



**HAL**  
open science

# Caractérisation des lymphocytes T CD8 du tissu adipeux au cours de l'infection par le VIH/SIV

Anaëlle Olivo

► **To cite this version:**

Anaëlle Olivo. Caractérisation des lymphocytes T CD8 du tissu adipeux au cours de l'infection par le VIH/SIV. Immunité adaptative. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ043 . tel-03881585

**HAL Id: tel-03881585**

**<https://theses.hal.science/tel-03881585v1>**

Submitted on 1 Dec 2022

**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.

# Caractérisation des lymphocytes T CD8 du tissu adipeux au cours de l'infection par le VIH/SIV

*Characterization of CD8 T cells within adipose tissue in the context of  
HIV/SIV infection*

## Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat : Immunologie  
Graduate School : Santé et médicaments  
Réfèrent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche : Immunologie des maladies virales, auto-immunes, hématologiques et bactériennes (Université Paris-Saclay, Inserm, CEA),  
sous la direction de **Christine BOURGEOIS**, Chargée de recherche INSERM,  
et la codirection d'**Olivier LAMBOTTE**, Professeur des Universités – Praticien hospitalier

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 7 octobre 2022, par

**Anaëlle OLIVO**

## Composition du Jury

**Pierre DELOBEL**

PU-PH, HDR, Université de Toulouse

Président

**Victor APPAY**

Directeur de recherche INSERM, HDR, Université de Bordeaux

Rapporteur & Examineur

**Isabelle WOLOWCZUK**

Directrice de recherche CNRS, HDR, Université de Lille

Rapporteur & Examinatrice

**Mireille LAFORGE**

Chargée de recherche CNRS, HDR, Université de Paris

Examinatrice

**Christine BOURGEOIS**

Chargée de recherche INSERM, HDR, Université Paris-Saclay

Directrice de thèse

**Titre :** Caractérisation des lymphocytes T CD8 du tissu adipeux au cours de l'infection par le VIH/SIV

**Mots clés :** Lymphocytes T CD8, Tissu adipeux, Infection virale, VIH/SIV, Sars-CoV-2

**Résumé :** Les réponses T CD8 sont cruciales pour le contrôle des infections virales. Dans le contexte de l'infection par le VIH, infection chronique avec réservoirs tissulaires disséminés, la qualité des lymphocytes T (LyT) mémoires tissulaires pourrait tout autant contribuer à la qualité du contrôle viral que les LyT circulants. Au niveau sanguin, le potentiel de migration des LyT pourrait également être un élément clé définissant une réponse efficace. Sur cette hypothèse, l'objectif du travail était d'évaluer les propriétés des LyT CD8 à la fois dans le sang et dans un tissu facilement accessible dans un contexte clinique : le tissu adipeux (TA), tissu pour lequel l'équipe a une expertise forte.

Notre première étude souligne l'hétérogénéité des sous-populations T CD8 mémoires plasmiques et montre l'importance d'intégrer la capacité de migration pour la caractérisation des LyT CD8 dans le contexte de l'infection chronique par le VIH. Les LyT CD8 spécifiques du VIH présentaient une plus forte proportion de cellules exprimant des récepteurs aux chimiokines CXCR3 et CXCR5 sur la fraction mémoire centrale. Nous n'avons néanmoins pas observé de différences entre les patients contrôleurs spontanés et les patients traités par antirétroviraux. La deu-

xième étude portait sur la caractérisation des LyT CD8 du TA. Le TA est en effet un site métabolique mais également un site d'accumulation de LyT CD8 qui exercent une activité anti-infectieuse. Dès lors, nous avons souhaité évaluer l'impact de l'infection chronique par le SIV contrôlée par un traitement sur le compartiment T CD8. Le compartiment hématopoïétique (cellules CD45+) était durablement réduit dans le contexte de l'infection chronique, sans effet correctif des antirétroviraux. Au sein des cellules CD45+, la fraction T CD8 est néanmoins préférentiellement préservée. Nous avons observé un profil d'expression de récepteurs aux métabolites énergétiques spécifiques aux LyT CD8 qui pourrait expliquer leur persistance préférentielle dans le TA. En parallèle, nous avons mené une étude dans un modèle d'infection modérée et précoce à SARS-CoV-2, nous avons montré que ce virus a un impact sur le TA (i) par une infection directe du TASC, et (ii) par des effets de proximité sur les TA infectés et non infectés.

L'ensemble de ces résultats confirme que le tissu adipeux est sensible aux contextes infectieux, et la nature des modifications touchant les cellules immunitaires résidentes du TA devra être plus finement évaluée.

**Title :** Characterization of CD8 T cells within adipose tissue in the context of HIV/SIV infection

**Keywords :** CD8T cells, Adipose tissue, Viral infection, HIV /SIV, Sars-CoV-2

**Abstract:** CD8 T responses are crucial for the control of viral infections. In the context of HIV infection, a chronic infection with disseminated tissue reservoirs, the quality of resident memory T cells could contribute to the quality of viral control as crucially as circulating T lymphocyte. Additionally, the migration potential of T cell in the blood could be a major aspect allowing efficient immune responses. Based on this hypothesis, the objective of the thesis was to evaluate the properties of CD8 T cells both in the blood and in a tissue easy to harvest in a clinical context: the adipose tissue, tissue for which the team has strong expertise.

Our first study highlights the heterogeneity of circulant CD8 memory cells and shows the importance of integrating migration capacity for the characterization of CD8 T cell in the context of chronic HIV infection. HIV-specific CD8 T cells showed a higher proportion of cells expressing CXCR3 and CXCR5 chemokine receptors on the central memory fraction. However, we did not observe any differences between spontaneous controller patients and patients treated with antiretrovirals. The second study focused on

characterization of CD8 T cells in AT. The AT is a metabolic site but also a site of accumulation of CD8 T cells exhibiting anti-infective properties. Therefore, we wanted to assess the impact of chronic SIV infection, efficiently treated, by antiretrovirals on the CD8 T cells compartment. The hematopoietic compartment was reduced in the context of chronic infection, without corrective effect of antiretrovirals. Within CD45+ cells, the CD8 T cell fraction was preferentially preserved. We observed a specific profile of metabolite receptors expression on CD8 T cells that could explain their preferential persistence in AT. Finally, as a adjustment to the SARS-coV-2 pandemic, we conducted a study in a model of moderate SARS-CoV-2 infection and showed that this virus has an impact on AT (i) by direct infection of subcutaneous infection, and (ii) by local effects on infected and uninfected AT.

All of these results confirm that adipose tissue is sensitive to infectious contexts, and the nature of the modifications affecting the resident immune cells of AT should be more finely assessed.



## **Remerciements**

*A l'issue de ces années de thèse, je suis convaincue que le chemin parcouru est le fruit d'un long travail, de détermination et persévérance, et au cours duquel j'ai beaucoup appris. Mais ce chemin est loin d'être un voyage solitaire, alors je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin, et dont l'intérêt, la générosité et la bonne humeur manifestés m'ont permis d'avancer et d'arriver au bout de cette aventure !*

*Mes remerciements vont tout d'abord aux membres du jury.*

*Au **Pr Pierre Delobel**,*

*de me faire l'honneur de présider mon jury.*

*Aux Dr **Isabelle Wolowczuk** et Dr **Victor Appay**,*

*d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci pour l'attention portée à la lecture du manuscrit et pour les conseils qui ont permis d'améliorer la qualité de ce manuscrit.*

*Au Dr **Mireille Laforge**,*

*d'avoir accepté de participer à ce jury.*

*Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail. C'est un très grand honneur pour moi de vous compter dans mon jury, je tiens à vous exprimer toute ma gratitude.*

*Mes remerciements s'adressent également au Dr **Alexandre Boissonas**, membre de mon comité de suivi. Je vous remercie pour les échanges constructifs qui ont permis d'enrichir mon travail. Merci également pour votre réactivité et votre bienveillance, je vous en suis reconnaissante.*

*Je remercie le Dr **Roger Le Grand**, directeur de l'unité, de m'avoir accueillie au sein de l'unité.*

*Mes remerciements s'adressent ensuite évidemment à mes directeurs de thèse.*

*A **Olivier Lambotte**, je vous remercie de m'avoir permis d'intégrer l'équipe de recherche pour mon Master 2 en 2016 et de m'avoir fait confiance pour mener ce projet de thèse par la suite. Merci pour vos conseils et votre expertise clinique, pour le temps consacré aux discussions scientifiques. Merci également pour votre disponibilité, votre écoute et votre réactivité. Je réalise la chance que j'ai eue de mener cette thèse au sein de l'équipe.*

*A **Christine Bourgeois**, ces quelques lignes ne suffiront pas à te témoigner ma profonde reconnaissance pour ton accompagnement indéfectible du premier au dernier jour de ces quatre années de thèse. Cette aventure n'aurait pas commencé sans toi, et j'aurai abandonné mille fois sans toi ! Alors merci, merci, merci ! Merci pour ta rigueur et ta grande disponibilité, pour tes qualités pédagogiques et organisationnelles qui ont été essentielles à toutes les étapes et particulièrement rassurantes cette dernière année. Merci également pour ta sympathie, ton*

enthousiasme et ta bienveillance qui sont pour moi des qualités humaines de grande valeur et qui ont été précieuses tout au long de cette aventure. Merci de m'avoir fait grandir, de m'avoir appris à raconter des histoires et de m'avoir permis de sortir au cours de cette aventure confinée.

Je crois qu'on peut le dire cette fois, on y est ~~presque~~!

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont permis un accès privilégié aux prélèvements qu'il s'agisse des cohortes ANRS Codex, ANRS Primo, des prélèvements de tissu adipeux ou encore des différentes collaborations mises en place au cours de ces travaux et qui ont permis d'une part de rendre mes quotidiens animés mais surtout qui ont permis d'enrichir ces travaux ! Merci en particulier à Roger Le Grand, Delphine Desjardins, Nathalie Dereuddre-Bosquet, Romain Marlin, Anne-Sophie Gallouet et la team FlowCyTech. Merci à Guillaume Pourcher, Stéphane Benoist et Thierry Lazure. Enfin merci à Géraldine Schlecht-Louf.

Et puis je tiens à remercier très chaleureusement l'ensemble de l'équipe.

Team immuno/ rhumato, Les Olivettes, L2 Anakinra (les p'tits tubes on s'en souviendra longtemps), Les Zouz', l'Après, l'U1184 le soir, From Stuttgart to Paris, les Afterworks KB-CEA.

Peu importe l'équipe, ma Team à moi c'est vous ! Merci pour ces 6 années à vos côtés !! Si l'aventure a été si belle c'est grâce à vous ! Merci d'avoir rendu ces quotidiens si énergiques, joyeux et caloriques ! Trouvez ici le signe de ma sincère amitié.

A ma **Bitu**, l'histoire a commencé avec un Ficoll renversé, ça partait mal ! Et pourtant, quelques karaokés dans le L2 plus tard, nous y voilà ! « Besoin de rien ? ... » Merci pour tout : ta sincérité, ton humour, ton amitié ! Merci d'avoir grandement participé à faire de nous une équipe !

A **Audraïce**, une rhumato qui parle VIH, une infiltrée !! On peut dire que les confinements nous auront rapprochées, entre les tropiques du L2 Anakinra et ton post-doc ! Merci pour ta fidèle amitié !

A **Elo**, c'était tellement chouette de t'avoir dans l'équipe ! Merci pour ta bonne humeur et ton calme olympien, j'ai beaucoup à apprendre !

A **Djouliette**, toi et moi, c'est fou ce qu'on se ressemble à quelques bougies près ! Merci d'avoir partagé toutes tes anecdotes (le début tout du moins) ! Merci pour ton énergie et ta sympathie.

A **Binetaaa**, encore une histoire que le COVID a accélérée ! Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur !

A **Camille** et **Candie**, merci pour tous les fous rires, pour vos anecdotes dignes des plus grands scénarios, pour l'Apéro du vendredi, les week-ends au grand air !

A **Christy**, aux nombreuses nocturnes au labo, aux journées intenses un peu décalées. Merci pour ta sympathie !

A **Léo** et **Meudec (#Loïc)** je vous souhaite le meilleur pour votre thèse et pour la suite chers Doc'.

A **Bitoun**, **Adela**, **Chloë**, **Annamaria**, **Delphine**, **Phiphi**, **Clara**, **Rami**, **Céline**.

A **Julien**, **Stéphane**, **Romain** et **Oscar**, merci pour votre accueil au CEA, pour votre sympathie, votre humour. Merci d'avoir été moteurs dans la vie (diurne et nocturne) de l'équipe KB-CEA !

A tous les **doctorants, et étudiants** côtoyés et en particulier Chloé, Jalal, François.

J'adresse enfin un grand merci à **tous les membres de l'équipe** pour leurs conseils et leur bienveillance. C'était un plaisir de travailler à vos côtés pendant toutes ces années.

A mes amis.

Une pensée à tous ceux qui me sont chers et en particulier :

Aux Sioux : **Amel, Caro, Marie, Marie-Anne, Marine, Thibaut.**

Aux Villejuifois : **Arnaud, Béré, Marie, Doudou**

A **Jacquie & Lise**

A **Clara, Charly** et **Maxou**

Parce que ce travail a pris beaucoup de place dans ma vie, je tiens à vous remercier pour votre amitié. Merci pour votre soutien et vos encouragements. Notre amitié m'est chère, votre présence est essentielle.

Enfin, j'ai une pensée particulière pour ma famille,

A mes **parents**,

A **Ju** et **Maë**,

A **Baptiste** et **JR**,

Merci d'avoir toujours cru en moi. Merci pour le soutien inconditionnel et vos encouragements.

A **Isaure** et **Suzanne**,

Notre aventure à nous elle commence, profitons-en !

Merci de vous être intéressés à mes travaux, d'avoir essayé de comprendre ce qu'était la cytométrie, c'était un bon apprentissage pour mes résumés « Grand public ». Merci de vous être inquiétés pour mes « p'tits bouts de gras » !

Votre amour et votre présence même à distance m'ont été précieux et indispensables à l'aboutissement de cette longue aventure.

Je vous aime tant

A ma grand-mère, Suzanne,  
Reçois ici toute ma tendresse.



## **Table des matières**

---

<b>Liste des abréviations</b> .....	i
<b>Liste des illustrations</b> .....	iii
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>17</b>
I. Tissu adipeux : un tissu métabolique avec une composante immunitaire .....	19
A. Généralités.....	19
1. Définition.....	19
2. Différents tissus adipeux .....	19
3. Distribution anatomique du tissu adipeux blanc.....	20
4. Excès de tissu adipeux et pathologies associées .....	22
5. Autres facteurs pouvant influencer le tissu adipeux.....	24
a. Age et genre .....	24
b. Prédisposition génétique .....	25
c. Environnement.....	26
B. Composition du tissu adipeux .....	26
1. Architecture et vascularisation du tissu adipeux.....	27
a. Matrice extracellulaire .....	27
b. Vascularisation .....	28
2. Composition cellulaire .....	28
a. Fraction adipocytaire .....	29
b. Fraction stroma-vasculaire .....	29
Composante métabolique .....	29
Composante immunitaire .....	32
• Macrophages .....	33
• Lymphocytes .....	35
C. Fonctions du tissu adipeux.....	37
1. Fonctions métaboliques.....	37
a. Lipogenèse et réserve énergétique.....	38
• Apport des acides gras de l'alimentation .....	38
• Lipogenèse.....	38
• Régulation de la synthèse des triglycérides.....	39
b. Lipolyse et mobilisation des triglycérides.....	40
2. Implications physiologiques multiples.....	41
a. Tissu adipeux, organe sécrétoire et endocrine : les adipokines .....	42
• Leptine.....	43
• Adiponectine.....	45

b.	Tissu adipeux et inflammation : cytokines, interleukines et chimiokines .....	46
•	TNF- $\alpha$ .....	46
•	IL-6.....	47
•	MCP-1.....	47
c.	Tissu adipeux et hémostasie .....	48
d.	Tissu adipeux et pression artérielle .....	49
3.	Immuno-métabolisme.....	50
a.	Régulation du métabolisme du glucose, par les cytokines pro-inflammatoires..	50
b.	Adipocytes, acteurs de la réponse immunitaire .....	51
c.	Voies métaboliques et polarisation lymphocytaire.....	52
d.	Rôle des cellules immunitaires dans le métabolisme tissulaire.....	52
•	Implication des cellules immunitaires dans l'inflammation systémique ....	52
•	Action des lymphocytes sur le métabolisme adipocytaire .....	53
II.	Tissu adipeux et infection .....	55
A.	Obésité et susceptibilité aux infections .....	55
1.	Infections associées aux soins.....	55
2.	Infections cutanées.....	56
3.	Infections respiratoires.....	56
•	Infection grippale .....	57
•	Infection à SARS-CoV-2.....	57
B.	Présence de pathogènes : réservoirs.....	58
1.	Bactéries .....	58
a.	Mycobacterium tuberculosis .....	58
b.	Staphylococcus aureus.....	59
2.	Parasites.....	60
a.	Trypanosoma cruzi .....	60
b.	Plasmodium species.....	60
3.	Virus .....	61
C.	Focus HIV .....	61
D.	Focus SARS-CoV-2 .....	66
E.	Activité anti-infectieuse du tissu adipeux.....	69
1.	Adipocytes.....	70
2.	Cellules immunitaires .....	70
III.	Cellules immunitaires du tissu adipeux .....	72
A.	Caractérisation des sous-populations lymphocytaires T CD8 .....	72
1.	Génération de la mémoire.....	72
2.	Diversité de la mémoire.....	73
3.	Caractérisation phénotypique des lymphocytes T CD8 systémiques .....	74

a.	CCR7, CD62L : distinction T <sub>CM</sub> et T <sub>EM</sub> .....	74
b.	Caractéristiques phénotypiques de la mémoire.....	74
c.	Plusieurs modèles de différenciation de la mémoire T <sub>CM</sub> /T <sub>EM</sub> .....	75
d.	Déterminants de l'efficacité de la mémoire .....	75
4.	Caractérisation phénotypique des lymphocytes T CD8 tissulaires : CD69 .....	76
a.	Lymphocytes T mémoires résidents.....	76
b.	Particularités des LyT du TA.....	77
•	CD69, de l'activation à la résidence.....	78
•	PD1, de l'activation à l'épuisement lymphocytaire et marqueur du réservoir viral .....	78
B.	Importance de la migration dans la définition de la mémoire.....	79
a.	CXCR3.....	80
b.	CX3CR1 .....	81
IV.	Hypothèses et objectifs .....	83
	<b>MATERIELS &amp; METHODES .....</b>	<b>85</b>
I.	Matériels biologiques.....	87
A.	Prélèvements sanguins chez l'Homme .....	87
1.	Patients infectés de façon chronique par le VIH.....	87
a.	Patients HIV Controllers .....	87
b.	Patients traités et contrôlés au long cours.....	88
2.	Sujets séronégatifs pour le VIH, groupe contrôle .....	88
3.	Autorisation de la recherche et déclaration d'éthique .....	89
B.	Prélèvements de tissu adipeux .....	89
1.	Modèle primate .....	89
a.	Modèle d'infection par le SIV .....	89
b.	Modèle d'infection par le SARS-CoV-2 .....	91
c.	Accessibilité du tissu adipeux dans les modèles simiens.....	91
d.	Autorisation de la recherche et déclaration d'éthique .....	92
2.	Modèle humain.....	92
a.	Modèle d'infection à VIH .....	92
b.	Modèle d'infection à SARS-CoV-2.....	93
c.	Autorisation de la recherche et déclaration d'éthique .....	94
II.	Méthodes.....	94
A.	Préparation des échantillons .....	94
1.	Choix du sang total versus PBMC.....	94
2.	Traitement des échantillons de tissu adipeux.....	95
a.	Echantillonnage pour la biothèque.....	95
b.	Dissociation des échantillons de tissu adipeux .....	95

B. Cytométrie en flux .....	96
1. Protocole de marquage sur sang total .....	96
2. Protocole de marquage sur tissu adipeux.....	97
3. Cytomètre .....	101
<b>RESULTATS .....</b>	<b>103</b>
<b>Article 1. Forte expression de CXCR3 et CXCR5 sur les lymphocytes T CD8 mémoires centrales spécifiques du VIH-1 chez les patients infectés.....</b>	<b>105</b>
• Résumé.....	105
<b>Article 2. Détection du SARS-CoV-2 dans le tissu adipeux sous-cutané et non dans le tissu adipeux viscéral, et perturbation de l'homéostasie lymphocytaire dans ces deux tissus chez le macaque .....</b>	<b>123</b>
• Résumé.....	123
<b>Article 3. Impact à long terme de l'infection par le SIV, contrôlée par un traitement antirétroviral, sur la composante immunitaire et mésenchymateuse du tissu adipeux .....</b>	<b>137</b>
• Résumé.....	137
<b>Revue 1. Contribution du tissu adipeux à l'activation immunitaire et à l'inflammation chronique associée à l'infection par le VIH et les traitements antirétroviraux.....</b>	<b>171</b>
• Résumé.....	171
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>195</b>
I. Rappel des résultats obtenus en préalable à la discussion.....	197
II. Discussion .....	199
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>213</b>



## *Liste des abréviations*

---

ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
AG	Acide gras
Ag	Antigène
AGN	Angiotensinogène
AGNE	Acide gras non estérifiés
ASC	Adipose stem cells
AT	Angiotensine
ATGL	Adipose triglyceride lipase
ATP	Adénosine triphosphate
CLS	Structure en couronne
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPAg	Cellule présentatrice d'antigène
CSM	Cellules souches mésenchymateuses
DC	Cellule dendritique
DG	Diglycéride
FABP	Fatty acid binding protein
FATP	Fatty acid transport protein
FSV	Fraction stroma-vasculaire
G3P	Glycérol 3-phosphate
GLUT	Transporteur du glucose
HIC	HIV Controllers
HIF	Hypoxia inductible factor
ILC	Cellule lymphoïde innée
IMC	Indice de masse corporelle
IFN	Interféron
IL	Interleukine
LHS	Lipase hormono-sensible
LPL	Lipoprotéine lipase
LyB	Lymphocyte B
LyT	Lymphocyte T
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein
MEC	Matrice extracellulaire
MG	Monoglycéride
NK	Cellule « natural killer »
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1
PPAR	Proliférateur de peroxyosome
SARS	Syndrome respiratoire aigu sévère
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone
TA	Tissu adipeux
TAE	Tissu adipeux épiqueur
TARV	Trithérapie antirétrovirale
TASC	Tissu adipeux sous-cutané

TAV	Tissu adipeux viscéral
TCM	Lymphocyte central mémoire
TCR	Récepteur des cellules T
TEM	Lymphocyte effecteur mémoire
TG	Triglycéride
TGF	Transforming growth factor
TLR	Récepteurs de type Toll
TNF	Facteur de nécrose tumorale
Treg	Lymphocyte T régulateur
TRM	Lymphocyte mémoire résident
UCP-1	Uncoupling protein-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## **Liste des illustrations**

---

<b>Figure 1</b> : Répartition des dépôts de tissu adipeux blanc chez l'Homme.....	22
<b>Figure 2</b> : Remodelage du tissu adipeux .....	23
<b>Figure 3</b> : Composition du tissu adipeux sain.....	27
<b>Figure 4</b> : Régulation de l'adipogenèse .....	30
<b>Figure 5</b> : Cellules immunitaires et signalisation inflammatoire du tissu adipeux.....	33
<b>Figure 6</b> : Voies de biosynthèse des acides gras et triglycérides dans l'adipocyte .....	39
<b>Figure 7</b> : Voies de la lipolyse adipocytaire .....	40
<b>Figure 8</b> : Implications physiologiques du tissu adipeux .....	42
<b>Figure 9</b> : Rôle physiologique de la leptine dans l'immunité innée et adaptative. ....	44
<b>Figure 10</b> : Rôle physiologique de l'adiponectine dans l'immunité innée et adaptative.....	46
<b>Tableau 1</b> : Contribution des cellules immunitaires du tissu adipeux à l'inflammation .....	53
<b>Figure 11</b> : Interactions des lymphocytes T CD8 avec les cellules infectées chez les HIV Controllers et les patients progressseurs .....	63
<b>Figure 12</b> : Facteurs associés à la survenue d'une infection sévère à SARS-CoV-2 chez les patients obèses.....	69



# ***AVANT-PROPOS***

---

Mes travaux de recherche se sont intéressés à la caractérisation des lymphocytes T (LyT) CD8 du tissu adipeux (TA) au cours de l'infection par le VIH et son équivalent simien le SIV. Ces travaux comprenaient une double approche : (i) une caractérisation des LyT CD8 du sang, et en particulier de leur profil de migration, chez les personnes vivant avec le VIH (PVVIH) et qui présentent un contrôle de la réplication virale, et (ii) une caractérisation des LyT CD8 dans un tissu réservoir : le TA. Cette partie de l'étude reposait sur un modèle d'infection chez le primate non humain. En parallèle, comme de nombreux laboratoires de recherche, notre activité a été bousculée par la pandémie de SARS-CoV-2, et nous avons eu l'opportunité de développer un programme de recherche dédié à l'infection par le SARS-CoV-2. Compte tenu de la susceptibilité accrue de l'infection à SARS-CoV-2 et des formes sévères de COVID-19 chez les patients obèses, nous avons pu ouvrir ma thématique de thèse, le tissu adipeux, à cette infection.

L'introduction que je vous propose sera principalement axée sur le TA, introduction où le SARS-CoV-2 est intégré en complément du VIH/SIV. Dans un premier chapitre, je rappellerai le contexte des travaux en introduisant tout d'abord le TA. Il s'agira ici de détailler les différents types de TA, la composition et les fonctions du TA blanc. La diversité fonctionnelle du TA (métabolique, régénérative, immunitaire) est évoquée le lien TA/infection sera approfondi. C'est l'objet du deuxième chapitre de cette introduction où il s'agira de développer la notion de susceptibilité aux infections dans le contexte de l'obésité d'une part et de préciser les contextes où le TA est réservoir de pathogènes d'autres part. Un focus sera consacré aux infections virales. Enfin, je viendrai préciser l'axe de recherche sur les cellules immunitaires du TA et en particulier les LyT CD8. La troisième partie de l'introduction est donc dédiée à la caractérisation des réponses T CD8 en insistant sur les notions de chronicité et de migration, mais également sur les notions d'immunité tissulaire et de mémoires résidentes.

# ***INTRODUCTION***

---



## **I. Tissu adipeux : un tissu métabolique avec une composante immunitaire**

### **A. Généralités**

#### **1. Définition**

Le tissu adipeux (TA) est un tissu conjonctif important du fait de sa large distribution anatomique. Il constitue la plus grande réserve énergétique de l'organisme. L'énergie y est stockée sous forme de triglycérides (TG) au sein de son unité cellulaire fonctionnelle : l'adipocyte. Mais le TA n'est pas seulement un organe de réserve, c'est aussi un organe avec une activité physiologique complexe. Le TA se définit ainsi comme un tissu métabolique actif, un véritable organe endocrine, ce qui le place au centre de l'équilibre métabolique et de l'homéostasie énergétique. D'une plasticité remarquable, il est capable d'expansion massive face à un apport calorique chronique et en excès (Sun et al., 2011). Enfin, par sa localisation anatomique stratégique, à proximité de nombreux organes vitaux, et les caractéristiques physiologiques des différents TA, le TA est un organe impliqué dans de nombreux processus métaboliques et contribue de façon significative à la régulation de l'homéostasie énergétique.

#### **2. Différents tissus adipeux**

Chez les mammifères, trois principaux TA sont décrits : le TA brun, le TA blanc, le TA beige. Les distinctions entre ces TA s'établissent aux niveaux anatomique, histologique et fonctionnel.

- Le TA brun est un acteur essentiel de la thermogénèse adaptative. Il se compose d'adipocytes bruns, riches en mitochondries et protéines découplantes « *uncoupling protein-1* » ou UCP-1, responsables non seulement de la couleur brunâtre mais aussi de la capacité métabolique intense. La protéine UCP-1, localisée dans la membrane mitochondriale permet de découpler la chaîne respiratoire de la production d'adénosine triphosphate (ATP) en faveur d'une libération d'énergie par thermogénèse. Il est principalement présent chez les animaux hibernants, les fœtus et nouveau-nés, localisé dans les régions axillaires, cervicales, périrénales et surrénales (Lidell et al., 2013).

- Le TA blanc est le TA majoritaire chez les mammifères puisqu'il peut représenter entre 10 et 30 % de la masse corporelle totale d'un adulte sain (Hausman et al., 2001). C'est un tissu dont la fonction principale est d'assurer le stockage et la libération de l'énergie sous forme de TG (Ouchi et al., 2011). Le TA blanc s'organise en dépôts qui se distinguent par leur structure, leur composition, leur métabolisme ainsi que leur impact sur les organes environnants (Ibrahim, 2010).
- Le TA beige est un troisième type de TA, dont les adipocytes ont une morphologie intermédiaire entre les adipocytes blancs et bruns. Bien que les TA blancs et bruns aient des localisations et propriétés fonctionnelles distinctes, on sait qu'il existe, au sein de dépôts de TA blancs, des adipocytes riches en mitochondries et qui expriment UCP-1, et dont la proportion peut varier selon les conditions physiologiques telles que l'exposition prolongée au froid. Ces adipocytes beiges ou « *brites* » pour « *brown in white* » viennent soutenir le processus de la thermogénèse. C'est le phénomène du brunissement (Kajimura et al., 2015; Petrovic et al., 2010; Wu et al., 2012). De la même manière qu'un « brunissement » du TA blanc est observée, un « blanchissement » du TA brun est également rapporté. En effet, au cours de l'obésité, plusieurs études dans des modèles murins ont décrit une différenciation terminale des pré-adipocytes bruns vers un phénotype de type blanc sans que tous les mécanismes impliqués ne soient à ce jour bien expliqués (Kotzbeck et al., 2018; Modica et al., 2016).
- Enfin, au cours de la grossesse et de l'allaitement, un TA rose se développe à partir de dépôts sous-cutanés de TA blanc. Il joue un rôle est fondamental dans la mise en place de la lactation (Giordano et al., 2014).

Dans la suite de ce travail, nous décrivons exclusivement le TA blanc puisque c'est l'objet de nos travaux, et par simplicité, nous utiliserons le terme « tissu adipeux ».

### **3. Distribution anatomique du tissu adipeux blanc**

Le TA se répartit dans de nombreux sites anatomiques de l'organisme (**Figure 1**) (Ouchi et al., 2011). On distingue le TA de soutien et le TA de réserve énergétique.

Le TA de soutien est un tissu principalement composé d'une matrice extracellulaire (MEC). Sa répartition anatomique est directement liée à sa fonction. On le retrouve donc dans les régions

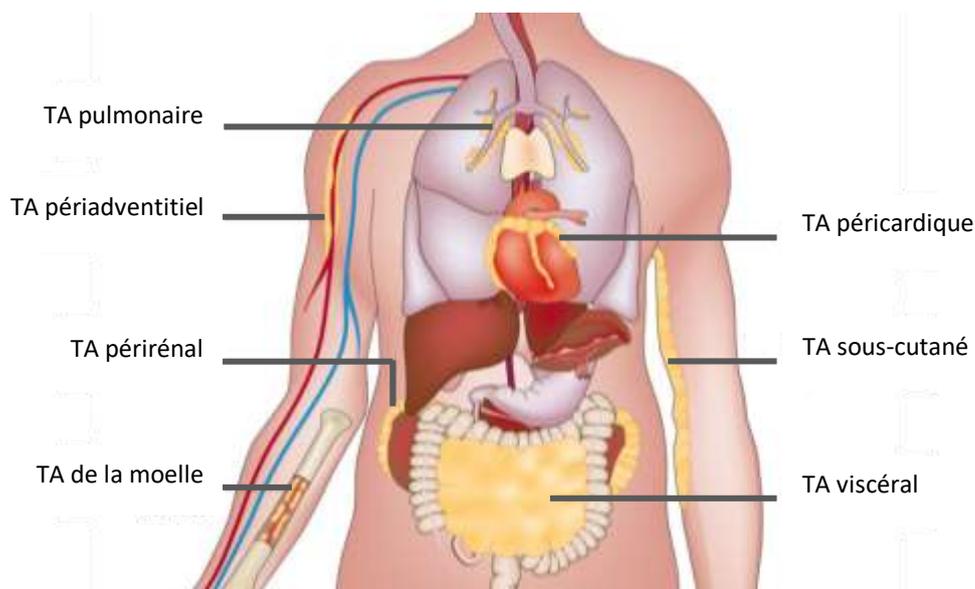
corporelles mécaniquement sollicitées comme la voûte plantaire ou la paume des mains. Ce TA est peu sensible aux variations nutritionnelles.

Le TA de réserve est plus largement répandu dans l'organisme et son développement varie en fonction de la balance énergétique. Il se caractérise à nouveau par une hétérogénéité entre les différents dépôts. Selon leur localisation anatomique, la composition cellulaire, les fonctions métaboliques et sécrétoires spécifiques à chaque site leur confèrent des caractéristiques cliniques et pronostiques propres (Ibrahim, 2010; Shen et al., 2003). La distribution anatomique du TA de réserve se divise en deux dépôts principaux : le TA sous-cutané (TASC) et le TA abdominal viscéral (TAV).

Le TASC représente près de 80 % de la masse grasse chez un sujet adulte de poids normal. Il est le principal TA de réserve, présent dans la zone hypodermique de la peau, et principalement localisé aux niveaux abdominal, glutéal et fémoral (M.-J. Lee et al., 2013). Il est le lieu privilégié du stockage énergétique mais joue aussi un rôle de protection mécanique et d'isolant thermique. Les adipocytes qui le composent sont de taille très variée reflet de la très grande plasticité de ce tissu.

Le TAV, ou TA intra-péritonéal, représente entre 5 et 20 % du TA total. Il entoure les organes vitaux et comprend le TA omental, mésentérique, rétropéritonéal, gonadique et péricardique (Wajchenberg, 2000). C'est un tissu métaboliquement actif, siège d'une lipolyse intense et dont l'expansion est associée à un risque cardiovasculaire accru contrairement au TASC. En termes d'architecture tissulaire et de composition cellulaire, le TAV se distingue du TASC par une vascularisation et une innervation plus développées, une densité cellulaire plus importante au sein de la fraction stroma-vasculaire (FSV) avec notamment un plus grand nombre de cellules inflammatoires et immunitaires (Cancello et al., 2006; Gealekman et al., 2011).

Enfin, le TA épipéricardique (TAE) est un TAV thoracique situé entre le myocarde et le péricarde viscéral (Iacobellis et al., 2005). Il a une activité endocrinienne et métabolique remarquable. Sa localisation lui permet une communication unique avec les cardiomyocytes et les cellules de la paroi vasculaire. Son expansion est corrélée à l'initiation et la progression des pathologies coronariennes (Patel et al., 2017; Tilg & Moschen, 2006).

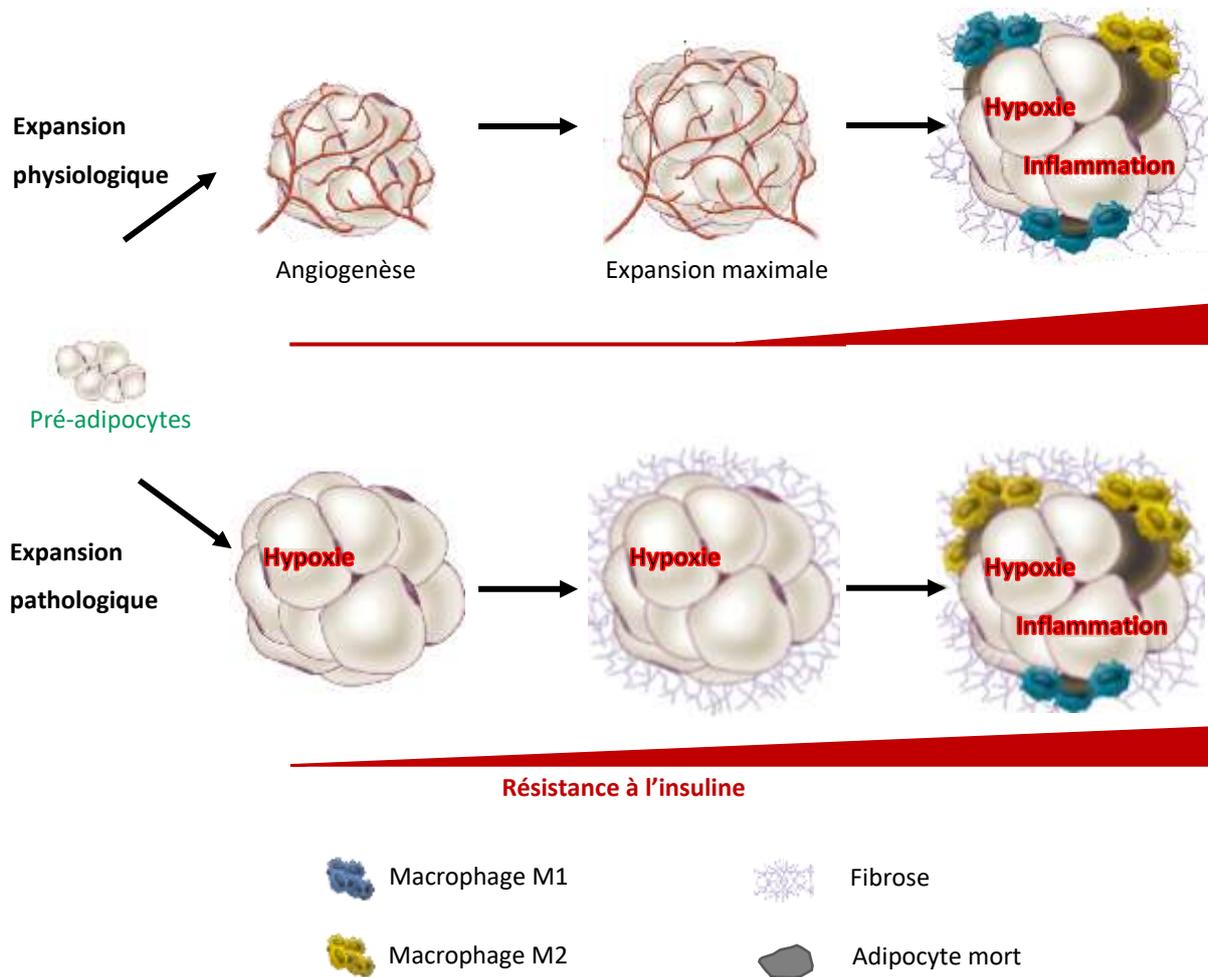


**Figure 1 : Répartition des dépôts de tissu adipeux blanc chez l'Homme**

Chez l'Homme, le tissu adipeux (TA) blanc est réparti en différents sites au sein desquels les sites sous-cutanés et viscéraux sont les plus importants. Il existe aussi des sites d'accumulation du TA au niveau de la moelle osseuse et du thymus, et de la plupart des organes vitaux (TA péripulmonaire péricardique, périrénal), et en périvasculaire. D'après Ouchi et al., 2011.

#### **4. Excès de tissu adipeux et pathologies associées**

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit le surpoids et l'obésité comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». Cette accumulation s'accompagne d'un remodelage du TA. En condition d'apport calorique excessif et chronique, le TA va s'expandre pour faire face à un besoin de stockage énergétique. Cette expansion pathologique du TA implique deux processus : l'hypertrophie adipocytaire (augmentation de la taille des adipocytes matures) et l'hyperplasie adipocytaire (augmentation du nombre d'adipocytes matures) (**Figure 2**) (Choe et al., 2016). L'hypertrophie du TA pourrait être réduite par la restriction calorique, alors que l'hyperplasie des cellules est irréversible. La séquence selon laquelle ces deux processus apparaissent n'est pas clairement définie. Toutefois, les conséquences délétères pour le TA sont avérées et comptent des altérations morphologiques, cellulaires et métaboliques d'installation progressive : hypoxie, mort prématurée des adipocytes, fibrose, réponse inflammatoire et résistance à l'insuline (situation où les cellules deviennent moins sensibles à l'insuline ce qui favorise une moindre utilisation du glucose circulant, parfois aussi appelé état prédiabétique) (Reilly & Saltiel, 2017).



**Figure 2 : Remodelage du tissu adipeux**

Le tissu adipeux est doué d'une extrême plasticité et peut ainsi s'adapter aux différents contextes métaboliques ou inflammatoires. Les mécanismes d'hyperplasie/hypertrophie permettent d'assurer le remodelage du tissu pour prendre en charge les excès énergétiques. Ce remodelage implique une expansion harmonieuse de la composante adipocytaire vasculaire et immunitaire. Mais lorsque ces mécanismes sont dépassés, une expansion pathologique se développe, favorisant l'installation de désordres métaboliques (libération ectopique d'acides gras libres, résistance à l'insuline), vasculaires (hypoxie) et immunitaires (cellules pro-inflammatoires). D'après Sun et al., 2011.

Il est établi que cet excès de TA constitue un facteur de risque important de développer des maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires et la résistance à l'insuline (Schäffler et al., 2006). Cependant, l'impact négatif du surpoids sur la santé n'est pas seulement lié à la quantité totale de masse grasse, il est aussi fonction de sa distribution viscérale ou sous-cutanée. En effet, l'accumulation de TA dans la zone viscérale est reconnue comme associée au développement du syndrome métabolique avec notamment le diabète de type 2, l'hypertension artérielle et les maladies cardiovasculaires (Després, 2006; Wang et al., 2005).

Enfin, le volume de TAV est le paramètre le mieux corrélé à la sensibilité à l'insuline (McLaughlin et al., 2011). C'est donc un TA prédictif de morbi-mortalité. A l'inverse, l'accumulation de TA dans le compartiment sous-cutané est associée à un risque métabolique modéré, certains l'associent même à un rôle protecteur contre les pathologies métaboliques (McLaughlin et al., 2011; Tran et al., 2008).

Compte tenu du risque métabolique associé à l'obésité, l'évaluation de l'adiposité abdominale et notamment du TAV devient essentielle. Cette évaluation se fait habituellement par des mesures anthropométriques qui incluent le poids et la taille, l'indice de masse corporelle (IMC), qui correspond au poids divisé par le carré de la taille, exprimée en  $\text{kg}/\text{m}^2$ , les plis cutanés, le tour de taille et des hanches et le rapport tour de taille/hanches (Sanchis-Gomar et al., 2020). Le surpoids et l'obésité sont définis en fonction de l'IMC (OMS, 2000). On parle de surpoids lorsque que l'IMC est supérieur ou égal à  $25 \text{ kg}/\text{m}^2$  et d'obésité par un rapport supérieur ou égal à 30. En pratique clinique, les mesures anthropométriques sont facilement accessibles et bien corrélées à l'adiposité corporelle totale mais ne permettent pas d'évaluer la distribution des TA et la répartition différentielle entre TASC et TAV. Les techniques d'imagerie (tomographie computationnelle ou l'absorptiométrie par exemple) permettent d'accéder à cette distinction en précisant la distribution et la taille des différents dépôts de TA et en particulier intra- et extra-péritonéaux, mais ces techniques restent peu utilisables en pratique clinique courante (Shen et al., 2003).

### ***5. Autres facteurs pouvant influencer le tissu adipeux***

Le facteur nutritionnel est le principal facteur pouvant impacter le TA. Mais d'autres facteurs viennent aussi influencer son développement et concourent à son hétérogénéité. Nous aborderons ici l'impact de l'âge et du genre, de la prédisposition génétique et de l'environnement.

#### *a. Age et genre*

L'âge et le genre jouent un rôle déterminant dans l'hétérogénéité du TA et en particulier dans sa distribution dans l'organisme et ses fonctions métaboliques.

Au cours du processus de vieillissement, le TA subit un remodelage quantitatif et qualitatif. Il va subir une redistribution anatomique au profit d'une localisation viscérale abdominale, un

remodelage cellulaire laissant apparaître des cellules sénescentes et une modification de ses capacités fonctionnelles avec perte des capacités de renouvellement des cellules progénitrices (Hunter et al., 2010; Tchkonina et al., 2010). Tout ceci concourt à une perturbation de l'homéostasie générale et contribue aux altérations métaboliques d'incidence grandissante avec l'âge : l'insulino-résistance, les pathologies cardiovasculaires, et participe au phénomène d'inflammation systémique décrit au cours du vieillissement.

Parallèlement à cela, un effet du genre sur l'hétérogénéité du TA est également documenté. Une différence notable de distribution du TA entre hommes et femmes est décrite dès le plus jeune âge mais reste plus prononcée après la puberté (Taylor et al., 2010). Dans un contexte d'obésité, cette différence se traduit par une distinction qualifiée d'androïde (chez l'homme) ou gynoïde (chez la femme). L'obésité androïde fait référence à l'accumulation de TAV dans la partie supérieure de l'organisme, alors que l'obésité gynoïde fait référence à l'accumulation de TASC dans la partie inférieure du corps (Karastergiou et al., 2012). Cette distribution préférentielle du TAV selon le genre tend néanmoins à se lisser avec l'âge puisqu'une accumulation de TAV est observée chez les femmes après la ménopause et fait suite à la baisse des taux d'œstrogènes, ce qui souligne par ailleurs l'importance de l'imprégnation hormonale dans le processus de répartition du TA dans l'organisme (Camhi et al., 2011).

### *b. Predisposition génétique*

Des études sur la répartition des graisses et la pathogenèse de l'obésité ont démontré qu'elle ne peut pas uniquement dépendre de facteurs liés au mode de vie et qu'elle serait causée par une combinaison de facteurs dont le facteur génétique. Dans une méta-analyse, réalisée sur plus de 300 000 individus européens, stratifiée sur le genre, les auteurs ont pu mettre en évidence que la répartition des graisses selon le genre n'est pas uniquement liée au facteur hormonal mais qu'il existe un dimorphisme sexuel dans l'expression de nombreux gènes (Winkler et al., 2016). Parmi les loci identifiés, un certain nombre est également corrélé à la survenue de pathologies telles que l'hypertension artérielle, une coronaropathie ou encore un trait diabétique. Enfin, certains patients qui développent une obésité morbide ( $IMC > 40 \text{ kg/m}^2$ ) sont définis « génétiquement sensible à une prise de poids sévère ». On distingue les cas d'obésité monogénique, impliquant principalement la voie de la leptine (hormone anorexigène dite « hormone de la satiété »), des cas d'obésité polygénique où la contribution des gènes

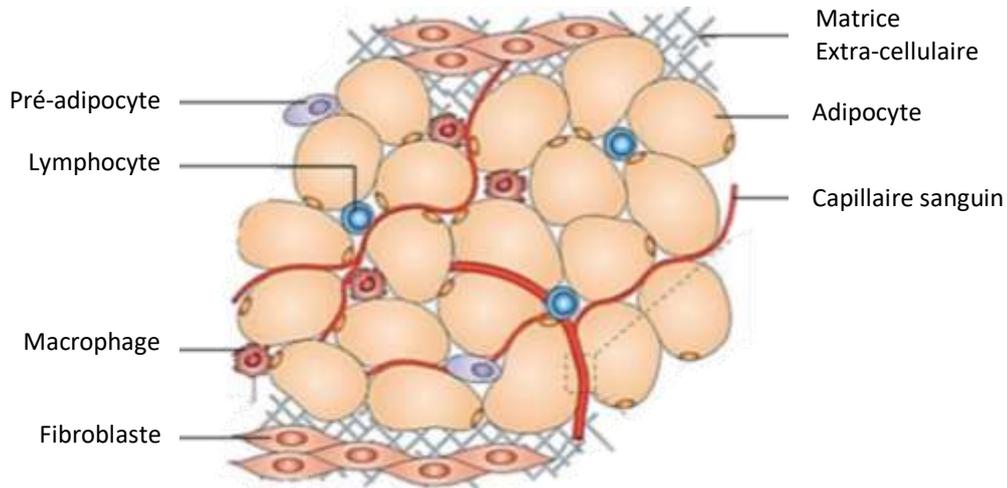
dans l'obésité ne devient significative qu'en présence de facteurs environnementaux (Hinney et al., 2010; Myers et al., 2010).

### *c. Environnement*

Enfin, le TA est aussi sensible aux facteurs environnementaux, que l'exposition soit ponctuelle ou répétée, qu'il s'agisse de facteurs traumatiques ou non, et leur impact sur le TA sera progressif et de nature variée. On peut observer par exemple une atrophie du TA suite à des injections répétées d'insuline, on parle de lipodystrophie insulinaire (Radermecker et al., 2007). Si ce type d'altération peut être prévenu par la multiplication des sites d'injections, d'autres lipodystrophies secondaires restent peu évitables. C'est le cas des lipodystrophies induites par les traitements médicamenteux. Du fait de sa composante fortement lipidique, le TA représente un lieu de stockage et d'accumulation privilégié pour de nombreux composés lipophiles. Les conséquences de cette accumulation sont une exposition à de nombreux xénobiotiques dont certains sont lipotoxiques. Parmi les classes thérapeutiques les plus pourvoyeuses d'altérations du TA, une littérature abondante est consacrée aux antirétroviraux (ARV) (Couturier et al., 2018; Koethe, 2017). Selon la molécule concernée, la lipotoxicité peut prendre des formes cliniques très variées allant de la lipoatrophie parfois associée à une redistribution tronculaire du TA, à la lipohypertrophie. Les deux phénomènes sont rassemblés sous le terme de lipodystrophies (Caron-Debarle et al., 2010). Les complications métaboliques associées à la lipodystrophie sont responsables d'une augmentation des risques cardiovasculaires notamment et pourraient également participer au vieillissement prématuré de l'organisme.

## **B. Composition du tissu adipeux**

Le TA est un tissu conjonctif vascularisé et structuré. Son organisation repose sur une membrane de tissu conjonctif, la MEC, et deux fractions cellulaires : la fraction adipocytaire et la FSV (**Figure 3**).



**Figure 3 : Composition du tissu adipeux sain**

Le tissu adipeux est composé de deux fractions : les adipocytes et la fraction stroma-vasculaire (FSV). La FSV regroupe une composante métabolique : cellules souches mésenchymateuses et de pré-adipocytes, et une composante immunitaire : macrophages et lymphocytes. L'architecture générale est organisée autour d'une matrice extra-cellulaire et une vascularisation. D'après Ouchi et al., 2011.

## **1. Architecture et vascularisation du tissu adipeux**

### *a. Matrice extracellulaire*

La MEC est un réseau tridimensionnel complexe constitué d'un ensemble de macromolécules qui incluent des protéines structurales (dont la principale composante est le collagène) et des protéines d'adhésion telles que la fibronectine, la laminine, les élastines et les protéoglycanes (Ricard-Blum & Ruggiero, 2005). Elle apporte un soutien architectural et une résistance mécanique au TA du fait d'un réseau structural auquel les cellules peuvent adhérer. Mais c'est aussi une structure dynamique, facilitant la communication entre les composants de la matrice et l'environnement intracellulaire, et qui s'adapte à la croissance des adipocytes et au stockage des TG. Enfin la MEC contribue également aux fonctions métaboliques du TA. Ainsi, toute altération de la MEC peut compromettre l'intégrité du TA, sa fonctionnalité et son homéostasie. Un phénomène de remodelage de la MEC peut être observé. Ce remodelage est un événement physiologique et indispensable au cours de l'adipogenèse (Lilla et al., 2002). Dans le contexte de l'obésité, la MEC du TA subit un remaniement massif aboutissant à une accumulation de collagène et une formation de fibrose. Les dépôts de fibrose sont plus abondants dans le TAV par comparaison au TASC (Divoux et al., 2010). Cette accumulation de fibrose pourrait nuire à

## **Introduction**

---

l'élasticité du TA, comprimer les adipocytes, et participe fortement à l'état inflammatoire chronique caractéristique du TA obèse ainsi qu'aux complications métaboliques associées (Sun et al., 2011).

### *b. Vascularisation*

Malgré une faible vascularisation apparente du TA, un important réseau vasculaire est identifié. Plusieurs études basées sur des méthodes d'immunohistochimie et de cytométrie en flux ont permis d'évaluer cette densité vasculaire et mettent en évidence une véritable relation entre angiogenèse et adipogenèse dans laquelle la vascularisation régule le développement et l'expansion du TA (Ledoux et al., 2008; X. Zhang et al., 2010). Les vaisseaux sanguins constituent une surface d'échange en oxygène et métabolites nutritifs (hormones, facteurs de croissance, cellules immunitaires notamment), participent à l'élimination des déchets produits par le TA, et concourent ainsi au maintien de l'homéostasie du TA (Rupnick et al., 2002). Ainsi, la microvascularisation du TA est nécessaire à l'expansion de la masse adipeuse de façon à prévenir l'hypoxie tissulaire délétère, mais également en tant que source potentielle de progéniteurs adipocytaires. Dans un TA sain, toute hypertrophie adipocytaire va conduire à un état d'hypoxie transitoire. Un des régulateurs majeurs de l'homéostasie oxygénique est le facteur HIF (Hypoxia inducible factor) (Brahimi-Horn et al., 2007). L'activation du facteur HIF va permettre l'expression de gènes tels que le VEGF (Vascular endothelial growth factor) et l'érythropoïétine, deux facteurs indispensables à l'activation de l'angiogenèse. Dans le contexte de l'obésité, il existe une inadéquation entre l'expansion rapide de la masse adipeuse et la réponse par une angiogenèse limitée. Il en résulte une hypoxie adipocytaire non transitoire, une altération du profil sécrétoire des adipocytes, un remodelage excessif et pro-fibrotique de la MEC ce qui participe à l'inflammation du TA (Wood et al., 2009).

## **2. Composition cellulaire**

Bien que les adipocytes matures occupent plus de 90 % du volume du TA, la composition cellulaire de ce tissu est variée puisque les adipocytes ne représentent qu'un tiers de son contenu cellulaire (M.-J. Lee et al., 2013). En effet, en plus des adipocytes, le TA comprend aussi la FSV caractérisée par une grande hétérogénéité cellulaire. On y retrouve : les cellules

endothéliales, les fibroblastes, les progéniteurs adipocytaires et les cellules immunitaires (Ouchi et al., 2011).

### *a. Fraction adipocytaire*

La fraction adipocytaire contient les adipocytes blancs matures, principales cellules qui composent le TA. D'un point de vue morphologique, les adipocytes sont des cellules sphériques dont la quasi-totalité du volume est occupée par une gouttelette lipidique leur permettant le stockage des TG. De ce fait, la quantité de cytoplasme est faible, le noyau cellulaire est décentralisé et refoulé contre la membrane plasmique, et les mitochondries sont rares et peu développées. La taille des adipocytes est très variable (de 20 à 200 $\mu$ M), dépend de la teneur en TG de la vacuole lipidique (Le Lay et al., 2015). Dans un modèle simien non obèse, les travaux de Damouche et al ont montré une densité adipocytaire plus élevée dans le TAV par rapport au TASC tandis que les travaux de Verboven et al chez l'Homme ne montrent aucune différence entre ces dépôts (Damouche et al., 2015; Verboven et al., 2018). Dans le contexte d'obésité, les travaux de Verboven et al mettent en évidence une taille d'adipocytes supérieure dans le TAV par comparaison au TASC. Cette hétérogénéité dans les observations montre que la densité adipocytaire varie selon le modèle étudié, le dépôt de TA considéré mais aussi la technique analytique utilisée.

### *b. Fraction stroma-vasculaire*

Constitué principalement d'adipocytes, le TA contient d'autres types cellulaires essentiels à son homéostasie et dont la présence illustre la complexité de ce tissu. La FSV est principalement composée de cellules souches mésenchymateuses (CSM) et de pré-adipocytes, de fibroblastes (essentiels au renouvellement de la MEC), de cellules endothéliales et péricytes (qui concourent à la vascularisation tissulaire), et de cellules immunitaires (qui participent au maintien de l'homéostasie du TA) (Le Lay et al., 2015; Ouchi et al., 2011). Nous décrivons ici essentiellement la composante métabolique avec les progéniteurs adipocytaires, et la composante immunitaire.

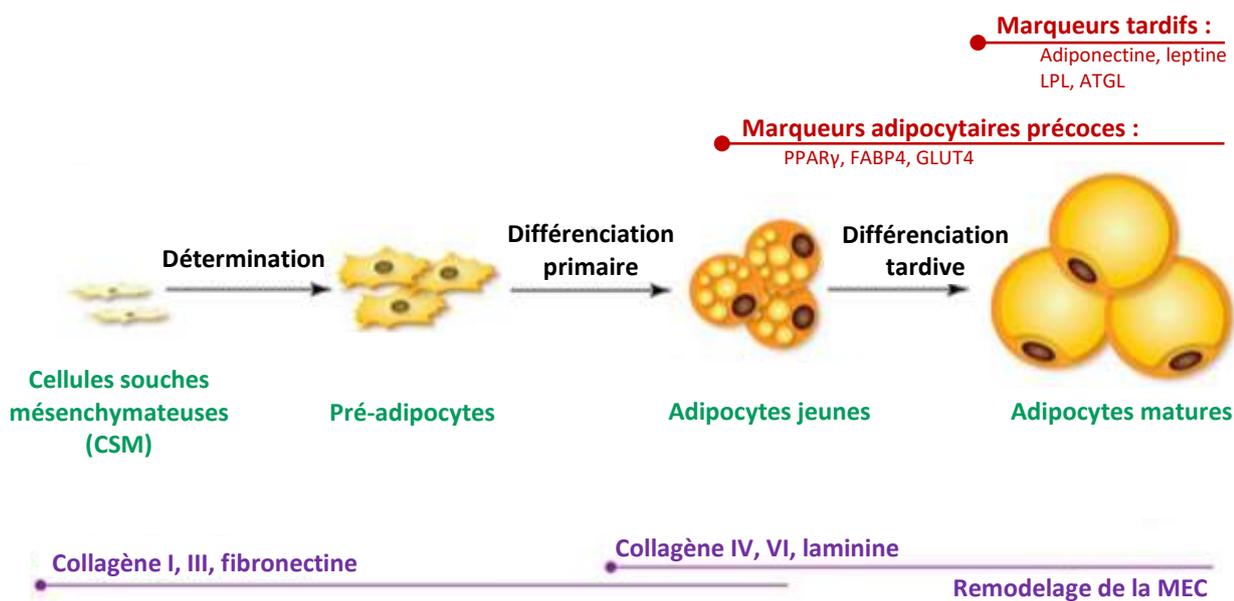
### Composante métabolique

Bien que le nombre d'adipocytes reste relativement constant à l'âge adulte, près de 10% des adipocytes sont renouvelés chaque année et cela quels que soient l'âge et l'IMC (Spalding et

## Introduction

al., 2008). Les études montrent que les adipocytes matures ne prolifèrent pas et ne se divisent pas. Les nouveaux adipocytes proviennent donc de la prolifération et/ou du recrutement de cellules progénitrices suivis de leur différenciation. L'adipogenèse est donc essentielle pour assurer le renouvellement et l'intégrité du TA.

La formation de nouveaux adipocytes matures est assurée à partir de précurseurs adipocytaires : les CSM (Zuk et al., 2002). L'adipogenèse est un processus séquentiel avec des événements précoces et tardifs (**Figure 4**). La première phase correspond à la prolifération des CSM et à leur engagement dans la voie de différenciation adipocytaire pour former les précurseurs adipocytaires ou pré-adipocytes (cellule à potentiel restreint, engagée vers la lignée adipocytaire). Au cours de cette étape, le phénotype cellulaire est peu modifié. La deuxième étape correspond à la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures (Lowe et al., 2011). Elle est caractérisée par un changement morphologique majeur, une acquisition des propriétés de synthèse des TG et de lipolyse et de l'expression d'un large panel de gènes spécifiques des adipocytes matures.



**Figure 4 : Régulation de l'adipogenèse**

La différenciation adipocytaire se divise schématiquement en deux phases. Au cours de la première phase, les cellules souches mésenchymateuses s'engagent dans la voie de différenciation adipocytaire pour former les pré-adipocytes : c'est la phase de détermination. La deuxième phase correspond à la phase de différenciation, qui correspond à la maturation des adipocytes et à l'acquisition de marqueurs adipocytaires (PPAR- $\gamma$  : proliférateurs de peroxyosomes- $\gamma$ , FABP4 : protéines de liaison aux acides gras 4, GLUT4 : transporteur du glucose 4, LPL : lipoprotéine

lipase, ATGL : adipose triglycérade lipase et la synthèse des hormones adiponectine et leptine). D'après Bourgeois et al., 2019 ; Ghaben et al., 2019.

Les CSM du TA sont des cellules immatures et multipotentes aussi appelées « adipose stem cells » (ASC). D'après la Société internationale de thérapie cellulaire, les CSM se définissent par trois critères : i) leur adhérence au plastique, ii) une expression positive de CD73, CD90, CD105 et négative de CD11b, CD14, CD45 et HLA-DR, iii) leur capacité à se différencier en 3 lignées cellulaires selon le microenvironnement : chondrocytaire, adipocytaire et ostéoblastique (Bourin et al., 2013). Les CSM possèdent des propriétés progénitrices, mais elles possèdent également des propriétés immunitaires remarquables, avec notamment des capacités immunosuppressives *in vitro* et *in vivo*. Elles inhibent la prolifération des lymphocytes et cellules dendritiques (DC), et inhibent également certaines fonctionnalités cellulaires telles que la sécrétion de cytokines, l'effet cytotoxique des lymphocytes T (LyT) et des cellules « *natural killer* » (NK), la maturation des lymphocytes B (LyB) et leur capacité de sécrétion d'anticorps (De Miguel et al., 2012). Les pré-adipocytes, précurseurs des adipocytes matures, sont quant à eux une population cellulaire déjà engagée dans le lignage adipocytaire. D'un point de vue phénotypique, aucun marqueur spécifique ne permet de distinguer à ce jour les pré-adipocytes des fibroblastes (Stephens, 2012). Cependant, une évolution morphologique et fonctionnelle est notée. Les précurseurs adipocytaires vont adopter de façon progressive une morphologie uniloculaire caractéristique de l'adipocyte mature, perdre leurs capacités prolifératives, et acquérir très tôt des molécules indispensables à la gestion des substrats adipocytaires (principalement acides gras (AG) et sucres) et dont la séquence d'acquisition rend aussi compte de la maturation adipocytaire : les transporteurs de substrats (notamment les transporteurs du glucose, GLUT, dont GLUT4), les acteurs du stockage, de la libération et la dégradation des TG (dont les protéines de liaison aux acides gras (FABP) ; l'adipose triglycérade lipase (ATGL) ; ou encore la lipoprotéine lipase (LPL). Les précurseurs adipocytaires vont acquérir la capacité de produire des adipocytokines dites adipokines (leptine, adiponectine) (Sarjeant & Stephens, 2012). L'acteur central de la différenciation adipocytaire repose sur les facteurs de transcription de la famille des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) qui jouent un rôle déterminant (Farmer, 2005; Lefterova et al., 2008). Enfin, plusieurs signaux extracellulaires sont nécessaires à l'expansion du TA en conditions

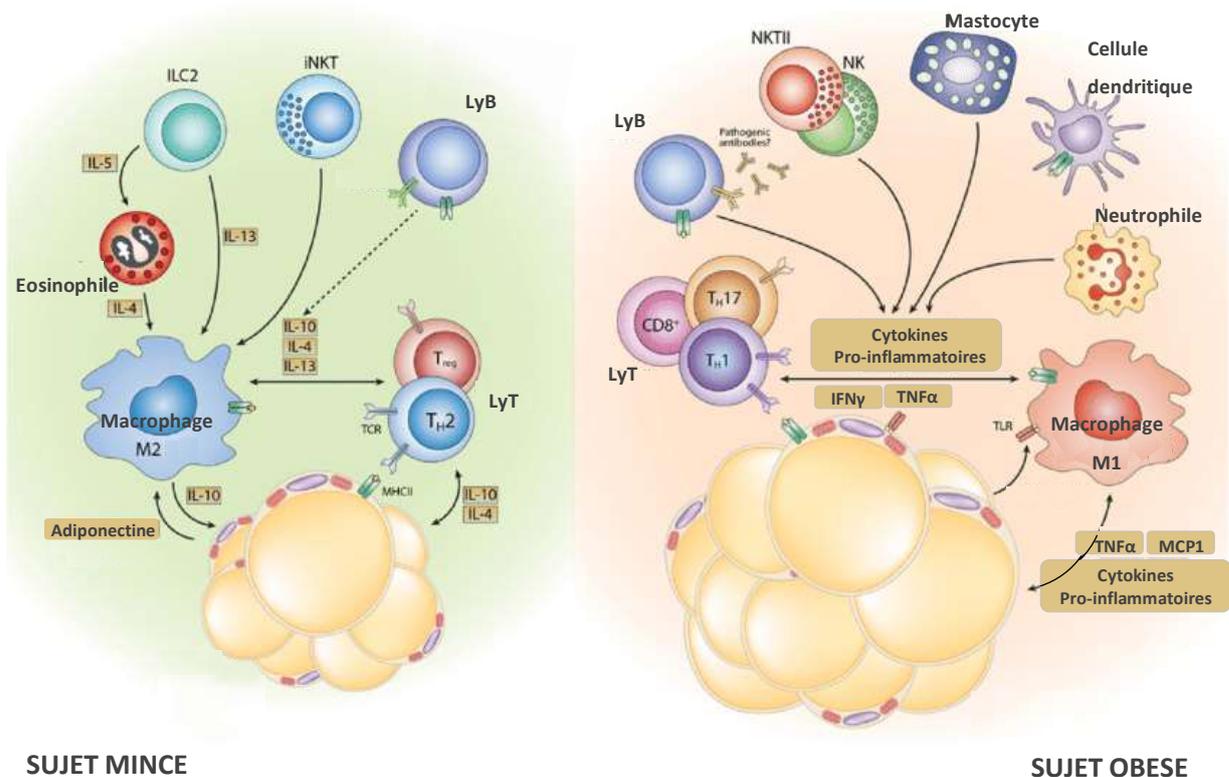
## ***Introduction***

---

physiologiques. Parmi ces facteurs, la signalisation pro-inflammatoire dans l'adipocyte a été montrée comme nécessaire au bon remodelage et à l'expansion du TA. Le concept d'une adipogenèse induite par l'inflammation est assez surprenant puisque l'inflammation est régulièrement présentée comme un processus délétère à l'organisme, une des conséquences néfastes de l'obésité. Toutefois, plusieurs études dans des modèles murins ont montré que l'inhibition d'une réponse inflammatoire aiguë dans le TA était à relier à une adipogenèse réduite, une expansion du TA limitée et un remodelage de la MEC altéré (Wernstedt Asterholm et al., 2014).

### *Composante immunitaire*

La FSV du TA comprend également un large spectre de cellules hématopoïétiques et notamment des cellules immunitaires. Les cellules immunitaires présentes dans le TA sont principalement les macrophages et les lymphocytes, mais on y retrouve aussi les cellules NK, les polynucléaires neutrophiles, les éosinophiles, les DC, les mastocytes, les cellules lymphoïdes innées (ILC) (**Figure 5**) (Brestoff & Artis, 2015; Chung et al., 2018). La plupart des cellules immunitaires peuvent être retrouvées dans le TA, mais la proportion de chacune de ces fractions est largement modulée par l'environnement métabolique et inflammatoire. Nous nous concentrerons ici sur les macrophages et les LyT du TA.



**Figure 5 : Cellules immunitaires et signalisation inflammatoire du tissu adipeux**

Le tissu adipeux mince se définit par une composante immunitaire hétérogène. Presque toutes les cellules immunitaires sont présentes dans le TA (macrophages de type M2, lymphocytes T et B, iNKT, ILC) permettent l'établissement d'un environnement immunosuppresseur et participent à l'homéostasie tissulaire. Au cours de l'obésité, le TA se caractérise par une infiltration de cellules immunitaires à potentiel pro-inflammatoire (macrophages de type M1, mastocytes, LyT CD8, polynucléaires neutrophiles) et une signalisation pro-inflammatoire. D'après Villarroya et al., 2018.

- Macrophages

Les macrophages sont les premières cellules immunitaires identifiées dans le TA. Ce sont les cellules de l'immunité les plus abondantes dans le TA puisqu'elles représentent entre 10% et 50% de la FSV du TA selon qu'il s'agisse d'un TA sain ou obèse (Weisberg et al., 2003).

Dans un contexte métaboliquement sain, le TA se trouve dans un environnement anti-inflammatoire qui se caractérise par la présence de macrophages résidents de type 2, dits M2 ou à profil anti-inflammatoire. Ces macrophages produisent en effet de grandes quantités de cytokines anti-inflammatoires (telles que l'interleukine (IL)-10 et l'IL-1), des quantités limitées de cytokines pro-inflammatoires, et ont une capacité de réparation et de remodelage des tissus endommagés (Gordon, 2007). Ils assurent ainsi l'intégrité tissulaire en phagocytant les débris

## Introduction

---

cellulaires, les adipocytes sénescents ou apoptotiques ou encore l'élimination de pathogènes et participent ainsi fortement à l'homéostasie du TA (Galli et al., 2011).

Mais les macrophages de type M2 sont également impliqués dans d'autres processus physiologiques. En effet, ils participent aux fonctions métaboliques et sécrétoires des adipocytes puisque l'activation des macrophages pro-inflammatoires est associée à une augmentation de l'absorption de glucose et une régulation à la hausse de la glycolyse. L'augmentation rapide de l'absorption du glucose dans les macrophages est facilitée par l'augmentation de l'expression de GLUT1, surexpression qui est parfois même associée à une sécrétion accrue de médiateurs inflammatoires et la production de ROS (Freemerman et al., 2014). Ils favorisent l'utilisation du glucose par les adipocytes, sont impliqués dans le maintien de la sensibilité à l'insuline. Ils captent les lipides des adipocytes en apoptose via le récepteur CD36 et concourent donc au stockage et au relargage lipidique des adipocytes (Aouadi et al., 2014; Flaherty et al., 2019; Kosteli et al., 2010). Par ailleurs, les macrophages de type M2 favorisent l'expansion physiologique du TA et sa vascularisation. Ils limitent la prolifération des adipocytes et participent au maintien d'une MEC adaptée tout en assurant une angiogenèse contrôlée (Bourlier et al., 2008; Y.-H. Lee et al., 2013).

Au cours de l'obésité, on assiste à une augmentation du nombre de macrophages au sein du TA. Cette accumulation de macrophages s'explique principalement par une infiltration monocyttaire depuis le compartiment sanguin mais peut aussi provenir d'une prolifération des macrophages *in situ* et d'une rétention des cellules résidentes (Weisberg et al., 2003). Cette accumulation s'accompagne d'un changement phénotypique. Les macrophages passent ainsi d'un état anti-inflammatoire, de type M2, à un état pro-inflammatoire de type M1 (Hinney et al., 2010). Les mécanismes impliqués dans l'accumulation macrophagique et leur activation sont multiples. Au cours de l'obésité, le recrutement des macrophages dans le TA est favorisé par la production de nombreuses chimiokines telles que le *monocyte chemo-attractant protein-1*, MCP-1, par les adipocytes hypertrophiques et les macrophages eux-mêmes (Kanda et al., 2006). D'autre part, la nécrose adipocytaire induite contribue à cette accumulation en favorisant la formation d'amas de macrophages autour des adipocytes nécrotiques, amas dits « structures en couronne » ou « crown-like structures », CLS (Cinti et al., 2005). Si les macrophages participent à l'homéostasie du TA, ils sont également les principaux contributeurs de l'inflammation métabolique au cours de l'obésité.

- Lymphocytes

La lignée lymphoïde représente jusqu'à 10 % des cellules non adipocytaires du TA humain sain. C'est une population hétérogène dans laquelle on distingue principalement deux lignées, les LyT et les LyB, mais comprend également les cellules NK, les cellules NKT, les ILC2 ou encore les lymphocytes MAIT, lymphocytes de l'immunité innée impliqués dans l'inflammation métabolique et qui participent également aux défenses immunitaires (Acosta et al., 2016; Toubal et al., 2020). Nous ne décrivons ici que les LyT.

### *Lymphocytes T CD4*

Les LyT CD4, T helper, jouent un rôle auxiliaire important dans l'établissement et le maintien de la réponse immunitaire adaptative. Les LyT CD4 reconnaissent l'antigène (Ag) par le récepteur des cellules T (TCR) lorsqu'il est présenté par une cellule présentatrice d'antigène (CPAg) par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Cette reconnaissance de l'Ag va activer les LyT CD4 qui vont alors entrer en prolifération. La voie de différenciation des LyT CD4 est ensuite modulée par la présence de cytokines et l'expression de facteurs de transcription. En fonction des paramètres associés, l'engagement des LyT CD4 naïfs est orienté vers une des sous-classes de LyT comme suit : les LyT de type Th1 par l'interféron (IFN)- $\gamma$  et l'IL-12 ; les cellules Th2 par IL-4 ; les cellules Th17 par l'IL-6 et le *Transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  (Cousens et al., 1999; Kimura & Kishimoto, 2010; Noben-Trauth et al., 1997). Les cellules Th1 et Th17 sont considérées comme pro-inflammatoires, les Th2 comme anti-inflammatoires. Dans le TA sain, la majorité des LyT CD4 ont un phénotype de type Th2 et présentent un profil cytokinique anti-inflammatoire ce qui participe à orienter le phénotype des macrophages vers le profil M2. Les LyT CD4 participent ainsi à créer un microenvironnement favorable à leur polarisation Th2 (Zatterale et al., 2020). Cependant au cours de l'obésité, il a été montré dans le modèle murin que la proportion des LyT CD4 Th2 laissait place au profil Th1 et que cette accumulation était corrélée à l'hypertrophie adipocytaire et la résistance à l'insuline (Rocha et al., 2008; Strissel et al., 2010). Les LyT CD4 du TA participent donc à l'homéostasie du TA en contribuant au microenvironnement immunosuppresseur. Ils ont aussi la faculté de s'adapter à un environnement pro-inflammatoire et de le maintenir par la sécrétion de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  ce qui a pour conséquences d'attirer d'autres cellules immunitaires comme les macrophages de type M1 et d'amplifier la réponse inflammatoire.

