose Tissue*) montre une diminution significative sept jours après l'infection (**Figure 37.D**). Une analyse corrélative entre le poids des tissus chez la souris non-infectée (*mock*) et chez la souris infectée (*IAV*) montre que les masses du SCAT et de l'EWAT corrèlent positivement dans les 2 cas ; suggérant que l'infection n'a pas entrainé de modification notable dans la répartition des différents dépôts de tissu adipeux blanc **(Figure 37.B)**.

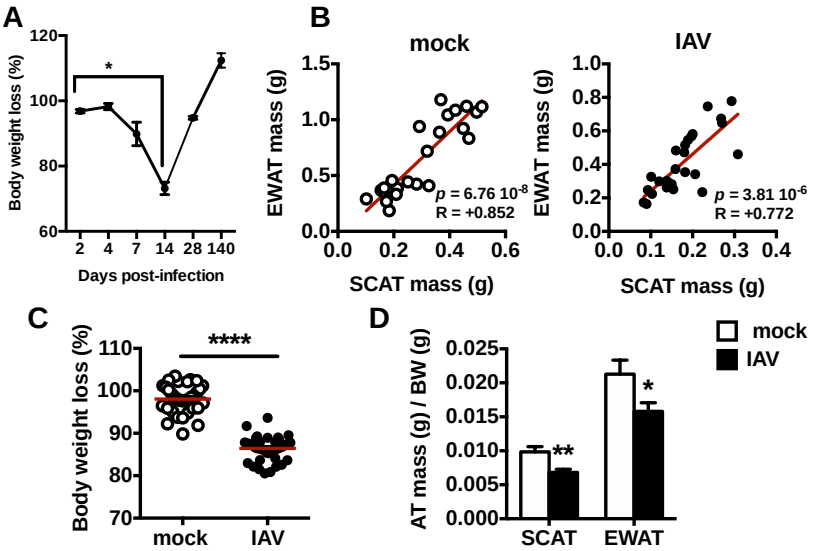

Figure 37. Effet de l'infection par le virus Influenza sur le poids des souris etla masse du tissu adipeux sous-cutané et viscéral.

(**A**) Suivi de la perte de poids de souris infectées par le virus de la grippe de 0 à 140 jours post-infection (p.i.), exprimée en %, n=4-7. (**B**) Analyse de la corrélation entre la masse du SCAT et de l'EWAT de souris non infectées (groupe *mock*) et de souris infectées (groupe IAV) à 7 jours p.i. (**C**) Perte de poids chez les souris infectées à 7 jours p.i. comparées aux

souris *mock*,exprimée en %, n=33 *mock* et n=46 IAV. (**D**) Masses du SCAT et de l'EWAT de souris infectées et non-infectées, exprimées en g de tissu/ g de poids corporel, n=25 *mock* et n=28 *IAV.*

Le dosage des cytokines sécrétées *ex vivo* par le tissu adipeux (surnageants de culture d'explants de tissus) montre une augmentation de la sécrétion d'IL-1β, IL-6 et IL-10 pour les deux types de dépôt (**Figure 38.A**). Cependant, l'effet de l'infection sur la sécrétion de la leptine semble être dépôt-dépendant, avec une augmentation significative dans le SCAT et, à l'inverse, une diminution significative dans l'EWAT. L'évaluation de l'expression relative des gènes intervenants dans le métabolisme des glucides et des lipides, montre une diminution très importante de l'expression des gènes codant des facteurs impliqués dans la lipolyse (*Pspla-1*, *Plin1)*, le transport de glucose (*Glut-4*, *Irs-1*, *Me-2*) et la lipogenèse (*Fasn*, *Srebp1c*) à la fois dans le SCAT et l'EWAT (**Figure 38.B**).

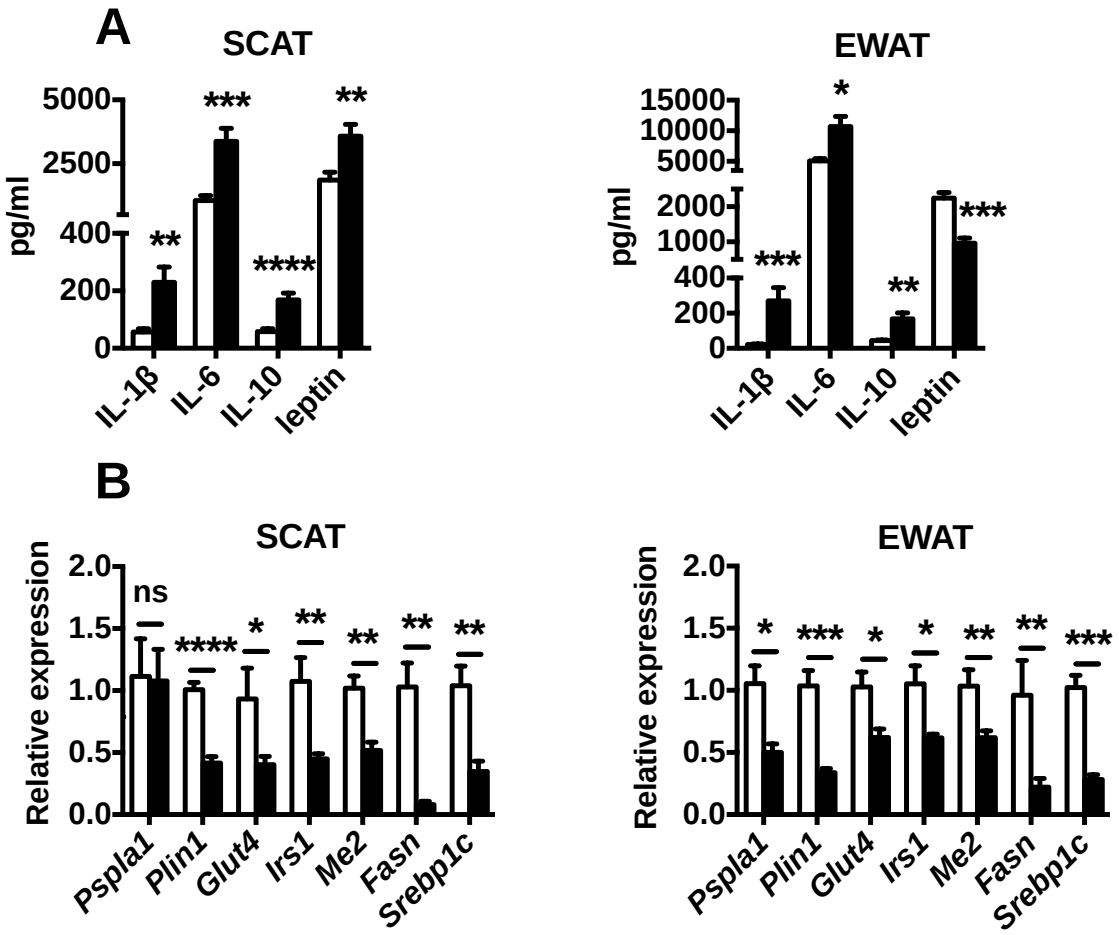

Figure 38. Effet de l'infection par le virus Influenza sur les secrétions de cytokines par le tissu adipeux blanc et l'expression des marqueurs métaboliques majeurs.

(**A**) Evaluation des sécrétions d'IL-1β, IL-6, IL-10 et de la leptine (ELISA) par les deux dépôts de tissu adipeux *ex vivo* n=7 à 14 *mock* et n=13 à 20 *IAV*. Les concentrations des cytokines sont normalisées par rapport au poids des explants du tissu adipeux. (**B**) Analyse par PCR-quantitative en temps réel (RT-qPCR) de l'expression des marqueurs métaboliques majeurs du fonctionnement du tissu adipeux (gènes impliqués dans la lipolyse (*Pspla1*, *Plin1)*, le transport du glucose (*Glut4*, *Irs1*, *Me2*) et la lipogenèse (*Fasn*, *Srebp1c*) n=5 mock et n=8 à 18 IAV. *Ps-pla1* ;Phosphatidylserine-specific phospholipase A1, *Plin1*; Perilipin 1, *Glut4*; Glucose transporter 4, *Irs1*; Insulin receptor 1, *Me2*; Malic enzyme 2, *Fasn*; Fatty acid synthase and *Srebp1c*; Sterol regulatory element-binding protein 1c.

II. L'infection de souris par le virus de la grippe induit le brunissement ou « *browning* » du tissu adipeux sous-cutané

Afin d'estimer l'impact éventuel de l'infection par le virus de la grippe sur l'histo-morphologie du tissu adipeux, des coupes histologiques ont été réalisées et la taille des adipocytes mesurée (à 7 jours p.i.). Les résultats montrent une tendance (non statistiquement significative) à la diminution de la taille des adipocytes dans les deux types de dépôt de tissus adipeux blanc des souris infectées, comparées aux souris non infectées **(Figure 39. A et B)**. En effet, les mesures effectuées montrent une tendance à l'augmentation du nombre d'adipocytes de petite taille associée à une diminution des adipocytes de grande taille dans les tissus adipeux des souris infectées. Ces résultats montrent que l'infection par le virus de la grippe affecte la taille des adipocytes de la même manière dans les deux types de dépôt de tissu adipeux.

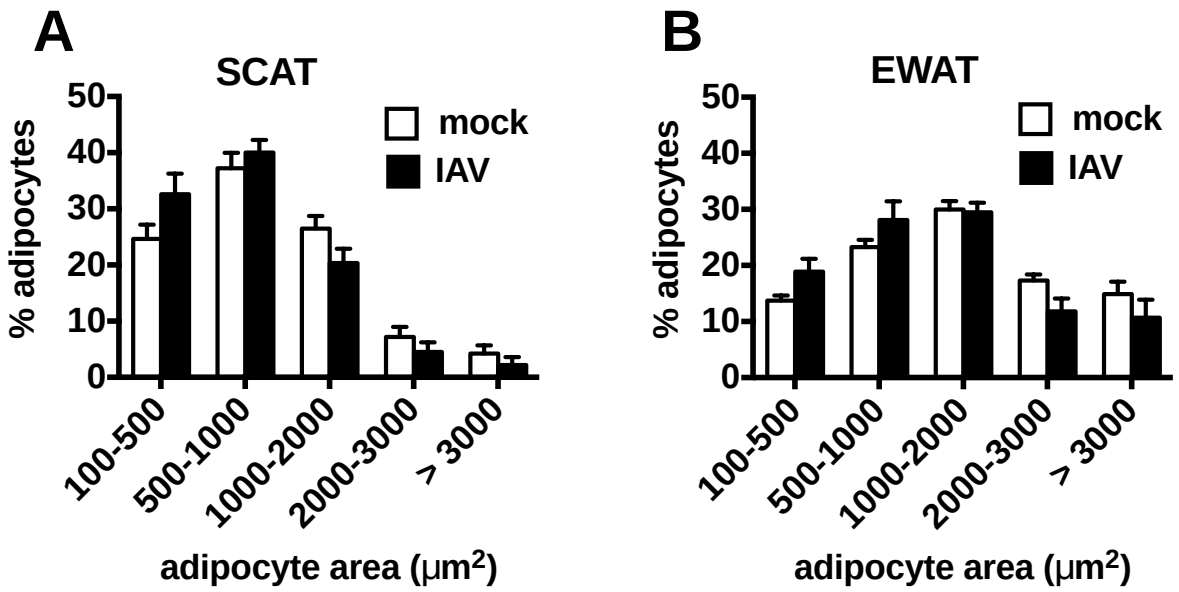

Figure 39. Analyse histomorphométrique du SCAT et de l'EWAT de souris non infectées ou infectées par le virus de la grippe.

Taille (aire en mm^2) des adipocytes présents dans (**A**) le SCAT et (**B**) l'EWAT de souris non infectées ou infectées par le virus de la grippe. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules dans chaque catégorie de taille allant de 100 μm^2 à >3000 μm^2, n=6 *mock* et n=6 *IAV*.

Alors que l'observation des coupes histologiques de l'EWAT ne montre pas d'effet notable de l'infection, l'analyse des coupes de tissu adipeux sous-cutané (SCAT) des souris infectées montre la présence d'îlots d'adipocytes bruns (également appelés adipocytes beiges) **(Figure 40.A)**. Comme le montre un agrandissement de l'une de ces zones, ces adipocytes bruns sont caractérisés par un aspect

plus dense et la présence de gouttelettes lipidiques multiloculaires (différente de l'aspect clair des adipocytes blancs uniloculaires) **(Bargut *et al.*, 2017).**

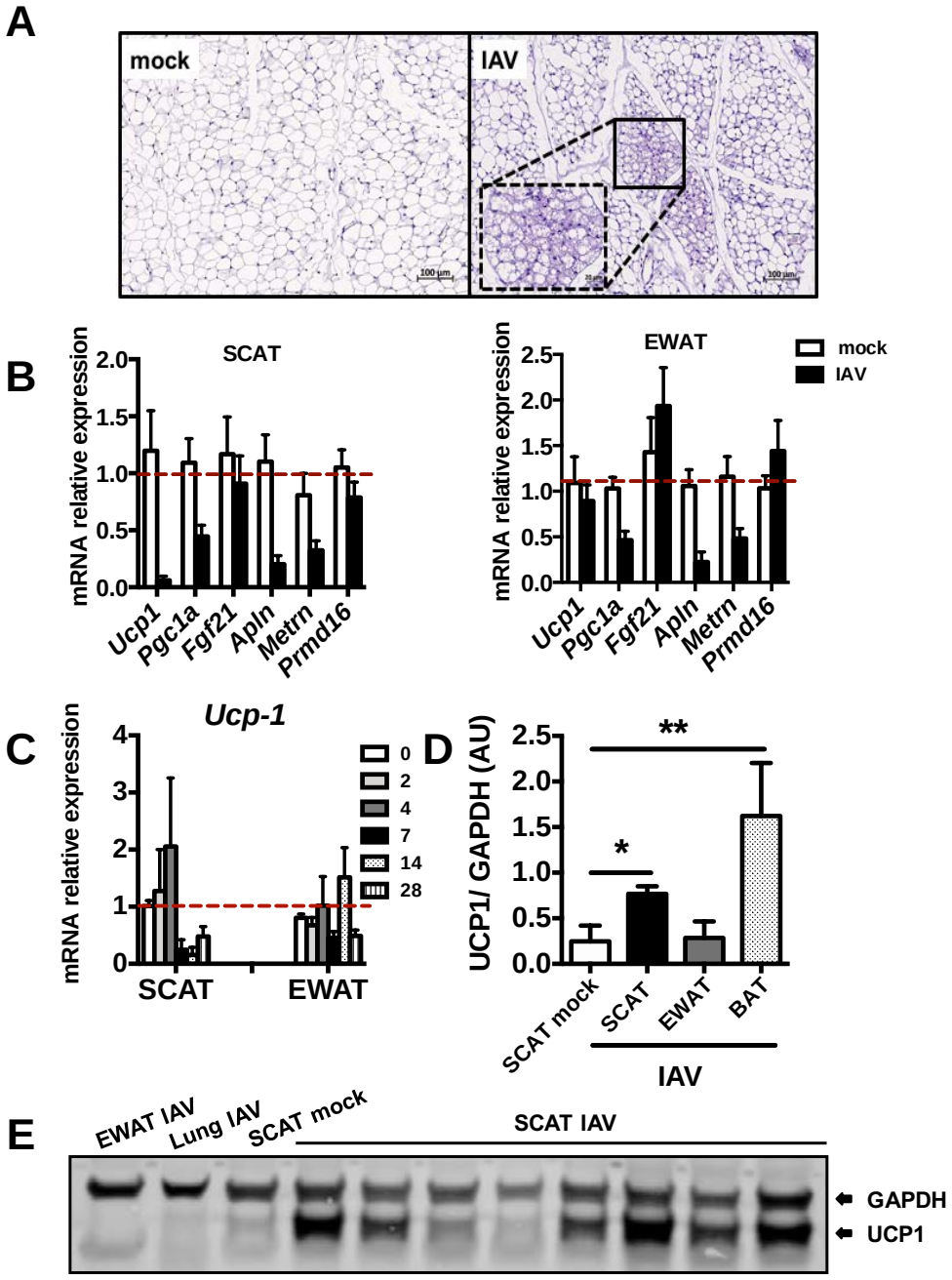

Figure 40. Mise en évidence du brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané des souris infectées.

(**A**) Coupes histologiques du SCAT de souris non infectées (*mock)* et de souris infectées (*IAV*) à 7 jours p.i. n=6 *mock* et n=6 *IAV*, échelle = 100 µm. (**B**) Analyse de l'expression des gènes codant différents marqueurs du browning (*Ucp1*, *PGC1a*, *Fgf21*, *Apln*, *Metrnl*, *Prdm16*) dans le SCAT et l'EWAT, comparant l'expression entre souris *mock* et *IAV* n=5 *mock*, n=7 à 18 *IAV*. (**C**) Quantification de la cinétique d'expression du gène *Ucp-1* dans le SCAT et l'EWAT à J0, J2, J4, J7, J14 et J28 par RT-qPCR. *Ucp1; uncoupling protein-1*, *Pgc1a*; peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha, *Fgf21*; fibroblast growth factor 21, *Apln*; Apelin, *Metrnl*; meteorin-like et *Prdm16*; PR domain containing 16, n=4 par condition. (**D**) Evaluation de l'expression d'UCP-1 sur l'ensemble des 4 blots effectués (expression rapportée à celle de la GAPDH). (**E**) Blot représentatif montrant l'augmentation de l'expression de la protéine découplante UCP-1 spécifiquement dans le SCAT de souris infectées par *western blot* ; n=5 SCAT *mock*, n=35 SCAT *IAV*, n=5 EWAT *IAV* et n=5 poumons *IAV* (contrôles négatifs), n=5 BAT *IAV* (contrôle positif).

Le développement d'adipocytes bruns ou beiges au sein du tissu adipeux blanc, correspond au phénomène de « *beiging* » ou « *browning* » **(Zuriaga *et al.*, 2017)**. Le beiging est associé à l'augmentation de l'expression de la protéine découplante UCP-1 (*Uncoupling Protein-1*) ; qui permet la dissipation de l'énergie au niveau de la mitochondrie sous forme de chaleur **(Shabalina *et al.*, 2013)**. L'expression de gènes tels que *Cidea*, *Tbx-1* et *Prdm16* a également été associée au beiging du tissu adipeux blanc **(Zuriaga *et al.*, 2017)**. L'analyse de l'expression des gènes *Ucp1*, *Pgc1a*, *Fgf21*, *Apln*, *Metrnl*, *Prdm16* par RT-qPCR à 7 jours p.i. n'a pas donné de résultats concluants **(Figure 40.B)**. Nous avons alors supposé que l'expression des gènes associés au beiging était modulée bien avant le 7ième jour suivant l'infection. Nous avons donc réalisé une analyse de l'expression du gène codant pour *Ucp-1* à J2, 4, 7, et 14 post-infection. En effet, les résultats montrent une augmentation de l'expression de ce gène à J4 suivie d'une diminution à J7, J14 et J28 **(Figure 40.C)**. Ainsi, pour conforter l'observation histologique du beiging dans le SCAT 7 jours post-infection, nous avons réalisé un western blot sur des extraits protéiques de tissus. Les blots analysés montrent la présence de bandes (d'intensité variable) au niveau correspondant à la protéine UCP-1 (25kDa) uniquement dans le SCAT des souris infectées (pas de bandes détectées au niveau des puits correspondant aux extraits protéiques de l'EWAT et du poumon (contrôle négatif) de souris infectées et du SCAT des souris non infectées) (**Figure 40.E**).

Rapporté à l'expression de la protéine GAPDH, l'expression d'UCP-1 est significativement plus forte dans le SCAT des souris infectées comparée aux souris contrôles. Cette expression demeure cependant beaucoup moins forte que dans le tissu adipeux brun (BAT ; *Brown Adipose Tissue*) ; tissu caractérisé par l'expression de la protéine UCP-1 et ainsi utilisé comme contrôle positif (**Figure 40.D**). L'analyse des coupes histologiques des tissus adipeux blanc à 20 semaines de l'infection ne montre pas d'îlots de browning dans le SCAT (non représenté), ce qui laisse supposer qu'il s'agit d'un phénomène éphémère qui disparaitra une fois l'infection et l'inflammation qui lui sont associée sont résolues.

III. L'infection de souris par le virus de la grippe modifie sélectivement la nature des cellules immunes présentes dans le tissu adipeux sous-cutané

La caractérisation des cellules immunes innées (macrophages, neutrophiles, éosinophiles) dans les deux types de tissus adipeux permet de montrer des effets dépôt-spécifiques induits par l'infection. La stratégie de *gating* (*i.e.* le choix des populations cellulaires analysées) adoptée est représentée sur la **Figure 41.A**. Alors que le pourcentage des macrophages, neutrophiles et éosinophiles demeure

inchangé dans l'EWAT, nous notons dans le SCAT une tendance importante à l'augmentation des éosinophiles et des macrophages (**Figure 41.B**). Ces résultats confortent le développement du beiging dans ce dépôt puisqu'il est connu que ce phénomène est associé à la mise en place d'un environnement anti-inflammatoire par le biais du recrutement d'éosinophiles et de macrophages. En effet, nous observons une augmentation du pourcentage de ces 2 types cellulaires dans le SCAT des souris infectées, comparativement aux animaux contrôles (éosinophiles ; de 5% (*mock*) à ≈ 20% (*IAV*) et macrophages ; de 5% (*mock*) à ≈ 20% (*IAV*), majoritairement de type M2, puisque ≈ 90% expriment le marqueur CD206, résultat non représenté dans la stratégie de *gating*).

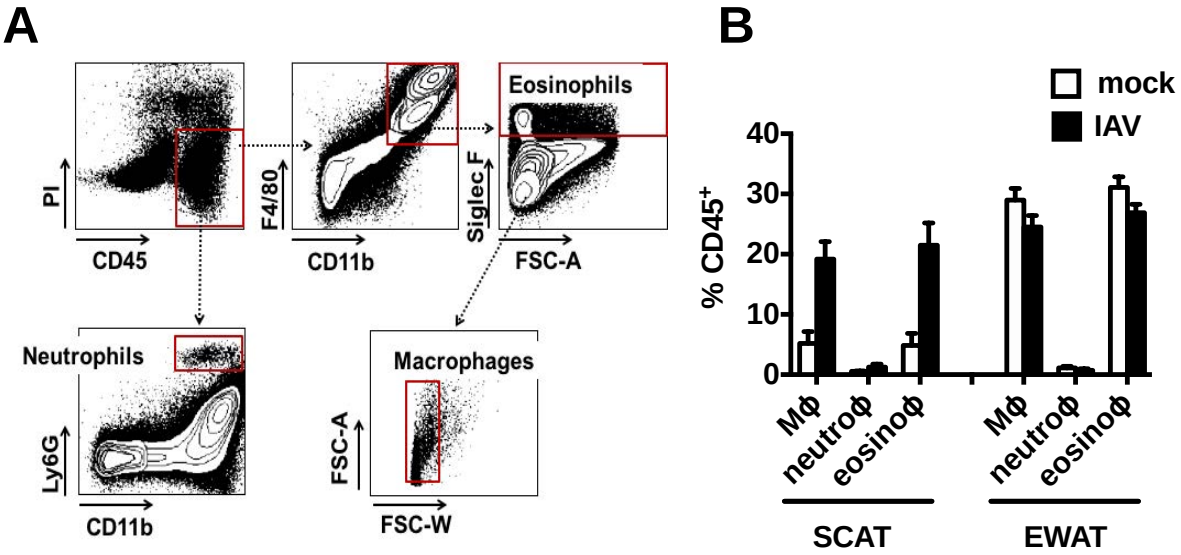

Figure 41. Détermination du pourcentage de cellules immunes innées (macrophages, neutrophiles et éosinophiles) dans le SCAT et l'EWAT.

(**A**) Stratégie de *gating* adoptée pour la caractérisation des macrophages ($CD45^+$, $F4/80^+$, $CD11b^+$, $SiglecF^-$), neutrophiles ($CD45^+$, $CD11b^+$, $Ly6G^+$) et éosinophiles ($CD45^+$, $CD11b^+$, Siglec F^+) dans le SCAT et l'EWAT. (**B**) Pourcentages de macrophages, neutrophiles et éosinophiles (représentés en % de $CD45^+$ (leucocytes totaux)) dans les dépôts sous-cutanés (SCAT) et viscéraux (EWAT).

IV. Impact de l'infection par le virus de la grippe sur le métabolisme glucidique de la souris

Le développement d'adipocytes beiges dans le tissu adipeux blanc est associé à une diminution des taux de glucose et une amélioration du métabolisme général **(Rao *et al.*, 2014)**. Ainsi, nous avons évalué les taux de glucose, d'insuline et de résistine dans le sang de souris infectées ou non-infectées par le virus de la grippe à un temps précoce (7 jours p.i., moment auquel est observé le beiging du tissu adipeux sous-cutané) et à distance de l'infection (20 semaines p.i.). La quantification de ces différents paramètres montre que l'infection par le virus de la grippe conduit à une diminution des taux de glucose et de résistine, associée à une augmentation du taux d'insuline dans le sang, 7 jours

après infection **(Figure 42.A)**, correspondant à une amélioration du métabolisme glucidique. De manière intéressante, ces mêmes effets sont retrouvés à des niveaux significatifs à 20 semaines post-infection **(Figure 42.B)**.

D'après la littérature **(Stanford *et al*., 2015)**, le phénomène de browning du tissu adipeux est décrit comme pouvant protéger du développement de l'obésité et des altérations métaboliques associées. Nous avons donc comparé le développement de l'obésité entre les souris infectées et non infectées. Ainsi, les souris infectées ont été mises sous régime obésogène (HFD ; 60% de gras) à partir de 7 jours p.i. (moment auquel est observé le browning du tissu adipeux sous-cutané) et le poids des souris a été suivi pendant 24 semaines. Les souris contrôles correspondent à des souris non-infectées maintenues sous régime normal (groupe contrôle). Les résultats obtenus montrent que les souris non infectées (*mock*) ou infectées (*IAV*) répondent de la même manière au régime obésogène, à savoir : prise de poids corporel et développement d'un état d'intolérance au glucose (mis en évidence grâce à la réalisation d'un test de tolérance au glucose) **(Figure 42.C-D)**. Cependant, la courbe d'évolution du poids des souris infectées (*IAV*) reste en dessous de la courbe de poids des souris non-infectées tout au long de la cinétique (*mock*) **(Figure 42.C)**. Ceci suggère que les souris préalablement infectées par le virus de la grippe développent une certaine résistance au régime obésogène et donc une amélioration métabolique, certes non significative, mais durable jusqu'à 24 semaines p.i.

De manière intéressante, les concentrations de glucose, d'insuline et de résistine mesurées à 24 semaines après le changement de régime montrent :(1) des taux significativement élevés chez les souris HFD (*mock* et *IAV*) comparées aux souris maintenues au régime initial (l'obésité étant associée au développement d'un état hyperglycémique et insulino-résistant) et (2) un effet de l'infection marqué par une diminution des taux de glucose et de la résistine et une tendance à l'augmentation de l'insuline (non-significative) **(Figure 42.E)**, tendances similaires à celles observées 7 jours et 20 semaines après infection (**Figures 42.A** et **B**).

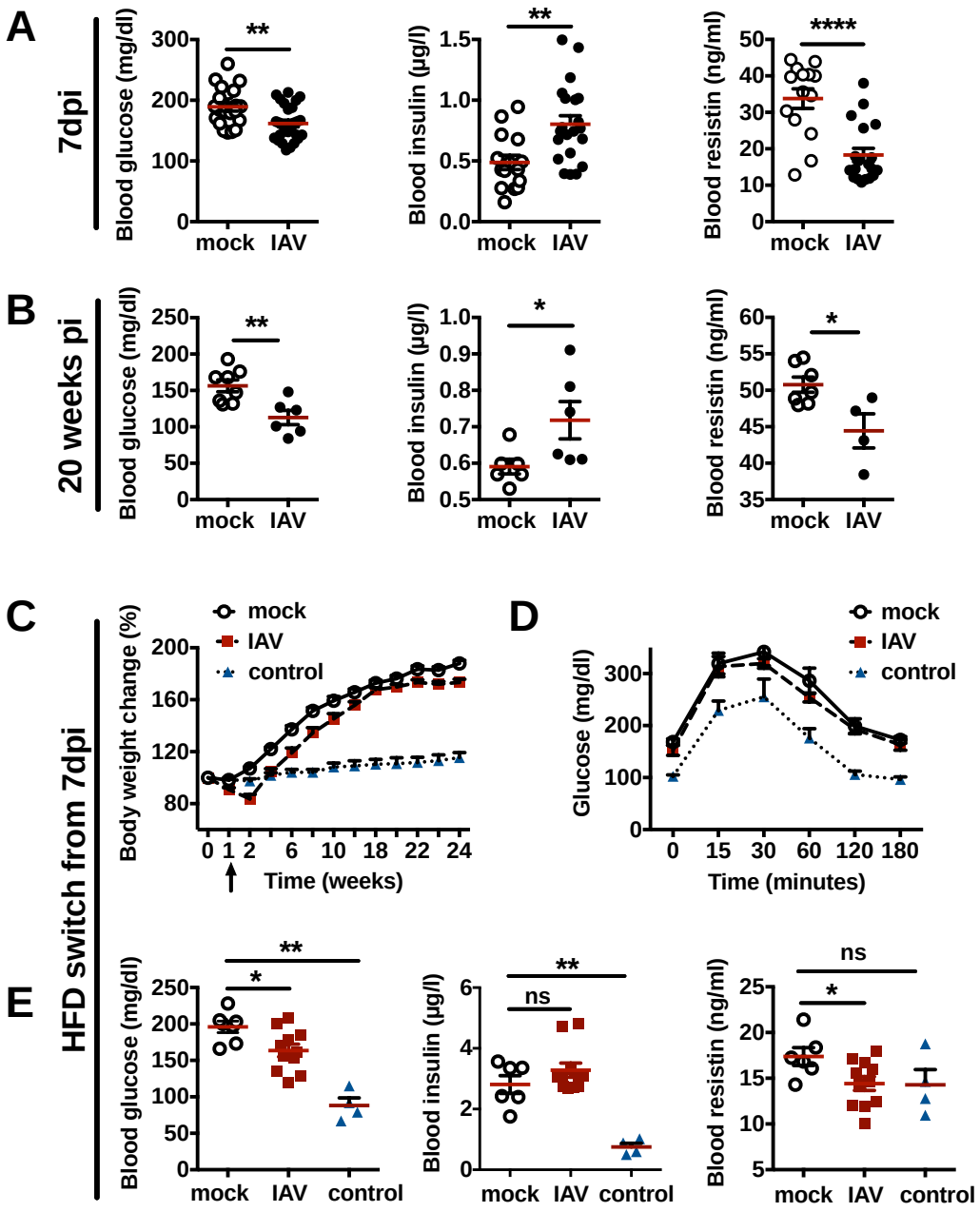

Figure 42. Conséquences métaboliques de l'infection par le virus de la grippe.

Conséquences de l'infection par le virus de la grippe sur les taux sériques de glucose, d'insuline et de résistine à (**A**) 7 jours post-infection (n=15 à 20 *mock* et n=15 à 30 *IAV*) et (**B**) 20 semaines post-infection (n=8 *mock* and n=6 *IAV*) (souris mises à jeun pendant 10 à 12h). (**C**) Evolution du poids des souris infectées (exprimée en % du poids initial) après un changement vers le régime HFD (*high-fat diet*) à partir de 7 jours post-infection.Des souris non infectées maintenues au régime initial sont utilisées comme contrôle n=5, n=10 *mock* et n=15 *IAV*. (**D**) Test de tolérance au glucose IP-GTT (*Intraperitoneal glucose tolerance test*) à 20 semaines post-infection sur des souris dont le régime a été changé contre un régime riche en gras (HFD) à 24 semaines p.i. La mesure de la glycémie a été effectuée avant l'administration du glucose et à 15, 30, 60, 120 and 180 minutes après, n=9 *mock*, n=12 *IAV* and n=5 contrôles non infectés et maintenus sous le régime initial. (E) Comparaison entre le taux de glucose, d'insuline et de résistine entre des souris non infectées et ayant subi un changement de régime (n=6 à 7 mock), des souris infectées et ayant subi un changement de régime à partir de 7 jours post-infection (n=11 à 12) et des souris non infectées et n'ayant pas subi de changement de régime (n=3 to 4) à 24 semaines p.i. Les résultats sont exprimés en moyenne±SEM. La limite de significativité est fixée à $p<0.05$.