## **Introduction**

---

### *Lymphocytes T régulateurs*

Les LyT régulateurs ou Treg sont une sous-population des LyT CD4 impliqués dans l'homéostasie lymphoïde, la tolérance du soi et le contrôle des maladies auto-immunes. Chez l'Homme, ils se caractérisent par l'expression, du facteur de transcription FoxP3 (Forkhead Box P3), du marqueur CD25 et la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires et immunorégulatrices telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (Fontenot et al., 2003). Les Treg du TA se distinguent de ceux des autres tissus par une signature génique propre : ils expriment le facteur de transcription adipogénique PPAR- $\gamma$  et de nombreux gènes impliqués dans le contrôle du métabolisme lipidique, présentent un profil de migration particulier qui pourrait contribuer à l'accumulation dans le TA (surexpression de CXCR6 et une sous-expression de CXCR3 notamment) (Cipolletta et al., 2012; Feuerer et al., 2009). Dans un modèle murin non obèse (modèle C57Bl/6, mâle adulte (20 semaines), il a été montré que les Treg représentent près de 50 % du compartiment des LyT CD4 du TAV, suggérant un rôle spécifique de cette population dans l'homéostasie du TA. Les Treg participent à l'homéostasie du TA sain via la sécrétion d'IL-10 en maintenant un environnement immunosuppresseur et favorisant la sensibilité à l'insuline (Cipolletta et al., 2012; Feuerer et al., 2009). Au cours de l'obésité, le pourcentage de Treg diminue de façon particulièrement marquée dans le TAV et cette déplétion pourrait participer à l'inflammation du TA. Cependant, des données différentes sont obtenues dans d'autres modèles murins et chez l'Homme : la proportion de Treg n'est pas majoritaire dans le TA chez le sujet métaboliquement sain (Laparra et al., 2019). Enfin, certains travaux décrivent une proportion supérieure de Treg dans le TA de sujets obèses par comparaison aux sujet non obèses (Zeyda et al., 2011). La proportion et le rôle des Treg du TA reste donc encore à mieux caractériser.

### *Lymphocytes T CD8*

Les LyT CD8 dits LyT cytotoxiques jouent un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire contre les infections intracellulaires virales, bactériennes et parasitaires (N. Zhang & Bevan, 2011). La réponse immunitaire du LyT CD8 implique plusieurs signaux nécessaires à l'activation, la différenciation et la survie des LyT CD8. Parmi ces signaux, on retrouve la présentation de l'Ag via le CMH de classe I et la reconnaissance de l'Ag par le TCR  $\alpha\beta$ , et la liaison à des molécules de costimulation telles que CD28. Enfin, le dernier signal provient de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, l'IL-18, les IFN de type I (IFN- $\alpha$  et  $\beta$ ) et de type II (IFN- $\gamma$ )

produites respectivement par les macrophages et DC, les NK et les LyT activés et les macrophages (Kolumam et al., 2005; Sigal, 2016). L'arsenal cytotoxique des LyT CD8 repose à la fois sur la libération de granules contenant des protéines cytolytiques, telles que granzymes et perforines, inducteurs de cytotoxicité cellulaire, mais aussi par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$  et le facteur de nécrose tumorale, TNF- $\alpha$  qui vont amplifier la réponse immunitaire (Harari et al., 2009). Enfin, suite à l'activation immunitaire, une fraction de LyT CD8 se différencie en cellules mémoires, dont les caractéristiques seront abordées plus tard (Appay et al., 2002).

Au sein du TA, les LyT CD8 ont été isolés et décrits dans des modèles d'obésité principalement. Dans le TA de souris et sujets obèses, de manière comparable aux macrophages M1 et LyT CD4 Th1, une infiltration massive de LyT CD8 cytotoxiques a été mise en évidence (Rausch et al., 2008). Les LyT CD8 sont présents comme les macrophages M1 au niveau des CLS ce qui participe à la polarisation de ces macrophages vers un profil pro-inflammatoire et donc au maintien d'une inflammation locale (Nishimura et al., 2009). Dans les contextes d'obésité, plusieurs études indiquent que les LyT CD8 infiltrent le TA et que leur infiltration pourrait même précéder celle des macrophages (Kintscher et al., 2008; Nishimura et al., 2009). Finalement, les LyT CD8 apparaissent comme indispensables à l'initiation et le maintien de la réponse inflammatoire *in situ* mais restent essentiellement décrits dans le contexte de l'obésité.

## C. Fonctions du tissu adipeux

### 1. Fonctions métaboliques

Au-delà de la protection mécanique et de son rôle d'isolant thermique, le TA est un acteur majeur du métabolisme. Du fait de la présence d'adipocytes, le TA est le seul tissu apte à stocker les TG et capable de tolérer un environnement lipidique, lipotoxique, sans compromettre son intégrité. Le TA est de ce fait un organe déterminant dans la mobilisation des lipides de l'organisme dont la régulation dépend des apports nutritionnels mais également de nombreux autres signaux (hormonaux notamment). La gestion de l'énergie stockée sous forme de lipides par les adipocytes implique deux voies métaboliques principales : la lipogénèse et la lipolyse.

### a. Lipogenèse et réserve énergétique

Le stockage des lipides dans les adipocytes se fait sous forme de TG. La source principale de lipides provient de l'alimentation mais ils peuvent aussi être le produit d'une synthèse *de novo* à partir des glucides en excès même si la contribution de cette dernière dans l'homéostasie des TG reste mineure (Schwarz et al., 2003).

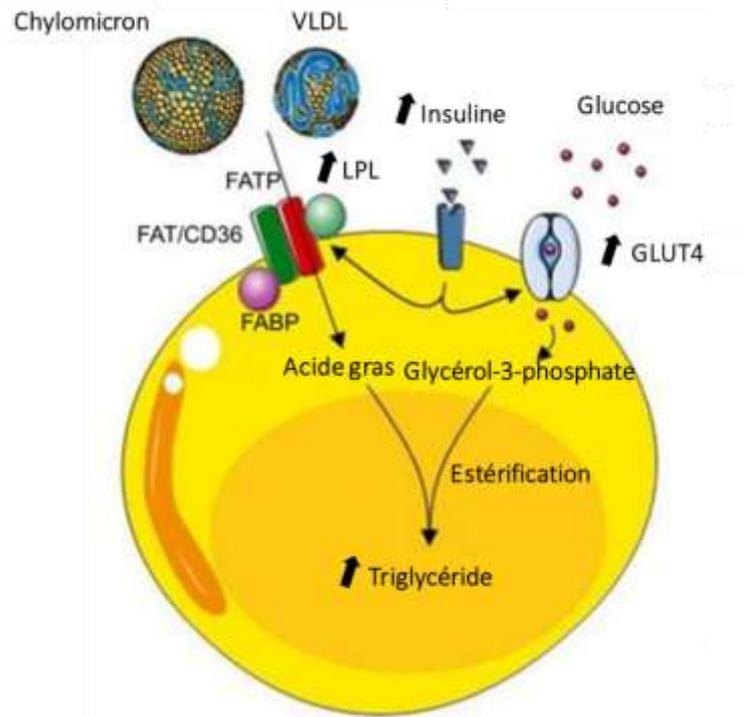
- Apport des acides gras de l'alimentation

Les acides gras (AG) sont soit issus de l'activité de lipolyse sous forme d'AG non estérifiés (AGNE) soit fournis par l'apport nutritionnel récent (chylomicrons et TG incorporés dans les lipoprotéines principalement de très basse densité). Les AG qu'ils contiennent sont libérés de leurs vésicules de transports grâce à l'intervention de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme ancrée sur les cellules endothéliales des capillaires sanguins du TA (Mead et al., 2002). Le mécanisme de transport des AG au travers de la membrane adipocytaire implique plusieurs phénomènes. Du fait de leur nature lipophile, un phénomène de transfert passif dit « flip-flop » peut avoir lieu, mais ce système de diffusion semble peu représentatif des échanges (Hamilton & Kamp, 1999). Le système de diffusion fait majoritairement intervenir des transporteurs spécifiques présents au niveau de la membrane adipocytaire et parmi lesquels on retrouve : les récepteurs membranaires FAT/ CD36 (*Fatty acid translocase/CD36*), les protéines de transports FATP (*Fatty acid transport proteins*) et une protéine membranaire liant les AG, FABPpm (*Plasma membrane-bound fatty acid binding proteins*). Une fois dans le cytoplasme, les AG sont pris en charge par le FABP et orientés dans les différentes voies métaboliques d'oxydation ou d'estérification (Thompson et al., 2010).

- Lipogenèse

Chez l'Homme, la lipogenèse adipocytaire ne participe que de façon accessoire à la synthèse des TG de l'organisme, la principale étant localisée au niveau hépatique (Diraison et al., 2002). Comme illustrée dans la **Figure 6**, la synthèse des TG se fait à partir de 2 principaux substrats: le glycérol et les AG, respectivement activés en glycérol 3-phosphate (G3P) et en acyl-CoA. Le G3P est généralement produit lors de la glycolyse (à partir du glucose) et/ou lors de la glycéronéogenèse (à partir de substrats comme le pyruvate, le lactate). La contribution de la glycolyse ou de la glycéronéogenèse dans cette synthèse de G3P varie selon les apports nutritionnels. Ainsi, en condition post-prandiale, la source majeure de G3P est la glycolyse. En

condition de jeûne, le G3P est principalement obtenu via la glycérologénèse (Reshef et al., 2003). L'estérification de chacune des fonctions alcool du G3P par les acyl-CoA va aboutir à la synthèse de TG afin de pouvoir répondre aux besoins énergétiques de l'organisme.



**Figure 6 : Voies de biosynthèse des acides gras et triglycérides dans l'adipocyte**

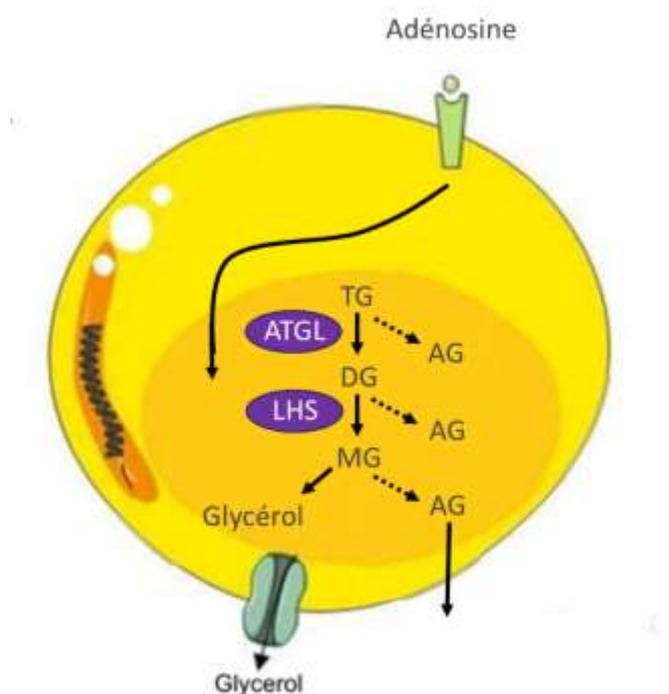
En période post-prandiale, la lipogenèse est activée dans les adipocytes. Les triglycérides et les chylomicrons sont pris en charge et dégradés par la lipoprotéine lipase pour l'entrée dans les adipocytes. Au sein de l'adipocyte, ces molécules sont estérifiées avec du glycérol-3 phosphate afin de produire des triglycérides. D'après Badimon et al., 2015.

- Régulation de la synthèse des triglycérides

Les voies de synthèse des TG sont régulées en partie par l'état nutritionnel mais elles dépendent également de facteurs hormonaux. L'insuline et le glucose régulent la synthèse des TG de façon positive. L'insuline augmente l'expression de GLUT4 sur la membrane plasmique des adipocytes ce qui favorise la lipogenèse en augmentant la disponibilité en glucose et donc en G3P (Kersten, 2001). Elle stimule également l'expression des transporteurs d'AG de type FATP, sur la membrane plasmique ce qui participe à augmenter la quantité d'AG disponibles pour la synthèse de TG (Bose et al., 2002).

### b. Lipolyse et mobilisation des triglycérides

En situation de besoins énergétiques, lors d'une période de jeûne par exemple, et lorsque les réserves en glycogène sont épuisées, la dégradation des TG stockés dans les adipocytes en AG libres se met en place. C'est le processus d'hydrolyse des lipides ou lipolyse (**Figure 7**) (Vernon, 1992). Seuls les adipocytes possèdent la propriété de libérer des AG libres dans la circulation. L'hydrolyse des TG requiert l'action de trois lipases : l'adipose triglycéride lipase (ATGL), la lipase hormono-sensible (LHS) et la monoglycéride lipase. Celles-ci sont respectivement responsables de la conversion des TG en diglycérides (DG) et de l'hydrolyse des DG en monoglycérides (MG) (Lafontan & Langin, 2009). Enfin, les MG sont hydrolysés en acides gras libres par l'action de la monoglycéride lipase. La lipolyse aboutit à la libération d'AG libres et de glycérol dans le sang. Ils constituent les substrats énergétiques utilisés par les cellules des tissus périphériques (via la  $\beta$ -oxydation et la production d'ATP).



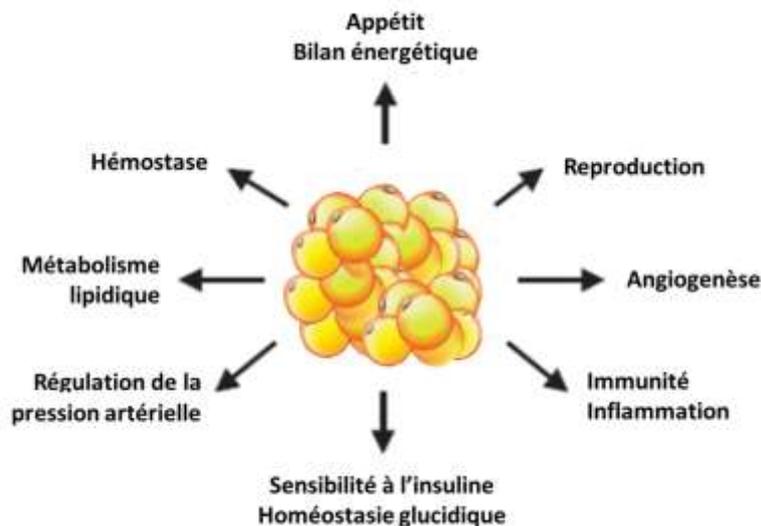
**Figure 7 : Voies de la lipolyse adipocytaire**

Au cours d'une période de jeûne, les triglycérides (TG) stockés sont mobilisés pour produire des acides gras (AG) libres et du glycérol pour répondre aux besoins énergétiques de l'organisme. Les TG sont progressivement et respectivement dégradés en diglycérides puis en monoglycérides par l'adipose triglycéride lipase et la lipase hormono-sensible. Les AG produits sont sécrétés sous forme d'AG libres dans la circulation, où ils seront transportés vers les organes cibles pour produire de l'énergie. Adapté de Badimon et al., 2015 ; Grant et al., 2015.

Tout comme cela a été décrit pour la lipogenèse, la lipolyse est également régulée par les facteurs nutritionnel et endocrine ou encore par le système nerveux (Jaworski et al., 2007). Les catécholamines sont de puissants régulateurs de la lipolyse dans les adipocytes humains par l'intermédiaire des récepteurs  $\beta 1$  et  $\beta 2$  adrénergiques, l'insuline intervient en tant que principal régulateur négatif de la lipolyse (Lafontan et al., 1997). La sécrétion post-prandiale d'insuline, hormone anti-lipolytique, favorise le stockage des AGNE dans les adipocytes. Inversement, une insulïnémie faible induit une lipolyse accrue. Une disparité dans l'activité lipolytique selon le dépôt de TA considéré est toutefois observée. Le TAV se caractérise par une activité lipolytique supérieure à celle du TASC. Le TAV, comparé au TASC, est plus sensible à la lipolyse induite par les catécholamines du fait d'un nombre plus élevé de récepteurs  $\beta 1$  et  $\beta 2$  adrénergiques et par une sensibilité diminuée aux effets anti-lipolytiques de l'insuline (Wajchenberg, 2000).

### **2. Implications physiologiques multiples**

La plupart des sécrétions endocrines du TA est assurée par la FSV, fraction non-adipocytaire plus particulièrement les cellules immunitaires, seul un tiers des sécrétions est assuré par les adipocytes (Fain et al., 2004). Du fait d'un profil sécrétoire étendu, et de leurs rôles physiologiques extrêmement variés, ces sécrétions confèrent au TA son activité pléiotrope. Le TA se place ainsi à l'interface de nombreux métabolismes parmi lesquels on retrouve : 1/ le métabolisme glucidique, lipidique et la régulation de la balance énergétique, 2/ le processus inflammatoire, 3/ la régulation de la pression artérielle, 4/ l'hémostase (**Figure 8**) (Lago et al., 2009; Trayhurn & Wood, 2004).



**Figure 8 : Implications physiologiques du tissu adipeux**

Le tissu adipeux est impliqué dans de nombreux processus physiopathologiques donc le principal est la régulation et l'homéostasie lipidique et glucidique. Il est également impliqué dans l'angiogenèse, l'hémostasie, la régulation de la pression artérielle, la reproduction ou encore l'immunité et l'inflammation. Adapté de Trayhurn and Wood et al., 2004.

*a. Tissu adipeux, organe sécrétoire et endocrine : les adipokines*

Longtemps considérés comme de simples cellules de stockage lipidique, les adipocytes sont également doués de fonctions endocrines. Ces nouvelles attributions sont dues aux découvertes successives de l'adipsine, par les travaux de Cook et al, suivie de celle de la leptine par les travaux de Zhang et al en 1994 (Cook et al., 1987; Y. Zhang et al., 1994). Depuis, la caractérisation de l'activité sécrétoire du TA s'est élargie, avec l'identification de plus d'une cinquantaine de peptides bioactifs regroupés sous le terme d'adipokines ou adipocytokines définissant leur origine adipocytaire (Lehr et al., 2012). Le terme d'adipokines est parfois utilisé au sens plus large, c'est-à-dire les peptides bioactifs produits par le TA, incluant adipocytes, cellules immunitaires et autres fractions cellulaires du TA. Les adipokines sont des molécules de nature protéique, hormones peptidiques et lipidiques qui agissent soit localement (de façon autocrine et/ou paracrine), soit systémique (de façon endocrine). L'adiponectine et la leptine sont les adipocytokines les plus abondamment et les plus spécifiquement produites par les adipocytes. Elles se caractérisent également par une double activité métabolique et immunitaire.

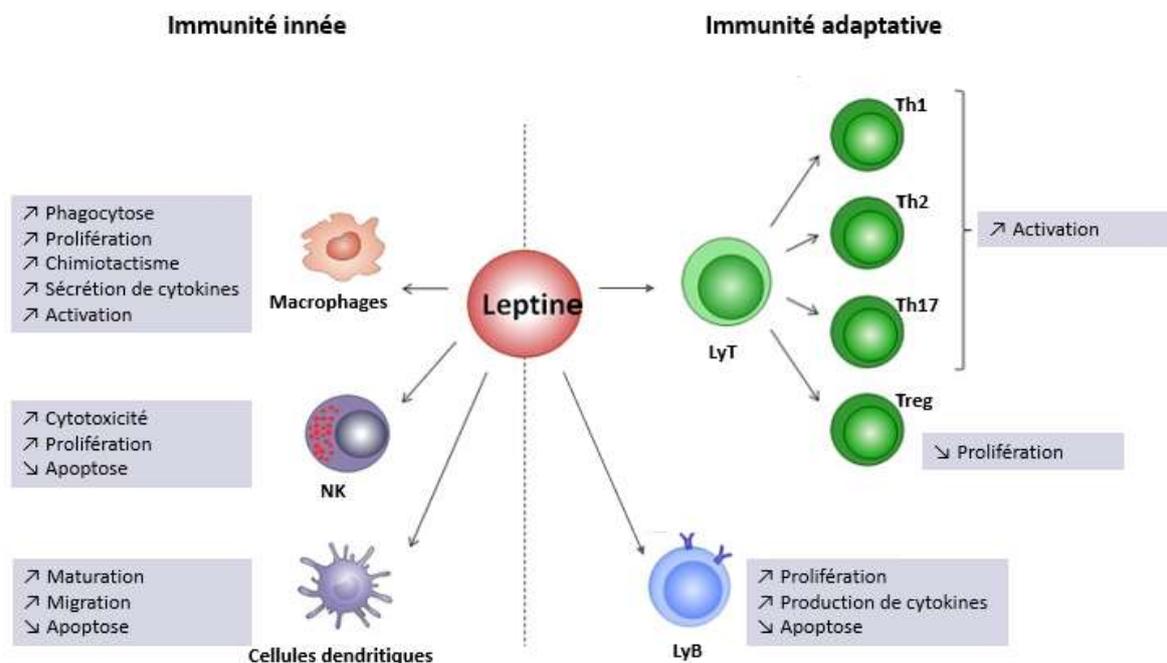
- Leptine

Les travaux de Zhang et al ont permis de mettre en évidence l'existence d'une protéine circulante produite par le TA et qui aurait la propriété de réguler la prise alimentaire. Il s'agit de la leptine, du grec « leptos », mince et dont la production est presque exclusivement assurée par les adipocytes (placenta, tissus fœtaux et estomac en sont capables mais à moindre mesure) et la concentration plasmatique est proportionnelle à l'adiposité de l'individu (Wajchenberg, 2000). La leptine est l'hormone dite de satiété dont la fonction principale est de réguler la prise alimentaire. Cette régulation de la faim passe par un rétrocontrôle au niveau de l'hypothalamus où la leptine se fixe sur ses récepteurs, principalement présents sur les neurones anorexigènes. La leptine active ainsi la voie anorexigène et inhibe la voie orexigène qui stimule l'appétit (Cowley et al., 2001). Mais la leptine concourt aussi à augmenter la dépense énergétique puisqu'elle stimulerait la lipolyse en activant les neurones sympathiques. Elle est également impliquée dans le maintien de l'homéostasie du glucose car elle altère la signalisation de l'insuline dans les adipocytes murins (Müller et al., 1997).

Enfin, en plus de son rôle métabolique, la leptine présente également d'autres fonctions essentielles comme une intervention dans la réponse inflammatoire où elle favorise la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  et dans la réponse immunitaire où elle contrôle la fonction des cellules immunitaires, stimule la croissance des cellules endothéliales, induit l'angiogenèse et accélère la réparation tissulaire (Margetic et al., 2002). En effet, l'implication de la leptine dans l'homéostasie du système immunitaire en tant que modulateur immunitaire est désormais évidente (**Figure 9**) (Francisco et al., 2018). Cette implication a été démontrée chez des patients présentant une signalisation de la leptine déficiente. Ces patients développent non seulement une obésité mais présentent également un risque accru d'infections intracellulaires secondaires (Ozata et al., 1999). La leptine régule les réponses innées et adaptatives par modulation de la survie, la prolifération et les fonctions des cellules immunitaires. Dans l'immunité innée, la leptine favorise l'activation des macrophages, leur polarisation M1, leur chimiotactisme et leur capacités de phagocytose ; renforce la cytotoxicité des NK et la maturation des DC (Acedo et al., 2013). Dans l'immunité adaptative, la leptine joue un rôle important dans le développement des LyT. Une carence en leptine entraîne une atrophie thymique et une diminution des nombres de cellules T circulantes (Procaccini et al., 2012; Saucillo et al., 2014). La leptine favorise le développement des LyT naïfs,

## Introduction

la polarisation Th1, diminue la prolifération Treg et renforce la capacité de production de cytokines des LyB.



**Figure 9 : Rôle physiologique de la leptine dans l'immunité innée et adaptative.**

La leptine intervient dans la régulation des réponses innées et adaptatives. Dans l'immunité innée, la leptine favorise l'activation des macrophages et leur polarisation en phénotype de type M1, augmente la cytotoxicité des lymphocytes NK et favorise la maturation des cellules dendritiques. Dans l'immunité adaptative, la leptine favorise l'activation des lymphocytes T, diminue la prolifération des Treg, augmente l'activation des lymphocytes B. D'après Francisco et al, 2018.

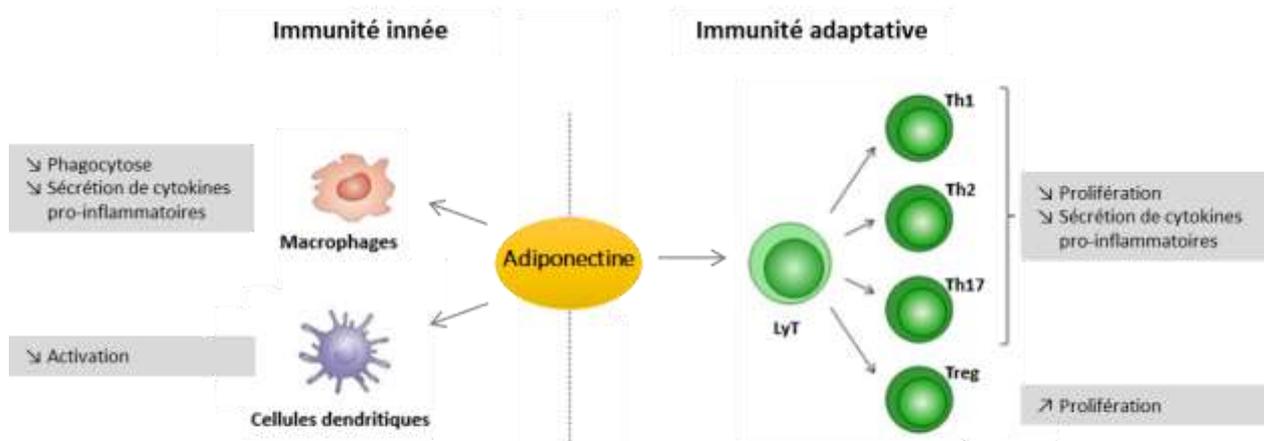
L'expression et la sécrétion de la leptine sont modulées par divers facteurs. Un premier niveau de régulation est le type de dépôt adipeux. En effet, il a été démontré que les taux de leptine sécrétés sont plus importants dans le TASC que dans le TAV (Van Harmelen et al., 1998). Les facteurs tels que l'insuline, les glucocorticoïdes ou le TNF- $\alpha$  stimulent la sécrétion de leptine, en revanche, la présence d'AG non-estérifiés inhibe sa sécrétion (Margetic et al., 2002). Indépendamment de l'IMC, le taux de leptine circulante est 2 à 3 fois supérieur chez les femmes par comparaison à celui des hommes. Au cours de l'obésité, l'expression du gène codant pour la leptine et la leptinémie sont plus élevées que celles des sujets non obèses, et corrélées à l'IMC. Cette hyperleptinémie joue un rôle dans l'état inflammatoire du TA en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-6) par les macrophages. La mise en

place d'une résistance neuronale à la leptine à la suite d'une production au niveau excessive et chronique de l'hormone est également suggérée.

- Adiponectine

L'adiponectine, aussi connue sous le nom d'Acrp30, possède une large gamme d'activités biologiques puisqu'elle intervient dans l'homéostasie lipidique, glucidique et les fonctions cardiovasculaires grâce à ses effets anti-diabétiques, anti-athérogènes et anti-inflammatoires. Elle est presque exclusivement synthétisée par les adipocytes mais peut également être sécrétée par les cardiomyocytes et les muscles squelettiques (Scherer et al., 1995). L'activité de l'adiponectine passe par des récepteurs spécifiques : AdipoR1, AdipoR2 et T-cadhérine. Elle protège les cellules endothéliales du stress oxydant (Joshi et al., 2005). Les principales cibles de l'adiponectine sont le foie (via le récepteur AdipoR2) et le muscle squelettique (via le récepteur AdipoR1), deux tissus insulino-sensibles (Yamauchi et al., 2003). L'activation des récepteurs à l'adiponectine va favoriser la captation glucidique, améliorer le transport des AG et diminuer la lipogenèse hépatique.

Mais l'adiponectine est également associée à une activité anti-inflammatoire et anti-oxydante (Maury & Brichard, 2010). Elle induit la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, inhibe le recrutement des monocytes via la sécrétion d'IL-1RA, antagoniste des récepteurs de l'IL-1, et inhibe la production d'IFN- $\gamma$  par des macrophages (**Figure 10**) (Carbone et al., 2012). Finalement, l'adiponectine présente des propriétés insulino-sensibilisatrices et cardio-protectrices (Wolf et al., 2004). Les taux d'adiponectine plasmatiques sont très élevés chez un individu normopondéral, représentant 0,05% des protéines plasmatiques totales (Scherer et al., 1995). Contrairement à la plupart des autres adipokines, elle voit sa concentration plasmatique diminuer chez les sujets obèses et/ou diabétiques (Arita, 2012). L'obésité, associée à l'insulino-résistance, est associée non seulement à une diminution des taux plasmatiques d'adiponectine mais aussi à une réduction de l'expression des deux récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 dans le muscle et le TA. La résistance à l'insuline est ainsi aggravée par l'hyper-insulinémie induite créant ainsi un cercle vicieux.



**Figure 10 : Rôle physiologique de l'adiponectine dans l'immunité innée et adaptative.**

L'adiponectine est impliquée dans les réponses innées et adaptatives. Dans l'immunité innée, elle favorise la polarisation des macrophages en phénotype de type M2 et diminue leur cytotoxicité, et diminue l'activation des cellules dendritiques. Dans l'immunité adaptative, à l'inverse de la leptine, l'adiponectine diminue l'activation des lymphocytes T et favorise la prolifération des Treg. Adapté de Carbone et al, 2012.

### *b. Tissu adipeux et inflammation : cytokines, interleukines et chimiokines*

Le TA est également un site de production de cytokines, produites par les cellules immunitaires mais également les adipocytes. L'étendue des cytokines produites est vaste, incluant des cytokines anti- et pro-inflammatoires. Le profil de sécrétion des cytokines du TA est ainsi étroitement lié à sa composition cellulaire et au contexte métabolique. Dans le contexte de l'obésité par exemple, les adipocytes isolés peuvent aussi exprimer des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 ou encore MCP-1. Mais c'est bien de la FSV que la majorité de la production de cytokines pro-inflammatoires est issue. Les cytokines les plus classiquement utilisées dans la caractérisation du TA seront présentées ici :

- TNF- $\alpha$

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire produite essentiellement par les adipocytes, les macrophages activés et les LyT de la FSV. Il orchestre la réponse inflammatoire en permettant le recrutement, l'activation des cellules inflammatoires et l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6. Dans des modèles murins d'obésité, et particulièrement des modèles d'obésité associée à une insulino-résistance, le TNF- $\alpha$  est fortement surexprimé à la

fois dans le compartiment sanguin et dans le TA. Sur le plan métabolique, l'augmentation des taux de TNF- $\alpha$  favorise également le développement de l'insulino-résistance dans le TA car il diminue la capture périphérique du glucose (via la translocation de GLUT4) (Sethi & Hotamisligil, 1999). C'est ainsi qu'il est devenu la première adipokine suspectée de faire le lien entre obésité, inflammation et diabète. Les taux de TNF- $\alpha$  sont directement corrélés à l'IMC et indirectement associés à la perte de poids ou l'amélioration de la résistance à l'insuline. Enfin, il possède un effet lipolytique favorisant l'activation de la LHS (Kern et al., 1995).

- IL-6

L'IL-6 est une cytokine pléiotrope pro-inflammatoire circulante. Elle est produite par de nombreuses cellules et notamment les macrophages, les cellules endothéliales, les fibroblastes mais également les adipocytes. Au sein du TA, la sécrétion d'IL-6 est assurée par les macrophages et les adipocytes qui, en l'absence d'inflammation, peuvent contribuer jusqu'à près d'un tiers des concentrations d'IL-6 circulante. Un effet localisation est aussi décrit avec une production viscérale trois fois plus importante que la production sous-cutanée (Fain et al., 2004; Fried et al., 1998). Sur le plan métabolique, l'IL-6 entraîne l'augmentation de la dépense énergétique dans le TA et la diminution des dépôts adipeux en favorisant la lipolyse. Elle induit également une augmentation de la production de la leptine (M. S. Han et al., 2020). Au niveau systémique, l'IL-6 module la prise de poids et pourrait être impliquée dans l'insulinorésistance en diminuant notamment la capture du glucose par une réduction du nombre de récepteurs GLUT4 (Lagathu et al., 2003). L'IL-6 contribue ainsi à la balance entre médiateurs pro- et anti-inflammatoires sécrétés par le TA.

- MCP-1

MCP-1 est une chimiokine, cytokine chimio-attractante, qui permet le recrutement des précurseurs macrophagiques et monocytaires. A ce jour, MCP-1 et son récepteur CCR2 représentent la principale voie de recrutement des macrophages dans le TA. MCP-1 est produite par les macrophages activés, mais aussi par les pré-adipocytes. L'expression basale de MCP-1 est très faible mais elle peut être induite par différentes cytokines telles que l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ . De ce fait, son expression est augmentée dans de nombreux processus inflammatoires associés à une infiltration de cellules mononucléées comme l'obésité. Les taux plasmatiques de MCP-1 corrént avec l'adiposité (Kanda et al., 2006). La surexpression de

## **Introduction**

---

MCP-1 contribue à la résistance à l'insuline dans le TA en diminuant la voie de la signalisation à l'insuline. Mais elle inhibe également la croissance et la différenciation adipocytaire en diminuant l'expression d'un certain nombre de gènes adipogéniques dont PPAR- $\gamma$  (Sartipy & Loskutoff, 2003). MCP-1 permet le recrutement précoce des macrophages. Une boucle d'amplification se met en place puisque les macrophages recrutés vont à leur tour produire et sécréter la chimiokine. Mais MCP-1 n'est pas la seule chimiokine impliquée dans le processus inflammatoire du TA. En plus de l'axe MCP-1/CCL2, de nombreuses autres chimiokines sont augmentées dans le TA au cours de l'obésité, telles que CCL5 ou encore CX3CL1, qui jouent un rôle important dans le recrutement de cellules immunitaires et dans la résistance à l'insuline (Keophiphath et al., 2010; Nagashimada et al., 2021).

### *c. Tissu adipeux et hémostasie*

En plus des perturbations métaboliques associées à l'obésité, l'obésité est également associée à un risque pro-thrombotique accru, risque près de deux fois plus élevé chez les sujets obèses par comparaison aux sujets non obèses (Eichinger et al., 2008). Le TA pourrait ainsi jouer un rôle causal dans cet effet pro-thrombotique et son implication dans les perturbations de l'hémostasie est multiple. En effet, le TA active les thrombocytes et altère directement la fibrinolyse par la sécrétion de leptine, mais aussi par la production de molécules impliquées dans la coagulation sanguine telles que l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) (Nakata et al., 1999; Riba et al., 2008). Le PAI-1 est une protéine, facteur anti-thrombotique, qui inhibe l'activation du plasminogène plasmatique et tissulaire et donc la fibrinolyse (Huber, 2001). Il est principalement exprimé par le foie mais il est également produit par les adipocytes et les cellules de la FSV. Fain et al ont rapporté des concentrations élevées de PAI-1 dans le contexte de l'obésité et ces taux élevés sont fortement corrélés au développement de l'adiposité viscérale. Mais le rôle du TA dans les perturbations de l'hémostasie est aussi indirect. En effet, l'inflammation induite au cours de l'obésité va non seulement endommager l'endothélium vasculaire mais aussi potentialiser les effets induits par la leptine et le PAI-1 et contribuer à l'effet pro-thrombotique par une activation de la cascade de la coagulation (Vilahur et al., 2017).

### *d. Tissu adipeux et pression artérielle*

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) désigne un des systèmes de régulation les plus importants des fonctions autonomes cardiovasculaires dont le rôle est de maintenir l'homéostasie hydrosodée. Ce système, organisé autour du rein, joue un rôle prépondérant dans la régulation de la pression artérielle. La cascade classique du SRAA est constituée d'un ensemble d'hormones et enzymes qui convertissent l'angiotensinogène (AGN) en angiotensine I (ATI), clivage sous le contrôle de la rénine. L'ATI est ensuite clivé en angiotensine II (ATII) par l'enzyme de conversion (ACE). L'ATII est considéré comme le principal acteur physiologique du SRAA responsable de l'activation du système sympathique, d'une vasoconstriction alvéolaire, de la rétention tubulaire hydrosodée et de la sécrétion d'aldostérone entre autres (Engeli et al., 2000).

L'implication du TA dans le SRAA est importante. Tous les acteurs majeurs du SRAA sont synthétisés et/ou exprimés par le TA (Karlsson et al., 1998). De ce fait, l'expansion du TA n'est pas sans conséquences sur le SRAA. Ainsi, au cours de l'obésité, l'expression de l'AGN par le TA est augmentée alors que la production hépatique reste inchangée (Boustany et al., 2004). Il contribue alors à presque 30% des concentrations circulantes d'AGN, ce qui le place comme deuxième source après le foie (Massiera et al., 2001). De même, une étude réalisée chez des femmes obèses a montré une élévation des taux d'AGN plasmatique, de rénine, et une activité de l'ACE augmentée par comparaison à des femmes non obèses (Engeli et al., 2005). Ainsi, il est probable que les composants du SRAA dérivés du TA soient impliqués dans la régulation de la pression artérielle. Enfin, des variations dans l'expression génique des protéines du SRAA ont été observées au sein des différents dépôts de TA. Il apparaît que leur expression est supérieure dans les dépôts viscéraux par comparaisons aux dépôts sous-cutanés (Giacchetti et al., 2000). En parallèle, le SRAA va également impacter le TA. En effet, la littérature met en évidence différents mécanismes : 1/ une inhibition du SRAA stimule l'hyperplasie adipocytaire en favorisant la différenciation adipocytaire (Furuhashi et al., 2004), 2/ l'ATII stimule la différenciation adipocytaire et augmente le taux de TG circulants (Massiera et al., 2001), 3/ les inhibiteurs de l'ACE et de la rénine concourent à améliorer la sensibilité à l'insuline et favoriser la tolérance du glucose (Jacob et al., 1996; Marchionne et al., 2012), et à réduire les effets délétères du syndrome métabolique.

### 3. Immuno-métabolisme

La réponse immunitaire et la régulation métabolique sont étroitement liées. Déterminer les liens spécifiques entre métabolisme et immunité et étudier l'interface entre ces deux systèmes est permise par une discipline récente : l'immuno-métabolisme (Y. S. Lee et al., 2018; Mathis & Shoelson, 2011). L'immuno-métabolisme reconsidère l'étude de ces systèmes de façon bidirectionnelle (Norata et al., 2015) : avec d'une part l'impact des voies métaboliques sur l'efficacité des réponses immunitaires et d'autre part le rôle des cellules immunitaires dans le métabolisme et l'homéostasie énergétique. On peut distinguer deux axes d'étude associés à l'immuno-métabolisme : (a) l'approche cellulaire, qui porte sur l'étude de l'influence des voies métaboliques sur les fonctions immunitaires au sein même de la cellule (bioénergétique cellulaire) et (b) l'approche macroscopique qui étudie les liens entre métabolisme et immunité à l'échelle du tissu ou de l'organisme (O'Neill et al., 2016). Par sa composition multicellulaire regroupant à la fois adipocytes et cellules immunitaires, et par ses fonctions physiologiques variées, réunissant les voies métaboliques et immunitaires hautement conservées, le TA se révèle comme le tissu idéal à la démonstration de l'intérêt d'une approche combinant le métabolisme et l'immunologie. Quelques exemples de ces interactions seront présentés ci-dessous :

#### *a. Régulation du métabolisme du glucose, par les cytokines pro-inflammatoires*

Des travaux précurseurs ont montré l'impact d'un milieu conditionné par des macrophages activés sur les adipocytes. Celui-ci induisait une résistance à l'insuline par diminution de la captation du glucose et de l'expression de la LPL (Mahoney et al., 1985; Pekala et al., 1983). Le rôle du TNF- $\alpha$  a ensuite été identifié puis décrit dans ces phénomènes et dans les contextes d'obésité (Beutler et al., 1985; Hotamisligil et al., 1993). Il existe une relation de corrélation entre l'inflammation associée à l'obésité viscérale et la résistance à l'insuline (Schäffler et al., 2006). Chez les sujets obèses, la production élevée de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 va réguler négativement l'action de l'insuline dans les adipocytes (Fain et al., 2004; Shoelson, 2006). Dans le TA en particulier, l'expression des gènes inflammatoires est sélectivement induite aux premiers stades de l'obésité ce qui n'est pas retrouvé dans d'autres organes impliqués dans le métabolisme comme le foie par exemple (Y. S. Lee et al., 2011). Ainsi,

le TA semble agir comme le tissu princeps, celui qui répond à un apport énergétique excessif de façon chronique et qui initie la réponse inflammatoire induite par l'obésité et ses conséquences métaboliques.

### *b. Adipocytes, acteurs de la réponse immunitaire*

Une première implication des adipocytes dans la réponse immunitaire est liée à l'expression des récepteurs de type Toll (TLR) par les adipocytes et pré-adipocytes, leur permettant de détecter les ligands microbiens et des déchets cellulaires libérés lors de lésions tissulaires. Ces TLR sont exprimés avec un spectre de reconnaissance plus large pour les adipocytes que pour les pré-adipocytes, aboutissant à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-6 (Pietsch et al., 2006). Par cette reconnaissance de pathogènes, les adipocytes initient une réponse pro-inflammatoire importante et nécessaire pour la défense de l'hôte. L'expression du panel complet et fonctionnels de TLR sur les adipocytes classe le TA comme un membre du système immunitaire inné capable d'induire une réponse inflammatoire locale et de participer à la réponse immunitaire innée de l'organisme (Trinchieri & Sher, 2007).

Une autre implication du TA dans la réponse immunitaire pourrait provenir de la capacité des précurseurs adipocytaires du TA (pré-adipocytes et CSM) à se différencier en macrophages. Les travaux de Charrière et al ont montré dans un modèle murin, que des pré-adipocytes soumis à un environnement adipeux ont la capacité d'adopter un phénotype macrophagique et une activité de phagocytose (Charrière et al., 2003). L'accumulation macrophagique observée dans le TA au cours de l'obésité ne se limiterait donc pas au phénomène d'infiltration depuis le compartiment plasmatique.

L'adipocyte a été également rapporté comme acteur de la réponse immunitaire adaptative puisqu'il est décrit comme une CPAg. Une expression des molécules de CMH de classe I a été montrée bien qu'il n'y ait à ce jour pas de preuve d'une interaction entre les adipocytes et les LyT CD8 (Huh et al., 2014). Cependant, il est prouvé que les adipocytes expriment les molécules de CMH de classe II et des molécules co-stimulatrices CD80/CD86 et que leur expression augmente significativement sur les adipocytes hypertrophiés et au cours d'un régime riche en TG (Deng et al., 2013). L'activation des LyT CD4 via les molécules du CMH de classe II sur les adipocytes est fonctionnelle et spécifique. Cependant, la contribution des adipocytes (vs macrophages) à l'activation des LyT CD4 dans le TA n'est pas claire (Morris et al., 2013)

### *c. Voies métaboliques et polarisation lymphocytaire*

Le métabolisme cellulaire (biosynthèse et libération énergétique) est primordial à la fonctionnalité des cellules, y compris des cellules de l'immunité dont les LyT font partie. L'équilibre entre micro-environnement pro- ou anti-inflammatoire et la mise en place de réponses immunitaires adaptées est donc fortement dépendant des voies métaboliques empruntées.

L'étude du métabolisme cellulaire a montré que la survie et la polarisation des réponses lymphocytaires reposaient sur des programmes métaboliques distincts. Ainsi, au repos, les LyT utilisent des processus énergétiquement efficaces : la phosphorylation oxydative (Pearce & Pearce, 2013). Dès leur activation, les LyT subissent un changement métabolique et passent d'un état de quiescence à un métabolisme hautement actif ce qui se traduit par une diminution de la  $\beta$ -oxydation des AG et une augmentation rapide de la glycolyse (Donnelly & Finlay, 2015). Enfin, en fonction du micro-environnement, une reprogrammation métabolique des cellules immunitaires est observée. Ceci participe à la polarisation vers un phénotype pro- ou anti-inflammatoire. Finalement, la glycolyse pourrait induire les phénotypes Th1, Th2 et Th17 ; la  $\beta$ -oxydation des AG oriente vers la différenciation en Treg (Ma et al., 2017). Enfin, le phénotype de LyT CD8 mémoire sera favorisé par une diminution de la glycolyse et une augmentation de la  $\beta$ -oxydation (Pearce et al., 2009). Ces changements liés aux besoins énergétiques de la cellule selon son stade de différenciation seront aussi modulés par la disponibilité des différents métabolites. Les propriétés métaboliques du TA pourraient ainsi moduler spécifiquement le profil métabolique et les profils fonctionnels des LyT présents dans le TA.

### *d. Rôle des cellules immunitaires dans le métabolisme tissulaire*

- Implication des cellules immunitaires dans l'inflammation systémique

Comme dans la plupart des autres organes, le TA est soumis à une surveillance immunitaire. Avec leur haut degré de plasticité, les macrophages du TA peuvent adopter différents phénotypes en réponse à des signaux micro-environnementaux (Gordon, 2007). Ainsi, dans le TA de sujets non obèses, le phénotype M2 est majoritairement retrouvé et la présence de cytokines anti-inflammatoires (IL-4 ou IL-13) favorise un phénotype associé à l'homéostasie tissulaire (Galli et al., 2011). En revanche, dès l'installation d'une obésité, les médiateurs pro-inflammatoires augmentent ce qui favorise la polarisation des macrophages vers un phénotype M1, l'infiltration de LyT CD8 cytotoxiques (K. Liu et al., 2015). La libération accrue de cytokines

pro-inflammatoires par les adipocytes mais aussi par les macrophages et lymphocytes favorise le recrutement d'autres cellules immunitaires qui vont à leur tour libérer des médiateurs pro-inflammatoires perpétuant l'état d'inflammation chronique observé dans l'obésité.

<b>Cellule immunitaire</b>	<b>Variation au cours de l'obésité</b>	<b>Rôle dans l'inflammation</b>	<b>Contribution à l'inflammation</b>
Cellules dendritiques	↗	ND	ND
Lymphocytes B	↗	Pro-inflammatoire	IFN- $\gamma$ , IL-10
Lymphocytes NK	↗	Pro-inflammatoire	
Lymphocytes T CD4 Th1	↗	Pro-inflammatoire	IFN- $\gamma$ , IP-10, MIG, TNF- $\alpha$
Lymphocytes T CD8	↗	Pro-inflammatoire	IL-6, TNF- $\alpha$
Lymphocytes Treg	↘	Anti-inflammatoire	TGF- $\beta$
Polynucléaires éosinophiles	↘	Anti-inflammatoire	
Polynucléaires neutrophiles	↗	Pro-inflammatoire	Myéloperoxydase, calprotectine
Macrophages, M1	↗	Pro-inflammatoire	TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12, MCP-1
Mastocytes	↗	Pro-inflammatoire	IL-6, IFN- $\gamma$

\* ND : Non déterminé

**Tableau 1 : Contribution des cellules immunitaires du tissu adipeux à l'inflammation**

Chaque type cellulaire qui compose le tissu adipeux contribue de façon positive ou négative au processus inflammatoire. D'après Huh et al, 2014.

- Action des lymphocytes sur le métabolisme adipocytaire

Enfin, parmi les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'obésité, l'accumulation de LyT pro-inflammatoires dans le TAV a montré toute son importance. Cette accumulation pourrait initier la réponse inflammatoire *in situ* et favoriser le développement de la résistance à l'insuline (Kintscher et al., 2008). Parmi les processus physiologiques mis en jeu, la coopération entre adipocytes et LyT pourrait se faire via l'implication de la voie CD40/CD40L. Plusieurs études indiquent l'importance de la voie du CD40/CD40L dans le déclenchement et le maintien de la réaction inflammatoire (Noelle, 1996). Fait intéressant, (i) les adipocytes humains matures expriment le CD40, (ii) la voie du CD40/CD40L stimule la production

## **Introduction**

---

d'adipokines pro-inflammatoires, réduit la signalisation de l'insuline et modifie la lipolyse et la lipogenèse, (iii) les LyT expriment le CD40L (Poggi et al., 2009). Ainsi, les LyT pourraient modifier la fonction adipocytaire par un contact cellule-cellule impliquant la voie CD40/CD40L. L'interaction *in vitro* entre adipocytes et LyT a montré une augmentation significative de la production des adipokines pro-inflammatoires IL-6, MCP-1 et PAI-1, ces altérations dépendaient du nombre de LyT activés. En conclusion, la coopération entre les LyT et les adipocytes, via la voie du CD40, pourrait jouer un rôle déterminant dans la réaction inflammatoire à travers la régulation des adipokines inflammatoires.

## **II. Tissu adipeux et infection**

### **A. Obésité et susceptibilité aux infections**

L'excès de TA participe activement à l'inflammation chronique et est classiquement associé au développement de maladies métaboliques du fait de la production et sécrétion d'un grand nombre de cytokines pro- et anti-inflammatoires, y compris les adipokines (Fantuzzi, 2005). Mais l'excès de TA est également un facteur de risque de développement de nombreuses autres pathologies et peut augmenter la sensibilité aux infections chez l'Homme comme chez la souris. Parmi les facteurs impliqués dans cette sensibilité aux infections, plusieurs études ont mis en évidence l'importance de l'induction de la leptine dans la défense de l'hôte (Ozata et al., 1999; Faggioni et al., 2001).

Chez la souris, le modèle *ob/ob* est un modèle d'obésité par hyperphagie massive induit par l'extinction de la signalisation leptinique. Dans ce modèle, les souris ont une morbi-mortalité plus élevée que les souris non obèses lors d'une infection grippale (A. G. Smith et al., 2007). Elles sont également plus sensibles aux infections bactériennes comme la tuberculose, la listériose ou encore les infections à staphylocoques (Wieland et al., 2005; Ikejima et al., 2005; Mancuso et al., 2002). Il a été démontré une mortalité accrue au cours d'infections pulmonaires à streptocoques et cet impact délétère peut être levé par injections intrapéritonéales de leptine (Hsu et al., 2007). Chez l'Homme, l'expansion excessive de TA prédispose là encore les individus à de multiples infections comme les infections respiratoires, nosocomiales ou encore les infections cutanées, et contribue à leur impact délétère sur l'organisme.

#### **1. Infections associées aux soins**

L'incidence des infections associées aux soins acquises au décours d'une hospitalisation dites aussi nosocomiales, sont plus fréquentes chez les patients obèses et en surpoids par comparaison aux patients de poids normal. Du fait de l'excès de poids et des nombreuses pathologies associées, la prise en charge médicale des patients obèses est une prise en charge complexe, nécessitant du personnel formé et des équipements adaptés. En raison de ces difficultés, la durée de séjour des patients obèses peut être allongée ce qui augmente le risque de contracter une infection nosocomiale (Anaya & Dellinger, 2006; Mathison, 2003). Parmi les infections les plus fréquentes, on retrouve les infections cutanées et les infections pulmonaires.

### **2. Infections cutanées**

Une incidence plus élevée des infections cutanées a été rapportée chez les sujets obèses par comparaison aux sujets non obèses. L'obésité est associée à un large éventail de maladies de la peau (Yosipovitch et al., 2007). Des infections fongiques superficielles comme l'intertrigo ou la candidose sont fréquentes et le plus souvent liées à une macération des plis cutanés. Des infections plus profondes sont également plus fréquentes, c'est le cas de la cellulite ou encore de la fasciite nécrosante, elles atteignent les tissus mous et sont rapidement évolutive vers des formes systémiques compliquées (Kilburn et al., 2010; Scheinfeld, 2004). Parmi les facteurs favorisant les infections cutané-muqueuses chez les sujets obèses, l'altération de la micro-vascularisation, la dérégulation immunitaire et les niveaux élevés de cytokines et d'adipokines pro-inflammatoires, en particulier la leptine, ont une influence significative (Tobin et al., 2013). Elles participent à l'altération de la barrière cutanée et de la fonction du collagène, à la cicatrisation de mauvaise qualité et sont associées à une inflammation localisée prolongée qui pourra infiltrer le tissu cutané-muqueux et donner lieu à des infections généralisées.

### **3. Infections respiratoires**

Depuis de nombreuses années, il est clairement démontré que le surpoids et l'obésité ont un impact fonctionnel délétère sur les fonctions respiratoires. Plusieurs mécanismes physiopathologiques peuvent expliquer ces atteintes pulmonaires accrues dans le contexte de l'obésité : un effet mécanique lié à l'accumulation de TA, un état inflammatoire chronique de bas grade et une altération des réponses immunitaires liées au contexte de l'obésité, et une participation des comorbidités à l'aggravation de ces atteintes (McCallister et al., 2009). L'obésité modifie ainsi profondément la mécanique pulmonaire en diminuant les volumes pulmonaires mobilisables, et en augmentant la résistance des voies respiratoires à l'effort ce qui contribue à l'altération des échanges gazeux, à un essoufflement compensatoire à l'effort et au repos (Guerra et al., 2002). De ce fait, l'obésité se retrouve associée à des pathologies pulmonaires comme l'apnée obstructive du sommeil, l'asthme, le syndrome restrictif, et devient un facteur de risque de pathologies respiratoires contribuant à l'aggravation d'une détresse respiratoire dans le contexte d'infections pulmonaires notamment (Koenig, 2001). Les pneumonies infectieuses les plus fréquemment rapportées chez les sujets obèses sont la tuberculose et les infections à pneumocoques pour les infections bactériennes, la grippe et

plus récemment l'infection à SARS-CoV-2 pour les infections virales (Corrales-Medina et al., 2009; Fisher-Hoch et al., 2013; Simonnet et al., 2020).

- Infection grippale

Les preuves de l'impact de l'obésité sur le risque de survenue et la gravité d'une pneumonie grippale, à virus Influenza, sont principalement basées sur la pandémie de grippe AH1N1 de 2009. Au cours de cette pandémie, il a été démontré que les sujets atteints d'obésité avec ou sans autre facteurs de risque ont une susceptibilité accrue à être infectés par le virus et sont plus à risques de formes sévères voire mortelles (Jain et al., 2009). En effet, les taux d'hospitalisation pour pneumonie grippale sont plus élevés chez les sujets obèses par comparaison aux sujets non obèses, ils sont également plus souvent admis dans les services de soins intensifs (Fuhrman et al., 2010; Jain et al., 2009). Depuis, le Haut Conseil de la santé publique a élargi les recommandations de vaccination aux personnes obèses dont l'IMC est supérieur ou égal à 40 kg/m<sup>2</sup>. Cependant, les travaux de Sheridan et al montrent que la réponse vaccinale chez les sujets obèses ne permet pas une protection optimale. Malgré une réponse initiale importante au vaccin, les taux d'anticorps après vaccination étaient inversement corrélés à l'IMC des patients, avec une réduction des titres d'anticorps pouvant être divisés par quatre dans un délai d'un mois après la vaccination (Sheridan et al., 2012). Cette diminution accélérée du titre d'anticorps s'accompagne d'une altération de la réponse mémoire des LyT CD8 suggérant l'importance d'une nouvelle stratégie de vaccination chez les sujets obèses. Enfin, les travaux d'Ayari et al ont permis de montrer que l'altération du TA n'est pas seulement décrite dans des modèles d'infection persistante mais que ces altérations pouvaient aussi être retrouvées au cours d'infections aiguës comme celle de la grippe. C'est dans un modèle murin d'infection intranasale par le virus *Influenza* que ces travaux ont mis en évidence que la présence du virus n'est pas sans conséquences pour l'intégrité tissulaire et que le virus peut modifier profondément les fonctions métaboliques et immunitaires du TA (Ayari et al., 2020).

- Infection à SARS-CoV-2

La notion d'association entre obésité et susceptibilité aux infections respiratoires a réémergé de manière frappante avec la pandémie du SARS-CoV-2 pour « Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 ». Parmi les premiers facteurs de risque de formes sévères de COVID-19 (Coronavirus disease 2019) identifiés, les premières données rapportées de cohortes

## Introduction

---

chinoises ont rapidement identifié l'âge. Mais d'autres facteurs de risque ont suivi tels que le diabète de type 2, l'hypertension artérielle (Guan et al., 2020). L'obésité comme facteur de risque indépendant n'a été confirmé que lors de la diffusion de la pandémie dans les pays occidentaux, où les populations sont davantage concernées par l'obésité (Richardson et al., 2020). L'obésité est non seulement un facteur de risque d'hospitalisation en soins intensifs mais c'est aussi un facteur de risque de formes sévères voire létales. Simonnet et al dans une étude princeps ont rapporté un sursisque d'intubation chez les patients atteints d'une obésité sévère ( $IMC > 35 \text{ kg/m}^2$ ) par comparaison à des sujets non obèses ( $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ ) (Simonnet et al., 2020). Cariou et al, dans une étude multicentrique française, CORONADO, sont venus confirmer que l'obésité était directement corrélée au risque de formes sévères, d'intubation à J7 de l'infection et de décès. Dans cette étude, les patients avec un  $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$  ont présenté un risque deux fois plus élevé d'intubation ou de décès que les patients non obèses (Cariou et al., 2020). Les mécanismes de cette susceptibilité accrue des sujets obèses aux formes sévères de la COVID-19 seront détaillés dans une section dédiée.

### B. Présence de pathogènes : réservoirs

Le TA est également la cible de pathogènes et un site d'accumulation de bactéries (*Mycobacterium tuberculosis* et *Staphylococcus aureus*), parasites (*Plasmodium species* et *Toxoplasma species*) et de virus (adénovirus, virus de l'immunodéficience humaine et simienne, et SARS-CoV-2) où ils induisent des perturbations métaboliques et immunitaires.

#### 1. Bactéries

##### a. *Mycobacterium tuberculosis*

Du fait de l'infection chronique latente dont la bactérie est responsable, la question de la localisation des bacilles de *Mycobacterium tuberculosis* fait l'objet de nombreuses études depuis le début du siècle (Parrish et al., 1998). La recherche de bacilles latents s'est tout d'abord concentrée sur les principaux tissus cibles de la tuberculose à savoir les poumons et les ganglions lymphatiques. L'ADN bactérien a été détecté *in situ* dans des échantillons autopsiques et plus précisément au sein des macrophages alvéolaires et interstitiels, des cellules endothéliales et fibroblastes (Hernández-Pando et al., 2000; Stewart et al., 2003). En

plus des poumons et ganglions lymphatiques, d'autres organes et tissus sont susceptibles d'héberger des bacilles latents. En effet, la tuberculose se caractérise par une réactivation qui survient dans près de 15% des cas dans des sites extra-pulmonaires (Farer et al., 1979). La réactivation se ferait donc directement depuis ces foyers extra-pulmonaires, d'où la nécessité d'identifier l'ensemble de sites réservoirs. De ce constat, avec une présence macrophagique importante dans la FSV du TA, la présence de *Mycobacterium tuberculosis* est attendue dans ce tissu. Les travaux de Neyrolles et al ont montré *in vitro* que *Mycobacterium tuberculosis* persiste dans les macrophages et les adipocytes à l'état quiescent, mais aucune multiplication bactérienne n'a pu être montrée dans un environnement adipeux (Neyrolles et al., 2006). Le mécanisme d'entrée passerait par la molécule CD36, récepteur scavenger impliqué dans le transport des AG. La pathogénicité de la bactérie détectée *in situ* est intacte puisque le transfert de lysats de TA murins infectés à des souris naïves peut induire une infection tuberculeuse. Enfin, la présence et la persistance de *Mycobacterium tuberculosis* au sein du TA n'est pas sans conséquences pour l'intégrité tissulaire puisque qu'elle est associée à une infiltration de LyT CD8 et de cellules NK ainsi qu'une production accrue d'IFN- $\gamma$  suggérant une inflammation *in situ* (Beigier-Bompadre et al., 2017; Neyrolles et al., 2006).

### b. *Staphylococcus aureus*

Le *Staphylococcus aureus* est une bactérie fréquemment impliquée dans les infections de la peau et des tissus mous et potentiellement graves. Les infections à staphylocoques sont classiquement associées à des troubles métaboliques comme le diabète par exemple (Breen & Karchmer, 1995). Toutefois, leur sévérité serait inversement corrélée à l'adiposité du fait notamment de l'action des adipokines (Wurzinger et al., 2010). Malgré l'effet protecteur de l'excès de masse adipeuse, la bactérie peut infecter les adipocytes, lyser les cellules sous réserve d'un inoculum bactérien suffisamment important. L'élimination bactérienne semble dépendante du taux de glucose. Parallèlement, l'infection à *Staphylococcus aureus* modifie la sécrétion d'adipokines avec une diminution de la libération de l'adiponectine, anti-inflammatoire et anti-diabétique. Au final, l'infection à *Staphylococcus aureus* concourt à un environnement adipeux pro-inflammatoire (Hanses et al., 2011).

### 2. Parasites

#### a. *Trypanosoma cruzi*

L'un des parasites les plus étudiés dans le TA est le *Trypanosoma cruzi*, responsable de la maladie de Chagas dont l'incidence et la morbi-mortalité sont importantes en Amérique (Tanowitz et al., 1992). Ce sont les travaux de Shoemaker et al qui ont mis en évidence chez la souris que le TA pouvait être une cible importante du *Trypanosoma cruzi* (Shoemaker et al., 1970). La présence du parasite est détectée très tôt après le début de l'infection (environ 15 jours) et il peut persister dans le TA jusqu'à un an après l'infection suggérant que le TA et en particulier les adipocytes sont des réservoirs à partir desquels le parasite pourrait provoquer une recrudescence de l'infection (Combs et al., 2005; Lenzi et al., 1996; Nagajyothi et al., 2012). La présence du parasite dans le TA est associée à un profil pro-inflammatoire avec une augmentation de l'expression de PPAR- $\gamma$ , de MCP-1 et des cytokines IL-6 et TNF- $\alpha$ , ainsi qu'une diminution de l'expression des adipokines (adiponectine et leptine) par les adipocytes. Toutes ces modulations montrent que l'infection par *T. cruzi* affecte les fonctions et sécrétions du TA (Combs et al., 2005; Nagajyothi et al., 2012).

#### b. *Plasmodium species*

D'autres exemples de parasites pouvant être détectés dans le TA sont les protozoaires du genre *Plasmodium* et responsables du paludisme. Le plasmodium est un parasite intracellulaire qui infecte les érythrocytes. Au cours de la phase érythrocytaire, les symptômes du paludisme apparaissent en raison de la destruction des globules rouges. Dans les formes sévères de paludisme à *Plasmodium falciparum*, une séquestration tissulaire de formes dites schizontes est observée post-mortem au sein de la rate, le cerveau et les poumons de patients infectés. Mais le *Plasmodium falciparum* s'accumule également dans le TA au cours des formes sévères (Franke-Fayard et al., 2010; Wilairatana et al., 2000). Parmi les mécanismes impliqués dans l'adhérence préférentielle du plasmodium aux vaisseaux du TA par comparaison aux vaisseaux de la circulation sanguine, la molécule CD36 apparaît comme là encore un récepteur clé. En effet, dans un modèle déficient en récepteur CD36, la séquestration des schizontes est spécifiquement réduite dans le TA (Franke-Fayard et al., 2005). Enfin, l'impact de la séquestration de formes schizontes dans le TA sur l'intégrité du tissu ainsi que sur la sévérité de l'infection reste à ce jour débattue.

### **3. Virus**

Tout comme l'accumulation bactérienne et la séquestration parasitaire, de nombreux virus ont également été détectés au sein du TA. Cette accumulation de virus divers est à mettre en regard avec la présence des cibles virales *in situ* : les adipocytes pour le CMV et plus récemment le SARS-CoV-2 (Price et al., 1990; Poma et al., 2021), les cellules stromales pour le CMV (Zwezdaryk et al., 2016), les macrophages pour le VIH et le SARS-CoV-2 (Damouche et al., 2015; Martínez-Colón et al., 2021) et enfin les LyT CD4 avec le VIH (Damouche et al., 2015). L'accumulation virale concerne aussi bien des virus associés à des infections aiguës qu'à des infections chroniques. Toutefois, le tropisme viral pour le TA permet de prolonger significativement la durée de l'excrétion virale chez des sujets obèses infectés par la grippe par exemple (Maier et al., 2018). Cette accumulation virale est associée à une activation prolongée des systèmes immunitaires locaux par une production accrue de cytokines pro-inflammatoires (Bouwman et al., 2008). Enfin, d'autres virus peuvent également interagir directement avec le TA en favorisant la différenciation adipocytaire et modulant l'expression de gènes lipogéniques par des adipocytes, c'est le cas de l'adénovirus 36 (Whigham et al., 2006). Ce dernier présente une forte affinité pour le TA et les quantités d'ADN détectées dans le TA sont directement proportionnelles à l'adiposité viscérale.

Une partie plus détaillée sera dédiée au VIH et au SARS-CoV-2 car ils ont fait l'objet de mon travail de thèse.

### **C. Focus HIV**

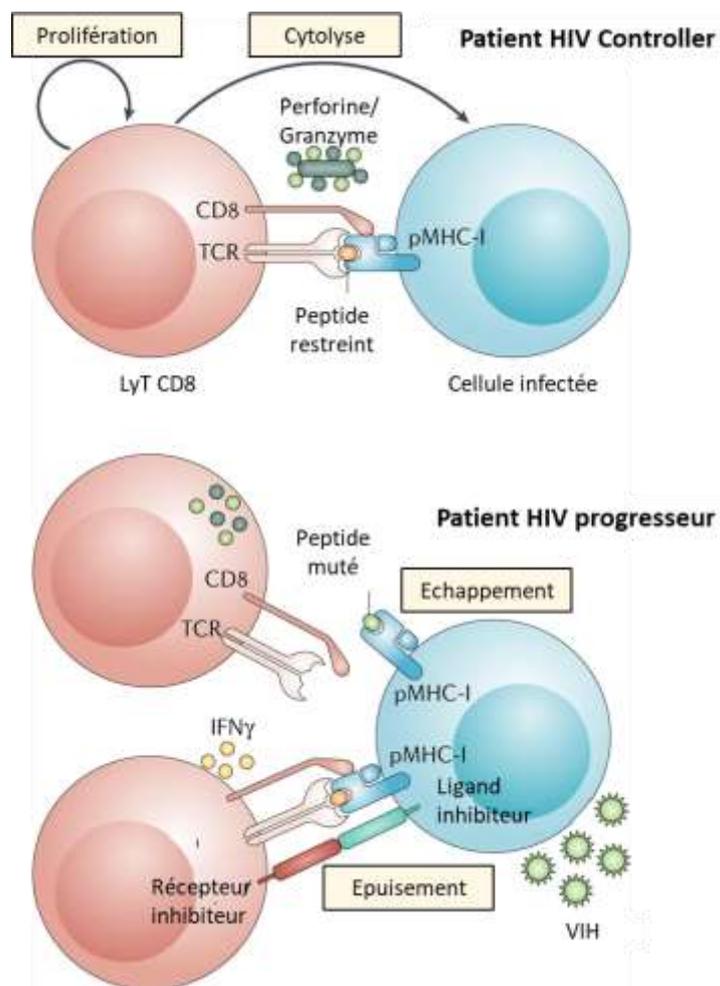
#### Cellules cibles et infection

Le VIH est un rétrovirus qui cible principalement les LyT CD4 activés mais d'autres cellules peuvent aussi être infectées comme les monocytes/macrophages, les DC, les cellules de la microglie du cerveau (Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984; Coleman & Wu, 2009). L'arrivée des TARV a radicalement transformé le pronostic de l'infection. L'évolution des molécules et des stratégies thérapeutiques (molécules plus puissantes avec une barrière génétique élevée limitant ainsi la sélection de mutations de résistance, molécules avec une demi-vie allongée ou encore les combinaisons fixes simplifiant des plans de prises et avec un meilleur profil de tolérance) a permis une nette amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients en contrôlant la réplication virale mais aussi en renforçant le

## Introduction

---

système immunitaire par la restauration (partielle ou complète) du nombre de LyT CD4 circulants (Autran et al., 1997). Cela a eu pour impact clinique une réduction de la morbi-mortalité, une prolongation de la durée de vie, une amélioration de la qualité de vie des patients et une diminution du risque de transmission du virus à un tiers. Chez les patients traités, et sous TARV bien conduit, malgré une charge virale plasmatique la plus souvent indétectable (<50 copies d'ARN/mL), l'éradication virale n'est pas complète, une réplication virale résiduelle persiste et peut être mise en évidence par l'utilisation de techniques de mesure ultrasensibles (Chun et al., 1997). Cette réplication résiduelle à bas bruit entretient le réservoir et participe à l'altération du système immunitaire empêchant ainsi l'élimination du virus (Klatt et al., 2013). Par ailleurs, le contrôle de l'infection sous TARV reste le plus souvent temporaire. En cas d'interruption du traitement, dans la majorité des cas, la réplication virale reprend imposant le maintien du traitement à vie pour éviter toute reprise de la réplication virale ce qui présente de nombreuses contraintes dont la toxicité des molécules au long cours (Whitney et al., 2014). Dans de rares cas, un état de rémission a été observé en post-arrêt de traitement chez les patients pour lesquels un traitement puissant et prolongé avait été initié en primo-infection (Sáez-Cirión et al., 2013). Ceci est la preuve de concept qu'une rémission est envisageable après une intervention thérapeutique même si les conditions de ce contrôle post-arrêt restent à mieux définir. Enfin, un troisième modèle de contrôle est celui des patients HIV Controllers (HIC), capables de contrôler spontanément leur infection en l'absence de tout TARV. Cette population de patients a été décrite pour la première fois par le Pr Lambotte au sein de l'équipe du Pr Delfraissy en 2005 (Lambotte et al., 2005). Chez ces patients, les mécanismes de contrôle identifiés sont divers et le système immunitaire y contribue fortement. Les LyT CD8 et T CD4 spécifiques ont des qualités supérieures à celles des autres patients ce qui permet une élimination plus rapide et de façon plus efficace des LyT CD4 infectés (Collins et al., 2020; Saez-Cirion et al., 2007). L'importance des réponses T CD8 et les altérations observées chez les patients non-contrôleurs est illustrée en **Figure 11**. Ces caractéristiques suggèrent qu'une intervention sur le système immunitaire visant à favoriser des réponses T de meilleure qualité pourrait permettre une rémission. Quel que soit le modèle de contrôle de la réplication virale, aucun ne permet d'accéder à l'éradication virale complète, le virus persiste toujours au sein de réservoirs viraux disséminés dans l'organisme.



**Figure 11 : Interactions des lymphocytes T CD8 avec les cellules infectées chez les HIV Controllers et les patients progresseurs**

Chez les patients HIV Controllers, les lymphocytes T CD8 reconnaissent les peptides restreints présentés via le CMH de classe 1 des cellules infectées. Cette reconnaissance induit la prolifération et une cytotoxicité cellulaire médiée par la libération de perforine et granzyme. Chez les patients progresseurs du VIH, il existe la présence de mutations peptidiques favorise l'échappement à la reconnaissance antigénique ce qui altère les processus de prolifération et de cytotoxicité. Il en résulte d'une expression de molécules inhibitrices telles que PD1 et PDL1, molécules qui vont participer aux dysfonctions lymphocytaires classiquement décrites au cours des infections persistances. D'après Collins et al, 2020.

Au cours de l'infection par le VIH, le réservoir est constitué très tôt au cours de la primo-infection : dans les deux premières semaines de l'infection. Dans les stades chroniques, plusieurs études portant sur l'établissement du réservoir viral suggèrent que sa taille serait proportionnelle à la virémie cumulée (Bourry et al., 2010; Jaafoura et al., 2014). On peut distinguer les réservoirs cellulaires, des réservoirs anatomiques. Le réservoir cellulaire est

## ***Introduction***

---

principalement constitué de cellules permissives, LyT CD4 et macrophages quiescents et à longue durée de vie, infectés par du virus sous forme latente à l'ADN cellulaire, forme peu visible pour le système immunitaire. Le réservoir anatomique est constitué de sites anatomiques favorisant la persistance du virus du fait non seulement d'une diffusion suboptimale des ARV mais probablement aussi lié aux propriétés immunologiques intrinsèques du tissu. Parmi ces sites anatomiques, les tissus lymphoïdes et en particulier les ganglions lymphatiques, la rate et les tissus lymphoïdes associés à l'intestin constituent les principaux réservoirs tissulaires du VIH. Mais d'autres tissus comme le TA, la moelle osseuse, le cerveau et les poumons sont également des sites réservoirs importants du virus et présentent des propriétés immunologiques propres associées à des caractéristiques pharmacologiques favorisant la sanctuarisation du VIH.

### *Lien tissu adipeux et VIH*

Il existe un lien étroit entre TA et l'infection par le VIH. En effet, les PVVIH ont un risque accru de développer une lipodystrophie par comparaison aux sujets non infectés (50 % d'après une enquête de 2009, contre moins de 2 % dans la population générale). En pratique clinique, cette redistribution des graisses se traduit par une lipoatrophie du TASC ou une lipohypertrophie du TA, et associée à une accumulation de TA dans la zone dorso-cervicale (bosse de bison) (Capeau et al., 2006). Elle s'accompagne également de troubles métaboliques telles que les dyslipidémies et des anomalies du métabolisme glucidique (Walli et al., 1998). Historiquement, ces lipodystrophies ont été associées à la toxicité des ARV de première génération sur le TA (inhibiteurs de protéase (IP) et inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI)) (Samaras et al., 2007). Néanmoins, des perturbations métaboliques sont également décrites chez les PVVIH avant mise sous traitement. Il semble donc que les atteintes du TA lors de l'infection par le VIH ne soient pas uniquement le fait des ARV mais soient aussi directement liées à un impact du virus lui-même sur le TA, comme présenté ci-dessous :

### *Impact de l'infection par le VIH sur le tissu adipeux*

L'étude de l'impact de l'infection par le VIH et des protéines codées par le VIH-1 a mis en évidence une lipodystrophie chez des patients infectés et naïfs de TARV suggèrent un impact du virus sur le TA (Giralt et al., 2011). L'étude de Gorwood et al révèle dans un modèle de primate non humain d'infection chronique par le SIV non seulement un impact du virus sur

l'induction d'un vieillissement prématuré du TA mais aussi un impact des protéines virales libérées par les cellules infectées, et en particulier Tat et Nef, sur les adipocytes et les ASC qui pourraient induire leur sénescence ce qui perturberait l'adipogenèse et donc l'homéostasie du TA (Gorwood et al., 2019). La sénescence induite par Nef est à relier à une réduction de la fonction adipogénique des ASC et à une résistance à l'insuline ce qui suggère que la sénescence du TA contribue aux complications cardio-métaboliques observées chez les personnes infectées par le VIH (Beaupere et al., 2015; Gorwood et al., 2019).