A ce stade de nos recherches, il apparait que l'infection par le virus de la grippe induit des changements importants au niveau du tissu adipeux blanc : diminution de la masse, modification du profil sécrétoire et de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. De manière très surprenante, les effets de l'infection sur le tissu adipeux blanc sont de plus différents selon la localisation du tissu ; le développement d'adipocytes beiges au sein du tissu adipeux blanc sous-cutané étant l'observation la plus intéressante.

Nous nous sommes donc posé la question de savoir si le virus pouvait être détecté dans le tissu adipeux blanc.

V. Le virus de la grippe est détectable dans le tissu adipeux de souris infectées

Pour comprendre si ces modulations dans le tissu adipeux sont dues à un effet direct ou indirect du virus, nous avons quantifié l'expression du génome viral (quantification de l'expression du gène codant la protéine virale M1) dans le SCAT, l'EWAT et les poumons (contrôle positif). Les résultats sur la **Figure 43.A** montrent que le génome viral est détectable dans le SCAT et l'EWAT des souris infectées.

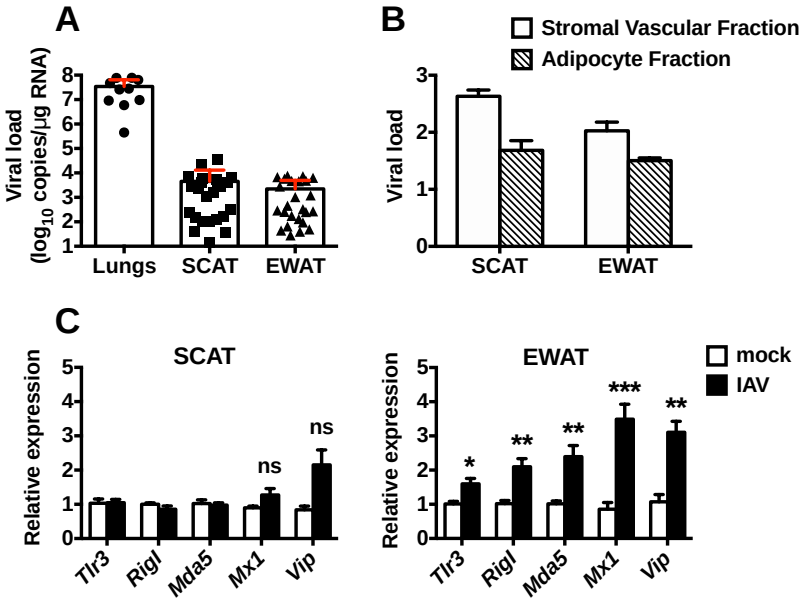

Figure 43. Détection du génome viral et induction des senseurs viraux dans le tissu adipeux blanc.

Quantification de l'expression du génome viral (exprimée en $\log_{10}$ du nombre de copie de la séquence virale M1/µg ARN) dans (**A**) les poumons des souris infectées (n=10), le SCAT n=25, l'EWAT n=25, ainsi que dans (**B**) les fractions adipocytaire et stromavasculaire du SCAT et de l'EWAT, n=3. (**C**) Quantification de l'expression relative des senseurs viraux (*Tlr3*, *Rig1*, *Mda5*, *Mx1* et *Vip*) par rapport au gène de ménage *EeF2* et par rapport au contrôle non infecté à 7

jours p.i. dans le SCAT et l'EWAT. *Tlr3*; Toll-like receptor 3, *Rig1*; Retinoic acid-inducible gene 1, *Mda5*; Melanoma differentiation-associated gene 5, *Mx1*; Myxovirus resistance protein 1 et *Vip*; Viperin.

Nous constatons que l'expression du génome viral est beaucoup moins importante dans les tissus adipeux blancs (SCAT et EWAT) (≈3-4 log_{10} copies/µg d'ARN) que dans les poumons (≈7-8 log_{10}copies/µg d'ARN), organe cible du virus utilisé comme contrôle positif. Le tissu adipeux blanc est composé essentiellement d'adipocytes (ou fraction adipocytaire) et d'une fraction stroma-vasculaire qui comprend plusieurs types de cellules dont les préadipocytes et les cellules immunes. Le génome viral ayant été détecté dans les extraits tissulaires totaux, nous avons recherché s'il était présent dans la fraction stroma-vasculaire, la fraction adipocytaire, ou les deux. Pour ce faire, nous avons procédé à une séparation des fractions adipocytaire et stroma-vasculaire des tissus et à une évaluation de l'expression de la séquence M1 dans chacune de ces deux fractions cellulaires. L'expression du génome viral a ainsi été détectée dans les deux fractions (fraction adipocytaire ≈1,5 log_{10} copies/µg d'ARN, fraction stroma-vasculaire ≈2 log_{10} copies/µg d'ARN) du SCAT et de l'EWAT (**Figure 43.B)**. Confortant la présence du virus dans le tissu adipeux blanc, nous montrons que l'expression des gènes codant les senseurs d'ARN viraux cytoplasmiques : *Tlr3*, *RigI* et *Mda5* et des ISGs (*interferon stimulated genes*) *Mx1* et *Vip* est augmentée dans l'EWAT (**Figure 43.C**). De manière surprenante, alors que du génome viral était détectable dans le SCAT, l'expression des gènes codant les senseurs viraux n'est pas induite, montrant une nouvelle fois la nature dépôt-spécifique de l'infection par IAV sur les tissus adipeux blancs. Faire le lien entre l'induction de browning dans le SCAT et cette absence d'induction de reconnaissance du virus fait partie des questions qui seront abordées dans la suite du projet.

VI. Les préadipocytes et les adipocytes murins sont permissifs à l'infection par le virus de la grippe *in vitro*

Afin de chercher à préciser les mécanismes par lesquels le virus de la grippe impacte sur le tissu adipeux blanc, et puisque nos données *ex vivo* montraient que le génome viral était détectable dans les deux fractions cellulaires de ce tissu, dont la fraction adipocytaire, nous avons mis en place un modèle *in vitro* d'infection d'adipocytes et de préadipocytes (lignée préadipocytaire murine 3T3-L1). Les préadipocytes et les adipocytes matures (obtenus par différenciation de préadipocytes grâce à l'ajout d'un mélange de facteurs pro-adipogéniques) ont été infectés par le virus de la grippe à différentes doses (0.5, 1 et 2 MOI), et les surnageants et les cellules ont été récupérés à 1h, 24h et 48h p.i. La quantification du génome viral dans les deux types cellulaires a montré une augmentation de l'expression du génome viral 24h p.i (≈7-8 log_{10} copies/µg d'ARN) **(Figure 44.A)**. L'observation des

cellules infectées par microscopie électronique montre les signes classiques (nucléaires et nucléolaires) d'infection par le virus influenza dans les deux types cellulaires, notamment : un remodelage de l'ultrastructure nucléaire et nucléolaire, une accumulation de structures tubulaires associées à M1 dans le noyau comme observés dans les cellules épithéliales pulmonaires infectées **(Terrier *et al.*, 2014)**, une complète ségrégation nucléolaire habituellement associée à l'infection, ainsi qu'un remodelage de la structure du réticulum endoplasmique (RE), généralement associé à la mise en place d'un état de stress lié au réticulum. Cependant, la distribution du RE en réseau dans le compartiment cytoplasmique de la cellule infectée est différente entre les deux types cellulaires. En effet, dans les préadipocytes infectés, on note une accumulation membranaire compacte organisée en couches superposée, structure non observée dans l'adipocyte mature **(Figure 44.B)**. La quantification de l'expression des senseurs viraux montre une augmentation significative de l'expression de *Tlr3*, *Rig1*, *Mda5*, *Mx1* et *Vip* dans les deux types cellulaires, avec une induction plus forte dans les adipocytes comparée aux préadipocytes **(Figure 44.C)**.

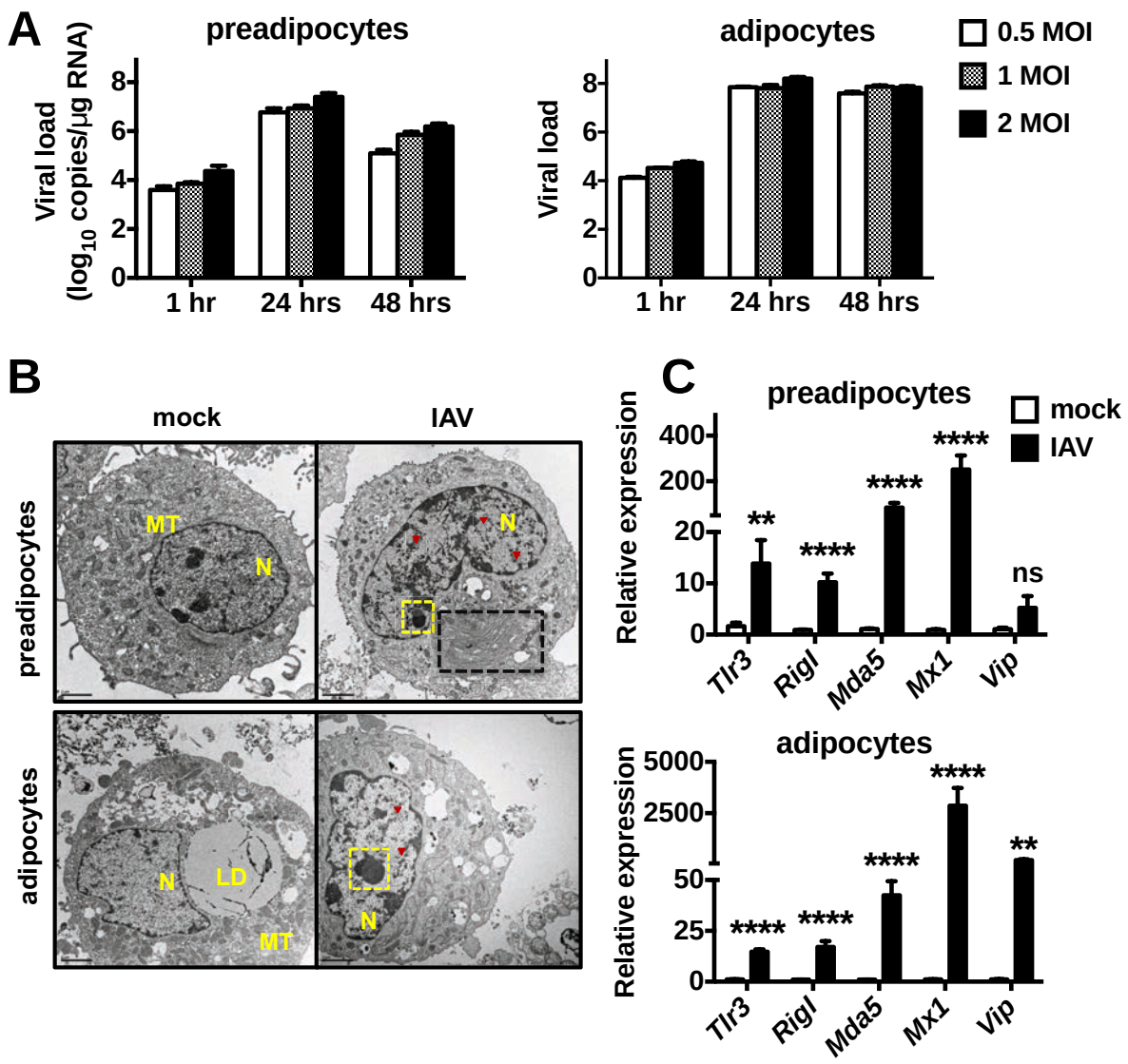

Figure 44. Mise en évidence de la permissivité des préadipocytes et des adipocytes à l'infection par virus influenza, *in vitro*.

(**A**) Evaluation de la charge virale à 1h, 24h et 48h p.i. et à 0.5, 1 et 2 MOI (*multiplicity of infection*) dans les préadipocytes et les adipocytes, résultats exprimés en $\log_{10}$ du nombre de copies de la séquence virale M1/µg ARN, n=3 à 6. (**B**) Observation en microscopie électronique de préadipocytes et d'adipocytes infectés ou non-infectés à 5 MOI et 24h p.i., le profil classiquement associé à l'infection grippale au niveau nucléaire (flèches rouges) et nucléolaire (cadres jaunes) est mis en évidence, les membranes du réticulum endoplasmique sont encadrées en noir (échelle 2 µm), N, noyau; MT, mitochondrie; LD, gouttelette lipidique. (**C**) Quantification de l'expression relative des senseurs viraux (*Tlr3*, *Rig1*, *Mda5*, *Mx1* et *Vip*) par rapport au gène de ménage *EeF2* et par rapport au contrôle non infecté à 24h p.i. et à 1 MOI dans les préadipocytes et les adipocytes, n=5 à 7 *mock* et n=5 à 18 *IAV*.

L'infection par le virus de la grippe est caractérisée par l'induction d'un effet cytopathique sur les cellules MDCK, cellules permissives au virus de la grippe, qui se caractérise par une mort cellulaire. Nous avons évalué la mortalité des préadipocytes et des adipocytes infectés, en comparaison avec les cellules MDCK. Les résultats obtenus montrent une mortalité induite dans les préadipocytes et les adipocytes très faible comparée à celle observée pour les MDCK **(Figure 45.A)**. Le marquage

immunofluorescent des protéines virales NS1 (*non structural protein*), NP (*nucleoprotein*, protéine structurale) et HA (*hemagglutinin*, protéine structurale) observé par microscopie confocale, montre l'expression de ces protéines dans les préadipocytes et les adipocytes infectés **(Figure 45.B)**. Il est à noter que les marquages, NS1 et NP, sont identiques entre les deux types cellulaires, cependant la localisation strictement cytoplasmique du marquage HA dans les préadipocytes et membranaire dans les adipocytes est à remarquer.

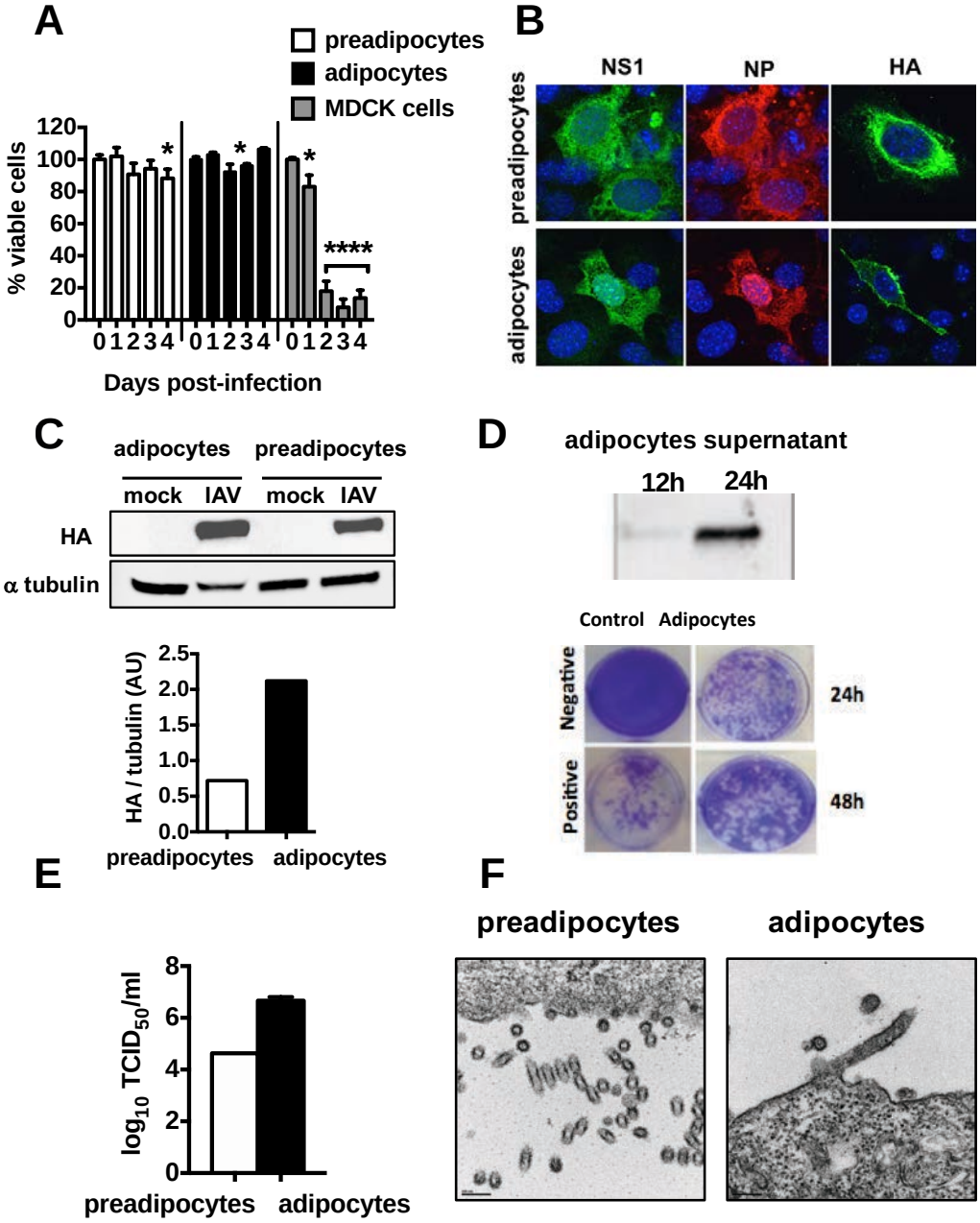

Figure 45. Comparaison de la mortalité, de l'expression des protéines virales et de la libération de nouveaux virions entre les préadipocytes et les adipocytes.

(**A**) Viabilité des préadipocytes, des adipocytes et des MDCK (contrôle positif de cellules permissives au virus) à 0, 1, 2, 3 et 4 jours p.i. par le virus influenza. (**B**) Localisation subcellulaire des protéines virales NS1 (*non-structural protein 1*), NP (*nucleoprotein*) et HA (*hemagglutinin*) sur préadipocytes et adipocytes murins *in vitro* à 48h p.i. (**C**) Analyse par western blot de l'expression de la protéine HA dans le lysat cellulaire de préadipocytes et d'adipocytes infectés par le

virus de la grippe à 48h p.i. Le graphe à droite correspond à l'expression de HA rapportée par rapport à celle du gène de ménage tubuline alpha. (**D**) Quantification des particules et des protéines virales relarguées à partir d'adipocytes infectés par Western blot et PFU (*plaque forming units*). (**E**) Quantification des particules virales relarguées à partir d'adipocytes et de préadipocytes infectés à 48h p.i. par $TCID_{50}$ (*50% Tissue culture Infective Dose*). (**F**) Visualisation des particules virales libérées à la surface des préadipocytes et des adipocytes par microscopie électronique.

L'analyse par *western blot* de l'expression de la protéine HA par les adipocytes et les préadipocytes, confirme les résultats de la microscopie confocale par la détection d'une bande positive pour HA dans les deux lysats cellulaires des préadipocytes et des adipocytes matures infectées, avec un rapport HA/tubuline alpha supérieur pour les adipocytes **(Figure 45.C)**. La quantification des particules infectieuses par la technique de PFU sur tapis de cellules MDCK permet de mettre en évidence la présence de particules virales nouvellement synthétisées dans le surnageant de culture des adipocytes matures. Pour conforter le fait que ces particules sont nouvellement synthétisées, un western blot réalisé à 12h et à 24h de l'infection sur la protéine HA, permet de montrer que : à 12h p.i. il y a nettement moins de protéines virales dans le surnageant du culture des adipocytes, ce qui confirme la production nouvelle des virions, et que les virions détectés dans le surnageant de culture ne sont pas des contaminants résiduels de l'infection (une quantification PFU réalisée sur le surnageant de culture après lavage des cellules ne montre aucune plage de lyse). La quantification des particules virales par $TCID_{50}$ révèle un nombre de particules nettement plus important dans le surnageant de culture des adipocytes comparées au préadipocytes **(Figure 45.D)**. Cependant, la nouvelle synthèse de virions ne semble pas être aussi efficace dans le préadipocyte que dans l'adipocyte, puisqu'aucune plage de lyse n'a été détectée par la technique de PFU à partir du surnageant de culture des préadipocytes, et un nombre faible de virions est détecté par la technique de $TCID_{50}$ **(Figure 45.E)**. La microscopie électronique réalisée sur les deux types cellulaires, révèle des différences concernant la libération de particules virales par les préadipocytes et les adipocytes et confirment les données de quantification des particules infectieuses par la technique de PFU ou de TCID50. En effet, alors que la majorité des particules virales libérées par l'adipocyte mature paraissent complètes, il y a un nombre très important de particules formées à la surface du préadipocyte, mais qui semblent vides **(Figure 45.F)**.

VII. Impact de l'infection par le virus de la grippe sur le métabolisme des préadipocytes et des adipocytes

La respiration cellulaire peut être divisée en différentes composantes : la respiration basale, la fuite des protons H^+, la respiration maximale et la respiration résiduelle. Chacune de ces composantes peut être mesurée suite à l'ajout de différents substrats cellulaires **(Figure 46.A)**.

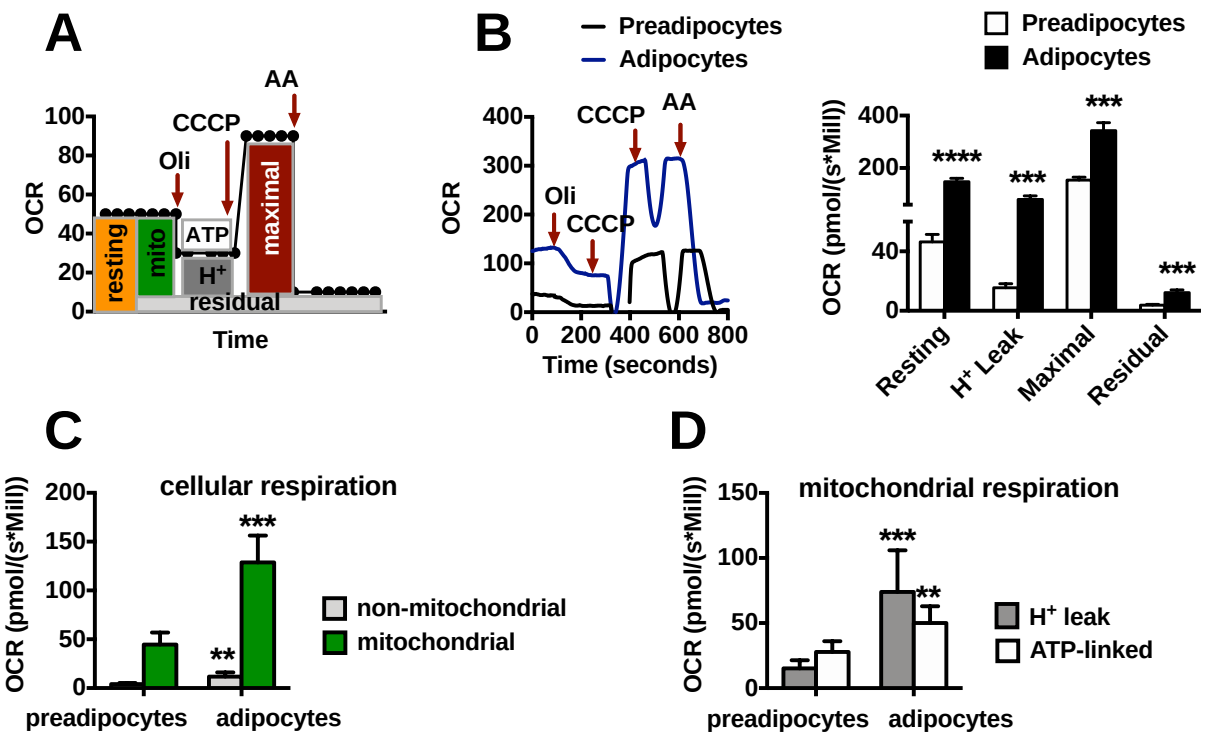

Figure 46. Comparaison de la respiration cellulaire et mitochondriale des préadipocytes des adipocytes non infectés.

(**A**) Schéma représentatif des différentes composantes respiratoires obtenues suite à l'ajout de substrats tels que l'oligomycine (Oli), le carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (cc) et l'antimycine A (AA). Ainsi, il est possible d'identifier un niveau d'OCR (O2 consumption rate) correspondant à la respiration basale, mitochondriale, maximale et résiduelle. (**B**) ***gauche***, Comparaison entre la respiration cellulaire des préadipocytes et des adipocytes non infectés, ***droite***, graphe comparant la respiration cellulaire basale, reliée à la fuite de proton, maximale et résiduelle entre préadipocytes et adipocytes non-infectés. (**C**) Comparaison de la respiration mitochondriale et non-mitochondriale entre préadipocytes et adipocytes non-infectés. (**D**) Comparaison de la respiration reliée à la fuite de protons H^+ et à l'ATP entre préadipocytes et adipocytes non-infectés.

Tout d'abord, la comparaison de la respiration cellulaire entre les préadipocytes et les adipocytes non infectés montrent un taux de consommation d'O_2 (OCR, *Oxygen cosumption Rate*) plus élevé dans les adipocytes avec des moyennes de 147,66 *vs* 46,31 (pmol/(s*Mill) pour la respiration basale, 80,13 *vs* 15,53 (pmol/(s*Mill) pour la fuite des protons H^+, 342,86 *vs* 154,10 (pmol/(s*Mill) pour la respiration maximale et 12,22 *vs* 3,57 (pmol/(s*Mill) pour la respiration résiduelle respectivement pour l'adipocyte et le préadipocyte **(Figure 46.B)**. En l'absence d'infection, la comparaison de la respiration mitochondriale, la respiration non-mitochondriale, la respiration associée à l'ATP et la respiration induite par la fuite de protons montre des niveaux plus élevés pour l'adipocyte comparé au préadipocyte **(Figure 46.C-D)**, en accord avec la littérature **(El-Bacha et De-poian, 2013)**.

Dans un contexte infectieux, seule la consommation d'O_2 des adipocytes est diminuée (significativité statistique à 72h p.i). A l'inverse et de manière inattendue, la respiration des préadipocytes infectés demeure inchangée **(Figure 47.A-B)**.

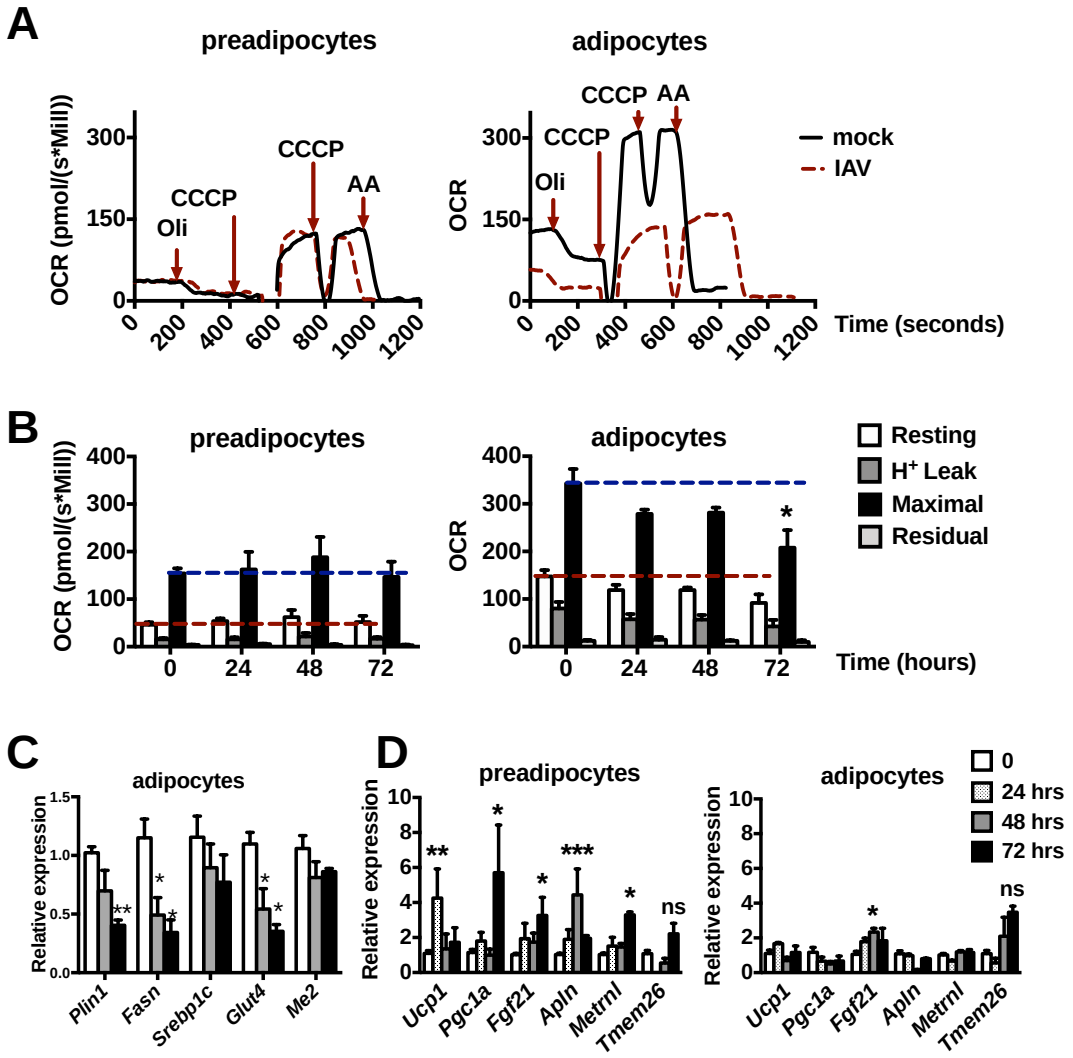

Figure 47. Effets de l'infection par le virus influenza sur la respiration des préadipocytes et des adipocytes

(**A**) Courbes représentatives du taux de consommation d'O_2 (OCR ; *O_2 consumption rate*) par les préadipocytes et les adipocytes (infectées et non infectées) à 72h p.i. avec fragmentation de la respiration par addition d'Oli), de CCCP et d'AA. (**B**) Représentation de la respiration basale, la fuite des protons, la respiration maximale et la respiration résiduelle à 0, 24, 48 et 72 heures p.i. dans les préadipocytes et les adipocytes. (**C**) Quantification de l'expression relative des gènes impliqués dans la lipolyse (*Plin1*), la lipogenèse (*Fasn* et *Srebp1c*) et le transport du glucose (*Glut4* et *Me2*) dans les adipocytes matures infectés à 1 MOI à 0h, 48h et 72h p.i. et (**D**) des gènes impliqués dans le développement du *browning* (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Fgf21*, *Apln*, *Metrnl* et *Tmem26*) à 24, 48 et 72h p.i. (1 MOI) par rapport à EeF2 et au contrôle non infecté dans les préadipocytes et les adipocytes, n=6 à 13 *mock*, n= 2 à 6 *IAV*. *Ucp1; uncoupling protein-1*, *Pgc1a*; peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha, *Fgf21*; fibroblast growth factor 21, *Apln*; Apelin, *Metrnl*; meteorin-like and *Tmem26*; transmembrane protein 26. Résultats exprimés en moyenne ± SEM, n=5-17 *mock*, n=5-17 *IAV*.

Pour mieux identifier les perturbations métaboliques potentiellement induites par l'infection des adipocytes, nous avons quantifié l'expression relative de certains gènes marqueurs de l'activité

métabolique (*Plin1*, *Fasn*, *Srebp1c*, *Glut4* et *Me2*) de l'adipocyte infecté à 1 MOI, à 0h, 48h et 72h p.i. De manière similaire aux résultats obtenus avec le tissu adipeux total, nous observons une diminution significative de l'expression de *Plin1*, *Fasn* et *Glut4* lorsque l'adipocyte est infecté, ce qui permet de conforter l'effet du virus sur la fonction métabolique du tissu adipeux **(Figure 47.C)**.

Enfin, pour tenter d'identifier l'origine du browning observé sur les coupes histologiques du SCAT de souris infectées, nous avons procédé à la quantification relative de l'expression des marqueurs du browning (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Fgf21*, *Apln*, *Metrnl* et *Tmem26*) dans les préadipocytes et les adipocytes non infectés et infectés. Les résultats obtenus montrent une augmentation significative de l'expression de ces marqueurs uniquement dans le préadipocyte **(Figure 47.D)**.

L'analyse transcriptomique comparant l'expression des gènes entre les préadipocytes et les adipocytes, infectés et non-infectés a permis de mettre en évidence des gènes dont l'expression est up-régulés :

- 449 gènes voient leur expression augmentée par l'infection à la fois dans les préadipocytes et les adipocytes. Il s'agit, logiquement, de gènes impliqués dans la réponse au virus, l'activation de la réponse immune innée, la présentation d'antigènes et la régulation de la réponse interféron.
- 117 gènes voient leur expression augmentée par l'infection uniquement dans les adipocytes. Ces gènes se regroupent dans la voie de régulation de la réponse au stress et aux stimuli.
- 532 gènes montrent une augmentation de leur expression par l'infection uniquement dans les préadipocytes. De manière remarquable, ces gènes sont principalement impliqués dans la biogenèse des ribosomes, du métabolisme des ARN ribosomiques dans le noyau, le nucléole et le cytoplasme **(Figure 48.A)**.

Cependant, les gènes dont l'expression est diminuée sont majoritairement (485 gènes) dans le préadipocytes (*vs* 13 gènes dans l'adipocytes matures) dont certains impliqués dans la régulationde la concentration des triacylglycérols **(Figure 48.B)**.

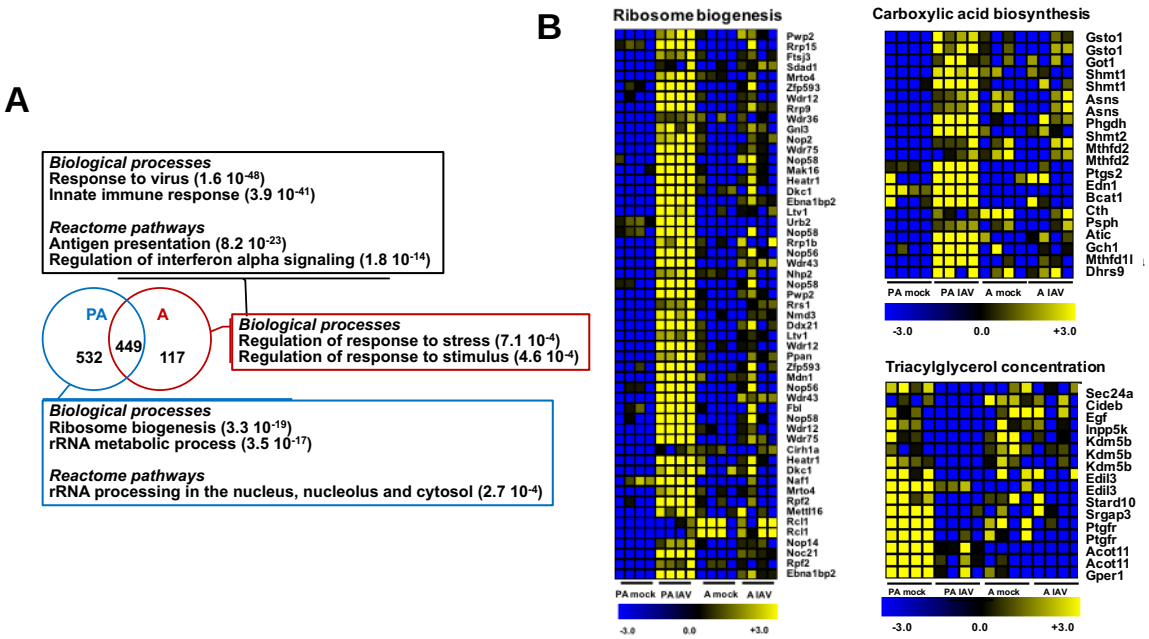

Figure 48. Comparaison des profils d'expression entre préadipocytes et des adipocytes infectés et non-infectés.

(**A**) Diagramme de Venn regroupant les gènes dont l'expression est augmentée lors de l'infection dans les préadipocytes uniquement, les adipocytes uniquement et dans les deux types cellulaires à la fois. Mise en évidence des processus biologiques et des voies métaboliques principales activées dans chacune des conditions (identifiés avec le logiciel *Gene Ontology* (GO)), n=4 cellules *mock* et n=4 cellules *IAV*. (**B**) *Heatmap* regroupant les gènes de la voie de la biogenèse des ribosomes (« up-régulés » dans le préadipocyte), de la biosynthèse des acides carboxyliques (« up-régulés » dans le préadipocyte), et de la biosynthèse des triacylglycérols (« down-régulés » dans le préadipocyte).

La construction des *heatmaps* impliquant la voie de la biogenèse des ribosomes, la biosynthèse des acides carboxyliques et la concentration des triglycérides confirment les modulations sélectives de l'expression des gènes dans le préadipocyte infecté, avec une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes et de la synthèse des acides carboxyliques et une diminution de l'expression des gènes intervenant dans la concentration des triglycérides **(Figure 48.B)**.

VIII. Les préadipocytes et des adipocytes humains sont également permissifs à l'infection par le virus de la grippe *in vitro*

Afin de savoir si nos résultats pourraient être transposables à l'Homme, nous avons mis en place des cultures primaires de préadipocytes humain isolés à partir du tissu adipeux sous-cutané. Nous montrons que le génome viral est détecté dans les préadipocytes et les adipocytes humains infectés, avec néanmoins une expression moins forte dans les préadipocytes comparé aux adipocytes matures **(Figure 49.A)**, comme observé avec les cellules murines. A la différence du modèle murin, l'infection par le virus influenza induit la mortalité des préadipocytes **(Figure 49.B)**. La quantification du nombre de particules virales dans le surnageant de culture des préadipocytes et des

adipocytes permet de montrer, comme pour le modèle murin, un nombre de particules virales beaucoup moins important dans le surnageant des préadipocytes infectés que dans celui des adipocytes infectés **(Figure 49.C)**. De plus, l'expression des senseurs viraux *Rig1* et *Mda5* est augmentée par l'effet de l'infection dans les deux types cellulaires **(Figure 49.D)**. Le marquage immunofluorescent des protéines virales NS1, NP et HA, permet de mettre en évidence l'expression de ces protéines dans les préadipocytes et les adipocytes humains à 24h p.i. avec une répartition comparable entre les deux types cellulaires **(Figure 49.E)**. Afin de voir si le virus de la grippe induit le processus de browning dans les préadipocytes humains, comme observé dans le modèle murin **(Figure 49.D)**, nous avons procédé à la quantification de l'expression des gènes *Ucp1*, *Prdm16*, *Tmem26* et *Tbx15*. Les résultats obtenus, conformément aux résultats des cellules murines, montrent une augmentation significative de l'expression des gènes impliqués dans le processus de browning uniquement dans les préadipocytes **(Figure 49.F)**. Enfin, même si les résultats sont encore préliminaires car concernant un petit nombre d'individus (n=5), le génome viral a été détecté dans des échantillons humains de tissu adipeux sous-cutané et viscéral, laissant suggérer que les effets (tout ou partie) induits par l'infection grippale sur le tissu adipeux blanc pourraient être transposables à l'infection chez l'Homme **(Figure 49.G)**.

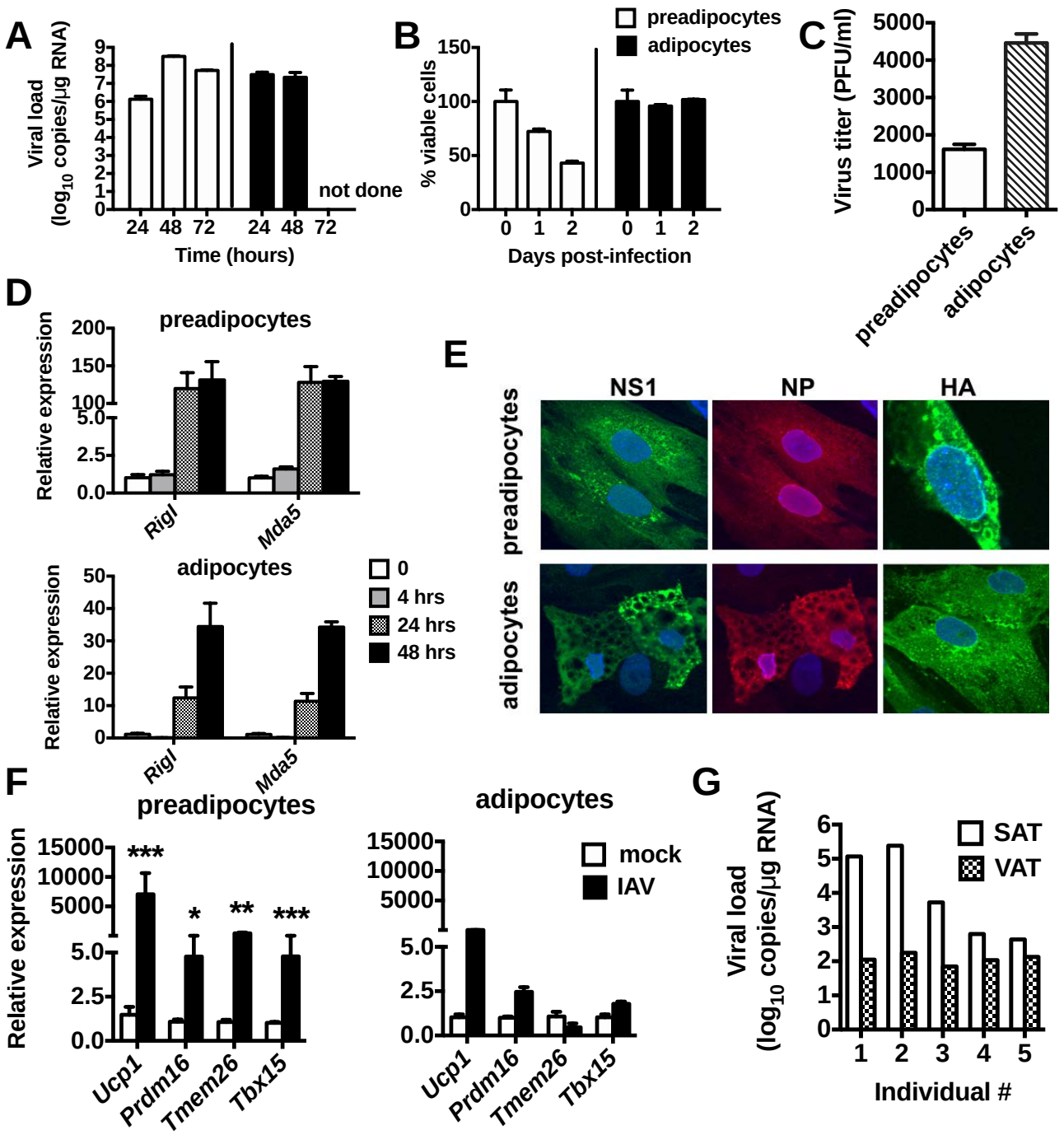

Figure 49. Les adipocytes et les préadipocytes humains sont permissifs à l'infection par le virus de la grippe.

(**A**) Quantification de l'expression du génome viral dans les lysats cellulaires des préadipocytes et des adipocytes humains cultivés *in vitro*. (**B**) Evaluation de la mortalité cellulaire induite par le virus de la grippe sur les cellules infectées. (**C**) Dénombrement des particules virales dans le surnageant des préadipocytes et des adipocytes infectés. (**D**) Quantification de l'expression des senseurs viraux *Rig1* et *Mda5* dans les deux types cellulaires à 24h p.i. (**E**) L'expression des protéines virales NS1 (en vert à gauche), NP (rouge) et HA (en vert à droite) dans les préadipocytes et les adipocytes infectés. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). (**F**) Quantification de l'expression des gènes relatifs au « browning » (*Ucp1*, *Prdm16*, *Tmem26* et *Tbx15*), (**G**) Quantification de l'expression du génome viral dans les tissus adipeux sous-cutanés et viscéraux de 5 patients.

Les résultats exposés ci-dessus sont actuellement soumis pour publication.

Comme mentionné dans l'Introduction, les données épidémiologiques obtenues au décours de l'infection par le virus influenza (H1N1) lors de la pandémie de 2009 **(Huttunen *et al.*, 2013)**, associées aux publications décrivant l'infection par IAV de souris obèses **(Milner *et al.*, 2015)**, montrent que l'obésité est un facteur de risque de formes sévères d'infection grippale.

Ainsi, nous avons étudié les effets de l'infection sur le tissu adipeux de souris obèses et comparés avec les données obtenues chez la souris normo-pondérale. Nous avons utilisé un modèle de souris rendues obèses par la consommation d'un régime enrichi en lipides (HFD, high-fat diet ; 60%) Ces travaux, qu'il reste à compléter, feront l'objet d'une publication ultérieure.

C. EFFET DE L'INFECTION PAR IAV SUR LE TISSU ADIPEUX DE SOURIS OBESES

Contrairement à ce qui estobservé chez les souris minces, l'infection des souris obèses se traduit par une augmentation moins marquée de la sécrétion des cytokines IL-1b, IL-6 et IL-10 par le SCAT et l'EWAT (surnageants de cultures d'explants tissulaires). Dans l'EWAT,nous mesurons même une diminution de la sécrétion d'IL-10 en contexte infectieux. Cependant, il est important de noter que les niveaux de sécrétions basales de l'IL-1b et de l'IL-6 sont beaucoup plus élevés dans les tissus adipeux de souris obèses que dans ceux des souris minces, reflétant l'état inflammatoire du « tissu obèse ». Cependant, le niveau basal de l'IL-10 est très réduit chez la souris obèse et même s'il augmente dans le SCAT, ses niveaux demeurent très bas comparés à ceux mesuréschez les souris minces. Cependant, la nature « dépôt-spécifique » des effets de l'infection sur le tissu adipeux est également observée chez les souris obèses, notamment concernant la sécrétion de leptine qui est augmentée dans le SCAT et inchangée dans l'EWAT **(Figure 50.A)**.

Afin de voir si nous retrouvons les mêmes effets de l'infection sur l'expression des marqueurs métaboliques du tissu adipeux, comme pour les souris minces, nous avons évalué l'expression de *Pspla1*, *Plin1*, *Glut4*, *Irs1*, *Me2*, *Fasn* et *Srebp1c* à 7 jours p.i. Nous retrouvons également une diminution significative de l'expression de ces gènes, sauf pour l'expression de la phospholipase *Pspla1*, dont l'expression dans l'EWAT reste inchangée **(Figure 50.B)**.

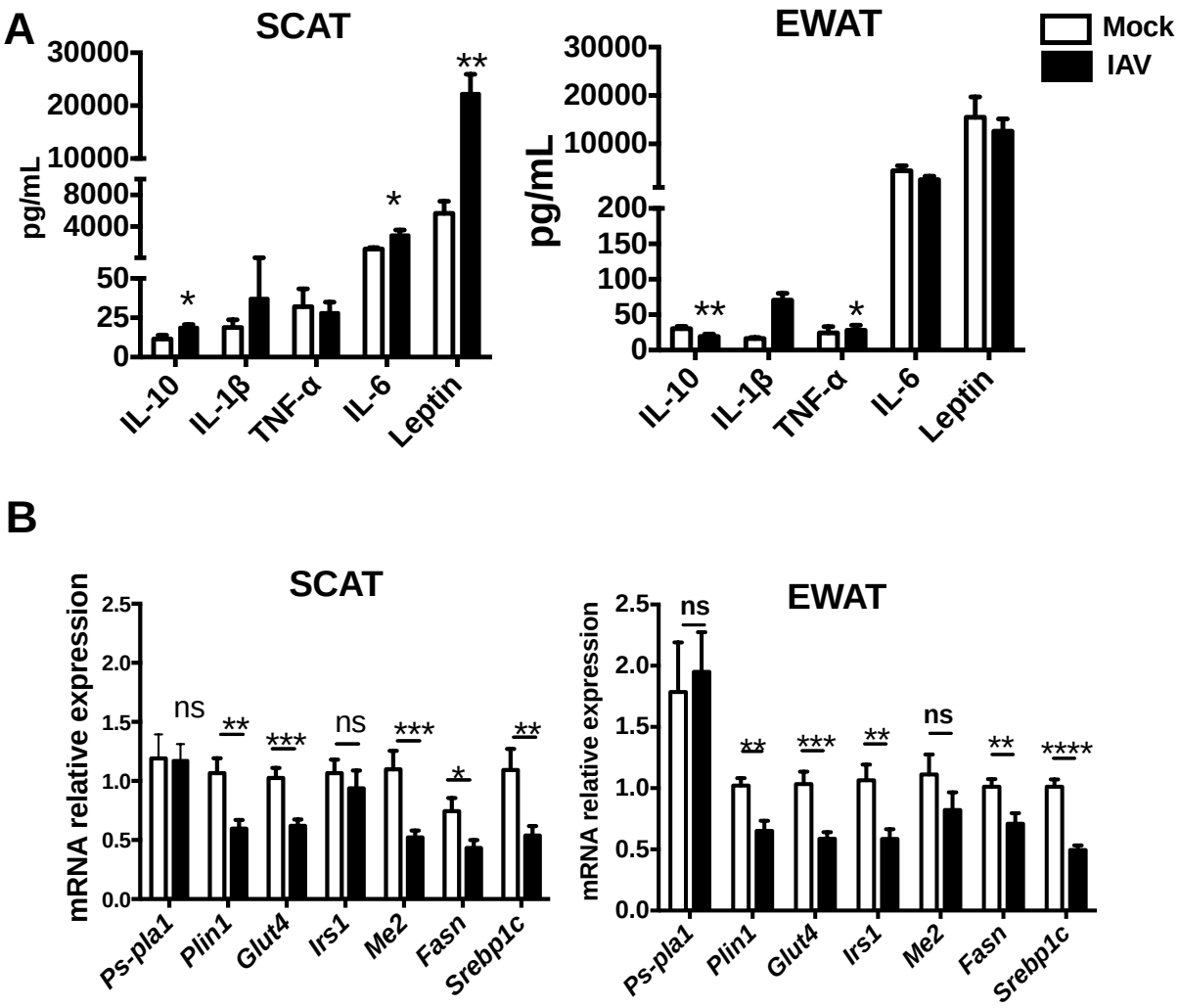

Figure 50. Effet de l'infection de souris obèses par le virus Influenza sur les secrétions de cytokines par le tissu adipeux blanc et l'expression des marqueurs métaboliques majeurs.

(**A**) Evaluation des sécrétions d'IL-1b, IL-6, IL-10 et de la leptine par les deux dépôts de tissu adipeux *ex vivo* n=7 à 14 *mock* et n=13 à 20 *IAV*. Les concentrations des cytokines sont normalisées par rapport au poids des explants de tissu adipeux. (**B**) Analyse par RT-qPCR de l'expression de gènes impliqués dans la lipolyse (*Pspla1*, *Plin1)*, le transport de glucose (*Glut4*, *Irs1*, *Me2*) et la lipogenèse (*Fasn*, *Srebp1c*) n=5 mock et n=8 à 18 IAV.
Pspla1; Phosphatidylserine-specific phospholipase A1, *Plin1*; Perilipin 1, *Glut4*; Glucose transporter 4, *Irs1*; Insulin receptor 1, *Me2*; Malic enzyme 2, *Fasn*; Fatty acid synthase et *Srebp1c*; Sterol regulatory element-binding protein 1c.

L'observation des coupes histologiques du tissu adipeux sous-cutané et viscéral de souris obèses non infectées ou infectées montrent que, contrairement aux observations faites chez la souris mince, il n'y a pas d'adipocytes beiges dans le SCAT des souris obèses, ce qui pourrait être en lien avec une signature différente du tissu adipeux dans un contexte d'obésité **(Figure 51.A)**. L'analyse histomorphométrique du SCAT montre une tendance à l'augmentation du nombre des cellules de petite taille dans le tissu infecté, alors que la taille des adipocytes composant l'EWAT n'est pas modifiée par l'infection **(Figure 51.B)**.Enfin, l'expression d'*Ucp1* dans le SCAT est fortement diminuée en contexte infectieux alors que cette expression n'est pas modifiée dans l'EWAT.

Cependant l'expression de la leptine est très induite dans les deux dépôts de tissu adipeux, ce qui nous permet de supposer dans l'EWAT la synthèse de l'ARNm de la leptine a lieu, mais n'aboutit pas à la production de la protéine **(Figure 51.C)**.

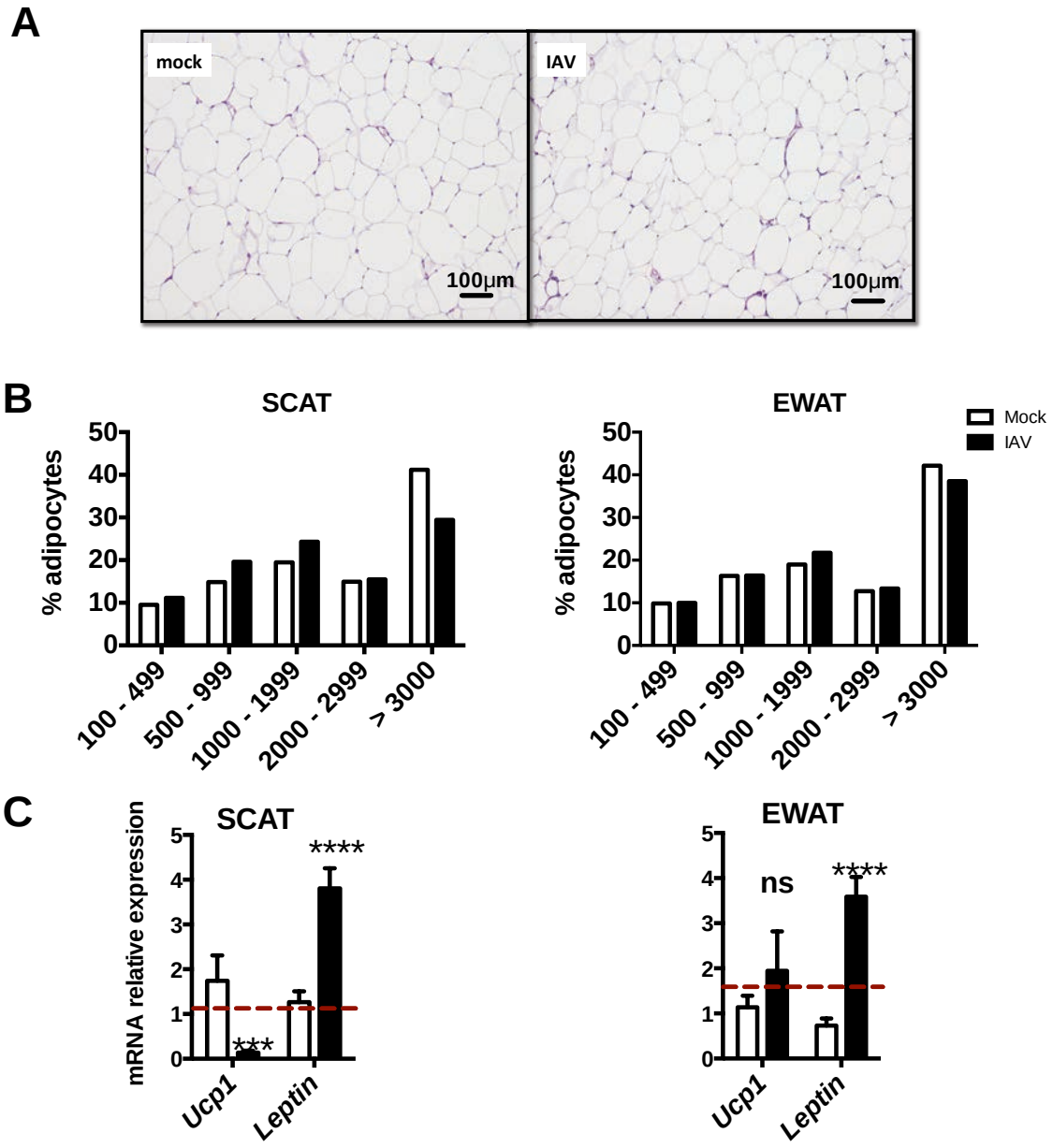

Figure 51. Analyse histomorphométrique du SCAT et de l'EWAT de souris obèses non infectées et infectées par le virus de la grippe.

(**A**) Coupes histologiques du tissu adipeux de souris obèses infectées (*IAV*) et non infectées (*mock*) par le virus de la grippe. (**B**) Détermination de la taille (aires) des adipocytes du SCAT et de l'EWAT de souris obèses non infectées (*mock*) et infectées (*IAV*) représentée en pourcentage de cellules dans chaque catégorie de tailles allant de 100 µm^2 à >3000 µm^2, n=6 *mock* et n=6 *IAV*. (**C**) Expression génique d'*Ucp1* et de la *leptine* dans le SCAT et l'EWAT.

La quantification de l'expression de la séquence virale M1 dans le tissu adipeux des souris obèses est à des niveaux plus faibles que dans le cas des souris minces (≈2-3 log_{10} copies/µg d'ARN) **(Figure 52.A)**.La quantification de l'expression des senseurs viraux *Rig1*, *Mx1*, *Mda5* et *Viperin* dans le SCAT et l'EWAT montre une augmentation de l'expression de ces gènes dans les deux dépôts **(Figure 52.B)** et pas uniquement dans l'EWAT comme chez les souris minces.

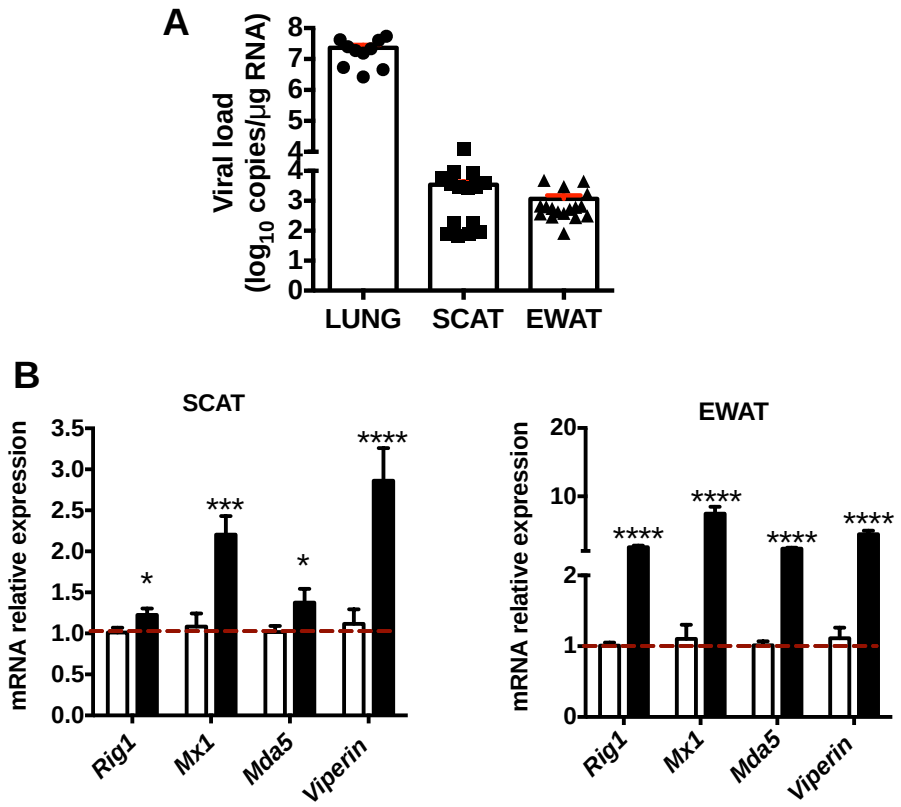

Figure 52. Détection du génome viral et induction des senseurs viraux dans le tissu adipeux blanc des souris obèses.

Quantification de l'expression du génome viral (exprimée en log_{10} du nombre de copie de la séquence virale M1/µg ARN) dans (**A**) les poumons des souris infectées (n=10), le SCAT n=25 et l'EWAT n=25. (**B**) Quantification de l'expression relative des senseurs viraux (*Tlr3*, *Rig1*, *Mda5*, *Mx1* et *Vip*) par rapport au gène de ménage *EeF2* et par rapport au contrôle non infecté, à 7 jours p.i. dans le SCAT et l'EWAT. *Tlr3*; Toll-like receptor 3, *Rig1*; Retinoic acid-inducible gene 1, *Mda5*; Melanoma differentiation-associated gene 5, *Mx1*; Myxovirus resistance protein 1 et *Vip*; Viperin.

Ainsi, les résultats obtenus montent non seulement un tropisme du virus de la grippe pour le tissu adipeux, mais en plus, un remodelage induit par l'infection à influenza sur les fonctions de ce tissu qui s'avère différent entre un état mince ou obèse.

Discussion

Discussion

Le tissu adipeux blanc est un tissu conjonctif hautement spécialisé. En plus de son rôle comme isolant thermique et mécanique, le tissu adipeux a été initialement décrit comme ayant un rôle métabolique important ; il s'agit en effet de la principale réserve énergétique de l'organisme (stockage de l'énergie sous forme de triglycérides et libération sous forme d'acides gras libres).

Depuis quelques années cependant, il est admis que le tissu adipeux excerce également une très forte activité endocrine du fait de sa capacité à sécréter de nombreuses hormones et cytokines, lui permettant d'interférer avec, et de contrôler, les différentes composantes de l'organisme. Ce tissu est ainsi capable de maintenir l'homéostasie énergétique en tamponnant l'absorption et la libération des lipides mais également en interférant avec l'immunité et le système nerveux central. Il n'est donc pas surprenant que ce tissu puisse jouer un rôle dans la défense de l'organisme contre les infections. En effet, l'accumulation excessive de tissu adipeux blanc, qui caractérise l'obésité, est associée à une susceptibilité accrue aux infections, confirmant l'étroite relation entre tissu adipeux et immunité.

Cette interférence se fait dans les deux sens: (1) certains pathogènes (comme l'adénovirus) affectent directement le tissu adipeux et joueraient un rôle dans le développement et la mise en place de l'obésité **(Whigham *et al*., 2006 ; Lyon *et al*., 1982 ; Carter *et al*., 1984 ; Gosztonyi et Ludwig, 1995)**, et (2) l'obésité, quant à elle, en altérant les défenses immunes de l'hôte, augmenterait ainsi sa susceptibilité à certaines infections, notamment pulmonaires **(Zammit *et al*., 2010 ; Beuther and Sutherland, 2007 ; Mancuso, 2009)**. Les adipocytes, qui présentent des fonctions à la fois métaboliques et immunologiques, jouent un rôle essentiel dans ces interactions entre le tissu adipeux et l'immunité. Globalement, le lien entre le tissu adipeux, l'immunité et le métabolisme ne cesse de se confirmer **(Schipper *et al*., 2012)**. En effet, **Schäffler et Schölmerich** rapportent que les adipocytes expriment à leur surface les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptors* (TLRs)), notamment TLR4, qui reconnait les lipopolysaccharides bactériens mais également les acides gras saturés ; se plaçant ainsi à l'interface entre l'immunité et le métabolisme (**Schäffler et Schölmerich, 2010**). De même, l'infiltration des macrophages au sein du tissu adipeux lors du développement de l'obésité est un argument supplémentaire montrant le lien étroit entre immunité et métabolisme **(**voir la revue **Surmie et Hasty, 2008)**.