### Impact des traitements antirétroviraux sur le tissu adipeux

L'étude de l'impact des ARV sur la prévalence des lipodystrophies a montré un risque très variable selon les études considérées. Cette variabilité s'explique par l'âge des patients, le délai après mise sous TARV (la toxicité étant généralement observée après 2 ans) et le type de molécules étudiées. Les IP et INTI ont été les premières classes associées aux lipodystrophies et jouent un rôle majeur dans leur développement, à noter cependant des variations intra-classe dans l'intensité des toxicités (Bogner et al., 2001; Caron-Debarle et al., 2010, p.). Parmi les mécanismes impliqués dans la toxicité des ARV, on retrouve non seulement un impact sur l'adiposité mais aussi une dysfonction mitochondriale, la perturbation de la différenciation adipocytaire, et une apoptose des adipocytes. Les IP sont associés à une augmentation de l'adiposité et en particulier abdominale (Paton et al., 2015). Mais l'impact des IP sur le TA n'impacte pas seulement la répartition du TA. Ils diminuent la teneur en lipides des adipocytes et augmentent la lipolyse du TA responsable d'une dyslipidémie (Lagathu et al., 2007). Les IP diminuent également la différenciation adipocytaire, objectivée par une diminution de l'expression de PPAR- $\gamma$  (Caron et al., 2003; Djedaini et al., 2009). Enfin l'impact est aussi métabolique puisque les IP induisent une insulino-résistance à relier notamment à une inhibition du récepteur GLUT4 et qui concourt *in vitro* à l'apoptose des adipocytes (Murata et al., 2000). Les INTI sont classiquement associés à une lipoatrophie du TASC et l'évolution des INTI, avec les INTI de deuxième génération, a permis de réduire l'incidence des lipodystrophies (Saint-Marc et al., 1999). Cette lipoatrophie se traduit au niveau histopathologique par une toxicité mitochondriale spécifique au TA. Elle se traduit également par une augmentation de l'apoptose des adipocytes que l'on peut relier à la stavudine en particulier, et qui s'est améliorée avec l'abacavir (McComsey et al., 2005).

## **Introduction**

---

### Tissu adipeux, réservoir du VIH

L'impact direct de l'infection sur le TA a aussi été réévalué lorsque la notion de persistance du virus dans le TA a été démontrée. Cette notion que le TA pourrait servir de réservoir pour le VIH a été abordée pour la première fois par Dupin et al en 2002 (Dupin et al., 2002). Ce n'est qu'en 2015 que le VIH et son équivalent simien le SIV ont été détectés dans le TA (Damouche et al., 2015; Couturier et al., 2015). Dans ces deux études, l'ADN et l'ARN du VIH ont été détectés respectivement au sein de la SVF chez les patients infectés et contrôlés par TARV et dans les LyT CD4 et les macrophages chez les patients infectés et contrôlés par TARV, et dans un modèle de macaque infecté par le SIV. Le virus présent dans le TA est un virus compétent pour la réplication (Couturier et al., 2015; Damouche et al., 2015). Cependant, la réplication virale dans le TA est moins efficace que celle décrite dans les tissus lymphoïdes. Enfin, l'infectiosité du virus latent dans le TA est comparable à celle décrite dans les autres tissus (Couturier et al., 2015). L'ensemble de ces observations a donc permis de conclure que le TA est un réservoir du VIH. Le fait que le TA et en particulier les LyT CD4 soient un réservoir du VIH, que les LyT CD8 jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'infection d'une part et d'autre part, que ce tissu soit la cible des effets délétères du virus et des ARV interrogent sur le rôle des LyT CD8 du TA et leurs altérations au cours de l'infection par le VIH.

### **D. Focus SARS-CoV-2**

Les coronavirus humains ont été décrits pour la première fois dans les années 1960. Depuis, d'autres coronavirus ont été découverts et parmi lesquels on retrouve le SARS et le MERS responsables respectivement du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS) et du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS). Le virus SARS-CoV-2 appartient au groupe des beta-coronavirus tout comme le SARS-CoV, responsable d'une épidémie en 2002 et principalement localisé en Asie, ou encore le MERS-CoV, responsable d'une épidémie en 2012 dans la péninsule arabique (Su et al., 2016). Le virus SARS-CoV-2 a été mis en évidence dans la région de Wuhan en Chine en décembre 2019 (Chen et al., 2020). Son incidence a ensuite rapidement explosé, et s'est étendue à de nombreux pays. Responsable de la maladie « Coronavirus Disease 2019 » (COVID-19), l'OMS a déclaré fin janvier 2020 ce nouveau coronavirus comme une urgence de santé publique de portée internationale et le statut de pandémie en mars 2020. Cette pandémie a provoqué une mobilisation inédite des chercheurs qui s'est traduite par une

rapide progression des connaissances mais de nombreux points restent encore à clarifier en raison de la complexité et la nouveauté de cette infection.

### Cellules cibles et infection

Les cellules ciblées par le SARS-CoV-2 sont nombreuses et ne sont probablement pas encore toutes identifiées. Elles sont déterminées par leur expression du récepteur ACE-2, qui permet ensuite l'entrée du virus dans la cellule hôte après liaison de sa protéine membranaire : la protéine Spike dite protéine S (W. Li et al., 2003). En plus de l'attachement au récepteur ACE-2, d'autres protéines ont également été identifiées comme importantes pour l'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellules, à savoir la furine, les protéines lysosomales et la protéine TMPRSS2, protéines de clivage de la protéine S et qui permettent la fusion entre les membranes virale et cellulaire (Hoffmann et al., 2020; Ou et al., 2020).

Une étude menée sur un prélèvement autopsique de patient atteint d'une forme sévère de COVID-19 a révélé la co-expression d'ACE-2 et de l'antigène viral dans les poumons, la trachée, l'intestin grêle, les reins, le pancréas et le cœur suggérant fortement que le SARS-CoV-2 exploite en grande partie ACE-2 comme récepteur d'entrée dans les cellules de l'organisme (J. Liu et al., 2021). L'ACE-2 étant exprimé par les cellules endothéliales vasculaires de différents tissus, les pneumocytes de type 2, les cellules cardiaques, intestinales, hépatiques, de nombreux tissus sont la cible potentielle du virus. Mais l'ACE-2 est également exprimé dans le TA avec une expression supérieure par comparaison au tissu pulmonaire et cela sans distinction d'âge ni de genre (M.-Y. Li et al., 2020). Ces données, ainsi que la susceptibilité des sujets obèses à l'infection, ont donc rapidement mené à penser que le TA pouvait être une cible potentielle directe ou indirecte du SARS-CoV-2.

En parallèle des études sur les cellules ciblées par le virus, l'importance des réponses adaptatives et en particulier des réponses T CD8 au cours de l'infection à SARS-CoV-2 a pu être démontrée. Les travaux de Grifoni et al ont pu mettre en évidence que plus de 70% des patients convalescents présentaient des LyT CD8 spécifiques du virus (Grifoni et al., 2020). La présence de ces LyT CD8 spécifiques circulants a ensuite été corrélée à la survenue d'infection peu sévères (Rydyznski Moderbacher et al., 2020). Enfin, une étude réalisée dans un modèle simien d'infection à SARS-CoV-2, a pu mettre en évidence une clairance virale limitée dans les voies respiratoires associée à un nombre de LyT CD8 tissulaire restreint, ce qui suggère

## **Introduction**

---

l'importance des réponses T CD8 pour le contrôle de l'infection à SARS-CoV-2 (McMahan et al., 2021).

### *Lien tissu adipeux et SARS-CoV-2 : effet indirect de l'infection*

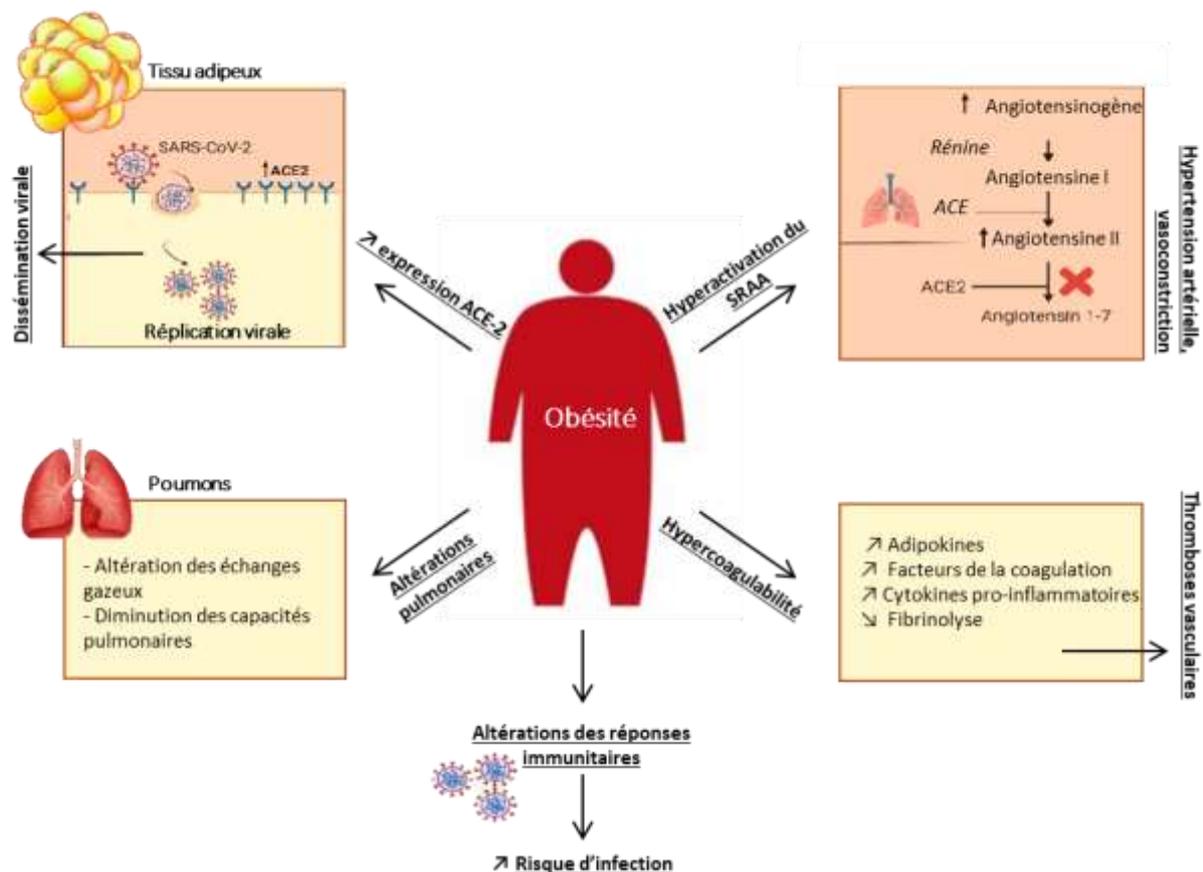
Parmi les mécanismes physiopathologiques qui pourraient expliquer la susceptibilité accrue des sujets obèses à une plus grande sévérité de la COVID-19, on retrouve (i) des facteurs de risque communs à toutes les infections respiratoires comme l'effet mécanique lié à l'accumulation de TA, un effet délétère direct des comorbidités associées à l'obésité, et une altération des réponses immunitaires locales et systémiques ; (ii) des facteurs plus spécifiques à l'infection par le SARS-CoV-2 comme l'activation du SRAA, une hypercoagulabilité et enfin des comorbidités communes entre l'obésité et les facteurs de risque de formes sévères de COVID-19 (**Figure 12**) (Magdy Beshbishy et al., 2020; Pasquarelli-do-Nascimento et al., 2020). Enfin, l'inflammation de bas grade associée à l'obésité contribue de façon importante aux réponses immunitaires locales et systémiques. Ainsi, les taux de cytokines pro-inflammatoires IL-6, TNF- $\alpha$  et MCP-1 produites en excès au cours de l'obésité pourraient ainsi concourir au développement de l'orage cytokinique caractéristique des formes sévères de COVID-19 (Tang et al., 2020).

### *Tissu adipeux, tissu cible du SARS-CoV-2*

Enfin, l'expression de l'ACE-2 dans le TA interroge sur le fait que le TA pourrait être la cible directe du SARS-CoV-2 et pourrait contribuer à la physiopathologie de la COVID-19 en perturbant directement les propriétés métaboliques et immunitaires du TA (Malavazos et al., 2020; Ryan & Caplice, 2020). Bien que les données de la littérature soient rares, des publications récentes démontrent l'infection du TA par le SARS-CoV-2. Ces études ont été menées dans un modèle simien *in vitro* mais aussi sur des prélèvements autopsiques de patients décédés de la COVID-19 (Basolo et al., 2022; Poma et al., 2021). L'expression de la protéine ACE-2 préférentiellement sur les adipocytes pointe clairement les adipocytes comme cible cruciale de l'infection. Mais l'infection des macrophages a aussi été récemment décrite (Martínez-Colón et al., 2021).

Cependant, ceci ne démontre pas la capacité du virus à cibler le TA dans un contexte non sévère d'infection et/ou hors obésité, ni la capacité du TA à devenir réservoir du virus puisqu'aucune étude n'a été réalisée à distance de l'infection. Cette démonstration de la

présence du virus en tant que virus entier et apte à infecter de nouvelles cellules pourrait participer à l'explication de la physiopathologie du « COVID long ».



**Figure 12 : Facteurs associés à la survenue d’une infection sévère à SARS-CoV-2 chez les patients obèses**

L'augmentation de la morbi-mortalité des patients obèses et en surpoids atteints de COVID-19 est liée à plusieurs mécanismes : 1/ une augmentation de l'expression d'ACE-2, 2/ une altération mécanique due à l'accumulation de tissu adipeux, 3/ une hyperactivation du système rénine angiotensine aldostérone (SRAA), 4/ une hypercoagulabilité, 5/ une altération des réponses immunitaires. Adapté de Magdy Beshbishy et al, 2020.

### **E. Activité anti-infectieuse du tissu adipeux**

Le TA est un organe à fonctions essentiellement métaboliques et dont le contrôle est étroitement lié au système immunitaire. Ce réseau de cellules immunitaires réagit constamment aux signaux de l'environnement adipeux afin de réguler le métabolisme du tissu. Cependant, la participation de la composante immunitaire du TA dans l'homéostasie et l'orchestration des réponses immunitaires anti-infectieuses restent mal comprises.

## **Introduction**

---

L'implication du TA dans l'immunité anti-infectieuse est décrite chez les organismes invertébrés où l'adiposité (majoritairement regroupée dans l'hémocèle) est un site de médiation important de la réponse à l'infection via la production de peptides antimicrobiens tels que la drosomycine (Choi & Hyun, 2012). L'idée d'une implication du TA dans ces fonctions a dès lors rapidement émergé pour les organismes vertébrés. Le TA est source de cytokines impliquées dans l'induction et/ou la coordination des défenses de l'hôte (Ouchi et al., 2011) mais le TA est aussi doué de fonctions immunitaires que l'on peut attribuer aux cellules immunitaires qui le composent mais aussi aux cellules adipocytaires. De ce fait, le TA dont la fonction principale reste métabolique assure une médiation immunitaire par une immunosurveillance contre les agents pathogènes et joue un rôle important dans la défense immunitaire, la cicatrisation et l'inflammation. Mais le rôle anti-infectieux des cellules de l'immunité du TA, et notamment des LyT CD8 est en train de se révéler.

### **1. Adipocytes**

Pour rappel, les adipocytes sont des contributeurs importants du système immunitaire. Cette contribution est non seulement liée à la production et la sécrétion d'adipokines mais aussi à sa capacité à recruter et activer des cellules immunitaires. L'implication directe des adipocytes dans la réponse anti-infectieuse a été amenée par les travaux de Zhang et al. Dans un modèle murin d'infection aiguë à *Staphylococcus aureus*, les adipocytes matures du TASC produisent des peptides antimicrobiens (dont la cathélicidine) qui favorisent l'élimination du pathogène (L. Zhang et al., 2015). Cependant, cette réponse locale des adipocytes semble diminuer à mesure de leur maturation.

### **2. Cellules immunitaires**

Mais un rôle anti-infectieux majeur de la composante immunitaire a également été démontré. Les premiers travaux suggérant une intervention du TA dans une immunité de proximité ont révélé la présence de LyT mémoires qui peuvent rapidement se développer en réponse à des signaux inflammatoires locaux (Masopust et al., 2001). Et les travaux de Han et al en 2017 sont venus confirmer cette hypothèse dans un modèle murin d'infection à *Yersinia pseudotuberculosis*. Ces travaux montrent qu'après une infection, une accumulation de LyT

mémoires spécifiques de l'agent pathogène s'opère dans le TA. Parmi ces LyT mémoires, un certain nombre sont qualifiés de résidents dans le tissu, présentent un profil métabolique distinct et sont capables de protéger lors qu'une exposition ultérieure au même antigène. Cette capacité de réponse anti-infectieuse spécifique au TA a été démontrée avec une greffe de TA, issu de souris préalablement infectées, à des souris receveuses soumises à une infection létale induite après exposition à ce même pathogène (S.-J. Han et al., 2017). La protection induite par cette greffe de TA est portée par les LyT CD8 mémoires résidents du TA. Pour la première fois, le TA est présenté comme un acteur de l'immunité adaptative. Plus tard, les travaux de Beura et al sont venus rediscuter de cette notion de résidence des LyT mémoires. En effet, l'immunosurveillance tissulaire repose essentiellement sur la caractérisation des cellules T mémoires résidentes ( $T_{RM}$ ) qui sont présentées comme des cellules résidentes, non circulantes et qui expriment CD69. Les travaux de Beura et al mettent en évidence une capacité de remobilisation de ces cellules résidentes, capacité qui vient remettre en question la notion de résidence et/ou la définition de la résidence par l'expression de CD69. Les LyT  $T_{RM}$  présenteraient non seulement un profil métabolique unique mais aussi des fonctionnalités distinctes dont la capacité à être remobilisés vers les organes lymphoïdes en cas de réponse antigénique secondaire (Beura et al., 2018; Valle-Casuso et al., 2019).

Par sa position stratégique à proximité des structures lymphoïdes secondaires et à l'interface entre tissus périphériques et sites d'activation immunitaire, le TA, site d'accumulation de LyT contribuerait non seulement à l'immunosurveillance *in situ* et plus largement aux réponses systémiques.

Enfin, l'induction d'une réponse mémoire au sein du TA va non seulement contribuer à la réponse immunitaire mais va aussi modifier le fonctionnement du TA. En effet, un remodelage de la physiologie du TA et une réorganisation des fonctions s'opèrent au décours d'une infection du tissu, en faveur de l'induction de réponses anti-infectieuses et au détriment du métabolisme lipidique (S.-J. Han et al., 2017).

Ces données renforcent la contribution du TA dans les réponses immunitaires et semblent lui attribuer un rôle immunitaire majeur. Le TA serait non seulement un acteur de cette réponse mais pourrait aussi contribuer à la protection des réponses immunitaires.

### **III. Cellules immunitaires du tissu adipeux**

Le TA inclut une composante immunitaire importante. En dehors de tout contexte pathologique, le TA est principalement décrit comme un site anti-inflammatoire, du fait de la forte proportion de cellules à phénotype immunosuppresseur telles que les macrophages de type M2 ou encore les LyT CD4 régulateurs chez la souris. Les études sur l'obésité ont révélé une forte proportion de macrophages de type M1 et LyT CD8 associés à un profil de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Plus récemment, des données de la littérature suggèrent que les LyT CD8 du TA pourraient aussi jouer un rôle anti-infectieux majeur. Le TA contribuerait ainsi à l'immunosurveillance et à la défense de l'organisme contre de multiples pathogènes. Les LyT CD8 dans le sang circulant, les organes lymphoïdes secondaires ou les tissus présentent des profils phénotypiques et fonctionnels distincts. Les échanges entre chacune de ces localisations, les capacités de migration des LyT CD8 pourraient également contribuer à l'efficacité globale des réponses T CD8.

#### **A. Caractérisation des sous-populations lymphocytaires T CD8**

##### ***1. Génération de la mémoire***

La primo-infection virale est une période critique au cours de laquelle le virus réplique, diffuse dans l'organisme et où l'infectiosité est majeure. Avec une présentation clinique polymorphe, la primo-infection est le point d'ancrage de l'apparition de la pathologie et la mise en place d'une réponse immunitaire. En effet, dans les jours qui suivent la contamination, les LyT CD8 naïfs sont activés et entrent en phase d'expansion clonale. Ils se différencient alors en LyT dit effecteurs capables de reconnaître et de lyser les cellules infectées par la sécrétion d'un jeu de protéines cytotoxiques telles que la perforine et le granzyme B. Ces LyT effecteurs, doués de propriétés de cytotoxicité immédiate, pourront donc rapidement lutter contre l'infection en participant au contrôle de la réplication virale et à la clairance du virus. Cependant, la réponse effectrice n'est que temporaire : au terme de la réponse primaire, les cellules effectrices subissent une phase de contraction, phase au cours de laquelle on observe l'apoptose de la majorité des LyT CD8. Toutefois, une faible proportion de LyT CD8 activés (5 à 10 %) va survivre, et ils constitueront la mémoire immunitaire. Ainsi, toute exposition ultérieure au même

pathogène déclenchera une réponse secondaire massive et rapide et permettra une éradication virale plus rapide que pour la primo-infection.

La mise en place et le maintien de cette mémoire immunitaire reposent sur des mécanismes de régulation très fins qui vont assurer leur efficacité protectrice. Plusieurs déterminants caractérisent la fonctionnalité d'une réponse T CD8 mémoire : leur potentiel à générer des réponses effectrices, leur capacité de sécrétion et de prolifération, mais leur profil de migration/localisation dans l'organisme en font également partie. Une étude réalisée dans différents modèles d'infections chroniques montrent même que la mémoire pourrait varier selon le type d'infection chronique (Appay et al., 2002). Les profils de différenciation des LyT dans les tissus sont probablement modulés par l'environnement cellulaire et les facteurs environnementaux tissulaires dans lesquels se situent les LyT CD8 mémoires.

### **2. Diversité de la mémoire**

Les LyT mémoires circulants sont un groupe de cellules hétérogènes qui contribuent à la diversité et à l'adaptabilité nécessaires pour assurer efficacement l'immunosurveillance de l'hôte. Leur fonctionnalité est adaptée à leur localisation et la distribution des sous-populations est directement dépendante du microenvironnement. La mise en place d'une réponse effectrice, anti-inflammatoire ou dirigée contre un antigène, se traduit par une migration vers les organes lymphoïdes secondaires et les tissus enflammés (Mackay et al., 2013). La mémoire circulante a initialement été caractérisée comme une mémoire dite effectrice ( $T_{EM}$ ) ou centrale ( $T_{CM}$ ) sur la base de l'expression de marqueurs de migration vers les ganglions lymphatiques, CCR7, CD62L (Sallusto et al., 1999). Cette dichotomie de la mémoire propose que les  $T_{EM}$  circulent entre le compartiment sanguin et les tissus non lymphoïdes et soient dédiés à une réponse effectrice rapide, et que les  $T_{CM}$  recirculent entre sang et organes lymphoïdes soient dédiés aux réponses localisées dans les tissus lymphoïdes où ils interviendraient en soutien des  $T_{EM}$  et de façon secondaire dans la réponse effectrice après une phase de prolifération rapide. Cependant, il est maintenant clairement admis que l'immunosurveillance n'est pas seulement médiée par les  $T_{CM}$  et  $T_{EM}$ , et qu'il existe d'autres sous-populations mémoires circulantes telles que les  $T_{RM}$  ou encore les  $T_{SCM}$  (cellules souches T mémoires) (Gattinoni et al., 2011; Gebhardt et al., 2009; Masopust et al., 2010). Du fait de

l'émergence de ces populations mémoires résidentes, définir les mécanismes régulant la localisation et la migration des LyT et leur impact sur la fonctionnalité des LyT CD8 est essentiel.

### **3. Caractérisation phénotypique des lymphocytes T CD8 systémiques**

#### *a. CCR7, CD62L : distinction $T_{CM}$ et $T_{EM}$*

Les travaux de Lanzavecchia et al ont introduit la notion de mémoire systémique en 1999 (Sallusto et al., 1999). Cette mémoire systémique est définie comme la présence de cellules mémoires dans différentes localisations de l'organisme à la suite d'une infection. Au sein des LyT CD8 circulants, les LyT CD8 mémoires se distinguent des LyT CD8 effecteurs par leurs fortes capacités prolifératives et leurs faibles capacités effectrices. Mais les cellules mémoires se caractérisent également par leur propension migratoire déterminée par l'expression de deux marqueurs que sont CCR7 et CD62L. CCR7 est un récepteur aux chimiokines dont la signalisation après interaction avec son ligand CCL19 favorise la migration vers les ganglions lymphatiques. CD62L est une glycoprotéine exprimée en surface des lymphocytes et dont la fonction principale est d'assurer leur adhésion à l'endothélium des ganglions lymphatiques et favoriser leur migration vers ces organes lymphoïdes secondaires.

#### *b. Caractéristiques phénotypiques de la mémoire*

En s'appuyant sur ces deux marqueurs mais également sur l'expression de CD45RA, exprimé sur les lymphocytes et en particulier les LyT naïfs, deux sous-populations mémoires circulantes se distinguent :  $CD45RA^-CCR7^+CD62L^+$  et  $CD45RA^-CCR7^-CD62L^{low}$  leur conférant ainsi des profils migratoires distincts. Deux sous-populations mémoires de LyT CD8 sont ainsi révélées : les  $T_{CM}$  et les  $T_{EM}$ . Les  $T_{CM}$  expriment les marqueurs CCR7 et CD62L, sont essentiellement présents dans les organes lymphoïdes secondaires, sont dénués de propriétés effectrices mais possèdent une forte capacité d'auto-renouvellement. Les  $T_{EM}$  n'expriment pas CCR7 en surface, sont essentiellement circulants ou présents dans les tissus périphériques et sont dotés de fonctions effectrices immédiates (Masopust et al., 2001).

### *c. Plusieurs modèles de différenciation de la mémoire $T_{CM}/T_{EM}$*

L'intérêt de cette distinction  $T_{CM}/T_{EM}$  a fait l'objet de plusieurs études dont certaines s'accordent à dire que les  $T_{EM}$  interviendraient dans la mémoire précoce du fait de leur localisation diffuse alors que les  $T_{CM}$  seraient impliqués dans la mémoire tardive. Toutefois, la mise en place de la mémoire et le modèle de différenciation entre ces sous-populations mémoires ne fait pas consensus. Un premier modèle propose une relation de différenciation linéaire ( $T_{Naïf} \rightarrow$  effecteur  $\rightarrow T_{EM} \rightarrow T_{CM}$ ) où la mémoire se met en place après la contraction des cellules effectrices et où les  $T_{CM}$  sont le stade de différenciation mémoire ultime (Opferman et al., 1999; Wherry et al., 2003). Un deuxième modèle, un modèle de différenciation divergente, propose que l'équilibre entre les cellules effectrices et les cellules mémoires soit régulé par l'intensité de la stimulation antigénique. La différenciation en cellules effectrices serait directement liée à l'augmentation du stimulus antigénique. A l'inverse, la mise en place de la mémoire n'apparaît qu'en conditions de charge antigénique limitée (Ahmed & Gray, 1996). Enfin un troisième modèle est aussi retrouvé, celui d'une différenciation linéaire inverse dans laquelle les cellules effectrices proviennent de la différenciation de cellules mémoires et en particulier des cellules mémoires centrales (Champagne et al., 2001; Sallusto et al., 1999).

Quel que soit le modèle invoqué, la mise en place de la mémoire et la différenciation des sous-populations mémoires est non seulement dépendante de la pression inflammatoire du milieu mais aussi de la localisation de la réponse lymphocytaire. Ainsi, une stimulation antigénique forte associée à un environnement pro-inflammatoire impacte négativement la différenciation lymphocytaire en cellules mémoires ce qui renforce la nécessité de l'éradication complète d'un pathogène pour établir une mémoire optimale (Stelekati et al., 2014). Enfin, dans la distinction  $T_{CM}/T_{EM}$ , une considération importante à prendre en compte est la localisation de la réponse puisqu'une mémoire protectrice serait médiée par les  $T_{EM}$  qui migrent vers les tissus périphériques enflammés tandis que la mémoire réactive des organes lymphoïdes secondaires serait médiée par les  $T_{CM}$  (Sallusto et al., 2004).

### *d. Déterminants de l'efficacité de la mémoire*

La véritable discrimination fonctionnelle entre les  $T_{CM}$  et les  $T_{EM}$  ne tient pas tant dans les fonctions effectrices (activité cytolytique), ou dans la capacité de production d'IFN- $\gamma$  ou de TNF- $\alpha$ , mais s'établit surtout sur la capacité à produire de l'IL-2 (Wherry et al., 2003). De manière plus générale, c'est la polyfonctionnalité de chaque sous-population mémoire qui permet un

contrôle optimal de la réplication virale. En effet, il existe une gradation dans la nature de l'activité cytolytique d'un LyT CD8 selon le nombre de cytokines sécrétées (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) (Lelic et al., 2012). Face à un second challenge antigénique, cette propriété des T<sub>CM</sub> à produire de l'IL-2 en plus grande quantité que les T<sub>EM</sub>, leur permet un engagement massif et rapide dans une voie de différenciation à l'origine de la formation de cellules effectrices. Les T<sub>CM</sub> sont à l'origine d'un meilleur contrôle de l'infection, permettent un contrôle plus efficace de la réplication virale de manière localisée mais également de la virémie de l'organisme entier. En parallèle, la part des T<sub>EM</sub> dans le contrôle d'une infection virale n'est pas à mettre de côté. Fort de leurs capacités effectrices, les T<sub>EM</sub> sont aussi de véritables médiateurs de la protection de tissus non lymphoïdes, à la différence des T<sub>CM</sub> dont l'action est limitée aux ganglions lymphatiques (Bachmann et al., 2005). Il est probable que la qualité de la réponse mémoire repose sur la présence combinée de fractions T<sub>CM</sub> et T<sub>EM</sub>. Une fois encore, la polyfonctionnalité qui naît de cette diversité est sans doute un atout pour assurer une défense efficace contre les pathogènes.

#### **4. Caractérisation phénotypique des lymphocytes T CD8 tissulaires : CD69**

L'immunosurveillance a longtemps été décrite uniquement pour les organes lymphoïdes secondaires, médiée par les cellules T mémoires et en particulier par les T<sub>CM</sub>. Des études récentes sont venues compléter cette immunosurveillance aux tissus non lymphoïdes en décrivant les T<sub>RM</sub>.

##### *a. Lymphocytes T mémoires résidents*

Les T<sub>RM</sub> sont une sous-population de LyT mémoires, qui résident dans les tissus périphériques non lymphoïdes comme les épithéliums cutanés, intestinaux ou encore les poumons (Gebhardt et al., 2009; Masopust et al., 2010; Piet et al., 2011). Par leur position stratégique, au niveau de sites privilégiés d'infections, les T<sub>RM</sub> confèrent une immunité protectrice *in situ* rapide et efficace permettant d'exercer un contrôle efficace de la réplication du pathogène et d'établir une protection anti-infectieuse robuste (Gebhardt et al., 2009). Les T<sub>RM</sub> sont probablement dérivés du même précurseur naïf que la mémoire circulante (Gaide et al., 2015). Cependant, leur profil d'expression génique unique montre qu'ils sont une lignée indépendante (Mackay et al., 2013).

L'identification des  $T_{RM}$  repose principalement sur deux grandes caractéristiques : 1/ une absence d'expression de molécules de sortie du tissu et de migration vers les ganglions lymphatiques (tels que CCR7, CD62L), 2/ une expression de molécules de résidence : CD69, CD103 ou encore CD49a, récepteur de liaison au collagène (Cheuk et al., 2017; Mackay et al., 2015; Masopust et al., 2006). Dans le modèle murin, d'autres marqueurs sont décrits et seraient essentiels à l'acquisition de la résidence tissulaire (Blimp1, Hobit) (Mackay et al., 2016). Le marqueur le plus étudié dans la caractérisation des  $T_{RM}$  est le CD69. La plupart des  $T_{RM}$  expriment CD69 de manière constitutive mais le rôle de CD69 dans la détermination de la résidence tissulaire reste incertain. En effet, une expression transitoire de CD69 est aussi décrite selon le tissu étudié et peut être suffisante pour la génération de  $T_{RM}$  (Steinert et al., 2015). Par ailleurs, une recirculation des  $T_{RM}$  exprimant CD69 a été démontrée (Beura et al., 2018; Park et al., 2016). La caractérisation phénotypique des  $T_{RM}$  varie selon les études et semble dépendre non seulement de signaux spécifiques au pathogène mais aussi du tissu étudié.

La présence de  $T_{RM}$  a été identifiée au sein de réservoirs viraux dans plusieurs modèles d'infection persistante telles que le CMV ou encore le VIH (Buggert et al., 2018; Kiniry et al., 2018; C. J. Smith et al., 2015). Le nombre de  $T_{RM}$  détectés *in situ* est inversement corrélée avec la charge virale plasmatique ce qui renforce l'intérêt pour les  $T_{RM}$ . A contrario, une charge virale élevée semble entraver la génération *de novo* de  $T_{RM}$  (Kiniry et al., 2018). Ceci suggère qu'une diminution significative de la charge virale plasmatique doit se produire en primo-infection afin de permettre la mise en place de  $T_{RM}$  efficaces. Les mécanismes mis en jeu par les  $T_{RM}$  pour le contrôle de la réplication virale sont multiples. Dans les modèles murins, face à une réinfection virale, les  $T_{RM}$  ont la capacité de produire de grandes quantités d'IFN- $\gamma$ , interféron essentiel au contrôle de l'infection et à la survie des animaux (McMaster et al., 2015). Chez l'Homme, la réactivation des  $T_{RM}$  conduit aussi à la production d'IFN- $\gamma$ , mais conduit également à la dégranulation des granules cytolytiques (granzyme B et perforine) (Cheuk et al., 2017; Jozwik et al., 2015). Quel que soit le modèle d'étude, la polyfonctionnalité des  $T_{RM}$  contribue à leur conférer un rôle clé dans l'éradication *in situ* d'un pathogène infectant un tissu périphérique non lymphoïde.

### *b. Particularités des LyT du TA*

La caractérisation phénotypique des  $T_{RM}$  présents dans le TA est sensiblement identique à celle des autres sites, avec une expression de marqueurs de surface tel que CD69, généralement

## Introduction

---

considérés comme marqueur de résidence. Toutefois, le TA présente certaines caractéristiques très spécifiques ce qui confère aux LyT *in situ* un profil phénotypique et métabolique distinct du fait du contexte métabolique local. Nous nous concentrerons ici sur deux caractéristiques phénotypiques des LyT du TA.

- CD69, de l'activation à la résidence

Le CD69 est protéine transmembranaire appartenant à la famille des lectines de type C. L'étude de CD69 dans le compartiment circulant a tout d'abord associé ce marqueur au phénomène d'activation lymphocytaire puisqu'il est précocement induit lors de l'activation très précoce des LyT (Ziegler et al., 1994). Mais, quand il vise à caractériser des LyT tissulaires, il est également intéressant de noter que CD69 est un antagoniste du récepteur de la sphingosine-1-phosphate, S1P (S1PR1), récepteur en charge de la rétention des LyT dans les organes lymphoïdes secondaires. De ce fait, l'expression de CD69 favorise la rétention au sein des tissus périphériques, et dans ce cas l'expression de CD69 est constitutive (Sathaliyawala et al., 2013). CD69 est fortement exprimé par les LyT du TA qui affichent des proportions de cellules exprimant CD69 supérieures par rapport à celles du sang y compris dans des modèles d'infection chronique au VIH/SIV (Couturier et al., 2015; Damouche et al., 2017). L'expression de CD69 sur les cellules T mémoires du TA est classiquement associée à une double-lecture : notion d'activation et/ou de résidence. La vision d'une résidence liée à l'expression de CD69 est désormais plus contrastée. Alors que CD69 est exprimé sur la plupart des  $T_{RM}$ , l'absence d'expression de CD69 sur les  $T_{RM}$  n'est pas corrélée à une diminution de l'infiltration T CD8. Exprimer CD69 n'est donc pas une exigence absolue mais un facteur facilitant la résidence au même titre que l'expression de CD103 (Mackay et al., 2013). À l'heure actuelle, il existe peu d'études sur l'impact de l'expression de CD69 sur la fonctionnalité des LyT CD4 et T CD8, ni même sur l'impact métabolique ou encore sur la dynamique des LyT *in situ*, bien que CD69 soit aussi présenté comme un régulateur métabolique (Cibrián & Sánchez-Madrid, 2017).

- PD1, de l'activation à l'épuisement lymphocytaire et marqueur du réservoir viral

Le PD-1 est une protéine membranaire de la superfamille des immunoglobulines. L'expression de PD-1 sur les LyT est induite par la stimulation du TCR et certaines cytokines telles que l'IL-2, les IFN de type I (Terawaki et al., 2011). L'expression de PD-1 est spécifiquement régulée à la hausse et de façon transitoire au cours de l'activation lymphocytaire ou au cours d'une

infection résolutive. Dans le contexte d'une infection persistante, l'expression de PD-1 est maintenue, associée à une charge antigénique élevée et prolongée, et est responsable d'un phénomène d'épuisement lymphocytaire (Barber et al., 2006; Blackburn et al., 2009). Cet épuisement des LyT CD8 conduit à des fonctions effectrices réduites, y compris une capacité altérée à produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (Shin & Wherry, 2007). Au sein des tissus, une expression de PD-1 sur les LyT est également retrouvée avec une expression sur les T<sub>RM</sub> dans plusieurs tissus comme le foie, les poumons et le TA (Hombrink et al., 2016; Pallett et al., 2017; Damouche et al., 2017). Cette expression de PD-1 sur les T<sub>RM</sub> est directement corrélée à une diminution des fonctions T CD8 (Kao et al., 2011). Plusieurs études menées sur le TA et réalisées dans le contexte d'infections virales chroniques ont montré une expression élevée de PD-1 sur les LyT infiltrant le TA. Cette expression tissulaire de PD-1 est supérieure aux niveaux exprimés dans le compartiment sanguin, suggérant que les LyT du TA seraient potentiellement plus susceptibles à l'activation des voies d'épuisement du fait de leur localisation dans un environnement adipeux. Dans le contexte de l'infection par le VIH, une expression élevée de PD-1 est particulièrement intéressante à relever du fait des altérations immunitaires persistantes mais aussi en tant que marqueur des cellules réservoirs infectées par le VIH (Fromentin et al., 2016).

### **B. Importance de la migration dans la définition de la mémoire**

L'importance de la migration lymphocytaire a fait l'objet de nombreuses études récentes en lien avec la notion de chronicité (Gerlach et al., 2016; Surmi & Hasty, 2010). En effet, le modèle de Lanzavecchia et al est construit sur un modèle d'infection aiguë, avec élimination du pathogène. Dans les contextes de persistance virale notamment, il semble nécessaire de réévaluer la définition des réponses T CD8 en intégrant les notions de chronicité. De manière intéressante, les profils de différenciation proposés pour caractériser les réponses LyT dans les contextes d'infection chronique reposent largement sur l'utilisation de marqueurs associés à la migration des LyT. Parmi les récepteurs aux chimiokines étudiés on retrouve CXCR3, CXCR5 et CX3CR1 (Böttcher et al., 2015; Chu et al., 2016; Gerlach et al., 2016; He et al., 2016). Dans les modèles murins, ces récepteurs définissent une sous-population de LyT CD8 mémoires spécifiques et dont la présence est directement à relier à la présence de l'antigène de façon chronique. Ces sous-populations mémoires sont présentées comme cruciales pour le contrôle

## **Introduction**

---

de l'infection puisqu'elles maintiennent une réponse effectrice robuste. Ces études viennent donc montrer une relation directe entre la migration lymphocytaire et un contrôle viral efficace. Définir les cellules mémoires T CD8 par des récepteurs aux chimiokines semble être particulièrement pertinent dans le contexte de l'infection par le VIH. En effet, l'infection chronique par le VIH est associée à une persistance virale dans les réservoirs tissulaires, lymphoïdes et non lymphoïdes. D'autre part, l'expression de ces récepteurs, et en particulier de CX3CR1, et/ou de leurs ligands est modifiée dans le contexte de l'infection par le VIH (Combadière et al., 2003; Mudd et al., 2016). L'expression de CXCR3 participe au phénomène de migration vers les sites lymphoïdes et inflammatoires comme la muqueuse intestinale (Loiseau et al., 2019). Un autre point important concerne un des ligands de CXCR3, CXCL10 également connu sous le nom d'IP10, dont l'expression est modulée au cours de l'infection par le VIH, et dont les taux plasmatiques sont inversement corrélés à la progression de la maladie (Noel et al., 2014; Yin et al., 2019). L'expression de CXCR5 permet aux LyT d'atteindre les follicules des LyB, dont le processus est surtout détaillé pour les LyT CD4. Bien que la plupart des LyT CD8 n'atteignent pas ces follicules, une fraction de LyT CD8 CXCR5+ joue un rôle crucial dans le contrôle de la réplication virale et est associée à une réplication virale limitée dans le contexte de l'infection par le VIH (He et al., 2016, p. 5; Leong et al., 2016; Perdomo-Celis et al., 2018).

### *a. CXCR3*

CXCR3, récepteur des chimiokines inflammatoires CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP10) et CXCL11 (ITAC), est préférentiellement exprimé sur les LyT CD8 activés et les lymphocytes Th1 (Loetscher et al., 1996; Luster et al., 1985). L'expression de CXCL10, de CXCL9 et CXCL11 est notamment induite par l'IFN- $\gamma$  (Griffith et al., 2014). De ce fait, CXCR3 favorise la migration des LyT vers les tissus lymphoïdes et les tissus non lymphoïdes inflammés (Xie et al., 2003). CXCR3 serait également impliqué dans la différenciation lymphocytaire puisque dans un modèle de souris knock-out pour le récepteur ou le ligand, les LyT CD8 ont présenté des capacités prolifératives et cytotoxiques réduites (Dufour et al., 2002). Les travaux de Mackay et al ont montré que la signalisation des récepteurs de chimiokines était nécessaire pour la migration des LyT CD8 effecteurs dans l'épiderme dans un modèle murin d'infection cutanée par le HSV (Mackay et al., 2013). Mais CXCR3 régule également le développement des LyT CD8 mémoires. Il en devient même parfois proposé comme marqueur fiable des réponses T mémoires car les

réponses secondaires sont largement limitées aux cellules CXCR3<sup>+</sup> et le niveau d'expression de CXCR3 directement associé aux capacités fonctionnelles des LyT CD8 mémoires (Hikono et al., 2007). C'est dans le contexte que les travaux de Chu et al, dans un modèle murin d'infection persistante à *Toxoplasma gondi*, ont proposé une relecture de caractérisation phénotypique des réponses T CD8 sur l'expression uniquement de CXCR3 (Chu et al., 2016). Ils distinguent trois sous-populations de LyT CD8 dites mémoires, intermédiaires et effectrices. Cette étude vient apporter une proposition de dynamique de différenciation cellulaire en cas de réponse secondaire. Les cellules mémoires intermédiaires sont présentées comme cruciales pour le contrôle de la réplication virale puisqu'elles permettent une production rapide de cellules effectrices tout en maintenant un sous-ensemble mémoire stable. Le rôle de la signalisation CXCR3 est donc essentiel au développement des réponses T CD8 et la différenciation nécessaire à l'équilibre entre cellules mémoires et effectrices.

### b. CX3CR1

CX3CR1, récepteur de la chimiokine CX3CL1 ou fractalkine, est exprimé sur les LyT CD4 et T CD8 ainsi que les cellules NK et la lignée monocyttaire (Combadiere et al., 1998; Imai et al., 1997). L'expression de CX3CL1 sur les cellules endothéliales est régulée par deux cytokines pro-inflammatoires : l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (Fratelli et al., 2001). La signalisation CX3CL1/CX3CR1 participe ainsi à la migration des LyT vers les tissus inflammatoires.

Mais plus récemment, CX3CR1 a également été reconnu comme marqueur de différenciation lymphocytaire puisque les LyT CD8 qui expriment ce marqueur présentent des capacités cytotoxiques importantes et ces cellules participent au contrôle d'une infection virale (Böttcher et al., 2015; Gerlach et al., 2016). Mais les travaux de Gerlach et Böttcher ont également permis de caractériser une sous-population de LyT CD8 mémoires avec une fonction effectrice cytotoxique directe générée en réponse à des infections virales ou bactériennes. Enfin, la signalisation CX3CL1/CX3CR1 est susceptible de jouer un rôle important dans l'infiltration préférentielle des LyT CD8 dans le TA en conditions d'obésité, puisque la production de CX3CL1 est augmentée dans le TA de patients obèses. Un processus équivalent pourrait être envisager dans un contexte d'infection chronique avec signaux inflammatoires *in situ*.

Ces nouvelles caractérisations basées sur de nouveaux récepteurs aux chimiokines, et intégrant la composant inflammatoire ainsi qu'une compartimentation plus large des réponses T CD8 peut être importante. Ainsi, la caractérisation des LyT CD8 classiquement définies sur le

## ***Introduction***

---

potentiel cytotoxique, prolifératif et sécrétoire semble devoir intégrer leur potentiel migratoire. Ces données renforcent l'idée que l'immunosurveillance serait médiée non seulement par des cellules circulantes et des cellules résidentes, mais implique également un recrutement lymphocytaire dynamique aux sites d'inflammation ou de persistance virale de façon chronique.

## **IV. Hypothèses et objectifs**

Dans le contexte de l'infection chronique par le VIH, les traitements ARV ne permettent pas l'élimination totale du virus puisque malgré un traitement ARV bien conduit, le virus persiste au sein de réservoirs tissulaires parmi lesquels on retrouve le TA. Or, la problématique de la persistance virale reste cruciale car elle contribue au maintien d'une inflammation chronique résiduelle et à la perte d'efficacité des réponses immunitaires. Malgré tout, le système immunitaire n'est pas totalement inopérant puisque des réponses T CD8 spécifiques se mettent en place et permettent un contrôle de l'infection dans le compartiment sanguin. Et parfois même les réponses T CD8 peuvent assurer le contrôle de l'infection, et cela sans traitement ARV, c'est le cas des patients « HIV Controllers ».

Dans le contexte de la persistance virale tissulaire, nous pensons :

- à une moindre efficacité des réponses T CD8 du fait de leur localisation tissulaire, et en particulier au sein du TA ;
- et à une efficacité des réponses T CD8 qui reposerait sur une dualité fonctionnelle incluant capacités de migration jusqu'aux tissus et efficacité des réponses *in situ*, aux sites de persistance virale.

Ce travail de recherche comprend une double approche :

(i) **une approche systémique**

Nous avons tout d'abord souhaité caractériser les LyT CD8 circulants en intégrant la notion de persistance virale, ce qui sur la base de la littérature donnait plus d'importance à leur potentiel de migration. Pour cela nous avons étudié l'expression de différents récepteurs aux chimiokines, CXCR3, CXCR5 et CX3CR1. Ce travail a été mené dans le contexte de l'infection chronique par le VIH, dans différents modèles de contrôle de la réplication virale, qu'il soit obtenu par ARV ou de façon spontanée chez les patients HIV Controllers.

(ii) **une approche tissulaire : le TA**

Nous avons ensuite souhaité caractériser les LyT CD8 du TA. De nouvelles données suggèrent un rôle anti-infectieux des LyT du TA, confortant l'intérêt d'évaluer les réponses LyT CD8 du TA. Pour cela, nous avons pu réaliser une caractérisation de ces réponses dans deux contextes

## **Introduction**

---

infectieux différents : le contexte de l'infection chronique par le VIH/SIV et le contexte de l'infection aiguë par le SARS-CoV-2.

### *Contexte de l'infection chronique par le VIH/SIV*

Le TA est non seulement la cible conjointe du VIH et des traitements ARV mais il est aujourd'hui également reconnu comme un site réservoir viral du VIH. Ce deuxième axe a été mené à la fois dans un modèle macaque et humain. Nous faisons l'hypothèse que, dans le contexte d'une infection chronique, les réponses T CD8 du TA seraient moins efficaces du fait de leur localisation dans ce tissu. Dans ce travail, nous avons évalué l'impact de l'infection et du traitement ARV sur les caractéristiques phénotypiques, fonctionnelles et métaboliques des LyT CD8 du TA.

### *Contexte de l'infection résolutive par le SARS-CoV-2*

Compte tenu de la susceptibilité accrue à l'infection SARS-COV-2 et aux formes sévères de COVID-19 chez les patients obèses, nous avons pu ouvrir notre thématique de recherche au SARS-CoV-2, et ainsi caractériser les réponses T CD8 du TA au cours de cette infection aiguë et résolutive.

# ***MATERIELS & METHODES***

---



L'originalité de ce travail de thèse est enrichie par la diversité des modèles étudiés. Ceci permet d'ajouter à la caractérisation des modèles, une possible comparaison des différents contextes infectieux. J'aborderai dans un premier temps les différents matériels biologiques utilisés au cours de l'étude et puis je développerai les méthodes.

### I. Matériels biologiques

Plusieurs compartiments ont été étudiés dans les différents travaux menés. Le premier travail visait à étudier l'expression des récepteurs aux chimiokines sur les LyT CD8 circulants au cours de l'infection chronique par le VIH et a donc été réalisé sur des prélèvements sanguins de PVVIH et leur contrôle non infecté. Nous nous sommes ensuite focalisés sur la caractérisation des LyT CD8 du TA. Pour cela, nous avons pu accéder à des prélèvements de TA simiens dans les contextes d'infection au SIV mais aussi d'infection à SARS-CoV-2, et des prélèvements humains de PVVIH et de patients non infectés. Si nous avons eu la possibilité d'étendre nos travaux à des prélèvements humains dans le contexte de l'infection par le VIH, cela n'a malheureusement pas été possible dans le contexte de l'infection par le SARS-CoV-2. L'obtention de ces prélèvements est un préalable à nos études et voici quelques informations complémentaires les concernant.

#### A. Prélèvements sanguins chez l'Homme

##### 1. *Patients infectés de façon chronique par le VIH*

Le travail a été réalisé sur 2 cohortes de PVVIH et un groupe contrôle de sujets séronégatifs pour le VIH.

###### *a. Patients HIV Controllers*

Les patients HIV Controllers, « HIC » sont des PVVIH, contrôlant spontanément et durablement la réplication virale plasmatique en l'absence de traitement ARV. Ils sont issus de la cohorte ANRS Co-21 CODEX (270 patients), et sont inclus selon les critères suivants :

- une infection par le VIH connue depuis plus de 5 ans,
- les 5 dernières charges virales inférieures à 400 copies/mL
- en l'absence de traitement ARV.

## **Matériels & Méthodes**

---

Les patients coinfectés par les virus des hépatites B ou C sont exclus de l'étude.

Notre laboratoire a obtenu un accès à la biobanque de cette cohorte après présentation du projet de recherche au conseil scientifique de la cohorte. Une richesse du travail sur prélèvements de cohortes est de bénéficier des informations cliniques, biologiques, virologiques et pharmacologiques des patients au moment du prélèvement, mais aussi d'accéder à l'historique de ces données. L'équipe est sensibilisée aux atouts du travail sur prélèvements de cohortes puisque le suivi immunologique de ces patients est réalisé sur le site de Bicêtre, à l'inclusion et annuellement.

### *b. Patients traités et contrôlés au long cours*

Les patients « ART » sont infectés par le VIH-1, contrôlent durablement depuis au moins 5 années leur réplication virale sous traitement ARV et traités dès la primo-infection. Ils sont issus de la cohorte ANRS Co-6 PRIMO. Pour notre étude, nous n'avons sélectionné que les patients inclus dans le module immunologique de la cohorte, patients pour lesquels le site de Bicêtre assure le suivi immunologique depuis la primo-infection. Les critères d'inclusion sont les suivants :

- une infection par le VIH diagnostiquée depuis plus de 5 ans,
- un traitement ARV débuté depuis plus de 4 ans,
- un compte de LyT CD4 supérieur à 500/mm<sup>3</sup> au dernier prélèvement,
- une charge virale indétectable depuis plus de 2 ans (Blip de réplication virale <400 copies/mL tolérés).

Les patients coinfectés par les virus des hépatites B ou C sont exclus de la cohorte.

### **2. Sujets séronégatifs pour le VIH, groupe contrôle**

Les prélèvements des sujets séronégatifs pour le VIH sont issus de la banque de sang de l'Etablissement Français du Sang du site de la Pitié-Salpêtrière. Les sujets de ce groupe contrôle seront appariés sur l'âge et le genre des sujets infectés (appariement par fréquence).

### **3. Autorisation de la recherche et déclaration d'éthique**

Tous les patients et sujets de l'étude ont donné leur consentement écrit et éclairé à la participation à l'étude. Les cohortes ANRS Co-21 CODEX et ANRS Co-6 PRIMO ont été approuvées par le comité local de protection des personnes (références d'approbation 12-021 et 1157 respectivement). Enfin, l'étude a été menée conformément aux principes de la Déclaration d'Helsinki.

## **B. Prélèvements de tissu adipeux**

Les études de caractérisation des LyT du TA reposent sur des prélèvements de primates mais également sur des prélèvements de patients. Les atouts de ces deux modèles sont détaillés dans cette section.

### **1. Modèle primate**

Le modèle est pertinent pour l'étude sur le TA puisqu'il présente des similarités avec le TA humain. Le modèle macaque présente le grand avantage de pouvoir maîtriser l'historique métabolique et infectieux et d'avoir accès à des prélèvements en dehors de tout autre contexte pathologique que celui du SIV ou de l'infection à SARS-CoV-2. L'accès aux prélèvements est moins restreint que chez l'Homme et nous avons pu avoir accès simultanément à plusieurs tissus : prélèvements sanguins, TASC, TAV et ganglions de proximité. Enfin, ces modèles permettent de contrôler les caractéristiques de l'infection (souche virale, dose, voie d'infection, et combinaison thérapeutique).

#### *a. Modèle d'infection par le SIV*

La complexité du virus du VIH et l'existence de réservoirs viraux tissulaires rendent le modèle animal indispensable. La souris par exemple ne peut pas être infectée par le virus du VIH, seuls les modèles de souris humanisées, génétiquement modifiées, permettent de reconstituer en partie un système immunitaire humain. Toutefois ces modèles restent encore imparfaits et les données doivent être interprétées avec prudence.

Dans l'infection par le VIH, le modèle de primates non humains (PNH) reste le modèle de choix. Ceci s'explique par un génome partagé à près de 98% avec le génome humain. L'infection par

## **Matériels & Méthodes**

---

la souche SIVmac251 des macaques cynomolgus permet de mimer l'infection humaine d'un point de vue virologique, métabolique et pharmacologique et de reproduire une infection chronique lente, proche de celle observée chez les PVVIH traitées.

Il existe différents modèles primates. Le modèle cynomolgus est le plus fréquemment utilisé dans les études de la physiopathologie de l'infection par le VIH/SIV dans le service de primatologie de l'IDMIT au CEA de Fontenay aux Roses. Ce modèle a pour avantage d'être un hôte non naturel du SIV. De ce fait, l'infection par le SIV va se traduire par le développement de la maladie avec une charge virale élevée, une déplétion T CD4, une chronicisation de l'infection et encore le développement de maladies opportunistes (Simon et al., 1994). Ce modèle est donc tout à fait adapté à notre étude et nous a permis d'obtenir des résultats transposables à l'infection observée chez l'Homme. Les animaux sont tous originaires de centres d'élevage certifiés à l'île Maurice. Cette provenance se distingue par une faible diversité haplotypique du fait d'une colonie à souche unique, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux par étude. Enfin, nous avons eu accès à un modèle d'infection contrôlée par une trithérapie ARV : DTG/TDF/FTC, trithérapie pour laquelle les données virologiques ont confirmé son efficacité. Le service de primatologie de l'IDMIT au CEA de Fontenay aux Roses a développé une expertise et le savoir-faire pour la mise en place de l'infection, du traitement et des suivis immunologique, virologique et pharmacologique de cette infection.

L'étude a été principalement menée dans un modèle de macaques infectés par le SIV (souche SIVmac251) traités ou non par trithérapie ARV. Ces animaux étaient engagés dans différents programmes de recherche du centre (programme SIVART et pVISCANTI. Les investigateurs principaux de ces cohortes ont donné leur accord pour la mise en place de prélèvements supplémentaires de TA lors de l'euthanasie de ces animaux. Pour ces études, des animaux mâles (afin de s'affranchir de l'imprégnation hormonale), adultes (âgés entre 5 à 8 ans) et non obèses ont été sélectionnés. Les animaux ont été infectés par le SIV (1000 AID50 de SIVmac251) par voie intraveineuse. Concernant les animaux infectés traités, les animaux ont été traités par voie sous-cutanée avec un début de traitement soit à la semaine 4 ou 24 post-infection par une trithérapie composée de FTC, 50 mg/kg / TDF, 20 mg/kg/ DTG, 20 mg/kg pendant au moins 12 mois. Un deuxième groupe a été infecté et non traité. Enfin un groupe d'animaux non infectés a été également inclu comme contrôle. Les animaux ont finalement été sédatisés avec de la tilétamine et du zolazépam puis sacrifiés par une injection létale de pentobarbital.

Une autopsie a été réalisée, les échantillons de sang, de TASC et de TAV ont été prélevés pour notre étude.

### *b. Modèle d'infection par le SARS-CoV-2*

L'étude a été principalement menée dans un modèle de macaques infectés par le SARS-CoV-2, souche primaire isolée (souche : BetaCoV/France/IDF/0372/2020) et qui développent une infection modérée à SARS-CoV-2. Il s'agit de macaques femelles non obèses. L'infection a été provoquée simultanément par les voies intranasale et intratrachéale. Nous avons eu accès aux données cliniques et biologiques depuis l'infection jusqu'au sacrifice à J7. Au cours de l'étude, des prélèvements nasopharyngés et trachéaux ont été réalisés quotidiennement ; les fluides bronchoalvéolaires ont été prélevés aux J3 et J6 ; et les fluides rectaux ont été prélevés aux J0, J2, J5 et J7. Enfin, tous les animaux ont été sédatés puis sacrifiés par le même protocole que décrit précédemment. Une autopsie a été réalisée, les échantillons de TASC, TAV et TAE ont été prélevés pour notre étude.

### *c. Accessibilité du tissu adipeux dans les modèles simiens*

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons pu accéder à un échantillonnage de TA de plusieurs cohortes primates, qu'il s'agisse d'animaux infectés (SIV ou SARS-CoV-2) ou de groupes contrôles (non infectés, obèses ou non). Toutefois, quelle que soit la cohorte concernée dans le travail présenté ici, aucune n'a été dédiée à l'étude du TA uniquement. Les modèles animaux étant des modèles rares et précieux, les échantillonnages en cours d'étude et à l'euthanasie sont optimisés de manière à répondre non seulement à l'objectif de l'étude principale mais peuvent également bénéficier aux travaux en cours d'équipes collaboratrices. De ce fait, nous avons pu accéder à l'échantillonnage de nombreuses études pour lesquelles l'euthanasie était programmée sur la période des travaux.

Dans ce contexte, nous avons pu accéder aux données de suivi clinique et biologique : dosages immunologique, virologique, pharmacologique, préalablement définies selon le programme de recherche et dont le contenu du suivi et la fréquence ne sont pas modifiables en cours d'étude. Parmi les prélèvements d'intérêt en cours d'étude, de façon longitudinale, nous avons pu accéder au sang total uniquement. Les prélèvements tissulaires (dont ceux de TA) restent trop invasifs et génèrent des réactions inflammatoires qui peuvent interférer avec le bon

déroulement de l'étude. De ce fait, tous les tissus n'ont été accessibles qu'à l'euthanasie des animaux. Ainsi à l'euthanasie, selon l'étude, nous avons pu accéder à des prélèvements de sang total et de TA (TASC, TAV, TAE). Mais nous avons également eu accès pour les études SIV à des prélèvements de ganglions lymphatiques (axillaires, inguinaux, mésentériques), intestins et colon, rate, ou encore de moelle osseuse. Tous les échantillons ont été pris en charge et dissociés extemporanément pour une analyse sur prélèvement frais ou bien à visée de constitution ou d'implémentation dans une bibliothèque après cryoconservation.

### *d. Autorisation de la recherche et déclaration d'éthique*

Les animaux sont issus de centres d'élevage certifiés sur l'île Maurice. A leur arrivée au service de primatologie de l'IDMIT, ils ont tous été hébergés selon les normes de sécurité en vigueur et respectant le confinement de niveau 2 ou 3 lorsque nécessaire (CEA, Fontenay-aux-Roses, France) (référence autorisation animalerie : D92-032-02, Préfecture des Hauts de Seine, France). Les animaux ont été manipulés conformément à la directive européenne 2010/63/UE, à la réglementation française et aux normes de conformité pour les soins humains et l'utilisation des animaux de laboratoire de l'Office for Laboratory Animal Welfare (OLAW, numéro d'assurance #A5826-01). Les protocoles ont été approuvés par le Comité d'Ethique Animale du CEA "Comité d'Ethique en Expérimentation Animale du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives" (CEtEA #44) (numéro de déclaration A15\_035). L'étude a été autorisée par le "Ministère de la Recherche, de l'Innovation et de l'Education" sous le numéro d'enregistrement APAFIS#2453-2015102713323361 v2 pour l'étude SIV et APAFIS#24434-2020030216532863v1 pour l'étude SARS-CoV-2.

## **2. Modèle humain**

### *a. Modèle d'infection à VIH*

Si les données chez le macaque sont un premier élément, il est important de compléter ces données chez l'Homme dans un contexte d'environnement infectieux et métabolique plus divers. La comparaison entre PVVIH et sujets non infectés est une difficulté technique. L'hétérogénéité des paramètres tels que l'âge, le genre, le contexte infectieux et métabolique, la durée d'infection, la combinaison d'ARV et l'observance a rendu jusqu'ici difficile la comparaison de deux groupes homogènes. La collecte de TA n'est d'ailleurs pas proposée dans

le contexte des cohortes ANRS et PRIMO, et il n'a donc pas été possible de comparer les TA de ces deux groupes de patients. Néanmoins, l'accès aux prélèvements sanguins permet de compléter certains aspects de nos études. Concernant la caractérisation des LyT CD8, nous avons travaillé chez le macaque principalement sur LyT CD8 totaux, sans intégrer d'étude de spécificité. Une information importante est néanmoins de confirmer la présence de LyT spécifiques du VIH dans le TA des patients, chez lesquels les stimulations d'origine infectieuse et métabolique (probablement plus marquées que dans le modèle macaque) pourraient induire une compétition pour des LyT de spécificités multiples. Les outils de détection des LyT spécifiques du VIH sont aussi plus vastes pour l'étude du répertoire humain comparativement à celui du macaque. Dans ce contexte, nous avons développé des collaborations avec différents services de chirurgie de l'institut Mutualiste Montsouris (Dr G. Pourcher) et Service de chirurgie de l'Hôpital Bicêtre (Pr S. Benoist) et ainsi eu l'opportunité d'accéder à des prélèvements de TA humain de PVVIH, de sujets non obèses et obèses. Les critères d'exclusion sont les patients atteints de pathologies cancéreuses, d'inflammation sévère, de pathologies métaboliques sévères. Le choix qui a été fait était de générer une biobanque de TA conséquente, qui pouvait inclure homme et femme, d'âge varié (nous n'avons fixé aucun critère d'âge), de localisations variées (TASC, ou TAV). Enfin, nous avons dans un second temps apporté un correctif à l'étude en demandant un prélèvement de sang afin de pouvoir compléter nos études par une comparaison TA/sang. Les informations concernant l'historique métabolique, infectieux et médicamenteux sont également collectés. La définition du groupe contrôle est une problématique des analyses collectées lors de ces chirurgies. A l'heure actuelle, la majorité des prélèvements de PVVIH sont des patients obèses (IMC 30-45) (avec ou sans diabète associé), et le groupe contrôle a donc été conçu sur cette base. La collecte de TA de patients non infectés et métaboliquement sains est, elle, plus difficile et comprend notamment des prélèvements obtenus lors d'ablation de la vésicule biliaire, pour laquelle un faible niveau de perturbations immunitaires est attendu.

### *b. Modèle d'infection à SARS-CoV-2*

L'accès de prélèvements de TA chez des sujets infectés par le SARS-CoV-2 aurait été une approche extrêmement élégante. Malheureusement, nous n'avons pas eu accès à ce type de prélèvements. D'autre part, les études dans le domaine reposaient principalement sur des prélèvements autopsiques, dont l'interprétation peut être difficile. Néanmoins nos résultats

chez le macaque nous également conduit à confirmer certains aspects chez l'Homme. (tel que l'expression d'ACE-2).

### *c. Autorisation de la recherche et déclaration d'éthique*

Tous les patients et sujets de l'étude ont donné leur consentement écrit et éclairé à la participation à l'étude. Le protocole d'étude a été approuvé par le comité régional d'examen d'investigation (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France VII, PP12-021, Paris, France).

## **II. Méthodes**

### **A. Préparation des échantillons**

#### **1. Choix du sang total versus PBMC**

L'étude des cellules immunitaires du sang est classiquement réalisée sur cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ou sur sang total. Dans les deux cas, la caractérisation des populations lymphocytaires est extemporanée. Dans notre étude visant à caractériser les LyT CD8 du compartiment sanguin le sang frais total a été privilégié par rapport aux PBMC.

Les PBMC sont isolés du sang total par centrifugation en gradient de densité, le Ficoll. Bien que les PBMC soient une source facilement accessible de cellules mononuclées et permettent d'envisager une cryoconservation de qualité, leur utilisation présente toutefois quelques limites. En effet, de nombreuses études ont montré que les PBMC peuvent différer des observations faites en sang total sur un certain nombre de paramètres et notamment la perte rapide et complète des polynucléaires neutrophiles, l'expression des récepteurs aux chimiokines (Berhanu et al., 2003). Par ailleurs, un retard dans la prise en charge des prélèvements ainsi qu'une exposition à des températures de marquage fixées ou non à 37°C pouvaient également influencer sur une altération dans l'expression des récepteurs aux chimiokines. Partant de ces observations, nous avons fait le choix de travailler sur sang total, en prélèvement frais, malgré les contraintes de prise en charge extemporanée, de façon à nous rapprocher au maximum des conditions physiologiques et caractériser l'expression des récepteurs aux chimiokines au plus proche des conditions réelles.

### 2. Traitement des échantillons de tissu adipeux

Les quantités de TA reçues ont varié selon les prélèvements de 3 à 5g chez des macaques à plus de 3 kg chez l'Homme. Dans les deux cas, les protocoles sont identiques. La constitution de la biobanque de TA repose sur le traitement et la conservation du TA sous différentes formes : traitement à la PFA pour les analyses de microscopie, congélation de tissus entiers pour la biologie moléculaire, congélation flash pour les analyses métabolomiques, et enfin dissociation du TA pour analyse des fractions stroma-vasculaires et adipocytaires.

#### a. Echantillonnage pour la biothèque

Tous les prélèvements de TA ont fait l'objet d'un échantillonnage systématique en biothèque. L'objectif de cette biothèque est de diversifier le matériel biologique issu de mêmes prélèvements et ultérieurement de pouvoir soit compléter les données du travail actuel soit de répondre à d'autres questions de recherche. L'échantillothèque se divise comme suit entre une biothèque tissulaire et cellulaire. Concernant le biobanking tissulaire on retrouve : 1/ le TA entier, non dissocié, congelé à sec en vue d'analyses en biologie moléculaire par exemple, 2/ le TA entier, conservé en solution de PFA 4% destiné à des analyses de microscopie comme l'immunohistochimie, 3/ le TA entier, conservé après une congélation Flash en isopentane qui permettra de d'envisager une analyse lipidomique en MALDI-tof. Concernant le biobanking cellulaire on retrouve : 4/ le culot SVF congelé à sec pour la biologie moléculaire, 5/ le culot SVF méthanol pour les analyses pharmacologiques en spectrométrie et enfin 6/ le culot SVF congelé en DMSO pour envisager des analyses en cytométrie ou de culture cellulaire ultérieures.

#### b. Dissociation des échantillons de tissu adipeux

Le traitement des prélèvements de TA est divisé en plusieurs étapes : le nettoyage, la dissociation mécanique, la dissociation enzymatique.

L'étape de nettoyage du TA est une étape clé en début de protocole puisqu'elle permet non seulement de sélectionner uniquement le TA (élimination des résidus de peau éventuels), d'écartier les zones trop vascularisées ainsi que les zones fibrosées. Ces informations macroscopiques sont conservées dans le compte rendu de traitement de chaque échantillon, mais les analyses sont menées sur les fractions de TA les plus homogènes.

## **Matériels & Méthodes**

---

Une fois cette étape effectuée, le TA est rincé dans du milieu DMEM (Lonza, Bâle, Suisse) avec 5% de sérum bovin fœtal (SVF) à 37°C puis asséché sur du papier absorbant. Le TA est ensuite pesé, réparti dans des tubes Falcons de 50 mL et coupé en fragments de 2 à 3 mm de façon à optimiser la digestion enzymatique qui va suivre. La suspension de fragments de TA est ensuite digérée par une solution de collagénase de type VIII de *Clostridium histolyticum* (0,33 mg/mL dans du DMEM avec 5 % de FBS ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La suspension est placée sous agitateur pendant 30 min à 37 °C. Après cette digestion enzymatique, une deuxième étape de dissociation mécanique est réalisée. Il s'agit d'une succession d'aspiration-expulsion à l'aide d'une seringue de 10 mL. La suspension est ensuite filtrée au travers de tamis cellulaires (taille des pores : 100 µm). Une première centrifugation à 330 g pendant 8 min à température ambiante permet à la phase adipocytaire de se répartir dans la phase supérieure. La phase adipocytaire est aspirée et éliminée. Une deuxième centrifugation est réalisée à 660 g pendant 8 min à température ambiante. Le surnageant est à nouveau éliminé, et le culot contenant la fraction cellulaire d'intérêt est remise en suspension, filtrée à travers un tamis cellulaire (taille des pores : 100 µm) et remise en suspension dans du DMEM avec 5 % de SVF. Les suspensions cellulaires sont désormais prêtes à être comptées et marquées pour une analyse en cytométrie en flux ou cryoconservées en DMSO pour analyse ultérieure.

### **B. Cytométrie en flux**

#### **1. Protocole de marquage sur sang total**

Les marquages ont été effectués en tube à partir de sang total. Afin d'éviter la fixation aspécifique des anticorps primaires par leur fragment Fc, une première incubation avec du Fc Block (BD Biosciences, FranklinLakes, NJ, USA), à température ambiante, a été réalisée. Pour la détection des LyT CD8 spécifiques du VIH, les cellules ont été incubées avec des complexes multimères de molécules de CMH de classe I et préalablement chargée de peptide spécifique de peptides immunodominants (Proimmune, Oxford, UK et Immudex, Fairfax, USA). Les cellules ont ensuite été marquées à +4°C avec une combinaison d'anticorps d'intérêt couplés à différents fluorochromes. Après incubation, les globules rouges ont été lysés à l'aide de la solution de lyse BD FACS (BD Biosciences). Les cellules ont ensuite été lavées deux fois dans du PBS 1X et fixés dans du paraformaldéhyde à 1 %. Les panels utilisés sont présentés ci-après :

Panel « Humain\_Sang total »

	Fluorochrome	Anticorps	Clone
<b><u>Laser violet</u></b>			
1	BV421	PD-1	EH12 2H7
2	BV510	CD28	CD28.2
3	BV605	CXCR5	J252D4
4	BV650	CCR7	G043H7
5	BV711	CD45RO	UCHL1
6	BV786	CD3	SK7
<b><u>Laser bleu</u></b>			
7	FITC	CD27	M-T271
8	PE	PE	Fluorotag multimère
9	PE-CF594	CXCR3	GO25H7
10	PerCP-Cy5.5	TIGIT	MBSA43
11	PE-Cy7	KLRG1	REA261
<b><u>Laser rouge</u></b>			
12	APC	CX3CR1	2A9 1
13	AF680/700	CD62L	DREG-56
14	APC-H7	CD8	SK1

Les données ont été acquises avec un cytomètre en flux LSR Fortessa (BD Biosciences). La configuration actuelle du Fortessa permet une détection de 14 couleurs, sur 3 lasers. L'acquisition est réalisée sur le logiciel FACS Diva (BD Biosciences). Les données ont ensuite été analysées en utilisant le logiciel FlowJo (version 10.6.2, FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

## **2. Protocole de marquage sur tissu adipeux**

Les marquages sur tissus ont été effectués sur des plaques 96 puits à fond rond sur culots cellulaires. La première étape est l'incubation avec le Fc Block (BD Biosciences, FranklinLakes, NJ, USA), réalisé à température ambiante. Pour le panel « Humain\_T CD8 spécifiques », les cellules ont été incubées avec des complexes multimères (Proimmune, Oxford, UK et Immudex, Fairfax, USA). Les cellules ont ensuite été marquées à +4°C avec la combinaison d'anticorps déterminée (cf détail infra). Les cellules ont ensuite été lavées deux fois dans du PBS 1X puis incubées avec une solution diluée de Live Dead (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Deux

## **Matériels & Méthodes**

---

nouveau lavage ont ensuite été réalisés. Ensuite, selon la combinaison de marquage envisagée et le type de prélèvement, trois protocoles ont été utilisés :

- Marquage extracellulaire, sans lyse des globules rouges

Panels concernés : « Migration\_NHP » et « Humain\_T CD8 spécifiques »

Tissus concernés : TA, ganglions lymphatiques, intestins et colon

Après les deux lavages précédemment décrits, les cellules ont été remises en suspension et fixées dans une solution de PFA 4%.

- Marquage extracellulaire, avec lyse des globules rouges

Panels concernés : « Migration\_NHP » et « Humain\_T CD8 spécifiques »

Tissus concernés : Rate, moelle osseuse et exceptionnellement le TAV très vascularisé

Après les deux lavages précédemment décrits, les globules rouges ont été lysés à l'aide d'une solution d'ACK (Ammonium-Chloride-Potassium), puis lavées deux fois dans du PBS 1X. Les cellules ont finalement été remises en suspension et fixées dans une solution de PFA 4%.

- Marquage intracellulaire

Panel concerné : « COVID\_NHP »

Tissus concernés : TA

Après les deux lavages précédemment décrits, les cellules ont été perméabilisées avec une solution Fix/Perméabilisation (eBiosciences Scientific, Waltham, MA, USA) à 4 °C. Les cellules ont été incubées avec le Fc Block puis les anticorps de la combinaison intracellulaire et enfin les cellules ont été lavées deux fois et remises en suspension dans du PBS 1X.

Tous les anticorps des combinaisons de marquage de l'étude ont été choisis en fonction de l'espèce étudiée. Lorsqu'il a été possible de choisir des clones présentant une cross-réactivité entre humains et cynomolgus, ce choix a été fait de manière à limiter les modifications de panel. Toutefois, certains anticorps sont spécifiques d'espèce et ont nécessité un clone espèce-dépendant (CD45 et CD3 notamment).

Panel tissu « COVID\_NHP »

	Fluorochrome	Anticorps	Clone
<b>Laser violet</b>			
1	BV421	PD-1	EH12 2H7
2	BV510	CD45 <sup>nHP</sup>	DO58 1283
3	BV605	HLA-DR	G46-6
4	BV650	CD8	RPA T8
5	BV711	CD4	L200
6	BV786	CD3	SP34-2
<b>Laser bleu</b>			
7	FITC	Ki67	B56
8	PE		
9	PE-CF594	CD57	HNK1
10	PerCP-Cy5.5	CD69	FN50
11	PE-Cy7	KLRG1	2F1/KLRG1
<b>Laser rouge</b>			
12	APC	IFN	B27
13	AF680/700	CD45 RA	HI100
14	APC-H7	Live Dead	

## Matériels & Méthodes

Panel tissu « Migration\_NHP »

	Fluorochrome	Anticorps	Clone
<b>Laser UV</b>			
1	BUV395		
2	DAPI		
3	BUV496	CD45RA	5H9
4	BUV563		
5	BUV661	HLA-DR	G46-6
6	BUV737	CD27	M-T271
7	BUV805	CD103	BerCAT8
<b>Violet laser</b>			
8	BV421	PD-1	EH12 2H7
9	V450		
10	BV510	CD45 <sup>nhp</sup>	DO58 1283
11	BV605	CD4	L200
12	BV650	CD8	RPA T8
13	BV711	CCR7	GO43H7
14	BV786	CD3	SP34-2
<b>Laser bleu</b>			
15	FITC		
16	PE	CD57	TB01/HNK-1
17	PerCP-Cy5.5	CD69	FN50
18	PE-Cy7	KLRG1	2F1/KLRG1
<b>Laser Jaune/vert</b>			
19	PE		
20	PE-CF594	CXCR3	GO25H7
21	PE-647		
22	PE-Cy5.5		
23	PE-Cy7		
<b>Laser rouge</b>			
24	APC	CX3CR1	2A9-1
25	AF680/700		
26	APC-H7	Live Dead	

Panel tissu « Humain\_T CD8 spécifiques »

	Fluorochrome	Anticorps	Clone
<b>Laser violet</b>			
1	BV421	PD-1	EH12 2H7
2	BV510	CD45 <sup>hu</sup>	HI30
3	BV605	CD4	L200
4	BV650	CD8	RPA T8
5	BV711	CD45RO	UCHL1
6	BV786	CD3	SK7
<b>Laser bleu</b>			
7	FITC	CD38	HIT2
8	PE	Fluorotag multimère	
9	PE-CF594	CD57	NK1
10	PerCP-Cy5.5	TIGIT	MBSA43
11	PE-Cy7	CD69	FN50
<b>Laser rouge</b>			
12	APC	CX3CR1	2A9 1
13	AF680/700	HLA DR	G46 6
14	APC-H7	Live Dead	

### 3. Cytomètre

L'acquisition des données de cytométrie a été réalisée sur deux cytomètres au cours de notre étude : LSR Fortessa (BD Biosciences) et ZE5 (Biorad).

Initialement, le cytomètre qui permettait la plus large détection et disponible dans notre unité était le LSR Fortessa. Ce cytomètre est paramétré pour une détection de 14 couleurs, il donc été privilégié pour les panels suivants :

- Panel « Humain\_Sang total »
- Panel tissu « Humain\_T CD8 spécifiques »
- Panel tissu « COVID\_NHP ».

C'est un cytomètre dont la maîtrise était acquise au laboratoire et pour lequel la mise en place d'un panel, l'accessibilité et la disponibilité en anticorps ont permis de lancer les études sur la caractérisation de l'expression des récepteurs aux chimiokines et caractériser les réponses T CD8 dans le contexte COVID. Malgré une détection de 14 couleurs possible, la composition

## ***Matériels & Méthodes***

---

des combinaisons d'anticorps a nécessité de faire des choix. Nous n'avons pas pu intégrer tous les marqueurs souhaités. Cette limite est acceptable en cas de matériel biologique facilement accessible mais oblige à multiplier les panels et donc les analyses qui s'en suivent. En conditions de matériel biologique restreint, ce qui a été le cas en analyses tissulaires, la nécessité d'un cytomètre avec une détection plus complète s'est rapidement imposée face aux nombreuses hypothèses de travail. En cours d'étude, la plateforme FlowCytech (IDMIT, Fontenay aux Roses) a fait l'acquisition d'un cytomètre ZE5, avec un paramétrage de 26 couleurs. Nous avons donc fait le choix de basculer les analyses tissulaires sur ce cytomètre. Toutes les acquisitions du panel tissulaire « Migration\_NHP » ont donc été réalisées sur ce cytomètre.

# ***RESULTATS***

---



**Article 1.** Forte expression de CXCR3 et CXCR5 sur les lymphocytes T CD8 mémoires centrales spécifiques du VIH-1 chez les patients infectés

A. Olivo, C. Lécuroux, M. Bitu, V. Avettand-Fenoel, F. Boufassa, A. Essat, L. Meyer, J-M. Doisne, B. Favier, B. Vaslin, G. Schlecht-Louf, N. Noël, C. Goujard, O. Lambotte, C. Bourgeois  
Eur J Immunol. 2021 Aug ;51(8) :2040-2050

- Résumé

L'efficacité des réponses T CD8 dans les contextes d'infections chroniques est caractérisée par leur profil mémoire/effecteur. Initialement, la définition de la mémoire correspondait à la persistance de LyT CD8 spécifiques du pathogène après l'élimination de l'antigène et des stratégies phénotypiques et fonctionnelles ont permis d'identifier ces cellules. Mais l'application de la définition de la mémoire aux contextes d'infections persistantes est aujourd'hui remise en cause. De nouvelles caractérisations des réponses T CD8, élaborées dans ces contextes d'infections chroniques, ont proposé l'expression des récepteurs de chimiokines (à savoir CXCR3, CXCR5 et CX3CR1) comme marqueur principal, et identifient des sous-populations spécifiques et indispensables au contrôle de l'infection dans les contextes chroniques.

L'objectif de l'étude était de réévaluer la caractérisation des réponses T CD8 mémoires du compartiment sanguin sur la base de ces récepteurs de chimiokines dans le contexte de l'infection chronique par le VIH. Intégrer le potentiel migratoire des LyT CD8 nous semblait particulièrement pertinent dans le contexte de l'infection chronique par le VIH, où les réservoirs viraux sont disséminés sur plusieurs tissus et où des altérations des muqueuses sont observées. Par ailleurs, l'expression de la plupart de ces récepteurs et/ou de leurs ligands est modifiée dans le contexte de l'infection par le VIH, confirmant l'intérêt de ce type d'approches.

Plusieurs résultats ont été mis en évidence. Tout d'abord, nous avons constaté que CXCR3 était exprimé de manière constitutive sur les LyT CD8 mémoires, ainsi qu'un déséquilibre dans le profil d'expression des récepteurs aux chimiokines CXCR5 et CX3CR1 ce qui pourrait influencer le recrutement des T<sub>CM</sub> dans les organes lymphoïdes et des T<sub>EM</sub> dans les tissus inflammés. Nous avons étudié les profils d'épuisement et de sénescence selon l'expression des récepteurs aux chimiokines. La proportion de cellules PD1<sup>+</sup> était supérieure sur les T<sub>CM</sub> qui présentaient un plus

## Résultats

---

grand potentiel migratoire et la proportion de cellules KLRG1<sup>+</sup> était supérieure sur les T<sub>CM</sub> et T<sub>EM</sub> qui coexprimaient les récepteurs aux chimiokines. Enfin, nous avons évalué l'impact de l'infection chronique sur le phénotype des récepteurs aux chimiokines sur les LyT CD8 spécifiques du VIH. Les proportions de cellules CXCR3<sup>+</sup> et CXCR5<sup>+</sup> étaient plus élevées au sein des LyT CD8 spécifiques au VIH par rapport à leurs homologues non spécifiques.

En conclusion, nos résultats suggèrent qu'il est pertinent d'intégrer la capacité de migration pour la caractérisation des LyT CD8 dans le contexte de l'infection chronique par le VIH. Ceci a permis de mettre en évidence une hétérogénéité dans le profil migratoire des cellules mémoires selon le groupe de contrôle (patients traités ou patients contrôleurs du VIH) et entre les LyT CD8 spécifiques et non spécifiques du VIH.

## Research Article

## CXCR3 and CXCR5 are highly expressed in HIV-1-specific CD8 central memory T cells from infected patients

Anaëlle Olivo<sup>1</sup> , Camille Lécuroux<sup>1</sup>, Marie Bitu<sup>1</sup>, Véronique Avettand-Fenoel<sup>2,3,4</sup> , Farouady Boufassa<sup>5,6</sup>, Asma Essat<sup>5,6</sup>, Laurence Meyer<sup>5,6</sup> , Jean-Marc Doisne<sup>7</sup> , Benoit Favier<sup>1</sup>, Bruno Vaslin<sup>1</sup>, Géraldine Schlecht-Louf<sup>6,8</sup> , Nicolas Noël<sup>1,6,9</sup> , Cécile Goujard<sup>5,6,9</sup> , Olivier Lambotte<sup>1,6,9</sup> and Christine Bourgeois<sup>1,6</sup> 

<sup>1</sup> CEA-Université Paris-Saclay-INSERM U1184, Immunology of Viral Infections, Autoimmune, Hematological and Bacterial diseases, (IMVA-HB/IDMIT), Fontenay-aux-Roses & Le Kremlin-Bicêtre, Paris, France

<sup>2</sup> AP-HP, Laboratoire de Microbiologie Clinique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

<sup>3</sup> Université de Paris, Faculté de Médecine, Paris, France

<sup>4</sup> INSERM U1016, CNRS, UMR8104, Institut Cochin, Paris, France

<sup>5</sup> INSERM CESP U1018, Université Paris-Saclay, Paris, France

<sup>6</sup> Université Paris-Saclay, Paris, France

<sup>7</sup> INSERM U1223, Innate Immunity Unit, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>8</sup> Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation, Microbiome and Immunosurveillance, 92140, Clamart, France

<sup>9</sup> Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Paris-Saclay, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, Paris, France

New ways of characterizing CD8<sup>+</sup> memory T cell responses in chronic infections are based on the measurement of chemokine receptor expression (CXCR3, CXCR5, and CX3CR1). We applied these novel phenotyping strategies to chronic HIV infection by comparing healthy donors (HDs), HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy (ART), and spontaneous HIV controllers (HICs). In all groups, the memory cells exhibited high proportion of CXCR3<sup>+</sup> cells. Proportions of CXCR5<sup>+</sup> and CX3CR1<sup>+</sup> cells were preferentially observed among central memory cells (Tcm) and effector memory cells (Tem) respectively. Chronic controlled HIV infection impacted the chemokine receptor profile of both HIV-specific and nonspecific CD8<sup>+</sup> T cells. In total CD8<sup>+</sup> T cells, the proportions of CXCR3<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup>Tcm and Tem were lower in HIV-infected patients than in HDs with subtle differences between ART and HICs. Such phenotyping strategy also revealed differences in exhaustion and senescence phenotypes, the CXCR3<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup> being more exhausted and senescent than the CXCR3<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>CX3CR1<sup>-</sup> Tcm fraction. Among HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells, the vast majority of Tcm cells were CXCR3<sup>+</sup> and CXCR5<sup>+</sup> cells in contrast with their nonspecific counterparts. In conclusion, the addition of migration markers contributes to better characterize Tcm/Tem compartment.

**Keywords:** CD8 T cell · Chemokine receptor · HIV controller · HIV infection · Migratory profile



Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Correspondence: Dr. Christine Bourgeois  
e-mail: christine.bourgeois@universite-paris-saclay.fr

## Introduction

Viral persistence in chronic HIV infection is associated with various immune dysfunctions including chronic low-grade inflammation, systemic immune activation, and T cell exhaustion [1,2]. Viral suppression and the partial restoration of immune responses are usually achieved by the administration of highly active antiretroviral therapy (ART). However, spontaneous viral control in the absence of ART is observed in a very small subpopulation of HIV-infected patients referred to as “HIV controllers” (HICs) [3]. Various mechanisms are thought to be involved in spontaneous HIV control including protective MHC alleles, immune responses and, in particular, CD8<sup>+</sup> T cell responses [3]. A good long-term CD8<sup>+</sup> T cell response is important for spontaneous HIV control but may nevertheless be impaired by viral persistence [4,5].

The effectiveness of CD8<sup>+</sup> T cell responses and the latter's impairment in the context of chronic HIV infection is characterized by the memory/effector T cell profile [6]. Memory CD8<sup>+</sup> T cells are functionally and phenotypically heterogeneous, as indicated initially by the identification of central and effector memory T cell subsets (T<sub>cm</sub> and T<sub>em</sub> respectively) [7,8]. The T<sub>cm</sub> subset has a higher homeostatic proliferation rate than the T<sub>em</sub> subset, whereas T<sub>em</sub> have greater cytotoxic activity than T<sub>cm</sub>. Central memory cells also exhibit a specific migration pattern that facilitates homing from the blood to secondary lymphoid organs (thanks to CCR7 expression), whereas T<sub>em</sub> are more likely to be localized in peripheral tissues.

Conventionally, memory cells are defined as those that persist after the clearance of antigen. However, this conventional CD8<sup>+</sup> differentiation profile with T<sub>cm</sub> and T<sub>em</sub> may not be fully applicable in the context of a chronic infection with a low persistent antigen burden. Indeed, recent studies have highlighted the existence of a specific memory cell differentiation stage in chronic infections [9–13]. All studies examined the expression of chemokine receptors (namely CXCR3, CXCR5, and CX3CR1). In mouse models, these receptors characterize specific memory cell subsets that are particularly prevalent in chronically infected hosts. These subsets maintain the robust effector response that is crucial for the control of the infection. Interestingly, the above-cited studies described a relationship between T cell migration and effective viral control. The labelling of chemokine receptors on CD8<sup>+</sup> memory cells appears to be particularly relevant in the context of HIV infection. First, chronic HIV infection is associated with viral persistence in lymphoid and nonlymphoid reservoirs, as well as mucosal alterations — suggesting the need for an appropriate T cell migration profile if the infection is to be controlled [14,15]. Second, the expression of most of these receptors and/or their ligands is modified during chronic HIV infection. This is notably the case for CX3CR1, a chemokine receptor that has a major role in lymphocyte migration to nonlymphoid and inflammatory sites [16,17]. The expression of CXCR3 allows CD8<sup>+</sup> T cells to home to lymphoid and inflammatory sites, and levels in the intestinal mucosa

are known to be influenced during HIV infection [18]. Importantly, levels of CXCR3's three ligands [19] (and notably CXCL10 — also known as IP10) are modulated during HIV infection and are inversely correlated with disease progression [20,21]. CXCR5 expression allows T cells to home to B cell follicles and this process has been described in detail for CD4<sup>+</sup> T cells. Although most CD8<sup>+</sup> T cells do not enter B cell follicles [12,13], a CXCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell fraction has a crucial role in viral control [12]. The presence of this fraction has been linked to limited HIV replication [22] and exhaustion [12].

The overall objective of the present study was to reassess the characterization of memory CD8<sup>+</sup> T cells by including these chemokine receptors in the standard phenotypic evaluation. A second objective was to evaluate the link between the migratory potential and exhaustion/senescence's profile [23–26]. A further objective was to determine whether this strategy might provide new insights into the role and status of both HIV-specific and nonspecific CD8<sup>+</sup> T cell compartment during chronic HIV infection. Our starting hypothesis was that the CD8<sup>+</sup> T cells' migratory potential is especially relevant in the context of chronic HIV infection, where viral reservoirs are disseminated over several tissues and local alterations of the mucosae are observed.

## Results

### Study participants

Forty-four patients with a chronic HIV infection and 15 healthy donors (HDs) were included in the study. The HIV-infected patients included 28 HICs from the ANRS CO21 CODEX cohort. Sixteen ART-exposed and virologically suppressed HIV-infected patients from the ANRS CO6 PRIMO cohort were also included. The patients' characteristics are summarized in Table 1. The three groups did not differ with regard to age. A difference in the sex ratio was observed for HICs (males: 50%) versus ART-exposed patients (males: 81%), which reflects the commonly described over-representation of women in HIC cohorts. The proportion of males in the HD group (80%) was similar to that of the ART-exposed group. In view of the sex bias, we included almost twice as many HICs as ART-exposed patients. As mentioned above, viral control in both the HIC and ART-exposed groups was defined a viral load below 40 copies/mL for at least 2 years was required in both patient groups. The groups did not differ significantly in terms of the CD4<sup>+</sup> T cell count. The median [interquartile range (IQR)] estimated time since infection was 12.5 years [5; 19.3] in the ART-exposed group and 16 years [11.3; 24.7] in the HIC group. Additionally, 8 ART-exposed (different from the PRIMO cohort) and 10 HICs (also included in the CODEX cohort) were included for HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells study and 8 HICs for the *in vitro* chemotaxis assay. The patient's characteristics are shown in Supporting information Tables S1 and S2.

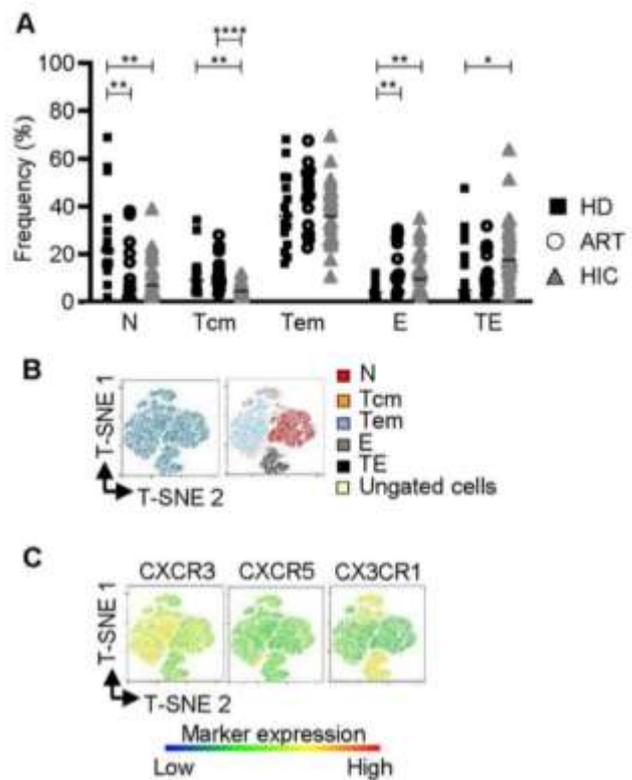
**Table 1.** The demographic and clinical characteristics of the study participants

	ART-exposed patients	HICs	HDs	p-value
N	16	28	15	
Age (years)	50 [40; 56]	53 [46; 58]	49 [29; 55]	ns
Male (%)	81%	50%	80%	0.048
Estimated duration of HIV infection	12.5 [5; 19.5]	16 [11.3; 24.7]		0.033
Treatment duration (years)	11 [5; 19]	<40 [<40; <40]		
Plasma HIV-RNA (copies/mL)	<40 [<40; <40]	796 [652; 956]		ns
CD4+ T cell count (/mL)	822 [597; 970]			ns

Quantitative variables are expressed as the median [IQR]. Qualitative variables are expressed as the number (percentage). p-values were estimated using a Kruskal-Wallis test. For all statistical analyses, the significance level was set to  $p < 0.05$ . If the groups differed significantly, Dunn's post-test was applied. For the proportion of males, the p-value for the intergroup comparison was 0.048 (i.e.  $<0.05$ ) but Dunn's post-test did not show a significant difference. ART, antiretroviral therapy; HDs, healthy donors; HIC, HIV controllers.

**Phenotypic heterogeneity among memory CD8<sup>+</sup> subsets**

We first used the standard CD45RO, CCR7, CD27, and CD28 markers to characterize CD8<sup>+</sup> T cell differentiation [6]. The naive (N), Tcm, Tem, effector (E), and terminal effector (TE) CD8<sup>+</sup> T cell subsets were defined as follows: N: CCR7<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup>CD27<sup>high</sup>; Tcm: CCR7<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>; Tem: CCR7<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>; E: CCR7<sup>-</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>; and TE: CCR7<sup>-</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>. The gating strategy is shown in Supporting information Fig. S1. We next compared the relative proportions of these CD8<sup>+</sup> T cell subsets in the three groups of participants (Fig. 1A). The Tem subset was consistently the most well-represented CD8<sup>+</sup> T cell subset in all groups, and the proportion was similar in HIV-infected patients and HDs. The ART-exposed and HIC groups exhibited a lower proportion of N CD8<sup>+</sup> T cells and a higher proportion of E CD8<sup>+</sup> T cells, relative to HDs. Furthermore, HICs had a lower proportion of Tcm than ART-exposed patients and HDs. In order to better characterize CD8<sup>+</sup> memory cell differentiation in the context of chronic infection, we studied the chemokine receptors CXCR3, CXCR5, and CX3CR1 [9,10,12]. To that end, we performed a t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) analysis on a concatenate of samples from HDs. The t-SNE analysis was based on the four standard markers of CD8<sup>+</sup> T cell differentiation (CD45RO, CCR7, CD27, and CD28) (Fig. 1B, upper graphs). It showed that the N, E, and TE cells were distributed into three well-separated clusters. With regard to the memory compartment, the distributions of Tcm and Tem were broad and heterogeneous. We next visualized the overlap between the chemokine receptor expression profiles and the vi-SNE projection (Fig. 1B, lower graphs). The expression of chemokine receptors was related to the memory compartment's differentiation stage: CXCR3 was mostly expressed by memory cells (Tcm and Tem), the expression of CXCR5 was limited to a fraction of the memory compartment, and the expression of CX3CR1 overlapped preferentially with the effector compartment (both the E and TE subsets). However, subtle differences in the expression of chemokine receptors were also observed within each subset — suggesting a degree of heterogeneity. Over-



**Figure 1.** Phenotypic heterogeneity among memory CD8 subsets. (A) Distribution of N, Tcm, Tem, E, and TE CD8<sup>+</sup> T cells in HDs (squares), ART-exposed patients (open circles), and HICs (triangles) in blood samples. (B) Visualization of a t-SNE analysis of CD8<sup>+</sup> T cells showing the overall distribution of CD8<sup>+</sup> T cells (left), and the projection of the various N, Tcm, Tem, E, and TE fractions (right). The t-SNE results within a concatenate of HD samples were visualized using FlowJo software and the following surface markers: CCR7, CD45RO, CD28, and CD27. The bottom panel shows the results of a t-SNE analysis of the distribution of CXCR3, CXCR5, or CX3CR1-expressing CD8<sup>+</sup> T cells. The staining was performed on fresh whole blood samples collected from 15 HDs, 16 ART-exposed patients, and 28 HICs. The graphs show the median values and each sample is considered an independent experiment. Intergroup comparisons were performed using a non-parametric, unpaired Kruskal-Wallis test. Statistically significant differences are indicated as follows: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

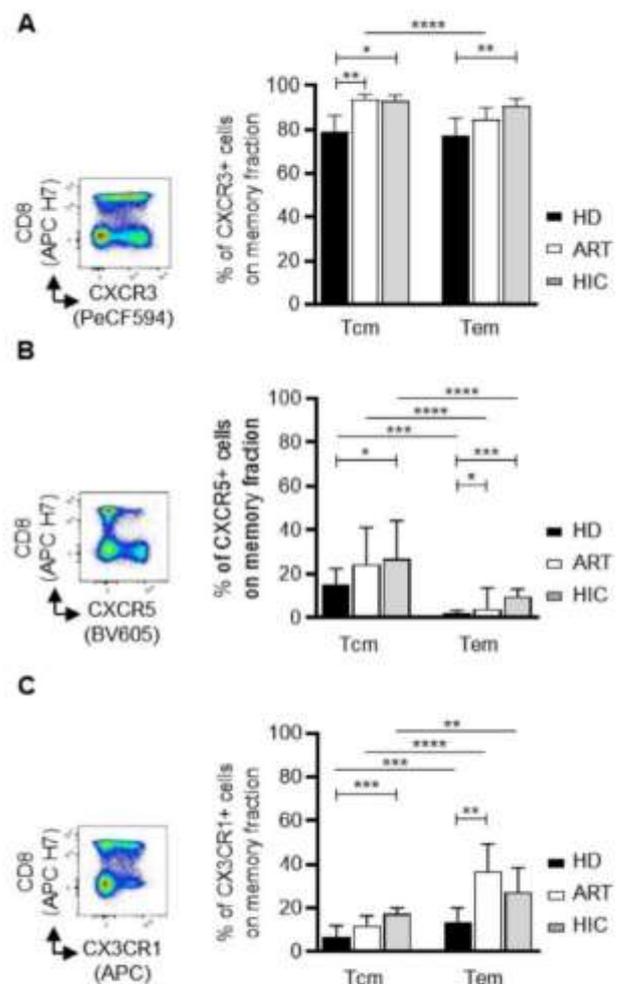
all, the characterization of chemokine receptor expression among Tcm and Tem subsets is relevant.

### Tcm and Tem subsets differ in the proportion of CXCR5<sup>+</sup> and CX3CR1<sup>+</sup> cells

The expression of CXCR3 within the memory compartment was first studied. CXCR3-expressing cells were predominant in both Tcm and Tem subsets. In ART-exposed patients, the proportion of CXCR3<sup>+</sup> cells was lower for Tem than for Tcm (Fig. 2A). In contrast, the proportions of CXCR3<sup>+</sup> Tem and Tcm were similar in HDs and HICs. We next looked at whether HIV status and the type of control were related to the proportion of CXCR3<sup>+</sup> cells within each of the memory CD8<sup>+</sup> T cell subsets. Considering the Tcm subset, the proportion of CXCR3<sup>+</sup> was higher in HIV-infected patients than in HDs. Within the Tem subset, the proportion of CXCR3<sup>+</sup> was significantly higher in HICs, but not in ART-exposed patients, than in HDs. Lastly, we evaluated the MFI associated with CXCR3 expression. Among CXCR3<sup>+</sup> cells, the intensity of expression was higher in the Tcm subset than in the Tem subset in all groups (Supporting information Fig. S2A).

We next focused on CXCR5 and CX3CR1 expression in the memory compartment. The proportion of CXCR5<sup>+</sup> cells (Fig. 2B) was higher among the Tcm than among the Tem in HDs in accordance with t-SNE analysis, but also in HIV-infected patients. As described for the proportion of CXCR3<sup>+</sup> cells, we also observed differences for CXCR5 expression with regard to the context of HIV infection. Considering Tcm subset, the proportion of CXCR5<sup>+</sup> cells was significantly higher in HICs than in HDs and varied markedly from one patient to another in both the ART-exposed and HIC groups. Within Tem subset, the proportion of CXCR5<sup>+</sup> cells was higher in HIV-infected patients than in HDs. The MFI of CXCR5 expression was consistently higher in Tcm compared to Tem in all groups (Supporting information Fig. S2B). Lastly, the fraction of CX3CR1<sup>+</sup> cells was higher among Tem than among Tcm in all groups (Fig. 2C), and the MFI of CX3CR1 expression was higher in Tem compared to Tcm (Supporting information Fig. 2C). The proportion of CX3CR1<sup>+</sup> cells also varied according to the presence of HIV infection: the proportion of CX3CR1<sup>+</sup> Tcm was higher in HICs than in HDs, and higher among Tem in ART-exposed patients than in HDs. Additionally, the MFI of CX3CR1 expression among Tcm was higher in HICs compared to HDs and ART-exposed patients and higher among Tem in HICs compared to HDs.

In summary, the migratory profiles of the memory CD8<sup>+</sup> T cells had a common feature in all groups: a high proportion of CXCR3<sup>+</sup> cells. Memory cells also exhibited subset-specific profiles: CXCR5<sup>+</sup> cells were detected preferentially in the Tcm subset, whereas CX3CR1<sup>+</sup> cells were found preferentially in the Tem subset. In the context of HIV infection, we observed common features in HIV-infected groups: a higher proportion of CXCR3<sup>+</sup> Tem and a higher proportion of CXCR5<sup>+</sup> Tem than in HDs. Overall, the proportions of CXCR3<sup>+</sup>, CXCR5<sup>+</sup>, and CX3CR1<sup>+</sup> Tcm and CXCR3<sup>+</sup> and CXCR5<sup>+</sup> Tem were higher in HICs than in HDs. In contrast,

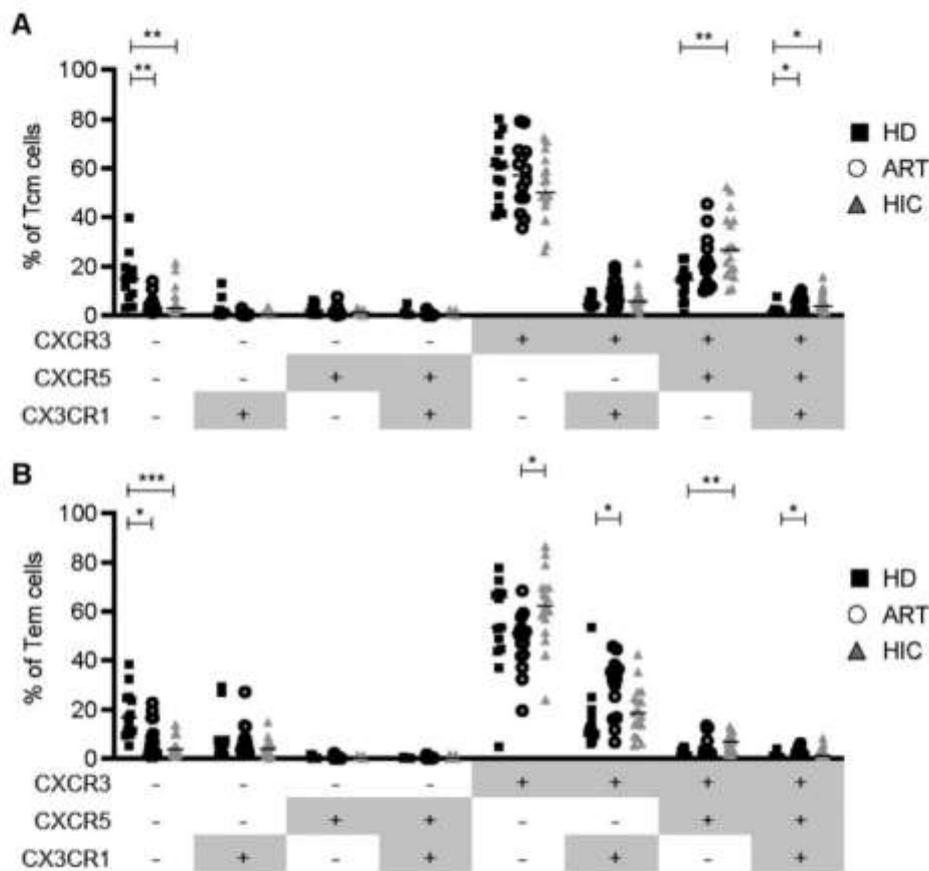


**Figure 2.** CXCR3, CXCR5, and CX3CR1 distribution among CD8<sup>+</sup> T cells. (A) Representative dot plot of CXCR3 expression on CD8<sup>+</sup> T cells in HDs and the percentage of CXCR3<sup>+</sup> cells among Tcm and Tem CD8<sup>+</sup> subsets in HDs (black bars), ART-exposed patients (white bars), and HICs (grey bars). (B) Representative dot plot of CXCR5 expression on CD8<sup>+</sup> T cells in HDs. The percentages of CXCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tcm and Tem subsets in HDs, ART-exposed patients, and HICs are shown. (C) Representative dot plot of CX3CR1 expression on CD8<sup>+</sup> T cells in HDs. Percentage of CX3CR1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tcm and Tem subsets in HDs, ART-exposed patients, and HICs are shown. The graphs show the median value and IQR for 15 HDs, 16 ART-exposed patients, and 28 HICs (samples were treated independently and are thus considered as independent experiments). Statistically significant differences (as determined in a nonparametric paired Wilcoxon test and a nonparametric unpaired Kruskal–Wallis test) are indicated as follows: \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\*\**p* < 0.0001).

the migratory profile in ART-exposed patients differed less from that seen in HICs, with a slightly higher proportion of CXCR3<sup>+</sup> Tcm (but not CXCR5<sup>+</sup> or CX3CR1<sup>+</sup> Tcm), a higher proportion of CXCR5<sup>+</sup> and CX3CR1<sup>+</sup> Tem and no impact on CX3CR1 MFI.

### Chemokine receptor coexpression reveals additional phenotypic heterogeneity

We next looked at whether CXCR3, CXCR5, and CX3CR1 were coexpressed by Tcm and Tem (Fig. 3A and B). As shown in



**Figure 3.** A unique migration profile for CD8<sup>+</sup> Tcm and Tem subsets. (A) Expression of CXCR3, CXCR5, and/or CX3CR1 among the Tcm subset in HDs (n = 13; squares), ART-exposed patients (n = 14, open circles), and HICs (n = 17, triangle). (B) Expression of CXCR3, CXCR5, and/or CX3CR1 among the Tem subset in HDs (squares), ART-exposed patients (open circles), and HICs (triangles). The graphs show the proportions of all fractions identified by the three markers. The data correspond to the median [IQR]. The groups were compared using a nonparametric, unpaired Kruskal–Wallis test, or paired Friedman test. Statistically significant differences are indicated as follows: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001.

Fig. 2A, most memory cells expressed CXCR3. A Boolean analysis revealed that CXCR3<sup>+</sup> fractions frequently also expressed CXCR5 and/or CX3CR1, whereas receptor coexpression was extremely rare among CXCR3<sup>-</sup> cells. Among Tcm expressing CXCR3, the CXCR5<sup>-</sup>CX3CR1<sup>-</sup> fraction (R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup>) was most predominant and was followed by the R3<sup>+</sup>R5<sup>+</sup>X3R1<sup>-</sup> fraction in all study groups. Within the Tem, the R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> fraction was again most predominant but the second most predominant fraction was R3<sup>+</sup>R5<sup>+</sup>X3R1<sup>+</sup> — a different subset from the one identified in Tcm. We next determined whether the ART-exposed and HIC groups differed from HDs with regard to chemokine receptor expression by the various memory subsets. In HIV-infected patients, the proportion of R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> Tcm and Tem was significantly lower and the proportion of R3<sup>+</sup>R5<sup>+</sup>X3R1<sup>+</sup> was significantly higher than in HDs. When considering CXCR3<sup>+</sup> Tcm, a specific feature was observed for HICs, with a higher proportion of R3<sup>+</sup>R5<sup>+</sup>X3R1<sup>-</sup> than in HDs. To assess the functional relevance of these chemokine receptors expression, in vitro chemotactic response of CD8<sup>+</sup> T cells toward various ligands of CXCR3, CXCR5, and CX3CR1 was analyzed on HICs whole blood (Supporting information Fig. S3). As expected from the high pro-

portion of CXCR3<sup>+</sup> cells among memory cells, CXCR3 ligands induced a migration of Tcm, but no significant chemotaxis could be detected for CXCR5 or CX3CR1 ligands (Supporting information Fig. S3A). We next assessed whether combining chemokine receptor expression enhanced Tcm chemotaxis. Importantly, we observed a trend towards higher migration index of Tcm CD8<sup>+</sup> T cells when combining CXCR3 and CXCR5 ligands (p = 0.19) (Supporting information Fig. S3B). These data suggest that Tcm may exhibit a different migratory profile depending on their CXCR5 expression, thus, giving functional relevance to the distinction of R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> and R3<sup>+</sup>R5<sup>+</sup>X3R1<sup>-</sup> Tcm fraction.

Within the CXCR3<sup>+</sup> Tem, we again observed a higher proportion of R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> in HICs than in HDs, and higher proportions of R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> and R3<sup>+</sup>R5<sup>+</sup>X3R1<sup>+</sup> cells in ART-exposed patients than in HDs. The proportion of R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> cells was significantly higher in HICs than in ART-exposed patients (Fig. 3B). As described for Tcm, we evaluated the in vitro migratory potential of Tem. The presence of CXCR3 ligands but not CXCR5 or CX3CR1 ligands induced a significant Tem migration (Supporting information Fig. S3C). No increase in the Tem chemotaxis was detected when CXCR3 ligands were

combined with CXCR5 or CX3CR1 ligands (Supporting information Fig. S3D).

Overall, this combined phenotyping revealed that CXCR3<sup>+</sup> Tcm cells included predominantly R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> and R3<sup>+</sup>R5<sup>+</sup>X3R1<sup>-</sup> subsets whereas CXCR3<sup>+</sup> Tem cells included R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> and R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>+</sup>. The chemotaxis assays performed in HICs support the predominant role of CXCR3 ligands in driving both Tcm and Tem migration. It also suggests that CXCR5 expression may improve/change the migratory potential of CXCR3<sup>+</sup> Tcm.

### Chemokine receptor coexpression is related to the PD-1 and KLRG1 expression profile

We next looked at whether the differences in chemokine receptor (co)expression were potentially related to the subsets' functional properties. We therefore evaluated the expression of PD-1 and KLRG1 (both of which are expressed on memory T cells and that modulate immune functions) on the main Tcm and Tem fractions.

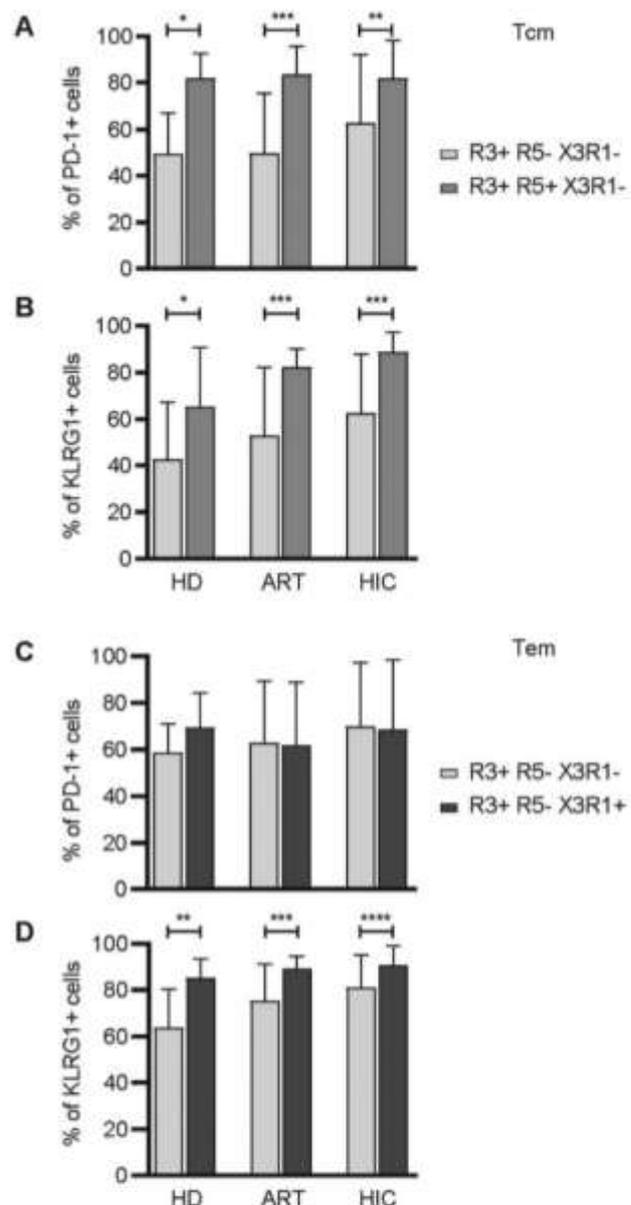
Overall, in the Tcm subset, the proportion of PD-1<sup>+</sup> was similar in all three study groups (Supporting information Fig. S4A), whereas a higher proportion of KLRG1<sup>+</sup> cells was observed in HIV-infected patients than in HDs (Supporting information Fig. S4B). When considering Tcm fractions (Fig. 4A), the proportion of PD-1<sup>+</sup> cells was higher in the R3<sup>+</sup>R5<sup>+</sup>X3R1<sup>-</sup> fraction than in the R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> fraction in all study groups. A similar trend was observed for KLRG1 expression (Fig. 4B).

The proportions of PD-1<sup>+</sup> Tem (Supporting information Fig. S4C) and KLRG1<sup>+</sup> Tem (Supporting information Fig. S4D) were higher in the ART-exposed patients (but not in HICs) than in HDs. For the Tem fractions, the proportion of PD-1<sup>+</sup> cells was similar in the R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> and R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>+</sup> fractions (Fig. 4C), whereas the proportion of KLRG1<sup>+</sup> cells was higher in the R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>+</sup> fraction than in the R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> fraction in all study groups (Fig. 4D).

In conclusion, we observed that the chemokine receptor expression profile was associated with a specific KLRG1 expression profile for Tcm and Tem and a specific PD-1 profile for Tcm. These differences were constitutive and did not appear to depend on the HIV infection status and/or the type of viral control.

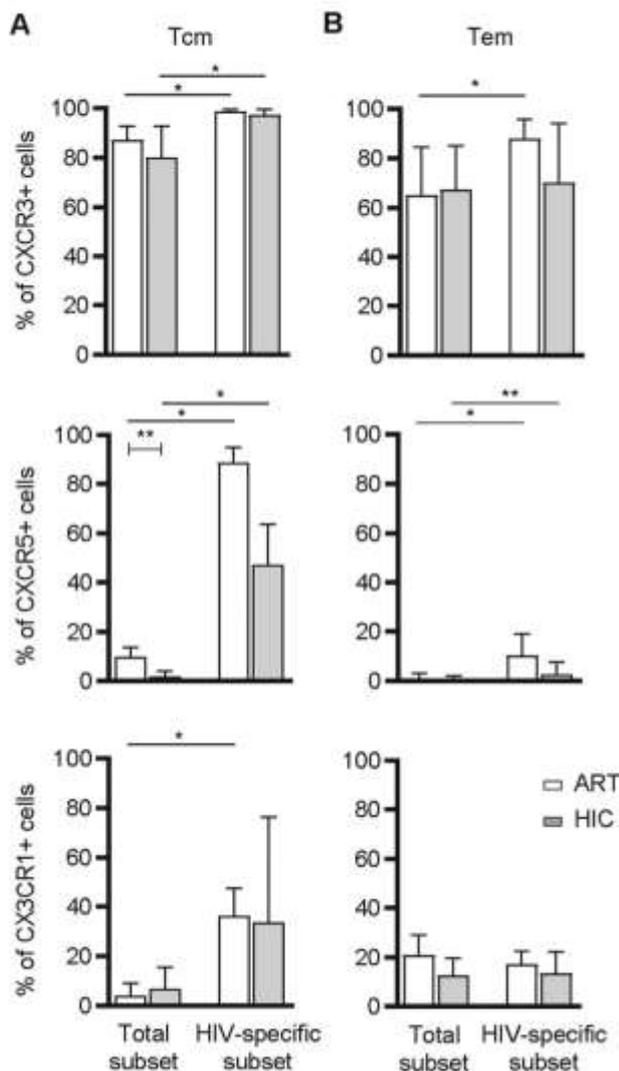
### Higher proportion of CXCR3 and CXCR5 expressing cells in HIV-specific cells

We next questioned whether the chemokine receptor expression observed in the nonspecific CD8<sup>+</sup> T cell compartment reflected the HIV-specific compartment. HIV-specific chemokine receptor expression was evaluated on a second set of HIV-infected patients (8 ART-exposed patients and 10 HICs) (Fig. 5A and B). As observed within nonspecific memory subsets, HIV-specific Tcm subsets exhibited a high proportion of CXCR3<sup>+</sup> cells. The proportions of CXCR3<sup>+</sup> cells among Tcm were nonetheless higher among the HIV-specific compartment compared to their nonspe-



**Figure 4.** PD-1 and KLRG1 expression depends on the chemokine receptor expression profile. (A) The proportions of PD-1<sup>+</sup> and (B) KLRG1<sup>+</sup> cells among the major Tcm fractions: R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> and R3<sup>+</sup>R5<sup>+</sup>X3R1<sup>-</sup> cells in HDs, ART-exposed patients, and HICs. (C) The proportions of PD-1<sup>+</sup> and (D) KLRG1<sup>+</sup> cells among the major Tem fractions: R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> and R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>+</sup> cells in HDs, ART-exposed patients, and HICs. The graphs show the median [IQR] for 10 HDs, 14 ART-exposed patients, and 17 HICs. The groups were compared using a nonparametric, unpaired Kruskal-Wallis test, and paired data were compared with a Wilcoxon test. Statistically significant differences are indicated as follows: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001.

cific counterparts for both ART-exposed patients and HICs. Concerning CXCR5<sup>+</sup> and CX3CR1<sup>+</sup> Tem expression, the proportions of chemokine receptor expressing cells were higher among HIV-specific cells compared to nonspecific compartment, in both ART-exposed and HICs (although it was only a trend for the percentage



**Figure 5.** Differential CXCR3, CXCR5, and CX3CR1 expression and coexpression between total and specific CD8<sup>+</sup> T cells. (A) Percentages of CXCR3, CXCR5, and CX3CR1 expressing cells among HIV-specific or non-specific Tcm CD8<sup>+</sup> T cells in ART-exposed patients (n = 6, white bars), and HICs (n = 6, grey bars). (B) Percentages of CXCR3, CXCR5, and/or CX3CR1 expressing cells among the HIV-specific or nonspecific Tem subset in ART-exposed patients (n = 8, white bars) and HICs (n = 10, grey bars). Statistically significant differences (as determined in a nonparametric paired Wilcoxon test and a nonparametric unpaired Mann-Whitney test) are indicated as follows: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001.

of CX3CR1<sup>+</sup> cells in HICs). Interestingly, the frequency of CXCR5<sup>+</sup> cells among Tcm cells tended to be higher in ART-exposed compared to HICs for HIV-specific cells. A significant difference was observed for HIV nonspecific CD8<sup>+</sup> Tcm cells, albeit at lower proportion.

When considering Tem cells, besides a high CXCR3 expression in HIV-specific CD8<sup>+</sup> cells, the frequencies of CXCR3<sup>+</sup> (for ART-exposed) and CXCR5<sup>+</sup> (for both ART-exposed and HICs) cells were higher in the HIV-specific compared to nonspecific Tem compartment. No significant difference was observed in the propor-

tion of CX3CR1<sup>+</sup> cells between HIV-specific and nonspecific Tem cells. Interestingly, the higher proportion of CXCR5<sup>+</sup> HIV-specific Tem cells was of smaller amplitude than previously observed in Tcm suggesting a higher migratory potential of HIV-specific Tem cells than Tem subset.

Overall, the Tcm fraction was the most affected by the HIV-infection with a significant increase in the CXCR3, CXCR5 proportions (and the CX3CR1 proportion in ARTs). Importantly, a modulation of CX3CR1 was seen on Tcm but not Tem HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. The most drastic change was the increase of the CXCR5 fraction in the HIV-specific Tcm CD8<sup>+</sup> T cells.

## Discussion

Recent research has shown that in the context of a chronic infection, chemokine receptor expression is a critical characteristic of memory CD8<sup>+</sup> T cells [9–13]. Hence, we hypothesized that the CD8<sup>+</sup> T cells' high migratory capacity might be beneficial for the patient by providing immune responses at the crucial sites, that is, sanctuaries of viral persistence and/or altered mucosal sites. In order to better characterize this aspect of controlled chronic HIV infections, we decided to combine chemokine receptor profiling strategies with conventional memory cell phenotyping.

First, we observed that some features were shared by HDs, ART-exposed patients, and HICs. We found that CXCR3 was expressed constitutively in all memory subsets, although the MFI for CXCR3 was higher in Tcm than in Tem — suggesting that CD8<sup>+</sup> memory cells subsets do not respond to IFN-gamma-inducible ligands in the same way [27]. We also observed that cells bearing CXCR5 (the receptor for the B lymphocyte chemoattractant CXCL13, which enables memory CD8<sup>+</sup> T cells to migrate to B cell follicles) and CX3CR1 (the receptor for CX3CL1/fractalkine) were not equally distributed across the memory subsets. CXCR5<sup>+</sup> cells were preferentially found among the Tcm, whereas CX3CR1<sup>+</sup> cells were preferentially found among the Tem subsets. The imbalance in the expression profile of chemokine receptors may influence the recruitment of Tcm to lymphoid organs and Tem to inflamed tissues. Furthermore, consideration of chemokine receptor coexpression revealed another degree of complexity because the three chemokine receptors were not independently expressed. CXCR3 was mostly coexpressed with CXCR5 in Tcm and with CX3CR1 in Tem. It is not clear how chemokine signaling is integrated when two or three chemokine receptors are coexpressed. Coexpression may provide a broader migratory profile that enables migration through different tissues after sequential contact with the respective chemokines. The chemotactic response of both Tcm and Tem cells towards CXCL9/CXCL10/CXCL11 migration buffer confirmed the predominant role of the CXCR3 receptor/ligands pathways, in accordance with the high proportion of CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> memory cells. We did not detect migration of Tcm or Tem CD8<sup>+</sup> T cells toward CXCR5 or CX3CR1 ligands. That may be related to the reduced proportion of cells expressing these markers, although the chemotaxis assay was conducted in HICs that exhibited the higher proportion of CXCR5<sup>+</sup> and CX3CR1<sup>+</sup> Tem

cells. Last, we compared the migratory responses of memory cells toward CXCR3 ligands when used alone or combined with CXCR5 or CX3CR1 ligands. Interestingly, a trend toward higher migration of Tcm was observed when both CXCR3 and CXCR5 ligands were present.

As chemokine receptor expression has been associated with exhaustion [25,28], we investigated the cells' exhaustion and senescence profiles on the basis of their expression of PD-1 and KLRG1, both of which are markers of the immune dysfunctions associated with chronic infection [2,29]. In all study groups, the proportion of PD-1<sup>+</sup> Tcm cells was lower in the R3<sup>+</sup>R5<sup>-</sup>X3R1<sup>-</sup> fraction (i.e. the fraction with the least migratory potential) than in the R3<sup>+</sup>R5<sup>+</sup>X3R1<sup>-</sup> fraction. This difference was not observed among the Tem. A difference in PD-1 expression as a function of the Tem subset's migratory profile might reflect (i) differences in the induction of T cell exhaustion and/or (ii) the exposure to antigens. It may also represent a safety mechanism for regulating T cell activation in the tissues. The proportion of KLRG1<sup>+</sup> cells was strongly correlated with the chemokine receptor profile in both the Tcm and Tem fractions. The physiological relevance of a difference in the proportion of KLRG1<sup>+</sup> expressing cells is not clear because KLRG1 has been described as a marker of not only terminal differentiation/senescence but also tissue residency [30]. Thus, phenotyping chemokine receptor expression among memory subset was helpful to further define heterogeneity for both Tcm and Tem subset identifying the fractions that are the more susceptible to exhaustion.

Second, we evaluated the impact of chronic HIV infection on the chemokine receptor phenotype on both HIV-specific and nonspecific CD8<sup>+</sup> T cells. As a whole, the proportions of CXCR3<sup>+</sup> Tcm and CXCR5<sup>+</sup> Tem CD8<sup>+</sup> T cells were higher in HIV-infected patients than in HDs. Regardless of the type of control, chronic and controlled HIV infection appears to enhance the migratory potential of both Tcm and Tem CD8<sup>+</sup> T cells — albeit through different pathways. Furthermore, HICs and ART-exposed patients exhibit specific chemokine receptor patterns. The proportions of Tcm expressing chemokine receptors were higher in HICs than in HDs. Tem CD8<sup>+</sup> T cells from HICs included low proportions of fractions coexpressing chemokine receptor compared to ARTs. Our results may reflect differences in the amplitude of mucosal alterations that may lead to different mobilization patterns. Considering HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells, the proportions of CXCR3<sup>+</sup> and CXCR5<sup>+</sup> cells were higher in HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells compared to their nonspecific counterparts. The proportions of CX3CR1<sup>+</sup> cells also tended to be increased among Tcm, but not Tem CD8<sup>+</sup> T cells. The high proportion of CXCR5<sup>+</sup> cells among HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells reemphasize the crucial role of CXCR5<sup>+</sup> expression in HIV infection, as already published [22,31]. CXCR5 expression in the absence of CCR7 is a characteristic of follicular CD8<sup>+</sup> Tem, the increase of this marker observed in circulating Tem in HIV-infected patients and may contribute to the control of HIV reservoir in lymphoid organ follicles as suggested in the SIV macaque model [32]. Due to the limited numbers of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells, we were unable to further dissect the combined chemokine

receptor expression. Last, further investigations need to be performed to decipher potential differences between ART-exposed patients and HICs, but will need to take into accounts the natural heterogeneity in the course of infection in ARTs and HICs

In conclusion, our results strongly suggest that migration capacity profiling is relevant for the characterization of the CD8<sup>+</sup> T cell compartment in the context of chronic HIV infection. The addition of migration markers to the standard Tcm/Tem characterization revealed differences in the migratory profile between the Tcm and Tem subsets, between ART-exposed patients and HICs and between HIV-specific and nonspecific CD8<sup>+</sup> T cells. Although the percentage of CXCR3<sup>+</sup> cells is high among memory CD8<sup>+</sup> T cells, CXCR5 expression appears to be the crucial factor modulated during chronic HIV infection: among HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells, a higher proportion of CXCR5<sup>+</sup> Tcm is observed in both ART-exposed and HICs patients.

## Materials and methods

### Study population

Fresh whole blood samples were collected from chronically HIV-1-infected patients, including HICs enrolled in the French HIC cohort (ANRS CO21 CODEX) and long-term ART-exposed HIV-infected patients enrolled in the ANRS CO06 PRIMO cohort. In the absence of any ART, the HICs exhibited the spontaneous control of HIV infection [13] and potent CD8<sup>+</sup> T cell suppression of HIV replication [33]. The main inclusion criteria for the ANRS CO21 CODEX cohort were as follows: HIV infection diagnosed at least 5 years previously, the five last consecutive plasma HIV RNA values <400 copies/mL (median [IQR] testing frequency: 7 months [5–9]), and the absence of ART. HIV-infected patients from the ANRS CO6 PRIMO cohort met the following criteria: ART for more than 4 years, a plasma HIV RNA load <40 copies/mL for more than 2 years. In both the ART-exposed and HIC groups, the selection criteria for the present study were HIV infection diagnosed at least 5 years previously, plasma HIV RNA <40 copies/mL for 2 years prior to inclusion, no coinfections with hepatitis B or C virus. The participants' demographic and laboratory data (plasma HIV RNA, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> cell counts and percentages) were extracted from their medical records. Samples from healthy, noninfected HDs were obtained from the French Blood Agency (*Etablissement Français du Sang*, La Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France). The HDs were matched with the ART-exposed patients for age and gender.

### Ethics statement

All subjects provided their written, informed consent to participation. The CO6 PRIMO and the CO21 CODEX cohort studies were approved by the local investigational review board (CPP Ile de France III and VII, Paris, France; approval references: 1157 and

12–021, respectively). The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

### Blood sample processing and FACS staining

Cytometry experiments were performed in accordance with recommended guidelines [34]. Following incubation of the whole blood samples with human Fc block (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), cells were incubated with fluorophore-labelled antibodies against the following surface markers: CCR7 (BV650, G034H7), CD28 (BV510, CD28.2), CD45RO (BV711, UCHL1), CD27 (FITC, L128), CD8 (APC-H7, SK1), CD3 (BV786, SK7) from BD Biosciences; PD-1 (BV421, EH12-2H7), CXCR3 (PE-Dazzle594, G025H7), CXCR5 (BV605, J252D4), CX3CR1 (APC, 2A9-1) from Biolegend (San Diego, CA, USA); TIGIT (PerCP eFluor710, MBSA43) from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) and KLRG1 (PE-Vio770, REA261) from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). After incubation, red blood cells were lysed using BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences), washed in PBS 1X, and were fixed in 1% paraformaldehyde.

For the detection of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells, cells were enriched by magnetic selection (positive selection) and incubated with matched HLA-peptide complex multimers (unlabeled peptide-HLA class I multimers (Proimmune, Oxford, UK) and PE-labeled dextramer (Immudex, Fairfax, USA)) derived from the HIV Gag, Nef, Pol, and Env proteins. Peptides corresponded to defined CTL epitopes (see Supporting information Table S3). Then, the cells were incubated with PE (Proimmune, Oxford, UK), and then stained as previously described.

Data were acquired with an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (version 10.6.2, FlowJo LLC, Ashland, OR, USA). A t-SNE algorithm in FlowJo was applied to a concatenate of HD samples, using the following parameters: 50 000 CD8<sup>+</sup> T cells per sample of total peripheral blood, and the CCR7, CD45RO, CD28, and CD27 surface markers.

### Chemotaxis assay

Migration assay was performed on whole blood in a Transwell system using a 24-well plate with a 5- $\mu$ m pore size polycarbonate membrane (Corning, NY, USA) as previously described [35]. Human CXCL10, CXCL11, CXCL13, (Immunotools, Friesoythe, Germany), CXCL9 and CX3CL1 (Peprotech, Hamburg, Germany) were diluted in migration medium (RPMI 1640 containing 0.2% Penicillin–Streptomycin (10 000 units/mL), 0.02 M HEPES buffer) at the final concentrations of 500, 400, 1000, 800, and 100 ng/mL, respectively. Chemokines were then added to the lower chamber of the Transwell. Whole blood was diluted at one-third in the migration medium; a volume of 100  $\mu$ L seeded in the upper chamber. All conditions were performed in duplicate. After a 3-h

incubation at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, transmigrated cells from the lower chamber or input cells were washed once in PBS 1X–2% SVF and stained as previously described. Chemotactic index corresponded to the ratio of cells migrated to chemokine versus input.

### Isolation of CD8<sup>+</sup> T cells

CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from whole blood by a magnetic-activated cell sorter using a CD8<sup>+</sup> T cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Auburn, USA). For each patient, CD8<sup>+</sup> T cells were incubated with CD8<sup>+</sup> microbeads (50  $\mu$ L/mL of whole blood) for 15 min at 4°C. Whole blood column was rinsed with 4 mL of PBS 1X. Magnetic labeled cell suspension was applied onto the prepared whole blood column. The column was washed two times with 2 mL of PBS 1X. CD8<sup>+</sup> magnetically labeled cells were flushed out with 4 mL of whole blood column elution buffer.

### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 8, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Groups were compared using a nonparametric, unpaired Kruskal–Wallis or the Mann–Whitney test; if the groups differed significantly, Dunn's post-test was applied. A nonparametric, paired Wilcoxon test or Friedman's test were used for paired data. The threshold for statistical significance was set to  $p < 0.05$  (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Continuous variables were described as the median [IQR].

The study was performed using standard operating procedures, in compliance with good laboratory practice, as recommended by MIATA guidelines [36].

**Acknowledgments:** C.L., O.L., and C.B. conceived and designed the project. A.O. and M.B. carried out experiments. A.O., C.L., F.B., J.-M.D., B.F., B.V., G.S.L., N.N., O.L., and C.B. performed the statistical analyses and helped to interpret the results. C.L., VA-E, A.E., L.M., C.G., O.L., and C.B. provided access to HIV-infected samples and associated clinical data and contributed to the clinical and biological monitoring of patients included in the cohorts. A.O. and C.B. drafted the article. C.B. and O.L. supervised the research. Most of the study participants came from the ANRS CO6-PRIMO and ANRS CO21-CODEX cohorts, and the authors thank the members of the cohorts' respective scientific advisory boards. ANRS (Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales).

**Conflict of interest:** There are no conflict of interest.

**Data availability statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Peer review:** The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/eji.202048943>.

## References

- Klatt, N. R., Chomont, N., Douek, D. C. and Deeks, S. G., Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol. Rev.* 2013. **254**: 326–342.
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W. et al., PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006. **443**: 350–354.
- Lambotte, O., Boufassa, F., Madec, Y., Nguyen, A., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C. et al., HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2005. **41**: 1053–1056.
- Hunt, P. W., Brenchley, J., Sinclair, E., McCune, J. M., Roland, M., Page-Shafer, K., Hsue, P. et al., Relationship between T cell activation and CD4<sup>+</sup> T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 2008. **197**: 126–133.
- Pereyra, F., Palmer, S., Miura, T., Block, B. L., Wiegand, A., Rothchild, A. C., Baker, B. et al., Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J. Infect. Dis.* 2009. **200**: 984–990.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R. and Lipp, M., Lanzavecchia, A., Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999. **401**: 708–712.
- Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M. and Lugli, E., The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets: highlights. *Eur. J. Immunol.* 2013. **43**: 2797–2809.
- Kueberuwa, G., Gornall, H., Alcantar-Orozco, E. M., Bouvier, D., Kapacee, Z. A., Hawkins, R. E. and Gilham, D., CCR7<sup>+</sup> selected gene-modified T cells maintain a central memory phenotype and display enhanced persistence in peripheral blood in vivo. *J. Immunother. Cancer* 2017. **5**: 14.
- Chu, H. H., Chan, S.-W., Gosling, J. P., Blanchard, N., Tsitsiklis, A., Lythe, G., Shastri, N. et al., Continuous effector CD8(+) T cell production in a controlled persistent infection is sustained by a proliferative intermediate population. *Immunity* 2016. **45**: 159–171.
- Gerlach, C., Möseman, E. A., Loughhead, S. M., Alvarez, D., Zwijnenburg, A. J., Waanders, L., Garg, R. et al., The chemokine receptor CX3CR1 defines three antigen-experienced CD8 T cell subsets with distinct roles in immune surveillance and homeostasis. *Immunity* 2016. **45**: 1270–1284.
- Böttcher, J. P., Beyer, M., Meissner, F., Abdullah, Z., Sander, J., Höchst, B., Eickhoff, S. et al., Functional classification of memory CD8(+) T cells by CX3CR1 expression. *Nat. Commun.* 2015. **6**: 8306.
- He, R., Hou, S., Liu, C., Zhang, A., Bai, Q., Han, M., Yang, Y. et al., Follicular CXCR5-expressing CD8<sup>+</sup> T cells curtail chronic viral infection. *Nature* 2016. **537**: 412–416.
- Leong, Y. A., Chen, Y., Ong, H. S., Wu, D., Man, K., Deleage, C., Minnich, M. et al., CXCR5<sup>+</sup> follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles. *Nat. Immunol.* 2016. **17**: 1187.
- Wong, J. K. and Yuki, S. A., Tissue reservoirs of HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS* 2016. **11**: 362–370.
- Heron, S. E. and Elahi, S., HIV infection and compromised mucosal immunity: oral manifestations and systemic inflammation. *Front. Immunol.* 2017. **8**. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00241>
- Mudd, J. C., Panigrahi, S., Kyi, B., Moon, S. H., Manion, M. M., Younes, S.-A., Sieg, S. et al., Inflammatory function of CX3CR1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in treated HIV infection is modulated by platelet interactions. *J. Infect. Dis.* 2016. **214**: 1808–1816.
- Combadière, B., Faure, S., Autran, B., Debré, P. and Combadière, C., The chemokine receptor CX3CR1 controls homing and anti-viral potencies of CD8 effector-memory T lymphocytes in HIV-infected patients. *AIDS* 2003. **17**: 1279–1290.
- Loiseau, C., Requena, M., Nayrac, M., Mavigner, M., Cuzabat, M., Iscache, A. L., Carrere, N. et al., Increased CXCR3<sup>+</sup> T cells impairs recruitment of T-helper type 17 cells via interferon  $\gamma$  and interleukin 18 in the small intestine mucosa during treated HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 2019. **220**: 830–840.
- Groom, J. R. and Luster, A. D., CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.* 2011. **89**: 207–215.
- Yin, X., Wang, Z., Wu, T., Ma, M., Zhang, Z., Chu, Z., Hu, Q. et al., The combination of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 levels during primary HIV infection predicts HIV disease progression. *J. Transl. Med.* 2019. **17**: 417.
- Noel, N., Boufassa, F., Lécuroux, C., Saez-Cirion, A., Bourgeois, C., Dunyach-Remy, C., Goujard, C. et al., Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4<sup>+</sup> T-cell counts in HIV controller patients. *AIDS* 2014. **28**: 467–476.
- Perdomo-Celis, F., Taborda, N. A. and Rugeles, M. T., Circulating CXCR5-expressing CD8<sup>+</sup> T-cells are major producers of IL-21 and associate with limited HIV replication. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2018. **78**: 473–482.
- Ghiglione, Y., Trifone, C., Salido, J., Rhodes, A., Ruiz, M. J., Polo, M. L., Salomón, H. et al., PD-1 expression in HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells before antiretroviral therapy is associated with HIV persistence. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2019. **80**: 1–6.
- Porichis, F. and Kaufmann, D. E., Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 2012. **9**: 81–90.
- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M. R. et al., Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.* 2006. **12**: 1198–1202.
- Streeck, H., Kwon, D. S., Pyo, A., Flanders, M., Chevalier, M. F., Law, K., Jülg, B. et al., Epithelial adhesion molecules can inhibit HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> T-cell functions. *Blood* 2011. **117**: 5112–5122.
- Groom, J. R. and Luster, A. D., CXCR3 in T cell function. *Exp. Cell Res.* 2011. **317**: 620–631.
- Sauce, D., Almeida, J. R., Larsen, M., Haro, L., Autran, B., Freeman, G. J. and Appay, V., PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *AIDS* 2007. **21**: 2005–2013.
- Joshi, N. S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H. K., Urso, D. R., Hagman, J., Gapin, L. et al., Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8<sup>+</sup> T cell fates via the graded expression of T-beta transcription factor. *Immunity* 2007. **27**: 281–295.
- Herndler-Brandstetter, D., Ishigame, H., Shinnakasu, R., Plajer, V., Stecher, C., Zhao, J., Lietzenmayer, M. et al., KLRG1<sup>+</sup> effector CD8<sup>+</sup> T cells lose KLRG1, differentiate into all memory T cell lineages, and convey enhanced protective immunity. *Immunity* 2018. **48**: 716–729.e8.
- Perdomo-Celis, F., Taborda, N. A. and Rugeles, M. T., CD8<sup>+</sup> T-cell response to HIV infection in the era of antiretroviral therapy. *Front. Immunol.* 2019. **10**: 1896.

- 32 Mylvaganam, G. H., Ríos, D., Abdelaal, H. M., Iyer, S., Tharp, G., Mavigner, M., Hicks, S. et al., Dynamics of SIV-specific CXCR5<sup>+</sup> CD8 T cells during chronic SIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017. **114**: 1976–1981.
- 33 Saez-Cirion, A., Lacabaratz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., Barré-Sinoussi, F. et al., HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. **104**: 6776–6781.
- 34 Cossarizza, A., Chang, H., Radbruch, A., Akdis, M., André, I., Annunziato, F., Bacher, P. et al., Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur. J. Immunol.* 2017. **47**: 1584–1797.
- 35 Maciejewski-Duval, A., Meuris, E., Bignon, A., Aknin, M.-L., Balabanian, K., Faivre, L., Pasquet, M. et al., Altered chemotactic response to CXCL12 in patients carrying GATA2 mutations. *J. Leukoc. Biol.* 2016. **99**: 1065–1076.
- 36 Janetzki, S., Britten, C. M., Kalos, M., Levitsky, H. I., Maecker, H. T., Melief, C. J. M., Old, L. J. et al., "MIATA"—minimal information about T cell assays. *Immunity* 2009. **31**: 527–528.

**Abbreviations:** **ART:** antiretroviral therapy · **E:** Effector cell · **HD:** healthy donor · **HIC:** HIV controller · **N:** naive cell · **MFI:** median fluorescence intensity · **T<sub>cm</sub>:** central memory T cell · **TE:** Terminal effector cell · **T<sub>em</sub>:** effector memory T cell · **t-SNE:** T-distributed stochastic neighbor embedding

**Full correspondence:** Dr. Christine Bourgeois, Faculté de Médecine, INSERM U1184, 63 Avenue du Gabriel Péri, F-94275 Le Kremlin-Bicêtre, Paris, France.  
e-mail: christine.bourgeois@universite-paris-saclay.fr

Received: 25/8/2020

Revised: 17/3/2021

Accepted: 3/5/2021

Accepted article online: 8/5/2021

**Supplemental Table 1: The demographic and clinical characteristics of patients for chemotaxis assay**

	HICs
N	8
Age (years)	51.5 [45.5; 61]
Male (%)	62.5%
Estimated duration of HIV infection	19 [14; 21]
Plasma HIV-RNA (copies/mL)	<40 [<40; 52.7]
CD4+ (/mL)	810 [592; 1050]

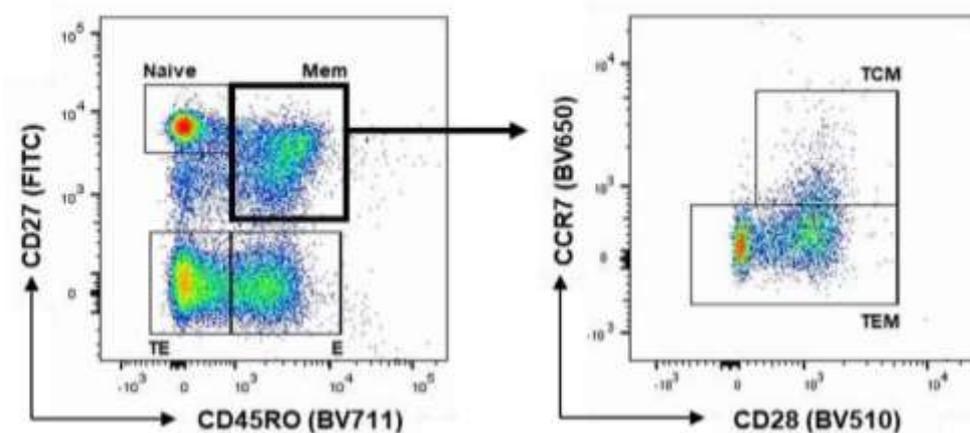
**Supplemental Table 2: The demographic and clinical characteristics of patients for HIV-specific CD8+ T cells study**

	ART-exposed patients	HICs	<i>P-value</i>
N	8	10	
Age (years)	48 [45.3; 60]	57 [49.5; 62.8]	ns
Male (%)	62.5%	60%	ns
Estimated duration of HIV infection	15 [4.3; 31.3]	24 [15; 34.3]	ns
Plasma HIV-RNA (copies/mL)	<40 [<40; <40]	59.5 [<40; 340]	0.013
CD4+ (/mL)	619 [ 536; 886]	790 [643; 985]	ns

**Supplemental Table 3: Peptides corresponding to defined CTL Epitopes for HIV specific CD8 T cell staining**

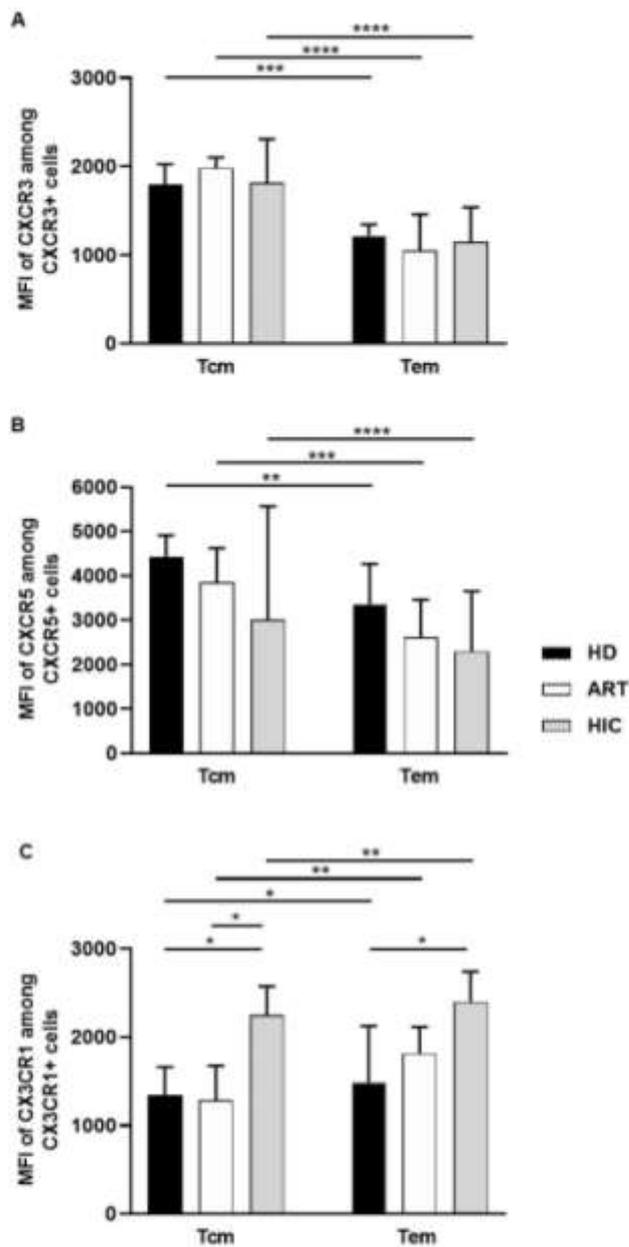
HLA type specificity	Virus	Protein	Epitope	Sequence
B*57:01	HIV	Gag	147-155	ISPRTLNAW
B*57:01	HIV	Gag	162-172	KAFSPEVIPMF
B*57:01	HIV	Gag	240-249	TSTLQEQIGW
B*57:01	HIV	Nef	116-124	HTQGYFPDW
A*02:01	HIV	Gag	77-85	SLYNTVATL
A*02:01	HIV	Pol	476-484	ILKEPVHGV
A*03:01	HIV	Gag	20-28	RLRPGGKKK
A*03:01	HIV	Nef	73-82	QVPLRPMTYK
A*11:01	HIV	Gag	84-92	AVDLSHFLK
A*24:02	HIV	Nef	134-143	RYPLTFGWCY
B*07:02	HIV	Env	848-856	IPRRIRQGL
B*08:01	HIV	Nef	90-97	FLKEKGGL
B*08:01	HIV	Gag	259-267	GEIYKRWII
B*27:05	HIV	Gag	263-272	KRWIILGLNK
B*35:01	HIV	Pol	342-350	NPDIVIQY

**Supplemental Figure 1: Gating strategy**



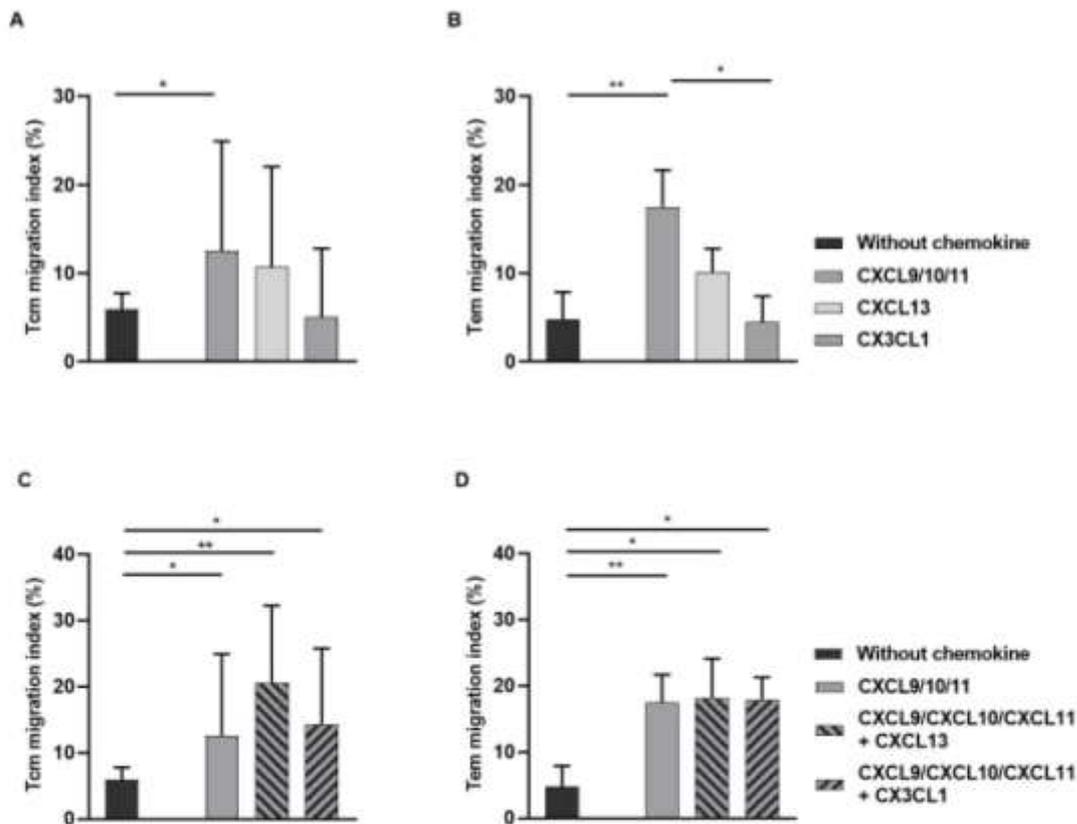
Representative dot plots of the gating strategies used to analyze memory and effector compartment for an ART-exposed patient. The CD8<sup>+</sup> T cells were identified by CD27 and CD45RO expression and then the CCR7 and CD28 expression profiles. Cells were differentiated into naive T cells (N: CD27<sup>high</sup>, CD45RO<sup>-</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>), central memory cells (Tcm: CD27<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>), effector memory cells (Tem: CD27<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, CCR7<sup>-</sup>), effector T cells (E: CD27<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, CCR7<sup>-</sup>, CD28<sup>-</sup>), and terminal effector T cells (TE: CD27<sup>-</sup>, CD45RO<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>, CD28<sup>-</sup>).