A travers ce travail de Thèse, nous nous sommes intéressés aux liens potentiels entre le tissu adipeux blanc et les infections pulmonaires. Nous avons ainsi analysé l'effet de l'infection par le virus de la grippe sur le tissu adipeux et évalué la susceptibilité des souris obèses à l'infection par la bactérie *Streptococcus pneumoniae.*

La réponse de l'hôte face aux infections virales et bactériennes n'est pas identique. En effet, alors que les bactéries sont détectées par les TLRs de surface (TLR 2, 4 et 5), l'infection virale est majoritairement détectée par des senseurs intracytoplasmiques localisés au niveau des endosomes (TLR3 et 7) et des mitochondries (RIG-I et MAVS). La réponse qui s'en suit est une activation de différentes voies de signalisation, aboutissant dans le cas de la bactérie à l'activation de l'inflammasome (entre autres le NLRP3), la maturation (par la caspase-1) des pro-IL-1β et pro-IL-18 aboutissant à la sécrétion, respectivement, d'IL-1β et d'IL-18 qui vont activer les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes T auxiliaires de type 1 ou Th1) **(Koppe *et al.*, 2012)**. Dans le cas de l'infection virale, l'activation des senseurs viraux aboutit à l'activation de la voie IRF-3 qui permettra la synthèse des interférons de type I (alpha et beta) qui vont agir de manière autocrine ou paracrine pour activer l'expression et la synthèse de protéines ISGs (Mx1, Viperine …) qui présentent des propriétés antivirales **(Iwasaki et Pillai, 2014)**.

I. Conséquences de l'obésité sur l'infection par la bactérie *Streptococcus pneumoniae*

Afin d'évaluer l'implication du tissu adipeux blanc lors d'une infection respiratoire bactérienne, nous avons mené notre étude dans un contexte d'expansion de ce tissu ; à savoir un modèle de souris obèses infectées par la bactérie *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*).

a. Une susceptibilité accrue des individus obèses à l'infection à pneumocoque ?

Les données épidémiologiques concernant la susceptibilité des obèses à l'infection par la bactérie *S. pneumoniae* **(Corrales-Medina *et al.*, 2011 ; Langley *et al.*, 2016)**, ainsi que les données expérimentales menées sur des modèles murins d'obésité d'origine génétique (les souris *ob/ob* ; déficientes pour le gène codant la leptine **(Hsu *et al.*, 2007)**, ou les souris CPE *fat/fat* ; déficientes pour le gène codant la carboxypeptidase E **(Mancuso *et al.*, 2014)**) sont controversées.

C'est pourquoi lors de notre étude nous avons choisi d'utiliser un modèle murin d'obésité induite par la consommation d'un régime riche en graisses (60%), qui consitue la cause principale d'obésité dans les sociétés développées **(Barry *et al.*, 2009)**. Nous avons donc comparé l'infection par *S. pneumoniae* (sérotype 1, administré à une dose sublétale) chez des souris minces ou obèses.

Notre étude montre que, comparativement aux souris minces, les souris obèses présentent une importante perte de poids et une mortalité très élevée après infection par une dose sub-léthale de *S. pneumoniae*. Il est décrit que l'infection par le streptocoque entraine des altérations au niveau des alvéoles pulmonaires, caractérisées notamment par le recrutement de cellules immunes (macrophages et neutrophiles) et l'augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF-α) **(Wang *et al.*, 2001)**. Afin d'évaluer et de comparer la sévérité de l'infection entre les souris minces et obèses, et éventuellement déterminer la cause de la susceptibilité des obèses à l'infection, nous avons évalué la charge bactérienne, le score histologique, le recrutement des neutrophiles, ainsi que l'expression et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNF-α dans les poumons. Nos résultats ne montrent aucun paramètre discriminatoire entre les souris minces et obèses. En effet, les niveaux de l'inflammation et les altérations pulmonaires induites par l'infection sont comparables entre les souris minces et les souris obèses. Ainsi, ces données suggèrent que la sévérité de l'infection en cause de la mortalité des souris obèses n'est pas localisée au niveau des poumons.

b. Souris rendues obèses par consommation d'un régime riche en lipides : Un modèle pour étudier la méningite à pneumocoque ?

Comme, d'une part, l'infection par *S. pneumoniae* est à caractère invasif et peut, dans certains cas, causer des méningites **(Klein *et al.*, 2008)**, et est associée, d'autre part, à une altération de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (BHE) **(Hsuchou *et al.*, 2012)**, nous avons évalué et comparé la charge bactérienne dans le cerveau des souris minces et obèses infectées par *S. pneumoniae*. Les résultats obtenus montrent une charge bactérienne plus élevée dans le cerveau des souris obèses, ce qui pourrait être l'une des causes de la mortalité augmentée suite au développement d'un syndrome de type méningite. Cependant, le niveau des sécrétions des cytokines est comparable entre les souris minces et obèses infectées. L'évaluation de l'expression des protéines de jonctions serrées montre une diminution significative de l'expression de la *Claudine 5* chez les souris obèses (infectées et non-infectées). En effet, d'autres travaux rapportent une association entre la diminution de l'expression de *Clau-5*, et l'altération de la perméabilité de la BHE chez les obèses, les rendant plus sujets au développement de méningites **(Li *et al.*, 2015 ; Vieira *et al.*, 2015)**. Quant à l'évaluation de l'expression de la *Gfap*, marqueur d'activation des astrocytes, nous avons également noté une diminution liée au régime et non pas à l'infection. Ces résultats sont contradictoires avec ce qui est décrit dans la littérature. En effet, il est rapporté que l'obésité est associée soit à une augmentation de l'expression de la *Gfap* **(Kloet *et al.*, 2014)**, soit à une expression inchangée **(Buckman *et al.*, 2013)**. Alors que l'expression du marqueur d'activation des microglies *Aif-1* dans le cerveau total montre une légère tendance à l'augmentation chez les souris minces infectées

comparées à leur contrôle non-infecté, elle marque une diminution chez les souris obèses infectées comparées à leur contrôle non-infecté. Des analyses préliminaires de l'expression de l'ARNm de *Clau5*, du *Tnfa*, du *Gfap et* du *Aif1* montrent une tendance à la diminution, du moins au niveau de la production de l'ARNm correspondant, chez les souris obèses dans les différentes régions du cerveau. Ces analyses préliminaires devront être confirmées notamment par une augmentation du nombre d'échantillons. Ces résultats, qui feront l'objet d'une publication ultérieure, mettent en évidence l'effet de l'expansion du tissu adipeux blanc dans l'induction d'une susceptibilité accrue à l'infection par la bactérie *S. pneumoniae*, favorisant le développement d'un syndrome de type méningite chez les souris obèses.

Les analyses que nous avons effectuées nous ont mené à considérer que la susceptibilité des obèses à l'infection par le pneumocoque serait potentiellement associée à des altérations au niveau cérébral et particulièrement au niveau de la BHE. Cependant, ceci n'empêche que cela pourrait être du à la dissémination systémique de la bactérie (septicémie, comme le montre le comptage de la charge bactérienne au niveau de la rate) qui crée un choc septique et une défaillance d'organes multiples auxquelles les souris obèses pourraient être plus vulnérables et qui pourrait être à l'origine de leur mortalité accrue **(Polat *et al*., 2017)**. Ainsi, à travers cette étude et dans les limites du modèle que nous avons utilisé, nous avons pu montrer que les souris présentant une obésité d'origine nutritionnelle montrent une susceptibilité augmentée face à l'infection par le streptocoque potentiellement relié à une dissémination plus importante de la bactérie au niveau du cerveau.

II. L'effet de l'infection par le virus de la grippe sur le tissu adipeux

Le virus de la grippe est responsable de plusieurs vagues épidémiques et pandémiques au cours de l'histoire, dont la plus récente est la pandémie causée par le virus H1N1 en 2009, responsable d'un nombre élevé de décès. L'infection par le virus influenza des cellules épithéliales pulmonaires et l'induction d'une réponse immune très intense, sont à l'origine du déclenchement de la réponse inflammatoire souvent associée à la sévérité de la maladie **(Tripathi *et al*., 2014)**. Le virus est également capable de moduler les fonctions métaboliques de la cellule qu'il infecte, puisqu'il puise dans les réserves de l'hôte pour assurer sa propre réplication **(Smallwood *et al*., 2017)**. Du fait de l'importance de la fonction assurée par le tissu adipeux blanc dans le métabolisme et l'immunité de l'hôte, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'infection par le virus influenza sur ce tissu.

Pour ce faire, nous avons choisi de travailler sur un modèle de souris mâles nourries sous un régime LFD (*low fat diet*), ce qui correspond à un modèle de souris minces dont les fonctions métaboliques sont préservées. Ainsi, nous avons infecté ces souris avec une dose sublétale d'un virus Influenza

H3N2 préalablement adapté à la souris (30 PFU, par voie intranasale), et avons analysé les paramètres métaboliques et infectieux.

Comme attendu d'après les données de la littérature et de notre laboratoire, nous avons noté une perte de poids corporel chez les souris infectées par H_3N_2, qui est en partie due à la diminution de la masse du tissu adipeux sous-cutané (inguinal) (SCAT) et du tissu adipeux viscéral (périgonadique) (EWAT). De plus, nous avons montré que l'infection par le virus de la grippe ne modifie pas la répartition (sous-cutanée *versus* viscérale) des différents dépôts.
L'évaluation des sécrétions et de l'expression des marqueurs de l'immunité et du métabolisme dans le tissu adipeux au cours de l'infection a été effectuée.

1. *Effets de l'infection par le virus influenza sur le tissu adipeux sous-cutané et viscéral*

Nos résultats montrent des **effets communs** aux deux types de dépôts de tissu adipeux, à savoir :

- Une diminution significative de leur masse
- Une tendance à la diminution de la taille des adipocytes composant ces tissus
- Une diminution significative de l'expression des gènes impliqués dans la lipolyse, la lipogenèse et le transport de glucose
- Une augmentation significative de la sécrétion des cytokines IL-1β, IL-6 et IL-10
- La présence du génome viral, à la fois dans le tissu adipeux blanc total et dans les fractions adipocytaires et stromavasculaires.

La perte de poids corporel associée à l'infection grippale a été rapportée par plusieurs études **(Bartley *et al.*, 2017 ; Rodriguez *et al.*, 2017)**. Cependant, son association à une diminution de la masse du tissu adipeux blanc n'a, à notre connaissance, jamais été étudiée ni évoquée. En effet, cette perte de poids corporel a été souvent associée à une diminution de la masse musculaire **(Bartley *et al.*, 2016)**. Ainsi, nous avons pu montrer que l'infection grippale affecte les réserves lipidiques en réduisant la taille des adipocytes de manière comparable entre le dépôt sous-cutané et le dépôt viscéral. L'étude de l'expression des marqueurs métaboliques dans le tissu adipeux montre une diminution très significative de l'expression des gènes impliqués dans la lipolyse *(Pspla1*, *Plin1)*, le transport de glucose (*Glut4*, *Irs1*) et la lipogenèse (*Fasn*, *Srebp1c)*. La diminution de l'expression de *Glut4* et *Irs1* est associée à une altération du transport de glucose dans les adipocytes **(Minokoshi *et al.* 2003)** et la diminution de l'expression de *Fasn* et *Srebp1c* est associée en partie à l'augmentation des taux de leptine circulante chez des rats âgés **(Nogalska *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2009)**. L'évaluation de l'expression d'autres marqueurs clés de l'activité du métabolisme lipidique (lipolyse) : ATGL (*Adipose Tri-Glycéride Lipase*), HSL (*Hormone-Sensitive Lipase*) et MGL

(*Monoacylglycerol Lipase*) n'a pas été effectuée au cours de cette étude et s'avère essentielle pour mieux estimer l'effet de l'infection sur le métabolisme lipidique de la cellule hôte.

Le tissu adipeux blanc est capable de sécréter de très nombreuses cytokines, les plus fréquemment mentionnées étant l'IL-1β et l'IL-6, produites majoritairement par les adipocytes et les cellules immunes présentes dans la fraction stromavasculaire **(Coppack, 2001)**. Notre étude, *via* la culture d'explants de tissu adipeux blanc, nous a permis d'identifier la « signature sécrétoire » propre au tissu adipeux dans un contexte d'infection par le virus influenza. Les résultats obtenus montrent une augmentation significative de la sécrétion des cytokines IL-6, IL-10 et IL-1β. La production de l'IL-6 par le tissu adipeux est étroitement liée à la lipolyse et à la mobilisation des acides gras du tissu adipeux **(Lingso *et al.*, 2002)**. Ainsi, l'augmentation de la production de l'IL-6 par les deux dépôts est en lien étroit avec la diminution de la taille des adipocytes et de la masse du SCAT et de l'EWAT. Nous avons noté des taux d'IL-6 beaucoup plus élevés dans le tissu adipeux viscéral que dans le tissu adipeux sous-cutané. Cette différence est probablement due à la présence d'adipocytes de plus grande taille dans le dépôt viscéral comparé au dépôt sous-cutané **(Ibrahim, 2009)**. L'expression du génome viral dans les différents dépôts de tissu adipeux permet de supposer que ces modulations des profils de secrétion et d'expression génique du tissu adipeux pourraient avoir été induits par un effet direct du virus. Nous ne pouvons pas cependant exclure que ces observations, similaires entre le SCAT et l'EWAT, résultent de l'inflammation systémique déclenchée par l'infection.

2. *Effets de l'infection par le virus influenza spécifiques au tissu adipeux sous-cutané : le brunissement ou beiging*

De manière tout-à-fait intéressante, nous avons également montré des **effets dépôt-spécifiques** de l'infection par le virus influenza. Le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral présentent en effet des caractéristiques propres. Le tissu adipeux sous-cutané est fréquemment associé à des effets métaboliques bénéfiques, puisque son accumulation est considérée neutre et n'altère pas les fonctions métaboliques de l'organisme, contrairement au tissu adipeux viscéral qui, lui, est associé à des effets métaboliques délétères (son accumulation excessive est en effet associée au développement de maladies métaboliques et cardiovasculaires) **(Cinti, 2012 ; Ibrahim, 2009)**.

Ainsi, les différents effets observés sur les deux types de dépôt ne sont donc pas surprenants. En effet, nous avons relevé les observations suivantes :

- La sécrétion de la leptine (adipokine majeure du tissu adipeux) est augmentée dans le SCAT et diminuée dans l'EWAT

- La sécrétion d'IL-6 est beaucoup plus élevée dans l'EWAT comparée au SCAT
- Un brunissement du tissu adipeux (*browning* ou *beiging*) apparait uniquement dans le SCAT
- L'expression de la protéine UCP-1 est augmentée uniquement dans les dépôts de SCAT à J7 (expression protéique, western blot) et à J4 (expression génique, RT-qPCR)
- La modulation des cellules immunes innées est induite uniquement dans le SCAT, caractérisée notamment par le recrutement d'éosinophiles et de macrophages de type 2
- L'induction de l'expression des senseurs viraux (*Tlr3*, *Rig1* et *Mavs*) et des ISGs (*Viperin* et *Mx1*) se fait uniquement dans l'EWAT.

Mis à part les effet bénéfiques et délétères associés, respectivement, au SCAT et à l'EWAT, leur capacité à développer du *beiging* est également différente. En effet, les niveaux d'expression des marqueurs du *beiging Ucp1*, *Tbx1* et *Prdm16* sont plus élevés dans le SCAT comparé à l'EWAT **(Zuriaga *et al.*, 2017)**. Dans la littérature, il est décrit que le SCAT contient plus de cellules (préadipocytes ?) susceptibles de devenir brunes **(Wu *et al.*, 2013)**, ainsi le SCAT est plus sujet à « brûnir » que l'EWAT. Par exemple, chez les souris *Prdm16*-KO, le développement du beiging dans le SCAT est altéré **(Cohen *et al.*, 2014)**.

Le phénomène de brunissement est également associé à des modifications de la composition des cellules immunes présentes dans le tissu adipeux, avec la mise en place d'un environnement anti-inflammatoire caractérisé par la prévalence des éosinophiles, des macrophages de type 2 (M2) et des lymphocytes T régulateurs **(Lee et Tontonoz, 2014 ; Qiu *et al.*, 2014)**. De même, l'augmentation de la sécrétion de l'IL-6 **(Han *et al.*, 2018)** et de la leptine **(Dodd *et al.*, 2015)** est associée au brunissement du tissu adipeux blanc.

Ainsi, les effets observés dans le SCAT à savoir ; l'augmentation d'IL-6, de la leptine et le recrutement des éosinophiles et des macrophages, associés à la prédisposition du SCAT à exprimer les gènes *Ucp1*, *Tbx1* et *Prdm16* **(Zuriaga *et al.*, 2017)** pourraient expliquer que le SCAT brunisse et non l'EWAT.

Dans le cas du brunissement du tissu adipeux induit par le froid, les variations de l'expression d'*Ucp1* suivent une cinétique bien contrôlée. En effet, le premier jour suivant l'exposition au froid le niveau d'expression de l'ARNm d'*Ucp-1* est diminué d'un facteur 2, et après 5 jours d'exposition, l'expression d'*Ucp1* est maximale **(Jacobsson *et al.*, 1994)**. En contrepartie, l'expression de la protéine UCP-1 est réduite très lentement après l'acclimatation au froid, ce qui rend l'analyse de la protéine plus simple à étudier que celle de l'ARNm **(Gospodarska *et al.*, 2015)**. C'est sans doute la

raison pour laquelle notre analyse de l'expression des gènes *Ucp1*, *Pgc1a*, *Fgf21*, *Apln*, *Metrnl*, *Prdm16* par RT-qPCR à 7 jours post-infection n'a pas donné des résultats concluants. Nous avons alors supposé que l'expression des gènes associés au beiging était modulée bien avant le 7ème jour suivant l'infection. En effet, l'analyse de l'expression du gène *Ucp1* à J2, 4, 7, et 14 post-infection confirme la dégradation rapide de l'ARNm d'*Ucp1* comme rapporté par **Gospodarska *et al*., (2015)**. L'analyse de l'expression de la protéine UCP-1 par western-blot confirme le développement du *browning* à 7 jours suivant l'infection par le virus influenza.

3. L'infection par le virus influenza protège du développement de l'obésité ?

Dans la plupart des études, le brunissement du tissu adipeux blanc est associé à une perte de poids corporel, une amélioration des paramètres métaboliques et une résistance au développement de l'obésité induite par un régime riche en graisses **(Seale *et al*., 2011 ; Feldmann *et al*., 2009 ; Stanford *et al*., 2015)**. Ainsi, dans notre modèle, l'infection par le virus influenza est associée, à 7 jours post-infection, à des améliorations métaboliques, marquées par une diminution du taux de glucose et de résistine ainsi qu'une augmentation du taux d'insuline dans le sang. Bien que modestes (mais néanmoins significatifs), ces effets sont durables puisqu'ils persistent jusqu'à 20 semaines après infection. Néanmoins, le challenge des souris infectées à 7 jours post-infection par un régime obésogène ne montre pas de résistance à la mise en place de l'obésité, en dépit d'une prise de poids moins importante comparée aux souris contrôles qui pourrait correspondre au poids perdu en début de l'infection. Ainsi, nous avons pu montrer que l'infection grippale induit des modulations métaboliques globales chez la souris et affecte la fonction et les sécrétions du tissu dipeux blanc. L'infection par le virus de la grippe, essentiellement pneumotrope, est associée à des perturbations extrapulmonaires. En effet, les antigènes du virus Influenza A (H_5N_1) ont été détectés dans le poumon et le cerveau mais également dans le tissu adipeux qui entoure le foie, le thymus, le pancréas, la rate et le tractus gastro-intestinal **(Nishimura *et al*., 2000).** Puisque les cellules souches à l'origine des préadipocytes et des adipocytes expriment les TLRs, il est judicieux de penser que ces cellules expriment à leur tour des PRRs (*Pathogen Recognition Receptor*). En effet, **Shäffler et Schölmerich (2010)** rapportent que dans le tissu adipeux humain, l'expression de tous les TLRs a été détectée. Une fois isolés du tissu adipeux, les adipocytes expriment tous les TLRs à l'exception des TLR 5 et 7 **(Shäffler et Schölmerich, 2010)**. De même, la présence de RIG-1 et TLR3, qui reconnaissant l'ARN viral, a été rapportée dans les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux humain **(Yu *et al*., 2016)**. Nos travaux confirment l'expression de ces senseurs dans le tissu adipeux mais également dans les préadipocytes et les adipocytes. L'infection par le virus de la grippe, qui rappelons-le est intranasale, conduit à l'augmentation de l'expression des gènes *Tlr3*, *Rig1*, *Mda5* et *Mavs* et des ISGs *Mx1* et *Viperin* dans le tissu adipeux viscéral et non dans le tissu adipeux sous-cutané

à 7 jours post-infection. Ainsi, bien que le génome viral ait été détecté dans les deux dépôts de tissu adipeux, l'expression des senseurs viraux est induite uniquement dans l'EWAT. Cependant, il est important de mentionner que le niveau d'expression de la leptine affecte profondément l'expression et l'activation des TLRs au niveau des adipocytes et du tissu adipeux. En effet, des souris *ob/ob* ou *db/db*, dépourvues de, respectivement, la leptine ou son récepteur, montrent une expression élevée de TLRs **(Shäffler et Schölmerich, 2010; Batra *et al*., 2007)**. Nos résultats confirment cette observation. En effet, dans le SCAT, l'expression de la leptine est augmentée par l'infection, ce qui pourrait expliquer le non déclenchement d'une augmentation de l'expression des senseurs viraux par ce tissu dans un contexte d'infection. A l'inverse, nous montrons une diminution de la sécrétion de la leptine par l'EWAT ; tissu dans lequel l'expression des senseurs viraux est induite.

4. Les préadipocytes et les adipocytes sont permissifs à l'infection par le virus influenza

Pour aller plus loin dans l'étude de l'interaction entre le virus influenza et les adipocytes (et leurs progéniteurs ; les préadipocytes) nous avons mis en place un modèle d'infection *in vitro*. L'infection des adipocytes et des préadipocytes montre une augmentation de l'expression du génome viral 24 heures après infection, ainsi qu'une augmentation de l'expression des senseurs viraux et des ISGs. La visualisation des cellules infectées par microscopie électronique a permis de mettre en évidence des vésicules à la surface des préadipocytes et des adipocytes qui présentent la structure de virions et de bourgeonnement du virus influenza **(Nayak *et al*., 2009 ; Noda, 2011)**. Cependant, les particules libérées par le préadipocyte paraissent vides et pourraient ainsi correspondre soit à des capsides virales vides **(Noda *et al*., 2006)** soit à des vésicules extracellulaires **(Gao *et al*., 2017)**. L'immunomarquage des protéines virales NS1, NP et HA observé en microscopie confocale a permis de montrer un marquage positif dans les deux types de cellules, ce qui a été confirmé par la présence de HA dans le lysat cellulaire par western blot. En effet, l'expression des protéines virales au niveau de la cellule est révélatrice d'un cycle viral qui se conduit jusqu'au stade de la traduction des protéines virales **(Zhao *et al*., 2017)**. L'ensemble de ces données montre que le virus est capable de répliquer son génome, de produire ses protéines et de bourgeonner pour former de nouvelles particules virales. Ainsi, pour estimer le potentiel infectieux de ces particules, nous avons procédé à la quantification des particules libérées par les deux types cellulaires. En effet, ce test réalisé sur des cellules MDCK, totalement permissives à l'infection par le virus influenza, montre que les virions nouvellement libérés dans le surnageant de culture des adipocytes sont capables de former des plages de lyse sur tapis cellulaire de MDCK ; prouvant leur caractère infectieux. Cependant, le même test réalisé sur du surnageant de culture de préadipocytes infectés montre nettement moins de virions

infectieux avec la technique $TCID_{50}$, voire pas du tout avec la technique de plages de lyse. Il pourrait cependant être envisagé que les particules détectées correspondent à du virus résiduel suite à l'infection. Pour exclure cette possibilité, nous avons effectué une quantification des particules virales dans le surnageant après lavage (réalisé à 1 heure post-infection) pour nous assurer que les particules détectées 24 heures et 48 heures après infection correspondent bien à du virus nouvellement synthétisé par les adipocytes et les préadipocytes. Ainsi, comparé à sa cellule-hôte de prédilection **(Ibricevic *et al.*, 2006)**, l'adipocyte mature peut également être considéré comme une cellule hôte au virus de la grippe, capable de libérer des virions infectieux mais à des niveaux plus bas. L'évaluation des paramètres infectieux a été effectuée sur un intervalle de temps large (1h, 24h et 48h post-infection) pour nous permettre de comprendre le déroulement du cycle viral dans ces nouvelles cibles cellulaires : les préadipocytes et les adipocytes.

L'infection par le virus de la grippe induit des changements métaboliques au niveau de sa cellule hôte, particulièrement marqués par une augmentation de l'absorption du glucose **(Sanchez et Lagunoff, 2015)**. Afin d'estimer les effets métaboliques induits par l'infection du virus de la grippe sur les adipocytes, nous avons évalué, comme nous l'avons fait pour le tissu adipeux total, l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique (*Pspla1*, *Plin1*, *Me2*, *Glut4*, *Irs1*, *Fasn et Srebp1c*). Nous avons retrouvé les mêmes effets de l'infection, à savoir : une diminution de l'expression des gènes de la lipolyse, de la lipogenèse et du transport de glucose à partir de 48 heures post-infection. Cependant, il est important de mentionner que ces effets sont accompagnés d'une augmentation très importante de la production de l'IL-6 (qui active la lipolyse) par les adipocytes matures (résultats non présentés dans ce rapport), comme observé *in vivo*. L'analyse transcriptomique a révélé l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la défense antivirale et dans l'induction de la réponse interféron dans les deux types cellulaires. De manière intéressante, une signature transcriptomique spécifique aux préadipocytes infectés a été mise en évidence, avec une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes et du métabolisme des carbohydrates.

Pour mieux comprendre l'effet de l'infection sur le métabolisme cellulaire des préadipocytes et des adipocytes, nous avons mesuré la respiration cellulaire (consommation d'O_2) de ces cellules par analyse respirométrique. En contexte non infectieux, nous montrons que la respiration cellulaire des adipocytes est plus élevée que celle des préadipocytes, comme décrit dans la littérature. En effet, la différentiation des préadipocytes en adipocytes matures est accompagnée d'une augmentation du nombre des mitochondries, se traduisant par une consommation d'O_2 plus importante **(Morrison et McGee, 2015)**. Il a été décrit que le virus influenza puise dans les réserves énergétiques de la cellule

hôte et affecte sa fonction mitochondriale ; aboutissant ainsi à la réduction de la respiration cellulaire **(Djafarzadeh *et al*., 2011)**. Ceci correspond à ce que nous avons observé dans le cas des adipocytes, confirmant que ces cellules se comportent comme n'importe quelle autre cellule hôte permissive à l'infection par le virus influenza. A l'inverse et de manière surprenante, l'infection des préadipocytes n'a aucun effet significatif sur leur respiration. Ceci laisse suggérer que, soit le préadipocyte est infectable et assure un cycle viral jusqu'aux phases de réplication du génome virale et de production de protéines virales avec un blocage dans les phases tardives d'assemblage et de bourgeonnement, comme décrit pour les macrophages **(Londrigan *et al.*, 2015)**, soit que la production de nouveaux virions est assurée mais avec une efficacité très réduite (à la limite de déctection).

L'apparition d'une structure en plis au niveau du compartiment cytoplasmique uniquement dans les préadipocytes pourrait être un signe révélateur de la mise en place d'un stress du réticulum endoplasmique. En effet, l'infection par le virus de la grippe induit un stress du réticulum endoplasmique dans la cellule infectée **(Hassan *et al*., 2012 ; Roberson *et al*., 2012)**. Ce phénomène, habituellement accompagné d'une réponse de non-repliement protéique (UPR ; *Unfolded Protein Response*) se traduit par un défaut de transport des protéines qui s'accumulent au niveau du cytoplame **(Oslowski et Urano, 2011)**. Ceci pourrait expliquer le défaut de synthèse de nouvelles particules complètes et à potentiel infectieux à partir des préadipocytes. En effet, la réponse UPR et le stress du réticulum endoplasmique sont des mécanismes qui permettent d'éliminer les protéines mal repliées et aberrantes. Dans leur récents travaux, **Frabutt *et al.* (2018)** montrent que la réponse UPR et le stress du réticulum endoplasmique s'activent après la synthèse de la protéine virale (HA) pour la dégrader via les protéasomes et ainsi bloquer le cycle viral **(Frabutt *et al*., 2018)**.

Pour tenter de comprendre si le *beiging* induit dans le tissu adipeux sous-cutané des souris infectées résulte d'un effet direct du virus ou/et d'un effet indirect de l'infection, c'est-à-dire la mise en place d'un environnement favorable au brunissement, nous avons estimé l'expression des gènes du *beiging* dans les préadipocytes et les adipocytes matures. Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'induction de l'expression des gènes relatifs au *beiging* est induite uniquement dans les préadipocytes. Cependant, la formation d'adipocytes beiges peut se faire soit à partir de la différenciation de préadipocytes ou de la transdifférenciation des adipocytes blancs **(Van Den Berg *et al*., 2017)**. Ainsi, nos données suggèrent que le virus agit directement sur le processus de différenciation des préadipocytes en adipocytes beiges et non pas sur la transdifférenciation d'adipocytes blancs matures en adipocytes beiges. Ces expériences menées *in vitro* montrent que l'induction de l'expression des gènes du beiging est induite par l'effet seul du virus et non à travers la modulation de l'environnement cellulaire. Cependant, les données de respirométrie ne viennent pas

confirmer la formation d'adipocytes beiges à partir de préadipocytes, ou du moins au moment où nous avons évalué la respiration cellulaire des préadipocytes infectés. En effet, la respiration cellulaire des préadipocytes infectés n'est pas augmentée comme attendu par des adipocytes beiges **(Li *et al*., 2017)**. Il est important de mentionner que nous n'avons pas obtenu d'adipocytes beiges à partir de préadipocytes mis en contact même très longtemps avec le virus (résultats non présentés dans ce rapport), ce qui laisse supposer que l'environnement cellulaire, comme éventuellement l'effet de la leptine, l'insuline et l'IL-6, pourrait jouer un rôle important dans le développement du phénotype de brunissement **(Dodd *et al*., 2015 ; Abdullahi *et al*., 2017)**. Cependant, nos données montrent que dans un milieu contenant exclusivement des préadipocytes et du virus, on observe uniquement une induction de l'expression des gènes du *beiging*, suggérant une reprogrammation nouvelle du profil transcriptomique des préadipocytes infectés vers un phénotype qui se rapproche de celui des adipocytes beiges.

Ces résultats validés sur un modèle de lignée cellulaire murine (3T3-L1) présentent des limites de part le fait qu'il s'agit d'un modèle de culture *in vitro* de cellules immortalisées, qui ne sont pas tout à fait identiques aux cellules primaires isolées du tissu adipeux **(Roberts *et al*., 2009)**. Aussi, compte tenu de l'addition de l'insuline, l'IBMX et de la déxaméthasone, agents qui affectent profondément les cellules en culture, il faudrait considérer le milieu artificiel dans lequel les cellules sont cultivées. Pour toutes ces raisons, nous avons mis en place un modèle d'étude *in vitro* sur des cellules humaines issues d'une culture primaire isolées de tissus adipeux sous-cutanés humains. L'infection des préadipocytes et des adipocytes humains confirme la permissivité des adipocytes au virus de la grippe. Alors que dans le modèle murin, la permissivité des préadipocytes semblait être faible avec peu de virions à potentiel infectieux relargués, les préadipocytes humains produisent des quantités non négligeables de particules infectieuses. Le virus H_3N_2 que nous utilisons dans cette étude a été isolé à la base chez l'humain puis adapté à la souris. Ceci pourrait expliquer l'affinité augmentée du virus pour les cellules humaines comparées aux cellules murines. Conformément à ce qui est obtenu dans le modèle murin, nous avons noté une augmentation de l'expression du génome viral 24 heures après infection et une augmentation de l'expression des senseurs viraux, ainsi qu'un marquage positif pour les protéines virales NS1, NP et HA dans les deux types cellulaires. L'évaluation de l'expression des gènes du *beiging* confirme, comme obtenu dans le modèle murin, l'effet induit par le virus uniquement sur les préadipocytes. Ainsi à travers le modèle humain nous avons montré sur une culture de cellules primaires que nous retrouvons les mêmes observations retenues dans le modèle de lignée cellulaire murine, ce qui permet de confirmer ainsi le tropisme cellulaire et tissulaire du virus de la grippe pour les adipocytes, les préadipocytes et le tissu adipeux blanc.

Le phénomène de *beiging* avait été observé lors de certaines infections parasitaires caractérisées par une infection chronique à caractère anti-inflammatoire **(Brestoff *et al*., 2014 ; Wu *et al*., 2011)**. Cet effet, qui s'accompagne d'une amélioration du métabolisme de l'hôte, avait été interprété par une sorte de symbiose qui se met en place entre le parasite et son hôte, en vue de maintenir en vie et en bonne santé l'hôte, assurant ainsi la survie du parasite **(Guigas et Malovski, 2015)**. En plus de l'exemple du développement du *beiging* suite à l'infection causée par le virus du sida (VIH) lors de la cachexie qui lui est associée **(Couturier et Lewis, 2018)**, nos données montrent que l'induction de ce phénomène pourrait aussi être induite dans le contexte d'une infection aigue par le virus de la grippe.

Les mêmes analyses effectuées sur des souris obèses, confirment : la présence du génome viral dans le SCAT et l'EWAT, l'augmentation de la sécrétion des cytokines IL-1β, IL-6 et IL-10 et l'augmentation dépôt spécifique de la sécrétion de la leptine au niveau du SCAT. La diminution de l'expression des gènes du métabolisme est également confirmée dans les deux types de dépôts. Cependant, l'induction de l'expression des senseurs viraux, spécifique à l'EWAT dans le modèle des souris minces, est retrouvée dans le SCAT et l'EWAT. Malgré l'augmentation de la sécrétion de l'IL-6 et de la leptine, connus pour participer la mise en place du *browning*, ce phénomène n'est pas détecté dans le SCAT des souris obèses. Ceci est probablement dû au fait que chez les souris obèses, l'expression des gènes du *beiging* connue pour être augmentée dans le SCAT **(Zuriaga *et al*., 2017)**, est réduite **(Carey *et al*., 2014).**

5. Le tissu adipeux, un réservoir pour le virus influenza ?

Ainsi à travers cette étude nous avons pu mettre en évidence la permissivité d'une nouvelle cible cellulaire pour le virus de la grippe, qui sont les préadipocytes et les adipocytes et que le tissu adipeux pourrait être ciblé par le virus de la grippe. Ainsi, la présence du virus dans le tissu adipeux nous incite à évoquer la notion de réservoir. Cependant, pour que cette notion soit confirmée, comme pour le virus du Sida, les critères suivants devraient être validés : la quiescence de la cellule cible, le niveau bas de la réplication virale, la mort cellulaire réduite, la détection des antigènes viraux et des particules infectieuses dans le tissu réservoir et en particulier la détection de l'expression des séquences virales très longtemps après l'infection **(Wang et yulk, 2016)**. Ainsi dans notre modèle expérimental nous avons validé les critères suivant : (1) la quiescence cellulaire puisque les adipocytes une fois différenciés voient leur division stoppée, (2) le niveau de la réplication virale dans les adipocytes est plus bas comparé aux cellules cibles usuelles du virus de la grippe et (3) les adipocytes infectés ne montrent pas de mortalité accrue. Cependant, des analyses complémentaires s'avèrent nécessaires pour détecter les protéines virales au sein même du tissu adipeux. Aussi, pour valider la notion de réservoir il serait nécessaire de mettre en évidence la présence de particules

infectieuses dans le tissu adipeux et en particulier la détection de l'expression du génome viral très longtemps après l'infection.

Ainsi, nous avons mis en évidence une interaction entre le virus de la grippe et le tissu adipeux. A ce stade de notre travail, nous proposons que l'infection intranasale des souris par le virus de la grippe atteint les poumons au niveau desquels la perméabilité est altérée par l'infection. Ainsi, deux hypothèses se présentent : (1) le virus est transporté vers le tissu adipeux *via* les monocytes infectés, ou (2) il transloque vers la circulation sanguine pour atteindre le tissu adipeux (qui rappelons-le est très vascularisé). En effet, une étude menée chez la souris a permi de montrer que l'infection par le virus de la grippe est accompagnée de virémie au pic de l'infection **(Mori *et al*., 1995).** Aussi, des cas de virémies avaient été observés chez des patients atteints par le virus influenza **(Lodmell *et al*., 2006)**. Quand il n'est pas altéré métaboliquement par l'obésité, le tissu adipeux induit une réponse face à l'infection virale qui se traduit par le *beiging* pour empêcher la réplication virale. En effet, dans la culture *in vitro*, les cellules qui semblent produire le moins de virus et dont la respiration cellulaire n'est pas altérée, sont les préadipocytes, qui, rappelons-le montrent une affinité, *via* une expression augmentée des gènes de brunissement, à se différencier en adipocytes beiges après infection. A travers ces analyses, il semblerait que nous soyons sur une nouvelle piste pour l'identification d'une nouvelle voie d'induction du *beiging* qui se met en place à la suite de l'infection par le virus de la grippe, qui est une infection aigue et qui déclenche une réponse immune pro-inflammatoire.

Conclusions générales et perspectives

Ces travaux nous ont permis d'évaluer l'implication du tissu adipeux blanc dans deux modèles de pathologies inflammatoires pulmonaires; un modèle d'infection virale (par le virus influenza) et un modèle d'infection bactérienne (par *Streptococcus pneumoniae*).

Dans le modèle de l'infection par *Streptococcus pneumoniae*, nous avons évalué la sévérité de l'infection chez les souris obèses, en les comparant aux souris minces. Les résultats obtenus confirment la susceptibilité des souris obèses à l'infection par *S. pneumoniae*, et ne l'associent pas à des altérations localisées au niveau pulmonaire. En effet, nos résultats montrent que la susceptibilité des obèses à l'infection serait due au développement d'un syndrome de type méningite résultant d'une translocation bactérienne au niveau du cerveau et à une potentielle altération de la barrière hématoencéphalique.

Cependant à la vue des données épidémiologiques également controversées, il serait intéressant d'identifier et de classer les cas d'obésité admis en hospitalisation (cause de l'obésité, répartition des dépôts de tissu adipeux en excès, le degré d'obésité et la sévérité de l'inflammation chronique à bas bruit générée) et ainsi d'identifier lesquels qui présentent une susceptibilité face à l'infection par *S. pneumoniae*.

Ce projet reliant l'obésité à l'infection par *Streptococcus pneumoniae* nécessite des expérimentations supplémentaires qui consistent en la réalisation de coupes flottantes du cerveau des différents groupes de souris, pour tenter de localiser les zones affectées par l'infection, par un marquage des astrocytes, des microglies et de la bactérie *S. pneumoniae*.
Une fois identifiées, les zones d'intérêt seront disséquées et étudiées séparément pour attribuer une signature d'expression et de sécrétion à la zone la plus touchée, et ainsi mieux identifier la cause de la susceptibilité des souris obèses à l'infection par *S. pneumonia.*
L'infection de souris obèses par *S. pneumoniae* pourrait faire l'objet d'un modèle d'étude de la méningite autre que l'injection intracérébroventriculaire **(Tsai *et al.*, 1980)**, l'injection de la bactérie dans le liquide céphalorachidien **(Chiavolini *et al.*, 2008)**, ou encore l'utilisation d'animaux jeunes puisque les animaux adultes développent une résistance à la méningite **(Koedel et Pfister, 1999)**. Ainsi le modèle que nous proposons pourrait être complémentaire à celui couramment utilisé dans l'étude de la méningite. En effet, l'injection de la bactérie directement dans le cerveau fait abstraction à l'étude de la traversée de la BHE. Ainsi, dans un modèle d'obésité, la méningite se développe d'une

manière plus spontanée que les modèles précédemment cités. Cependant, il faudrait prendre en considération le fait que l'immunité et le métabolisme chez les souris obèses sont modulés.

Dans un modèle murin d'infection par le virus de la grippe, nous avons évalué les conséquences de l'infection sur le tissu adipeux. Nous avons ainsi pu montrer que le genome du virus influenza est détectable dans le tissu adipeux, que l'infection intranasale induit une inflammation dans les deux types de dépôt (sous-cutané et viscéral), et il participe à la mise en place d'un phénomène de *beiging* dépôt dépendant qui se développe spécifiquement dans le tissu sous-cutané, avec une amélioration des paramètres métaboliques persistants à distance de l'infection. De plus, nous avons montré, grâce à l'utilisation d'un modèle de culture *in vitro*, que les préadipocytes et les adipocytes murins et humains sont permissifs à l'infection par le virus de la grippe et que ces cellules pourraient ainsi être considérées comme cibles potentielles pour le virus influenza. Ainsi, nous avons pu montrer que l'infection par le virus de la grippe n'affecte pas seulement le poumon, mais que, le tissu adipeux blanc, organe à fonctions immunes et métaboliques, est également affecté par l'infection.
Ce projet est finalisé et actuellement soumis pour publication. Cependant, il permet d'ouvrir de nouvelles perspectives très attrayantes. En effet, il serait très intéressant d'identifier les facteurs viraux qui induisent la reprogrammation transcriptomique spécifique aux préadipocytes à travers l'induction de l'expression gènes du *beiging* pour potentiellement former des adipocytes beiges. Cependant, même analysés sur des cellules primaires humaines, les modèles utilisés *in vitro* dans cette étude présentent des limites à cause du milieu artificiel dans lequel les cellules sont cultivées. Ainsi, il serait encore plus intéressant de pouvoir détecter les protéines virales (par western blot ou par immuno-marquage) et d'évaluer la production de particules infectieuses dans le tissu adipeux blanc de souris infectées par le virus de la grippe. De même, une infection par le virus de la grippe par voie intraveineuse, certes très différente de la voie d'infection spontanée, permettra de comparer l'affinité du virus de la grippe entre le poumon et le tissu adipeux. En effet, l'infection par voie intranasale, privilégie la réplication virale dans le poumon. L'identification des particules libérées par le préadipocyte infecté serait également très intéressante. Si elles correspondent à des particules virales vides, et si elles présentent à leur surface les protéines virales de surface (en particulier l'HA et la NA) il pourrait s'agir de virosomes qui présentent un intérêt pour la vaccination contre le virus de la grippe en particulier pour les personnes allergiques aux protéines de l'œuf **(Abdoli *et al*., 2013)**. Ces formes pourraient aussi correspondre à des vésicules libérées par le préadipocyte dans des conditions de stress ou de dysfonctionnement métabolique **(Durcin *et al*., 2017)** et l'identification de leur contenu serait d'intérêt, puisque rappelons-le les préadipocytes produisent peu ou pas de particules virales. L'induction du phénomène de *beiging* lors d'une infection aigue est surprenant,

puisque ce phénomène est souvent associé à un profil anti-inflammatoire. Ainsi ce modèle pourrait correspondre à une nouvelle voie d'induction du beiging différente de celle identifiée suite à l'exposition au froid, au jeune ou encore à l'infection parasitaire **(Van Den Berg *et al.*, 2017)**. L'évaluation de l'implication des intervenants essentiels au développement du *beiging*, comme par exemple : la leptine, l'IL-6, la créatine kinase ainsi que les cellules immunes jouant un rôle dans le brunissement (éosinophiles, mastocytes, cellules lymphoïdes innées de type 2) serait à préciser. De même, l'analyse de la réponse UPR au niveau des préadipocytes serait très interessante à étudier en vue de mettre en évidence son lien potentiel avec l'induction du *beiging*.

Bien que ciblée sur le poumon, l'infection par le virus de la grippe cause une myalgie, qui est considérée comme un symptôme non-pulmonaire commun à l'infection grippale et qui est associée, du moins chez les personnes âgées à une augmentation des taux sériques des marqueurs de dommage musculaire, la créatine kinase (CK), la myoglobine et la lactate déshydrogénase **(Agyeman *et al.*, 2004 ; Sertogullarindan *et al.*, 2009)**. L'identification du lien potentiel entre la myalgie et le browning serait également d'intérêt.

L'établissement d'une cinétique de l'expression de la protéine UCP-1 du début et à distance de l'infection s'avère essentielle pour mieux comprendre si l'induction du beiging dans un contexte d'infection aigue est similaire à celui obtenue suite à l'exposition au froid **(Gospodarska *et al.*, 2015)** ce qui permettra de définir la persistance de ce phénomène post-infection.

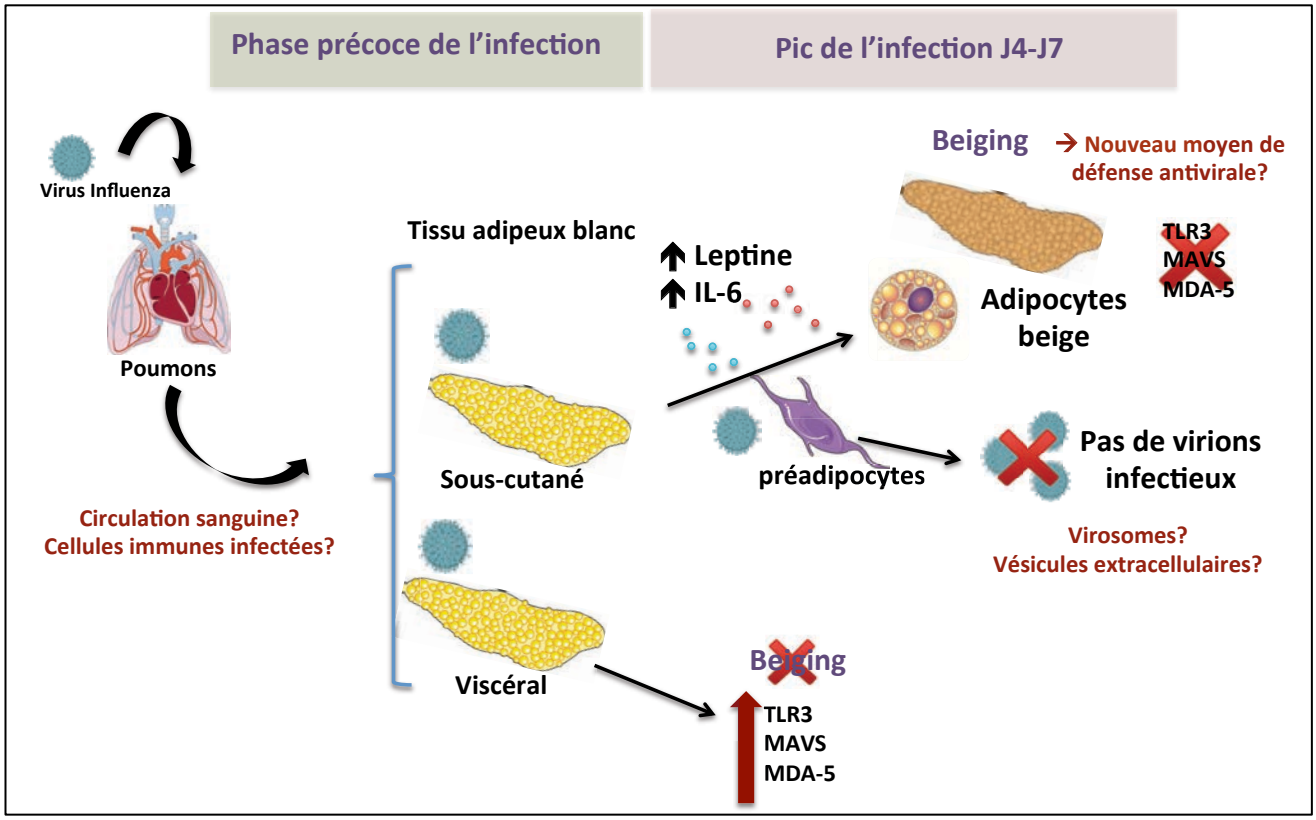

Figure 53. Schéma récapitulatif hypothétique de l'effet de l'infection par le virus de la grippe sur les deux dépôts de tissu adipeux blanc.

L'inoculation intranasale du virus influenza est suivie par une réplication virale qui s'effectue lors de la phase précoce de l'infection au niveau des poumons. Nous montrons à travers cette étude que le tissu adipeux blanc est affecté par l'infection grippale. En effet, nous avons détecté du génôme viral au niveau du dépôt sous-cutané et viscéral du tissu adipeux blanc à 7 jours p.i. La présence du virus dans les deux dépôts présente des conséquences différentes. En effet, cet effet dépôt spécifique se manifeste par la mise en place d'un phénomène de beiging et par la non-induction de l'expression des senseurs viraux (TLR3, MAVS, MDA-5) uniquement dans le dépôt sous-cutané. Les données *in vitro* ont permis de montrer que la présence du virus dans un milieu artificiel avec les préadipocytes est accompagnée d'une induction de l'expression des gènes du beiging, ce qui laisse supposer que les adipocytes beiges formés au sein du tissu adipeux blanc sous-cutané pourrait provenir d'une différenciation des préadipocytes et non d'une transdifférenciation d'adipocytes blancs. Du fait que les préadipocytes *in vitro* ne produisent pas de particules infectieuses après infections, laisse supposer que le beiging pourrait correspondre à un nouveau moyen de défense anti-virale. Le préadipocyte infecté libère des particules non-infectieuses qui pourraient correspondre à des virosomes ou à des vésicules extracellulaires, cependant des analyses complémentaires sont essentielles pour déterminer la nature de ces particules.

Références bibliographiques

Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. Neurobiol. Dis. *37*, 13–25.

Abdoli, A., Soleimanjahi, H., Kheiri, M.T., Jamali, A., Sohani, H., Abdoli, M., and Rahmatollahi, H.R. (2013). Reconstruction of H3N2 influenza virus based virosome in-vitro. Iran J Microbiol *5*, 166–171.

Abdullahi, A., Chen, P., Stanojcic, M., Sadri, A.-R., Coburn, N., and Jeschke, M.G. (2017). IL-6 Signal From the Bone Marrow is Required for the Browning of White Adipose Tissue Post Burn Injury. Shock *47*, 33.

Agyeman, P., Duppenthaler, A., Heininger, U., and Aebi, C. (2004). Influenza-associated myositis in children. Infection *32*, 199–203.

Ahima, R.S., and Flier, J.S. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. Trends Endocrinol. Metab. *11*, 327–332.

Aiewsakun, P., and Simmonds, P. (2018). The genomic underpinnings of eukaryotic virus taxonomy: creating a sequence-based framework for family-level virus classification. Microbiome *6*.

Ajuwon, K.M., Kuske, J.L., Ragland, D., Adeola, O., Hancock, D.L., Anderson, D.B., and Spurlock, M.E. (2003). The regulation of IGF-1 by leptin in the pig is tissue specific and independent of changes in growth hormone11Purdue University Agricultural Research Program # 16653. The Journal of Nutritional Biochemistry *14*, 522–530.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. Cell *124*, 783–801.

Al-Muharrmi, Z. (2010). Understanding the Influenza A H1N1 2009 Pandemic. Sultan Qaboos Univ Med J *10*, 187–195.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). Innate Immunity.

Aldiss, P., Betts, J., Sale, C., Pope, M., Budge, H., and Symonds, M.E. (2018). Exercise-induced “browning” of adipose tissues. Metab. Clin. Exp. *81*, 63–70.

Allard, R., Leclerc, P., Tremblay, C., and Tannenbaum, T.-N. (2010). Diabetes and the severity of pandemic influenza A (H1N1) infection. Diabetes Care *33*, 1491–1493.

Allen, I.C., Moore, C.B., Schneider, M., Lei, Y., Davis, B.K., Scull, M.A., Gris, D., Roney, K.E., Zimmermann, A.G., Bowzard, J.B., et al. (2011). NLRX1 protein attenuates inflammatory responses to infection by interfering with the RIG-I-MAVS and TRAF6-NF-κB signaling pathways. Immunity *34*, 854–865.

Anand, S.K., and Tikoo, S.K. (2013). Viruses as modulators of mitochondrial functions. Adv Virol *2013*, 738794.

Andrade, Z.A., and Silva, H.R. (1995). Parasitism of adipocytes by Trypanosoma cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz *90*, 521–522.

Angulo, M.A., Butler, M.G., and Cataletto, M.E. (2015). Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings. J. Endocrinol. Invest. *38*, 1249–1263.

Anhlan, D., Grundmann, N., Makalowski, W., Ludwig, S., and Scholtissek, C. (2011). Origin of the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus as studied by codon usage patterns and phylogenetic analysis. RNA *17*, 64–73.

Arias, C.F., Escalera-Zamudio, M., de los Dolores Soto-Del Río, M., Georgina Cobián-Güemes, A., Isa, P., and López, S. (2009). Molecular Anatomy of 2009 Influenza Virus A (H1N1). Archives of Medical Research *40*, 643–654.

Arner, P. (1995). Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. Ann. Med. *27*, 435–438.

Arpaia, N., Green, J.A., Moltedo, B., Arvey, A., Hemmers, S., Yuan, S., Treuting, P.M., and Rudensky, A.Y. (2015). A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. Cell *162*, 1078–1089.

Arredouani, M., Yang, Z., Ning, Y., Qin, G., Soininen, R., Tryggvason, K., and Kobzik, L. (2004). The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. J. Exp. Med. *200*, 267–272.

Asano, H., Kanamori, Y., Higurashi, S., Nara, T., Kato, K., Matsui, T., and Funaba, M. (2014). Induction of beige-like adipocytes in 3T3-L1 cells. J. Vet. Med. Sci. *76*, 57–64.

Assimacopoulos-Jeannet, F., Cusin, I., Greco-Perotto, R.M., Terrettaz, J., Rohner-Jeanrenaud, F., Zarjevski, N., and Jeanrenaud, B. (1991). Glucose transporters: structure, function, and regulation. Biochimie *73*, 67–70.

Bacchetti, P., Gripshover, B., Grunfeld, C., Heymsfield, S., McCreath, H., Osmond, D., Saag, M., Scherzer, R., Shlipak, M., Tien, P., et al. (2005). Fat distribution in men with HIV infection. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. *40*, 121–131.

Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. Bacteriol Rev *35*, 235–241.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature *392*, 245–252.

Banks, W.A., DiPalma, C.R., and Farrell, C.L. (1999). Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. Peptides *20*, 1341–1345.

Banning, M. (2005). Influenza: incidence, symptoms and treatment. Br J Nurs *14*, 1192–1197.

Barberis, I., Myles, P., Ault, S.K., Bragazzi, N.L., And Martini, M. (2016). History and evolution of influenza control through vaccination: from the first monovalent vaccine to universal vaccines. J Prev Med Hyg *57*, E115–E120.

Barichello, T., Ceretta, R.A., Generoso, J.S., Moreira, A.P., Simões, L.R., Comim, C.M., Quevedo, J., Vilela, M.C., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., et al. (2012). Cannabidiol reduces host immune response and prevents cognitive impairments in Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis. Eur. J. Pharmacol. *697*, 158–164.

Barry, D., Clarke, M., and Petry, N.M. (2009). Obesity and Its Relationship to Addictions: Is Overeating a Form of Addictive Behavior? Am J Addict *18*, 439–451.

Bartelt, A., and Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. Nature Reviews Endocrinology *10*, 24.

Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., et al. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. Nat. Med. *17*, 200–205.

Bartley, J.M., Zhou, X., Kuchel, G.A., Weinstock, G.M., and Haynes, L. (2017). Impact of Age, Caloric Restriction, and Influenza Infection on Mouse Gut Microbiome: An Exploratory Study of the Role of Age-Related Microbiome Changes on Influenza Responses. Front Immunol *8*.

Batra, A., Pietsch, J., Fedke, I., Glauben, R., Okur, B., Stroh, T., Zeitz, M., and Siegmund, B. (2007). Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes. Am. J. Pathol. *170*, 1931–1941.

Bechmann, I., Priller, J., Kovac, A., Böntert, M., Wehner, T., Klett, F.F., Bohsung, J., Stuschke, M., Dirnagl, U., and Nitsch, R. (2001). Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. Eur. J. Neurosci. *14*, 1651–1658.

Becker, M., Levings, M.K., and Daniel, C. (2017). Adipose-tissue regulatory T cells: Critical players in adipose-immune crosstalk. European Journal of Immunology *47*, 1867–1874.

Belser, J.A., Lash, R.R., Garg, S., Tumpey, T.M., and Maines, T.R. (2018). The eyes have it: influenza virus infection beyond the respiratory tract. Lancet Infect Dis.

Bełtowski, J. (2003). Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. Med. Sci. Monit. *9*, RA55-61.

Benomar, Y., Amine, H., Crépin, D., Al Rifai, S., Riffault, L., Gertler, A., and Taouis, M. (2016). Central Resistin/TLR4 Impairs Adiponectin Signaling, Contributing to Insulin and FGF21 Resistance. Diabetes *65*, 913–926.

Bertola, A., Ciucci, T., Rousseau, D., Bourlier, V., Duffaut, C., Bonnafous, S., Blin-Wakkach, C., Anty, R., Iannelli, A., Gugenheim, J., 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*, 2238–2247.

Beuther, D.A., and Sutherland, E.R. (2007). Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *175*, 661–666.

Beuther, D.A., and Sutherland, E.R. (2007). Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *175*, 661–666.

Bjørbaek, C., and Kahn, B.B. (2004). Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. Recent Prog. Horm. Res. *59*, 305–331.

Bogdanovic, E., Kraus, N., Patsouris, D., Diao, L., Wang, V., Abdullahi, A., and Jeschke, M.G. (2015). Endoplasmic reticulum stress in adipose tissue augments lipolysis. J. Cell. Mol. Med. *19*, 82–91.

Böni-Schnetzler, M., Hauri, C., and Zapf, J. (1999). Leptin is suppressed during infusion of recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF I) in normal rats. Diabetologia *42*, 160–166.

Bouvier, N.M., and Palese, P. (2008). The biology of influenza viruses. Vaccine *26 Suppl 4*, D49-53.

Boyd, M., Clezy, K., Lindley, R., and Pearce, R. (2006). Pandemic influenza: clinical issues. The Medical Journal of Australia *185*, 44.

Brameld, J.M., Atkinson, J.L., Saunders, J.C., Pell, J.M., Buttery, P.J., and Gilmour, R.S. (1996). Effects of growth hormone administration and dietary protein intake on insulin-like growth factor I and growth hormone receptor mRNA Expression in porcine liver, skeletal muscle, and adipose tissue. J. Anim. Sci. *74*, 1832–1841.

Brass, A.L., Huang, I.-C., Benita, Y., John, S.P., Krishnan, M.N., Feeley, E.M., Ryan, B.J., Weyer, J.L., van der Weyden, L., Fikrig, E., et al. (2009). The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. Cell *139*, 1243–1254.

Brestoff, J.R., Kim, B.S., Saenz, S.A., Stine, R.R., Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Thome, J.J., Farber, D.L., Lutfy, K., Seale, P., et al. (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. Nature *519*, 242–246.

Bronte, V., and Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. Nat. Rev. Immunol. *5*, 641–654.

Bruce, E.A., Medcalf, L., Crump, C.M., Noton, S.L., Stuart, A.D., Wise, H.M., Elton, D., Bowers, K., and Digard, P. (2009). Budding of filamentous and non-filamentous influenza A virus occurs via a VPS4 and VPS28-independent pathway. Virology *390*, 268–278.

Brundavani, V., Murthy, S.R., and Kurpad, A.V. (2006). Estimation of deep-abdominal-adipose-tissue (DAAT) accumulation from simple anthropometric measurements in Indian men and women. Eur J Clin Nutr *60*, 658–666.

Bruns, K., Studtrucker, N., Sharma, A., Fossen, T., Mitzner, D., Eissmann, A., Tessmer, U., Röder, R., Henklein, P., Wray, V., et al. (2007). Structural characterization and oligomerization of PB1-F2, a proapoptotic influenza A virus protein. J. Biol. Chem. *282*, 353–363.

Buckman, L.B., Hasty, A.H., Flaherty, D.K., Buckman, C.T., Thompson, M.M., Matlock, B.K., Weller, K., and Ellacott, K.L.J. (2014). Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. Brain Behav. Immun. *35*, 33–42.

Bui, M., Wills, E.G., Helenius, A., and Whittaker, G.R. (2000). Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. J. Virol. *74*, 1781–1786.

Burnet, F.M. (1940). Influenza Virus Infections of the Chick Embryo Lung. Br J Exp Pathol *21*, 147–153.

Burzyn, D., Benoist, C., and Mathis, D. (2013). Regulatory T cells in nonlymphoid tissues. Nat. Immunol. *14*, 1007–1013.

Campbell, D.J., and Koch, M.A. (2011). Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. Nat. Rev. Immunol. *11*, 119–130.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol. Rev. *84*, 277–359.

Capua, I., Mercalli, A., Pizzuto, M.S., Romero-Tejeda, A., Kasloff, S., De Battisti, C., Bonfante, F., Patrono, L.V., Vicenzi, E., Zappulli, V., et al. (2013). Influenza A Viruses Grow in Human Pancreatic Cells and Cause Pancreatitis and Diabetes in an Animal Model. J Virol *87*, 597–610.

Cardozo, D.M., Nascimento-Carvalho, C.M., Andrade, A.-L.S.S., Silvany-Neto, A.M., Daltro, C.H.C., Brandão, M.-A.S., Brandão, A.P., and Brandileone, M.-C.C. (2008). Prevalence and risk factors for nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae among adolescents. J. Med. Microbiol. *57*, 185–189.

Carey, A.L., Vorlander, C., Reddy-Luthmoodoo, M., Natoli, A.K., Formosa, M.F., Bertovic, D.A., Anderson, M.J., Duffy, S.J., and Kingwell, B.A. (2014). Reduced UCP-1 Content in In Vitro Differentiated Beige/Brite Adipocytes Derived from Preadipocytes of Human Subcutaneous White Adipose Tissues in Obesity. PLoS One *9*.

Carmen, G.-Y., and Víctor, S.-M. (2006). Signalling mechanisms regulating lipolysis. Cell. Signal. *18*, 401–408.

Carter, J.K., and Smith, R.E. (1984). Specificity of avian leukosis virus-induced hyperlipidemia. J. Virol. *50*, 301–308.

Chan, D.C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. Cell *125*, 1241–1252.

Chance, B., and Williams, G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv Enzymol Relat Subj Biochem *17*, 65–134.

Chandalia, M., and Abate, N. (2007). Metabolic complications of obesity: inflated or inflamed? J. Diabetes Complicat. *21*, 128–136.

Chavez-Munoz, C., Nguyen, K.T., Xu, W., Hong, S.-J., Mustoe, T.A., and Galiano, R.D. (2013). Transdifferentiation of Adipose-Derived Stem Cells into Keratinocyte-Like Cells: Engineering a Stratified Epidermis. PLoS One *8*.

Chawla, A., Nguyen, K.D., and Goh, Y.P.S. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. Nat. Rev. Immunol. *11*, 738–749.

Chen, I.-Y., and Ichinohe, T. (2015). Response of host inflammasomes to viral infection. Trends in Microbiology *23*, 55–63.

Chen, L.-H., Chien, Y.-W., Liang, C.-T., Chan, C.-H., Fan, M.-H., and Huang, H.-Y. (2017). Green tea extract induces genes related to browning of white adipose tissue and limits weight-gain in high energy diet-fed rat. Food Nutr Res *61*, 1347480.

Chen, L.-H., Chien, Y.-W., Liang, C.-T., Chan, C.-H., Fan, M.-H., and Huang, H.-Y. (2017). Green tea extract induces genes related to browning of white adipose tissue and limits weight-gain in high energy diet-fed rat. Food Nutr Res *61*, 1347480.

Chiavolini, D., Pozzi, G., and Ricci, S. (2008). Animal models of Streptococcus pneumoniae disease. Clin. Microbiol. Rev. *21*, 666–685.

Chlanda, P., Schraidt, O., Kummer, S., Riches, J., Oberwinkler, H., Prinz, S., Kräusslich, H.-G., and Briggs, J.A.G. (2015). Structural Analysis of the Roles of Influenza A Virus Membrane-Associated Proteins in Assembly and Morphology. J. Virol. *89*, 8957–8966.

Choe, S.S., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Kim, J.I., and Kim, J.B. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. Front Endocrinol (Lausanne) *7*.