**Supplemental Figure 2: The MFI for CXCR3, CXCR5 and CX3CR1 among memory cells**



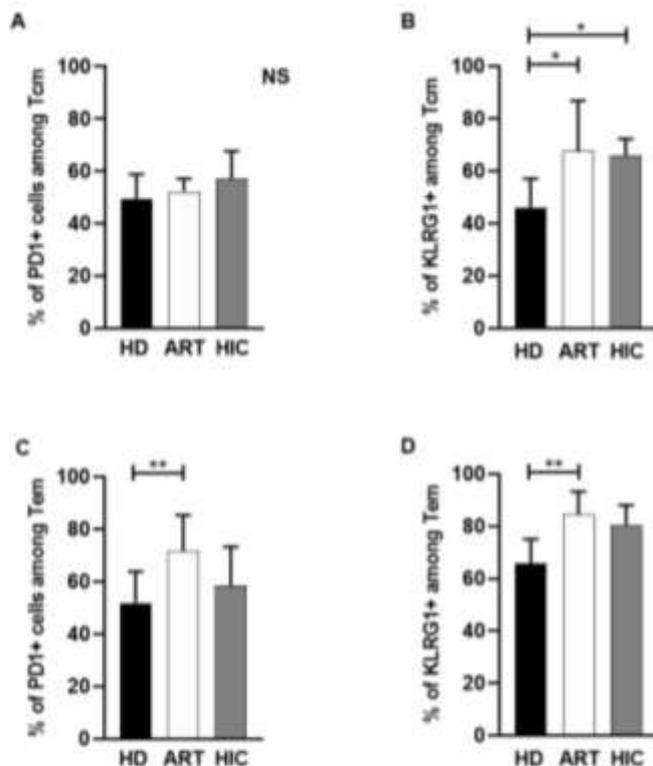
The MFI for (A) CXCR3, (B) CXCR5 and (C) CX3CR1 among respectively CXCR3+, CXCR5+ and CX3CR1+ memory cells in all groups. The graphs show the median value and IQR for 15 HDs (black bars), 16 ART-exposed patients (white bars), and 28 HICs (grey bars). Statistically significant differences (as determined in a non-parametric paired Wilcoxon test and a non-parametric unpaired Kruskal-Wallis test) are indicated as follows: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

**Supplemental Figure 3: The migratory profile of Tcm and Tem cells with CXCR3, CXCR5 or CX3CR1 ligands**



Transwell migration assay of whole blood samples collected from HICs in the presence of the indicated chemokines in the lower chamber (n = 8). Each bar represents median chemotactic index (representing the percentage of migration towards the lower chamber reported to the cellular input) for (A) Tcm subset, (B) Tem subsets upon CXCR3, CXCR5 or CX3CR1 ligands, and chemotactic index of (C) Tcm subset, (D) Tem subsets upon CXCR3 alone or combined with CXCR5 or CX3CR1 ligands. The groups were compared using a nonparametric paired Friedman test. Statistically significant differences are indicated as follows: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

Supplemental Figure 4: PD-1 and KLRG1 expression on Tcm and Tem subsets



(A) The proportions of PD-1<sup>+</sup> and (B) KLRG1<sup>+</sup> cells among Tcm in HDs, ART-exposed patients, and HICs. (C) The proportions of PD-1<sup>+</sup> and (D) KLRG1<sup>+</sup> cells among Tem in 15 HDs, 16 ART-exposed patients, and 28 HICs. The groups were compared using a nonparametric, unpaired Kruskal–Wallis test. Statistically significant differences are indicated as follows: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

**Article 2.** *Détection du SARS-CoV-2 dans le tissu adipeux sous-cutané et non dans le tissu adipeux viscéral, et perturbation de l'homéostasie lymphocytaire dans ces deux tissus chez le macaque*

A. Olivo, R. Marlin, T. Lazure, P. Maisonnasse, L. Bossevot, C. Mouanga, J. Lemaitre, G. Pourcher, S. Benoist, R. Le Grand, . Lambotte, N. Dereuddre-Bosquet, C. Bourgeois  
Commun Biol. 2022 Jun 3;5(1):542

- Résumé

L'association entre l'obésité et la sévérité de la COVID-19 est bien décrite mais les mécanismes physiopathologiques impliqués n'ont pas encore été identifiés. Parmi les mécanismes avancés, on retrouve l'inflammation systémique associée à l'obésité qui affecte les réponses immunitaires locales. Cette inflammation chronique pourrait contribuer à la tempête cytokinique associée aux formes sévères de COVID-19. Mais la COVID-19 est aussi une pathologie multi-organes qui peut affecter directement le TA. Une hypothèse reposait sur l'infection directe du TA par le SARS-CoV-2 qui pourrait altérer les fonctions métaboliques et immunitaires de ce tissu et ainsi favoriser le développement de réponses pro-inflammatoires excessives.

L'objectif de l'étude était de déterminer les impacts directs et indirects de l'infection par le SARS-CoV-2 sur le TASC et le TAV. L'étude a été menée dans un modèle simien.

Nous avons d'abord étudié les paramètres de l'infection. Le modèle est un modèle d'infection modérée, sans modification des concentrations plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires produites par le TA (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ). Parmi les paramètres métaboliques, nous observons une tendance à une diminution du taux de leptine associée à une augmentation de la concentration d'adiponectine dans le plasma, suggérant un impact de l'infection sur le TA. Dans ce modèle d'infection modérée, le SARS-CoV-2 a été détecté à J7 dans le TASC, mais pas le TAV ou le TA épiqueur (TAE). Aucun virus n'a été détecté à J43 post-infection suggérant une infection transitoire du TA. Plusieurs mécanismes d'entrée du virus dans le TA sont envisagés dont les récepteurs ACE-2 et TMPRSS2, l'expression de l'ACE-2 s'est avérée significativement plus élevée dans le TASC que dans le TAV alors que nous n'avons pas détecté d'expression d'ARNm de TMPRSS2 dans aucun échantillon. Nous avons

## **Résultats**

---

enfin cherché à connaître l'impact de l'infection sur les réponses immunitaires du TA. Nous n'avons observé aucun changement quantitatif significatif qu'il s'agisse de la proportion de CD45<sup>+</sup>, ou des fractions T CD4 ou T CD8, J7 après infection. Toutefois, l'étude des profils d'activation/différenciation/résidence des LyT a permis de montrer un effondrement de la proportion de LyT CD69<sup>+</sup> dans TASC et TAV à J7 post-infection.

Pour conclure cette étude, menée dans un modèle d'infection modérée et précoce, nous avons démontré que le SARS-CoV-2 a un impact sur le TA (i) par l'infection directe sur le TASC, et (ii) par des effets de proximité sur les TA non infectés et infectés.

# communications biology

ARTICLE


<https://doi.org/10.1038/s42003-022-03503-9>

OPEN

## Detection of SARS-CoV-2 in subcutaneous fat but not visceral fat, and the disruption of fat lymphocyte homeostasis in both fat tissues in the macaque

Anaëlle Olivo<sup>1</sup>, Romain Marlin<sup>1</sup>, Thierry Lazure<sup>2</sup>, Pauline Maisonnasse<sup>1</sup>, Laetitia Bossevoit<sup>1</sup>, Christelliah Mouanga<sup>1</sup>, Julien Lemaitre<sup>1</sup>, Guillaume Pourcher<sup>3,4</sup>, Stéphane Benoist<sup>5</sup>, Roger Le Grand<sup>1</sup>, Olivier Lambotte<sup>1,6,7</sup>, Nathalie Dereuddre-Bosquet<sup>1,7</sup> & Christine Bourgeois<sup>1,7</sup>✉

The well documented association between obesity and the severity of SARS-CoV-2 infection raises the question of whether adipose tissue (AT) is impacted during this infection. Using a model of SARS-CoV-2 infection in cynomolgus macaques, we detected the virus within subcutaneous AT (SCAT) but not in visceral AT (VAT) or epicardial AT on day 7 post-infection. We sought to determine the mechanisms responsible for this selective detection and observed higher levels of angiotensin-converting-enzyme-2 mRNA expression in SCAT than in VAT. Lastly, we evaluated the immunological consequences of SARS-CoV-2 infection on AT: both SCAT and VAT T cells showed a drastic reduction in CD69 expression, a standard marker of resident memory T cell in tissue, that is also involved in the migratory and metabolic properties of T cells. Our results demonstrate that in a model of mild infection, SCAT is selectively infected by SARS-CoV-2 although changes in the immune properties of AT are observed in both SCAT and VAT.

<sup>1</sup> Université Paris-Saclay, CEA, INSERM UMR-1184, Center for Immunology of Viral, Auto-immune, Hematological and Bacterial Diseases (IMVA-HB/IDMIT), 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France. <sup>2</sup> Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service d'anatomo-pathologie, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France. <sup>3</sup> Obesity Center, Department of Digestive, Oncologic and Metabolic Surgery, Institut Mutualiste Montsouris, 75014 Paris, France. <sup>4</sup> Centre de Recherche en Épidémiologie et Santé des Populations (CESP), Inserm, Université Paris-Saclay, 94800 Villejuif, France. <sup>5</sup> Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, GHU Paris-Saclay, Hôpital Bicêtre, Service de Chirurgie Digestive et Oncologique, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France. <sup>6</sup> Université Paris-Saclay, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, GHU Paris-Saclay, Hôpital Bicêtre, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France. <sup>7</sup> These authors contributed equally: Olivier Lambotte, Nathalie Dereuddre-Bosquet, Christine Bourgeois. ✉email: [christine.bourgeois@universite-paris-saclay.fr](mailto:christine.bourgeois@universite-paris-saclay.fr)

The association between obesity and the severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19, caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)) is well documented<sup>1–7</sup> along with age, male sex, and comorbidities, obesity is a major risk factor<sup>8–11</sup>. The association between obesity and severity has already been described for other viral disease. Influenza is the prototypical example<sup>12,13</sup>, although there are notable exceptions<sup>14–16</sup>. The pathophysiological mechanisms underlying the greater severity of COVID-19 in obese individuals have yet to be identified but presumably include (i) factors that are common to all infections, and (ii) factors that are more specific to infections by SARS-CoV-2. Due to the variety of impairments associated with obesity (which go far beyond simply having excess adipose tissue (AT)), various mechanisms have been considered<sup>17–19</sup>. They range from the mechanical pressure on the lungs caused by visceral obesity<sup>20–22</sup> to metabolic disorders affecting first the AT and then systemic immune responses<sup>23</sup> and/or epithelial cells<sup>24</sup>. Obesity is also associated with activation of the renin-angiotensin system (notably in AT)<sup>25</sup>, hypercoagulability<sup>26</sup>, and comorbidities (e.g. type II diabetes, hypertension, and dyslipidemia) that are major risk factors for severe forms of COVID-19.

A major underlying mechanism is the systemic, low-grade inflammation associated with obesity that affects local immune responses (first in AT and then in other tissues) and subsequently induces systemic inflammation<sup>27</sup>. This chronic inflammation might contribute to the cytokine storm associated with severe forms of COVID-19<sup>28</sup>. Indeed, AT is central to this inflammatory profile because its endocrine activity shifts from anti-inflammatory cytokine production (e.g. IL-6, TNF- $\alpha$ , and MCP-1) in obese individuals. Elevated levels of these three cytokines have been identified in severe forms of COVID-19<sup>29</sup>. Among the pro-inflammatory factors specifically expressed more in obese individuals, the pro-inflammatory hormone leptin is thought to be involved in COVID-19<sup>30</sup>. On the systemic level, obesity is also associated with free fatty acid overload<sup>31</sup>, hyperglycemia<sup>32</sup>, and high levels of oxidative stress<sup>33</sup>, all of which contribute to sustained inflammation. Activation of the complement system<sup>34</sup> and disruption of vitamin D availability<sup>35</sup> might also contribute to pro-inflammatory responses.

Furthermore, it was recently shown that CD8 T cells in AT have a direct anti-infective activity<sup>36</sup>, and that obesity has an impact on these T cell responses<sup>37</sup>. Lastly, the documented expression of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in AT<sup>38</sup> has also raised the question as to whether or not AT can be directly targeted by SARS-CoV-2 and contributes to the pathophysiology of COVID-19<sup>39,40</sup> by directly impacting the AT's metabolic and immune properties. This hypothesis is consistent with the notion that the COVID-19 is a multi-organ pathology that can also directly affect AT functions. Direct infection by SARS-CoV-2 might alter the AT's metabolic and immune functions and thus favor the development of excessive, pro-inflammatory responses. SARS-CoV-2 infection might be even more harmful in obese individuals because it might synergize with pre-existing quantitative and qualitative defects in AT. The detection of SARS-CoV-2 in AT also prompts the question of whether this tissue is a viral reservoir and whether it contributes to "long COVID-19".

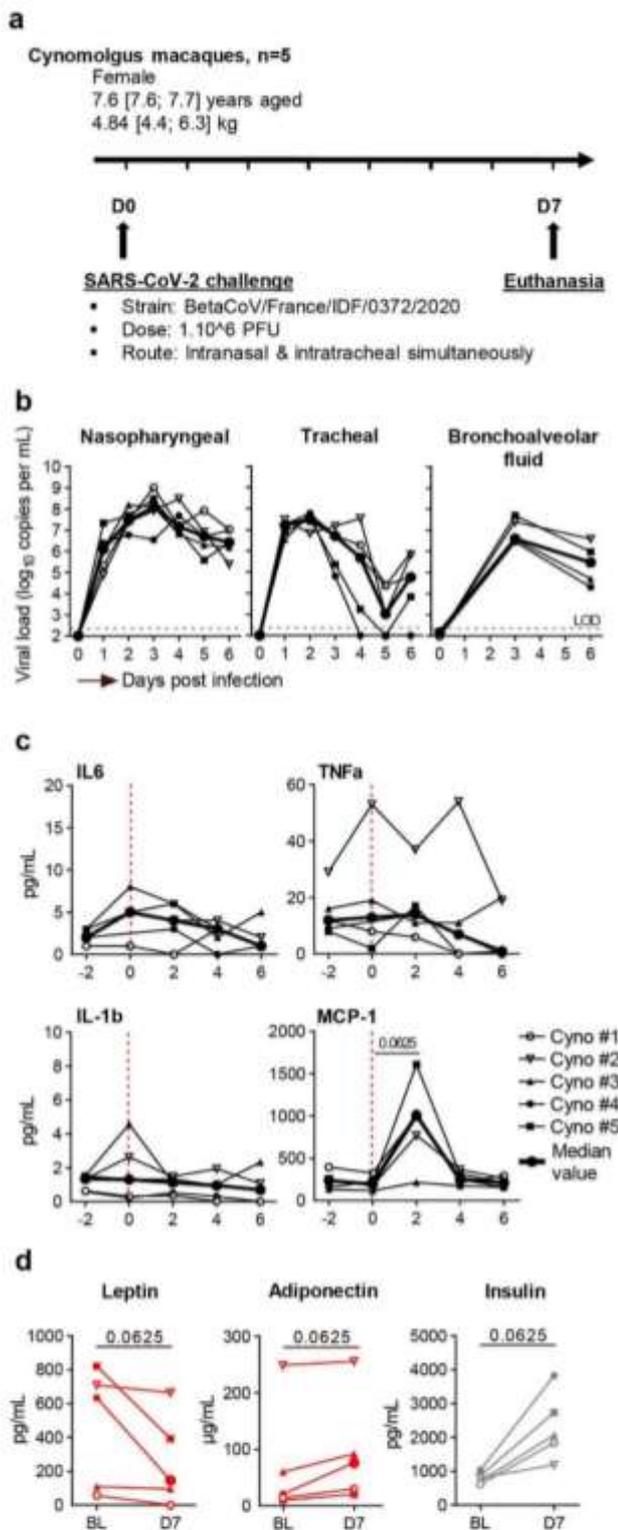
Given that AT is the pathophysiological core feature of obesity, the primary objective of the present work was to determine the direct and indirect impacts of SARS-CoV-2 infection on both subcutaneous AT (SCAT) and visceral AT (VAT). Both tissues exhibit specific metabolic and immune features<sup>41–43</sup>. Our preliminary goal was to confirm the presence of SARS-CoV-2 in AT. Although the literature data on this topic are scarce, recent publications demonstrate the infection of adipocytes either in vitro assay or on autopsic samples for patients having died from COVID<sup>44–48</sup>. The existence of AT infection in the context of

mild infection has not been addressed. We studied a model of experimental SARS-CoV-2 infection in cynomolgus macaques<sup>49</sup>; these non-human primates (NHPs) showed transient radiographic lung abnormalities (within 2–5 dpi), evidence of T cell activation, mild lymphopenia, and neutrophilia. We screened for SARS-CoV-2 in abdominal SCAT, VAT, and epicardial AT (EpAT), since the latter has been identified as a site of major inflammation<sup>50</sup>. We also performed a standard analysis of the immune compartments of SCAT and VAT, with a focus on CD8 T cells and on T cell markers (such as CD69, a marker of activation and residency in tissue<sup>51,52</sup>, and PD-1<sup>53</sup>, a marker associated with chronic infection and exhaustion) that are strongly expressed in AT. Although we studied a small number of animals, we detected SARS-CoV-2 in SCAT but not in VAT or EpAT. Interestingly, we also observed severe changes in the proportions of CD69<sup>+</sup> and PD-1<sup>+</sup> cells in both SCAT and VAT - suggesting that the systemic inflammatory response also affected AT.

## Results

**The animal cohort.** A total of ten cynomolgus macaques were included. The infected group comprised five females, which were infected by combined intranasal and intratracheal inoculation of SARS-CoV-2 (the strain first isolated in France: BetaCoV/France/IDF/0372/2020 SARS-CoV-2). The median [interquartile range (IQR)] age was 7.6 years [7.6; 7.7], and the median weight was 7.6 kg [7.6; 7.7]. The uninfected (control) group also comprised five females (median age: 5.4 years [5.4; 7.0]; median weight: 6.7 kg [3.8; 7.1]). The infected and uninfected groups did not differ significantly with regard to bodyweight but differed in age ( $p = 0.0079$ ). The infection and follow-up protocols are summarized in Fig. 1a. Macaques were inoculated on day 0 with  $1.0 \times 10^6$  PFU of SARS-CoV-2. Nasopharyngeal and tracheal swabs were collected daily between 0 and 7 dpi. Macaques were euthanized at 7 dpi, and selected fluids (nasopharyngeal and tracheal swabs) and tissues (SCAT, VAT, and EpAT) were collected at sacrifice for subsequent viral load, molecular and immunological assays.

We first confirmed that SARS-CoV-2 infection had occurred by analyzing the viral loads in nasopharyngeal swabs, tracheal swabs, and bronchoalveolar fluids. As mentioned above, the virus was detected in all five infected macaques and at all three respiratory tract sites (Fig. 1b). The viral load in nasopharyngeal swabs peaked between 1 and 6 dpi, with a median peak value of 8.1 log<sub>10</sub> copies/mL at 3 dpi. The viral loads then fell progressively but were above the assay's limit of detection throughout the course of the study. In tracheal swabs, the viral load peaked at 2 dpi, with a median peak value of 7.5 log<sub>10</sub> copies/mL at 3 dpi. The viral load fell rapidly between 3 and 5 dpi but we observed a viral rebound shortly before the time of euthanasia, with a median value of 4.8 log<sub>10</sub> copies/mL at 6 dpi. Mild clinical signs and weight loss (median (range): 2.5% (1.4–4.2) of bodyweight) were observed. Biological monitoring of the inflammatory response in the blood revealed a trend towards an increase in MCP-1 at 2 dpi. No change in the concentrations of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , cytokines known to be produced by AT in inflammatory contexts were detected between d0 and 7 dpi (Fig. 1c). We also measured the impact of the infection on metabolic parameters, such as adiponectin and leptin, predominant cytokines produced by AT, and insulin as AT dysfunction has also been associated to the insulin pathway (Fig. 1d). At 7 dpi, a trend towards a decreased leptin level associated to increased adiponectin concentration in the plasma, suggesting AT was indeed impacted during SARS-CoV-2 infection. Finally, we also observed a trend towards increased insulin level at 7 dpi. Collectively, we observed both metabolic and inflammatory changes associated with the SARS-CoV-2 infection induced in the cynomolgus macaque model, in accordance with previous publications<sup>49</sup>.

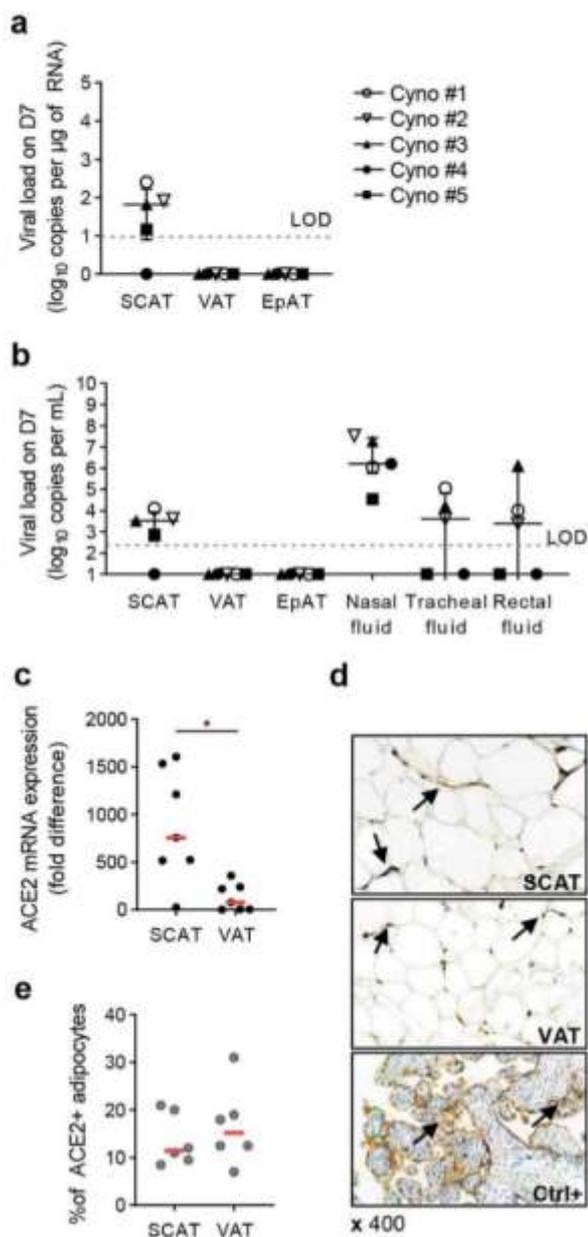


**Fig. 1** Study design and determination of the viral load in the respiratory tract. **a** Experimental design, with the intratracheal and intranasal inoculation of the BetaCoV/France/IDF/0372/2020 A viral strain in NHPs (cynomolgus macaques). **b** Changes over time in the SARS-CoV-2 load in nasopharyngeal swabs (left panel), tracheal swabs (middle panel), and bronchoalveolar fluids (right panel) for the five infected NHPs tested. Viral loads were determined in an RT-PCR assay. The estimated limit of detection (represented by the dashed horizontal line) was  $2.3 \log_{10}$  copies RNA/mL. **c** Dynamic of cytokine plasmatic concentrations during SARS-CoV-2 infection: IL-6 (top left), TNF- $\alpha$  (top right), IL-1 $\beta$  (bottom left), MCP-1 (bottom right). **d** Changes in plasma leptin concentrations (left panel, adiponectin (middle panel) and insulin (right panel) at baseline (BL) and D7 after infection. Each NHP is represented by a single symbol ( $n = 5$  independent animals), and the median viral loads are shown as a bold line. The values were compared in a Friedman test with Dunn's multiple comparison post-test. Statistically significant differences are indicated as follows: \* $p < 0.05$ .

load of  $1.82 \log_{10}$  copies/ $\mu$ g RNA [0.90; 2.23] (Fig. 2a). The virus was never detected in VAT or EpAT but was detected consistently in nasopharyngeal swabs (five out of five animals) and less consistently in tracheal swabs or rectal fluids (3 out of 5) (Fig. 2b). The median viral loads (and IQR) in nasopharyngeal, tracheal and rectal fluid samples were  $6.2$  [5.77; 7.42],  $3.6$  [0; 4.82] and  $3.4$  [0; 5.85]  $\log_{10}$ /ml, respectively whereas the median viral load in SCAT lysate was  $3.5 \log_{10}$ /ml [2.57; 3.93]. It is noteworthy that when the virus could not be detected in an animal's SCAT, it was also not detected in tracheal swabs or rectal fluid at the same timepoint. In contrast, one animal did not have a detectable viral load in tracheal and rectal fluids but still had virus in the AT. An important question is the long-term persistence of the virus in the SCAT. We had the opportunity to check the viral load in five male animals at 43 dpi. No virus was detected at this later timepoint suggesting a transient infection of AT.

**Higher expression of ACE2 in SCAT than in VAT.** The presence of virus in SCAT has also been demonstrated in the setting of influenza<sup>54</sup>, suggesting that this tissue has specific metabolic, immune and/or vascular properties. However, SARS-CoV-2's infectious cycle is highly dependent on the expression of various entry receptors, such as ACE2 and TMPRSS2. We therefore measured the mRNA expression of ACE2 in SCAT and VAT samples from seven cynomolgus macaques (five infected with SARS-CoV-2, 7 dpi: one animal with a chronic simian immunodeficiency virus infection, and one uninfected animal) (Fig. 2c). The small size of the EpAT samples prevented us from assaying them for ACE2 expression. ACE2 mRNA expression was found to be significantly (7-fold) higher in SCAT than in VAT whereas TMPRSS2 mRNA expression was not detected in all samples. Overall, these findings provide a rationale for the infection of SCAT (but not VAT or EpAT) during SARS-CoV-2 infection, although high heterogeneity is observed among SCAT samples. Due to the uncertainties related to mRNA expression as ACE2 expression is also highly regulated by age, sex, metabolic context, AT composition or SARS-CoV-2 infection<sup>45,55,56</sup>, we also confirmed at the protein level the expression of ACE2 in AT by immunohistochemistry. For technical reason (no ACE2 antibody available for the cynomolgus model), this experiment was performed on human AT collected from male and female donors. The median of age was 54.1 [38.1–69.6] years and the body mass index was 33 [27.5–40.6]. We detected ACE2 in the cytoplasm of the adipocytes, below the plasmic membrane and close to the nucleus (Fig. 2d). Interestingly, contrary to the mRNA data, we observed a similar proportion of adipocytes expressing ACE2 in SCAT and VAT, 10–15% of adipocytes expressed ACE2. (Fig. 2e). This discrepancy between mRNA

**Detection of SARS-CoV-2 in subcutaneous AT.** We next established whether or not SARS-CoV-2 could be detected in AT. Using an RT-PCR assay, we measured the infected animals' viral loads in SCAT, VAT, EpAT, and nasopharyngeal, tracheal and rectal fluids 7 dpi (i.e. after euthanasia). SARS-CoV-2 was detected in the SCAT from 4 of the 5 infected animals (80%), with a median viral



**Fig. 2** Detection of SARS-CoV-2 in SCAT, and higher levels of ACE2 mRNA expression in SCAT than in VAT. Characterization of the AT during SARS-CoV-2 infection in cynomolgus macaques, with quantification of SARS-CoV-2 RNA and the expression of the cell-entry receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). **a** Quantification of SARS-CoV-2 RNA in SCAT, VAT, and EpAT and IQR. The estimated limit of detection (represented by the dashed horizontal line) was 9.5 copies/µg of RNA. The median and errors bar shown as interquartile [IQR] are indicated. **b** The viral loads in SCAT, VAT and EpAT lysate, and the nasal, tracheal, and rectal fluids at euthanasia and IQR (7 dpi). The estimated limit of detection (represented by the dashed horizontal line) was 2.3 log<sub>10</sub> copies RNA/mL. The median and errors bar shown as interquartile [IQR] are indicated. Viral loads were determined in an RT-PCR assay. Each NHP is represented by a single symbol (*n* = 5). **c** Semi-quantitative measurement of ACE2 mRNA expression in SCAT and VAT, normalized against the *PPIA* housekeeping gene. Data were generated from SCAT and VAT collected from 7 NHPs. Each animal is represented by a pair of linked points. The graph shows the fold-difference in ACE2 expression. The values were compared in a paired nonparametric Wilcoxon test. Statistically significant differences are indicated as follows: \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.0001. **d** Immunohistochemical analysis of ACE-2 expression in human AT. ACE-2 expression was analyzed in SCAT (upper), VAT (middle) and placenta as positive control (lower). Brown staining for ACE2, blue staining for DAPI. **e** Proportion of adipocytes expressing ACE-2 at the protein levels in human adipose tissue samples from non-COVID patients. Each patient is represented by a symbol (*n* = 6 independent patients, *n* = 6 SCAT and *n* = 6 VAT). The values were compared in a paired nonparametric Wilcoxon test.

and protein data may reflect the different composition of AT in SCAT and VAT: due to the higher proportion of stromal vascular cells in VAT, the expression of ACE2 mRNA in whole VAT may appear lower than what is observed in SCAT. Further investigation will be required to understand the mechanisms regulating ACE2 but we confirm the expression of ACE2 in AT, both in cynomolgus macaques and humans.

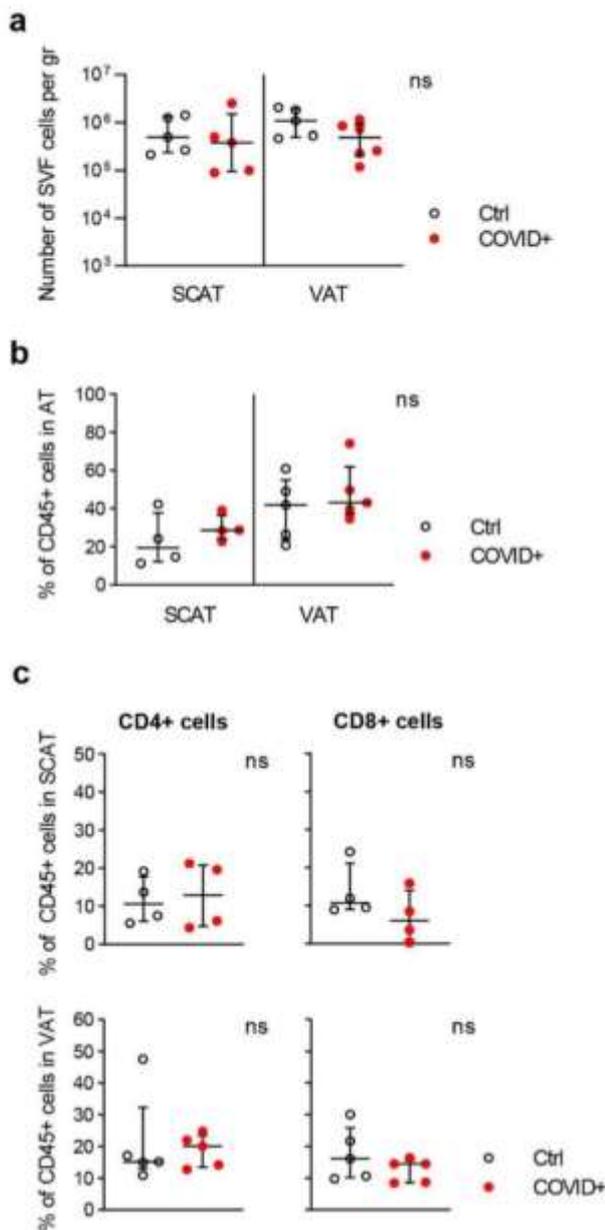
**SARS-CoV-2 infection did not affect the proportions of CD4 and CD8 T cells in SCAT or VAT.** The immune compartment of AT is critically involved in regulation of the tissue's metabolic activity and the development of low-grade inflammation. Furthermore, AT is also a site where memory CD8 T cells with anti-infective immune functions accumulate. Since the direct infection of AT might induce major local immune activation and disrupt the tissue's endocrine functions, we next used flow cytometry to evaluate the impact of SARS-CoV-2 infection on the immune compartment in fresh SCAT and VAT samples. As a control, we

reanalyzed data from earlier studies of fresh samples from animals not infected with SARS-CoV-2. As a prerequisite, we compare the number of stromal vascular cells collected following AT dissociation. No significant difference in SVF cell numbers was observed in the SCAT and VAT collected from SARS-CoV-2 infected animals compared to control animals (Fig. 3a). Our analyses focused on the T cell fractions, and the gating strategy is shown in Supplementary Fig. 1. We first examined the proportion of CD45<sup>+</sup> cells in the AT's stromal vascular fraction (SVF), as a marker of change in AT SVF composition. As shown in Fig. 3b, the infected and non-infected macaque groups did not differ significantly in terms of the proportion of CD45<sup>+</sup> cells in the SCAT or the VAT. The median [IQR] proportion of CD45<sup>+</sup> cells in SCAT SVF was 28.6% [24.3; 36.5] in the infected group and 19.3% [12.1; 37.8] in the control group. In VAT SVF, the median [IQR] proportion was 43.1% [37.2; 61.9] in the infected group and 41.9% [23.6; 55.0] in the control group.

We next determined the effect of SARS-CoV-2 infection on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> distribution among CD45<sup>+</sup> cells (Fig. 3c); AT CD4 and CD8 T cells have antiviral properties, are involved in the metabolic regulation of AT<sup>52,57</sup>, and are severely reduced in the blood of patients with severe forms of COVID-19. There was no significant difference between infected and non-infected macaques in the proportion of CD4 T cells in SCAT or in VAT. The same was true for the proportion of CD8 cells.

Overall, we did not observe major quantitative changes in the proportion of CD45<sup>+</sup> cells or CD4 and CD8 T cell fractions in SCAT and VAT at 7 dpi.

**SARS-CoV-2 infection is associated with a drastic reduction in CD69 expression on T cells from SCAT and VAT.** Although the infection-associated changes in AT T cell proportions were limited, we also analyzed the expression of standard T cell markers (such as PD-1 and CD69) and other markers of cell activation



**Fig. 3 Slight changes in the AT T cell compartment seven days after SARS-CoV-2 infection vs. controls.** Comparison of the number of SVF cells per gram of AT, the proportions of CD45<sup>+</sup> cells, CD8 T cells and CD4 T cells in d7 SARS-CoV-2 animals vs. age-matched, sex-matched, weight-matched control (uninfected) cynomolgus macaques. **a** The number of SVF cells per gram of AT. **b** CD45<sup>+</sup> cells as a proportion of live cells in the SVF from SCAT and VAT, as determined by flow cytometry. **c** The proportions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells among CD45<sup>+</sup> SVF cells from SCAT and VAT. The graphs show data from uninfected NHPs (black open circles:  $n = 4$  for SCAT,  $n = 5$  for VAT) and from SARS-CoV-2-infected NHPs (open circles with a red point:  $n = 4$  for SCAT,  $n = 5$  for VAT). The median [IQR] proportion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in SCAT SVF was 12.9% [4.8; 20.8] and 6.0% [1.0; 14.1] respectively in the infected group and 10.6% [6.0; 17.8] and 10.8% [9.1; 21.1] respectively in the control group. In VAT SVF, the median [IQR] proportion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells was 20.1% [13.5; 23.4] and 14.5% [8.6; 15.5] respectively in the infected group and 15.2% [13.0; 32.3] and 16.1% [10.2; 25.9] respectively in the control group. Each symbol represents a distinct animal. The median and errors bar shown as interquartile [IQR] are indicated. Statistically significant differences (as determined in a nonparametric, unpaired Mann-Whitney test) are indicated as follows: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

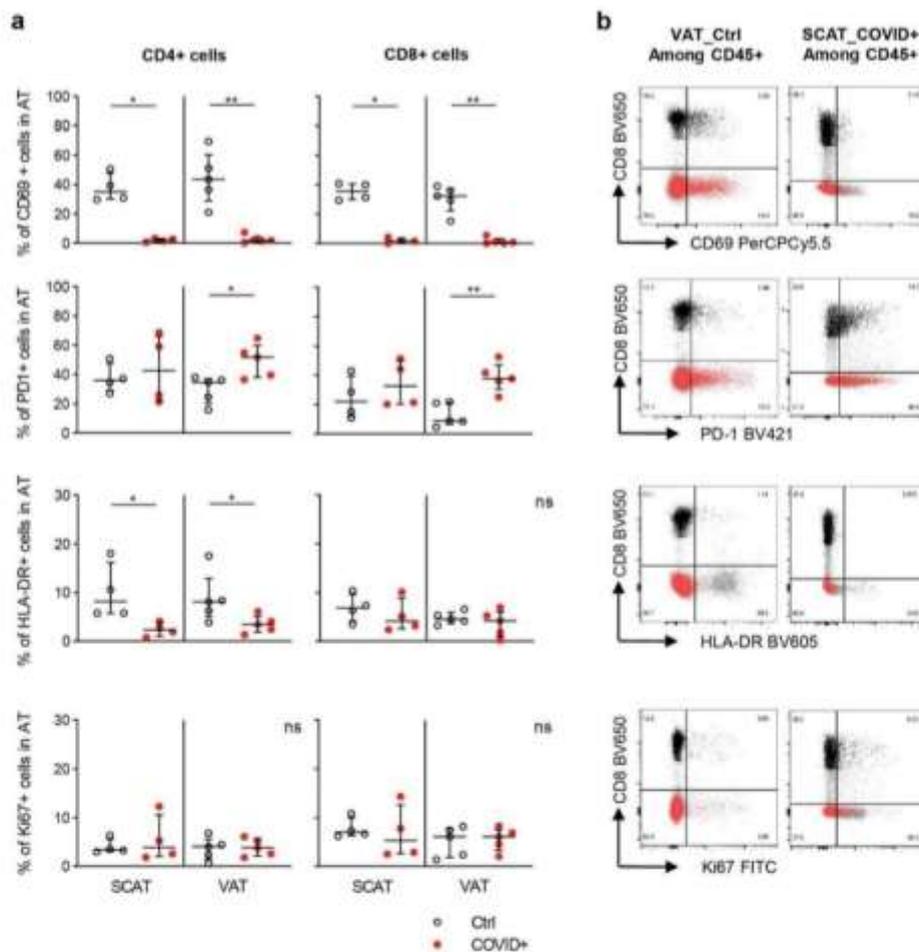
among CD4 and CD8 T cells: the proportion of CD69<sup>+</sup> cells being higher among CD4 T cells and lower among CD8 T cells in the blood of SARS-Cov-2 infected animals (Supplementary Fig. 2). To note, at 7 dpi, there is no more trace of T cell lymphopenia, as observed at 2 dpi (Supplementary Fig. 3). We also evaluated the proportions of PD-1<sup>+</sup> T cells in AT: PD-1 (an activation and/or exhaustion marker on T cells) is usually expressed strongly in AT. Indeed, high proportions of PD-1<sup>+</sup> CD4 and CD8 cells were observed in both SCAT and VAT from control (uninfected) macaques. In SARS-CoV-2 infected animals, a higher proportion of PD-1<sup>+</sup> cells was observed in VAT but not SCAT (Fig. 4b). This difference was observed for both CD4 and CD8 T cell subsets. The median proportion of PD-1<sup>+</sup> CD4 T cells in VAT SVF was higher in infected animals than in controls ( $p = 0.0151$ ), 51.8% [38.1; 59.9] and 34.6% [20.3; 37.1] respectively. In the CD8 T cell compartment, median proportion of PD-1<sup>+</sup> cells was 37.7% [30.7; 47.3] in infected animals and 8.9% [6.6; 21.4] in controls ( $p = 0.0079$ ).

We also measured the expression of HLA-DR (a standard marker of T-cell activation) and Ki67 (a proliferation marker), neither of which are highly expressed by AT T cells under baseline conditions<sup>53</sup>. As expected, the proportions of HLA-DR<sup>+</sup> CD4 and CD8 T cells were similar in SCAT and VAT from uninfected animals, with values of between 5 and 10% (Fig. 4c). The proportion of HLA-DR<sup>+</sup> CD4 T cells in the AT was lower in infected macaques than in uninfected macaques. No changes in the CD8 T cell compartment were detected. In SCAT, the median proportion of HLA-DR<sup>+</sup> CD4 T cells was 2.3% [1.0; 3.8] in infected animals and 8.2% [5.7; 16.2] in control animals ( $p = 0.0286$ ). In VAT, the median proportion was 3.4% [1.9; 5.0] in infected animals vs. 8.1% [5.1; 12.9] in control animals ( $p = 0.0317$ ). In infected animals, the differences between SCAT and VAT were not significant. Lastly, the AT T cells' proliferative potential was assessed by evaluating Ki67 expression (a marker of non-resting cells).

There were no significant differences in the proportions of Ki67<sup>+</sup> CD4 or CD8 cells between infected and uninfected macaques or between SCAT and VAT samples.

In summary, our phenotyping of AT T cells revealed contrasting alterations 7 days after SARS-CoV-2 infection. The proportions of CD69<sup>+</sup> T cells in SCAT and VAT were much

and proliferation (Figs. 4a and 4b). In non-infected macaques, the SCAT and VAT contained similar proportions of CD69<sup>+</sup> T cells (ranging from ~35% to ~45%); this was true for both CD4 and CD8 subsets. In the blood, the proportion of CD69<sup>+</sup> T cells was low (Supplementary Fig. 2)<sup>53</sup>. In infected animals, however, we observed a collapse in the proportion of CD69<sup>+</sup> T cells in both SCAT and VAT at 7 dpi. The CD4 and CD8 T cell subsets were both affected. The median [IQR] proportion of CD69<sup>+</sup> CD4 T cells in SCAT SVF was 2.1% [0.8; 3.2] in infected animals and 35.2% [30.2; 47.9] in controls ( $p = 0.0286$ ); the median [IQR] proportion in VAT SVF was 1.8% [0.8; 4.7] in infected animals and 43.7% [43.7; 60.4] in controls ( $p = 0.0079$ ). The median proportion of CD69<sup>+</sup> CD8 T cells in SCAT SVF was 1.6% [0.4; 3.7] in infected animals and 35.7% [30.1; 40.8] in controls ( $p = 0.0286$ ); the median [IQR] proportion in VAT SVF was 0.8% [0.1; 3.3] in infected animals and 32.4% [22.5; 37.5] in controls ( $p = 0.0079$ ). In the blood, the proportion of CD69<sup>+</sup> T cells remained low, but exhibited significant and opposite changes



**Fig. 4 Phenotyping of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in SCAT and VAT.** Comparison of the phenotypic features of CD8 and CD4 T cells on day 7 in SARS-CoV-2-infected animals vs. age-matched, sex-matched, weight-matched control (uninfected) cynomolgus macaques, using flow cytometry. **a** Proportions of CD69<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>, Ki67<sup>+</sup>, and HLA-DR<sup>+</sup> CD4 T cells (left graph) and CD8 T cells (right graph) (median [IQR]). The median and errors bar shown as interquartile [IQR] are indicated. **b** Representative dot plots for CD69, PD-1, Ki67 and HLA-DR expression on CD4 (red dot) and CD8 T cell (black dot) subsets from SCAT and VAT, as determined by flow cytometry. The graphs show data from uninfected NHPs (black open circles: *n* = 4 for SCAT, *n* = 5 for VAT) and SARS-CoV-2 infected NHPs (open circles with a red point: *n* = 4 for SCAT, *n* = 5 for VAT). Each symbol represents a distinct animal. Statistically significant differences (as determined in a nonparametric, unpaired Mann-Whitney test) are indicated as follows: \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\*\**p* < 0.0001.

lower in infected animals than in uninfected animals. We also observed tissue-specific changes (such as a higher proportion of PD-1<sup>+</sup> cells in the VAT only) and cell-subset specific changes (such as a lower proportion of HLA-DR<sup>+</sup> cells in the CD4 subset only). The data on the AT's immune activation status were also contrasting. The drastic reduction in CD69 expression observed in both SCAT and VAT suggests that even areas of AT not directly infected by SARS-CoV-2 might be altered by the systemic inflammatory responses developed during the infection.

**Discussion**

The association between obesity and the severity of COVID-19 has raised questions about the underlying mechanisms. Obesity is commonly associated with comorbidities and low-grade local and systemic inflammation. The role of these parameters need to be addressed, and AT has a key role in the development of these inflammatory phenomena. Given that AT expresses ACE2, we hypothesized that the virus could directly infect AT and could subsequently alter the tissue's metabolic and immune functions.

In a macaque model of SARS-CoV-2 infection, we detected the virus at 7 dpi in 4 of the 5 SCAT samples tested. In contrast,

SARS-CoV-2 was never detected in VAT or EpAT. The specific presence of SARS-CoV-2 in SCAT is in line with the literature data for influenza virus<sup>54</sup>; SCAT's specific metabolic, immune and vascular properties might make it more susceptible than other sites<sup>58</sup>. The greater expression of ACE2 in SCAT than in VAT might explain this selective infection. In the literature, the data on ACE2 expression in AT are scarce and discordant. One study found that ACE2 mRNA expression is higher in AT than in lung<sup>59</sup>. The impact of obesity on ACE2 mRNA expression remains unclear; some publications have suggested that ACE2 expression is regulated in different metabolic contexts<sup>60–62</sup>, whereas another did not detect any differences<sup>63</sup>. Taken as a whole, these data suggest that the regulation of the receptor's expression in AT is complex and depending on the type of AT considered<sup>61</sup>, the sex<sup>60</sup>, the exposure to metabolism-modifying medications<sup>64</sup> and the composition of the AT<sup>56</sup>. It is noteworthy that downregulation of ACE2 expression in the lung is observed in COVID-19, following internalization of the receptor with the virus<sup>65</sup>. A recent publication describes an increase in ACE2 transcription levels in AT following COVID-19 infection<sup>45</sup> in contrast to previous publication describing a downregulation of

ACE2 following SARS-CoV binding in the lung<sup>55</sup>. Additionally, influenza infection and exposure to type I interferon increase ACE2 expression in the lung<sup>66</sup>. There is no consensus on ACE2 expression levels in SCAT vs. VAT; it has variously been reported that the level is similar in both ATs<sup>59</sup> or is higher in VAT than in SCAT<sup>64</sup>. In the present study, we observed higher mRNA expression of ACE2 in SCAT than in VAT in 7 samples from both SARS-CoV-2-infected animals and uninfected animals. The higher expression of ACE2 may contribute to the preferential infection of SCAT. This discrepancy with regard to previous studies may reflect differences in the model used (i.e. humans vs. NHPs), the metabolic context (obese vs. nonobese animals), the severity of the viral disease (lethal vs. mild), and the timepoint of the analysis (autopsy vs. 7 dpi). It may also reflect the intrinsic limitation of mRNA detection in whole AT. Higher expression of ACE2 mRNA in SCAT may not reflect higher expression on a per cell basis, but rather a higher relative proportion of adipocyte among the complex cellular network that is AT and the difference in composition between SCAT versus VAT<sup>56</sup>. We thus evaluated the expression of ACE2 at the protein level by immunohistochemistry on human samples. This different method did not reveal any difference in the proportion of adipocytes expressing ACE2 in both AT. Nevertheless, in a model of early-stage infection (i.e. nonsevere disease), we demonstrated that AT is effectively targeted by the SARS-CoV-2. This observation is in accordance with the report showing the presence of SARS-CoV-2 in autopsy samples of SCAT from patients who died of COVID-19. However, our results also suggest that SCAT is infected in the context of mild COVID-19. The mechanisms underlying the preferential infection of SCAT by SARS-CoV-2 remain to be determined. This finding also raises questions with regard to (i) the duration of SARS-CoV-2's persistence in AT, (ii) possible spreading of the virus to all AT sites over the course of severe COVID-19, and (iii) the local impact of SARS-CoV-2 on SCAT's metabolic and immune properties. Concerning the persistence of the infection in AT, we had the opportunity to measure the viral load at 43 dpi in a cohort of male animals. In that context, no virus was detected, suggesting no long-term sequestration of the virus in AT in this model of mild COVID. The absence of VAT infection may also reflect the transient lung infection seen in mild COVID, that may reduce the possibility for large spread. Alternately, one cannot exclude that VAT was infected but eliminated the virus prior 7 dpi. Indeed, VAT includes more hematopoietic and immune cells and may thus eradicate the virus more rapidly than the SCAT. Although the severity of COVID-19 has been linked to visceral adiposity<sup>61</sup>, it is important to note that both SCAT and VAT might contribute to the metabolic alterations associated with obesity<sup>67–69</sup>. VAT is thought to be more metabolically active, whereas SCAT is predominantly a lipid buffering site that prevents lipotoxicity.

We next focused on the immune properties of AT in SARS-CoV-2-infected animals by studying the T cell compartment in both SCAT and VAT. The proportion of CD45<sup>+</sup> cells did not significantly differ when comparing uninfected and infected animals at 7 dpi. The proportions of CD4 and CD8 T cells were similar in SCAT and in VAT. This result was surprising; although SCAT was infected by SARS-CoV-2, it did not show any signs of an overt immune response. A reduction in the proportions of both CD4 and CD8 cells might have indirectly indicated the recruitment/activation of the innate immune system, as has been seen for neutrophils and monocytes in the lungs during SARS-CoV-2 infection<sup>70</sup>. Conversely, an increase in the proportions of CD4 and/or CD8 cells would have indicated the induction of a T-cell-specific response because both CD4 and CD8 T cells are involved in the defense against different types of virus. Unfortunately, we were unable to provide absolute T cell counts for AT

from SARS-CoV-2-infected and control animals; this prevented us from determining whether or not T cell lymphopenia had developed in the AT (as has been described in the blood<sup>71</sup>) or whether T cell subsets had been recruited from the blood.

Even though the proportions of CD4 and CD8 T cells were unchanged, we observed a marked difference in the expression of CD69 on T cells collected from SCAT and from VAT. The proportions measured in uninfected animals were in line with the literature data but CD69 expression was dramatically lower in infected animals. CD69 is expressed on activated T cells and tissue-resident T cells. The expression of CD69 counteracts the expression of the sphingosine-1 phosphate receptor that ensures local T cell egress; hence, CD69 thus helps to retain T cells in tissues<sup>72</sup>. The loss of CD69 expression on AT T cells might therefore reflect (i) a major change in the migratory potential of AT T cells, leading to remobilization and a contribution to systemic hyperactivation, and/or (ii) functional alterations in AT-resident T cells caused by inappropriate activation<sup>73</sup>. Importantly, the expression of CD69 also modulate the metabolic activity of T cells<sup>74</sup>, which could be especially relevant in the metabolic tissue that is AT. Taken as a whole, these results suggest that (i) CD69 expression at the surface of AT T cells changes dramatically, and (ii) the CD69<sup>+</sup> AT T cell fraction was not replaced. The total proportions of CD8 and CD4 cells did not differ when comparing samples from infected and uninfected animals, and PD-1 expression was modulated in a different way in VAT (with a higher proportion of PD-1 expressing cells) relative to SCAT. These findings suggest that CD69 is specifically regulated in what would be a new pathophysiological mechanism in SARS-CoV-2 infection. The details of the mechanism and consequences of the loss of CD69 expression on AT in this specific context need to be evaluated further. However, the lower proportion of HLA-DR + CD4 T cells might be related to abnormal regulation of T cell activation in AT. It is tempting to speculate that the increase in CD69<sup>+</sup> cells among CD4 T cells in the blood is a reflect of the remobilization of the AT CD4 T cells and may contribute to the restoration of the blood T cell count. However, as CD69 is a marker of T cell activation, further investigations will be required to evaluate the contribution of AT CD4 T cells to the blood CD4 T cell compartment.

Despite the persistence of equivalent CD4 and CD8 T cell proportions, the higher observed expression of PD-1 in VAT of infected animals but not SCAT emphasized the differences between the two AT's immune properties. This difference might result in a particular immune and/or metabolic microenvironment and might thus impact SARS-CoV-2 infection. This might seem counterintuitive because PD-1<sup>+</sup> CD8 and CD4 T cells in blood or in cancer are usually considered to be exhausted. However, PD-1 is also a marker of cell activation, and its expression on T cells is associated with a lower level of glycolysis, preferential lipolysis, and greater fatty acid oxidation<sup>75</sup>. Furthermore, this metabolic pathway has been linked to greater antiviral activity for CD8 T cells in other infections (e.g. HIV infection<sup>76</sup>) and might reflect a beneficial adaptation to the AT environment, rather than an impaired response. The direct impact of PD-1 modulation in VAT at 7 dpi remains to be elucidated.

This work has obvious limitations. Firstly, we did not provide any insight on the type of cells that bear the virus in the SCAT. Indirectly, the identification of ACE2 protein preferentially on adipocytes clearly points towards adipocytes as crucial target of the infection. The literature in the field has now provided some important insight confirming the infection of adipocytes, both in vitro and ex vivo<sup>45–48</sup>, although the infection of AT macrophages has also been described<sup>46</sup>. Secondly, the analyses are performed in a context of mild infection. This setting may explain some of the discrepancy observed compared to other publications

in terms of the immune or metabolic signature of the infection. However, it also confirms that the infection of AT is not a process that is strictly associated with the most severe form of infection. Interestingly, the change in the phenotypic of AT T cells is drastic, although not impacting the outcome of this acute infection. The long-term consequences of these defects will need to be further evaluated.

Overall, our work shows that SARS-CoV-2 infection impacts AT two levels: (i) through the direct infection of SCAT, and (ii) through bystander effects on both uninfected and infected AT. The post-infection inflammatory responses in the lung and then systemically are strong candidates for altering the AT's immune composition and thus its immune and metabolic properties - regardless of the presence of the virus per se at each site. Our results confirm the need to study the impact of SARS-CoV-2 on AT in obese and/or aged individuals and in men vs. women. It is tempting to speculate that the virus's metabolic and immune effects on AT will be exacerbated in obese individuals. The impact on the AT T cell compartment might be more severe, due to the higher proportion of pro-inflammatory T cells in AT in obese people prior to infection. The abnormalities observed in our NHP model strongly suggest that AT dysfunction has a major role in the pathogenesis of COVID-19 and warrants further investigation.

**Methods**

**Animal models.** Cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) were imported from AAALAC-certified breeding centers in Mauritius. All animals were housed at the IDMIT facility (CEA, Fontenay-aux-Roses, France) in BSL-2 and BSL-3 containment conditions, when necessary (animal facility authorization reference: D92-032-02, Hauts de Seine Prefecture, France). All studies were performed in compliance with the European Directive 2010/63/EU, French regulations, and the Standards for Human Care and Use of Laboratory Animals published by the US Office for Laboratory Animal Welfare (OLAW, assurance number #A5826-01). The experiments were approved by an institutional review board (*Comité d'Éthique en Expérimentation Animale du Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives*, Fontenay-aux-Roses, France; reference: CÉEA #44). The study was authorized by the French veterinary authorities (registration number: APA-FIS#24434-2020030216532863v1).

**Infection with SARS-CoV-2.** Five female cynomolgus macaques were challenged simultaneously via the intranasal and intratracheal routes with  $1.0 \times 10^6$  PFU of primary isolated SARS-CoV-2 (strain: BetaCoV/France/IDF/0372/2020). Body-weight, body temperature, and clinical signs of infection were monitored daily. Blood cell counts were determined from EDTA-treated blood samples using a HMX A/L analyser (Beckman Coulter). Nasopharyngeal and tracheal swabs were collected daily until 7 dpi. Bronchoalveolar fluids were collected at dpi 3 and 6, and rectal fluids were collected at dpi 0, 2, 5, and 7. At 7 dpi, animals were humanely euthanized with 18.2 mg/kg of intravenous pentobarbital sodium during anesthesia with tiletamine (4 mg/kg) and zolazepam (4 mg/kg), and an autopsy was performed. At the time of euthanasia, abdominal SCAT, VAT and EpAT samples were collected and assayed for SARS-CoV-2 and/or immune and cellular characteristics. A second cohort of cynomolgus macaques including six male animals were challenged and euthanized at later timepoint (43 dpi), i.e. after the resolution of the infection.

**Control samples.** Samples from historical cohorts of cynomolgus macaques were used as controls. Stromal vascular cells were collected from the VAT and SCAT of animals of the same sex and equivalent weights. The control group was composed of SCAT and VAT samples from 4 to 5 female cynomolgus macaques.

**Cell isolation.** Stromal vascular fraction was isolated from fresh AT samples. When necessary, the AT was devascularized before dissociation. AT was rinsed in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Lonza, Basel, Switzerland) with 5% fetal bovine serum (FBS), weighed, and cut into pieces of 2–3 mm (to optimize enzymatic digestion). The pieces were digested in a solution of type VIII collagenase from *Clostridium histolyticum* (0.33 mg/mL in DMEM with 5% FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Enzymatic digestion was performed for 30 min at 37 °C with constant stirring. This was followed by mechanical dissociation by repeated suction-expulsion of the suspension with a 10 mL syringe. The AT suspension was filtered through a cell strainer (pore size: 100 µm; Corning, New York, NY, USA) and centrifuged at 330 g for 8 min at room temperature. The upper phase of the supernatant was discarded, and the lower phase (comprising the SVF cells) was centrifuged at 660 g for 8 min at room temperature. The supernatant was discarded, and the pellet containing the SVF was filtered through a cell strainer (pore size: 100 µm) and resuspended in DMEM with 5% FBS. Trypan blue-treated

cell suspensions were then counted under a microscope using a Malassez cell (C-chip, NanoEntek, Seoul, Korea). The SVF was either directly stained for flow cytometry analysis or cryopreserved in 90% FBS/10% DMSO.

**Cell staining and flow cytometry.** Fresh samples were stained after the incubation of SVF with 1:10 diluted Fc block reagent (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) for 15 min at 4 °C. Next, cells were incubated for 15 min at 4 °C with fluorophore-labelled antibodies against the following surface markers: 1:20 diluted CD45 (BV510, D058-1283), CD8 (BV650, RPA-T8), CD4 (BV711, L200), CD3 (BV786, SP34-2), CD69 (FN50, PercPCy5.5); 1:200 diluted HLA-DR (BV605, G46-6), from BD Biosciences; and 1:40 diluted PD-1 (BV421, EH12-2H7) from Biogen (San Diego, CA, USA). Next, cells were incubated for 15 min at 4 °C with 1:2000 diluted amine-reactive blue dye (Live/Dead Fixable, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). After this incubation, cells were washed in PBS 1X and permeabilized-fixed using an Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer Set (eBiosciences Scientific, Waltham, MA, USA) for 30 min at 4 °C. The cells were washed in PBS 1X, incubated with 1:10 diluted Fc block reagent (BD Biosciences) for 15 min at 4 °C, and then incubated with 1:20 diluted Ki67 (FITC, B56, from BD Biosciences) for 30 min at 4 °C. Lastly, the cells were washed in PBS 1X. Data were acquired with an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (version 10.6.2, FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

**Quantification of the viral load in NHP samples.** All specimens (whether nasopharyngeal, tracheal, or rectal) were collected with swabs (Viral Transport Medium, DSR-052-01, CDC, Atlanta, GA, USA) and stored at between 2 °C and 8 °C until analysis with a standard concentration range of plasmid containing an *rdRp* gene fragment including the RdRp-IP4 RT-PCR target sequence. AT samples were stored at -80 °C until analysis. Fragments of 50 mg of frozen SCAT and VAT samples were lysed in NucleoZOL (Machery-Nagel, Duren, Germany) using a Precellys device (Bertin Technology, Montigny-le Bretonneux, France). RNA isolation and reverse transcription were performed according to the manufacturers' instructions (NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Core Kit (Macherey-Nagel)). The protocol for detecting SARS-CoV-2 is available on the World Health Organization's website (<https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf>).

**Quantitative RT-PCR.** Fragments of 100–200 µg of frozen SCAT and VAT samples from seven cynomolgus macaques were dissociated in Qiazol (Qiagen, Hilden, Germany) using stainless steel beads in the tissue-lyser system (Qiagen). The RNA-containing aqueous phase was collected after treatment with chloroform. Total RNA from the aqueous phase was precipitated with ethanol. RNA isolation and reverse transcription were performed according to the manufacturers' instructions (NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plus Kit (Macherey-Nagel)) and the enhanced RT-PCR Kit (Sigma-Aldrich), respectively. ACE2 mRNA expression was determined using a standard reverse-transcription PCR assay and commercially available TaqMan probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States) on the CFX96 thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, United States). All results were normalized against expression of the *PPIA* gene. The 18 S rRNA gene was used as second housekeeping gene. The TaqMan probes for ACE2 (*Mj01085327\_m1*), *TMPRSS2* (*Mj02802837\_m1*), *adiponectin* (*ADIPOQ* *Mj02788052\_m1*), *leptin* (*LEP* *Mj02788316\_m1*), *PPIA* (*Mj04932064\_gH*), and 18 S (*Hs99999901\_s1*) were used.

**Protein detection.** Cytokines were quantified in EDTA-treated plasma using the NHP cytokine Milliplex (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) for IL-6, TNF-α, IL-1β and MCP-1 (also known as CCL2); the NHP metabolic Milliplex panel for leptin and insulin; and the Human Adipokine Milliplex for adiponectin. Analysis was performed on a Bioplex 200 analyser (Bio-Rad) according to manufacturer's instructions.

**Microscopy and immunohistochemistry.** Samples of SCAT and VAT (and placenta as control) were fixed in 4% buffered formalin and embedded in paraffin. Sections (thickness: 3 microns) were immunostained for ACE2 using unconjugated recombinant rabbit monoclonal antibody directed against human ACE2 (clone SN0754) (ThermoFisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA) followed by incubation with Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody. Nuclei were stained with DAPI. The merged image is shown at the magnitude of 400.

**Human sample.** SCAT and VAT samples from six patients who provided their written, informed consent to participation were selected for ACE2 protein detection. The study protocol was approved by the regional investigational review board (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France VII, PP12-021, Paris, France). The study includes three female and three male donors. The median of age is 54.1 [38.1–69.6] and the median of body mass index is 33 [27.5–40.6].

**Statistics and reproducibility.** The size of the group was defined based on statistical and ethical parameters. Groups of 5 to 6 NHPs were studied for each group. No biological replicate was performed for the in vivo infection of NHPs. Technical

replicates were performed for RT-PCR, protein detection, viral detection and microscopy. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 8, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Continuous variables were described as the median [IQR]. Groups were compared using a nonparametric, unpaired Mann-Whitney two-sided test or a paired Wilcoxon two-sided test. Comparison of values at different timepoint compared to d0 were performed using paired Friedman test with a Dunn's multiple comparison post-test. The threshold for statistical significance was set to  $p < 0.05$  (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

**Data availability**

All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its supplementary information files).

Received: 20 August 2021; Accepted: 19 May 2022;

Published online: 03 June 2022

**References**

1. Bhattacharya, I., Ghayor, C., Pérez Dominguez, A. & Weber, F. E. From Influenza Virus to Novel Corona Virus (SARS-CoV-2)-The Contribution of Obesity. *Front in endocrinol.* **11**, 556962 (2020).
2. Zakka, K. et al. SARS-CoV-2 and Obesity: "CoVesity"—a Pandemic Within a Pandemic. *Obes Surg.* (2021) <https://doi.org/10.1007/s11695-020-04919-0>.
3. Kimura, T. & Namkoong, H. Susceptibility of obese population to COVID-19. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases* (2020) <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.015>.
4. Caussy, C., Wallet, F., Laville, M. & Disse, E. Obesity is associated with severe forms of COVID-19. *Obesity*. *oby*.22842 (2020) <https://doi.org/10.1002/oby.22842>.
5. Dugail, I., Amri, E.-Z. & Vitale, N. High prevalence for obesity in severe COVID-19: Possible links and perspectives towards patient stratification. *Biochimie.* (2020) <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.07.001>.
6. Simonnet, A. et al. High prevalence of obesity in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) requiring invasive mechanical ventilation. *Obes. (Silver Spring, Md.)* **28**, 1195–1199 (2020).
7. Petrilli, C. M. et al. Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. *BMJ (Clin. Res. ed.)* **369**, m1966 (2020).
8. Zhou, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* **395**, 1054–1062 (2020).
9. Albitar, O., Ballouze, R., Ooi, J. P. & Ghadzi, S. M. S. Risk factors for mortality among COVID-19 patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **166**, 108293 (2020).
10. Peckham, H. et al. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ICU admission. *Nut. commun.* **11**, 163 (2020).
11. Gallo Marin, B. et al. Predictors of COVID-19 severity: a literature review. *Rev. Med. Virol.* **31**, 1–10 (2021).
12. Milner, J. J. & Beck, M. A. Obesity and influenza infection severity. *Future Virol.* **9**, 223–225 (2014).
13. Luzi, I. & Radaelli, M. G. Influenza and obesity: its odd relationship and the lessons for COVID-19 pandemic. *Acta diabetologica* **57**, 759–764 (2020).
14. CJ, L., DB, C. & MT, L. The obesity paradox in infections and implications for COVID-19. *Mayo Clin. Proc.* **96**, 518–520 (2021).
15. AJ, R.-D. et al. The obesity paradox in patients with severe soft tissue infections. *Am. J. Surg.* **214**, 385–389 (2017).
16. N, B. et al. Obesity paradox in patients with community-acquired pneumonia: Is inflammation the missing link? *Nutr. (Burbank, Los Angeles Cty., Calif.)* **33**, 304–310 (2017).
17. Belančić, A., Kresović, A. & Rački, V. Potential pathophysiological mechanisms leading to increased COVID-19 susceptibility and severity in obesity. *Obes. Med.* **19**, 100259 (2020).
18. Michalakis, K., Panagiotou, G., Ilias, I. & Pazaritou-Panayiotou, K. Obesity and COVID-19: a jigsaw puzzle with still missing pieces. *Clin. obes.* e12420 (2020) <https://doi.org/10.1111/cob.12420>.
19. Sanchis-Gomar, F., Lavie, C. J., Mehra, M. R., Henry, B. M. & Lippi, G. Obesity and outcomes in COVID-19: when an epidemic and pandemic collide. *Mayo Clin. Proc.* **95**, 1445–1453 (2020).
20. Hur, S. J., Kim, D. H., Chun, S. C. & Lee, S. K. Effect of adenovirus and influenza virus infection on obesity. *Life Sci.* **93**, 531–535 (2013).

21. McCallister, J. W., Adkins, E. J. & O'Brien, J. M. Obesity and acute lung injury. *Clin. chest Med.* **30**, 495–508 (2009).
22. Zerah, F. et al. Effects of obesity on respiratory resistance. *Chest* **103**, 1470–1476 (1993).
23. Smith, A. G., Sheridan, P. A., Tseng, R. J., Sheridan, J. F. & Beck, M. A. Selective impairment in dendritic cell function and altered antigen-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses in diet-induced obese mice infected with influenza virus. *Immunology* **126**, 268–279 (2009).
24. Ather, J. L. et al. Obese adipose tissue modulates proinflammatory responses of mouse airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Regulatory, Integr. Comp. Physiol.* **321**, R79–R90 (2021).
25. Frigolet, M. E., Torres, N. & Tovar, A. R. The renin-angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. *J. Nutritional Biochem.* **24**, 2003–2015 (2013).
26. Pasquarelli-do-Nascimento, G. et al. Hypercoagulopathy and adipose tissue exacerbated inflammation may explain higher mortality in COVID-19 patients with obesity. *Front. Endocrinol.* **11**, 530 (2020).
27. Mraz, M. & Haluzik, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *J. Endocrinol.* **222**, R113–R127 (2014).
28. Kiselevskiy, M. et al. Immune pathogenesis of COVID-19 intoxication: storm or silence? *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* **13**, 166 (2020).
29. Tang, Y. et al. Cytokine storm in COVID-19: the current evidence and treatment strategies. *Front. Immunol.* **11**, 1708 (2020).
30. Maurya, R., Sebastian, P., Namdeo, M., Devender, M. & Gertler, A. COVID-19 severity in obesity: leptin and inflammatory cytokine interplay in the link between high morbidity and mortality. *Front. Immunol.* **12**, 649359–649359 (2021).
31. Boden, G. Obesity and free fatty acids. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **37**, 635–646 (2008).
32. Viucros-Sanabria, R. & Escobedo, G. Immunometabolic bases of type 2 diabetes in the severity of COVID-19. *World J. diabetes* **12**, 1026–1041 (2021).
33. A, F.-S. et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 3117–3132 (2011).
34. Moreno-Navarrete, J. M. & Fernández-Real, J. M. The complement system is dysfunctional in metabolic disease: Evidences in plasma and adipose tissue from obese and insulin resistant subjects. *Semin. Cell Developmental Biol.* **85**, 164–172 (2019).
35. Vranić, L., Mikošević, I. & Milić, S. Vitamin D deficiency: consequence or cause of obesity? *Medicina (Kaunas, Lithuania)* **55**, 541 (2019).
36. Han, S.-J. et al. White adipose tissue is a reservoir for memory T cells and promotes protective memory responses to infection. *Immunity* **47**, 1154–1168.e6 (2017).
37. Misumi, I. et al. Obesity expands a distinct population of T cells in adipose tissue and increases vulnerability to infection. *Cell Rep.* **27**, 514–524.e5 (2019).
38. Kawabe, Y. et al. ACE2 exerts anti-obesity effect via stimulating brown adipose tissue and induction of browning in white adipose tissue. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **317**, E1140–E1149 (2019).
39. Malavazos, A. E., Corsi Romanelli, M. M., Bandera, F. & Iacobellis, G. Targeting the adipose tissue in COVID-19. *Obes. (Silver Spring, Md.)* **28**, 1178–1179 (2020).
40. Ryan, P. M. & Caplice, N. M. Is adipose tissue a reservoir for viral spread, immune activation, and cytokine amplification in coronavirus disease 2019? *Obes. (Silver Spring, Md.)* **28**, 1191–1194 (2020).
41. Wronska, A. & Kmiec, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta physiologica (Oxf., Engl.)* **205**, 194–208 (2012).
42. Bray, G. A. et al. Relation of central adiposity and body mass index to the development of diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 1212–1218 (2008).
43. Chau, Y.-Y. et al. Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. *Nat. Cell Biol.* **16**, 367–375 (2014).
44. Poma, A. M. et al. COVID-19 autopsy cases: detection of virus in endocrine tissues. *J. of endocrinological investigation* (2021) <https://doi.org/10.1007/s40618-021-01628-y>.
45. Basolo, A. et al. Adipose tissue in COVID-19: detection of SARS-CoV-2 in adipocytes and activation of the interferon-alpha response. *J Endocrinol Invest* (2022) <https://doi.org/10.1007/s40618-022-01742-5>.
46. Martínez-Colón, G. J. et al. SARS-CoV-2 infects human adipose tissue and elicits an inflammatory response consistent with severe COVID-19. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.10.24.465626> (2021) <https://doi.org/10.1101/2021.10.24.465626>.
47. Reiterer, M. et al. Hyperglycemia in Acute COVID-19 is Characterized by Adipose Tissue Dysfunction and Insulin Resistance. <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.03.21.21254072> (2021) <https://doi.org/10.1101/2021.03.21.21254072>.
48. Zickler, M. et al. Replication of SARS-CoV-2 in adipose tissue determines organ and systemic lipid metabolism in hamsters and humans. *Cell Metab.* **34**, 1–2 (2022).