Chuang, J.-C., Krishnan, V., Yu, H.G., Mason, B., Cui, H., Cui, H., Wilkinson, M.B., Zigman, J.M., Elmquist, J.K., Nestler, E.J., et al. (2010). A beta3-adrenergic-leptin-melanocortin circuit regulates behavioral and metabolic changes induced by chronic stress. Biol. Psychiatry *67*, 1075–1082.

Cinti, S. (2005). The adipose organ. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *73*, 9–15.

Cinti, S. (2012). The adipose organ at a glance. Dis Model Mech *5*, 588–594.

Coelho, M., Oliveira, T., and Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. Arch Med Sci *9*, 191–200.

Cohen, P., Levy, J.D., Zhang, Y., Frontini, A., Kolodin, D.P., Svensson, K.J., Lo, J.C., Zeng, X., Ye, L., Khandekar, M.J., et al. (2014). Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. Cell *156*, 304–316.

Combs, T.P., Nagajyothi, null, Mukherjee, S., de Almeida, C.J.G., Jelicks, L.A., Schubert, W., Lin, Y., Jayabalan, D.S., Zhao, D., Braunstein, V.L., et al. (2005). The adipocyte as an important target cell for Trypanosoma cruzi infection. J. Biol. Chem. *280*, 24085–24094.

Coppack, S.W. (2001). Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. Proc Nutr Soc *60*, 349–356.

Corrales-Medina, V.F., Serpa, J., Rueda, A.M., Giordano, T.P., Bozkurt, B., Madjid, M., Tweardy, D., and Musher, D.M. (2009). Acute bacterial pneumonia is associated with the occurrence of acute coronary syndromes. Medicine (Baltimore) *88*, 154–159.

Cotton, M., Innes, S., Jaspan, H., Madide, A., and Rabie, H. (2008). Management of upper respiratory tract infections in children. S Afr Fam Pract (2004) *50*, 6–12.

Couch, R.B. (1996). Orthomyxoviruses. In Medical Microbiology, S. Baron, ed. (Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston), p.

Couturier, J., and Lewis, D.E. (2018). HIV Persistence in Adipose Tissue Reservoirs. Curr HIV/AIDS Rep *15*, 60–71.

Cox, M., Rose, L., Kalua, K., de Wildt, G., Bailey, R., and Hart, J. (2017). The prevalence and risk factors for acute respiratory infections in children aged 0-59 months in rural Malawi: A cross-sectional study. Influenza Other Respir Viruses *11*, 489–496.

Cros, J.F., García-Sastre, A., and Palese, P. (2005). An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. Traffic *6*, 205–213.

Cui, X., Nguyen, N.L.T., Zarebidaki, E., Cao, Q., Li, F., Zha, L., Bartness, T., Shi, H., and Xue, B. (2016). Thermoneutrality decreases thermogenic program and promotes adiposity in high-fat diet-fed mice. Physiol Rep *4*.

Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., and Tuomanen, E.I. (1995). Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. Nature *377*, 435–438.

Dando, S.J., Mackay-Sim, A., Norton, R., Currie, B.J., St. John, J.A., Ekberg, J.A.K., Batzloff, M., Ulett, G.C., and Beacham, I.R. (2014). Pathogens Penetrating the Central Nervous System: Infection Pathways and the Cellular and Molecular Mechanisms of Invasion. Clin Microbiol Rev *27*, 691–726.

De Kloet, A.D., Pioquinto, D.J., Nguyen, D., Wang, L., Smith, J.A., Hiller, H., and Sumners, C. (2014). Obesity induces neuroinflammation mediated by altered expression of the renin-angiotensin system in mouse forebrain nuclei. Physiol Behav *0*, 31–38.

De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J.A., and Velloso, L.A. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. Endocrinology *146*, 4192–4199.

De Vries, E., Tscherne, D.M., Wienholts, M.J., Cobos-Jiménez, V., Scholte, F., García-Sastre, A., Rottier, P.J.M., and de Haan, C.A.M. (2011). Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. PLoS Pathog. *7*, e1001329.

Degawa-Yamauchi, M., Bovenkerk, J.E., Juliar, B.E., Watson, W., Kerr, K., Jones, R., Zhu, Q., and Considine, R.V. (2003). Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. J. Clin. Endocrinol. Metab. *88*, 5452–5455.

Dell, K.M., and Schulman, S.L. (1997). Rhabdomyolysis and acute renal failure in a child with influenza A infection. Pediatr. Nephrol. *11*, 363–365.

Deruisseaux, M.S., Nagajyothi, null, Trujillo, M.E., Tanowitz, H.B., and Scherer, P.E. (2007). Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease. Infect. Immun. *75*, 1066–1078.

Dessing, M.C., Florquin, S., Paton, J.C., and van der Poll, T. (2008). Toll-like receptor 2 contributes to antibacterial defence against pneumolysin-deficient pneumococci. Cell Microbiol *10*, 237–246.

Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., and Raptis, S.A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. Diabetes Res. Clin. Pract. *93 Suppl 1*, S52-59.

Djafarzadeh, S., Vuda, M., Takala, J., Ochs, M., and Jakob, S.M. (2011). Toll-like receptor-3-induced mitochondrial dysfunction in cultured human hepatocytes. Mitochondrion *11*, 83–88.

Dodd, G.T., Decherf, S., Loh, K., Simonds, S.E., Wiede, F., Balland, E., Merry, T.L., Münzberg, H., Zhang, Z.-Y., Kahn, B.B., et al. (2015). Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. Cell *160*, 88–104.

Dodd, G.T., Decherf, S., Loh, K., Simonds, S.E., Wiede, F., Balland, E., Merry, T.L., Münzberg, H., Zhang, Z.-Y., Kahn, B.B., et al. (2015). Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. Cell *160*, 88–104.

Domingo, P., Matias-Guiu, X., Pujol, R.M., Francia, E., Lagarda, E., Sambeat, M.A., and Vázquez, G. (1999). Subcutaneous adipocyte apoptosis in HIV-1 protease inhibitor-associated lipodystrophy. AIDS *13*, 2261–2267.

Doran, K.S., Fulde, M., Gratz, N., Kim, B.J., Nau, R., Prasadarao, N., Schubert-Unkmeir, A., Tuomanen, E.I., and Valentin-Weigand, P. (2016). Host–pathogen interactions in bacterial meningitis. Acta Neuropathol *131*, 185–209.

Dorfman, M.D., and Thaler, J.P. (2015). Hypothalamic inflammation and gliosis in obesity. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes *22*, 325–330.

Drel, V.R., Mashtalir, N., Ilnytska, O., Shin, J., Li, F., Lyzogubov, V.V., and Obrosova, I.G. (2006). The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. Diabetes *55*, 3335–3343.

Durcin, M., Fleury, A., Taillebois, E., Hilairet, G., Krupova, Z., Henry, C., Truchet, S., Trötzmüller, M., Köfeler, H., Mabilleau, G., et al. (2017). Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. J Extracell Vesicles *6*, 1305677.

Eagle, H., and Habel, K. (1956). The nutritional requirements for the propagation of poliomyelitis virus by the HeLa cell. J. Exp. Med. *104*, 271–287.

Easterbrook, J.D., Dunfee, R.L., Schwartzman, L.M., Jagger, B.W., Sandouk, A., Kash, J.C., Memoli, M.J., and Taubenberger, J.K. (2011). Obese mice have increased morbidity and mortality compared to non-obese mice during infection with the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. Influenza Other Respir Viruses 5, 418–425.

Eder, K., Baffy, N., Falus, A., and Fulop, A.K. (2009). The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. Inflamm. Res. *58*, 727–736.

Eichelberger, M.C., Wang, M.L., Allan, W., Webster, R.G., and Doherty, P.C. (1991). Influenza virus RNA in the lung and lymphoid tissue of immunologically intact and CD4-depleted mice. J. Gen. Virol. *72 (Pt 7)*, 1695–1698.

Eichelberger, M.C., Wang, M.L., Allan, W., Webster, R.G., and Doherty, P.C. (1991). Influenza virus RNA in the lung and lymphoid tissue of immunologically intact and CD4-depleted mice. J. Gen. Virol. *72 (Pt 7)*, 1695–1698.

El-Bacha, T., and Da Poian, A.T. (2013). Virus-induced changes in mitochondrial bioenergetics as potential targets for therapy. Int. J. Biochem. Cell Biol. *45*, 41–46.

Fabbiano, S., Suárez-Zamorano, N., Rigo, D., Veyrat-Durebex, C., Stevanovic Dokic, A., Colin, D.J., and Trajkovski, M. (2016). Caloric Restriction Leads to Browning of White Adipose Tissue through Type 2 Immune Signaling. Cell Metab. *24*, 434–446.

Fain, J.N., Bahouth, S.W., and Madan, A.K. (2004). TNFalpha release by the nonfat cells of human adipose tissue. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. *28*, 616–622.

Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P., and Bahouth, S.W. (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*, 2273–2282.

Fearnley, R.A., Lines, S.W., Lewington, A.J.P., and Bodenham, A.R. (2011). Influenza A-induced rhabdomyolysis and acute kidney injury complicated by posterior reversible encephalopathy syndrome. Anaesthesia *66*, 738–742.

Feeley, E.M., Sims, J.S., John, S.P., Chin, C.R., Pertel, T., Chen, L.-M., Gaiha, G.D., Ryan, B.J., Donis, R.O., Elledge, S.J., et al. (2011). IFITM3 Inhibits Influenza A Virus Infection by Preventing Cytosolic Entry. PLOS Pathogens *7*, e1002337.

Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2009). UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. Cell Metab. *9*, 203–209.

Fenoll, A., Jado, I., Vicioso, D., Pérez, A., and Casal, J. (1998). Evolution of Streptococcus pneumoniae Serotypes and Antibiotic Resistance in Spain: Update (1990 to 1996). J Clin Microbiol *36*, 3447–3454.

Ferrante, A.W. (2013). The Immune Cells in Adipose Tissue. Diabetes Obes Metab *15*, 34–38.

Ferré, P., and Foufelle, F. (2007). SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. Horm. Res. *68*, 72–82.

Ferreira, A.V.M., Segatto, M., Menezes, Z., Macedo, A.M., Gelape, C., de Oliveira Andrade, L., Nagajyothi, F., Scherer, P.E., Teixeira, M.M., and Tanowitz, H.B. (2011). Evidence for Trypanosoma cruzi in adipose tissue in human chronic Chagas disease. Microbes Infect. *13*, 1002–1005.

Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., et al. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. Nat. Med. *15*, 930–939.

Fieber, C., and Kovarik, P. (2014). Responses of innate immune cells to group A Streptococcus. Front Cell Infect Microbiol *4*.

Fisher-Hoch, S.P., Mathews, C.E., and McCormick, J.B. (2013). Obesity, diabetes and pneumonia: the menacing interface of non-communicable and infectious diseases. Trop. Med. Int. Health *18*, 1510–1519.

Flach, M., and Diefenbach, A. (2015). Adipose tissue: ILC2 crank up the heat. Cell Metab. *21*, 152–153.

Flickinger, T.W., and Salz, H.K. (1994). The Drosophila sex determination gene snf encodes a nuclear protein with sequence and functional similarity to the mammalian U1A snRNP protein. Genes Dev. *8*, 914–925.

Fouchier, R.A.M., Schneeberger, P.M., Rozendaal, F.W., Broekman, J.M., Kemink, S.A.G., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G.F., Schutten, M., Van Doornum, G.J.J., et al. (2004). Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 1356–1361.

Frabutt, D.A., Wang, B., Riaz, S., Schwartz, R.C., and Zheng, Y.-H. (2018). Innate Sensing of Influenza A Virus Hemagglutinin Glycoproteins by the Host Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Pathway Triggers a Potent Antiviral Response via ER-Associated Protein Degradation. J. Virol. *92*, e01690-17.

Francis, T. (1953). Vaccination against influenza. Bull World Health Organ *8*, 725–741.

Franco, J.R., Simarro, P.P., Diarra, A., and Jannin, J.G. (2014). Epidemiology of human African trypanosomiasis. Clin Epidemiol *6*, 257–275.

Frayn, K.N. (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. Diabetologia *45*, 1201–1210.

Fried, S.K., Ricci, M.R., Russell, C.D., and Laferrère, B. (2000). Regulation of Leptin Production in Humans. J Nutr *130*, 3127S-3131S.

Fuhrman, C., Roche, N., Vergnenègre, A., Zureik, M., Chouaid, C., and Delmas, M.-C. (2011). Hospital admissions related to acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease in France, 1998-2007. Respir Med 105, 595–601.

Fujimoto, S., Kobayashi, M., Uemura, O., Iwasa, M., Ando, T., Katoh, T., Nakamura, C., Maki, N., Togari, H., and Wada, Y. (1998). PCR on cerebrospinal fluid to show influenza-associated acute encephalopathy or encephalitis. Lancet *352*, 873–875.

Gamblin, S.J., and Skehel, J.J. (2010). Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. J. Biol. Chem. *285*, 28403–28409.

Gao, Q., Chou, Y.-Y., Doğanay, S., Vafabakhsh, R., Ha, T., and Palese, P. (2012). The influenza A virus PB2, PA, NP, and M segments play a pivotal role during genome packaging. J. Virol. *86*, 7043–7051.

Gao, X., Salomon, C., and Freeman, D.J. (2017). Extracellular Vesicles from Adipose Tissue—A Potential Role in Obesity and Type 2 Diabetes? Front Endocrinol (Lausanne) *8*.

Gao, Y., Qimuge, N.R., Qin, J., Cai, R., Li, X., Chu, G.Y., Pang, W.J., and Yang, G.S. (2018). Acute and chronic cold exposure differentially affects the browning of porcine white adipose tissue. Animal *12*, 1435–1441.

Garcia, M.N., Woc-Colburn, L., Aguilar, D., Hotez, P.J., and Murray, K.O. (2015). Historical Perspectives on the Epidemiology of Human Chagas Disease in Texas and Recommendations for Enhanced Understanding of Clinical Chagas Disease in the Southern United States. PLOS Neglected Tropical Diseases *9*, e0003981.

Gazit, R., Gruda, R., Elboim, M., Arnon, T.I., Katz, G., Achdout, H., Hanna, J., Qimron, U., Landau, G., Greenbaum, E., et al. (2006). Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene Ncr1. Nat. Immunol. *7*, 517–523.

Gelderblom, H.R. (1996). Structure and Classification of Viruses. In Medical Microbiology, S. Baron, ed. (Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston), p.

Gerber, M., Isel, C., Moules, V., and Marquet, R. (2014). Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. Trends Microbiol. *22*, 446–455.

Giordano, A., Frontini, A., and Cinti, S. (2008). Adipose organ nerves revealed by immunohistochemistry. Methods Mol. Biol. *456*, 83–95.

Godfrey, D.I., Stankovic, S., and Baxter, A.G. (2010). Raising the NKT cell family. Nat. Immunol. *11*, 197–206.

Goffic, R.L., Leymarie, O., Chevalier, C., Rebours, E., Costa, B.D., Vidic, J., Descamps, D., Sallenave, J.-M., Rauch, M., Samson, M., et al. (2011). Transcriptomic Analysis of Host Immune and Cell Death Responses Associated with the Influenza A Virus PB1-F2 Protein. PLOS Pathogens *7*, e1002202.

Gospodarska, E., Nowialis, P., and Kozak, L.P. (2015). Mitochondrial turnover: a phenotype distinguishing brown adipocytes from interscapular brown adipose tissue and white adipose tissue. J. Biol. Chem. *290*, 8243–8255.

Gospodarska, E., Nowialis, P., and Kozak, L.P. (2015). Mitochondrial turnover: a phenotype distinguishing brown adipocytes from interscapular brown adipose tissue and white adipose tissue. J. Biol. Chem. *290*, 8243–8255.

Gosztonyi, G., and Ludwig, H. (1995). Borna disease--neuropathology and pathogenesis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *190*, 39–73.

Grant, S.F.A., Li, M., Bradfield, J.P., Kim, C.E., Annaiah, K., Santa, E., Glessner, J.T., Casalunovo, T., Frackelton, E.C., Otieno, F.G., et al. (2008). Association analysis of the FTO gene with obesity in children of Caucasian and African ancestry reveals a common tagging SNP. PLoS ONE *3*, e1746.

Grenier, D., and Bodet, C. (2008). Streptococcus suis stimulates ICAM-1 shedding from microvascular endothelial cells. FEMS Immunol Med Microbiol *54*, 271–276.

Grinspoon, S., and Carr, A. (2005). Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. N. Engl. J. Med. *352*, 48–62.

Grundy, S.M., Brewer, H.B., Cleeman, J.I., Smith, S.C., Lenfant, C., American Heart Association, and National Heart, Lung, and Blood Institute (2004). Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. Circulation *109*, 433–438.

Guan, Y., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Zhu, H., Wang, J., and Smith, G.J.D. (2010). The emergence of pandemic influenza viruses. Protein Cell *1*, 9–13.

Guarner, J., and Falcón-Escobedo, R. (2009). Comparison of the pathology caused by H1N1, H5N1, and H3N2 influenza viruses. Arch. Med. Res. *40*, 655–661.

Guigas, B., and Molofsky, A.B. (2015). A worm of one's own: how helminths modulate host adipose tissue function and metabolism. Trends Parasitol. *31*, 435–441.

Haagsman, H.P., de Haas, C.G., Geelen, M.J., and van Golde, L.M. (1981). Regulation of triacylglycerol synthesis in the liver: a decrease in diacylglycerol acyltransferase activity after treatment of isolated rat hepatocytes with glucagon. Biochim. Biophys. Acta *664*, 74–81.

Hagiwara, K., Kondoh, Y., Ueda, A., Yamada, K., Goto, H., Watanabe, T., Nakata, T., Osada, H., and Aida, Y. (2010). Discovery of novel antiviral agents directed against the influenza A virus nucleoprotein using photo-cross-linked chemical arrays. Biochem. Biophys. Res. Commun. *394*, 721–727.

Hale, B.G., Randall, R.E., Ortín, J., and Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. J. Gen. Virol. *89*, 2359–2376.

Han, J., Meng, Q., Shen, L., and Wu, G. (2018). Interleukin-6 induces fat loss in cancer cachexia by promoting white adipose tissue lipolysis and browning. Lipids Health Dis *17*.

Han, S., Sun, H.M., Hwang, K.-C., and Kim, S.-W. (2015). Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells: Update on Clinical Utility and Efficacy. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. *25*, 145–152.

Hanage, W.P., Kaijalainen, T.H., Syrjänen, R.K., Auranen, K., Leinonen, M., Mäkelä, P.H., and Spratt, B.G. (2005). Invasiveness of serotypes and clones of Streptococcus pneumoniae among children in Finland. Infect. Immun. *73*, 431–435.

Hancock, K., Veguilla, V., Lu, X., Zhong, W., Butler, E.N., Sun, H., Liu, F., Dong, L., DeVos, J.R., Gargiullo, P.M., et al. (2009). Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. N. Engl. J. Med. *361*, 1945–1952.

Hao, L., Sakurai, A., Watanabe, T., Sorensen, E., Nidom, C.A., Newton, M.A., Ahlquist, P., and Kawaoka, Y. (2008). Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. Nature *454*, 890–893.

Hardie, J.M., and Whiley, R.A. (1997). Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus. J. Appl. Microbiol. *83*, 1S-11S.

Harris, D.M., Dunshea, F.R., Bauman, D.E., Boyd, R.D., Wang, S.Y., Johnson, P.A., and Clarke, S.D. (1993). Effect of in vivo somatotropin treatment of growing pigs on adipose tissue lipogenesis. J. Anim. Sci. *71*, 3293–3300.

Hashimoto, G., Wright, P.F., and Karzon, D.T. (1983). Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against influenza virus-infected cells. J. Infect. Dis. *148*, 785–794.

Hashimoto, Y., Moki, T., Takizawa, T., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y. (2007). Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. J. Immunol. *178*, 2448–2457.

Hassan, I.H., Zhang, M.S., Powers, L.S., Shao, J.Q., Baltrusaitis, J., Rutkowski, D.T., Legge, K., and Monick, M.M. (2012). Influenza A Viral Replication Is Blocked by Inhibition of the Inositol-requiring Enzyme 1 (IRE1) Stress Pathway. J Biol Chem *287*, 4679–4689.

Hassane, M., Demon, D., Soulard, D., Fontaine, J., Keller, L.E., Patin, E.C., Porte, R., Prinz, I., Ryffel, B., Kadioglu, A., et al. (2017). Neutrophilic NLRP3 inflammasome-dependent IL-1β secretion regulates the γδT17 cell response in respiratory bacterial infections. Mucosal Immunol *10*, 1056–1068.

He, Q., Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Yun, Z., and Ye, J. (2011). Regulation of HIF-1{alpha} activity in adipose tissue by obesity-associated factors: adipogenesis, insulin, and hypoxia. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *300*, E877-885.

Heaton, N.S., Moshkina, N., Fenouil, R., Gardner, T.J., Aguirre, S., Shah, P.S., Zhao, N., Manganaro, L., Hultquist, J.F., Noel, J., et al. (2016). Targeting Viral Proteostasis Limits Influenza Virus, HIV, and Dengue Virus Infection. Immunity *44*, 46–58.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature *408*, 740–745.

Henkel, M., Mitzner, D., Henklein, P., Meyer-Almes, F.-J., Moroni, A., Difrancesco, M.L., Henkes, L.M., Kreim, M., Kast, S.M., Schubert, U., et al. (2010). The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 forms a nonselective ion channel. PLoS ONE *5*, e11112.

Henrichsen, J. (1999). Typing of Streptococcus pneumoniae: past, present, and future. Am. J. Med. *107*, 50S-54S.

Herold, S., von Wulffen, W., Steinmueller, M., Pleschka, S., Kuziel, W.A., Mack, M., Srivastava, M., Seeger, W., Maus, U.A., and Lohmeyer, J. (2006). Alveolar epithelial cells direct monocyte transepithelial migration upon influenza virus infection: impact of chemokines and adhesion molecules. J. Immunol. *177*, 1817–1824.

Herrera, B.M., and Lindgren, C.M. (2010). The Genetics of Obesity. Curr Diab Rep *10*, 498–505.

Hick, R.W., Gruver, A.L., Ventevogel, M.S., Haynes, B.F., and Sempowski, G.D. (2006). Leptin selectively augments thymopoiesis in leptin deficiency and lipopolysaccharide-induced thymic atrophy. J. Immunol. *177*, 169–176.

Ho, P.-C., and Wei, L.-N. (2012). Biological Activities of Receptor-interacting Protein 140 in Adipocytes and Metabolic Diseases. Curr Diabetes Rev *8*, 452–457.

Hoeve, M.A., Nash, A.A., Jackson, D., Randall, R.E., and Dransfield, I. (2012). Influenza virus A infection of human monocyte and macrophage subpopulations reveals increased susceptibility associated with cell differentiation. PLoS ONE *7*, e29443.

Holmes, A.R., McNab, R., Millsap, K.W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J.L., and Jenkinson, H.F. (2001). The pavA gene of Streptococcus pneumoniae encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. Mol. Microbiol. *41*, 1395–1408.

Holt, P.G., Strickland, D.H., Wikström, M.E., and Jahnsen, F.L. (2008). Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. Nat. Rev. Immunol. *8*, 142–152.

Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. J. Biol. Chem. *286*, 12983–12990.

Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. Nature *444*, 860–867.

Howard, J.K., Cave, B.J., Oksanen, L.J., Tzameli, I., Bjørbaek, C., and Flier, J.S. (2004). Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. Nat. Med. *10*, 734–738.

Hu, M., Jin, Y., Zhou, J., Huang, Z., Li, B., Zhou, W., Ren, H., Yue, J., and Liang, L. (2017). Genetic Characteristic and Global Transmission of Influenza A H9N2 Virus. Front Microbiol *8*.

Huber, V.C., Lynch, J.M., Bucher, D.J., Le, J., and Metzger, D.W. (2001). Fc receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections. J. Immunol. *166*, 7381–7388.

Hui, K.P.Y., Li, H.S., Cheung, M.C., Chan, R.W.Y., Yuen, K.M., Mok, C.K.P., Nicholls, J.M., Peiris, J.S.M., and Chan, M.C.W. (2016). Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus delays apoptotic responses via activation of STAT3. Scientific Reports *6*, 28593.

Hulme, K.D., Gallo, L.A., and Short, K.R. (2017). Influenza Virus and Glycemic Variability in Diabetes: A Killer Combination? Front Microbiol *8*.

Huson, M.A.M., Stolp, S.M., van der Poll, T., and Grobusch, M.P. (2014). Community-acquired bacterial bloodstream infections in HIV-infected patients: a systematic review. Clin. Infect. Dis. *58*, 79–92.

Hussaarts, L., García-Tardón, N., van Beek, L., Heemskerk, M.M., Haeberlein, S., van der Zon, G.C., Ozir-Fazalalikhan, A., Berbée, J.F.P., Willems van Dijk, K., van Harmelen, V., et al. (2015). Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. FASEB J. *29*, 3027–3039.

Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K., and Brown, J.S. (2010). The Streptococcus pneumoniae capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. Infect. Immun. *78*, 704–715.

Ibrahim, M.M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. Obes Rev *11*, 11–18.

Ibricevic, A., Pekosz, A., Walter, M.J., Newby, C., Battaile, J.T., Brown, E.G., Holtzman, M.J., and Brody, S.L. (2006). Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. J. Virol. *80*, 7469–7480.

Ichinohe, T. (2010). Respective roles of TLR, RIG-I and NLRP3 in influenza virus infection and immunity: impact on vaccine design. Expert Rev Vaccines *9*, 1315–1324.

Igarashi, M., Yamatani, K., Fukase, N., Daimon, M., Ohnuma, H., Takahashi, H., Manaka, H., Tominaga, M., and Sasaki, H. (1992). Sepsis inhibits insulin-stimulated glucose transport in isolated rat adipocytes. Diabetes Res. Clin. Pract. *15*, 213–218.

Ikonen, N., Strengell, M., Kinnunen, L., Osterlund, P., Pirhonen, J., Broman, M., Davidkin, I., Ziegler, T., and Julkunen, I. (2010). High frequency of cross-reacting antibodies against 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus among the elderly in Finland. Euro Surveill. *15*.

Ishikawa, H., Fukui, T., Ino, S., Sasaki, H., Awano, N., Kohda, C., and Tanaka, K. (2016). Influenza virus infection causes neutrophil dysfunction through reduced G-CSF production and an increased risk of secondary bacteria infection in the lung. Virology *499*, 23–29.

Ivanov, S., Paget, C., and Trottein, F. (2014). Role of Non-conventional T Lymphocytes in Respiratory Infections: The Case of the Pneumococcus. PLOS Pathogens *10*, e1004300.

Iwasaki, A., and Pillai, P.S. (2014). Innate immunity to influenza virus infection. Nat. Rev. Immunol. *14*, 315–328.

Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Fujii, Y., and Kawaoka, Y. (2004). Generation of Influenza A Virus NS2 (NEP) Mutants with an Altered Nuclear Export Signal Sequence. J. Virol. *78*, 10149–10155.

Jacobsson, A., Mühleisen, M., Cannon, B., and Nedergaard, J. (1994). The uncoupling protein thermogenin during acclimation: indications for pretranslational control. Am. J. Physiol. *267*, R999-1007.

Jain, N., Lodha, R., and Kabra, S.K. (2001). Upper respiratory tract infections. Indian J Pediatr *68*, 1135–1138.

Jamaluddin, M.S., Weakley, S.M., Yao, Q., and Chen, C. (2012). Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. Br. J. Pharmacol. *165*, 622–632.

Janke, R., Genzel, Y., Wetzel, M., and Reichl, U. (2011). Effect of influenza virus infection on key metabolic enzyme activities in MDCK cells. BMC Proc *5*, P129.

Jaworska, J., Coulombe, F., Downey, J., Tzelepis, F., Shalaby, K., Tattoli, I., Berube, J., Rousseau, S., Martin, J.G., Girardin, S.E., et al. (2014). NLRX1 prevents mitochondrial induced apoptosis and enhances macrophage antiviral immunity by interacting with influenza virus PB1-F2 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *111*, E2110-2119.

Jayasekera, J.P., Vinuesa, C.G., Karupiah, G., and King, N.J.C. (2006). Enhanced antiviral antibody secretion and attenuated immunopathology during influenza virus infection in nitric oxide synthase-2-deficient mice. J. Gen. Virol. *87*, 3361–3371.

Jedrzejas, M.J. (2001). Pneumococcal virulence factors: structure and function. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *65*, 187-207 ; first page, table of contents.

Jeschke, M.G., Gauglitz, G.G., Kulp, G.A., Finnerty, C.C., Williams, F.N., Kraft, R., Suman, O.E., Mlcak, R.P., and Herndon, D.N. (2011). Long-term persistance of the pathophysiologic response to severe burn injury. PLoS ONE *6*, e21245.

Johndrow, C., Nelson, R., Tanowitz, H., Weiss, L.M., and Nagajyothi, F. (2014). Trypanosoma cruzi infection results in an increase in intracellular cholesterol. Microbes Infect. *16*, 337–344.

Jørgensen, J.O.L., Møller, L., Krag, M., Billestrup, N., and Christiansen, J.S. (2007). Effects of growth hormone on glucose and fat metabolism in human subjects. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. *36*, 75–87.

Jung, U.J., and Choi, M.-S. (2014). Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Int J Mol Sci *15*, 6184–6223.

Juno, J.A., Keynan, Y., and Fowke, K.R. (2012). Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection. PLoS Pathog. *8*, e1002838.

Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. (2008). The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nat. Rev. Microbiol. *6*, 288–301.

Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr. Rev. *26*, 439–451.

Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., et al. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. J Clin Invest *116*, 1494–1505.

Kanoski, S.E., Zhang, Y., Zheng, W., and Davidson, T.L. (2010). The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. J. Alzheimers Dis. *21*, 207–219.

Kaplan, J.L., Marshall, M.A., C. McSkimming, C., Harmon, D.B., Garmey, J.C., Oldham, S.N., Hallowell, P., and McNamara, C.A. (2015). Adipocyte progenitor cells initiate monocyte chemoattractant protein-1-mediated macrophage accumulation in visceral adipose tissue. Mol Metab *4*, 779–794.

Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K.-P., Artarini, A., Heuer, D., Becker, D., Khalil, H., Ogilvie, L.A., Hess, S., et al. (2010). Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. Nature *463*, 818–822.

Karlsson, E.A., and Beck, M.A. (2010). The burden of obesity on infectious disease. Exp. Biol. Med. (Maywood) 235, 1412–1424.

Karlström, A., Heston, S.M., Boyd, K.L., Tuomanen, E.I., and McCullers, J.A. (2011). Toll-like receptor 2 mediates fatal immunopathology in mice during treatment of secondary pneumococcal pneumonia following influenza. J. Infect. Dis. *204*, 1358–1366.

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. Nature *441*, 101–105.

Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity *34*, 637–650.

Kennedy, P.G.E. (2006). Human African trypanosomiasis-neurological aspects. J. Neurol. *253*, 411–416.

Kern, P.A., Saghizadeh, M., Ong, J.M., Bosch, R.J., Deem, R., and Simsolo, R.B. (1995). The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. J. Clin. Invest. *95*, 2111–2119.

Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. J. Clin. Endocrinol. Metab. *89*, 2548–2556.

Kersten, S. (2014). Physiological regulation of lipoprotein lipase. Biochim. Biophys. Acta *1841*, 919–933.

Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. Physiol. Rev. *91*, 461–553.

Khan, M.N., Xu, Q., and Pichichero, M.E. (2017). Protection against Streptococcus pneumoniae Invasive Pathogenesis by a Protein-Based Vaccine Is Achieved by Suppression of Nasopharyngeal Bacterial Density during Influenza A Virus Coinfection. Infect. Immun. *85*, e00530-16.

Kim, S.-J., Kim, J.-S., Park, E.S., Lee, J.-S., Lin, Q., Langley, R.R., Maya, M., He, J., Kim, S.-W., Weihua, Z., et al. (2011). Astrocytes upregulate survival genes in tumor cells and induce protection from chemotherapy. Neoplasia *13*, 286–298.

Kim, S.U., and de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. J. Neurosci. Res. *81*, 302–313.

Kim, Y.H. (2017). Understanding of Host Switch and Host Adaptation to the Avian Influenza Viruses. Journal of Bacteriology and Virology *47*, 14.