49. Maisonnasse, P. et al. Hydroxychloroquine use against SARS-CoV-2 infection in non-human primates. *Nature* **585**, 584–587 (2020).

50. Iacobellis, G. et al. Epicardial fat inflammation response to COVID-19 therapies. *Obesity (Silver Spring, Md.)* (2021) <https://doi.org/10.1002/oby.23232>.

51. Koethe, J. R. et al. Adipose tissue is enriched for activated and late-differentiated CD8+ T cells, and shows distinct CD8+ receptor usage, compared to blood in HIV-infected persons. *JAIDS J. Acquired Immune Defic. Syndromes* **77**, e14–e21 (2017).

52. Wanjalla, C. N. et al. Adipose tissue in persons with HIV is enriched for CD4+ T effector memory and T effector memory RA+ cells, which show higher CD69 expression and CD57, CX3CR1, GPR56 co-expression with increasing glucose intolerance. *Front. Immunol.* **10**, 408 (2019).

53. Damouche, A. et al. High proportion of PD-1-expressing CD4+ T cells in adipose tissue constitutes an immunomodulatory microenvironment that may support HIV persistence. *Eur. J. Immunol.* **47**, 2113–2123 (2017).

54. Ayari, A. et al. Influenza infection rewires energy metabolism and induces browning features in adipose cells and tissues. *Commun. Biol.* **3**, 237 (2020).

55. Kuba, K. et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.* **11**, 875–879 (2005).

56. El-Sayed Moustafa, J. S. et al. ACE2 expression in adipose tissue is associated with COVID-19 cardio-metabolic risk factors and cell type composition. <https://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.08.11.20171108> (2020) <https://doi.org/10.1101/2020.08.11.20171108>.

57. Nishimura, S. et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* **15**, 914–920 (2009).

58. Ibrahim, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev.* **11**, 11–18 (2009).

59. Al-Benna, S. Association of high level gene expression of ACE2 in adipose tissue with mortality of COVID-19 infection in obese patients. *Obes. Med.* **19**, 100283 (2020).

60. Gupte, M. et al. Angiotensin converting enzyme 2 contributes to sex differences in the development of obesity hypertension in C57BL/6 mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, Vasc. Biol.* **32**, 1392–1399 (2012).

61. Favre, G. et al. Visceral fat is associated to the severity of COVID-19. *Metab. Clin. Exp.* **115**, 154440 (2021).

62. Al Hetaly, S. et al. Regulation of angiotensin-converting enzyme 2 in obesity: implications for COVID-19. *Front. Physiol.* **11**, 555039 (2020).

63. Pinheiro, T. et al. Obesity and malnutrition similarly alter the renin-angiotensin system and inflammation in mice and human adipose. *J. nutritional Biochem.* **48**, 74–82 (2017).

64. Y. Z. et al. Comparative expression of renin-angiotensin pathway proteins in visceral versus subcutaneous fat. *Front. in physiol.* **9**, (2018).

65. Glowacka, I. et al. Differential downregulation of ACE2 by the spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus NL63. *J. Virol.* **84**, 1198–1205 (2010).

66. Ziegler, C. G. K. et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell* **181**, 1016–1035.e19 (2020).

67. van der Kolk, B. W. et al. Subcutaneous adipose tissue and systemic inflammation are associated with peripheral but not hepatic insulin resistance in humans. *Diabetes* **68**, 2247–2258 (2019).

68. Longo, M. et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *Int. J. of mol. sci.* **20**, 2358 (2019).

69. Gealekman, O. et al. Depot-specific differences and insufficient subcutaneous adipose tissue angiogenesis in human obesity. *Circulation* **123**, 186–194 (2011).

70. Alon, R. et al. Leukocyte trafficking to the lungs and beyond: lessons from influenza for COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 49–64 (2021).

71. Tavakolpour, S., Rakhshandehroo, T., Wei, E. X. & Rashidian, M. Lymphopenia during the COVID-19 infection: What it shows and what can be learned. *Immunol. Lett.* **225**, 31–32 (2020).

72. Mackay, L. K. et al. Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. *J. Immunol. (Baltim., Md.: 1950)* **194**, 2059–2063 (2015).

73. Chen, Z.-Y. et al. Decreased expression of CD69 on T cells in tuberculosis infection resisters. *Front. Microbiol.* **11**, 1901 (2020).

74. Cibrian, D. et al. CD69 controls the uptake of L-tryptophan through LAT1-CD98 and AhR-dependent secretion of IL-22 in psoriasis. *Nat. Immunol.* **17**, 985–996 (2016).

75. Patsoukis, N. et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* **6**, 6692 (2015).

76. Angin, M. et al. Metabolic plasticity of HIV-specific CD8+ T cells is associated with enhanced antiviral potential and natural control of HIV-1 infection. *Nat. Metab.* **1**, 704–716 (2019).

**Acknowledgements**

We thank the members of the COVIR team for their helpful suggestions. This work was funded by a grant from Paris-Saclay University ("Programme de recherche exceptionnel 2020 UPSaclay COVID-19", OSCOVIR/OSV1). A.O. received a fellowship from the French Agency for HIV, Hepatitis and Emerging Diseases (ANRS-MIE). We thank B. Delache, F. Relouzat, S. Langlois, Q. Sconosciuti, V. Magneron, P. Le Calvez, M. Potier, J. M. Robert, N. Dhooge T. Prot, and C. Dodan for the NHP experiments; L. Bossevoit, M. Leonec, L. Moenne-Loccoz, M. Galpin-Lebreau, L. Pintore and J. Morin, M. Cavarelli, R. Marlin, M. Galhaut, and V. Contreras, Barendji, J. Dinh and E. Guyon for the NHP sample processing and discussions; S. Keyser for the transports organization; F. Ducancel, A. Pouget and Y. Gorin for their help with the logistics and safety management; B. Targat contributed to data management; We thank S. Van der Werf, S. Bellil and V. Enouf for contribution to viral stock challenge production and A. Nougairede for sharing the plasmid used for the sgRNA assays standardization. The Infectious Disease Models and Innovative Therapies (IDMIT) research infrastructure is supported by the "Programme Investissements d'Avenir", managed by the ANR under reference ANR-11-INRS-0008. The Fondation Bettencourt Schueller and the Region Ile-de-France contributed to the implementation of IDMIT's facilities and imaging technologies. The NHP model of SARS-CoV-2 infection have been developed thanks to the support from REACTing, the Fondation pour la Recherche Medicale (FRM; AM-CoV-Path) and the European Infrastructure TRANSVAC2 (730964).

**Author contributions**

A.O., R.M., P.M., J.L., L.B., T.L., C.M., S.B. and C.B. performed the experiments; A.O. and C.B. characterized the immune profile of AT samples, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. R.M., P.M., R.L.G., and N.D.B. conceived the experimental design for the SARS-CoV-2 infection in NHPs. G.P. and S.B. collected human AT samples during abdominal surgery. O.L., N.D.B., and C.B. designed the work on the adipose tissue samples. L.B. and N.D.B. have done viral load quantification and analysis on AT samples. R.M., L.B. and J.L. performed the Lumina analysis. T.L. performed the immunohistochemistry analysis. C.B. have drafted the work.

**Competing interests**

The authors declare no competing interests.

**Additional information**

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03503-9>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to Christine Bourgeois.

**Peer review information** *Communications Biology* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. Primary Handling Editor: Gracjan Michlewski, Karli Montague-Cardoso and Zhijuan Qui. Peer reviewer reports are available.

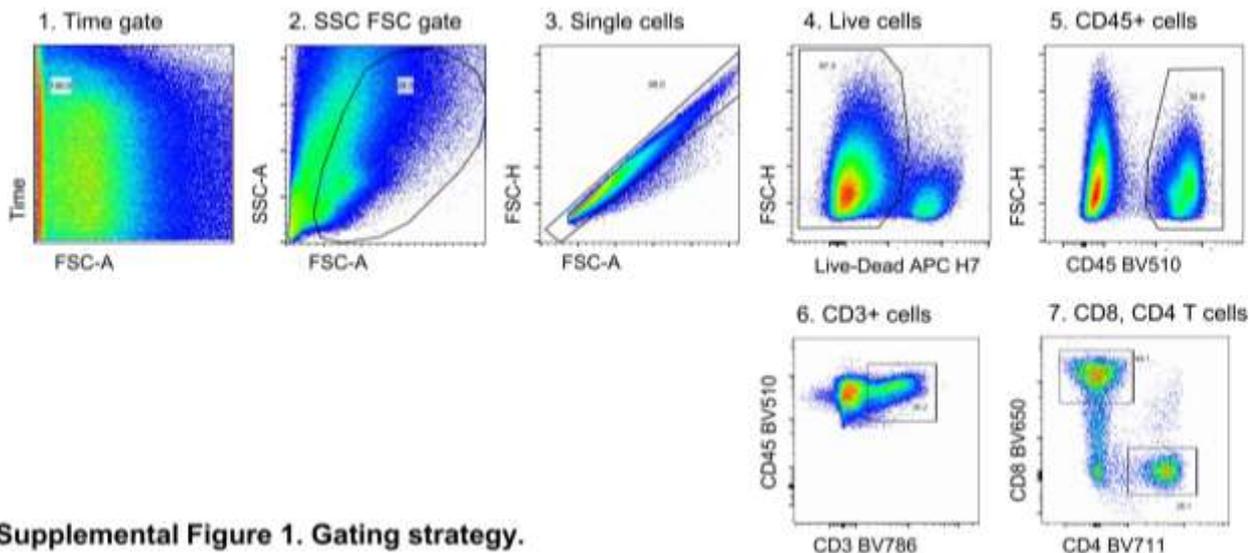
**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

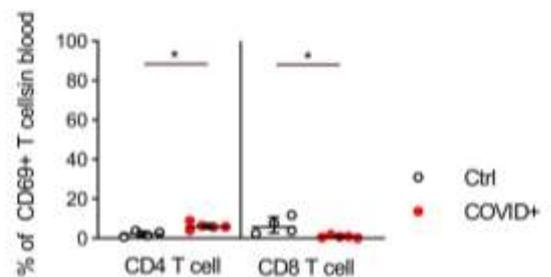


**Supplemental Figure 1. Gating strategy.**

Gating strategy for stromal vascular cells collected after dissociation of VAT sampled from a cynomolgus macaque infected with SARS-CoV-2. The quality of the cell suspension was checked using the time vs. FSC gating. Next, cells are selected in a broad FSC/SSC gate, from which doublets and dead cells are subsequently excluded. Staining with an anti-CD45 antibody selects hematopoietic cells, which are then stained for CD3, CD4, and CD8.

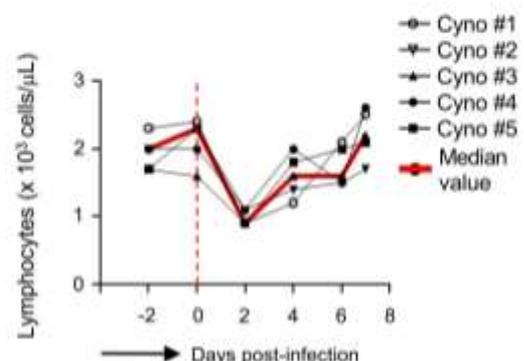
**Supplemental Figure 2. CD69 expression among CD4 and CD8 T cells in blood.**

Proportions of CD69<sup>+</sup> CD4 T cells and CD8 T cells as determined by flow cytometry. The graphs show data from uninfected NHPs (black open circles: n=4 for SCAT, n=5 for VAT). Each symbol represents a distinct animal. The median [IQR] proportion of CD69<sup>+</sup> cells in blood among CD4<sup>+</sup> cells and CD8<sup>+</sup> cells was 5.9% [4.9; 7.6] and 0.8% [0.2; 1.4] respectively in the infected group and 2.2% [0.9; 3.6] and 5.7% [2.8; 10.7] respectively in the control group. Statistically significant differences (as determined in a nonparametric, unpaired Mann–Whitney test) are indicated as follows: \**p* < 0.05).



**Supplemental Figure 3. Determination of T cell numbers in the blood during the course of the infection**

Numbers of lymphocytes cells as determined using a HMX A/L analyzer (Beckman Coulter). **Dynamic of lymphocyte number during SARS-CoV-2 infection.** Each symbol represents a distinct animal. The values were compared in a Friedman test with a Dunn's multiple comparison post-test. Statistically significant differences are indicated as follows: \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01





**Article 3.** *Impact à long terme de l'infection par le SIV, contrôlée par un traitement antirétroviral, sur la composante immunitaire et mésenchymateuse du tissu adipeux*

A. Olivo, C. Mouanga, F. Lanthiez, A. Mausoléo, M. Bitu, G. Pourcher, D. Desjardins, A. Barrail-Tran, R. Le Grand, A. Sáez-Ciri3n, O. Lambotte and C. Bourgeois.

- Résumé

Le tissu adipeux (TA) est ciblé à la fois par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) mais aussi les molécules antirétrovirales (ART) ce qui pourrait favoriser l'établissement de perturbations fonctionnelles du TA et la persistance virale de façon chronique. Dans des travaux précédemment menés au laboratoire, nous avons démontré que le TA était un réservoir tissulaire du virus, et que l'infection par le SIV était aussi associée à une proportion accrue de LyT CD8 dans le TA.

L'objectif de ce travail était d'étudier les caractéristiques du compartiment T CD8 au cours de l'infection par le SIV en analysant la fraction T CD8 mais également les cellules environnantes susceptibles de moduler leur activité et d'évaluer si le compartiment T CD8 était restauré après introduction du traitement antirétroviral (TARV).

Plusieurs résultats ont été mis en évidence. L'infection par le SIV se traduit au niveau du TA par une altération des compartiments mésenchymateux et hématopoïétiques, et ces altérations sont maintenues ou exacerbées chez les animaux SIV<sup>+</sup>ART<sup>+</sup>. Au sein de la fraction lymphocytaire, la mise sous TARV n'a pas permis une restauration du compartiment T puisque le ratio CD4/CD8 reste inchangé entre les groupes infectés (SIV<sup>+</sup>) et infectés et traités (SIV<sup>+</sup>ART<sup>+</sup>). Concernant la fraction T CD8, nous avons étudié le mécanisme pouvant expliquer leur accumulation au sein du TA. Nous avons observé une augmentation légère mais significative de l'expression des chimiokines attirant les LyT activés. Au sein du TA, les LyT CD8 présentaient des propriétés métaboliques distinctes des autres cellules immunitaires du TA avec une expression particulièrement élevée de GLUT-1, ce qui leur permet une utilisation préférentielle du glucose. Enfin, nous avons exploré le répertoire antiviral des LyT CD8 du TA, en recherchant la présence de LyT CD8 spécifiques de virus dans le TA. Cette étude a été réalisée sur des prélèvements de TA humains et, nous avons pu détecter des cellules LyT CD8 spécifiques de plusieurs virus (CMV, EBV et VIH).

## **Résultats**

---

En conclusion, nos résultats ont permis de mettre en évidence des changements majeurs et persistants dans la composition du TA au cours de l'infection par le VIH/SIV, changements qui peuvent contribuer aux altérations des propriétés métaboliques, régénératrices et immunitaires du TA. L'atteinte du compartiment LyT pourrait également contribuer à perturber le potentiel anti-infectieux du TA.

**Long term impact of antiretroviral-treated SIV infection on the adipose tissue immune and mesenchymal compartment**

Anaëlle Olivo<sup>1</sup>, Christelliah Mouanga<sup>1</sup>, François Lanthiez<sup>1</sup>, Aude Mausoléo<sup>1</sup>, Marie Bitu<sup>1</sup>, Guillaume Pourcher<sup>3</sup>, Delphine Desjardins<sup>1</sup>, Aurélie Barrail-Tran<sup>1</sup>, Roger Le Grand<sup>1</sup>, Asier Saez-Cirion<sup>2</sup>, Olivier Lambotte<sup>1</sup> and Christine Bourgeois<sup>1</sup>.

1 Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Center for Immunology of Viral, Auto-Immune, Hematological and Bacterial Diseases (IMVA-HB/IDMIT), Fontenay-aux-Roses, France

2 Institut Pasteur, Université Paris Cité, Unité HIV Inflammation et Persistance, Paris, France.

3 Obesity Center, Department of Digestive, Oncologic and Metabolic Surgery, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France.

Short title: Regenerative and immune defects in adipose tissue in ART treated SIV infection

\* Correspondence: [christine.bourgeois@universite-paris-saclay.fr](mailto:christine.bourgeois@universite-paris-saclay.fr)

### **Abstract**

Adipose tissue (AT) is targeted by both the human immunodeficiency virus (HIV) and the antiretroviral treatment (ART), thus rendering AT presumably extremely sensitive to the long-term persistence of HIV under ART treatment. We have previously demonstrated in cynomolgus macaques that ART-naïve SIV infection was associated with viral persistence in AT and increased proportion of CD8 T cells in AT. We thus further investigated whether the AT cell composition, including the CD8 T cell compartment, was restored following ART introduction. The analysis of the cellular composition of AT was performed by cytometry on both SCAT and VAT samples collected from noninfected, ART-naïve and ART-treated SIV infected animals. The alterations of both the adipose mesenchymal stem cells and the hematopoietic fraction including the CD8 T cell fractions observed in SIV+ animals are sustained or exacerbated in SIV+ART+ animals. Focusing on the CD8 T cell fraction, we studied the mechanism that may explain the accumulation of CD8 T cells. We observed mild but significant increase in the expression of chemokines attracting activated T cells. More importantly, CD8 T cells exhibited specific metabolic properties that were not shared by the other AT immune cells. AT CD8 T cells exhibited high proportions of GLUT-1 expressing cells, providing these cells with specific accessibility to glucose. Lastly, we indirectly evaluated the contribution of AT CD8 T cells to ant-infectious response by determining whether virus specific CD8 T cells were present in AT. CD8 T cells specific for CMV, EBV, HIV were detected in human AT samples.

Altogether, we thus observed major and persistent changes in the composition of AT that may contribute to the alterations of the metabolic, regenerative and immune properties of AT.

### **Author summary**

Adipose tissue (AT) is a long-known target of HIV infection, as both the virus and the antiretroviral treatment (ART) impact adipose tissue biology. The respective role of HIV and ART on adipocyte biology and the metabolic activity of adipose tissue has been well described, but less is known on the impact of ART-treated infection on the other functions of AT. Schematically, adipose tissue is not only a metabolic tissue but also exhibit regenerative and immune functions, including accumulation of CD8 T cell contributing to anti-infectious immune responses. We report here, in a macaque model, that these two functions are also severely affected following ART introduction, suggesting more deleterious effect than beneficial effect of ART at the level of adipose tissue. Developing novel ART drugs with limited impact of AT may be useful to reduce the toxicity of ART on AT.

### Introduction

The benefit of antiretroviral treatment (ART) is undisputable in the context of chronic HIV infection (Deeks et al., 2013a). It allows viral control and reduction of major immune alterations: the CD4 T cell count in peripheral blood is fully or partially restored, the immune activation and chronic inflammation are partially corrected (Deeks et al., 2013b; Khoury et al., 2017). However, some alterations persist at the blood level as exemplified by low grade chronic inflammation and T cell exhaustion (Fromentin et al., 2016; Trautmann et al., 2006). At the tissue level, ART allows partial gut restoration and the microbial dysbiosis that may subsequently contribute to chronic inflammation (Allers et al., 2016; Kök et al., 2015; Mudd and Brenchley, 2016; Verhoeven et al., 2008) although early ART initiation may favor restoration. Alterations of lymph node structures have also been documented and may contribute to the alterations of the immune responses (Lindqvist et al., 2012; Miles and Connick, 2016). Finally, alterations of adipose tissue (AT) have also been documented (Diggins et al., 2022; Giralt et al., 2011; Lagathu et al., 2019): AT exhibit the unique feature of being targeted by both HIV/SIV but also the adverse effects of ART. Both viral proteins and ART interfere with adipocyte biology, both in vitro and in vivo (Gorwood et al., 2019, 2020), which identified AT as the most impacted site of AT toxicity. The specific toxicity of ART on AT may thus locally counterbalance its benefit. The alterations of the metabolic functions of AT may presumably impact the metabolic profile of people living with HIV (PLHIV) and contribute to the cardiovascular comorbidities associated with HIV infection although this notion is complex to demonstrate (Nix and Tien, 2014). However, little is known about the long-term impact of ART-treated HIV/SIV infection on the immune compartment of AT and the other cell fractions. AT may contribute to systemic immune responses, due to its endocrine capacity (Gregor and Hotamisligil, 2011) but growing evidence suggest a direct anti-infectious role of the immune AT resident cells (Han et al., 2017; Misumi et al., 2019). AT CD8 T cells have been directly involved in defense against viruses (Han 2017, Misumi 2019), as a such represent direct interest to the context of HIV infection. Interestingly, our group previously showed that the proportion of AT CD8 T cells of infected animals was increased although AT CD4 T cell count was not affected by SIV infection (Damouche et al., 2015). The change in the AT T cell composition may thus alter AT biology, (as CD8 T cells accumulation is commonly associated with local inflammation (Nishimura et al., 2009), as

demonstrated in the context of obesity) but also impact the anti-infectious activity of AT (Han et al., 2017).

The aims of the work were (i) to evaluate whether ART allowed restoration of the CD8 T cell compartment during chronic SIV infection and identify other AT cell subsets that may be impacted by the infection and/or the treatment. Indeed, AT is defined in healthy metabolic conditions as an immunosuppressive environment, which may indirectly impact the anti-infectious properties of AT; (ii) to consider the mechanisms that led to the specific recruitment and/or accumulation of CD8 T cells in AT of infected and ART-treated animals. A third aspect was (iii) to provide evidence of the potential anti-infectious role of AT CD8 T cells. As AT is sensitive to multiples environmental, metabolic, infectious cues (Bourgeois et al 2019), addressing the role of HIV infection in clinical context is a difficult task, as AT cell composition highly varies depending on the sex, the age, the metabolic status of each individuals. The impact of ART also differs depending on the combination of ART, which may introduce heterogeneity on the analyses of human samples. A unique alternative is the model of SIV infection in cynomolgus macaques, for which a therapy based on emtricitabine (FTC)/ tenofovir disoproxil fumarate (TDF) / dolutegravir (DTG) regimen has been established. This model allows to study in male, adult, nonobese animals the impact of long-term SIV infection in ART-treated animals efficiently controlling the virus. For ethical consideration, control animals were selected from prior studies.

In this report, we identified three main alterations in AT composition in ART-naïve SIV infected animals: a drastic reduction of the proportion of adipose mesenchymal stem cells (ASC), a reduction of the proportion of hematopoietic cells and among those, a preferential increase of the CD8 T cell fraction. Interestingly, none of these defects were restored by ART introduction, some defects being exacerbated by the treatment. Altogether, these results showed that most functions of AT: the metabolic, regenerative and immune activities of AT are altered.

## Results

### Description of the study population

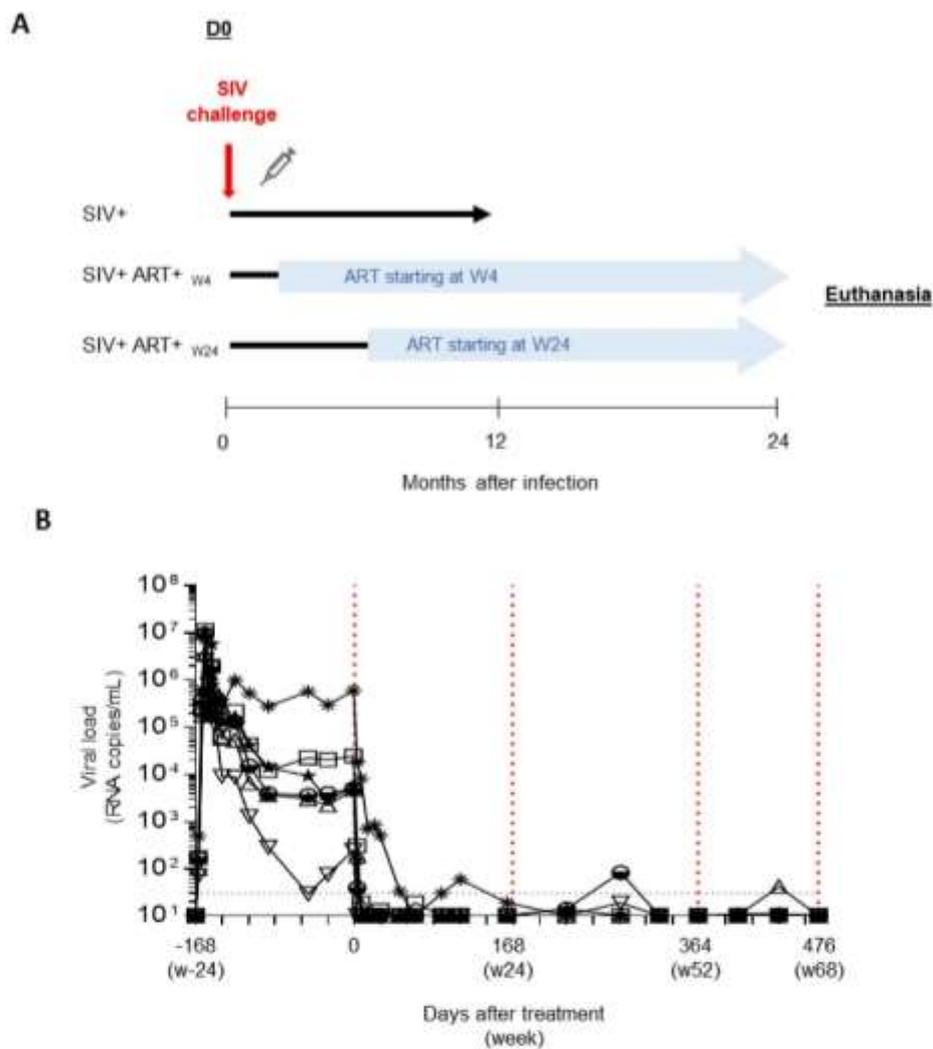
We had the opportunity to study the cellular composition, inflammatory profile of AT collected from SIV-noninfected (SIV-), SIV-infected animals (SIV+) and ART-treated SIV-infected animals (SIV+ART+). The study design for these studies is presented in **Figure 1a**. Animals were infected intravenously by the SIV mac251 strain and were treated with FTC/TDF/DTG either at week 4 or 24 following infection. After 24 months of infection, animals were sacrificed. The characteristics of the animals were as follows (**Table 1**): the control group consisted of 12 SIV-uninfected male cynomolgus macaques with a median age of 6.1 years [5.2; 9.1] and a median weight of 6.8 kg [6.2; 7.6], the SIV-infected group consisted of 11 male macaques with a median age of 6.8 years [6.3; 9.4] and a median weight of 9.8 kg [7.8; 12.7] and the SIV-infected and ARV-treated group consisted of 11 macaques with a statistically higher median age than the control group of 8.7 years [7.6; 9.7] and a median weight of 9.2 kg [9.4; 10.1].

The infection was monitored for clinical and biological parameters as previously described (Karlsson et al., 2007; Lemaitre et al., 2020): the peak of infection is observed at d12, followed by the plateau phase. For the infected groups, viral loads at euthanasia were  $1 \times 10^4$  [ $1.0 \times 10^4$ - $5.9 \times 10^4$ ] for the SIV+ group and  $<50$  copies/mL for the SIV+ART+ group, confirming the efficacy of the ART treatment (data from the w24 ART treatment group are shown in **Figure 1b**). Note that the median duration of infection was different between SIV+ and SIV+ART+ animals: 349 days for the SIV+ group versus 1112 days for the SIV+ART+, although both groups were sacrificed at the plateau phase of the infection.

	Male gender	Age at sacrifice (years)	Weight at sacrifice (kg)	Duration of infection (days)	Duration of ART (days)
SIV- N=12	100%	6.1 [5.2; 9.1]	6.8 [6.2; 7.6]		
SIV+ N=11	100%	6.8 [6.3; 9.4]	9.8 [7.8; 12.7]	349 [336;357]	
SIV+ ART W4 N=5	100%	7.2 [4.2;10.2]	8.8 [7.9;9.6]	1112 [1107;1117]	565 [565;570]
SIV+ ART W24 N=6	100%	9.2 [8.1;9.6]	9.8 [8.5;10.5]	1131 [1080;1141]	726 [726;791]

**Table 1**

Median [IQR]



**Fig. 1: Study design and kinetics of viral load following ART in SIV infected NHPs.** **A.** Experimental study design for the introduction of ART in SIV infected macaques. Schematic of the study design. Cynomolgus macaques were intravenously infected with 1000 AID50 of SIVmac251 (day 0). Two groups were treated with combination ART (TDF, FTC, DTG) starting on 4- or 24-weeks post-infection (dpi) by subcutaneous route. Animals were sacrificed at 24 months post-infection. follow-up continued for 24 weeks after treatment interruption. As controls, a group of ART naïve SIV infected animals was included but infection was maintained for 12 months before euthanasia. A group of SIV noninfected animals was also used. **B.** Kinetics of viral load following SIV infection and introduction of ART treatment. Representative follow-up for 6 animals of the group were induced at w24. Each symbol represent one animal.

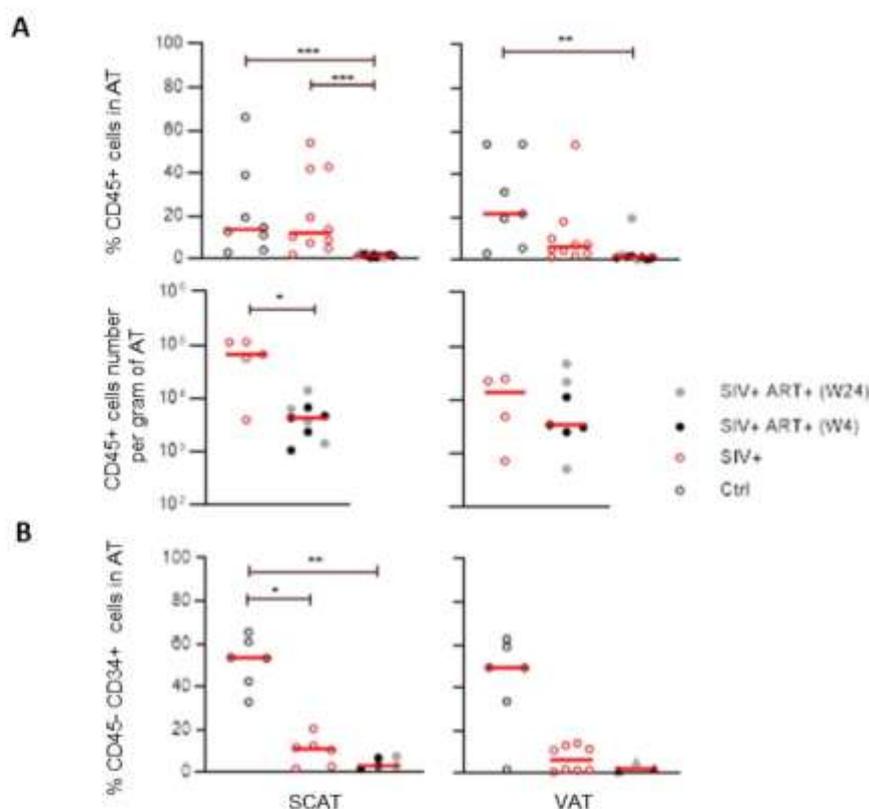
### **Decrease in the proportion of both CD45+ and CD45-CD34+ cells in the stromal vascular fraction of AT in SIV infected animals, that is not corrected by ART introduction**

We have previously described changes in the proportion of CD45+ cells among SVF cells (although their number was not changed) and in the proportion of CD8 T cells among CD3+ cells in AT following SIV infection (Damouche et al., 2015). These results suggested that major remodeling of AT occurred during SIV infection, by the recruitment of nonhematopoietic cells. We thus wanted to evaluate whether some restoration occurred following ART-treatment and whether an important fraction of the SVF, the mesenchymal stem cells that exhibit both metabolic activity (as progenitors of adipocytes) and immune activity (due to their immunosuppressive capacity) (Franquesa et al., 2015; Jeong et al., 2014; Leto Barone et al., 2013) were also impacted by SIV infection. As shown in Figure 2, the percentage of CD45+ cells in SCAT was severely impacted by ART treatment, as SIV+ART+ animals showed lower percentage of CD45+ cells compared to both SIV+ and SIV- animals. The percentage of CD45+ cells was also drastically lower in the VAT of SIV+ART+ animals compared to SIV-, but not SIV+ animals. The difference previously observed between SIV- and SIV+ were not recapitulated in this experiment, although a trend was observed in VAT. This discrepancy may rely on the lower number of SIV+ macaques included in this study. We next evaluated whether this change in the percentage of CD45+ cells was associated with a change in CD45+ cells counts. Interestingly, and in contrast with the impact of SIV infection alone, we observed a 10-fold lower number of CD45+ cells (expressed per gram of AT) in SCAT. A similar trend was observed in VAT. Thus, in contrast to the impact of SIV infection that changed the percentage but not the number of CD45+ cells, we observed a change in both percentage and number of CD45+ in the context of ART-treated infection, suggesting a severe impact of ART on the hematopoietic compartment.

To evaluate whether these modifications were specific to the CD45+ fraction, we also studied the most prominent fraction in the SVF: the adipose-derived stem cells (ASC) fraction (representing in noninfected conditions proportions ranging from 30 to 65% of the SVF in cynomolgus macaques) (Laparra et al., 2019). Interestingly, we observed a lower percentage of CD45-CD34+ cells in both SIV+ and SIV+ART+ groups compared to the control group. A similar trend was observed in VAT. Thus, in contrast to the CD45+ fraction that was mostly impacted by ART-treatment, the impact on ASC was

readily detected in SIV-infected animals. Unfortunately, the long-term exposition to ART did not restore this drastic alteration of CD45-CD34+ percentages.

Altogether, we demonstrate that ART appeared deleterious to the AT CD45+ compartment, and inoperative to restore the alterations of the CD45-CD34+ progenitor fractions.

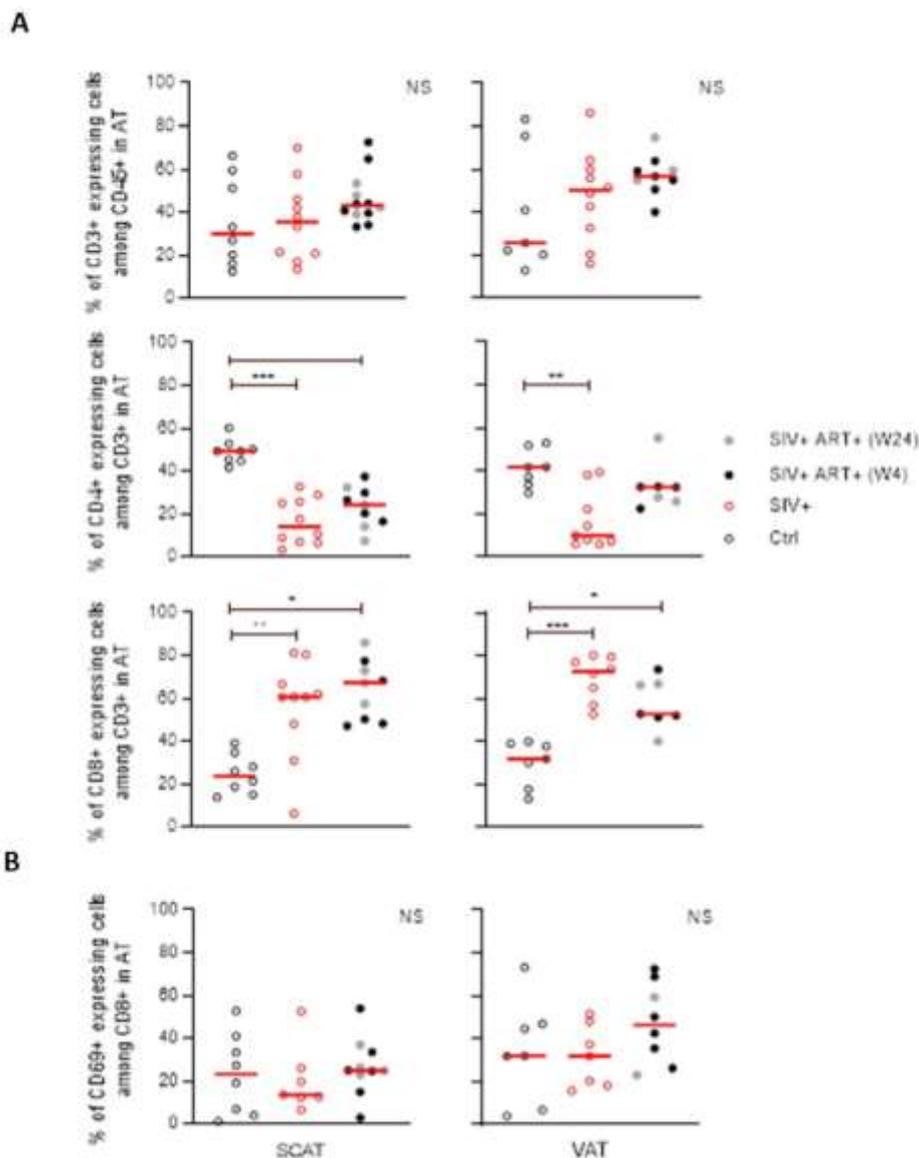


**Fig. 2: No restoration of the hematopoietic and ASC fraction following ART.** Characterization of the cellular composition of AT by flow cytometry by analysis of the CD45+ hematopoietic fraction and the CD45-CD34+ mesenchymal stem cell fraction. SCAT and VAT samples from 8 SIV-, 10 SIV+ and 8 SIV+ART+ animals were studied. The groups of animals treated at w4 or w24 were pooled as no difference was observed. **A.** Comparison of the proportions of CD45+ cells among SVF cells in the 3 groups and numbers of CD45+ cells among SVF cells per gram of AT for a small number of animals, included in the SIV+ and SIV+ART+ animals. in SCAT (left graph) and VAT (right graph) **B.** Proportions of CD45-CD34+ cells in the 3 groups, in SCAT (left graph) and VAT (right graph). The graphs show data from uninfected NHPs (black open circles), infected and viremic NHPs (red open circles), infected and treated NHPs (black full circles, W4-treated, and grey full circles, W24-treated). Statistically significant differences (as determined in a nonparametric, unpaired Mann–Whitney test) are indicated as follows: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001).

### **Sustained modification of the CD4/CD8 ratio among T cells despite the introduction of ART-treatment.**

We next evaluated the impact of ART-treatment on the immune cell compartment, and notably the CD8 T cell compartment, as higher proportion of CD8 T cells in AT of infected animals as been previously documented by our group (Damouche et al., 2015). Although the percentage of CD3+ cells was not statistically different, a trend towards a progressive increase in the percentage of CD3+ cells among SVF cells was observed (Figure 3). However, the composition of the CD3+ cell fraction was drastically affected as the proportion of CD8 T cells among T cells was higher in both SIV+ and SIV+ART+ groups compared to SIV-, in both SCAT and VAT. In mirror, the proportion of CD4 T cells among T cells was lower in both SIV+ and SIV+ART+ macaques in SCAT. In VAT, the difference in CD4 T cell proportion was observed solely between SIV+ and SIV- groups, suggesting some degree of restoration of the CD4 T cell percentage in the VAT by ART. We next evaluated whether change in the phenotype of the CD8 T cell fraction was observed during ART-treated or ART naïve infection. We studied the expression of CD69 as a marker of residency in tissue (Sathaliyawala et al., 2013; Walsh et al., 2019), PD-1 as a maker of exhaustion (Damouche et al., 2017; Porsche et al., 2021), CD45RA as a marker of terminal differentiation (Lee et al., 2014) and Ki67 as marker of proliferation. We did not detect any difference in the expression of these molecules between SIV+ and SIV+ART+ animals (Figure 3 B and data not shown), suggesting that the higher proportion of CD8 T cells may reflect preferential survival of CD8 T cells in AT compared to CD4 T cells rather than a specific recruitment of circulating CD8 T cells with a different phenotype or a change in phenotype due to the infection.

In conclusion, although the mechanisms responsible for the change in the T cell proportion as a whole, and the skewed CD4/CD8 ratio are not clearly established, ART treatment did not allow restoration of the AT T cell compartment

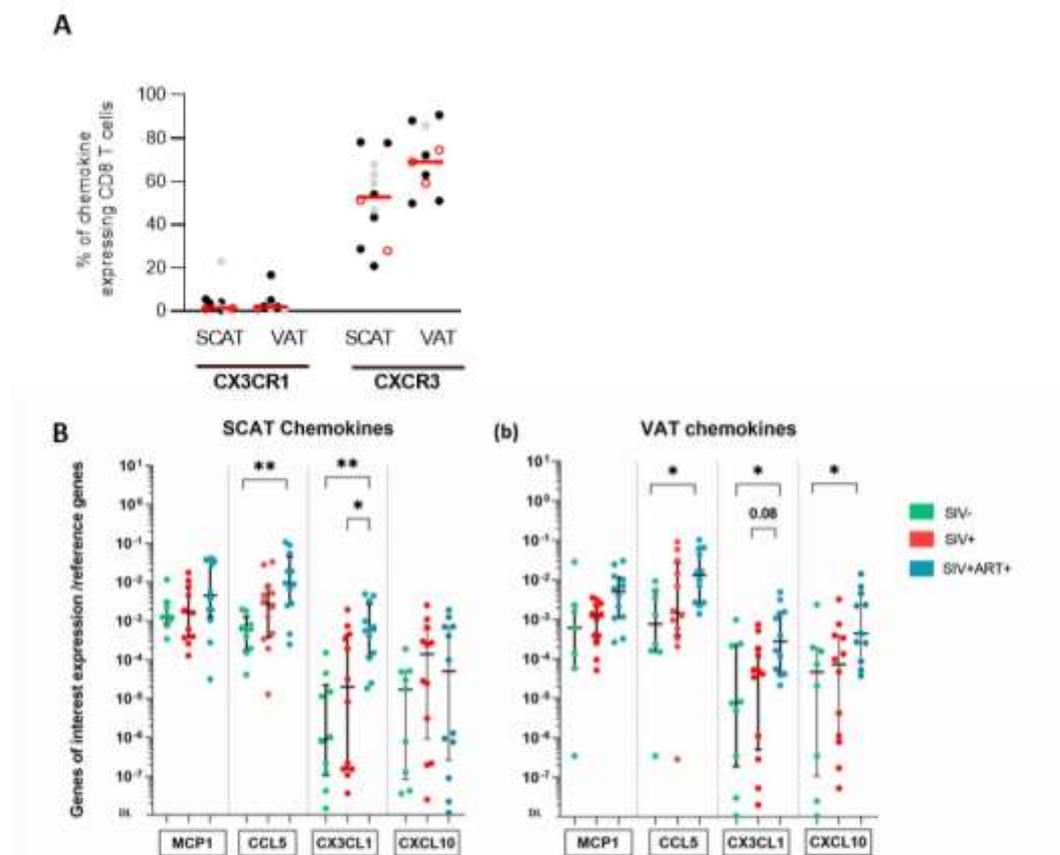


**Fig. 3: No restoration of the CD8 T cell compartment following ART introduction.** Analysis of the T cell fraction in AT by flow cytometry on the SVF fractions. **(A)** Proportions of CD3+ cells, CD4+ and CD8+ T cells in the three groups of animals: SIV-, SIV+, SIV+ART+ (including animals treated either at w4 or w24). Data collected in SCAT (left graph) and VAT (right graph). **(B)** Proportions of CD69+ cells among CD8 T cells. The graphs show data from uninfected NHPs (black open circles), infected and viremic NHPs (red open circles), infected and treated NHPs (black full circles, W4-treated, and grey full circles, W24-treated). Statistically significant differences (as determined in a nonparametric, unpaired Mann–Whitney test) are indicated as follows: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

### Specific properties of adipose tissue that may modulate the CD8 T cell compartment

We next evaluated the AT environment and notably the factors specifically modulating AT CD8 T cells during SIV infection. We first hypothesized that SIV infection and/or ART-treatment may induce pro-

inflammatory signals in AT and induce chemotaxis. We first evaluated the expression of chemokine receptor at the surface of AT CD8 T cells. As shown in Figure 4A, we observed that AT CD8 T cell preferentially expressed CXCR3 compared to CX3CR1. CX3CR1 was poorly expressed on the CD8 T cell surface whereas the expression of CXCR3 was heterogeneous on the CD8 T cells. We thus evaluated on whole tissue the expression of mRNA coding for MCP-1, CCL5, CX3CL1, CXCL10, as standard markers of macrophage (MCP1, CCL5, CXCL10) and T cell recruitment (CX3CL1, CXCL10) (Figure 4B). Indeed, macrophages recruitment may indirectly favor CD8 T cell recruitment (Kintscher et al., 2008; Suganami et al., 2005), we did not detect any difference in the expression of these chemokines between SIV+ and SIV- group, suggesting a limited impact of SIV infection per se. However, differences in CCL5, CX3CL1 were detected between SIV+ART+ and SIV+ and/or SIV- groups. We observed a significant increase in the expression of RNA encoding CCL5 in SIV+ART+ animals compared to the control group within SCAT and VAT. Regarding the expression of RNA encoding CX3CL1, a significant increase was observed in the SIV+ART+ group compared to the control group within SCAT and VAT and also between the SIV+ ART+ and the SIV+ group in the SCAT with a similar trend in the VAT. An increase in CXCL10 mRNA expression was also observed in the VAT of SIV+ART+ animals compared to SIV-. As a whole, we observed a change in the chemotactic capacity of AT in SIV+ART+ animals. However, this mechanism is not specific to the CD8 T cell fraction, and did not appear in SIV+ animals. We thus further investigated the mechanism that may specifically impact AT CD8 T cells and examine their sensitivity to metabolic signals.



**Fig. 4: Higher chemokine expression in AT of SIV+ART+ animals**

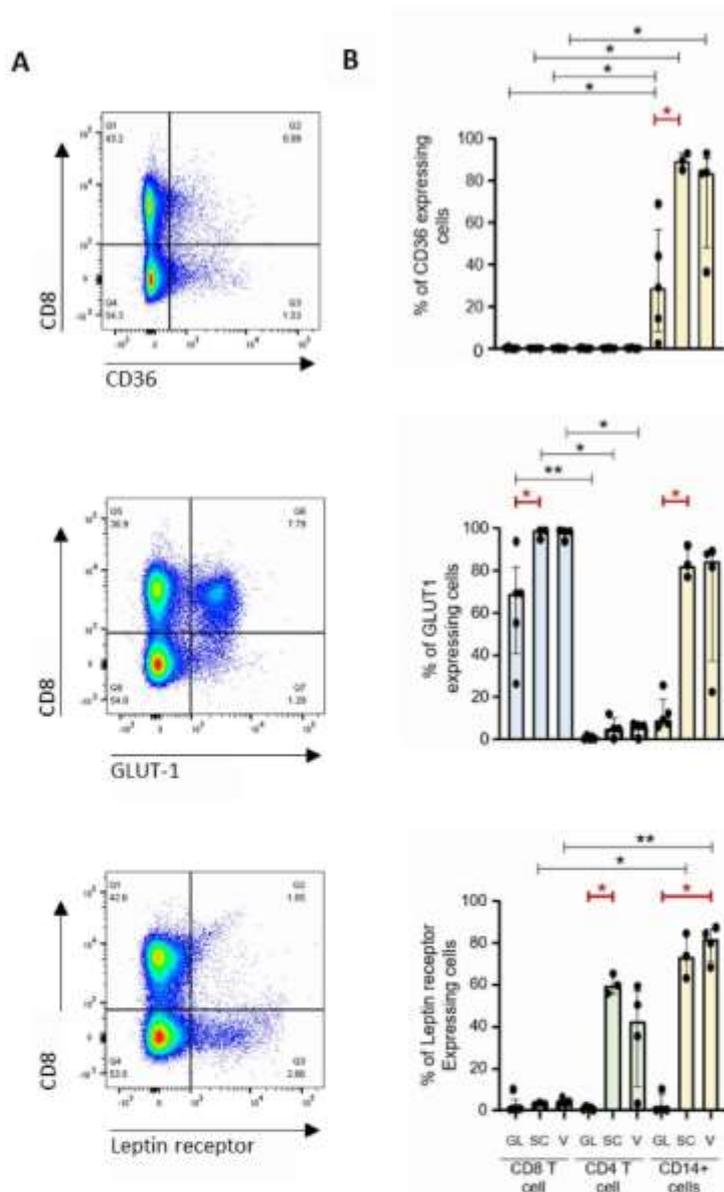
(A) Percentages of chemokine expressing CD8 T cells in SCAT and VAT. The percentage of cells expressing CXCR3 and CX3CR1 was evaluated by flow cytometry on SVF cells collected from SIV+ and SIV+ART+ individuals. Animals from the different groups were pooled as no difference were observed between groups. (B) Expression of RT-qPCR analysis of mRNA expression encoding MCP1, CCL5, CX3CL1 and CXCL10 chemo-kines within the SCAT and VAT in the three groups of animals; SIV- (green), SIV+ (red), SIV+ART+ (blue). The expression of the genes of interest is related to that of the housekeeping genes (18s and PPIA). The detection limit (DL) was set at 20 cycles of differences compared to the mean housekeeping genes expression, i.e. a DL of 10-8 fold difference. (a,b) Expression from left to right of MCP1, CCL5, CX3CL1 and CXCL10 within SCAT (a) and VAT (b) in the three groups SIV-, SIV+, SIV+ART+. Medians and interquartiles are shown. Kruskal-Wallis or Mann-Whitney tests were used for unpaired and paired tests respectively. Only significant results and trends are shown: \*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001

#### Specific sensitivity to metabolic cues of adipose tissue CD8 T cell

Adipose tissue is firstly a metabolic site and as such provide a microenvironment rich in metabolites. The response on immune cells to the metabolic environment provided by AT remains to be further explored. As an exploratory study, we analyzed the expression for receptors specific for lipids (CD36, a scavenger receptor for lipid structure), glucose (GLUT-1, a transporter for glucose), but also the

receptor for leptin, a hormone which immunostimulatory activity has been extensively described (Matarese and La Cava, 2004), and that is produced mostly by adipocytes. We analyzed the expression of these markers on three immune cell fractions: the CD8 T cells, the CD4 T cells and the CD14<sup>+</sup> monocyte/macrophages fraction collected from lymph node, SCAT or VAT from noninfected animals. As shown in Figure 5, we observed that CD14<sup>+</sup> cells expressed CD36, and this expression was increased in AT compared to lymph nodes. In contrast to CD14<sup>+</sup> cells, both CD4 and CD8 T cells did not show any detectable expression CD36 in all sites considered. Regarding GLUT-1, we observed higher expression of GLUT-1 on CD8 T cells and CD14<sup>+</sup> cells compared to CD4 T cells. The percentage of GLUT-1 expressing cells among CD8 T cells or CD14<sup>+</sup> cells was higher in SCAT compared to lymph nodes, and a similar trend was observed in VAT. Lastly, we studied the expression of CD295, the receptor for leptin. Interestingly, no expression was detected on LN subsets, but higher percentages of CD295 expressing cells was observed among CD4 T cells and CD14<sup>+</sup> cells in SCAT and VAT respectively.

Altogether, these results demonstrate that AT immune cells exhibit different profiles of metabolites uptake or metabolic sensing, suggesting that changes in the metabolic environment of AT may differently impact the various immune subsets. Such observation may provide a rationale for the different behavior of the CD8 T cells compared to CD4 T cells during ART-naïve and ART-treated SIV infection.

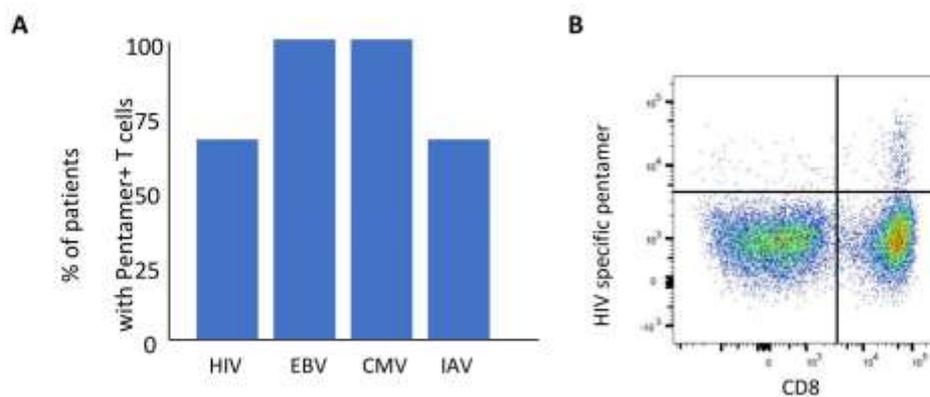


**Fig. 5: Survival and metabolic requirement.** A. Representative dot plots for CD36, GLUT& and leptin receptor on CD8 T cells. B. Analysis of metabolites receptor expression on NHP control on CD8 T cell (blue bar), CD4 T cell (green bar) and CD14+ (yellow bar) cells within lymph nodes, SCAT and VAT, using flow cytometry. Statistically significant differences (as determined in a nonparametric, unpaired Mann–Whitney test) are indicated as follows: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

### Presence of virus specific CD8 T cell in human adipose tissue

Recent publications in mice describe AT as a site of CD8 T cell accumulation (Han et al., 2017; Misumi et al., 2019) and demonstrate the protective role of AT CD8 T cell in infectious context (Han et al., 2017). These studies addressed the impact of AT CD8 T cell during a second infectious challenge in

close timeframe following the first pathogenic encounter. We thus wanted to evaluate whether the presence of pathogen specific CD8 T cells was also observed in human contexts, where antigenic and metabolic stimulation may be more frequent than for mouse hold in more controlled infectious and metabolic conditions. We thus performed a detection for viruses frequently encountered in human population: CMV, EBV and influenza. We also had the opportunity to evaluate the presence of HIV-specific CD8 T cells in AT samples collected from ART treated HIV infected patients. As shown in Figure 6, we were able to detect by pentamer detection (restricted to the HLA A2 or B8 complex, for which immunodominant peptide for CMV, EBV or influenza are described) the presence of cells specific for each of these specificities. This observation confirms in a clinical setting the presence of virus-specific CD8 T cells in AT, and thus question the impact of the alteration of the CD8 compartment during ART-treated SIV-infection.



**Fig. 6: Detection of pathogen specific CD8 T cells in adipose tissue.** (A) Pentamer staining for HIV, EBV, CMV and IAV epitopes presented in the appropriate HLA were performed on 3 ART controlled HIV infected patients (n=3), and control volunteers that were seropositive for EBV and CMV (n= 5). (A) Proportions of TA samples positive for viral specific T cells. (B) Representative dot plot of pentamer staining among AT CD8 T cells (VAT sample).

### Discussion

Despite the introduction of ART which allow reduction of viral load, chronic HIV infection is still associated with various alterations of the immune system, the gut mucosa and the microbiota, and low-grade inflammation (Deeks, 2011), that may subsequently contribute to cardiovascular comorbidities (Nix and Tien, 2014). As previously described, AT is also persistently impacted due to the combined effect of the virus and the ARV drugs. The impact of ART-treated chronic HIV infection on AT has

been increasingly documented at the metabolic level, revealing defects in adipogenesis, exacerbated fibrosis, trend towards beiging (Gorwood et al., 2019, 2020; Ngono Ayissi et al., 2022). The aim of this work was to complete the characterization of the defects developing in AT during ART treated SIV infection focusing more specifically on the progenitor and immune cells fractions. The proportion of ASC was drastically reduced in SIV-infected animals, a reduction that was not restored by the chronic exposition to ART. This decrease suggests that the regenerative potential of AT is drastically impacted. Interestingly, ASC are not only involved in the differentiation of adipocytes, chondrocytes and myofibroblasts, but also exhibit immunosuppressive functions on immune cells, potentially contributing the homeostasis of AT, by preserving a limited level of inflammation (Bobileva et al., 2019; Engela et al., 2013; Jeong et al., 2014). Therefore, ASC reduction may also impact the immune compartment and contribute to the establishment of a more pro-inflammatory environment, and a less effective immune responses. The molecular mechanisms responsible for such decay in the ASC fraction are unclear but may include continual recruitment of ASC towards differentiation in the different lineage, thus reducing the availability in ASC. A second hypothesis could be that the HIV/SIV infection disrupt the AT microenvironment creating an unfavorable environment for ASC survival, either due to a more inflammatory or more hypoxic environment. Similarly, the proportion of hematopoietic cells was decreased in SIV+ART+ animals suggesting that the hematopoietic and immune potential of AT is also affected: in chronic SIV/HIV infection. To note, a trend towards a reduction of the proportion of CD45+ cells was also observed in the VAT of SIV+ animals. Altogether, the reduction in the proportion of hematopoietic cells suggest that the immune potential of AT is severely altered, this may subsequently impact the anti-infectious activity of AT, but also the homeostasis of AT, as immune cells contribute to the functions of AT. The impact of ART appears to be the most deleterious on this immune function compared to the infection per se. Interestingly, although a drastic reduction of the proportion (and number) of CD45+ cells in AT is observed in SIV+ART+ compared to SIV+, the proportion of CD3+ or CD8+ T cells were not drastically different between SIV+ART+ and SIV+, suggesting a preferential preservation of the AT CD8 T cell compartment. In contrast to the ASC or the CD45+ fraction, the impact on the CD8 T cell fraction was readily detectable in SIV+ animals, and was not corrected in SIV+ART+. One may hypothesize a more direct impact of the infection on the CD8 T cell pool, that is

combined with a passive mechanism tending to reducing the number of all CD45+ cells, driven by the ART introduction. The disruption of the AT CD8 T cell compartment may probably impact the metabolic functions of AT, as CD8 T cell contribute to local inflammation, but the consequences of the alteration of the AT CD8 T cell compartment on the anti-infectious responses remains to be further elucidated. This aspect has been mostly neglected so far but need to be emphasized based on the recent observation demonstrating in mice an active anti-infectious role of AT CD8 T cells during the resolution of secondary challenge (Han et al., 2017). The preferential persistence of AT CD8 T cell in SIV+ animals may rely on various mechanisms: specific recruitment to AT by chemotaxis or due to the recruitment of HIV/SIV specific cells, better survival due to specific metabolic machinery, local proliferation, fibrosis that may retain AT CD8 T cells in AT. We did not observe dominant proportion of HIV specific CD8 T cells among AT, suggesting that the CD8 T cell accumulation in AT is mostly a bystander phenomenon. As shown in the report, AT CD8 T cells exhibit a specific metabolic profile that may favor their persistence in AT, being capable of high glucose uptake. The difference in metabolic uptake of macrophages (identified based on CD14), CD4 or CD8 T cells may explain why the alterations of AT may differently impact immune cells that sense AT metabolic changes by different pathways. This preferential preservation of AT CD8 T cells may have multiple consequences. On the metabolic side, it may contribute to the local inflammation and sustain AT inflammation. On the immune side, it could go either way: it could be beneficial as it may preserve the AT memory CD8 T cell pool, or it could be deleterious, as it may disrupt the CD8 T cell migratory pathway required for immunosurveillance, and lead to the loss of immune defense by inappropriate location of CD8 T cells in AT.

Regarding the mechanism responsible for such extensive defects, our results showing more severe defects in SIV+ART+ animals point towards a crucial role of ART. The toxicity of ART on adipogenesis, affecting both ASC and adipocytes is well documented (Koethe, 2017), although viral proteins also alter some aspect of adipogenesis (Agarwal et al., 2013; Gorwood et al., 2019). These defects may indirectly modify the extracellular matrix and provide an environment less favorable for CD45+ cells. Alternately, recent works also point towards a direct toxicity of ART on immune cells, that need to be further explored. Based on these data, it seems important to pursue the efforts to develop ART combination with reduced impact on AT, and further consider strategies of ART interruption.

Altogether, ART-treated chronic SIV infection combines alteration of the metabolic, regenerative, hematopoietic and immune functions of AT. These data strongly supported the development of therapies aiming at correcting the defects developing in adipose tissue. One may consider independent strategies to restore the ASC and hematopoietic functions respectively but as all AT cells are closely interacting, one may consider one targeted approach either on the metabolic or immune fraction. Regarding the hematopoietic compartment, we may envisage targeting hematopoiesis, chemotaxis pathways and/or the fibrosis. Specific strategies aiming at restoring an anti-inflammatory profile of AT may also contribute to the restoration of the immune and metabolic equilibrium in AT. Data in the BM has shown the close relationship between stem cells and immune cells, the latter providing the appropriate environment for progenitor differentiation. It is tempting to speculate that similar mechanism may occur in AT. Interestingly, BM is also a site of memory CD8 T cell accumulation, questioning the specific interaction between progenitors and CD8 T cells. The potential link between ASC/CD8 T cells and other immune cells such as Tregs will be important to decipher to design restoration strategies.

This study has obviously some limitations. As the results points towards a severe impact of ART, it could be important to consider the specific role of ART on SIV noninfected animals. A second aspect is the difference in the duration of infection in the SIV+ (12 months) and the SIV+ART+ (37 months) groups. The design of the study was based on previous studies performed in cynomolgus macaques showing that following infection, the viral peak was reached between day 10 and day 15, and then a plateau was rapidly established with limited progression. The SIV mac 251 infection is indeed a mild infection, that do not progress towards AIDS. The rationale was thus to compare two steady-state of infection, one in viremic animals, another in nonviremic animals.

In conclusion, we observed multiple and persistent defects in AT collected from ART-naïve and even more ART-treated SIV-infected animals, confirming the long-term scare inflicted by the infection to this tissue. These persistent defects may contribute to the metabolic alterations reported in ART-treated PLHIV and to the cardiovascular comorbidities. The limited correction provided by ART to the AT homeostasis points towards the need to further develop novel ART drugs, that may present lower toxicity and/or lower diffusion to AT to limit their side-effects. Additionally, one may consider complementary

therapeutic strategies to restore some of the AT functions that are severely impacted during chronic inflammation.

**Material and methods****Ethics statement**

Cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) aged 37–40 months were imported from AAALAC-certified breeding centers in Mauritius. All animals were housed at the IDMIT facility under BSL-2 and BSL-3 containment when necessary (CEA, Fontenay-aux-Roses, France) (animal facility authorization reference: D92-032-02, Hauts de Seine Prefecture, France). Animals were handled in accordance with European Directive 2010/63/EU, French regulations, and complying Standards for Human Care and Use of Laboratory Animals of the Office for Laboratory Animal Welfare (OLAW, assurance number #A5826-01). The protocols were approved by the Ethical Animal Committee of the CEA “Comité d’Ethique en Expérimentation Animale du Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives” (CEtEA #44) (statement number A15\_035). The study was authorized by “Research, Innovation and Education Ministry” under registration number APAFIS#2453-2015102713323361 v2.

**Animal models, infection and sample collection**

For ethical reasons, animals were not sacrificed for the sole purpose of collecting AT. Samples from various studies were thus analyzed for the present work (samples collected from the SIVART program, the pVISCONTI program and re-use program). Two cohorts of 11 adult cynomolgus macaques were infected intravenously with 1000 AID50 of SIVmac251 and subsequently treated with a combination of 3 ARVs (Emtricitabine (FTC, 50 mg/kg) /Tenofovir disoproxil fumarate (TDF, 20 mg/kg) /Dolutegravir (DTG, 20 mg/kg)) subcutaneously at week 4 (n=7) or 24 (n=4) after infection. Eleven adult cynomolgus macaques infected intravenously with 1000 AID50 of SIVmac251 and not treated were also included in this study. Twelve non-SIV infected animals were used as controls. At sacrifice, animals were sedated with tiletamine (4 mg/kg) and zolazepam (4 mg/kg), humanely euthanized with 18.2 mg/kg of intravenous pentobarbital sodium, and an autopsy was performed. Blood samples and samples of abdominal subcutaneous adipose tissue (SCAT) and visceral adipose tissue (VAT) were collected at necropsy.

### Cell isolation

Stromal vascular fraction was isolated from fresh AT samples. Before dissociation, SCAT and VAT were devascularized, rinsed in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Lonza, Basel, Switzerland) with 5% fetal bovine serum (FBS), and weighed. Then, AT were cut into pieces of 2 to 3 mm (to optimize enzymatic digestion). The pieces were digested in a solution of type VIII collagenase from *Clostridium histolyticum* (0.33 mg/mL in DMEM supplemented with 5% FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Enzymatic digestion was performed for 30 min at 37°C with constant stirring. This was followed by mechanical dissociation by repeated suction/discharge of the suspension with a 10 mL syringe. The AT suspension was filtered through a cell strainer (pore size: 100 µm; Corning, New York, NY, USA) and low-speed centrifuged (300g, 10 min at room temperature). The upper phase of the supernatant (adipocytes) was discarded, and the lower phase (comprising the SVF cells) was centrifuged further (660g, 8 min at room temperature). After two additional washes, supernatants were discarded the pellet containing the SVF was resuspended, filtered through a cell strainer (pore size: 100 µm) and resuspended in DMEM with 5% FBS. Trypan blue-treated cell suspensions were then counted in Malassez counting chambers (C-chip, NanoEntek, Seoul, Korea) under the microscope, using to exclude dead cells. The SVF was either immediately stained for flow cytometry analysis or cryopreserved in FBS 10% DMSO for cell preservation.

### Cell staining and flow cytometry

Cytometry staining was performed after the saturation of Fc receptors by incubation with 1:10 diluted Fc block reagent (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) for 15 min at 4°C. Next, cells were incubated for 15 min at 4°C with fluorophore-labelled antibodies against the following surface markers. For the T cell panel, surface markers were : 1:10 diluted CX3CR1 (APC, 2A9-1) from Biolegend (San Diego, CA, USA); 1:20 diluted CD45RA (BUV496, 5H9), HLA-DR (BUV661, G46-6), CD27 (BUV737, M-T271), CD103 (BUV805, BerCAT8), CD45 (BV510, DO58 1283), CD4 (BV605, L200), CD8 (BV650, RPA T8), CD3 (BV786, SP34-2), CD69 (PerCP-Cy5.5, FN50) from BD Biosciences, CCR7 (BV711, GO43H7), KLRG1 (PE-Cy7, 2F1/KLRG1) from Biolegend, CD57 (PE, TB01/HNK-1) from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA); and 1:40 diluted PD-1 (BV421, EH12 2H7),

CXCR3 (PE-CF594, GO25H7) from Biolegend. For the metabolic panel, surface markers were : 1:20 diluted CD45 (V500, D058-1283), CD8 (BV650, RPA T8), CD45RA (BV711, 5H9), CD36 (FITC, CB38), CD4 (PE-CF594, L200), CD295 (APC, 52263) or GLUT1 (APC, 202915) from BD Biosciences, CD3 (BV786, SP34-2) from Biolegend (San Diego, CA, USA), and 1:40 diluted CD14 (PerCP-Cy5.5, M5E2) from BD Biosciences. After incubation, cells were washed in PBS 1X. Next, cells were incubated for 15 min at 4°C with 1:2000 diluted amine-reactive blue dye (Live/Dead Fixable, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The cells were washed in PBS 1X and were fixed in 1% paraformaldehyde. T cell panel data were acquired on the ZE5 Cell Analyzer (Hercules, CA, USA), metabolic panel data were acquired with an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (version 10.6.2, FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

### **Chemokine mRNA detection**

We used aliquots of 50 to 100 mg of whole AT fragments stored at -80°C. A first step of tissue dissociation of the tissue in Qiazol (Qiagen, Venlo Netherlands) was performed by using the Tissue-lyser (Qiagen) and allowed the extraction of nucleic acids. Purification of mRNAs was performed using the GeneJET RNA Purification kit (Life Technologies, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's instructions. A quality control of the extracted RNA by Nanodrop was performed after each extraction to define the RNA concentration and to evaluate the presence of contaminations (protein residues and organic solvents). A retrotranscription step was used to produce complementary DNA (Enhanced Avian RT-PCR Kit, Sigma-Adrich, St. Louis, USA). The expression of each the gene of interest was analyzed by real-time quantitative PCR using specific primers (Life Technologies). PCR was performed on the BioRad CFX96 Real Time System using a program of 50 amplification cycles using the Taq polymerase mix from Roche Biosystems (each cycle corresponding to 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°).

We used specific pre-established primers tested for efficiency designed for the following genes (TaqMan™ Gene Expression Assay, Life Technologies): MCP-1 (Mf02787889\_g1), CX3CL1 (Rh03043051\_m1), CCL5 (Mf02788105\_m1), IP-10 (Mf02788358\_g1). For housekeeping genes: Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) (Mf04932064\_gH), Large Ribosomal Protein (RPLPO) (Mf04343677\_g1) and 18s (Hs99999901\_s1). Most primers were developed specifically for the

cynomolgus macaque, apart from the CX3CL1 and 18s primers for which cross-reactivity was validated. The primers were associated with fluorescein phosphoramidite (FAM) labeling allowing the monitoring of amplification at each cycle. Analysis of amplification curves (including  $\Delta C_t$  measurement) was performed on Bio-Rad CFX Maestro 2.0 software.

### **Statistics analysis**

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 8, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Continuous variables were quoted as the median [interquartile range, IQR]. Groups were compared using a nonparametric, unpaired Kruskal–Wallis or the Mann–Whitney test; if the groups differed significantly, Dunn's post-test was applied. In graphs, the threshold for statistical significance was indicated as follows:  $p < 0.05$  (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

### **Acknowledgment**

We thank the members of the COVIR team for their helpful suggestions. This work was funded by a grant from ANRS-MIE (French Agency for HIV, Hepatitis and Emerging Diseases (ANRS-MIE)). A.O. received a PhD fellowship from APHP (Assistance publique des Hôpitaux de Paris) and ANRS-MIE . We thank B. Delache, F Relouzat, S. Langlois, Q. Sconosciuti, V. Magneron, P. Le Calvez, M. Potier, J. M. Robert, N; Dhooge T. Prot, and C. Dodan for the NHP experiments; L. Bossevot, M. Leonec, L. Moenne-Loccoz, M. Galpin-Lebreau, L. Pintore and J. Morin, M. Cavarelli, R. Marlin, M. Galhaut, and V. Contreras, Barendji, J. Dinh and E. Guyon for the NHP sample processing and discussions; S. Keyser for the transports organization; F. Ducancel, A. Pouget and Y. Gorin for their help with the logistics and safety management; B. Targat contributed to data management. The Infectious Disease Models and Innovative Therapies (IDMIT) research infrastructure is supported by the “Programme Investissements d’Avenir”, managed by the ANR under reference ANR-11-INBS-0008. The Fondation Bettencourt Schueller and the Region Ile-de-France contributed to the implementation of IDMIT’s facilities and imaging technologies.

### References

Agarwal, N., Iyer, D., Patel, S.G., Sekhar, R. V, Phillips, T.M., Schubert, U., Oplt, T., Buras, E.D., Samson, S.L., Couturier, J., et al. (2013). HIV-1 Vpr induces adipose dysfunction in vivo through reciprocal effects on PPAR/GR co-regulation. *Sci. Transl. Med.* *5*, 213ra164.

Allers, K., Puyskens, A., Epple, H.J., Schürmann, D., Hofmann, J., Moos, V., and Schneider, T. (2016). The effect of timing of antiretroviral therapy on CD4<sup>+</sup> T-cell reconstitution in the intestine of HIV-infected patients. *Mucosal Immunol.* *9*, 265–274.

Bobyleva, P., Gornostaeva, A., Andreeva, E., Ezdakova, M., Gogiya, B., and Buravkova, L. (2019). Reciprocal modulation of cell functions upon direct interaction of adipose mesenchymal stromal and activated immune cells. *Cell Biochem. Funct.* *37*, 228–238.

Damouche, A., Lazure, T., Avettand-Fènoël, V., Huot, N., Dejuq-Rainsford, N., Satic, A.-P.A.-P., Mélard, A., David, L., Gomet, C., Ghosn, J., et al. (2015). Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection. *PLOS Pathog.* *11*, e1005153.

Damouche, A., Pourcher, G., Pourcher, V., Benoist, S., Busson, E., Lataillade, J.-J., Le Van, M., Lazure, T., Adam, J., Favier, B., et al. (2017). High proportion of PD-1-expressing CD4<sup>+</sup> T cells in adipose tissue constitutes an immunomodulatory microenvironment that may support HIV persistence. *Eur. J. Immunol.* *47*, 2113–2123.

Deeks, S.G. (2011). HIV Infection, Inflammation, and Aging. *Annu Rev Med* *62*, 141–055.

Deeks, S.G., Lewin, S.R., and Havlir, D. V. (2013a). The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet (London, England)* *382*, 1525–1533.

Deeks, S.G.G., Tracy, R., and Douek, D.C.C. (2013b). Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity* *39*, 633–645.

Diggins, C.E., Russo, S.C., and Lo, J. (2022). Metabolic Consequences of Antiretroviral Therapy. *Curr. HIV/AIDS Rep.* *19*, 141–153.

Engela, A.U., Hoogduijn, M.J., Boer, K., Litjens, N.H.R., Betjes, M.G.H., Weimar, W., and Baan, C.C. (2013). Human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells induce functional de-novo regulatory T cells with methylated FOXP3 gene DNA. *Clin. Exp. Immunol.* *173*, 343–354.

Franquesa, M., Mensah, F.K., Huizinga, R., Strini, T., Boon, L., Lombardo, E., DelaRosa, O., Laman, J.D., Grinyó, J.M., Weimar, W., et al. (2015). Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Abrogate Plasmablast Formation and Induce Regulatory B Cells Independently of T Helper Cells. *Stem Cells* *33*, 880–891.

Fromentin, R., Bakeman, W., Lawani, M.B., Khoury, G., Hartogensis, W., DaFonseca, S., Killian, M., Epling, L., Hoh, R., Sinclair, E., et al. (2016). CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLoS Pathog.* *12*, e1005761.

Giralt, M., Domingo, P., and Villarroya, F. (2011). Adipose tissue biology and HIV-infection. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *25*, 487–499.

Gorwood, J., Bourgeois, C., Mantecon, M., Atlan, M., Pourcher, V., Pourcher, G., Le Grand, R., Desjardins, D., Feve, B., Lambotte, O., et al. (2019). Impact of HIV/simian immunodeficiency virus infection and viral proteins on adipose tissue fibrosis and adipogenesis. *AIDS* *33*, 953–964.

Gorwood, J., Bourgeois, C., Pourcher, V., Pourcher, G., Charlotte, F., Mantecon, M., Rose, C., Morichon, R., Atlan, M., Le Grand, R., et al. (2020). The integrase inhibitors dolutegravir and raltegravir exert proadipogenic and profibrotic effects and induce insulin resistance in human/simian adipose tissue and human adipocytes. *Clin. Infect. Dis.* *71*.

Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 415–445.

Han, S.-J., Glatman Zaretsky, A., Andrade-Oliveira, V., Collins, N., Dzutsev, A., Shaik, J., Morais da Fonseca, D., Harrison, O.J., Tamoutounour, S., Byrd, A.L., et al. (2017). White Adipose Tissue Is a Reservoir for Memory T Cells and Promotes Protective Memory Responses to Infection. *Immunity* *47*, 1154-1168.e6.

Jeong, S.-H., Ji, Y.-H., and Yoon, E.-S. (2014). Immunosuppressive Activity of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rat Model of Hind Limb Allograft Transplantation. *Transplant. Proc.* *46*, 1606–1614.

Karlsson, I., Malleret, B., Brochard, P., Delache, B., Calvo, J., Le Grand, R., and Vaslin, B. (2007). Dynamics of T-cell responses and memory T cells during primary simian immunodeficiency virus infection in cynomolgus macaques. *J. Virol.* *81*, 13456–13468.

Khoury, G., Fromentin, R., Solomon, A., Hartogensis, W., Killian, M., Hoh, R., Somsouk, M., Hunt, P.W., Girling, V., Sinclair, E., et al. (2017). Human Immunodeficiency Virus Persistence and T-Cell Activation in Blood, Rectal, and Lymph Node Tissue in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals Receiving Suppressive Antiretroviral Therapy. *J. Infect. Dis.* *215*, 911–919.

Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T.F.E., Dragun, D., Skurk, T., et al. (2008). T-lymphocyte Infiltration in Visceral Adipose Tissue: A Primary Event in Adipose Tissue Inflammation and the Development of Obesity-Mediated Insulin Resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 1304–1310.

Koethe, J.R. (2017). Adipose Tissue in HIV Infection. In *Comprehensive Physiology*, (Hoboken, NJ,

USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 1339–1357.

Kök, A., Hocqueloux, L., Hocini, H., Carrière, M., Lefrou, L., Guguin, A., Tisserand, P., Bonnabau, H., Avettand-Fenoel, V., Prazuck, T., et al. (2015). Early initiation of combined antiretroviral therapy preserves immune function in the gut of HIV-infected patients. *Mucosal Immunol.* *8*, 127–140.

Lagathu, C., Béréziat, V., Gorwood, J., Fellahi, S., Bastard, J.P., Vigouroux, C., Boccara, F., and Capeau, J. (2019). Metabolic complications affecting adipose tissue, lipid and glucose metabolism associated with HIV antiretroviral treatment. *Expert Opin. Drug Saf.* *18*, 829–840.

Laparra, A., Tricot, S., Le Van, M., Damouche, A., Gorwood, J., Vaslin, B., Favier, B., Benoist, S., Ho Tsong Fang, R., Bosquet, N., et al. (2019). The Frequencies of Immunosuppressive Cells in Adipose Tissue Differ in Human, Non-human Primate, and Mouse Models. *Front. Immunol.* *10*, 117.

Lee, S.A., Sinclair, E., Hatano, H., Hsue, P.Y., Epling, L., Hecht, F.M., Bangsberg, D.R., Martin, J.N., McCune, J.M., Deeks, S.G., et al. (2014). Impact of HIV on CD8+ T Cell CD57 Expression Is Distinct from That of CMV and Aging. *PLoS One* *9*, e89444.

Lemaitre, J., Cosma, A., Desjardins, D., Lambotte, O., and Le Grand, R. (2020). Mass Cytometry Reveals the Immaturity of Circulating Neutrophils during SIV Infection. *J. Innate Immun.* *12*, 170–181.

Leto Barone, A.A., Khalifian, S., Lee, W.P.A., and Brandacher, G. (2013). Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells: fact or fiction? *Biomed Res. Int.* *2013*, 383685.

Lindqvist, M., van Lunzen, J., Soghoian, D.Z., Kuhl, B.D., Ranasinghe, S., Kranias, G., Flanders, M.D., Cutler, S., Yudanin, N., Muller, M.I., et al. (2012). Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J. Clin. Invest.* *122*, 3271–3280.

Matarese, G., and La Cava, A. (2004). The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends Immunol.* *25*, 193–200.

Miles, B., and Connick, E. (2016). TFH in HIV Latency and as Sources of Replication Competent Virus. *Trends Microbiol.* *24*, 338.

Misumi, I., Starmer, J., Uchimura, T., Beck, M.A., Magnuson, T., and Whitmire, J.K. (2019). Obesity Expands a Distinct Population of T Cells in Adipose Tissue and Increases Vulnerability to Infection. *Cell Rep.* *27*, 514-524.e5.

Mudd, J.C., and Brenchley, J.M. (2016). Gut Mucosal Barrier Dysfunction, Microbial Dysbiosis, and Their Role in HIV-1 Disease Progression. *J. Infect. Dis.* *214*, S58–S66.

Ngono Ayissi, K., Gorwood, J., Le Pelletier, L., Bourgeois, C., Beaupère, C., Auclair, M., Foresti, R., Motterlini, R., Atlan, M., Barrail-Tran, A., et al. (2022). Inhibition of Adipose Tissue Beiging by HIV Integrase Inhibitors, Dolutegravir and Bictegravir, Is Associated with Adipocyte Hypertrophy, Hypoxia,

Elevated Fibrosis, and Insulin Resistance in Simian Adipose Tissue and Human Adipocytes. *Cells* *11*, 1841.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., et al. (2009). CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* *15*, 914–920.

Nix, L.M., and Tien, P.C. (2014). Metabolic Syndrome, Diabetes, and Cardiovascular Risk in HIV. *Curr. HIV/AIDS Rep.* *11*, 271.

Porsche, C.E., Delproposto, J.B., Geletka, L., O'Rourke, R., and Lumeng, C.N. (2021). Obesity results in adipose tissue T cell exhaustion. *JCI Insight* *6*.

Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J.J.C., Bickham, K.L., Lerner, H., Goldstein, M., Sykes, M., et al. (2013). Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* *38*, 187–197.

Suganami, T., Nishida, J., and Ogawa, Y. (2005). A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *25*, 2062–2068.

Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E.A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M.-R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R.S., et al. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.* *12*, 1198–1202.

Verhoeven, D., Sankaran, S., Silvey, M., and Dandekar, S. (2008). Antiviral Therapy during Primary Simian Immunodeficiency Virus Infection Fails To Prevent Acute Loss of CD4<sup>+</sup> T Cells in Gut Mucosa but Enhances Their Rapid Restoration through Central Memory T Cells. *J. Virol.* *82*, 4016–4027.

Walsh, D.A., Borges da Silva, H., Beura, L.K., Peng, C., Hamilton, S.E., Masopust, D., and Jameson, S.C. (2019). The Functional Requirement for CD69 in Establishment of Resident Memory CD8<sup>+</sup> T Cells Varies with Tissue Location. *J. Immunol.* *jj1900052*.

### **Annexe de l'article 3**

La version de l'article présentée ci-dessus nécessitera d'être complétée par quelques données non disponibles à ce jour. Nous souhaitons tout d'abord mieux caractériser le modèle animal de l'étude en précisant des paramètres biologiques telles que la numération de LyT plasmatiques et la charge virale tissulaire et les paramètres pharmacocinétiques avec les concentrations tissulaires des ARV. Ces données ont été collectées lors du suivi de l'étude mais ne sont pas encore disponibles. Démontrer la bonne diffusion des ARV dans le TA semble en effet un élément capital pour (i) discuter de la faible correction des altérations lymphocytaires observées dans le TA, et/ou (ii) discuter d'une toxicité des ARV sur le TA.

Nous réfléchissons également à compléter les données présentées par des études complémentaires. Différents axes sont envisagés :

- Nous pensons qu'il serait utile de renforcer les données sur l'effet spécifique des ARV sur les modifications du TA par l'étude d'une groupe de singes non infectés et traités.
- Mieux caractériser les modifications de la composition cellulaire du TA par une analyse en séquençage de l'ARN en cellules uniques (technique Genomics, Chromium). Du fait du rôle immunomodulateur d'un grand nombre de sous-populations présentes dans le TA, cette technique nous permettrait de définir au niveau basal la composition cellulaire du TA, et d'évaluer l'impact de l'infection et/ou du traitement sur les cellules présentes dans le TA.
- Une autre stratégie consisterait à approfondir les données concernant la diminution drastique des précurseurs mésenchymateux du TA. Une étude de la capacité de différenciation à partir de la SVF nous permettra de confirmer cette perte de potentiel régénératif. Une étude complémentaire sur une fraction triée d'ASC nous permettra de compléter les données concernant le faible potentiel régénératif du tissu. Ce travail sera mené en collaboration avec l'équipe du Dr Claire Lagathu, au Centre de Recherche de Saint Antoine.
- Nous souhaiterions également intégrer davantage de données de métabolisme et de bioénergétique. En effet, le TA est un site métabolique perturbé lors de l'infection par le SIV ou le VIH, qu'elle soit traitée ou non. Néanmoins, nous n'avons que peu d'éléments sur les modifications de la production de métabolites par le TA que ce soit au niveau basal à la suite d'une infection, ou à son traitement. Nous avons initié des analyses de métabolomiques et lipidomiques avec l'équipe du Pr Christophe Junot (Service de Pharmacologie et Immuno-analyse, plateforme Métabolome IDF). Nous souhaiterions également approfondir la notion

d'une sensibilité métabolique différente des cellules immunitaires du TA aux signaux métaboliques. Une étape complémentaire serait d'évaluer la machinerie énergétique mise en place par chaque sous-type cellulaire dans le TA (par technique SeaHorse notamment). Ces données nous renseigneraient sur les voies énergétiques utilisées par les LyT CD8 du TA et déterminerait leur potentiel impact sur la survie et la fonctionnalité des cellules du TA. L'objectif serait ainsi de combiner une analyse de (i) la disponibilité en métabolites, (ii) l'expression de récepteurs aux signaux métaboliques et (iii) les voies énergétiques prioritairement utilisées.



**Revue 1.** *Contribution du tissu adipeux à l'activation immunitaire et à l'inflammation chronique associée à l'infection par le VIH et les traitements antirétroviraux*

C. Bourgeois, J. Gorwood, A. Olivo, L. Le Pelletier, J. Capeau, O. Lambotte, V. Béréziat, C. Lagathu  
Frontiers in Immunology, Frontiers, 2021, 12, pp.670566

- Résumé

Le TA est un acteur majeur de l'inflammation dans les contextes d'obésité. Cette implication est à relier à sa large distribution dans l'organisme, une activité endocrinienne majeure, une composante immuno-métabolique. Toute altération du TA pourrait ainsi concourir à une inflammation locale et systémique. Au cours de l'infection par le VIH, le TA est non seulement la cible directe des protéines virales mais il est aussi la cible des molécules ARV et de leurs toxicités. Parmi les molécules lipotoxiques, les INTI de première génération sont associés à une un stress oxydatif et une mort prématurée des adipocytes ; les IP affectent les voies métaboliques et induisent une résistance à l'insuline ; les inhibiteurs d'intégrase induisent une hypertrophie adipocytaire et une fibrose. Les effets délétères des protéines virales et des ARV sont difficiles à distinguer chez les PVVIH traitées et d'autres paramètres individuels (vieillesse naturel, statut métabolique et comorbidités associées), des paramètres de l'infection (taille du réservoir viral pré-établi, qualité de la restauration immunitaire, exposition au traitement ARV) doivent également être considérés. Les PVVIH présentent une exposition à une inflammation de bas grade supérieure à la population générale, ce qui se traduit par des facteurs de risque de maladies cardio-vasculaires augmentés. De ce fait, comprendre l'implication du virus et des traitements pour en prévenir les effets délétères est primordial.



# Contribution of Adipose Tissue to the Chronic Immune Activation and Inflammation Associated With HIV Infection and Its Treatment

Christine Bourgeois<sup>1\*</sup>, Jennifer Gorwood<sup>2</sup>, Anaëlle Olivo<sup>1</sup>, Laura Le Pelletier<sup>2</sup>, Jacqueline Capeau<sup>2</sup>, Olivier Lambotte<sup>1,3</sup>, Véronique Béréziat<sup>2††</sup> and Claire Lagathu<sup>2††</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Nicholas Funderburg,  
The Ohio State University,  
United States

### Reviewed by:

Cristian Apetrel,  
University of Pittsburgh, United States  
Karen Ingrid Tasca,  
São Paulo State University, Brazil

### \*Correspondence:

Christine Bourgeois  
christine.bourgeois@u-psud.fr  
Véronique Béréziat  
veronique.bereziat@inserm.fr  
Claire Lagathu  
claire.lagathu@inserm.fr

<sup>††</sup>These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Viral Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 21 February 2021

Accepted: 24 May 2021

Published: 18 June 2021

### Citation:

Bourgeois C, Gorwood J, Olivo A,  
Le Pelletier L, Capeau J, Lambotte O,  
Béréziat V and Lagathu C (2021)  
Contribution of Adipose Tissue to the  
Chronic Immune Activation and  
Inflammation Associated With HIV  
Infection and Its Treatment.  
*Front. Immunol.* 12:670566.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.670566

<sup>1</sup>CEA - Université Paris Saclay - INSERM U1184, Center for Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases, IDMIT Department, IBFJ, Fontenay-aux-Roses, France, <sup>2</sup>Sorbonne Université, INSERM UMR\_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Institut Hospitalo-Universitaire de Cardio-métabolisme et Nutrition (ICAN), FRM EQU201903007868, Paris, France, <sup>3</sup>AP-HP, Groupe Hospitalier Universitaire Paris Saclay, Hôpital Bicêtre, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Le Kremlin-Bicêtre, France

White adipose tissue (AT) contributes significantly to inflammation – especially in the context of obesity. Several of AT's intrinsic features favor its key role in local and systemic inflammation: (i) large distribution throughout the body, (ii) major endocrine activity, and (iii) presence of metabolic and immune cells in close proximity. In obesity, the concomitant pro-inflammatory signals produced by immune cells, adipocytes and adipose stem cells help to drive local inflammation in a vicious circle. Although the secretion of adipokines by AT is a prime contributor to systemic inflammation, the lipotoxicity associated with AT dysfunction might also be involved and could affect distant organs. In HIV-infected patients, the AT is targeted by both HIV infection and antiretroviral therapy (ART). During the primary phase of infection, the virus targets AT directly (by infecting AT CD4 T cells) and indirectly (via viral protein release, inflammatory signals, and gut disruption). The initiation of ART drastically changes the picture: ART reduces viral load, restores (at least partially) the CD4 T cell count, and dampens inflammatory processes on the whole-body level but also within the AT. However, ART induces AT dysfunction and metabolic side effects, which are highly dependent on the individual molecules and the combination used. First generation thymidine reverse transcriptase inhibitors predominantly target mitochondrial DNA and induce oxidative stress and adipocyte death. Protease inhibitors predominantly affect metabolic pathways (affecting adipogenesis and adipocyte homeostasis) resulting in insulin resistance. Recently marketed integrase strand transfer inhibitors induce both adipocyte adipogenesis, hypertrophy and fibrosis. It is challenging to distinguish between the respective effects of viral persistence, persistent immune defects and ART toxicity on the inflammatory profile present in ART-controlled HIV-infected patients. The host metabolic status, the size of the pre-established viral reservoir, the quality of the immune restoration, and the natural ageing with associated comorbidities may mitigate and/or reinforce the contribution of antiretrovirals (ARVs)

toxicity to the development of low-grade inflammation in HIV-infected patients. Protecting AT functions appears highly relevant in ART-controlled HIV-infected patients. It requires lifestyle habits improvement in the absence of effective anti-inflammatory treatment. Besides, reducing ART toxicities remains a crucial therapeutic goal.

**Keywords:** adipose tissue, HIV infection, fat, antiretroviral treatment, chronic inflammation, chronic immune activation

## THE BIOLOGY OF ADIPOSE TISSUE

### Several “Colors” of Adipose Tissue: White, Brown, Beige, and Pink

Adipose tissue (AT) is a loose connective tissue composed of differentiated adipocytes and stroma/vascular cells (a heterogeneous cell population including endothelial cells, immune cells, fibroblasts, and adipocyte precursors). White adipocytes are characterized by a single, large droplet of cytoplasmic fat and a flattened nucleus. Brown adipocytes contain several small lipid droplets and large numbers of mitochondria and lysosomes; the latter are responsible for the tissue's brown color. Beige adipocytes (white adipocytes that have differentiated into brown adipocytes) are characterized by multilocular lipid droplets. Lastly, pink adipocytes are white adipocytes that have differentiated into milk-producing gland cells during pregnancy, lactation, and post-lactation (1).

The various ATs differ with regard to their metabolic activity, sites, plasticity, vascularization and innervation. White adipose tissue (WAT) is the main site for lipid storage and mobilization and has a high secretion capacity. The activity of WAT is strongly linked to inflammation in healthy individuals (where low-grade inflammation is required for correct metabolic activity) (2), and even more so in ageing and in people with fat gain/obesity (where the more intense inflammation contributes to the loss of metabolic activity) (3). Brown adipose tissue (BAT, mainly characterized in rodents) ensures non-shivering thermogenesis; it can maintain thermal homeostasis by dissipating large amounts of energy in the form of heat. It used to be thought that BAT was only present in meaningful amounts in infants and that it regressed and become metabolically inactive in adults. However, recent positron emission tomography (PET) imaging studies of glucose uptake have revealed the presence of substantial deposits of thermogenic fat in adult humans (4, 5). Besides being highly metabolically active, BAT is densely innervated by the sympathetic nervous system (6) and is relatively insensitive to inflammatory signals. Recent studies have demonstrated the presence of brown-like adipocytes in WAT. These “Beige” adipocytes (also referred to as “browned” or “brite” [“brown in white”] adipocytes) are highly thermogenic adipocytes (6). They are functionally flexible and can either store or dissipate energy, depending on the environmental or physiological circumstances. Like brown adipocytes, beige adipocytes oxidize fatty acids and glucose and have large numbers of mitochondria. In response to various stimuli, the energy is dissipated as heat through uncoupled respiration (7). This mechanism is mediated by the uncoupling protein-1 (UCP-1)

present in the inner mitochondrial membrane. Beige adipocytes can enhance energy expenditure by inducing a futile cycle that involves free fatty acid (FFA)  $\beta$ -oxidation and re-esterification (8, 9). This process might constitute a crucial adaptive response to excess energy supplies. In humans, the correlation between leanness and high levels of brown and beige fat activity suggests that these ATs have an important metabolic role (4, 5, 10).

Adipocytes are highly plastic, as exemplified by the beiging process, which corresponds to recruitment of the adaptive thermogenic adipocytes. Beiging may be a novel therapeutic target for mitigating lipid storage, alleviating metabolic disorders and thus dampening the associated inflammatory profile.

### A Focus on WAT and Its Unique Properties WAT Is Influential Because of Its Large Mass and Broad Distribution

WAT is the body's main energy reservoir; it stores energy as triglycerides and releases energy (in response to hormonal stimuli) as FFAs. This AT accounts for 15 to 25% of body weight in lean, healthy individuals and much greater percentage in overweight and obese people. In contrast to BAT, WAT is distributed throughout the body. There are two main types of WAT: subcutaneous adipose tissue (SCAT, accounting for about 80% of AT in lean individuals) and visceral adipose tissue (VAT, located in the intra-abdominal cavity, e.g. at omental, mesenteric, and retroperitoneal sites). Although lean individuals have a small amount of VAT, this tissue expands considerably in people with metabolic disorders. Intra-abdominal VAT is able to communicate with nearby internal organs, such as the intestinal tract and the liver. Several mechanisms are involved in this communication, with the release of metabolites, hormones, cytokines and miRNAs (11, 12). Perivascular AT, epicardial AT, lymph-node (LN)-associated AT, bone-marrow (BM)-infiltrating AT, and (in the context of metabolic disorders) ectopic AT in liver or muscles have been described (see section 4). Lastly, the anatomical distribution of WAT in contact with the external environment (such as the intestinal tract and the skin) and with immune structures (LNs, BM, and thymus) might be crucial in the modulation of local immune responses.

### WAT Is Also a Major Endocrine Organ

WAT is less metabolically active than BAT but has a unique endocrine profile. The main endocrine activity in WAT is adipokine secretion [for a review, see (13)]. In fact, WAT secretes over 400 different adipokines, which are usually

categorized as being anti-inflammatory or pro-inflammatory but also contribute to metabolic regulation. Some of these adipokines are produced by the adipocytes themselves (such as the prototypical adipokines leptin and adiponectin), whereas others are mainly produced by immune cells located in the AT (interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-8, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted chemokine (RANTES), etc.) (Table 1). The well-known satiety factor leptin is secreted specifically by adipocytes in SCAT and (to a lesser extent) VAT and has a role in energy regulation. Blood leptin levels are correlated with the AT mass. Adiponectin is the other main adipocyte-specific adipokine. It is mainly secreted by VAT and is known to enhance fatty acid oxidation by muscle tissue and to increase the action of insulin in the liver. Thus, blood adiponectin levels are inversely correlated with insulin resistance. Importantly, both leptin and adiponectin also have immunomodulatory functions (20, 21).

The influence of adipose-secreted factors on systemic and distal inflammation, angiogenesis, vascular homeostasis, fibrolysis, and the immune system is not fully understood (22) and is being evaluated in various diseases [including inflammatory arthritis, autoimmunity (23), inflammatory bowel disease (24), and cancer (25)]. The AT's adipokine secretion profile is strongly modulated by the metabolic and inflammatory context. The various bioactive adipokines exert autocrine, paracrine and endocrine effects on local and systemic targets. The AT's endocrine activity appears to depend on the adipokine in question and the tissue site: SCAT produces IL-6 and TNF- $\alpha$  but the latter does not have an endocrine effect (26, 27). In contrast, the TNF- $\alpha$  produced by mesenteric AT contributes to inflammation in the mesentery (28). Most recently, AT has also been identified as a site of miRNA

production; miRNAs with endocrine activity are packaged into exosomes and then released into the circulation (11).

### Metabolic and Immune Cells Coexist in AT

The influence of AT on acute or chronic immune responses depends on the resident immune cells. As mentioned above, AT contains differentiated adipocytes and stromal/vascular cells. Virtually all the known types of immune cell have been detected in WAT: eosinophils, neutrophils, mast cells, macrophages, T lymphocytes (including regulatory T cells, CD4 and CD8  $\alpha\beta$  T cells,  $\gamma\delta$  T cells, and natural killer (NK) T cells), type I and II innate lymphoid cells, and invariant NK cells (29). Remarkably, the presence of immune cells is required for the full metabolic activity of AT under normal conditions. Macrophages (including M2 anti-inflammatory and M1 pro-inflammatory subsets) and T lymphocytes are the most numerous immune cells in AT. The macrophages clear dead adipocytes, buffer lipids and contribute to angiogenesis (30). The regulatory CD4 T cell (Tregs) fraction is highly represented in lean AT in some mouse models (31). Other Th2-like cells (e.g. eosinophils) also help to limit excessive inflammation and modulate lipogenesis (32). Importantly, a degree of inflammation in AT is essential for homeostasis (2). Whereas adipose stem cells (ASCs) are crucial for metabolic homeostasis, they also send immunomodulatory signals to immune cells. In an *in vitro* study of the immunomodulatory effect of ASCs on macrophages isolated from osteoarthritic synovial tissue, the secretion of prostaglandin E2 favored the M1-to-M2 transition (33). *In vitro* culture of human ASCs with T lymphocytes also induces immunosuppression through the PD1/PDL1 Gal-9/TIM-3 pathways (34). The interplay between immune and metabolic cells is subtle, and metabolic stress induce changes in the immune cells' composition and functions.

TABLE 1 | Cytokine production by AT.

	Differences between VAT and SCAT			Cell source	
				Adipocytes	Stromal/vascular cells
<b>Pro-inflammatory factors</b>					
IL-6	VAT	>	SCAT	++	++
TNF- $\alpha$	VAT	=	SCAT	+	+++
IL-1 $\beta$	VAT	>	SCAT	+	++
Resistin	VAT	>	SCAT	+	++
Leptin	SCAT	>	VAT	+++	-
<b>Chemokines</b>					
IL-8	VAT	>	SCAT	+	++
RANTES	VAT	>	SCAT	+	++
MCP-1	VAT	>	SCAT	+	++
<b>Anti-inflammatory factors</b>					
IL-10	VAT	=	SCAT	+	++
IL-1R $\alpha$	VAT	=	SCAT	+	+
IL-4	VAT	>	SCAT	+	++
Adiponectin	VAT	>	SCAT	+++	-

This table gives a non-exhaustive list of adipokines/cytokines with prominent pro- or anti-inflammatory activities from among the 400 produced by AT. Three groups are defined here: pro-inflammatory cytokines (IL-6, Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , resistin, and leptin); chemokines (IL-8, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted chemokine (RANTES)), and anti-inflammatory factors (IL-10, IL-1R $\alpha$ , IL-4, and adiponectin). The secretion profile depends on the site (i.e. SCAT vs. VAT) and the cell type (14–19).

SCAT, Subcutaneous adipose tissue; VAT, Visceral adipose tissue; IL, Interleukin.

In addition to having key roles in metabolic regulation, these immune cells notably exhibit immune and cytokine-secreting activities that might contribute directly to systemic inflammation and/or sustain/exacerbate local inflammation in AT. Recent research has suggested that tissue-resident T lymphocytes contribute to secondary immune responses by migrating towards lymphoid sites, although the underlying mechanisms have not been fully evaluated (35, 36). If this process occurs in AT (e.g. with the release of memory T cells into draining LNs), it might constitute a novel way in which AT contributes to chronic immune activation.

### Functional Differences Between SCAT and VAT

Although SCAT and VAT are morphologically similar; the latter is more densely vascularized and innervated and contains larger numbers of adipocytes, and immune cells (37).

#### Metabolic Differences

A growing body of evidence suggests that SCAT and VAT differ in their metabolic characteristics (38, 39) and thus their functions. VAT has a lower proportion of preadipocytes and a higher proportion of large adipocytes (39). Furthermore, VAT adipocytes are more insulin-resistant than SCAT adipocytes but also have a higher metabolic rate. In fact, VAT is more sensitive to adrenergic stimulation and thus more prone to lipolysis and FFA release. In contrast, SCAT buffers levels of FFAs and triglycerides. The progenitor cells' adipogenic capacity is closely linked to metabolic changes. In obesity, hypertrophic adipocytes (which contribute to contribute to insulin resistance) are frequently observed in VAT (40), and VAT expansion is correlated with the onset of metabolic disorders (41, 42). Adipocyte precursors isolated from SCAT displayed a higher adipogenic potential than those from VAT (40). In rodent models of obesity, it has been shown that SCAT is metabolically beneficial. Indeed, the intra-abdominal transplantation of SCAT ameliorates several metabolic parameters, including insulin resistance (43). Likewise, removal of VAT can prevent the onset of insulin resistance (44).

#### Endocrine and Immune Differences

VAT vs. SCAT differences in endocrine activity have been documented in both healthy lean individuals and obese individuals (Table 1). The differences are more pronounced in the context of obesity. In healthy individuals, differences in C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) (45, 46) have been reported, and adiponectin is secreted more by VAT than by SCAT. However, VAT is prone to being pro-inflammatory in response to obesity. IL-6 is secreted more by VAT than by abdominal SCAT, whereas leptin is secreted more by SCAT. On the cellular level, no difference in the number of macrophages has been detected, although VAT has a more pro-inflammatory profile than SCAT (47). In mice fed a high-fat diet, macrophage infiltration is increased rapidly in VAT but not in SCAT (48, 49). It is noteworthy that macrophages and inflammation also contribute to the remodeling of the extracellular matrix (ECM). In VAT in obese individuals,

increased fibrosis (characterized by the excessive production of ECM components) interrupts normal metabolic functions and accentuates inflammatory responses (48, 49) (see the following section).

### Differences Between Subcutaneous Upper Versus Lower Fat

The SCAT is the greater fat mass in healthy individuals, and differential capacity for certain subcutaneous regions are described, notably lower-body (gluteal fat, subcutaneous leg fat, and intramuscular fat), and upper-body subcutaneous fat (including abdominal SCAT) (50). Although the accumulation of upper fat (abdominal obesity, including visceral and abdominal subcutaneous) is associated with the development of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus, lower-body fat has protective properties that are associated with an improved cardiometabolic risk profile in men and women (51). However, the underlying mechanisms for the functional differences between upper and lower-body AT remain elusive (52). The observation that regional characteristics are retained *in vitro* strongly indicates that the differences in adipocyte functions are inherent to the depot rather than a consequence of the local microenvironment. Abdominal and gluteofemoral SCAT present differentially-expressed developmental genes (53, 54) including members of the homeobox (HOX) family, HOX-domain encoding genes and T-box genes. In addition, lower-body AT is characterized by low lipid mobilization (55, 56) through  $\alpha$ -adrenergic (antilipolytic) receptors. The release rates of non-esterified fatty acid (NEFA) are lower, in accordance with the reduced overall turnover of the triglyceride pool of this tissue (52). On the other side, abdominal SCAT is characterized by smaller adipocytes, higher expression of adipogenic, lipolytic, and mitochondrial genes associated with lower oxygen consumption (57) and the capacity to recruit new adipocytes seems limited in this tissue. Thus, different metabolic pathways regulate lipid metabolism in upper- versus lower-body fat and these tissues respond differently to weight gain in favor of a causality between lower-body fat accumulation and reduced risk of cardiometabolic diseases.

### The Plasticity of AT and Fibrosis in the Context of Obesity/Metabolic Disorders

AT is highly plastic, so that it can regulate energy influx and efflux. Adipocytes react to energy overload by initiating hypertrophy (an increase in cell size, due to lipogenesis and triglyceride accumulation) and hyperplasia (an increase in cell number, due to adipogenesis); both of these processes are associated with metabolic and endocrine changes, as extensively reviewed elsewhere (13, 58, 59). During AT expansion, the ECM requires remodeling to accommodate adipocyte growth. In AT, the ECM is characterized by collagens; these are produced mainly by adipocytes but also by stromal/vascular cells. Adipocytes are maintained within an ECM network whose deposition is impaired during obesity. Fibrosis can mechanically limit tissue plasticity and contribute to metabolic impairments (60). In obese individuals, the presence

of pericellular fibrosis and fibrosis bundles was negatively correlated with hypertrophy (61). In this context, fibrosis is associated with inflammation and insulin resistance (60, 62, 63). Moreover, ECM deposition was found to be higher in SCAT than in VAT in both lean and obese subjects (63), although adipocyte hypertrophy in VAT coincides with increased adipocyte death, formation of crown-like structure, inflammation, and insulin resistance (60, 64, 65). Simultaneous changes in the immune cell compartment are also observed and drastically modify the AT's secretory profile (66). Although adipocytes secrete some pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF $\alpha$ , and IL-8) at low levels, immune cells account for most of the cytokine secretion.

### Immune System Activation and Inflammatory Activity of AT in Obese Contexts

AT inflammation is a standard feature of obesity, and mainly involves AT macrophages. Macrophage accumulation and a progressive shift from an M2 phenotype to an M1 phenotype are observed in AT during obesity (49). This translates into a shift from the secretion of immunosuppressive cytokines [such as IL-10 and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )] to the secretion of pro-inflammatory cytokines (such as IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-12, IL-23, and IL-1 $\beta$ ). However, several mechanisms are involved in the shift in the AT's inflammatory profile; they include the direct impact of adipocyte dysfunction and M1 differentiation (both through the adipocyte's cytokine production (67) and lipid buffering) and the local influence of other immune events, such as neutrophil accumulation, Th1 bias (leading to greater IFN- $\gamma$  production), and a reduction in the proportion of Tregs. The recruitment of neutrophils (rather than eosinophils) also contributes to the AT's pro-inflammatory secretion profile; the production of superoxide, elastase and myeloperoxidase by neutrophils and IL-1 $\beta$  production contribute to the inflammatory response (68). The Th2-Th1 shift and the recruitment of CD8 T cells increase the level of IFN- $\gamma$  production, favors M1 macrophage polarization, and activates adipocytes (69). Additionally, Th17 cells are also recruited in AT in obese contexts, under the combined influences of AT macrophages, ASC and adipocytes (70). Recruitment of NK cells is also described in visceral (epididymal) but not subcutaneous AT in the HFD mouse model. The upregulation of NK activating ligands by adipocytes contributes to the increase in NK cells in SCAT, that will subsequently contribute to M1 macrophage differentiation (48, 71). The exact sequence of events is still not fully known, although neutrophils and CD8 T cells appear to have crucial roles in the initiation of local inflammatory responses (68, 72) because they are detected before the accumulation of macrophages. Moreover, inflammatory macrophages disrupt ECM homeostasis, which leads to fibrosis (2). Lastly, advanced glycation end-products (AGE) that are increased in obese diabetic patients, impact both adipocyte and immune cells functions, as both cell types express the receptor for AGE (RAGE) (73, 74). On the whole, inflammation in AT is triggered by several integrated mechanisms and involves the

various cell subsets in the AT, i.e. immune cells, adipocytes, and (presumably) ASCs - a shift towards a more inflammatory profile has not been described for the latter. In a vicious circle, the concomitant pro-inflammatory signals produced by these various cell types help to drive local inflammation.

### Contribution of AT to Low-Grade Inflammation During Obesity

Obesity is associated with low-grade inflammation (75–77) and insulin resistance (78). It is generally acknowledged that the secretion of adipokines by AT contributes to overall inflammation, although the exact contribution of a given pro-inflammatory cytokine to local and/or systemic inflammation is difficult to evaluate. The complexity of the inflammatory network that develops in AT (involving intricate, redundant, time-framed interactions between pro-inflammatory signals) is an initial hurdle. The integrated metabolic and inflammatory processes that drive each other in the AT (79) and thus amplify local inflammation constitute a second hurdle. Lastly, a third level of complexity relates to the opposing influences of cytokines produced by metabolic vs. immune cells, since the results appear to depend on the type of producing cell for IL-6 (80) and type I interferon [as reviewed in (81)] (82, 83). Although the secretion of adipokines by AT contributes to overall inflammation, the low-grade inflammation observed in the blood is due to many inflammatory factors, including lipotoxicity, disruption of gut microbiota, and systemic immune activation. The severity of obesity and the development of metabolic comorbidities (84) must also be taken into account.

## CAUSES OF ADIPOSE TISSUE ALTERATIONS DURING HIV INFECTION

HIV infection in ART-naive patients is characterized by wasting, affecting both muscle and fat mass. ART-naive patients have lower SCAT volume and decreased whole tissue expression of pro-adipogenic genes compared to HIV-negative controls together with decreased mitochondrial DNA (mtDNA) content and reduced expression of mitochondria-encoded proteins that are required for adequate adipocyte metabolic function (85). Different AT alterations were observed in HIV-infected patients receiving ART. Although HIV impacts AT biology per se and metabolic profile (86), these changes were mainly attributed to the ART. The first-generation drugs taken by patients had lipotoxic effects; the resulting lipoatrophy gave rise to a syndrome called "ART-related lipodystrophy". Once lipotoxic molecules had been replaced by less toxic drugs, patients progressively gained fat (mainly on the trunk). The broad use of the newer class of integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) now means that some patients can increase their overall fat mass. Understanding why AT mass, distribution, and function are often altered in HIV-infected patients (regardless of the type of ART) is a real challenge. Viral persistence certainly has an

important role, together with HIV-related changes in the immune context inside and outside AT. The fact that the patients' fat alterations became severe only after the introduction of ART molecules (i) emphasizes the drugs' essential contribution to harmful changes and (ii) suggests that HIV and some antiretrovirals (ARVs) act in synergy on adipocytes and other adipose cells to induce metabolic and inflammatory dysfunctions in AT and thus trigger adverse events in other tissues.

### HIV-Related Fat Alterations: The Impact of HIV Infection on AT Biology

Although ART is clearly associated with adverse events, the presence of metabolic alterations in treatment-naïve, HIV-infected people (86) suggests that the virus itself also has an impact on AT biology. All the studies performed in the 2000s found that adipocytes were not infected by HIV (87, 88) and that no HIV components were present in these cells. However, other HIV-related mechanisms have been identified (Figure 1).

#### Viral Proteins

Since viral proteins are present in patients with no detectable viral load (87, 89, 90), it has been suggested that Vpr, Nef, Tat and Gag have an impact on AT.

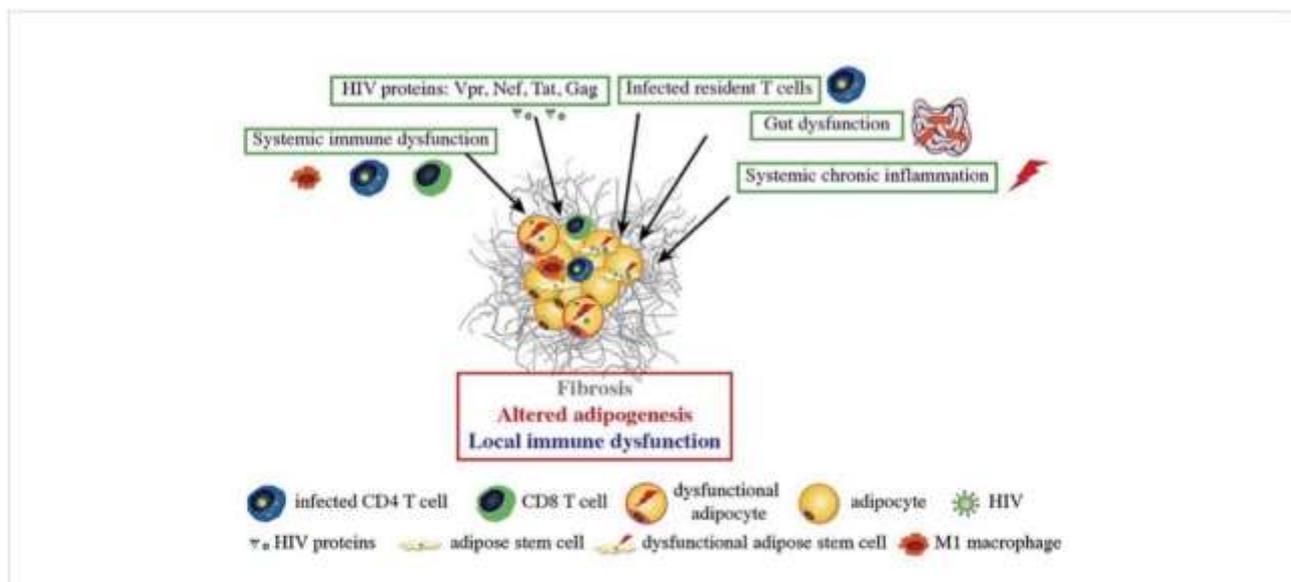
The mechanisms whereby viral proteins might affect adipocyte functions have been investigated *in vitro*. Nef, the accessory protein Vpr, and the regulatory protein Tat have been shown to alter adipogenesis (85, 91, 92) and might also

contribute to the onset of insulin resistance in adipocytes (92). Interestingly, some studies have shown that Tat induces mitochondrial dysfunction [probably through mitochondrial membrane permeabilization and the generation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) (93)], which might account for the observed AT dysfunction and insulin resistance. It was established that HIV infection upregulated the expression of collagen 6, fibronectin and the profibrotic factor TGF- $\beta$  in SCAT and (to a lesser extent) VAT. These observations were confirmed *in vitro*, where Tat and Nef promoted the acquisition of a profibrotic phenotype and increased the production of ECM components by adipocytes and their precursors (91).

The impact of the viral proteins on immune cells is well documented in general but has not been specifically investigated for AT-resident immune cells. It is known that the intracellular diffusion of viral proteins influences the function of T cells (94–96) and macrophages (97, 98). Nef binds to CXCR4 and modulates T cell activation (99). Lastly, T cells are activated (as expected) after exposure to viral proteins but the impact on the immune response in AT has not been extensively investigated.

#### Direct Infection of AT-Resident CD4 T Cells

The observation of high numbers of immune cells (and notably CD4 T cells and macrophages) in AT in obese individuals prompted reexamination of whether AT was directly infected by HIV. Couturier et al. detected HIV in the stromal vascular fraction prepared from AT (100). Subsequently, HIV (and SIV,



**FIGURE 1** | HIV-related alterations in AT. HIV itself and the viral proteins produced by infected cells induce fibrosis and alter adipogenesis and local immune functions. HIV proteins are secreted by infected cells within AT and can impact the nearby adipose stem cells (ASCs) and adipocytes. Dysfunctional ASCs present mitochondrial dysfunction, elevated levels of oxidative stress and a profibrotic phenotype. The proteins impede the ASCs' ability to differentiate into adipocytes; this leads to dysfunctional adipocytes with low expression of adipogenic markers, lipid accumulation, and leptin and adiponectin secretion. HIV-protein-treated adipocytes also acquired a pro-inflammatory phenotype that is involved in local inflammation and immune dysfunction. Systemic factors (gut dysfunction, systemic chronic inflammation, and immune dysfunction) also contribute to AT dysfunction, with the induction of CD8 T cells, macrophages infiltration, and a shift towards a pro-inflammatory M1 macrophage profile.

in macaque models) were detected in the CD4 T cell fraction (101, 102) in both viremic and controlled ART-experienced patients. Lastly, several research groups have confirmed that the virus found in AT is replication-competent (102, 103). It is noteworthy that unambiguous data on the macrophage fraction are not available: the virus was found in the viremic macaque model but not in samples from ART-experienced, HIV-infected patients (102).

### Systemic effects of HIV infection on AT functions

Although HIV is undetectable in the blood of ART responders, some dysfunctions persist. An ART-controlled HIV infection is known to be associated with low-grade chronic inflammation and persistent immune dysfunction (104–107), although the extent of these defects is subject to debate. Schematically, three main HIV-related factors may indirectly impact AT functions: gut dysfunction, immune dysfunction, and inflammation.

#### Gut Dysfunction

A crucial event during the first stage of an HIV infection is the severe, rapid depletion of the CD4 T cell compartment in the gut. ART enables only partial restoration of the gut mucosa (108) and does lasting damage to the gut's functional properties. In some ART-controlled patients, gut dysfunction impacts both the immune responses and the AT functions. The intactness of the epithelial barrier is weakened, leading to greater microbial load and viral persistence that are factors in chronic immune activation and inflammation. The disruption of the gut microbiota (109) modulates AT functions and subsequently impacts AT immune cells. Indeed, gut microbiota has a causal role in the development of obesity and associated metabolic disorders (12, 110, 111): microbiota transplanted from obese mice induces obesity. Given the central role of gut microbiota on metabolic and immune responses, multiple pathways are presumably involved (increase in LPS that may directly favor AT expansion, changes in metabolites and miRNA production by the gut, resulting in changes in AT immune cells inflammatory potential and in metabolites, adipokines and miRNA production by AT...). We currently lack data on changes in metabolite and miRNA production in the gut during chronic ART-controlled HIV infection.

#### Immune Dysfunction

The immune responses that develop during HIV infection lead to a progressive loss of cell function. For example, HIV-specific CD8 T cells exhibit an exhausted profile (112). The loss of immune function has several known causes, and others probably remain to be found. The following causes are commonly cited: (i) persistent antigenic stimulation; (ii) dysregulated immunoregulation (the important immunosuppressive population of Tregs are targeted by HIV, albeit to a lesser extent than conventional CD4 T cells, and thus control the immune responses less tightly); (iii) immune activation caused by exposure to a pro-inflammatory environment, (iv) the differentiation of T cells into less functional cells (such as senescent and/or exhausted cells), which in turn favors antigen persistence. Given that the AT is

also a site of immune cell accumulation (predominantly CD4 T cells and immunoregulatory T cells in lean individuals), immune dysfunction during chronic HIV infection can particularly disturb the AT-resident immune cells' immune and metabolic functions.

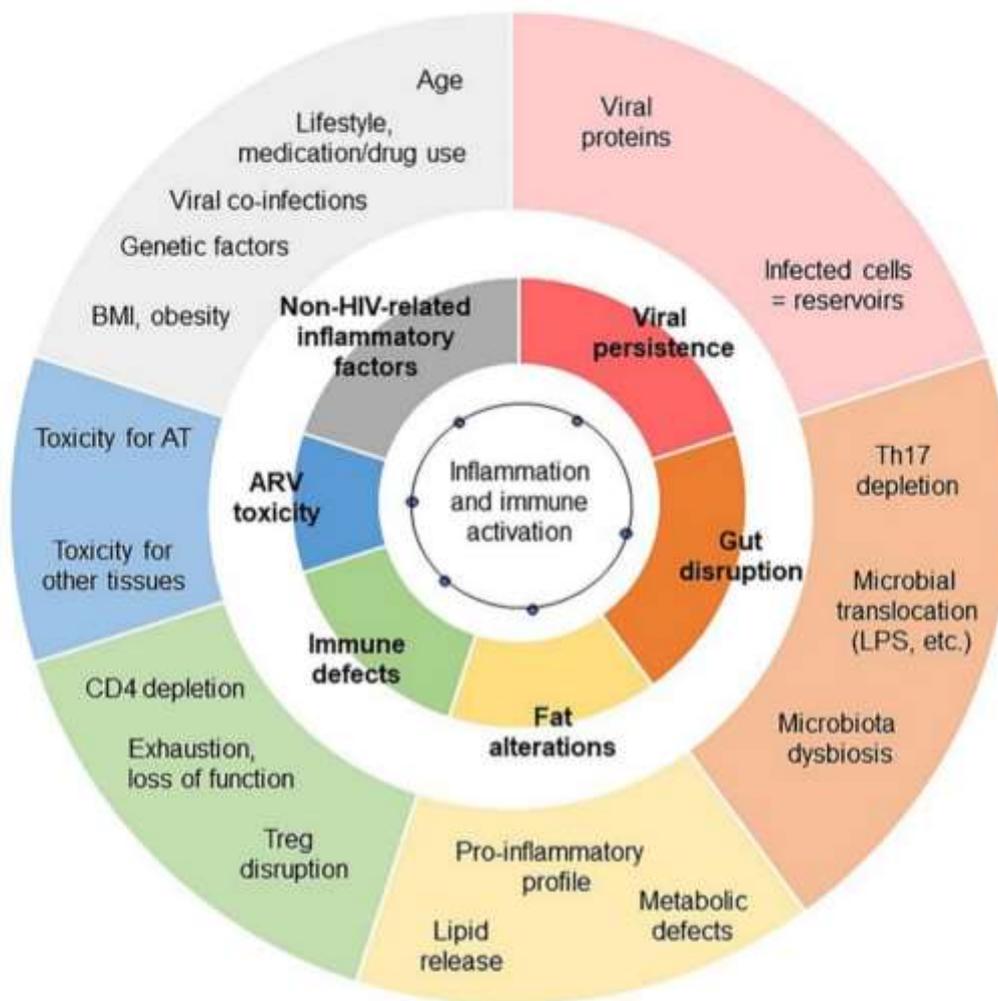
#### Chronic Inflammation

The low-grade inflammation observed in chronic HIV-controlled patients has several causes. It combines immune dysfunctions (CD4 depletion, which is partially restored; defects in immunomodulatory mechanisms, and gut disruption), metabolic inflammation ("meta-inflammation"), inflammation associated with pathogen persistence/overload (leading to constant immune activation, i.e. "infectious inflammation") and "inflammaging" (HIV infection has been linked to accentuated ageing) (3). The residual inflammatory signature also depends on several factors, including the CD4 T cell count (both at the nadir and after treatment), the timing of ART, the patient's age and gender of the patients, and non-HIV-related factors (overweight, viral co-infections, smoking, alcohol consumption, recreational drug abuse, drug toxicity, etc.) (106, 113). Regardless of the exact nature of the inflammation that develops during a chronic ART-controlled HIV infection, the AT is highly sensitive to the inflammatory environment. As described above, systemic inflammation may contribute to or initiate local inflammation in AT. Reciprocally, AT inflammation may contribute to the systemic low-grade inflammation observed in HIV-infected patients (**Figure 2**). Importantly, the amplitude and nature of this chronic inflammation is also highly dependent on effective ART. This therapy restores the CD4 T cell count fully or partially (as defined by the patient's status as an "immune responder" or an "immune nonresponder") and reduces microbial translocation, viral persistence in reservoirs, and inflammation. Although ART is highly beneficial, it is also associated with metabolic side effects – notably within AT. ART can thus drastically change the nature of the inflammation that persists during chronic HIV infection.

### ART-Related Lipodystrophy Description

Prior to the development of ART, HIV-infected patients were seen to experience severe changes in body composition (including loss of muscle and AT) during the first few years of HIV infection. This resulted in cachexia, especially when patients had progressed to AIDS (85).

The introduction of the first thymidine nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), such as zidovudine and stavudine, enabled partial control of the HIV infection and delayed the onset of AIDS. Next, the introduction of protease inhibitors (PIs) enabled the "resurrection" of patients with AIDS who were already in a state of profound, life-threatening immunodeficiency. Triple therapy (a combination of two NRTIs and a PI) enabled real control of the virus, with an increase in the CD4 cell count and a marked decrease in the HIV load. However, patients with controlled infections



**FIGURE 2** | Contribution of AT dysfunction to HIV-related low-grade inflammation. The exact degree of low-grade inflammation associated with chronic, controlled HIV infections remains subject to debate. The inflammation profile depends on the biomarkers studied and the clinical context of chronic HIV infection (including the time of ART initiation, and the severity of the primary phase of the infection). However, various triggers of inflammation are commonly reported to contribute to low-grade chronic inflammation: viral persistence, gut disruption, immunoregulatory defects, and non-HIV related comorbidities. Each of these main factors (shown in the inner circle) has several subfactors (shown in the outer circle). Fat alterations and the toxicity of ARVs also contribute.

commonly lost fat, even though the muscle mass was unaffected. This lipoatrophy was observed at all SCAT locations (the limbs, trunk, face, and buttocks). In particular, facial lipoatrophy gave the patient a striking, stigmatizing, cadaveric appearance – a hallmark of HIV infection. Furthermore, the levels of visceral fat variously decreased or increased, giving a mixed lipodystrophy phenotype (peripheral lipoatrophy plus central lipohypertrophy). Lastly, some patients developed a “buffalo neck”, with the accumulation of fat at the back of the neck.

It was soon determined that thymidine NRTIs (mainly stavudine but also zidovudine) were responsible for the lipodystrophy, and these drugs were replaced by NRTIs with

little or no AT toxicity. However, the features of lipoatrophy can persist for years (with long-term cardiometabolic consequences) after a patient has switched from thymidine NRTIs.

### The Impact of First-Generation ARVs on Adipocytes and Their Progenitors

The mechanisms underlying the effects of individual drugs on AT have been investigated *ex vivo* and *in vitro*. The *ex vivo* studies of fat samples from patients were limited by the fact that none of the latter were being treated with a single ART and that the triple therapy at that time constituted of a PI and two NRTIs. In general, only subcutaneous fat samples were available. The

*in vitro* studies of each ART on adipose cells in cultured models were limited by the absence of a true, three-dimensional AT milieu comprising the different cell types (Figure 3).

**The First-Generation Thymidine NRTIs Stavudine and Zidovudine**

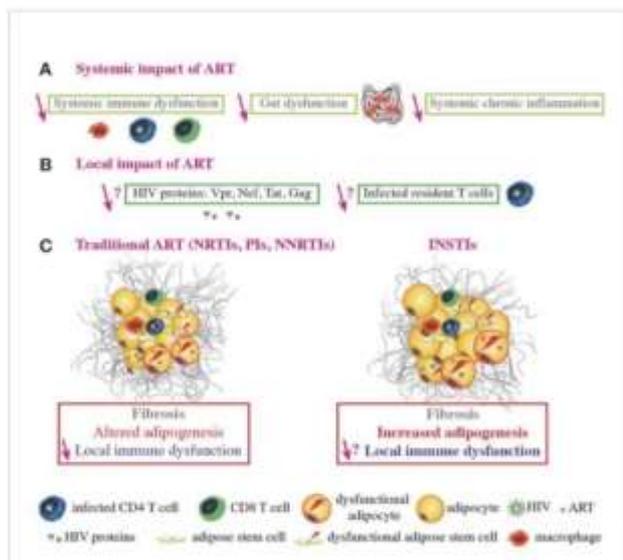
*Ex vivo* analyses of samples taken from lipoatrophic areas indicated that AT was deeply affected, with small adipocytes, fibrosis, and crown-like structures indicating the infiltration of macrophages around dead adipocytes (114, 115). This situation was unusual because crown-like structures are observed during obesity, when adipocytes are enlarged. In cases of lipoatrophy, these histological features pointed to a toxic effect of ART on adipocytes. Furthermore, expression levels of the main adipogenic factors (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$

(PPAR- $\gamma$ ), CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP- $\alpha$ ), and sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (SREBP-1)), adipose markers, adiponectin, and leptin were abnormally low. Greater levels of inflammation were characterized by increased gene and protein expression of proinflammatory cytokines (like IL-6 and TNF- $\alpha$ ) by stressed adipocytes and immune cells infiltrating the AT. Furthermore, the AT from lipoatrophic subjects has a low mitochondrial DNA (mtDNA) content and low expression levels of the mitochondria-encoded proteins required for adequate metabolic function in adipocytes (116, 117). In end-stage lipoatrophy, all the subcutaneous ASCs and adipocytes were destroyed. In contrast to SCAT, few studies have evaluated alterations in VAT in ART-treated patients. However, NRTIs appear to be less toxic for VAT adipocytes than for SCAT adipocytes (85).

The role of thymidine NRTIs was further investigated in patients who switched from these drugs. Progressive AT recovery was observed, although recovery from severe lipoatrophy was often only partial - probably due to irreversible exhaustion of the ASCs in subcutaneous fat (118).

**The First-Generation PIs Indinavir and Nelfinavir**

Studying PIs in clinical AT samples was difficult since the patients were receiving two NRTIs (including one thymidine NRTI) at the same time as a PI. Therefore, most of the information on the effects of indinavir and nelfinavir has been obtained *in vitro* (see below). It has been suggested that some PIs have a role in the shift from a brown/beige phenotype to a white phenotype because the expression of the micro-RNA processing enzyme Dicer was found to be low in lipoatrophic areas, and this decrease was proportional to the duration of PI use.



**FIGURE 3 |** ART-related fat alterations. ART controls HIV replication, improves systemic immune function, decreases chronic inflammation, promotes immune reconstitution and function, improves gut function and integrity, and decreases the viral load and viral protein concentration in the blood (A). However, it is not known whether ART decreases the number of infected T cells or the viral protein concentration within AT (B). Regarding conventional ART, the NRTIs stavudine and zidovudine, some PIs boosted by ritonavir, and the NNRTI efavirenz (EFV) induce alterations in AT such as fibrosis, altered adipogenesis, and local immune dysfunction. ART does improve immune function and expression levels of some adipogenic markers (e.g. PPAR $\gamma$ ) in the AT, relative to treatment-naïve HIV-infected patients. However, adipogenic marker expression is still lower than in non-infected people. ART induces mitochondria dysfunction and alters adipogenesis in both ASCs and adipocytes. ART-treated adipocytes present with oxidative stress and insulin resistance. Furthermore, some ARVs induce pro-inflammatory adipokine/cytokine secretion by adipocytes, ASCs and macrophages and CD8 T cells accumulation; this contributes to AT immune dysfunction and inflammation. It was recently reported that some INSTIs can be associated with fat and weight gain, adipogenesis, fibrosis, and adipocyte hypertrophy/dysfunction, with increased insulin resistance *in vitro*. INSTIs also induce collagen production, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in both ASCs and adipocytes, which might promote fibrosis. Nonetheless, the local impact of INSTIs on immune cells within the AT remains to be determined (C).

**ART-Related Changes in Fat With Combinations of Today's ARVs**

**Description**

More recently, HIV-infected patients with long-term control of the infection were generally receiving triple therapy with two NRTIs and a PI or a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI, such as efavirenz). As the treated patients aged, however, the prevalence of comorbidities increased. The patients often gained weight and fat, with the classical truncal distribution seen during ageing (85, 119). These changes were associated with adverse cardiometabolic outcomes, as atherosclerotic cardiovascular disease (CVD), diabetes, and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

This increase in trunk fat is seen in both women and men and in all ethnic groups. It can result in obesity, particularly when the initial bodyweight is already high (as observed frequently in North America and less so in Europe). As the person ages, the fat gain is often accompanied by the loss of muscle mass. This situation is called sarcopenic obesity and is associated with harmful cardiometabolic outcomes.

Nowadays, the recently developed class of INSTIs is widely used to control HIV infections. Although the INSTIs are effective and safe, combination therapy (with the addition of an NRTI) is typically required to control the virus. However, some patients

gain weight and fat mass (mainly on the limbs, trunk, and abdomen) and become obese (85).

Weight gain can affect treatment-naïve patients initiating ART. A large proportion of this gain is due to a return to good health; patients with a low CD4 and a high viral load gain the most weight during the first two years of ART. Nevertheless, this weight/fat mass gain is excessive in some individuals taking an INSTI [mainly dolutegravir (DTG) and bictegravir], especially in women (vs. men) and African ethnic groups (vs. Caucasians) (120, 121). Weight gain is also observed in some ART-controlled patients who switch to an INSTI; female sex and older age are risk factors for this increase. Nevertheless, it is unclear why some patients (but not others) gain weight disproportionately. Recent studies have indicated that along with INSTIs, commonly used “older” drugs can also modulate weight gain. For example, the NNRTI efavirenz and the NRTI tenofovir diproxil fumarate (TDF) have been linked to lower weight gains, while tenofovir alafenamide (TAF, a derivative of TDF that concentrates within cells) is associated with a greater weight gain (121).

#### The Impact of INSTIs and TAF/TDF on Fat

In AT, adipocytes can sequester ARTs inside the adipocyte lipid droplet, which contributes to viral persistence (87). Adipocytes have consistently been shown to reduce the antiviral efficacy of TDF and TAF *in vitro*, and some INSTIs have been found in AT (122).

**Effect of INSTIs.** Recent *ex vivo* studies have found that fibrosis, adipocyte size, and adipogenic marker expression are greater in SCAT and VAT samples from INSTI-treated macaques than in samples from untreated animals. Similarly, SCAT and VAT from obese INSTI-treated HIV-infected patients show higher levels of fibrosis than samples from INSTI-naïve obese patients (85, 123).

DTG has been detected within adipocytes and in the stromal vascular fraction prepared from VAT (122), suggesting that it has access to ASCs and adipocytes *in vivo*. Raltegravir (RAL) has a high level of tissue penetration and is therefore likely to accumulate in AT (124). These features might explain the fat mass gain in treated patients (Figure 3).

Recent results suggest that INSTIs can decrease SCAT inflammation. In the OBEVIH cohort of obese subjects undergoing bariatric surgery, the level of inflammation was lower in HIV-infected patients treated with an INSTI than in patients not receiving an INSTI and in HIV-negative controls (Pourchez V, unpublished data). Accordingly, our study of SCAT samples from HIV-infected patients switched from a PI-containing regimen to combination therapy with RAL and the CCR5 inhibitor maraviroc revealed very low expression levels of genes involved in T lymphocyte signaling (125).

**Effects of TAF vs. TDF.** Differences in pharmaceutical formulation mean that TAF has lower circulating concentrations but higher intracellular concentrations than TDF. It remains to be determined why TDF prevents weight gain and TAF enhances it. However, it is possible that these effects are related to differences in the level of drug-induced oxidative stress.

## A Third Factor: The Host Status Prior Infection

### Inflammation Is an Integrative Process

It is challenging to distinguish between the respective effects of HIV infection, ART toxicity and personal factors on the inflammatory profile developing in ART-controlled HIV-infected patients. The interplay between HIV and the ARVs are multiple. Firstly, ART reduces viral persistence and virus-related immune defects, suggesting that the persisting low-grade inflammation observed in ART-controlled patients may partly relate to ARV-toxicities when immune restoration is achieved. Among host-related factors, the severity of the primary phase, the size of the pre-established viral reservoir may affect the quality of the immune restoration and also participate to the development of low-grade inflammation. Immune and tissue-specific natural senescence together with the presence of age-related comorbidities may also contribute to the development of an exacerbated immune responses. In aged patients, ART toxicity is increased probably due to reduced capacities to detoxify and eliminate drugs (kidney and liver failures) and to the prescription of other drugs (polypharmacy).

Importantly, patients with efficient immune restoration present inflammatory profile close to healthy individuals (106, 113), suggesting a limited impact of currently used ARVs *per se* on inflammation. However, the question of the relative impact of HIV infection and ARV remains open when considering patients with partial immune restoration. One may hypothesize sequential impacts of HIV infection and ARV on AT. It could be hypothesized that ARV may impact differently AT that was previously disrupted by HIV infection compared to uninfected AT, possibly acting in synergy to amplify adipose dysfunction. The same notion may apply to other infections that target AT (tuberculosis, CMV, ...) and may alter the metabolic and immune parameters of AT. Lastly, because HIV persist in AT even after ART induction, one may consider the combined impacts of HIV infection and ARVs on the alteration of AT. These questions are difficult to address *ex vivo* since ARV are prescribed only to HIV-infected patients and very limited data are available in animal models regarding the study of ARV toxicity with/out HIV/SIV infection, and the associated inflammation.

### An Important Factor: The Host Metabolic Status Prior Infection

Importantly, the impact of HIV infection and ARV on AT may also directly rely on the host metabolic status prior infection. In that respect, preexisting obesity may exacerbate the pathophysiology of HIV infection and the toxicity of ARVs. Studies in NHP demonstrate the higher severity of SIV pathogenesis in animals fed with high fat diet with resulting cardiovascular (CV) and liver alterations (126, 127), but ARV were not administered in this setting. Data in humans are obviously less consensual. Before ART's availability, HIV infected patients with higher BMI showed slower HIV progression compared to underweight patients (128, 129),

presumably due to delayed wasting/cachexia effects. In ART-treated patients, obese or underweight patients exhibited higher cumulative mortality rates, delineating an optimal BMI range between 24 and 28 (130) and obesity has been identified as a risk factor for multimorbidity (131). Regarding the impact of obesity on CD4 T cell reconstitution, patients with higher BMI before ART initiation exhibit higher (132, 133) or comparable (134) immune reconstitution. This apparent discrepancy between mortality rate and CD4 T cell restoration exemplified the diverse impacts of obesity which is associated simultaneously with positive and negative effects. However, the impact of obesity on the toxicity of ARV remains ill-documented. It has been hypothesized that the sequestration and metabolism of ARV may differ in obese versus lean patients. ART plasma concentrations were lower in obese patients, although not impacting the viral control (135).

As a whole, the close interplay between HIV infection, ARV toxicity and metabolic status prior infection and/or following ART introduction may be considered as a combination rather than as independent factors of inflammation.

## PHENOTYPIC AND MECHANISTIC CHANGES IN AT

### Metabolic Changes

#### Local Effects

A number of *in vitro* studies have sought to describe the mechanisms involved in the detrimental effects of individual PIs, NRTIs and NNRTIs on adipogenesis, insulin signaling, adipokine secretion, and apoptosis (85).

*In vitro* studies of adipocytes cultured with individual thymidine NRTIs showed that stavudine and (to a lesser extent) zidovudine were toxic for AT. The drugs inhibited the mitochondrial DNA polymerase (required for mtDNA replication) and also induced severe oxidative stress. Thus, toxic effects on mitochondria might result in an energy deficiency and high levels of oxidative stress (136). Inter-individual differences in sensitivity to the lipotrophic effect of stavudine or zidovudine might be related (at least in part) to mtDNA haplogroups, some of which are variously associated with a greater risk of lipotrophy (the H, I and K haplogroups) or a lower risk (the T and W haplogroups) (137, 138).

The effects of first-generation PIs on adipose cells have also been evaluated *in vitro*. These effects might result (at least in part) from the inhibition of the enzyme ZMPSTE24, which is responsible for the maturation of the precursor prelamin A into the nuclear protein lamin A. First-generation PIs were able to inhibit the enzyme, which led to the accumulation of prelamin A around the nucleus and to mislocalization of SREBP-1 (139, 140). The accumulation of prelamin A favored cell senescence, adipocyte dysfunction, and insulin resistance. First-generation PIs could also induce endoplasmic reticulum (ER) stress. Furthermore, a recent study showed that both short- and long-term treatment with the first-generation PI lopinavir promoted whitening of brown adipocytes differentiated *in vitro*. This shift

impeded fatty acid oxidation and favored insulin resistance (141–143).

Efavirenz has been used for a long time and is still given to HIV-infected people today. However, it can reduce adipogenesis and adiponectin expression whilst increasing the expression of proinflammatory markers (144).

More recently, several research groups have started to identify and characterize the mechanisms involved in the INSTIs' effect on weight/fat gain. The etiology of INSTI-related weight/fat gain is unclear but may include indirect effects on thermogenesis, appetite or energy regulation, or a direct effect on AT. We have observed that some INSTIs do indeed have a direct impact on adipocytes: DTG and (to a lesser extent) RAL increased ECM accumulation and adipocyte hypertrophy. Despite the increase in adipogenesis, INSTIs also promote oxidative stress and insulin resistance (123). The mechanisms involved are being studied but one can reasonably hypothesize that adipocyte hypertrophy in the abdominal SCAT of patients on INSTIs compensates for the decreases in beige AT and energy expenditure. Interestingly, a recent study showed that the brown AT transcription factor PRDM16 might protect against the development of fibrosis in WAT (145). Furthermore, TGF- $\beta$  inhibits the being of adipocyte precursors (146). A decline in being might therefore also be involved in the fibrosis observed in the AT of INSTI-treated patients. These associations highlight the need to determine whether people living with HIV (PLWH) are at risk of cardiometabolic disease as a result of reduced being capacity in WAT; this might constitute a novel mechanism for metabolic dysregulation in this population.

Another hypothesis relates to the effect of INSTIs on food intake. It has been shown that DTG inhibits the binding of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ MSH) and melanocortin 4 receptor (MC4R) in the hypothalamus; this might promote hyperphagia (147, 148). However, the serum DTG levels in patients are much lower than those required for hyperphagia (149).

In the context of obesity, elevated fibrosis is mainly due to periadipocyte fibrosis; the latter has been linked to metabolic disorders (60) and was observed in the AT of INSTI-treated macaques and patients. These alterations might result from increased oxidative stress. Indeed, lipohypertrophy in PLWH has previously been linked to mitochondrial toxicity in AT (150). Accordingly, we found that DTG and RAL promoted ROS production and mitochondrial dysfunction. We hypothesized that in the context of HIV infection and stressed adipocytes in a profibrotic environment (due to the impact of HIV, obesity, or antiretrovirals other than INSTIs), INSTIs might alleviate adipocyte stress (thereby favoring hypertrophy/expansion) but might also increase oxidative stress, reduce metabolic flexibility, and accentuate insulin resistance.

#### Systemic Effects

After secretion by AT, the hormones adiponectin and leptin regulate key pathways in lipid and glucose metabolism (151). Adiponectin has a potent anti-inflammatory and anti-atherogenic action, and a decrease in adiponectin levels is correlated with the development of insulin resistance (152).

Adiponectin also has an important role in lipid metabolism by increasing fatty acid oxidation in skeletal muscle and in the liver and thus lowering circulating FFA levels (153). In contrast, leptin regulates the energy balance by inhibiting hunger but also has major effects on insulin sensitivity and inflammation (154). In accordance with the observed alterations in AT function, circulating levels of adiponectin and leptin are low in both ART-treated and treatment-naïve patients (155). Furthermore, some studies have shown that DTG and RAL lower circulating adiponectin levels (156–160). Recently, it has been suggested that the adiponectin/leptin ratio is a marker of AT dysfunction; threshold values for cardiometabolic risk have been determined (161, 162) and could therefore be explored in ART-experienced HIV-infected patients.

Metabolite profiles are altered not only in plasma/serum but also in a variety of other biological fluids. In cerebrospinal fluid, alterations in energy metabolites were found to be correlated with neurocognitive impairments and increased inflammation in ART-experienced HIV-infected individuals. These alterations overlap with the metabolic alterations seen in older HIV-negative individuals and suggest that aging is accelerated by exposure to ART (163).

## Immune Changes

### AT-Resident Immune Cells

Studies of samples collected from HIV-infected people (mostly ART patients) and HIV-negative controls are difficult to interpret because of large intergroup differences in infectious, metabolic and treatment-related parameters. In this respect, nonhuman primates are interesting models for determining the effect of HIV in the presence or absence of ART, and provide a more controlled experimental setting with regard to the individuals' infectious and metabolic histories. Regardless of the model and the stage of infection considered, mRNA/protein quantification (on supernatants or microscopy) and flow cytometry studies (102, 103, 164) have shown that chronic HIV/SIV infection is associated with a shift towards a pro-inflammatory immune profile in AT. In humans, levels of adipose-macrophage-derived cytokine (IL-12, IL-6, IL-8, and MCP-1) are higher in HIV-infected individuals than in noninfected individuals. In cynomolgus macaques, the overall macrophage count in AT was similar in HIV-infected and noninfected individuals but the former group had a higher proportion of non-M2 macrophages (based on the expression of CD206 and CD163 as M2 markers) (102). Changes in the T cell compartment have been reviewed in detail (165). The most important change is a decrease in the CD4/CD8 ratio, with an accumulation of CD8 T cells during chronic untreated SIV infections (101, 102). Research on the CD4 T cell fraction (166, 167) in both humans and nonhuman primates revealed an AT-specific phenotype, whereas differences between HIV/SIV+ and HIV/SIV noninfected animals were limited. AT-resident CD4 T cells are characterized by higher expression levels of PD-1 and CD57 and higher proportions of effector memory (Tem) and CD45RA+ Tem (Temra) – suggesting a more activated/exhausted profile. High expression of CD69 on AT-resident T cells has also been reported (166, 167), although this marker is associated with

resident memory cell differentiation and/or activation. The Treg fraction (a seminal immunoregulatory subset) was reportedly prominent in the AT in some mouse models (31, 168). In contrast, baseline Foxp3 expression was low in both HIV-infected and noninfected people, even though the proportion of Tregs was slightly higher in SIV-positive animals (166).

Overall, chronic HIV infection appears to have the same effects on AT as obesity (a shift towards M1 macrophages and CD8 T cell accumulation), albeit to a lesser extent. Data on the modulation of other immune cell fractions present in AT during HIV infection (in the presence or absence of ART) are lacking. Likewise, HIV-related changes in the status of neutrophils, CD4 Th1 T cells, and type 1 innate lymphoid cells as effectors or partners in pro-inflammatory immune responses have not yet been studied. However, this knowledge may be needed to fully understand the complex crosstalk between immune and metabolic cells in AT and to further evaluate local inflammation in AT during HIV infection.

### Inflammation

The pro-inflammatory cytokine profile of AT in HIV/SIV-infected individuals vs. noninfected individuals has been characterized by detecting proteins or mRNA in AT lysates or supernatants of AT fractions. Although the studies differed with regard to the experimental methods and the cytokines assayed (91, 101, 167), all found a greater pro-inflammatory potential (with IL-2, IL-7, IL-15, CCL19, and TGF- $\beta$ ) in AT collected from HIV/SIV-infected individuals vs. noninfected individuals. Koethe et al. also contributed important insights into the transcriptional upregulation of genes coding for chemokines, chemokine receptors, and Toll-like receptors (167). Taken as a whole, these data suggest that chronic infection induces a pro-inflammatory profile in AT. Importantly, all the studies performed on human samples were limited by high inter-individual heterogeneity, which presumably reflects differences in metabolic and infectious histories. Important, Couturier et al. compared the AT cytokine secretion profiles in ART-experienced patients and treatment-naïve patients; ART appeared to be associated with a less inflammatory profile in the AT (101).

The net impact of ART is thus obviously highly beneficial because it controls the HIV infection. ART reduces the viral load, restores (at least partially) the CD4 T cell count, and dampens inflammatory processes. This benefit is also observed within the AT, with regard to inflammatory cytokines. However, ART induces metabolic side effects (which are highly dependent on the combination used) that change the nature of the chronic inflammation associated with a controlled HIV infection. As described in this section, the ARVs' side effects affect ASCs and/or adipocytes and can induce oxidative stress, ECM remodeling (with a consequential reduction in the metabolic responsiveness of AT), and insulin resistance. Importantly, recent studies have also evidenced a direct impact of ARVs on immune cell functions (169). DTG and elvitegravir reduce the oxidative and proliferative activities of peripheral blood CD4 T cells and thus induce a "stress" immune response with strong production of TNF but no polyfunctional cytokine

responses. Based on these data, the ARV's impact on immune activity (and not just metabolic activity) in AT should also be investigated.

### Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System

In the context of AT disease such as obesity, vascular damage, including endothelial dysfunction, has been observed, along with oxidative stress. Increased oxidative stress develops in obese AT as a result of multiple factors: dysfunctional adipocytes in response to nutrient overload (hypertrophy, increased mitochondrial oxidation, increased levels of reactive oxygen species (ROS)), AT hypoxia, increased pro-oxidant cytokines production (such as TNF- $\alpha$ ) by AT and increased release of FFAs. These parameters contribute to systemic oxidative stress and inflammation (170). Obesity is also associated with vascular remodeling and fibrosis in both VAT and SCAT (171). This vascular remodeling is associated with inflammation characterized by macrophage infiltration especially in SCAT and has been associated with systemic endothelial dysfunction and insulin resistance in obese patients (172).