Kim, Y.S., Carp, R.I., Callahan, S.M., and Wisniewski, H.M. (1988). Adrenal involvement in scrapie-induced obesity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *189*, 21–27.

Kinjo, Y., Illarionov, P., Vela, J.L., Pei, B., Girardi, E., Li, X., Li, Y., Imamura, M., Kaneko, Y., Okawara, A., et al. (2011). Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. Nat. Immunol. *12*, 966–974.

Kita, H. (2011). Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. Immunol. Rev. *242*, 161–177.

Klein, M., Obermaier, B., Angele, B., Pfister, H.-W., Wagner, H., Koedel, U., and Kirschning, C.J. (2008). Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. J. Infect. Dis. *198*, 1028–1036.

Klemperer, H. (1961). Glucose breakdown in chick embryo cells infected with influenza virus. Virology *13*, 68–77.

Koedel, U., and Pfister, H.W. (1999). Oxidative stress in bacterial meningitis. Brain Pathol. *9*, 57–67.

Kohio, H.P., and Adamson, A.L. (2013). Glycolytic control of vacuolar-type ATPase activity: a mechanism to regulate influenza viral infection. Virology *444*, 301–309.

König, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H.-H., Bhattacharyya, S., Alamares, J.G., Tscherne, D.M., Ortigoza, M.B., Liang, Y., et al. (2010). Human host factors required for influenza virus replication. Nature *463*, 813–817.

Kooijman, S., Wang, Y., Parlevliet, E.T., Boon, M.R., Edelschaap, D., Snaterse, G., Pijl, H., Romijn, J.A., and Rensen, P.C.N. (2015). Central GLP-1 receptor signalling accelerates plasma clearance of triacylglycerol and glucose by activating brown adipose tissue in mice. Diabetologia *58*, 2637–2646.

Koppe, U., Suttorp, N., and Opitz, B. (2012). Recognition of Streptococcus pneumoniae by the innate immune system. Cellular Microbiology *14*, 460–466.

Krammer, F., Smith, G.J.D., Fouchier, R.A.M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P.C., Palese, P., Shaw, M.L., Treanor, J., Webster, R.G., et al. (2018). Influenza. Nature Reviews Disease Primers *4*, 3.

Kratz, M., Coats, B.R., Hisert, K.B., Hagman, D., Mutskov, V., Peris, E., Schoenfelt, K.Q., Kuzma, J.N., Larson, I., Billing, P.S., et al. (2014). Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. Cell Metab. *20*, 614–625.

Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci. *19*, 312–318.

Krishnan, J., Danzer, C., Simka, T., Ukropec, J., Walter, K.M., Kumpf, S., Mirtschink, P., Ukropcova, B., Gasperikova, D., Pedrazzini, T., et al. (2012). Dietary obesity-associated Hif1α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD+ system. Genes Dev. *26*, 259–270.

Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., and Grüters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. Nat. Genet. *19*, 155–157.

Kudva, A., Scheller, E.V., Robinson, K.M., Crowe, C.R., Choi, S.M., Slight, S.R., Khader, S.A., Dubin, P.J., Enelow, R.I., Kolls, J.K., et al. (2011). Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice. J. Immunol. *186*, 1666–1674.

Kuiken, T., and Taubenberger, J.K. (2008). Pathology of human influenza revisited. Vaccine *26 Suppl 4*, D59-66.

Kumlin, U., Olofsson, S., Dimock, K., and Arnberg, N. (2008). Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. Influenza Other Respir Viruses *2*, 147–154.

Kuriakose, T., and Kanneganti, T.-D. (2017). Regulation and functions of NLRP3 inflammasome during influenza virus infection. Molecular Immunology *86*, 56–64.

Kuriyama, H., Shimomura, I., Kishida, K., Kondo, H., Furuyama, N., Nishizawa, H., Maeda, N., Matsuda, M., Nagaretani, H., Kihara, S., et al. (2002). Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. Diabetes *51*, 2915–2921.

Kwok, K.H.M., Lam, K.S.L., and Xu, A. (2016). Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. Experimental & Molecular Medicine *48*, e215.

Lafontan, M. (2014). Adipose tissue and adipocyte dysregulation. Diabetes Metab. *40*, 16–28.

LaFranchi, S., Hanna, C.E., Torresani, T., Schoenle, E., and Illig, R. (1985). Comparison of growth hormone binding and metabolic response in rat adipocytes of epididymal, subcutaneous, and retroperitoneal origin. Acta Endocrinol. *110*, 50–55.

Lago, F., Gómez, R., Gómez-Reino, J.J., Dieguez, C., and Gualillo, O. (2009). Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. Trends Biochem. Sci. *34*, 500–510.

Lalvani, A., Brookes, R., Hambleton, S., Britton, W.J., Hill, A.V., and McMichael, A.J. (1997). Rapid effector function in CD8+ memory T cells. J. Exp. Med. *186*, 859–865.

Laver, G., and Garman, E. (2002). Pandemic influenza: its origin and control. Microbes and Infection *4*, 1309–1316.

Le Goffic, R., Balloy, V., Lagranderie, M., Alexopoulou, L., Escriou, N., Flavell, R., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2006). Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. PLoS Pathog. *2*, e53.

Lee, M.-W., Odegaard, J.I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Yun, K., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2015). Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. Cell *160*, 74–87.

Lee, N., Wong, C.K., Hui, D.S.C., Lee, S.K.W., Wong, R.Y.K., Ngai, K.L.K., Chan, M.C.W., Chu, Y.J., Ho, A.W.Y., Lui, G.C.Y., et al. (2013). Role of human Toll-like receptors in naturally occurring influenza A infections. Influenza Other Respir Viruses *7*, 666–675.

Lee, S.D., and Tontonoz, P. (2014). Eosinophils in fat: pink is the new brown. Cell *157*, 1249–1250.

Lee, S.J., Evers, S., Roeder, D., Parlow, A.F., Risteli, J., Risteli, L., Lee, Y.C., Feizi, T., Langen, H., and Nussenzweig, M.C. (2002). Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. Science *295*, 1898–1901.

Lee, Y.-H., Petkova, A.P., and Granneman, J.G. (2013). Identification of an Adipogenic Niche for Adipose Tissue Remodeling and Restoration. Cell Metab *18*, 355–367.

Lee, Y.-H., Petkova, A.P., Mottillo, E.P., and Granneman, J.G. (2012). In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. Cell Metab. *15*, 480–491.

Lefkowitz, E.J., Dempsey, D.M., Hendrickson, R.C., Orton, R.J., Siddell, S.G., and Smith, D.B. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Nucleic Acids Res *46*, D708–D717.

Lemieux, S., and Després, J.P. (1994). Metabolic complications of visceral obesity: contribution to the aetiology of type 2 diabetes and implications for prevention and treatment. Diabete Metab *20*, 375–393.

Lemieux, S., and Després, J.P. (1994). Metabolic complications of visceral obesity: contribution to the aetiology of type 2 diabetes and implications for prevention and treatment. Diabete Metab *20*, 375–393.

León, B., Bradley, J.E., Lund, F.E., Randall, T.D., and Ballesteros-Tato, A. (2014). FoxP3^{+} regulatory T cells promote influenza-specific Tfh responses by controlling IL-2 availability. Nature Communications *5*, 3495.

Li, G., Xie, C., Lu, S., Nichols, R.G., Tian, Y., Li, L., Patel, D., Ma, Y., Brocker, C.N., Yan, T., et al. (2017). Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. Cell Metabolism *26*, 672-685.e4.

Li, J., Yang, Q., Bai, Z., Zhou, W., Semenza, G.L., and Ge, R.-L. (2018). Chronic cold exposure results in subcutaneous adipose tissue browning and altered global metabolism in Qinghai-Tibetan plateau pika (Ochotona curzoniae). Biochem. Biophys. Res. Commun. *500*, 117–123.

Li, Y., Fromme, T., and Klingenspor, M. (2017). Meaningful respirometric measurements of UCP1-mediated thermogenesis. Biochimie *134*, 56–61.

Liberti, M.V., and Locasale, J.W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? Trends Biochem. Sci. *41*, 211–218.

Lihn, A.S., Pedersen, S.B., and Richelsen, B. (2005). Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. Obes Rev *6*, 13–21.

Lin, J., Barb, C.R., Matteri, R.L., Kraeling, R.R., Chen, X., Meinersmann, R.J., and Rampacek, G.B. (2000). Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig. Domestic Animal Endocrinology, Domestic Animal Endocrinology. *19*, 53–61.

Lin, Y., Lee, H., Berg, A.H., Lisanti, M.P., Shapiro, L., and Scherer, P.E. (2000). The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. J. Biol. Chem. *275*, 24255–24263.

Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clément, K., Glickman, J.N., Sukhova, G.K., Wolters, P.J., Du, J., Gorgun, C.Z., et al. (2009). Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. Nat. Med. *15*, 940–945.

Liu, P.-S., Lin, Y.-W., Burton, F.H., and Wei, L.-N. (2015). M1-M2 balancing act in white adipose tissue browning - a new role for RIP140. Adipocyte *4*, 146–148.

Lodmell, D.L., Dimcheff, D.E., and Ewalt, L.C. (2006). Viral RNA in the bloodstream suggests viremia occurs in clinically ill rabies-infected mice. Virus Res. *116*, 114–118.

Lolmède, K., Duffaut, C., Zakaroff-Girard, A., and Bouloumié, A. (2011). Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders. Diabetes Metab. *37*, 283–290.

Londrigan, S.L., Short, K.R., Ma, J., Gillespie, L., Rockman, S.P., Brooks, A.G., and Reading, P.C. (2015). Infection of Mouse Macrophages by Seasonal Influenza Viruses Can Be Restricted at the Level of Virus Entry and at a Late Stage in the Virus Life Cycle. J Virol *89*, 12319–12329.

Loos, R.J.F., Lindgren, C.M., Li, S., Wheeler, E., Zhao, J.H., Prokopenko, I., Inouye, M., Freathy, R.M., Attwood, A.P., Beckmann, J.S., et al. (2008). Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. Nat. Genet. *40*, 768–775.

Louveau, I., and Gondret, F. (2004). Regulation of development and metabolism of adipose tissue by growth hormone and the insulin-like growth factor system. Domest. Anim. Endocrinol. *27*, 241–255.

Louveau, I., and Gondret, F. (2004). Regulation of development and metabolism of adipose tissue by growth hormone and the insulin-like growth factor system. Domest. Anim. Endocrinol. *27*, 241–255.

Lowen, A.C. (2017). Constraints, Drivers, and Implications of Influenza A Virus Reassortment. Annu Rev Virol *4*, 105–121.

Lowen, A.C. (2017). Constraints, Drivers, and Implications of Influenza A Virus Reassortment. Annu Rev Virol *4*, 105–121.

Ludwig, H., and Rott, R. (1975). Effect of 2-deoxy-D-glucose on herpesvirus-induced inhibition of cellular DNA synthesis. J. Virol. *16*, 217–221.

Lumeng, C.N., Deyoung, S.M., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. Diabetes *56*, 16–23.

Luo, X., Jia, R., Zhang, Q., Sun, B., and Yan, J. (2016). Cold-Induced Browning Dynamically Alters the Expression Profiles of Inflammatory Adipokines with Tissue Specificity in Mice. Int J Mol Sci *17*.

Lynch, L., Michelet, X., Zhang, S., Brennan, P.J., Moseman, A., Lester, C., Besra, G., Vomhof-Dekrey, E.E., Tighe, M., Koay, H.-F., et al. (2015). Regulatory iNKT cells lack PLZF expression and control Treg cell and macrophage homeostasis in adipose tissue. Nat Immunol *16*, 85–95.

Lynch, L., Nowak, M., Varghese, B., Clark, J., Hogan, A.E., Toxavidis, V., Balk, S.P., O'Shea, D., O'Farrelly, C., and Exley, M.A. (2012). Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. Immunity *37*, 574–587.

Lynch, L., O'Shea, D., Winter, D.C., Geoghegan, J., Doherty, D.G., and O'Farrelly, C. (2009). Invariant NKT cells and CD1d(+) cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. Eur. J. Immunol. *39*, 1893–1901.

Lyngsø, D., Simonsen, L., and Bülow, J. (2002). Metabolic effects of interleukin-6 in human splanchnic and adipose tissue. J Physiol *543*, 379–386.

Maccioni, L., Weber, S., Elgizouli, M., Stoehlker, A.-S., Geist, I., Peter, H.-H., Vach, W., and Nieters, A. (2018). Obesity and risk of respiratory tract infections: results of an infection-diary based cohort study. BMC Public Health *18*, 271.

Machida, K., Okamatsu-Ogura, Y., Shin, W., Matsuoka, S., Tsubota, A., and Kimura, K. (2017). Role of macrophages in depot-dependent browning of white adipose tissue. J Physiol Sci.

Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., et al. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. Nat. Med. *8*, 731–737.

Mahmoud, A.B., Tu, M.M., Wight, A., Zein, H.S., Rahim, M.M.A., Lee, S.-H., Sekhon, H.S., Brown, E.G., and Makrigiannis, A.P. (2016). Influenza Virus Targets Class I MHC-Educated NK Cells for Immunoevasion. PLoS Pathog. *12*, e1005446.

Malcom, G.T., Bhattacharyya, A.K., Velez-Duran, M., Guzman, M.A., Oalmann, M.C., and Strong, J.P. (1989). Fatty acid composition of adipose tissue in humans: differences between subcutaneous sites. Am. J. Clin. Nutr. *50*, 288–291.

Mancuso, P. (2009). Obesity and lung inflammation. Journal of Applied Physiology *108*, 722–728.

Mancuso, P. (2013). Obesity and respiratory infections: Does excess adiposity weigh down host defense? Pulm Pharmacol Ther *26*, 412–419.

Mancuso, P., O Brien, E., Prano, J., Goel, D., and Aronoff, D.M. (2014). No Impairment in host defense against Streptococcus pneumoniae in obese CPEfat/fat mice. PLoS ONE *9*, e106420.

Mansfield, K.G. (2007). Viral Tropism and the Pathogenesis of Influenza in the Mammalian Host. Am J Pathol *171*, 1089–1092.

Mao, H., Liu, Y., Sia, S.F., Peiris, J.S.M., Lau, Y.-L., and Tu, W. (2017). Avian influenza virus directly infects human natural killer cells and inhibits cell activity. Virol Sin *32*, 122–129.
Mao, H., Tu, W., Qin, G., Law, H.K.W., Sia, S.F., Chan, P.-L., Liu, Y., Lam, K.-T., Zheng, J., Peiris, M., et al. (2009). Influenza Virus Directly Infects Human Natural Killer Cells and Induces Cell Apoptosis. Journal of Virology *83*, 9215–9222.

Marc, T. (2013). Brain development and the immune system: an introduction to inflammatory and infectious diseases of the child's brain. Handb Clin Neurol *112*, 1087–1089.

Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G., and Hill, R.A. (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. *26*, 1407–1433.

Mårin, P., Andersson, B., Ottosson, M., Olbe, L., Chowdhury, B., Kvist, H., Holm, G., Sjöström, L., and Björntorp, P. (1992). The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. Metab. Clin. Exp. *41*, 1242–1248.

Mathis, D. (2013). Immunological Goings-On In Visceral Adipose Tissue. Cell Metab *17*, 851–859.

Matlin, K.S., Reggio, H., Helenius, A., and Simons, K. (1981). Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. J. Cell Biol. *91*, 601–613.

Matsuoka, Y., Matsumae, H., Katoh, M., Eisfeld, A.J., Neumann, G., Hase, T., Ghosh, S., Shoemaker, J.E., Lopes, T.J., Watanabe, T., et al. (2013). A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. BMC Syst Biol *7*, 97.

McGill, J., Heusel, J.W., and Legge, K.L. (2009). Innate immune control and regulation of influenza virus infections. J. Leukoc. Biol. *86*, 803–812.

McGlashon, J.M., Gorecki, M.C., Kozlowski, A.E., Thirnbeck, C.K., Markan, K.R., Leslie, K.L., Kotas, M.E., Potthoff, M.J., Richerson, G.B., and Gillum, M.P. (2015). Central serotonergic neurons activate and recruit thermogenic brown and beige fat and regulate glucose and lipid homeostasis. Cell Metab *21*, 692–705.

McLaughlin, T., Lamendola, C., Liu, A., and Abbasi, F. (2011). Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96*, E1756-1760.

Medina, R.A. (2018). 1918 influenza virus: 100 years on, are we prepared against the next influenza pandemic? Nat. Rev. Microbiol. *16*, 61–62.

Medina, R.A., and García-Sastre, A. (2011). Influenza A viruses: new research developments. Nat. Rev. Microbiol. *9*, 590–603.

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. Nature *454*, 428–435.

Mehr, S., and Wood, N. (2012). Streptococcus pneumoniae--a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. Paediatr Respir Rev *13*, 258–264.

Mendelson, M., Tekoah, Y., Zilka, A., Gershoni-Yahalom, O., Gazit, R., Achdout, H., Bovin, N.V., Meningher, T., Mandelboim, M., Mandelboim, O., et al. (2010). NKp46 O-Glycan Sequences That Are Involved in the Interaction with Hemagglutinin Type 1 of Influenza Virus. J Virol *84*, 3789–3797.

Metkar, S.S., Menaa, C., Pardo, J., Wang, B., Wallich, R., Freudenberg, M., Kim, S., Raja, S.M., Shi, L., Simon, M.M., et al. (2008). Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. Immunity *29*, 720–733.

Metkar, S.S., Menaa, C., Pardo, J., Wang, B., Wallich, R., Freudenberg, M., Kim, S., Raja, S.M., Shi, L., Simon, M.M., et al. (2008). Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. Immunity *29*, 720–733.

Mills, E.L., Kelly, B., and O'Neill, L.A.J. (2017). Mitochondria are the powerhouses of immunity. Nat. Immunol. *18*, 488–498.

Minihane, A.M., Vinoy, S., Russell, W.R., Baka, A., Roche, H.M., Tuohy, K.M., Teeling, J.L., Blaak, E.E., Fenech, M., Vauzour, D., et al. (2015). Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. Br J Nutr *114*, 999–1012.

Minokoshi, Y., Kahn, C.R., and Kahn, B.B. (2003). Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. J. Biol. Chem. *278*, 33609–33612.

Mitchell, A.M., and Mitchell, T.J. (2010). Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. Clin. Microbiol. Infect. *16*, 411–418.

Mook-Kanamori, B.B., Geldhoff, M., van der Poll, T., and van de Beek, D. (2011). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. Clin. Microbiol. Rev. *24*, 557–591.

Moraes, J.C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D.E., Roman, E.A., Pauli, J.R., Romanatto, T., Carvalheira, J.B., Oliveira, A.L.R., Saad, M.J., et al. (2009). High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. PLoS ONE *4*, e5045.

Mori, I., Komatsu, T., Takeuchi, K., Nakakuki, K., Sudo, M., and Kimura, Y. (1995). Viremia induced by influenza virus. Microb. Pathog. *19*, 237–244.

Mori, I., Komatsu, T., Takeuchi, K., Nakakuki, K., Sudo, M., and Kimura, Y. (1995). In vivo induction of apoptosis by influenza virus. J. Gen. Virol. *76 (Pt 11)*, 2869–2873.

Morrison, S., and McGee, S.L. (2015). 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. Adipocyte *4*, 295–302.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. *136*, 2348–2357.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. *136*, 2348–2357.

Muir, L.A., Kiridena, S., Griffin, C., DelProposto, J.B., Geletka, L., Martinez-Santibañez, G., Zamarron, B.F., Lucas, H., Singer, K., O' Rourke, R.W., et al. (2018). Frontline Science: Rapid adipose tissue expansion triggers unique proliferation and lipid accumulation profiles in adipose tissue macrophages. J. Leukoc. Biol. *103*, 615–628.

Mulder J, Hers JFP. Influenza. Groningen: Wolters-Noordhoff; (1972). p. 287.

Munster, V.J., and Fouchier, R. a. M. (2009). Avian influenza virus: of virus and bird ecology. Vaccine *27*, 6340–6344.

Myers, M.G., Leibel, R.L., Seeley, R.J., and Schwartz, M.W. (2010). Obesity and Leptin Resistance: Distinguishing Cause from Effect. Trends Endocrinol Metab *21*, 643–651.

Nagajyothi, F., Desruisseaux, M.S., Machado, F.S., Upadhya, R., Zhao, D., Schwartz, G.J., Teixeira, M.M., Albanese, C., Lisanti, M.P., Chua, S.C., et al. (2012). Response of adipose tissue to early infection with Trypanosoma cruzi (Brazil strain). J. Infect. Dis. *205*, 830–840.

Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C., and Iwasaki, A. (2009). CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. Nature *462*, 510–513.

Nash, B., Thomson, C.E., Linington, C., Arthur, A.T., McClure, J.D., McBride, M.W., and Barnett, S.C. (2011). Functional duality of astrocytes in myelination. J. Neurosci. *31*, 13028–13038.

Nayak, D.P., Balogun, R.A., Yamada, H., Zhou, Z.H., and Barman, S. (2009). Influenza virus morphogenesis and budding. Virus Res *143*, 147–161.

Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., and Cannon, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics *1504*, 82–106.

Neels, J.G., and Olefsky, J.M. (2006). Inflamed fat: what starts the fire? J Clin Invest *116*, 33–35.

Nelli, R.K., Kuchipudi, S.V., White, G.A., Perez, B.B., Dunham, S.P., and Chang, K.-C. (2010). Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. BMC Vet. Res. *6*, 4.

Nelson, M.I., Vincent, A.L., Kitikoon, P., Holmes, E.C., and Gramer, M.R. (2012). Evolution of Novel Reassortant A/H3N2 Influenza Viruses in North American Swine and Humans, 2009–2011. J Virol *86*, 8872–8878.

Neumann, G., Castrucci, M.R., and Kawaoka, Y. (1997). Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. J. Virol. *71*, 9690–9700.

Neumann, G., Hughes, M.T., and Kawaoka, Y. (2000). Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. EMBO J *19*, 6751–6758.

Neyrinck, A.M., Bindels, L.B., Geurts, L., Van Hul, M., Cani, P.D., and Delzenne, N.M. (2017). A polyphenolic extract from green tea leaves activates fat browning in high-fat-diet-induced obese mice. J. Nutr. Biochem. *49*, 15–21.

Nguyen, K.D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.P.S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. Nature *480*, 104–108.

Nguyen, M.T.A., Favelyukis, S., Nguyen, A.-K., Reichart, D., Scott, P.A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C.K., Neels, J.G., and Olefsky, J.M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. J. Biol. Chem. *282*, 35279–35292.

Nigro, E., Scudiero, O., Monaco, M.L., Palmieri, A., Mazzarella, G., Costagliola, C., Bianco, A., and Daniele, A. (2014). New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases. Biomed Res Int *2014*.

Nishimura, H., Itamura, S., Iwasaki, T., Kurata, T., and Tashiro, M. (2000). Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection. J. Gen. Virol. *81*, 2503–2510.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., et al. (2009). CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. Nat. Med. *15*, 914–920.

Nishioku, T., Matsumoto, J., Dohgu, S., Sumi, N., Miyao, K., Takata, F., Shuto, H., Yamauchi, A., and Kataoka, Y. (2010). Tumor necrosis factor-alpha mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. J. Pharmacol. Sci. *112*, 251–254.

Noda, T. (2012). Native Morphology of Influenza Virions. Front Microbiol *2*.

Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R.H., and Kawaoka, Y. (2006). Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. Nature *439*, 490–492.

Nogalska, A., Sucajtys-Szulc, E., and Swierczynski, J. (2005). Leptin decreases lipogenic enzyme gene expression through modification of SREBP-1c gene expression in white adipose tissue of aging rats. Metabolism - Clinical and Experimental *54*, 1041–1047.

Nussbaum, J.C., Van Dyken, S.J., von Moltke, J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Molofsky, A.B., Thornton, E.E., Krummel, M.F., Chawla, A., Liang, H.-E., et al. (2013). Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. Nature *502*, 245–248.

O'Neill, R.E., Talon, J., and Palese, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. EMBO J *17*, 288–296.

Ohman, T., Rintahaka, J., Kalkkinen, N., Matikainen, S., and Nyman, T.A. (2009). Actin and RIG-I/MAVS signaling components translocate to mitochondria upon influenza A virus infection of human primary macrophages. J. Immunol. *182*, 5682–5692.

Opitz, B., van Laak, V., Eitel, J., and Suttorp, N. (2010). Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *181*, 1294–1309.

Ordway, D., Henao-Tamayo, M., Smith, E., Shanley, C., Harton, M., Troudt, J., Bai, X., Basaraba, R.J., Orme, I.M., and Chan, E.D. (2008). Animal model of Mycobacterium abscessus lung infection. J. Leukoc. Biol. *83*, 1502–1511.

Oslowski, C.M., and Urano, F. (2011). Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. Methods Enzymol *490*, 71–92.

Ouyang, S., Hsuchou, H., Kastin, A.J., Wang, Y., Yu, C., and Pan, W. (2014). Diet-induced obesity suppresses expression of many proteins at the blood-brain barrier. J. Cereb. Blood Flow Metab. *34*, 43–51.

Pajvani, U.B., and Scherer, P.E. (2003). Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. Curr. Diab. Rep. *3*, 207–213.

Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., Rodríguez, A.M., Palou, A., and Picó, C. (2009). Gene expression patterns in visceral and subcutaneous adipose depots in rats are linked to their morphologic features. Cell. Physiol. Biochem. *24*, 547–556.

Papic, N., Pangercic, A., Vargovic, M., Barsic, B., Vince, A., and Kuzman, I. (2012). Liver involvement during influenza infection: perspective on the 2009 influenza pandemic. Influenza Other Respir Viruses *6*, e2–e5.

Pappas, G., Kiriaze, I.J., and Falagas, M.E. (2008). Insights into infectious disease in the era of Hippocrates. International Journal of Infectious Diseases *12*, 347–350.

Park, J., Kim, M., Sun, K., An, Y.A., Gu, X., and Scherer, P.E. (2017). VEGF-A–Expressing Adipose Tissue Shows Rapid Beiging and Enhanced Survival After Transplantation and Confers IL-4–Independent Metabolic Improvements. Diabetes *66*, 1479–1490.

Patsouris, D., Qi, P., Abdullahi, A., Stanojcic, M., Chen, P., Parousis, A., Amini-Nik, S., and Jeschke, M.G. (2015). Burn Induces Browning of the Subcutaneous White Adipose Tissue in Mice and Humans. Cell Rep *13*, 1538–1544.

Peiris, J.S.M., Hui, K.P.Y., and Yen, H.-L. (2010). Host response to influenza virus: protection versus immunopathology. Curr. Opin. Immunol. *22*, 475–481.

Pericone, C.D., Overweg, K., Hermans, P.W., and Weiser, J.N. (2000). Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by Streptococcus pneumoniae on other inhabitants of the upper respiratory tract. Infect. Immun. *68*, 3990–3997.

Perrone, L.A., Plowden, J.K., García-Sastre, A., Katz, J.M., and Tumpey, T.M. (2008). H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. PLoS Pathog. *4*, e1000115.

Petruzzelli, M., Schweiger, M., Schreiber, R., Campos-Olivas, R., Tsoli, M., Allen, J., Swarbrick, M., Rose-John, S., Rincon, M., Robertson, G., et al. (2014). A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. Cell Metab. *20*, 433–447.

Picard, F., Naïmi, N., Richard, D., and Deshaies, Y. (1999). Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. Diabetes *48*, 452–459.

Picardi, P.K., Calegari, V.C., Prada, P.O., Prada, P. de O., Moraes, J.C., Araújo, E., Marcondes, M.C.C.G., Ueno, M., Carvalheira, J.B.C., Velloso, L.A., et al. (2008). Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. Endocrinology *149*, 3870–3880.

Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Näslund, T.I., Liljeström, P., Weber, F., and Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. Science *314*, 997–1001.

Pimenta, F.C., Miyaji, E.N., Arêas, A.P.M., Oliveira, M.L.S., de Andrade, A.L.S.S., Ho, P.L., Hollingshead, S.K., and Leite, L.C.C. (2006). Intranasal immunization with the cholera toxin B subunit-pneumococcal surface antigen A fusion protein induces protection against colonization with Streptococcus pneumoniae and has negligible impact on the nasopharyngeal and oral microbiota of mice. Infect. Immun. *74*, 4939–4944.

Platell, C., Cooper, D., Papadimitriou, J.M., and Hall, J.C. (2000). The omentum. World J. Gastroenterol. *6*, 169–176.

Plowden, J., Renshaw-Hoelscher, M., Engleman, C., Katz, J., and Sambhara, S. (2004). Innate immunity in aging: impact on macrophage function. Aging Cell *3*, 161–167.

Polat, G., Ugan, R.A., Cadirci, E., and Halici, Z. (2017). Sepsis and Septic Shock: Current Treatment Strategies and New Approaches. Eurasian J Med *49*, 53–58.

Pond, C.M., and Mattacks, C.A. (1998). In vivo evidence for the involvement of the adipose tissue surrounding lymph nodes in immune responses. Immunol. Lett. *63*, 159–167.

Portela, A., and Digard, P. (2002). The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. J. Gen. Virol. *83*, 723–734.

Potter, C.W. (2001). A history of influenza. J. Appl. Microbiol. *91*, 572–579.

Pulendran, B., and Maddur, M.S. (2015). Innate Immune Sensing and Response to Influenza. Curr Top Microbiol Immunol *386*, 23–71.

Qiu, Y., Nguyen, K.D., Odegaard, J.I., Cui, X., Tian, X., Locksley, R.M., Palmiter, R.D., and Chawla, A. (2014). Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. Cell *157*, 1292–1308.

Quagliarello, V.J., Long, W.J., and Scheld, W.M. (1986). Morphologic alterations of the blood-brain barrier with experimental meningitis in the rat. Temporal sequence and role of encapsulation. J. Clin. Invest. *77*, 1084–1095.

Radigan, K.A., Morales-Nebreda, L., Soberanes, S., Nicholson, T., Nigdelioglu, R., Cho, T., Chi, M., Hamanaka, R.B., Misharin, A.V., Perlman, H., et al. (2014). Impaired clearance of influenza A virus in obese, leptin receptor deficient mice is independent of leptin signaling in the lung epithelium and macrophages. PLoS ONE 9, e108138.

Ramos, I., Bernal-Rubio, D., Durham, N., Belicha-Villanueva, A., Lowen, A.C., Steel, J., and Fernandez-Sesma, A. (2011). Effects of receptor binding specificity of avian influenza virus on the human innate immune response. J. Virol. *85*, 4421–4431.

Ramsay, T.G., and Richards, M.P. (2005). Leptin and leptin receptor expression in skeletal muscle and adipose tissue in response to in vivo porcine somatotropin treatment. J. Anim. Sci. *83*, 2501–2508.

Ramseyer, V.D., and Granneman, J.G. (2016). Adrenergic regulation of cellular plasticity in brown, beige/brite and white adipose tissues. Adipocyte *5*, 119–129.

Rao, R.R., Long, J.Z., White, J.P., Svensson, K.J., Lou, J., Lokurkar, I., Jedrychowski, M.P., Ruas, J.L., Wrann, C.D., Lo, J.C., et al. (2014). Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. Cell *157*, 1279–1291.

Reading, P.C., Allison, J., Crouch, E.C., and Anders, E.M. (1998). Increased Susceptibility of Diabetic Mice to Influenza Virus Infection: Compromise of Collectin-Mediated Host Defense of the Lung by Glucose? J. Virol. *72*, 6884–6887.

Reese, T.A., Liang, H.-E., Tager, A.M., Luster, A.D., Van Rooijen, N., Voehringer, D., and Locksley, R.M. (2007). Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. Nature *447*, 92–96.

Reikine, S., Nguyen, J.B., and Modis, Y. (2014). Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. Front Immunol *5*.

Rello, J., and Pop-Vicas, A. (2009). Clinical review: Primary influenza viral pneumonia. Crit Care *13*, 235.

Reperant, L.A., Kuiken, T., Grenfell, B.T., Osterhaus, A.D.M.E., and Dobson, A.P. (2012). Linking Influenza Virus Tissue Tropism to Population-Level Reproductive Fitness. PLOS ONE *7*, e43115.

Ricci, S., Gerlini, A., Pammolli, A., Chiavolini, D., Braione, V., Tripodi, S.A., Colombari, B., Blasi, E., Oggioni, M.R., Peppoloni, S., et al. (2013). Contribution of different pneumococcal virulence factors to experimental meningitis in mice. BMC Infectious Diseases *13*, 444.

Richelsen, B. (1997). Action of growth hormone in adipose tissue. Horm. Res. *48 Suppl 5*, 105–110.

Richmond, E.J., and Rogol, A.D. (2008). Growth hormone deficiency in children. Pituitary *11*, 115–120.

Ritter, J.B., Wahl, A.S., Freund, S., Genzel, Y., and Reichl, U. (2010). Metabolic effects of influenza virus infection in cultured animal cells: Intra- and extracellular metabolite profiling. BMC Syst Biol *4*, 61.

Robb, N.C., Smith, M., Vreede, F.T., and Fodor, E. (2009). NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. J. Gen. Virol. *90*, 1398–1407.

Roberson, E.C., Tully, J.E., Guala, A.S., Reiss, J.N., Godburn, K.E., Pociask, D.A., Alcorn, J.F., Riches, D.W.H., Dienz, O., Janssen-Heininger, Y.M.W., et al. (2012). Influenza induces endoplasmic reticulum stress, caspase-12-dependent apoptosis, and c-Jun N-terminal kinase-mediated transforming growth factor-β release in lung epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *46*, 573–581.

Roberson, E.C., Tully, J.E., Guala, A.S., Reiss, J.N., Godburn, K.E., Pociask, D.A., Alcorn, J.F., Riches, D.W.H., Dienz, O., Janssen-Heininger, Y.M.W., et al. (2012). Influenza induces endoplasmic reticulum stress, caspase-12-dependent apoptosis, and c-Jun N-terminal kinase-mediated transforming growth factor-β release in lung epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *46*, 573–581.

Roberts, L.D., Virtue, S., Vidal-Puig, A., Nicholls, A.W., and Griffin, J.L. (2009). Metabolic phenotyping of a model of adipocyte differentiation. Physiol Genomics *39*, 109–119.

Rodgers, B., and Mims, C.A. (1981). Interaction of influenza virus with mouse macrophages. Infect. Immun. *31*, 751–757.

Rodriguez, L., Nogales, A., and Martínez-Sobrido, L. (2017). Influenza A Virus Studies in a Mouse Model of Infection. J Vis Exp.

Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *16*, 145–171.

Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2014). What we talk about when we talk about fat. Cell *156*, 20–44.

Rossman, J.S., and Lamb, R.A. (2011). Influenza virus assembly and budding. Virology *411*, 229–236.

Ruan, H.-B., Dietrich, M.O., Liu, Z.-W., Zimmer, M.R., Li, M.-D., Singh, J.P., Zhang, K., Yin, R., Wu, J., Horvath, T.L., et al. (2014). O-GlcNAc transferase enables AgRP neurons to suppress browning of white fat. Cell *159*, 306–317.

Rubins, J.B., Duane, P.G., Clawson, D., Charboneau, D., Young, J., and Niewoehner, D.E. (1993). Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. Infect. Immun. *61*, 1352–1358.

Sackmann-Sala, L., Berryman, D.E., Munn, R.D., Lubbers, E.R., and Kopchick, J.J. (2012). Heterogeneity among white adipose tissue depots in male C57BL/6J mice. Obesity (Silver Spring) *20*, 101–111.

Sahu, A. (2003). Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. Front Neuroendocrinol *24*, 225–253.

Samji, T. (2009). Influenza A: understanding the viral life cycle. Yale J Biol Med *82*, 153–159.

Sanchez, E.L., and Lagunoff, M. (2015). Viral activation of cellular metabolism. Virology *479–480*, 609–618.

Sartipy, P., and Loskutoff, D.J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 7265–7270.

Schäffler, A., and Schölmerich, J. (2010). Innate immunity and adipose tissue biology. Trends Immunol. *31*, 228–235.

Schipper, H.S., Prakken, B., Kalkhoven, E., and Boes, M. (2012). Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. Trends Endocrinol. Metab. *23*, 407–415.

Schmidt, F.M., Weschenfelder, J., Sander, C., Minkwitz, J., Thormann, J., Chittka, T., Mergl, R., Kirkby, K.C., Faßhauer, M., Stumvoll, M., et al. (2015). Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical Activity. PLoS One *10*.

Schultz-Cherry, S., and Hinshaw, V.S. (1996). Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. J Virol *70*, 8624–8629.

Schwarz, D.S., and Blower, M.D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. Cell Mol Life Sci *73*, 79–94.

Seale, P., Conroe, H.M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S., and Spiegelman, B.M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. J. Clin. Invest. *121*, 96–105.

Sellers, S.A., Hagan, R.S., Hayden, F.G., and Fischer, W.A. (2017). The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. Influenza Other Respir Viruses *11*, 372–393.

Sengenès, C., Lolmède, K., Zakaroff-Girard, A., Busse, R., and Bouloumié, A. (2005). Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. J. Cell. Physiol. *205*, 114–122.

Sertogullarindan, B., Ozbay, B., Gunini, H., Sunnetcioglu, A., Arisoy, A., Bilgin, H., Mermit Cilingir, B., Duran, M., Yildiz, H., Ekin, S., et al. (2011). Clinical and prognostic features of patients with pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus in the intensive care unit. Afr Health Sci *11*, 163–170.

Shabalina, I.G., Petrovic, N., de Jong, J.M.A., Kalinovich, A.V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2013). UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. Cell Rep *5*, 1196–1203.

Shapira, S.D., Gat-Viks, I., Shum, B.O.V., Dricot, A., de Grace, M.M., Wu, L., Gupta, P.B., Hao, T., Silver, S.J., Root, D.E., et al. (2009). A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection. Cell *139*, 1255–1267.

Shepherd, P.R., Gnudi, L., Tozzo, E., Yang, H., Leach, F., and Kahn, B.B. (1993). Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. J. Biol. Chem. *268*, 22243–22246.

Shi, B.-J., Liu, C.-C., Zhou, J., Wang, S.-Q., Gao, Z.-C., Zhang, X.-M., Zhou, B., and Chen, P.-Y. (2016). Entry of Classical Swine Fever Virus into PK-15 Cells via a pH-, Dynamin-, and Cholesterol-Dependent, Clathrin-Mediated Endocytic Pathway That Requires Rab5 and Rab7. J Virol *90*, 9194–9208.

Shim, J.M., Kim, J., Tenson, T., Min, J.-Y., and Kainov, D.E. (2017). Influenza Virus Infection, Interferon Response, Viral Counter-Response, and Apoptosis. Viruses *9*.

Shimizu, T., Takizawa, N., Watanabe, K., Nagata, K., and Kobayashi, N. (2011). Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP. FEBS Lett. *585*, 41–46.

Shimomura, I., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Ikemoto, S., Bashmakov, Y., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998). Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. Genes Dev *12*, 3182–3194.

Shoemaker, J.P., Hoffman, R.V., and Huffman, D.G. (1970). Trypanosoma cruzi: Preference for brown adipose tissue in mice by the Tulahuen strain. Experimental Parasitology *27*, 403–407.

Shuster, A., Patlas, M., Pinthus, J.H., and Mourtzakis, M. (2012). The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. Br J Radiol *85*, 1–10.

Sieczkarski, S.B., and Whittaker, G.R. (2003). Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. Traffic *4*, 333–343.

Siiteri, P.K. (1987). Adipose tissue as a source of hormones. Am. J. Clin. Nutr. 45, 277–282.

Simon, S.M., and Blobel, G. (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. Cell *65*, 371–380.

Simonsen, L., Spreeuwenberg, P., Lustig, R., Taylor, R.J., Fleming, D.M., Kroneman, M., Van Kerkhove, M.D., Mounts, A.W., and Paget, W.J. (2013). Global Mortality Estimates for the 2009 Influenza Pandemic from the GLaMOR Project: A Modeling Study. PLoS Med *10*.

Smallwood, H.S., Duan, S., Morfouace, M., Rezinciuc, S., Shulkin, B.L., Shelat, A., Zink, E.E., Milasta, S., Bajracharya, R., Oluwaseum, A.J., et al. (2017). Targeting Metabolic Reprogramming by Influenza Infection for Therapeutic Intervention. Cell Rep *19*, 1640–1653.

Smed-Sörensen, A., Chalouni, C., Chatterjee, B., Cohn, L., Blattmann, P., Nakamura, N., Delamarre, L., and Mellman, I. (2012). Influenza A Virus Infection of Human Primary Dendritic Cells Impairs Their Ability to Cross-Present Antigen to CD8 T Cells. PLoS Pathog *8*.

Smith, A.G., Sheridan, P.A., Harp, J.B., and Beck, M.A. (2007). Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. J. Nutr. *137*, 1236–1243.

Smith, U., and Kahn, B.B. (2016). Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. J Intern Med *280*, 465–475.

Snäll, J., Linnér, A., Uhlmann, J., Siemens, N., Ibold, H., Janos, M., Linder, A., Kreikemeyer, B., Herwald, H., Johansson, L., et al. (2016). Differential neutrophil responses to bacterial stimuli: Streptococcal strains are potent inducers of heparin-binding protein and resistin-release. Scientific Reports *6*, 21288.

Snelgrove, R.J., Goulding, J., Didierlaurent, A.M., Lyonga, D., Vekaria, S., Edwards, L., Gwyer, E., Sedgwick, J.D., Barclay, A.N., and Hussell, T. (2008). A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. Nature Immunology *9*, 1074–1083.

Sowers, J.R. (2008). Endocrine functions of adipose tissue: focus on adiponectin. Clin Cornerstone *9*, 32–38; discussion 39-40.

Srivastava, A., Henneke, P., Visintin, A., Morse, S.C., Martin, V., Watkins, C., Paton, J.C., Wessels, M.R., Golenbock, D.T., and Malley, R. (2005). The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. Infect. Immun. *73*, 6479–6487.

Stanford, K.I., Middelbeek, R.J.W., and Goodyear, L.J. (2015). Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. Diabetes *64*, 2361–2368.

Stanford, K.I., Middelbeek, R.J.W., and Goodyear, L.J. (2015). Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. Diabetes *64*, 2361–2368.

Steinhoff, M.C., Omer, S.B., Roy, E., Arifeen, S.E., Raqib, R., Altaye, M., Breiman, R.F., and M B B S, K.Z. (2010). Influenza immunization in pregnancy--antibody responses in mothers and infants. N. Engl. J. Med. *362*, 1644–1646.

Steinhoff, M.C., Omer, S.B., Roy, E., Arifeen, S.E., Raqib, R., Altaye, M., Breiman, R.F., and M B B S, K.Z. (2010). Influenza immunization in pregnancy--antibody responses in mothers and infants. N. Engl. J. Med. *362*, 1644–1646.

Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature *409*, 307–312.

Stevens, T.H., and Forgac, M. (1997). Structure, function and regulation of the vacuolar (H+)-ATPase. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *13*, 779–808.

Stranahan, A.M., Hao, S., Dey, A., Yu, X., and Baban, B. (2016). Blood-brain barrier breakdown promotes macrophage infiltration and cognitive impairment in leptin receptor-deficient mice. J. Cereb. Blood Flow Metab. *36*, 2108–2121.

Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. Diabetes *56*, 2910–2918.

Su, S., Bi, Y., Wong, G., Gray, G.C., Gao, G.F., and Li, S. (2015). Epidemiology, Evolution, and Recent Outbreaks of Avian Influenza Virus in China. J. Virol. *89*, 8671–8676.

Sugawara, K., Miyata, G., Shineha, R., and Satomi, S. (2003). The lipolytic responsiveness to endotoxin in subcutaneous adipose tissue is greater than mesenteric adipose tissue. Tohoku J. Exp. Med. *199*, 171–179.

Sulikowska, A., Grzesiowski, P., Sadowy, E., Fiett, J., and Hryniewicz, W. (2004). Characteristics of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Moraxella catarrhalis isolated from the nasopharynges of asymptomatic children and molecular analysis of S. pneumoniae and H. influenzae strain replacement in the nasopharynx. J. Clin. Microbiol. *42*, 3942–3949.

Surmi, B.K., and Hasty, A.H. (2008). Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. Future Lipidol *3*, 545–556.

Symonds, M.E., Pope, M., and Budge, H. (2015). The Ontogeny of Brown Adipose Tissue. Annu. Rev. Nutr. *35*, 295–320.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2009). Innate Immunity to Virus Infection. Immunol Rev *227*, 75–86.

Tang, Q.Q., and Lane, M.D. (2012). Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. Annual Review of Biochemistry *81*, 715–736.

Tang, W., Song, H., Cai, W., and Shen, X. (2015). Real Time Monitoring of Inhibition of Adipogenesis and Angiogenesis by (-)-Epigallocatechin-3-Gallate in 3T3-L1 Adipocytes and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Nutrients *7*, 8871–8886.

Tanowitz, H.B., Scherer, P.E., Mota, M.M., and Figueiredo, L.M. (2017). Adipose tissue - a safe haven for parasites? Trends Parasitol *33*, 276–284.

Tanowitz, H.B., Scherer, P.E., Mota, M.M., and Figueiredo, L.M. (2017). Adipose tissue - a safe haven for parasites? Trends Parasitol *33*, 276–284.

Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., et al. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell *83*, 1263–1271.

Tate, M.D., Brooks, A.G., and Reading, P.C. (2008). The role of neutrophils in the upper and lower respiratory tract during influenza virus infection of mice. Respir. Res. *9*, 57.

Taubenberger, J.K., and Morens, D.M. (2006). 1918 Influenza: the Mother of All Pandemics. Emerg Infect Dis *12*, 15–22.

Tchkonia, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M.D., and Kirkland, J.L. (2013). Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots. Cell Metab *17*, 644–656.

Thomas, P.G., Dash, P., Aldridge, J.R., Ellebedy, A.H., Reynolds, C., Funk, A.J., Martin, W.J., Lamkanfi, M., Webby, R.J., Boyd, K.L., et al. (2009). NLRP3 (NALP3/CIAS1/Cryopyrin) mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. Immunity *30*, 566–575.

Topham, D.J., Tripp, R.A., and Doherty, P.C. (1997). CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. J. Immunol. *159*, 5197–5200.

Tran, K.-V., Gealekman, O., Frontini, A., Zingaretti, M.C., Morroni, M., Giordano, A., Smorlesi, A., Perugini, J., De Matteis, R., Sbarbati, A., et al. (2012). The vascular endothelium of the adipose tissue give rise to both white and brown fat cells. Cell Metab *15*, 222–229.

Tran, T.T., Yamamoto, Y., Gesta, S., and Kahn, C.R. (2008). Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. Cell Metab. *7*, 410–420.

Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. Physiological Reviews *93*, 1–21.

Trindade, S., Rijo-Ferreira, F., Carvalho, T., Pinto-Neves, D., Guegan, F., Aresta-Branco, F., Bento, F., Young, S.A., Pinto, A., Van Den Abbeele, J., et al. (2016). Trypanosoma brucei Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. Cell Host & Microbe *19*, 837–848.

Tripathi, S., Pohl, M.O., Zhou, Y., Rodriguez-Frandsen, A., Wang, G., Stein, D.A., Moulton, H.M., DeJesus, P., Che, J., Mulder, L.C.F., et al. (2015). Meta- and Orthogonal Integration of Influenza "OMICs" Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding. Cell Host Microbe *18*, 723–735.

Trujillo, M.E., Sullivan, S., Harten, I., Schneider, S.H., Greenberg, A.S., and Fried, S.K. (2004). Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. J. Clin. Endocrinol. Metab. *89*, 5577–5582.

Tsai, Y.H., Bies, M., Leitner, F., and Kessler, R.E. (1990). Therapeutic studies of cefepime (BMY 28142) in murine meningitis and pharmacokinetics in neonatal rats. Antimicrob. Agents Chemother. *34*, 733–738.

Tulloch-Reid, M.K., Hanson, R.L., Sebring, N.G., Reynolds, J.C., Premkumar, A., Genovese, D.J., and Sumner, A.E. (2004). Both subcutaneous and visceral adipose tissue correlate highly with insulin resistance in african americans. Obes. Res. *12*, 1352–1359.

Tumpey, T.M., García-Sastre, A., Taubenberger, J.K., Palese, P., Swayne, D.E., Pantin-Jackwood, M.J., Schultz-Cherry, S., Solórzano, A., Van Rooijen, N., Katz, J.M., et al. (2005). Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. J. Virol. *79*, 14933–14944.

Tuomanen, E., Liu, H., Hengstler, B., Zak, O., and Tomasz, A. (1985). The Induction of Meningeal Inflammation by Components of the Pneumococcal Cell Wall. J Infect Dis *151*, 859–868.

Turrell, L., Lyall, J.W., Tiley, L.S., Fodor, E., and Vreede, F.T. (2013). The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes. Nat Commun *4*, 1591.

Tzanavari, T., Giannogonas, P., and Karalis, K.P. (2010). TNF-alpha and obesity. Curr. Dir. Autoimmun. *11*, 145–156.

Ueta, C.B., Fernandes, G.W., Capelo, L.P., Fonseca, T.L., Maculan, F.D., Gouveia, C.H.A., Brum, P.C., Christoffolete, M.A., Aoki, M.S., Lancellotti, C.L., et al. (2012). β(1) Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice. J. Endocrinol. *214*, 359–365.

Vague J. Sexual differentiation. A factor affecting the forms of obesity. PresseMedicale. (1947); 30: S39–S40.

Vaillant, L., La Ruche, G., Tarantola, A., Barboza, P., and epidemic intelligence team at InVS (2009). Epidemiology of fatal cases associated with pandemic H1N1 influenza 2009. Euro Surveill. 14.

Van de Sandt, C.E., Kreijtz, J.H.C.M., and Rimmelzwaan, G.F. (2012). Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. Viruses *4*, 1438–1476.

Van Den Berg, S.M., van Dam, A.D., Rensen, P.C.N., de Winther, M.P.J., and Lutgens, E. (2017). Immune Modulation of Brown(ing) Adipose Tissue in Obesity. Endocr. Rev. *38*, 46–68.

Van der Poll, T., and Opal, S.M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. Lancet *374*, 1543–1556.

Van Dyken, S.J., and Locksley, R.M. (2013). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. Annu. Rev. Immunol. *31*, 317–343.

Van Harmelen, V., Reynisdottir, S., Eriksson, P., Thörne, A., Hoffstedt, J., Lönnqvist, F., and Arner, P. (1998). Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. Diabetes *47*, 913–917.

Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Ivanov, S., Porte, R., Deruy, E., Chabalgoity, J.A., Renauld, J.-C., Eberl, G., Benecke, A.G., et al. (2014). Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs during Streptococcus pneumoniae infection. J. Infect. Dis. *210*, 493–503.

Van Riel, D., Leijten, L.M.E., van der Eerden, M., Hoogsteden, H.C., Boven, L.A., Lambrecht, B.N., Osterhaus, A.D.M.E., and Kuiken, T. (2011). Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infects alveolar macrophages without virus production or excessive TNF-alpha induction. PLoS Pathog. *7*, e1002099.

Van Swieten, M.M.H., Pandit, R., Adan, R.A.H., and van der Plasse, G. (2014). The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. Journal of Chemical Neuroanatomy *61–62*, 207–220.

Vandanmagsar, B., Youm, Y.-H., Ravussin, A., Galgani, J.E., Stadler, K., Mynatt, R.L., Ravussin, E., Stephens, J.M., and Dixit, V.D. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. Nat. Med. *17*, 179–188.

Vannier-Santos, M.A., and Lenzi, H.L. (2011). Parasites or Cohabitants: Cruel Omnipresent Usurpers or Creative "Éminences Grises"? J Parasitol Res *2011*.

Varela, C.E., Rodriguez, A., Romero-Valdovinos, M., Mendoza-Lorenzo, P., Mansour, C., Ceballos, G., Villarreal, F., and Ramirez-Sanchez, I. (2017). Browning effects of (-)-epicatechin on adipocytes and white adipose tissue. Eur. J. Pharmacol. *811*, 48–59.

Venner, A.A., Lyon, M.E., and Doyle-Baker, P.K. (2006). Leptin: a potential biomarker for childhood obesity? Clin. Biochem. *39*, 1047–1056.

Vikman, K., Carlsson, B., Billig, H., and Edén, S. (1991). Expression and Regulation of Growth Hormone (GH) Receptor Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) in Rat Adipose Tissue, Adipocytes, and Adipocyte Precursor Cells: GH Regulation of GH Receptor mRNA. Endocrinology *129*, 1155–1161.

Villalón-Letelier, F., Brooks, A.G., Saunders, P.M., Londrigan, S.L., and Reading, P.C. (2017). Host Cell Restriction Factors that Limit Influenza A Infection. Viruses *9*.

Vorbrodt, A.W., Dobrogowska, D.H., Tarnawski, M., Meeker, H.C., and Carp, R.I. (2001). Quantitative immunogold study of glucose transporter (GLUT-1) in five brain regions of scrapie-infected mice showing obesity and reduced glucose tolerance. Acta Neuropathol. *102*, 278–284.

Waffarn, E.E., and Baumgarth, N. (2011). Protective B cell responses to flu--no fluke! J. Immunol. *186*, 3823–3829.

Wajchenberg, B.L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. Endocr. Rev. *21*, 697–738.

Walsh, D., Mathews, M.B., and Mohr, I. (2013). Tinkering with translation: protein synthesis in virus-infected cells. Cold Spring Harb Perspect Biol *5*, a012351.

Wang, G., Li, R., Jiang, Z., Gu, L., Chen, Y., Dai, J., and Li, K. (2016). Influenza Virus Induces Inflammatory Response in Mouse Primary Cortical Neurons with Limited Viral Replication. Biomed Res Int *2016*, 8076989.

Wang, L., Fu, B., Li, W., Patil, G., Liu, L., Dorf, M.E., and Li, S. (2017). Comparative influenza protein interactomes identify the role of plakophilin 2 in virus restriction. Nature Communications *8*, 13876.

Wang, N.D., Finegold, M.J., Bradley, A., Ou, C.N., Abdelsayed, S.V., Wilde, M.D., Taylor, L.R., Wilson, D.R., and Darlington, G.J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. Science *269*, 1108–1112.

Warner, A., and Mittag, J. (2016). Breaking BAT: can browning create a better white? J. Endocrinol. *228*, R19-29.

Wartha, F., Beiter, K., Albiger, B., Fernebro, J., Zychlinsky, A., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2007). Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect Streptococcus pneumoniae against neutrophil extracellular traps. Cell. Microbiol. *9*, 1162–1171.

Watanabe, T., Kawakami, E., Shoemaker, J.E., Lopes, T.J.S., Matsuoka, Y., Tomita, Y., Kozuka-Hata, H., Gorai, T., Kuwahara, T., Takeda, E., et al. (2014). Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. Cell Host Microbe *16*, 795–805.

Watanabe, T., Watanabe, S., and Kawaoka, Y. (2010). Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. Cell Host Microbe *7*, 427–439.

Way, J.M., Görgün, C.Z., Tong, Q., Uysal, K.T., Brown, K.K., Harrington, W.W., Oliver, W.R., Willson, T.M., Kliewer, S.A., and Hotamisligil, G.S. (2001). Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. J. Biol. Chem. *276*, 25651–25653.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J. Clin. Invest. *112*, 1796–1808.

Weiser, J.N., Ferreira, D.M., and Paton, J.C. (2018). Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion. Nat. Rev. Microbiol.

Weiss, R., Laengle, J., Sachet, M., Shurygina, A.-P., Kiselev, O., Egorov, A., and Bergmann, M. (2015). Interleukin-24 inhibits influenza A virus replication in vitro through induction of toll-like receptor 3 dependent apoptosis. Antiviral Res. *123*, 93–104.

Westerbacka, J., Cornér, A., Kolak, M., Makkonen, J., Turpeinen, U., Hamsten, A., Fisher, R.M., and Yki-Järvinen, H. (2008). Insulin regulation of MCP-1 in human adipose tissue of obese and lean women. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *294*, E841-845.

Whigham, L.D., Israel, B.A., and Atkinson, R.L. (2006). Adipogenic potential of multiple human adenoviruses in vivo and in vitro in animals. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *290*, R190-194.

Whitworth, J.R., Mack, C.L., O'Connor, J.A., Narkewicz, M.R., Mengshol, S., and Sokol, R.J. (2006). Acute hepatitis and liver failure associated with influenza A infection in children. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. *43*, 536–538.

Wieland, C.W., Florquin, S., Chan, E.D., Leemans, J.C., Weijer, S., Verbon, A., Fantuzzi, G., and van der Poll, T. (2005). Pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection in leptin-deficient ob/ob mice. Int. Immunol. *17*, 1399–1408.

Wilairatana, P., Riganti, M., Puchadapirom, P., Punpoowong, B., Vannaphan, S., Udomsangpetch, R., Krudsood, S., Brittenham, G.M., and Looareesuwan, S. (2000). Prognostic significance of skin and subcutaneous fat sequestration of parasites in severe falciparum malaria. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health *31*, 203–212.

Wilking, H., Buda, S., von der Lippe, E., Altmann, D., Krause, G., Eckmanns, T., and Haas, W. (2010). Mortality of 2009 pandemic influenza A(H1N1) in Germany. Euro Surveill. *15*.

Williams, B.G., Gouws, E., Boschi-Pinto, C., Bryce, J., and Dye, C. (2002). Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. Lancet Infect Dis *2*, 25–32.

Winer, D.A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P.P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M.G., Alonso, M.N., et al. (2011). B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. Nat. Med. *17*, 610–617.

Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielenski, J., Mastronardi, F., et al. (2009). Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. Nat. Med. *15*, 921–929.

Witte, N., Muenzner, M., Rietscher, J., Knauer, M., Heidenreich, S., Nuotio-Antar, A.M., Graef, F.A., Fedders, R., Tolkachov, A., Goehring, I., et al. (2015). The Glucose Sensor ChREBP Links De Novo Lipogenesis to PPARγ Activity and Adipocyte Differentiation. Endocrinology *156*, 4008–4019.

Wood, I.S., de Heredia, F.P., Wang, B., and Trayhurn, P. (2009). Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. Proc Nutr Soc *68*, 370–377.

Wu, D., Molofsky, A.B., Liang, H.-E., Ricardo-Gonzalez, R.R., Jouihan, H.A., Bando, J.K., Chawla, A., and Locksley, R.M. (2011). Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. Science *332*, 243–247.

Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., et al. (2012). Beige Adipocytes are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. Cell *150*, 366–376.

Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J. Clin. Invest. *112*, 1821–1830.

Xu, X., Grijalva, A., Skowronski, A., van Eijk, M., Serlie, M.J., and Ferrante, A.W. (2013). Obesity Activates a Program of Lysosomal-Dependent Lipid Metabolism in Adipose Tissue Macrophages Independently of Classic Activation. Cell Metabolism *18*, 816–830.

Xue, B., Kim, Y.-B., Lee, A., Toschi, E., Bonner-Weir, S., Kahn, C.R., Neel, B.G., and Kahn, B.B. (2007). Protein-tyrosine phosphatase 1B deficiency reduces insulin resistance and the diabetic phenotype in mice with polygenic insulin resistance. J. Biol. Chem. *282*, 23829–23840.

Yángüez, E., Rodriguez, P., Goodfellow, I., and Nieto, A. (2012). Influenza virus polymerase confers independence of the cellular cap-binding factor eIF4E for viral mRNA translation. Virology *422*, 297–307.

Yao, L., Korteweg, C., Hsueh, W., and Gu, J. (2008). Avian influenza receptor expression in H5N1-infected and noninfected human tissues. FASEB J. *22*, 733–740.

Ye, L., Kleiner, S., Wu, J., Sah, R., Gupta, R.K., Banks, A.S., Cohen, P., Khandekar, M.J., Boström, P., Mepani, R., et al. (2012). TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation and energy homeostasis. Cell *151*, 96–110.

Yin, D., Clarke, S.D., Peters, J.L., and Etherton, T.D. (1998). Somatotropin-dependent decrease in fatty acid synthase mRNA abundance in 3T3-F442A adipocytes is the result of a decrease in both gene transcription and mRNA stability. Biochem. J. *331 (Pt 3)*, 815–820.

Yoshizumi, T., Ichinohe, T., Sasaki, O., Otera, H., Kawabata, S., Mihara, K., and Koshiba, T. (2014). Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. Nat Commun *5*, 4713.

Yu, L., Xu, Y., Wang, F., Yang, C., Liu, G., and Song, X. (2016). Functional Roles of Pattern Recognition Receptors That Recognize Virus Nucleic Acids in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Biomed Res Int *2016*, 9872138.

Yu, X., Tsibane, T., McGraw, P.A., House, F.S., Keefer, C.J., Hicar, M.D., Tumpey, T.M., Pappas, C., Perrone, L.A., Martinez, O., et al. (2008). Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. Nature *455*, 532–536.

Zamarin, D., García-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R., and Palese, P. (2005). Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. PLoS Pathog. *1*, e4.

Zammit, C., Liddicoat, H., Moonsie, I., and Makker, H. (2010). Obesity and respiratory diseases. Int J Gen Med *3*, 335–343.

Zeng, H., Pappas, C., Belser, J.A., Houser, K.V., Zhong, W., Wadford, D.A., Stevens, T., Balczon, R., Katz, J.M., and Tumpey, T.M. (2012). Human pulmonary microvascular endothelial cells support productive replication of highly pathogenic avian influenza viruses: possible involvement in the pathogenesis of human H5N1 virus infection. J. Virol. *86*, 667–678.

Zhang, H. (2009). Tissue and host tropism of influenza viruses: importance of quantitative analysis. Sci. China, C, Life Sci. *52*, 1101–1110.

Zhang, H., Luo, J., Alcorn, J.F., Chen, K., Fan, S., Pilewski, J., Liu, A., Chen, W., Kolls, J.K., and Wang, J. (2017). AIM2 Inflammasome Is Critical for Influenza-Induced Lung Injury and Mortality. J. Immunol. *198*, 4383–4393.

Zhang, L., and Wang, A. (2012). Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. Front Plant Sci *3*.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature *372*, 425–432.

Zhao, M., Wang, L., and Li, S. (2017). Influenza A Virus–Host Protein Interactions Control Viral Pathogenesis. Int J Mol Sci *18*.

Zhou, N.N., Senne, D.A., Landgraf, J.S., Swenson, S.L., Erickson, G., Rossow, K., Liu, L., Yoon, K. j, Krauss, S., and Webster, R.G. (1999). Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. J. Virol. *73*, 8851–8856.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2010). Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. Immunol. Rev. *238*, 247–262.

Zhu, P., Liang, L., Shao, X., Luo, W., Jiang, S., Zhao, Q., Sun, N., Zhao, Y., Li, J., Wang, J., et al. (2017). Host Cellular Protein TRAPPC6AΔ Interacts with Influenza A Virus M2 Protein and Regulates Viral Propagation by Modulating M2 Trafficking. J. Virol. *91*.

Zou, L., Menon, R.K., and Sperling, M.A. (1997). Induction of mRNAs for the growth hormone receptor gene during mouse 3T3-L1 preadipocyte differentiation. Metab. Clin. Exp. *46*, 114–118.

Zuccotti, G., Pogliani, L., Pariani, E., Amendola, A., and Zanetti, A. (2010). Transplacental Antibody Transfer Following Maternal Immunization With a Pandemic 2009 Influenza A(H1N1) MF59-Adjuvanted Vaccine. JAMA *304*, 2360–2361.

Zuccotti, G., Pogliani, L., Pariani, E., Amendola, A., and Zanetti, A. (2010). Transplacental Antibody Transfer Following Maternal Immunization With a Pandemic 2009 Influenza A(H1N1) MF59-Adjuvanted Vaccine. JAMA *304*, 2360–2361.

Zuriaga, M.A., Fuster, J.J., Gokce, N., and Walsh, K. (2017). Humans and Mice Display Opposing Patterns of "Browning" Gene Expression in Visceral and Subcutaneous White Adipose Tissue Depots. Front Cardiovasc Med *4*.

Zwick, R.K., Guerrero-Juarez, C.F., Horsley, V., and Plikus, M.V. (2018). Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. Cell Metab. *27*, 68–83.