The renin-angiotensin system (RAS) plays an important pathophysiological role. The production of RAS components by adipocytes is exacerbated during obesity, contributing to the systemic RAS which then affects the cardiovascular system (171). The up-regulation of adipose RAS, and especially the increase of angiotensin II production, promotes inflammation through increased chemokine production, oxidative stress and fibrosis (171). Conversely, blocking or preventing RAS activation in AT can reduce oxidative stress, improve insulin resistance and reduce inflammation (173, 174). Interactions between the RAS and HIV infection have been described, and could contribute to AT inflammation, but also to the onset of metabolic syndrome and hypertension in PLWH (175, 176).

### Insulin Resistance and Lipotoxicity

AT dysfunction, as seen in obesity and diabetes, is generally associated with insulin resistance, a metabolic disorder affecting multiple tissues. The proposed mechanisms involved in insulin resistance include both whole body aspects, such as inflammation and metabolic inflexibility; as well as cellular phenomena, such as lipotoxicity, ER stress, and mitochondrial dysfunction. Lipotoxicity, as a result of increased lipolysis in AT and release of FFAs, is a type of cellular stress induced by the accumulation of lipid intermediates such as diacylglycerols (DAGs), ceramides, and triglycerides that facilitate the development of insulin resistance and ectopic fat deposition in muscle, liver, and adipose tissue together with a pro-inflammatory response (177). Lipotoxicity participates to the enhanced cardiometabolic risk observed in PLWH (178, 179).

## COMORBIDITIES ASSOCIATED WITH LOW-GRADE INFLAMMATION

In the general population, a number of age-related comorbidities (including cardiometabolic diseases, neurocognitive

impairments, cancer, and frailty) are associated with a state of low-grade chronic inflammation. Circulating levels of several cytokines and inflammatory markers [such as IL-6 and C-reactive protein (CRP)] rise with age and might trigger these comorbidities. AT is the main source of circulating IL-6, and the cytokine triggers the synthesis of CRP in the liver. Accordingly, obesity is associated with low-grade, chronic inflammation. Hence, an increase in the mass of AT might contribute to these comorbidities by enhancing low-grade inflammation.

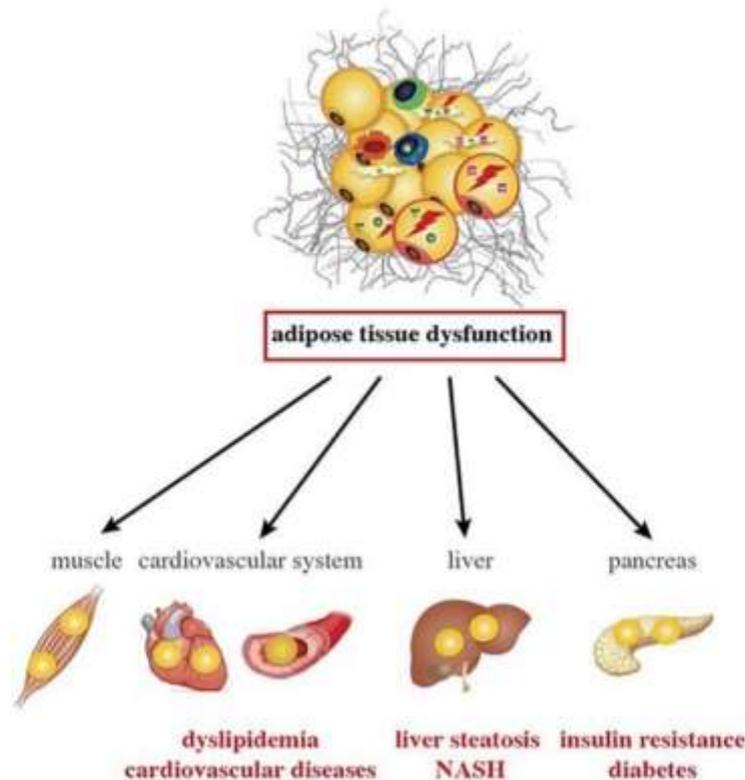
Several studies have evidenced a state of low-grade inflammation in ageing HIV-infected patients who are well controlled by ART. This level of inflammation is greater than in non-infected subjects (180, 181) and is thought to be involved in the elevated prevalence of certain comorbidities. The inflammation might result from HIV-related factors, such as the presence of the virus inside reservoirs, greater gut permeability, dysbiosis, an effect on gut-associated lymphoid tissue, and coinfections (which are nevertheless observed in ART-controlled patients). AT might be a key factor - first as an HIV reservoir and then as a source of inflammatory markers in the context of ART-related fat mass gain.

Some patients treated with thymidine NRTIs present persistent fat alterations several years after treatment discontinuation. In the AGEHIV cohort, long-term-infected, ART-controlled patients had a greater waist circumference, a lower hip circumference, and a greater incidence of hypertension than HIV-negative people (180). In the COCOMO study, cumulative exposure to stavudine, zidovudine or didanosine was associated with elevated amounts of VAT, lower amounts of SCAT, and a higher risk of hypertension and dyslipidemia (182).

Trunk fat accumulation is one facet of the broader condition of ectopic lipid deposition in HIV-infected patients; accumulation is also observed in the liver, epicardial tissue, and skeletal muscle. In this situation (also referred to as "metabolically unhealthy obesity", due to its association with cardiometabolic outcomes), the storage capacity of SCAT (the largest WAT depot) is limited, and further calory overload leads to fat accumulation in ectopic tissues (e.g., liver, skeletal muscle, and heart) and in VAT depots - an event commonly referred to as "lipotoxicity". Excessive ectopic lipid accumulation leads to local inflammation and insulin resistance (42). The clinical consequences of ectopic fat deposition are summarized in **Figure 4**.

### Atherosclerotic Cardiovascular Disease

Epicardial fat is physiologically similar to visceral fat and is located close to the coronary arteries. It might therefore have a major role in the development of coronary atherosclerosis (183, 184). Groups of adipocytes are close to the right ventricular myocardium and might release fatty acids to fuel the cardiomyocytes. Epicardial fat also releases adipokines, cytokines, and vasoactive products that regulate coronary artery tone. In obese patients with several CV risk factors, epicardial fat around the coronary arteries releases pro-inflammatory cytokines and presents a high macrophage count and high levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 (185). It has been suggested that the greater volume of epicardial fat in obese subjects contributes to the elevated CV risk (186).



**FIGURE 4** | Inflammation changes in AT and are associated with comorbidities in ART-experienced, HIV-infected patients. AT alterations with VAT expansion, local and systemic inflammation, and gut dysfunction promote lipotoxicity in ART-experienced, HIV-infected people. Lipids accumulate in metabolic organs other than the AT, such as muscle, heart, blood vessels, liver, and pancreas. Lipotoxicity and inflammation might contribute to the development of atherogenic dyslipidemia, cardiovascular diseases, insulin resistance, diabetes, liver steatosis and NASH in the context of HIV infection and ART.

Several studies of ART-controlled patients have evidenced greater volumes of epicardial fat; along with traditional risk factors for atherosclerosis and the duration of ART, the amount of epicardial fat is associated with the amount of VAT and with insulin resistance. In HIV-infected patients, the epicardial fat volume is related to endothelial dysfunction and the progression of carotid atherosclerosis (187–189).

More recently, the overall fat gain observed in some patients raises the question of whether treatment with INSTIs influences cardiometabolic outcomes. At present, there is no indication of an elevated CV risk for this class of ART molecules, although long-term follow-up data (i.e. for at least 5 years) are missing.

### Metabolic Liver Diseases

Liver steatosis corresponds to another type of ectopic fat deposition. An elevated liver fat content has been reported in patients with lipotrophy and in those with central obesity - two situations associated with systemic low-grade inflammation. In HIV-mono-infected patients, the prevalence of steatosis is relatively high, relative to the body mass index (BMI) (30–35%) (190). In some people, simple steatosis can progress to a more worrying situation:

non-alcoholic steatohepatitis (NASH), with liver inflammation and often progressive fibrosis. Severe fibrosis (cirrhosis) and progression to hepatocarcinoma are life-threatening.

Several studies have highlighted the strong relationship between trunk fat accumulation and steatosis or fibrosis in HIV-infected subjects. In a matched cohort of 468 HIV-mono-infected patients the prevalence of significant liver fibrosis ( $\geq$ Fibroscan grade 2) was 25.1% in patients with metabolic syndrome and 7.9% in those without. In a multivariate analysis, obesity and insulin resistance were independently associated with advanced fibrosis ( $\geq$ Fibroscan grade 3). Leptin and soluble (s) CD163 were strongly associated with fibrosis/cirrhosis, whereas HIV parameters and ART were not. Thus, AT and macrophage activation might be key players in the development of liver fibrosis in HIV-infected patients (191). In a study of 62 HIV-infected adults with elevated aminotransferase levels, insulin resistance, obesity, and the presence of either of two minor alleles in the *PNPLA3* gene were significantly associated with an elevated risk of NASH and fibrosis. NASH and/or fibrosis were not associated with the duration of HIV infection or ART (192).

## Insulin Resistance and Diabetes

In the APROCO cohort of HIV-infected patients followed up for 10 years after the initiation of first-generation PIs, the incidence of diabetes peaked in 1999-2000, and was linked to treatment with indinavir, stavudine and didanosine. As expected, diabetes was associated with age and adiposity. The main risk factor was the waist-to-hip ratio (hazard ratio: 3.9), which highlighted the key role of truncal obesity (193). In a longer-term study of 352 patients from the cohort, the prevalence of diabetes was 11%, and the prevalence of atherogenic dyslipidemia (a high triglyceride/high-density lipoprotein ratio, observed mainly in diabetic subjects) was 9%. Diabetes and atherogenic dyslipidemia were associated with elevated levels of systemic markers of oxidative stress and inflammation (194).

The more recent use of INSTIs has resulted in overall fat gain in some patients. While blood lipid levels are generally lower, the outcome for insulin resistance is less clear. We have observed elevated insulin resistance in well-controlled, aging patients switched from a PI-containing regimen to RAL/etravirine; this is probably linked to INSTI-related weight gain (195). Regarding diabetes, 722 of the 22,884 eligible individuals (3%) in the USA/Canadian NA-ACCORD study of ART-initiators developed this condition. Persons initiating INSTIs + NNRTIs had the same incident risk of diabetes as those initiating PIs+ NNRTIs. This effect was most pronounced for RAL. The association between INSTI and diabetes was attenuated by accounting for 12-month weight gain. Initiating combination ART regimens with INSTIs or PIs + NNRTIs may confer a greater risk of diabetes; this is probably mediated by weight gain (196). In the French DAT/AIDS study, 265 of the 19,462 HIV-infected patients initiating ART developed diabetes. Multivariate and survival analyses did not highlight an increase in new-onset diabetes in patients undergoing combination ART with an INSTI as a third agent (relative to an NNRTI or a PI). BMI, age, African or Hispanic ethnicity, arterial hypertension, and AIDS were associated with a higher incidence of diabetes (197).

Hence, it is currently not clear whether INSTIs have an additional effect on the incidence of diabetes, other than that related to weight gain. However, clinicians should be aware of this possible metabolic comorbidity - particularly in older patients and in patients with a high BMI.

Relative to non-infected subjects, HIV-infected patients present a higher prevalence of age-related comorbidities associated with a higher level of systemic inflammation. This might result from a number of factors related to HIV infection and coinfections (with hepatitis C virus or CMV) but also modifiable risk factors such as smoking, alcohol abuse and substance abuse (181, 198). Furthermore, adiposity and particularly truncal fat accumulation are associated with low-grade inflammation and comorbidities resulting from greater ectopic fat deposition.

## THERAPEUTIC STRATEGIES

Here, the goal of treatment (in addition to ART) is to decrease inflammation, immune activation, and thus the related

comorbidities. Even though these strategies do not specifically address AT, they might act on this tissue in addition to other organs. As observed for obesity-related cardiometabolic complications in the general population, weight reduction has been consistently associated with lower AT inflammation and results in better cardiovascular, hepatic and metabolic outcomes (i.e. a lower incidence of NAFLD, insulin resistance, and diabetes) (199). This approach is relevant in overweight or obese HIV-infected patients with central fat accumulation. Furthermore, regular exercise is an excellent strategy for reducing inflammation and cardiometabolic complications (199).

Other strategies aiming at reducing systemic inflammation to reduce comorbidities have been tested in HIV-infected patients and are reviewed elsewhere (198). The lasting association between inflammation and atherosclerosis has prompted significant interest in strategies for inhibiting inflammatory proteins upstream of CRP - particularly IL-6 and IL-1 $\beta$ . The strongest evidence to date in favor of preventing CVD by reducing inflammation comes from the CANTOS study using canakinumab, inhibiting IL-1 $\beta$ , albeit in HIV-negative participants (200). In HIV-infected patients, Hsue et al. recently demonstrated that IL-1 $\beta$  inhibition with canakinumab reduced atherosclerotic inflammation (201) but was not associated with other improvements. In a phase II trial, HIV-infected patients at an increased risk of atherosclerotic events were treated with low-dose methotrexate or placebo for 24 weeks (202). Low-dose methotrexate had no effect on the primary endpoint (brachial artery flow-mediated dilation) or levels of various inflammatory biomarkers, and the trial was stopped prematurely. The potential effect of the Janus kinase inhibitor ruxolitinib was evaluated in an open-label trial in HIV-positive patients (Marcolin VC, unpublished data). At week 5, the sCD14 level was significantly lower in the ruxolitinib arm than in the ART-alone arm but the IL-6 level was not. Since D-dimer elevation is linked to the pro-inflammatory profile reported in PLWH, it has been suggested that anticoagulant drugs may be of value in treating the pro-coagulant state. Orally administered edoxaban (a direct factor Xa inhibitor) was tested against placebo in the TACTICAL-HIV trial (Baker JV, unpublished data). However, four months of edoxaban treatment did not lead to lower levels of biomarkers associated with inflammation or monocyte activation.

The anti-inflammatory activity of 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors (i.e. statins) is well documented (203), and several clinical trials have assessed the benefits of these drugs on surrogate markers of CVD (along with LDL-lowering activity) in ART-suppressed HIV-infected patients. In the SATURN-HIV trial, rosuvastatin (10 mg/day) was significantly associated with low levels of sCD14, with a fall of approximately 10% at 48 weeks (204). Lower levels of several markers of vascular inflammation were also observed. In the INTREPID trial, similar results were observed for pitavastatin but not for pravastatin (205). It is now necessary to determine whether the statin-induced reduction of inflammatory/immune activation and cardiovascular biomarkers translates into a reduction in morbidity and mortality in HIV-infected patients. The ongoing REPRIEVE study is addressing this question (206).

Taken as a whole, strategies designed to decrease systemic inflammation/immune activation in HIV-infected patients have not produced a clear reduction in comorbidities. Again, combinations of simple lifestyle modifications (e.g. exercise and weight loss) with decreased AT inflammation have been validated for reducing the incidence of cardiovascular events, diabetes, and NAFLD.

## CONCLUSION

AT is targeted by both HIV infection and ART. HIV targets AT both directly (direct infection of AT CD4 T cells) and indirectly (viral protein release, inflammatory signals, and gut disruption). Schematically, ART impacts adipogenesis, adipocyte homeostasis, and ECM remodeling (including fibrosis), whereas viral persistence directly impacts the metabolic and immune functions of AT immune cells. In a chronic ART-controlled HIV infection, the direct impact of HIV *per se* is less severe than that of ART. Indeed, ART efficiently reduces the viral load and the various immune defects associated with the early stage of infection. However, restoration of the immune system is only partial, and the persisting damage inflicted on the immune system during the early stages of infection might contribute to AT inflammation. Given the close links between the gut and AT, the latter's functions may also be indirectly impacted by the massive CD4 T cell depletion observed in the gut in the early stages of infection. Subsequently, AT's endocrine activity and its release of metabolites will increase systemic immune activation and inflammation. Furthermore, ART reduces the viral load to undetectable levels in the circulation blood but does not eradicate the virus in reservoir sites such as AT.

In the longer term, the various direct toxic effects of ARVs might drive low-grade inflammation in HIV-infected patients. These effects are highly dependent on the classes/combinations of ARV used, that variously target ASCs and/or adipocytes, and can induce oxidative stress, ECM remodeling (with a consequential reduction in the metabolic responsiveness of

AT), and insulin resistance (125). Ongoing research is also evaluating the direct impact of ARVs on immune cells. Given the crucial, pleiotropic, metabolic role of AT and the complex, intricate dialogue between AT and HIV-related or ART-related parameters, it is still very difficult to evaluate the contribution to systemic inflammation of AT in general and HIV-related changes in AT in particular. These contributions might also depend strongly on metabolic alterations and comorbidities present at the start of the infection.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

The research was funded by the French National Research Agency for HIV and Viral Hepatitis (ANRS), the French National Research Agency (reference: RHU CARMMA ANR-15-RHUS-0003), Sidaction, DIM OneHealth, Fondation Dormeur, and Gilead.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the staff at the IDMIT facility working on the SIVART program: the project manager (Dr. D. Desjardins), the animal welfare group (Dr Ho Tsong Fang), and the biomonitoring groups (Dr. N. Dereuddre-Bosquet, and AS. Gallouet), and the director (Dr. R. Le Grand). We thank the surgery departments at Bicêtre Hospital and Institut Mutualiste Montsouris Hospital (Dr G Pourcher) and Pr V Pourcher (Pitié-Salpêtrière Hospital, APHP) for access to human AT samples. Lastly, we thank the patients for agreeing to participate in the research on AT.

## REFERENCES

- Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cint S, White, Brown and Pink Adipocytes: The Extraordinary Plasticity of the Adipose Organ. *Eur J Endocrinol* (2014) 170:159–71. doi: 10.1530/EJE-13-0945
- Wernstedt Asterholm I, Tao C, Morley TS, Wang QA, Delgado-Lopez F, Wang ZV, et al. Adipocyte Inflammation Is Essential for Healthy Adipose Tissue Expansion and Remodeling. *Cell Metab* (2014) 20:103–18. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.005
- Zamboni M, Nori N, Brunelli A, Zoico E. How Does Adipose Tissue Contribute to Inflammation? *Exp Gerontol* (2021) 143:111162. doi: 10.1016/j.exger.2020.111162
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N Engl J Med* (2009) 360:1509–17. doi: 10.1056/NEJMoa0810780
- Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, et al. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans: Effects of Cold Exposure and Adiposity. *Diabetes* (2009) 58:1526–31. doi: 10.2337/db09-0530

- Wang W, Seale P. Control of Brown and Beige Fat Development. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2016) 17:691–702. doi: 10.1038/nrm.2016.96
- Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *Cell* (2012) 151:400–13. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.010
- Cypess AM, White AP, Vernochet C, Schulz TJ, Xue R, Sass CA, et al. Anatomical Localization, Gene Expression Profiling and Functional Characterization of Adult Human Neck Brown Fat. *Nat Med* (2013) 19:635–9. doi: 10.1038/nm.3112
- Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Dugaard S, Homoe P, Loft A, et al. A Classical Brown Adipose Tissue mRNA Signature Partly Overlaps With Brite in the Supraclavicular Region of Adult Humans. *Cell Metab* (2013) 17:798–805. doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.011
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N Engl J Med* (2009) 360:1500–8. doi: 10.1056/NEJMoa0808718
- Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, et al. Adipose-Derived Circulating miRNAs Regulate Gene Expression in Other Tissues. *Nature* (2017) 542:450–5. doi: 10.1038/nature21365

12. Virtue AT, McCrigh JT, Wright JM, Jimenez MT, Mowbray WK, Kotzlin JJ, et al. The Gut Microbiota Regulates White Adipose Tissue Inflammation and Obesity Via a Family of MicroRNAs. *Sci Transl Med* (2019) 11:eav1892. doi: 10.1126/scitranslmed.aav1892
13. Hotamisligil GS. Inflammation and Metabolic Disorders. *Nature* (2006) 444:860–7. doi: 10.1038/nature05485
14. Lafontan M, Berlan M. Do Regional Differences in Adipocyte Biology Provide New Pathophysiological Insights? *Trends Pharmacol Sci* (2003) 24:276–83. doi: 10.1016/S0165-6147(03)00132-9
15. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Release Is Higher in Visceral than Subcutaneous Human Adipose Tissue (AT ): Implication of Macrophages Resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab* (2005) 90:2282–9. doi: 10.1210/jc.2004-1696
16. Madani R, Karastergiou K, Ogston NC, Miheisi N, Bhome R, Halocob N, et al. RANTES Release by Human Adipose Tissue In Vivo and Evidence for Depot-Specific Differences. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2009) 296:E1262–8. doi: 10.1152/ajpendo.90511.2008
17. Rakotoarivelo V, Lacraz G, Mayhew M, Brown C, Rottembourg D, Fradette J, et al. Inflammatory Cytokine Profiles in Visceral and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Patients Undergoing Bariatric Surgery Reveal Lack of Correlation With Obesity or Diabetes. *EBioMedicine* (2018) 30:237–47. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.03.004
18. Bouloumié A, Curat CA, Sengenès C, Lohmède K, Miranville A, Busse R. Role of Macrophage Tissue Infiltration in Metabolic Diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (2005) 8:347–54. doi: 10.1097/01.mco.0000172571.41149.52
19. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, et al. Regulation of Adiponectin by Adipose Tissue-Derived Cytokines: In Vivo and In Vitro Investigations in Humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2003) 285:E527–33. doi: 10.1152/ajpendo.00110.2003
20. Matarese G, La Cava A. The Intricate Interface Between Immune System and Metabolism. *Trends Immunol* (2004) 25:193–200. doi: 10.1016/j.it.2004.02.009
21. Luo Y, Liu M. Adiponectin: A Versatile Player of Innate Immunity. *J Mol Cell Biol* (2016) 8:120–8. doi: 10.1093/jmcb/mjw012
22. Maximus PS, Al Achkar Z, Hamid PF, Hasnain SS, Peralta CA. Adipocytokines: Are They the Theory of Everything? *Cytokine* (2020) 133:155144. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155144
23. Neumann E, Hasseli R, Öhl S, Lange U, Frommer KW, Müller-Ladner U. Adipokines and Autoimmunity in Inflammatory Arthritis. *Cells* (2021) 10:216. doi: 10.3390/cells10020216
24. Tsai Y-W, Fu S-H, Dong J-L, Chien M-W, Liu Y-W, Hsu C-Y, et al. Adipokine-Modulated Immunological Homeostasis Shapes the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Int J Mol Sci* (2020) 21:9564. doi: 10.3390/ijms21249564
25. Angelucci A, Clementi L, Alessi E. Leptin in Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* (2020) 1259:89–112. doi: 10.1007/978-3-030-43093-1\_6
26. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor-Alpha, In Vivo. *J Clin Endocrinol Metab* (1997) 82:4196–200. doi: 10.1210/jcem.82.12.4450
27. Carey AL, Bruce CR, Sacchetti M, Anderson MJ, Olsen DB, Saltin B, et al. Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-Alpha Are Not Increased in Patients With Type 2 Diabetes: Evidence That Plasma Interleukin-6 Is Related to Fat Mass and Not Insulin Responsiveness. *Diabetologia* (2004) 47:1029–37. doi: 10.1007/s00125-004-1403-x
28. Desreumaux P, Ernst O, Geboes K, Gambiez L, Berrebi D, Müller-Alouf H, et al. Inflammatory Alterations in Mesenteric Adipose Tissue in Crohn's Disease. *Gastroenterology* (1999) 117:73–81. doi: 10.1016/S0016-5085(99)70552-4
29. Bourgeois C, Gorwood J, Barrail-Tran A, Lagathu C, Capeau J, Desjardins D, et al. Specific Biological Features of Adipose Tissue, and Their Impact on HIV Persistence. *Front Microbiol* (2019) 10:2837. doi: 10.3389/fmicb.2019.02837
30. Ivanov S, Merlin J, Lee MKS, Murphy AJ, Guinamard RR. Biology and Function of Adipose Tissue Macrophages, Dendritic Cells and B Cells. *Atherosclerosis* (2018) 271:102–10. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.01.018
31. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, But Not Obese, Fat Is Enriched for a Unique Population of Regulatory T Cells That Affect Metabolic Parameters. *Nat Med* (2009) 15:1–11. doi: 10.1038/nm.2002
32. Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Decaunes P, Maumus M, Chiotasso P, et al. Interplay Between Human Adipocytes and T Lymphocytes in Obesity: CCL20 as an Adipochemokine and T Lymphocytes as Lipogenic Modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2009) 29:1608–14. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.192583
33. Manfredini C, Paoletta F, Gabusi E, Gambari L, Piacentini A, Filardo G, et al. Adipose Stromal Cells Mediated Switching of the Pro-Inflammatory Profile of M1-like Macrophages Is Facilitated by PGE2: In Vitro Evaluation. *Osteoarthritis Cartil* (2017) 25:1161–71. doi: 10.1016/j.joca.2017.01.011
34. Zhou K, Guo S, Tong S, Sun Q, Li F, Zhang X, et al. Immunosuppression of Human Adipose-Derived Stem Cells on T Cell Subsets Via the Reduction of NF-kappaB Activation Mediated by PD-L1/PD-1 and Gal-9/TIM-3 Pathways. *Stem Cells Dev* (2018) 27:1191–202. doi: 10.1089/scd.2018.0033
35. Beura LK, Wijeyesinghe S, Thompson EA, Macchietto MG, Rosato PC, Pierson MJ, et al. T Cells in Nonlymphoid Tissues Give Rise to Lymph-Node-Resident Memory T Cells. *Immunity* (2018) 48:327–338.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.015
36. Behr FM, Parga-Vidal L, Kragten NAM, van Dam TJP, Wesselink TH, Sheridan BS, et al. Tissue-Resident Memory CD8+ T Cells Shape Local and Systemic Secondary T Cell Responses. *Nat Immunol* (2020) 21:1070–81. doi: 10.1038/s41590-020-0723-4
37. Ibrahim MM. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Structural and Functional Differences. *Obes Rev* (2009) 11:11–8. doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x
38. Gealekman O, Guseva N, Hartigan C, Apotheker S, Gorgoglione M, Gurav K, et al. Depot-Specific Differences and Insufficient Subcutaneous Adipose Tissue Angiogenesis in Human Obesity. *Circulation* (2011) 123:186–94. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.970145
39. Hwang I, Kim JB. Two Faces of White Adipose Tissue With Heterogeneous Adipogenic Progenitors. *Diabetes Metab J* (2019) 43:752–62. doi: 10.4093/dmj.2019.0174
40. Kim JJ, Huh JY, Sohn JH, Choe SS, Lee YS, Lim CY, et al. Lipid-Overloaded Enlarged Adipocytes Provoke Insulin Resistance Independent of Inflammation. *Mol Cell Biol* (2015) 35:1686–99. doi: 10.1128/MCB.01321-14
41. Bray GA, Jablonski KA, Fujimoto WY, Barrett-Connor E, Halfner S, Hanson RL, et al. Relation of Central Adiposity and Body Mass Index to the Development of Diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Am J Clin Nutr* (2008) 87:1212–8. doi: 10.1093/ajcn/87.5.1212
42. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci* (2019) 20:2358. doi: 10.3390/ijms20092358
43. Hocking SL, Stewart RL, Brandon AE, Suryana E, Stuart E, Baldwin EM, et al. Subcutaneous Fat Transplantation Alleviates Diet-Induced Glucose Intolerance and Inflammation in Mice. *Diabetologia* (2015) 58:1587–600. doi: 10.1007/s00125-015-3583-y
44. Gabrieli I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, et al. Removal of Visceral Fat Prevents Insulin Resistance and Glucose Intolerance of Aging: An Adipokine-Mediated Process? *Diabetes* (2002) 51:2951–8. doi: 10.2337/diabetes.51.10.2951
45. Alvehus M, Burén J, Sjöström M, Goedecke J, Olsson T. The Human Visceral Fat Depot has a Unique Inflammatory Profile. *Obesity (Silver Spring)* (2010) 18:879–83. doi: 10.1038/oby.2010.22
46. Ayari A, Wolowczuk I. Physiology and Pathophysiology of Adipose Tissue-Derived Cytokine Networks. In: *Cytokine Effector Functions in Tissues*. Elsevier Inc. Academic Press (2017) p. 33–50. doi: 10.1016/B978-0-12-804214-4.00001-4
47. Kralova Lesna I, Kralova A, Cejkova S, Fronek J, Petras M, Sekerkova A, et al. Characterisation and Comparison of Adipose Tissue Macrophages From Human Subcutaneous, Visceral and Perivascular Adipose Tissue. *J Transl Med* (2016) 14:208. doi: 10.1186/s12967-016-0962-1
48. Lee B-C, Kim M-S, Pae M, Yamamoto Y, Eberlé D, Shimada T, et al. Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity. *Cell Metab* (2016) 23:685–98. doi: 10.1016/j.cmet.2016.03.002

49. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity Is Associated With Macrophage Accumulation in Adipose Tissue. *J Clin Invest* (2003) 112:1796–808. doi: 10.1172/JCI200319246. Introduction

50. Tchkonia T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, et al. Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences Among Fat Depots. *Cell Metab* (2013) 17:644–56. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.008

51. White UA, Tchoukalova YD. Sex Dimorphism and Depot Differences in Adipose Tissue Function. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* (2014) 1842:377–92. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.05.006

52. Karpe F, Pinnick KE. Biology of Upper-Body and Lower-Body Adipose Tissue - Link to Whole-Body Phenotypes. *Nat Rev Endocrinol* (2015) 11:90–100. doi: 10.1038/nrendo.2014.185

53. Pinnick KE, Nicholson G, Manolopoulos KN, McQuaid SE, Valet P, Frayn KN, et al. Distinct Developmental Profile of Lower-Body Adipose Tissue Defines Resistance Against Obesity-Associated Metabolic Complications. *Diabetes* (2014) 63:3785–97. doi: 10.2337/db14-0385

54. Karastergiou K, Fried SK, Xie H, Lee MJ, Divoux A, Rosencrantz MA, et al. Distinct Developmental Signatures of Human Abdominal and Gluteal Subcutaneous Adipose Tissue Depots. *J Clin Endocrinol Metab* (2013) 98:362–71. doi: 10.1210/jc.2012-2953

55. Tan GD, Goossens GH, Humphreys SM, Vidal H, Karpe F. Upper and Lower Body Adipose Tissue Function: A Direct Comparison of Fat Mobilization in Humans. *Obes Res* (2004) 12:114–8. doi: 10.1038/oby.2004.15

56. McQuaid SE, Humphreys SM, Hodson L, Fielding BA, Karpe F, Frayn KN. Femoral Adipose Tissue may Accumulate the Fat That has Been Recycled as VLDL and Nonesterified Fatty Acids. *Diabetes* (2010) 59:2465–73. doi: 10.2337/db10-0678

57. Vogel MAA, Jocken JWE, Sell H, Hoebers N, Essers Y, Rouschop KMA, et al. Differences in Upper and Lower Body Adipose Tissue Oxygen Tension Contribute to the Adipose Tissue Phenotype in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* (2018) 103:3688–97. doi: 10.1210/jc.2018-00547

58. Choe SS, Huh JY, Hwang JJ, Kim JL, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2016) 7:30. doi: 10.3389/fendo.2016.00030

59. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol* (2011) 29:415–45. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322

60. Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer PE. Fibrosis and Adipose Tissue Dysfunction. *Cell Metab* (2013) 18:470–7. doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.016

61. Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, et al. Fibrosis in Human Adipose Tissue: Composition, Distribution, and Link With Lipid Metabolism and Fat Mass Loss. *Diabetes* (2010) 59:2817–25. doi: 10.2337/db10-0585

62. Abdennour M, Reggio S, Le Naour G, Liu Y, Poitou C, Aron-Wisniewsky J, et al. Association of Adipose Tissue and Liver Fibrosis With Tissue Stiffness in Morbid Obesity: Links With Diabetes and BMI Loss After Gastric Bypass. *J Clin Endocrinol Metab* (2014) 99:898–907. doi: 10.1210/jc.2013-3253

63. Muir LA, Neeley CK, Meyer KA, Baker NA, Brosius AM, Washabaugh AR, et al. Adipose Tissue Fibrosis, Hypertrophy, and Hyperplasia: Correlations With Diabetes in Human Obesity. *Obesity* (2016) 24:597–605. doi: 10.1002/oby.21377

64. Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged Subcutaneous Abdominal Adipocyte Size, But Not Obesity Itself, Predicts Type II Diabetes Independent of Insulin Resistance. *Diabetologia* (2000) 43:1498–506. doi: 10.1007/s001250051560

65. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship Between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *J Clin Endocrinol Metab* (2007) 92:1023–33. doi: 10.1210/jc.2006-1055

66. Apostolopoulos V, de Courten MPI, Stojanovska L, Blatch GL, Tangalakis K, de Courten B. The Complex Immunological and Inflammatory Network of Adipose Tissue in Obesity. *Mol Nutr Food Res* (2016) 60:43–57. doi: 10.1002/mnfr.201500272

67. Klein-Wieringa IR, Andersen SN, Kwekkeboom JC, Giera M, de Lange-Brokaar BJE, van Osch GJVM, et al. Adipocytes Modulate the Phenotype of Human Macrophages Through Secreted Lipids. *J Immunol* (2013) 191:1356–63. doi: 10.4049/jimmunol.1203074

68. Watanabe Y, Nagai Y, Honda H, Okamoto N, Yanagibashi T, Ogasawara M, et al. Bidirectional Crosstalk Between Neutrophils and Adipocytes Promotes Adipose Tissue Inflammation. *FASEB J* (2019) 33:11821–35. doi: 10.1096/fj.201900477RR

69. Wang Q, Wu H. T Cells in Adipose Tissue: Critical Players in Immunometabolism. *Front Immunol* (2018) 9:2509. doi: 10.3389/fimmu.2018.02509

70. Chehimi M, Vidal H, Eljaafari A. Pathogenic Role of IL-17-Producing Immune Cells in Obesity, and Related Inflammatory Diseases. *J Clin Med* (2017) 6:68. doi: 10.3390/jcm6070068

71. Wensveen FM, Jelenčić V, Valentić S, Šestan M, Wensveen TT, Theurich S, et al. NK Cells Link Obesity-Induced Adipose Stress to Inflammation and Insulin Resistance. *Nat Immunol* (2015) 16:376–85. doi: 10.1038/ni.3120

72. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ Effector T Cells Contribute to Macrophage Recruitment and Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Nat Med* (2009) 15:914–20. doi: 10.1038/nm.1964

73. Strieder-Barboza C, Baker NA, Flesher CG, Karmakar M, Neeley CK, Polsinelli D, et al. Advanced Glycation End-Products Regulate Extracellular Matrix-Adipocyte Metabolic Crosstalk in Diabetes. *Sci Rep* (2019) 9:1–10. doi: 10.1038/s41598-019-56242-z

74. Feng Z, Zhu L, Wu J. RAGE Signaling in Obesity and Diabetes: Focus on the Adipose Tissue Macrophage. *Adipocyte* (2020) 9:563–6. doi: 10.1080/21623945.2020.1817278

75. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *J Am Med Assoc* (2001) 286:327–34. doi: 10.1001/jama.286.3.327

76. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease. *Nat Publ Gr* (2011) 11:85–97. doi: 10.1038/nri2921

77. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral Fat Adipokine Secretion Is Associated With Systemic Inflammation in Obese Humans. *Diabetes* (2007) 56:1010–3. doi: 10.2337/db06-1656

78. McLaughlin T, Liu L-F, Lamendola C, Shen L, Morton J, Rivas H, et al. T-Cell Profile in Adipose Tissue Is Associated With Insulin Resistance and Systemic Inflammation in Humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2014) 34:2637–43. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304636

79. Liu R, Nikolajczyk BS. Tissue Immune Cells Fuel Obesity-Associated Inflammation in Adipose Tissue and Beyond. *Front Immunol* (2019) 10:1587. doi: 10.3389/fimmu.2019.01587

80. Han MS, White A, Perry RJ, Camporez JP, Hidalgo J, Shulman GI, et al. Regulation of Adipose Tissue Inflammation by Interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2020) 117:2751–60. doi: 10.1073/pnas.1920004117

81. Gessani S, Belardelli F. Type I Interferons as Joint Regulators of Tumor Growth and Obesity. *Cancers (Basel)* (2021) 13:1–18. doi: 10.3390/cancers13020196

82. Wieser V, Adolph TE, Grander C, Grabherr F, Enrich B, Moser P, et al. Adipose Type I Interferon Signaling Protects Against Metabolic Dysfunction. *Gut* (2018) 67:157–65. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313155

83. Chan CC, Dumen MSMA, Moreno-Fernandez ME, Stankiewicz TE, Cappelletti M, Alarcon PC, et al. Type I Interferon Sensing Unlocks Dormant Adipocyte Inflammatory Potential. *Nat Commun* (2020) 11:2745. doi: 10.1038/s41467-020-16571-4

84. Iacobini C, Pugliese G, Blassetti Fantauzzi C, Federici M, Menini S. Metabolically Healthy Versus Metabolically Unhealthy Obesity. *Metabolism* (2019) 92:51–60. doi: 10.1016/j.metabol.2018.11.009

85. Koethe JR, Lagathu C, Lake JE, Domingo P, Calmy A, Falutz J, et al. HIV and Antiretroviral Therapy-Related Fat Alterations. *Nat Rev Dis Prim* (2020) 6:48. doi: 10.1038/s41572-020-0181-1

86. Giral M, Domingo P, Villarroya F. Adipose Tissue Biology and HIV-Infection. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (2011) 25:487–99. doi: 10.1016/j.beem.2010.12.001

87. Dupin N, Buffet M, Marcelin A-G, Lamotte C, Gorin I, Ait-Arkoub Z, et al. HIV and Antiretroviral Drug Distribution in Plasma and Fat Tissue of HIV-Infected Patients With Lipodystrophy. *AIDS* (2002) 16:2419–24. doi: 10.1097/00002030-200212060-00006

88. Munier S, Borjabad A, Lemaire M, Mariot V, Hazan U. In Vitro Infection of Human Primary Adipose Cells With HIV-1: A Reassessment. *AIDS* (2003) 17:2537–9. doi: 10.1097/01.aids.0000096866.36052.84

89. Raymond AD, Campbell-Sims TC, Khan M, Lang M, Huang MB, Bond VC, et al. HIV Type 1 Nef Is Released From Infected Cells in CD45(+) Microvesicles and Is Present in the Plasma of HIV-infected Individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* (2011) 27:167–78. doi: 10.1089/aid.2009.0170
90. Agarwal N, Iyer D, Patel SG, Sekhar RV, Phillips TM, Schubert U, et al. HIV-1 Vpr Induces Adipose Dysfunction In Vivo Through Reciprocal Effects on PPAR/GR Co-Regulation. *Sci Transl Med* (2013) 5:213ra164. doi: 10.1126/scitranslmed.3007148
91. Gorwood J, Bourgeois C, Mantecon M, Atlan M, Pourcher V, Pourcher G, et al. Impact of HIV/simian Immunodeficiency Virus Infection and Viral Proteins on Adipose Tissue Fibrosis and Adipogenesis. *AIDS* (2019) 33:953–64. doi: 10.1097/QAD.0000000000002168
92. Gorwood J, Ejlalmanesh T, Bourgeois C, Mantecon M, Rose C, Atlan M, et al. SIV Infection and the HIV Proteins Tat and Nef Induce Senescence in Adipose Tissue and Human Adipose Stem Cells, Resulting in Adipocyte Dysfunction. *Cells* (2020) 9:854. doi: 10.3390/cells9040854
93. Pérez-Matute P, Pérez-Martínez L, Blanco JR, Oteo JA, Pérez-Matute P, Pérez-Martínez L, et al. Role of Mitochondria in HIV Infection and Associated Metabolic Disorders: Focus on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Lipodystrophy Syndrome. *Oxid Med Cell Longev* (2013) 2013:493413. doi: 10.1155/2013/493413
94. Vendeville A, Rayne F, Bonhoure A, Bettache N, Montcourrier P, Beaumelle B. HIV-1 Tat Enters T Cells Using Coated Pits Before Translocating From Acidified Endosomes and Eliciting Biological Responses. *Mol Biol Cell* (2004) 15:2347–60. doi: 10.1091/mbc.E03-12-0921
95. Debaisieux S, Rayne F, Yezid H, Beaumelle B. The Ins and Outs of HIV-1 Tat. *Traffic* (2012) 13:355–63. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01286.x
96. Clark E, Nava B, Caputi M. Tat Is a Multifunctional Viral Protein That Modulates Cellular Gene Expression and Functions. *Oncotarget* (2017) 8:27569–81. doi: 10.18632/oncotarget.15174
97. Herbein G, Gras G, Khan KA, Abbas W. Macrophage Signaling in HIV-1 Infection. *Retrovirology* (2010) 7:34. doi: 10.1186/1742-4690-7-34
98. Datta PK, Deshmans S, Khalili K, Merali S, Gordon JC, Fecchio C, et al. Glutamate Metabolism in HIV-1 Infected Macrophages: Role of HIV-1 Vpr. *Cell Cycle* (2016) 15:2288–98. doi: 10.1080/15384101.2016.1190054
99. Jacob RA, Johnson AL, Pawlak EN, Dirk BS, Van Nynatten LR, Haeryfar SMM, et al. The Interaction Between HIV-1 Nef and Adaptor Protein-2 Reduces Nef-mediated CD4+ T Cell Apoptosis. *Virology* (2017) 509:1–10. doi: 10.1016/j.virol.2017.05.018
100. Couturier J, Suliburk JW, Brown JM, Luke DJ, Agarwal N, Yu X, et al. Human Adipose Tissue as a Reservoir for Memory CD4+ T Cells and HIV. *AIDS* (2015) 29:667–74. doi: 10.1097/QAD.0000000000000599
101. Couturier J, Agarwal N, Nebete PN, Baze WB, Barry MA, Jagannadha Sastry K, et al. Infectious SIV Resides in Adipose Tissue and Induces Metabolic Defects in Chronically Infected Rhesus Macaques. *Retrovirology* (2016) 13:30. doi: 10.1186/s12977-016-0260-2
102. Damouche A, Lazure T, Avettand-Fénoël V, Huot N, Dejujuc-Rainsford N, Sattie A-PA-P, et al. Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site During Chronic HIV and SIV Infection. *PLoS Pathog* (2015) 11:e1005153. doi: 10.1371/journal.ppat.1005153
103. Couturier J, Lewis DE. HIV Persistence in Adipose Tissue Reservoirs. *Curr HIV/AIDS Rep* (2018) 15:60–71. doi: 10.1007/s11904-018-0378-z
104. Sabin CA. Do People With HIV Infection Have a Normal Life Expectancy in the Era of Combination Antiretroviral Therapy? *BMC Med* (2013) 11:251. doi: 10.1186/1741-7015-11-251
105. Hunt PW. HIV and Inflammation: Mechanisms and Consequences. *Curr HIV/AIDS Rep* (2012) 9:139–47. doi: 10.1007/s11904-012-0118-8
106. Novelli S, Lécureux C, Goujard C, Reynes J, Villemant A, Blum L, et al. Persistence of Monocyte Activation Under Treatment in People Followed Since Acute HIV-1 Infection Relative to Participants at High or Low Risk of HIV Infection. *EBioMedicine* (2020) 62:103129. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.103129
107. Sereti I, Krebs SJ, Phanuphak N, Fletcher JL, Slike B, Pinyakorn S, et al. Persistent, Albeit Reduced, Chronic Inflammation in Persons Starting Antiretroviral Therapy in Acute HIV Infection. *Clin Infect Dis* (2017) 64:124–31. doi: 10.1093/cid/ciw683
108. Brechley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial Translocation Is a Cause of Systemic Immune Activation in Chronic HIV Infection. *Nat Med* (2006) 12:1365–71. doi: 10.1038/nm1511
109. Bandera A, De Benedetto I, Bozzi G, Gori A. Altered Gut Microbiome Composition in HIV Infection: Causes, Effects and Potential Intervention. *Curr Opin HIV AIDS* (2018) 13:73–80. doi: 10.1097/COH.0000000000000429
110. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The Gut Microbiota as an Environmental Factor That Regulates Fat Storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101:15718–23. doi: 10.1073/pnas.0407076101
111. Spencer SP, Sonnenburg JL. When Gut Microbiota Creep Into Fat, the Fat Creeps Back. *Cell* (2020) 183:589–91. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.008
112. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 Expression on HIV-Specific T Cells Is Associated With T-Cell Exhaustion and Disease Progression. *Nature* (2006) 443:350–4. doi: 10.1038/nature05115
113. Ghislain M, Bastard J-P, Meyer L, Capeau J, Fellahi S, Gérard L, et al. Late Antiretroviral Therapy (ART) Initiation Is Associated With Long-Term Persistence of Systemic Inflammation and Metabolic Abnormalities. *PLoS One* (2015) 10:e0144317. doi: 10.1371/journal.pone.0144317
114. Bastard J-P, Caron M, Vidal H, Jan V, Auclair M, Vigouroux C, et al. Association Between Altered Expression of Adipogenic Factor SREBP1 in Lipotrophic Adipose Tissue From HIV-1-Infected Patients and Abnormal Adipocyte Differentiation and Insulin Resistance. *Lancet* (2002) 359:1026–31. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08094-7
115. Jan V, Cervera P, Maachi M, Baudrimont M, Kim M, Vidal H, et al. Altered Fat Differentiation and Adipocytokine Expression Are Inter-Related and Linked to Morphological Changes and Insulin Resistance in HIV-1-Infected Lipodystrophic Patients. *Antivir Ther* (2004) 9:555–64. doi: 10.1038/nm1511
116. Mallal SA, John M, Moore CB, James IR, McKinnon EJ. Contribution of Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors to Subcutaneous Fat Wasting in Patients With HIV Infection. *AIDS* (2000) 14:1309–16. doi: 10.1097/00002030-200007070-00002
117. Nolan D, Hammond E, Martin A, Taylor L, Herrmann S, McKinnon E, et al. Mitochondrial DNA Depletion and Morphologic Changes in Adipocytes Associated With Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Therapy. *AIDS* (2003) 17:1329–38. doi: 10.1097/01.aids.0000060385.18106.35
118. Martin A, Mallon PW. Therapeutic Approaches to Combating Lipodystrophy: Do They Work? *J Antimicrob Chemother* (2005) 55:612–5. doi: 10.1093/jac/dk062
119. Lake JE, Stanley TL, Apovian CM, Bhasin S, Brown TT, Capeau J, et al. Practical Review of Recognition and Management of Obesity and Lipohypertrophy in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Infect Dis* (2017) 64:1422–9. doi: 10.1093/cid/cix178
120. Calmy A, Tovar Sanchez T, Kouanfack C, Mpoudi-Etame M, Leroy S, Perrineau S, et al. Dolutegravir-Based and Low-Dose Efavirenz-Based Regimens for the Initial Treatment of HIV-1 Infection (NAMSAL): Week 96 Results From a Two-Group, Multicentre, Randomised, Open Label, Phase 3 Non-Inferiority Trial in Cameroon. *Lancet HIV* (2020) 7:e677–87. doi: 10.1016/S2352-3018(20)30238-1
121. Venter WDF, Moorhouse M, Sokhela S, Fairlie L, Mashabane N, Masenya M, et al. Dolutegravir Plus Two Different Prodrugs of Tenofovir to Treat HIV. *N Engl J Med* (2019) 381:803–15. doi: 10.1056/NEJMoa1902824
122. Couturier J, Winchester LC, Suliburk JW, Wilkerson GK, Podany AT, Agarwal N, et al. Adipocytes Impair Efficacy of Antiretroviral Therapy. *Antiviral Res* (2018) 154:140–8. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.04.002
123. Gorwood J, Bourgeois C, Pourcher V, Pourcher G, Charlotte F, Mantecon M, et al. The Integrase Inhibitors Dolutegravir and Raltegravir Exert Pro-Adipogenic and Profibrotic Effects and Induce Insulin Resistance in Human/Simian Adipose Tissue and Human Adipocytes. *Clin Infect Dis* (2020) 71:e549–60. doi: 10.1093/cid/ciaa259
124. Patterson KB, Prince HA, Stevens T, Shabehn NJ, DeBon ES, Madanick RD, et al. Differential Penetration of Raltegravir Throughout Gastrointestinal Tissue: Implications for Eradication and Cure. *AIDS* (2013) 27:1413–9. doi: 10.1097/QAD.0b013e32835f2b49
125. Bastard JP, Pelloux V, Ailli R, Fellahi S, Aron-Wisniewsky J, Emilie C, et al. Altered Subcutaneous Adipose Tissue Parameters After Switching ART-Controlled HIV+ Patients to Raltegravir/Maraviroc. *AIDS* (2021). doi: 10.1097/QAD.0000000000002900
126. Mansfield KG, Carville A, Wachtman L, Goldin BR, Yearley J, Li W, et al. A Diet High in Saturated Fat and Cholesterol Accelerates Simian Immunodeficiency Virus Disease Progression. *J Infect Dis* (2007) 196:1202–10. doi: 10.1086/521680

127. Milner JJ, Sheridan PA, Karlsson EA, Schulte-Cherry S, Shi Q, Beck MA. Diet-Induced Obese Mice Exhibit Altered Heterologous Immunity During a Secondary 2009 Pandemic H1N1 Infection. *J Immunol* (2013) 191:2474–85. doi: 10.4049/jimmunol.1202429
128. Crum-Cianflone NF, Roediger M, Eberly LE, Vyas K, Landrum ML, Ganesan A, et al. Obesity Among HIV-Infected Persons: Impact of Weight on CD4 Cell Count. *AIDS* (2010) 24:1069–72. doi: 10.1097/QAD.0b013e328337fe01
129. Shor-Posner G, Campa A, Zhang G, Persaud N, Miguez-Burbano M-J, Quesada J, et al. When Obesity Is Desirable: A Longitudinal Study of the Miami HIV-1-Infected Drug Abusers (MIDAS) Cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2000) 23:81–8. doi: 10.1097/00126334-200001010-00011
130. Jiang J, Qin X, Liu H, Meng S, Abdullah AS, Huang J, et al. An Optimal BMI Range Associated With a Lower Risk of Mortality Among HIV-Infected Adults Initiating Antiretroviral Therapy in Guangxi, China. *Sci Rep* (2019) 9:7816. doi: 10.1038/s41598-019-44279-z
131. Kim DJ, Westfall AO, Chamot E, Willig AL, Mugavero MJ, Ritchie C, et al. Multimorbidity Patterns in HIV-Infected Patients: The Role of Obesity in Chronic Disease Clustering. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2012) 61:600–5. doi: 10.1097/QAI.0b013e32827303d5
132. Koethe JR, Jenkins CA, Shepherd BE, Stinnette SE, Sterling TR. An Optimal Body Mass Index Range Associated With Improved Immune Reconstitution Among HIV-Infected Adults Initiating Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis* (2011) 53:952–60. doi: 10.1093/cid/cir606
133. Koethe JR, Jenkins CA, Lau B, Shepherd BE, Wester W, Rebeiro PF, et al. Higher Time-Updated Body Mass Index: Association With Improved CD4+ Cell Recovery on HIV Treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2016) 73:197–204. doi: 10.1097/QAI.0000000000001035
134. Tedaldi EM, Brooks JT, Weidle PJ, Richardson JT, Baker RK, Buchacz K, et al. Increased Body Mass Index Does Not Alter Response to Initial Highly Active Antiretroviral Therapy in HIV-1-Infected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2006) 43:35–41. doi: 10.1097/01.qai.0000234084.11291.84
135. Madelain V, Le MP, Champenois K, Charpentier C, Landman R, Joly V, et al. Impact of Obesity on Antiretroviral Pharmacokinetics and Immunovirological Response in HIV-Infected Patients: A Case-Control Study. *J Antimicrob Chemother* (2017) 72:1137–46. doi: 10.1093/jac/dkx527
136. Caron M, Auclair M, Lagathu C, Lombes A, Walker UA, Kornprobst M, et al. The HIV-1 Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors Stavudine and Zidovudine Alter Adipocyte Functions In Vitro. *AIDS* (2004) 18:2127–36. doi: 10.1097/00002030-200411050-00004
137. De Luca A, Naxi M, Di Giambenedetto S, Cozzi-Lepri A, Pinti M, Marzocchetti A, et al. Mitochondrial DNA Haplogroups and Incidence of Lipodystrophy in HIV-Infected Patients on Long-Term Antiretroviral Therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2012) 59:113–20. doi: 10.1097/QAI.0b013e32823daaf3
138. Hulgan T, Haubrich R, Riddler SA, Tebas P, Ritchie MD, McCormsey GA, et al. European Mitochondrial DNA Haplogroups and Metabolic Changes During Antiretroviral Therapy in AIDS Clinical Trials Group Study A5142. *AIDS* (2011) 25:37–47. doi: 10.1097/QAD.0b013e328339d002
139. Caron M, Auclair M, Donadille B, Béréziat V, Guerci B, Laville M, et al. Human Lipodystrophies Linked to Mutations in A-type Lamins and to HIV Protease Inhibitor Therapy Are Both Associated With Prelamin A Accumulation, Oxidative Stress and Premature Cellular Senescence. *Cell Death Differ* (2007) 14:1759–67. doi: 10.1038/sj.cdd.4402197
140. Caron M, Auclair M, Sterlingot H, Kornprobst M, Capeau J. Some HIV Protease Inhibitors Alter Lamin A/C Maturation and Stability, SREBP-1 Nuclear Localization and Adipocyte Differentiation. *AIDS* (2003) 17:2437–44. doi: 10.1097/00002030-200311210-00005
141. Torriani M, Srinivasa S, Fitch KV, Thomou T, Wong K, Petrow E, et al. Dysfunctional Subcutaneous Fat With Reduced Dicer and Brown Adipose Tissue Gene Expression in HIV-Infected Patients. *J Clin Endocrinol Metab* (2016) 101:1225–34. doi: 10.1210/je.2015-3993
142. Ravaud C, Pare M, Yao X, Azoulay S, Mazure NM, Dani C, et al. Resveratrol and HIV-Protease Inhibitors Control UCP1 Expression Through Opposite Effects on P38 MAPK Phosphorylation in Human Adipocytes. *J Cell Physiol* (2020) 235:1184–96. doi: 10.1002/jcp.29032
143. Srinivasa S, Torriani M, Fitch KV, Maehler P, Iyengar S, Feldpausch M, et al. Brief Report: Adipogenic Expression of Brown Fat Genes in HIV and HIV-Related Parameters. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2019) 82:491–5. doi: 10.1097/QAI.0000000000002180
144. El Hadri K, Glorian M, Monsempes C, Dieudonne MN, Pecquery R, Giudicelli Y, et al. In Vitro Suppression of the Lipogenic Pathway by the Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Efavirenz in 3T3 and Human Preadipocytes or Adipocytes. *J Biol Chem* (2004) 279:15130–41. doi: 10.1074/jbc.M312875200
145. Hasegawa Y, Ikeda K, Chen Y, Alba DL, Stifler D, Shinoda K, et al. Repression of Adipose Tissue Fibrosis Through a PRDM16-GTF2IRD1 Complex Improves Systemic Glucose Homeostasis. *Cell Metab* (2018) 27:180–194.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2017.12.005
146. Babaei R, Schuster M, Meln I, Lerch S, Ghandour RA, Pisani DF, et al. Jak-TGFbeta Cross-Talk Links Transient Adipose Tissue Inflammation to Beige Adipogenesis. *Sci Signal* (2018) 11:eaai7838. doi: 10.1126/scisignal.aai7838
147. Hill A, Waters I, Pozniak A. Are New Antiretroviral Treatments Increasing the Risks of Clinical Obesity? *J Virus Erad* (2019) 5:41–3. doi: 10.1016/S2055-6640(20)30277-6
148. Domingo P, Villarroya F, Giralt M, Domingo JC. Potential Role of the Melanocortin Signaling System Interference in the Excess Weight Gain Associated to Some Antiretroviral Drugs in People Living With HIV. *Int J Obes* (2020) 44:1970–3. doi: 10.1038/s41366-020-0551-5
149. McMahon C, Trevaskis JL, Carrier C, Holsapple K, White K, Das M, et al. Lack of an Association Between Clinical INSTI-Related Body Weight Gain and Direct Interference With MC4 Receptor (MC4R), a Key Central Regulator of Body Weight. *PLoS One* (2020) 15:e0229617. doi: 10.1371/journal.pone.0229617
150. Caron-Debarle M, Lagathu C, Boccardo F, Vigouroux C, Capeau J. HIV-Associated Lipodystrophy: From Fat Injury to Premature Aging. *Trends Mol Med* (2010) 16:218–29. doi: 10.1016/j.molmed.2010.03.002
151. Vigouroux C, Maachi M, Nguyen TH, Coussieu C, Gharakhanian S, Funahashi T, et al. Serum Adipocytokines Are Related to Lipodystrophy and Metabolic Disorders in HIV-Infected Men Under Antiretroviral Therapy. *AIDS* (2003) 17:1503–11. doi: 10.1097/00002030-200307040-00011
152. Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: Action, Regulation and Association to Insulin Sensitivity. *Obes Rev* (2005) 6:13–21. doi: 10.1111/j.1467-789X.2005.00159.x
153. Fang H, Judd RL. Adiponectin Regulation and Function. *Compr Physiol* (2018) 8:1031–63. doi: 10.1002/cphy.c170046
154. Brennan AM, Mantzoros CS. Drug Insight: The Role of Leptin in Human Physiology and Pathophysiology—Emerging Clinical Applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* (2006) 2:318–27. doi: 10.1038/ncpendmet0196
155. Das S, Shahmanesh M, Stollinski M, Shojaei-Moradie F, Jefferson W, Jackson NC, et al. In Treatment-Naive and Antiretroviral-Treated Subjects With HIV, Reduced Plasma Adiponectin Is Associated With a Reduced Fractional Clearance Rate of VLDL, IDL and LDL. Apolipoprotein B-100. *Diabetologia* (2006) 49:538–42. doi: 10.1007/s00125-005-0085-3
156. Dirajlal-Fargo S, Moser C, Brown TT, Kelesidis T, Dube MP, Stein JH, et al. Changes in Insulin Resistance After Initiation of Raltegravir or Protease Inhibitors With Tenofovir-Emtricitabine: AIDS Clinical Trials Group A5260s. *Open Forum Infect Dis* (2016) 3:ofw174. doi: 10.1093/ofid/ofw174
157. Katlama C, Assoumou L, Valantin MA, Soulié C, Martinez E, Bénéguet L, et al. Dual Therapy Combining Raltegravir With Etravirine Maintains a High Level of Viral Suppression Over 96 Weeks in Long-Term Experienced HIV-Infected Individuals Over 45 Years on a PI-Based Regimen: Results From the Phase II ANRS 163 ETRAL Study. *J Antimicrob Chemother* (2019) 74:2742–51. doi: 10.1093/jac/dkz224
158. McCormsey GA, Moser C, Carrier J, Ribaud H, Paczusi P, Dube MP, et al. Body Composition Changes After Initiation of Raltegravir or Protease Inhibitors: ACTG A5260s. *Clin Infect Dis* (2016) 62:853–62. doi: 10.1093/cid/ciw017
159. McLaughlin M, Walsh S, Galvin S. Dolutegravir-Induced Hyperglycaemia in a Patient Living With HIV. *J Antimicrob Chemother* (2018) 73:258–60. doi: 10.1093/jac/dkx365
160. Ofor O, Utay N, Reynoso D, Somasunderam A, Currier J, Lake J. Adiponectin and the Steatosis Marker Ch3L1 Decrease Following Switch to Raltegravir Compared to Continued PI/NNRTI-based Antiretroviral Therapy. *PLoS One* (2018) 13:e0196395. doi: 10.1371/journal.pone.0196395

161. Fruhbeck G, Catalan V, Rodriguez A, Gomez-Ambrosi J. Adiponectin-Leptin Ratio: A Promising Index to Estimate Adipose Tissue Dysfunction. Relation With Obesity-Associated Cardiometabolic Risk. *Adipocyte* (2018) 7:57–62. doi: 10.1080/21623945.2017.1402151
162. Vega GL, Grundy SM. Metabolic Risk Susceptibility in Men Is Partially Related to Adiponectin/Leptin Ratio. *J Obes* (2013) 2013:409679. doi: 10.1155/2013/409679
163. Casol E, Misra V, Dutta A, Morgello S, Gabuzda D. Cerebrospinal Fluid Metabolomics Reveals Altered Waste Clearance and Accelerated Aging in HIV Patients With Neurocognitive Impairment. *AIDS* (2014) 28:1579–91. doi: 10.1097/QAD.0000000000000303
164. Shikuma CM, Gangcuangco LMA, Killebrew DA, Libutti DE, Chow DC, Nakamoto BK, et al. The Role of HIV and Monocytes/Macrophages in Adipose Tissue Biology. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2014) 65:151–9. doi: 10.1097/QAI.0000435599.27727.6c
165. Wanjalla CN, McDonnell WJ, Koethe JR. Adipose Tissue T Cells in HIV/SIV Infection. *Front Immunol* (2018) 9:2730. doi: 10.3389/fimmu.2018.02730
166. Damouche A, Pourcher G, Pourcher V, Benoist S, Busson E, Lataillade J-J, et al. High Proportion of PD-1-expressing CD4<sup>+</sup> T Cells in Adipose Tissue Constitutes an Immunomodulatory Microenvironment That may Support HIV Persistence. *Eur J Immunol* (2017) 47:2113–23. doi: 10.1002/eji.201747060
167. Koethe JR, McDonnell W, Kennedy A, Abana CO, Pilkinton M, Setliff L, et al. Adipose Tissue Is Enriched for Activated and Late-differentiated CD8<sup>+</sup> T Cells, and Shows Distinct CD8<sup>+</sup> Receptor Usage, Compared to Blood in HIV-Infected Persons. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2017) 77:e14–21. doi: 10.1097/QAI.00000000000001573
168. Laparra A, Tricot S, Le Van M, Damouche A, Gorwood J, Vasil B, et al. The Frequencies of Immunosuppressive Cells in Adipose Tissue Differ in Human, Non-Human Primate, and Mouse Models. *Front Immunol* (2019) 10:117. doi: 10.3389/fimmu.2019.00117
169. Korenchak M, Byrne M, Richter E, Schultz BT, Juszcak P, Ake JA, et al. Effect of HIV Infection and Antiretroviral Therapy on Immune Cellular Functions. *JCI Insight* (2019) 4(12):e126675. doi: 10.1172/jci.insight.126675
170. Masschelin PM, Cox AR, Chernis N, Hartig SM. The Impact of Oxidative Stress on Adipose Tissue Energy Balance. *Front Physiol* (2020) 10:1638. doi: 10.3389/fphys.2019.01638
171. Martínez-Martínez E, Souza-Neto FV, Jiménez-González S, Cachofeiro V. Oxidative Stress and Vascular Damage in the Context of Obesity: The Hidden Guest. *Antioxidants (Basel Switzerland)* (2021) 10:406. doi: 10.3390/antiox10030406
172. Apovian CM, Bigornia S, Mott M, Meyers MR, Ulloor J, Gagna M, et al. Adipose Macrophage Infiltration Is Associated With Insulin Resistance and Vascular Endothelial Dysfunction in Obese Subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2008) 28:1654–9. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.170316
173. Frigolet ME, Torres N, Tovar AR. The Renin-Angiotensin System in Adipose Tissue and its Metabolic Consequences During Obesity. *J Nutr Biochem* (2013) 24:2003–15. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.07.002
174. Boccaro F, Auclair M, Cohen A, Lefèvre C, Prot M, Bastard J-P, et al. HIV Protease Inhibitors Activate the Adipocyte Renin Angiotensin System. *Antivir Ther* (2010) 15:363–75. doi: 10.3851/IMP1533
175. Masenga SK, Elijovich F, Koethe JR, Hamooya BM, Heimbürger DC, Munsaka SM, et al. Hypertension and Metabolic Syndrome in Persons With HIV. *Curr Hypertens Rep* (2020) 22:78. doi: 10.1007/s11906-020-01089-3
176. Srinivasa S, Fitch KV, Wong K, Torriani M, Mayhew C, Stanley T, et al. RAAS Activation Is Associated With Visceral Adiposity and Insulin Resistance Among HIV-Infected Patients. *J Clin Endocrinol Metab* (2015) 100:2873–82. doi: 10.1210/jc.2015-1461
177. da Silva Rosa SC, Nayak N, Caymo AM, Gordon JW. Mechanisms of Muscle Insulin Resistance and the Cross-Talk With Liver and Adipose Tissue. *Physiol Rep* (2020) 8:e14607. doi: 10.14814/phy2.14607
178. Bourgi K, Wanjalla C, Koethe JR. Inflammation and Metabolic Complications in HIV. *Curr HIV/AIDS Rep* (2018) 15:371–81. doi: 10.1007/s11904-018-0411-2
179. Giralt M, Diaz-Delfin J, Gallego-Escuredo JM, Villarroya J, Domingo P, Villarroya F. Lipotoxicity on the Basis of Metabolic Syndrome and Lipodystrophy in HIV-1-Infected Patients Under Antiretroviral Treatment. *Curr Pharm Des* (2010) 16:3371–8. doi: 10.2174/138161210793563527
180. Schouten J, Wit FW, Stolte IG, Kootstra NA, van der Valk M, Geerlings SE, et al. Group AGECS. Cross-Sectional Comparison of the Prevalence of Age-Associated Comorbidities and Their Risk Factors Between HIV-Infected and Uninfected Individuals: The AGEHIV Cohort Study. *Clin Infect Dis* (2014) 59:1787–97. doi: 10.1093/cid/ciu701
181. Bastard J-PP, Fellahi S, Couffignal C, Raffi F, Gras G, Hardel L, et al. Increased Systemic Immune Activation and Inflammatory Profile of Long-Term HIV-Infected ART-Controlled Patients Is Related to Personal Factors, But Not to Markers of HIV Infection Severity. *J Antimicrob Chemother* (2015) 70:1816–24. doi: 10.1093/jac/dkv036
182. Gelpi M, Afzal S, Fuchs A, Lundgren J, Knudsen AD, Drivsholm N, et al. Prior Exposure to Thymidine Analogs and Didanosine Is Associated With Long-Lasting Alterations in Adipose Tissue Distribution and Cardiovascular Risk Factors. *AIDS* (2019) 33:675–83. doi: 10.1097/QAD.0000000000002119
183. Rosito GA, Massaro JM, Hoffmann U, Ruberg FL, Mahabadi AA, Vasan RS, et al. Pericardial Fat, Visceral Abdominal Fat, Cardiovascular Disease Risk Factors, and Vascular Calcification in a Community-Based Sample: The Framingham Heart Study. *Circulation* (2008) 117:605–13. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.743062
184. Lee YJ, Wang CP, Hsu HL, Hung WC, Yu TH, Chen YH, et al. Increased Epididymal Adipose Tissue (EAT) Volume in Type 2 Diabetes Mellitus and Association With Metabolic Syndrome and Severity of Coronary Atherosclerosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* (2009) 70:876–82. doi: 10.1111/j.1365-2265.2008.03411.x
185. Mazurek T, Zhang JF, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arzafat H, et al. Human Epicardial Adipose Tissue Is a Source of Inflammatory Mediators. *Circulation* (2003) 108:2460–6. doi: 10.1161/01.CIR.0000099542.57313.C5
186. Iacobellis G, Willens HJ. Echocardiographic Epicardial Fat: A Review of Research and Clinical Applications. *J Am Soc Echocardiogr* (2009) 22:1311–8. doi: 10.1016/j.echo.2009.10.013
187. Buggie J, Longenecker CT. Heart Fat in HIV: Marker or Mediator of Risk? *Curr Opin HIV AIDS* (2017) 12:572–8. doi: 10.1097/COH.0000000000000414
188. Iacobellis G, Pellicelli AM, Sharma AM, Grisorio B, Barbarini G, Barbaro G. Relation of Subepicardial Adipose Tissue to Carotid Intima-Media Thickness in Patients With Human Immunodeficiency Virus. *Am J Cardiol* (2007) 99:1470–2. doi: 10.1016/j.amjcard.2006.12.082
189. Iantorno M, Soleimanifard S, Schar M, Brown TT, Bonanno G, Barditch-Crovo P, et al. Regional Coronary Endothelial Dysfunction Is Related to the Degree of Local Epicardial Fat in People With HIV. *Atherosclerosis* (2018) 278:7–14. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.08.002
190. Maurice JB, Patel A, Scott AJ, Patel K, Thursz M, Lemoine M. Prevalence and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in HIV-Monoinfection. *AIDS* (2017) 31:1621–32. doi: 10.1097/QAD.0000000000001504
191. Lemoine M, Lacombe K, Bastard JP, Sebire M, Fonquernie L, Valin N, et al. Metabolic Syndrome and Obesity Are the Cornerstones of Liver Fibrosis in HIV-Monoinfected Patients. *AIDS* (2017) 31:1955–64. doi: 10.1097/QAD.00000000000001587
192. Morse CG, McLaughlin M, Matthews L, Proschan M, Thomas F, Gharib AM, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis and Hepatic Fibrosis in HIV-1-Monoinfected Adults With Elevated Aminotransferase Levels on Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis* (2015) 60:1569–78. doi: 10.1093/cid/civ101
193. Capeau J, Bouteloup V, Katlama C, Bastard J-P, Guiyedi V, Salmon-Ceron D, et al. Ten-Year Diabetes Incidence in 1046 HIV-Infected Patients Started on a Combination Antiretroviral Treatment. *AIDS* (2012) 26:303–14. doi: 10.1097/QAD.0b013e32834e8776
194. Bastard JP, Couffignal C, Fellahi S, Bard JM, Mentre F, Salmon D, et al. Diabetes and Dyslipidaemia Are Associated With Oxidative Stress Independently of Inflammation in Long-Term Antiretroviral-Treated HIV-Infected Patients. *Diabetes Metab* (2019) 45:573–81. doi: 10.1016/j.diabet.2019.02.008
195. Assoumou L, Racine C, Fellahi S, Lamaziere A, Farabos D, Beniguel L, et al. Fat Gain Differs by Sex and Hormonal Status in Persons Living With Suppressed HIV Switched to Raltegravir/Etravirine. *AIDS* (2020) 34:1859–62. doi: 10.1097/QAD.0000000000002644
196. Rebeiro PF, Jenkins CA, Bian A, Lake JE, Bourgi K, Moore RD, et al. Risk of Incident Diabetes Mellitus, Weight Gain, and Their Relationships With Integrase Inhibitor-Based Initial Antiretroviral Therapy Among Persons

With Human Immunodeficiency Virus in the United States and Canada. *Clin Infect Dis* (2020), ciaa1403. doi: 10.1093/cid/ciaa1403

197. Ursenbach A, Maas V, Maurel M, Bani-Sadr F, Gagneux-Brunon A, Garraffo R, et al. Incidence of Diabetes in HIV-Infected Patients Treated With First-Line Integrase Strand Transfer Inhibitors: A French Multicentre Retrospective Study. *J Antimicrob Chemother* (2020) 75:3344–8. doi: 10.1093/jac/dkaa330

198. Bloch M, John M, Smith D, Rasmussen TA, Wright E. Managing HIV-Associated Inflammation and Ageing in the Era of Modern ART. *HIV Med* (2020) 21:2–16. doi: 10.1111/hiv.12932

199. Piché ME, Tchernof A, Després JP. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ Res* (2020) 126:1477–500. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316101

200. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy With Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* (2017) 377:1119–31. doi: 10.1056/nejmoa1707914

201. Hsue PY, Li D, Ma Y, Ishai A, Manion M, Nahrendorf M, et al. IL-1 $\beta$  Inhibition Reduces Atherosclerotic Inflammation in HIV Infection. *J Am Coll Cardiol* (2018) 72:2809–11. doi: 10.1016/j.jacc.2018.09.038

202. Hsue PY, Ribaudo HJ, Deeks SG, Bell T, Ridker PM, Fichtenbaum C, et al. Safety and Impact of Low-dose Methotrexate on Endothelial Function and Inflammation in Individuals With Treated Human Immunodeficiency Virus: AIDS Clinical Trials Group Study A5314. *Clin Infect Dis* (2019) 68:1877–86. doi: 10.1093/cid/ciy781

203. Antonopoulos AS, Margaritis M, Lee R, Channon K, Antoniades C. Statins as Anti-Inflammatory Agents in Atherogenesis: Molecular Mechanisms and Lessons From the Recent Clinical Trials. *Curr Pharm Des* (2012) 18:1519–30. doi: 10.2174/1381612122799504803

204. Funderburg NT, Jiang Y, Debanne SM, Labbato D, Juchnowski S, Ferrari B, et al. Rosuvastatin Reduces Vascular Inflammation and T-Cell and Monocyte Activation in HIV-Infected Subjects on Antiretroviral Therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2015) 68:396–404. doi: 10.1097/QAI.0000000000000478

205. Toribio M, Fitch KV, Sanchez L, Burdo TH, Williams KC, Sponseller CA, et al. Effects of Pitavastatin and Pravastatin on Markers of Immune Activation and Arterial Inflammation in HIV. *AIDS* (2017) 31:797–806. doi: 10.1097/QAD.0000000000001427

206. Fichtenbaum CJ, Ribaudo HJ, Leon-Cruz J, Overton ET, Zanni MV, Malvestutto CD, et al. Patterns of Antiretroviral Therapy Use and Immunologic Profiles at Enrollment in the REPRIEVE Trial. *J Infect Dis* (2020) 222:S8–S19. doi: 10.1093/infdis/jiaa259

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Bourgeois, Gorwood, Olivo, Le Pelletier, Capeau, Lambotte, Béréziat and Lagathu. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



# ***DISCUSSION***

---



## **I. Rappel des résultats obtenus en préalable à la discussion**

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude des propriétés fonctionnelles des LyT CD8 du TA au cours de l'infection par le VIH/SIV. La caractérisation visait tout d'abord à évaluer l'expression de trois récepteurs aux chimiokines sur les LyT CD8 circulants dans le contexte de l'infection chronique par le VIH. Nous avons ensuite envisagé une approche tissulaire avec une caractérisation des LyT CD8 dans deux modèles d'infection : l'infection chronique par le VIH/SIV et l'infection aiguë par le SARS-CoV-2.

Dans le premier travail mené sur sang total, nous avons montré l'intérêt d'intégrer des récepteurs aux chimiokines à la caractérisation des LyT CD8 dans le contexte de l'infection chronique par le VIH. Notre modèle d'étude nous a tout d'abord permis de confirmer que l'expression de CXCR3, CXCR5 et CX3CR1 différait selon le statut de différenciation des LyT CD8 et que les cellules mémoires exprimaient fortement CXCR3. Nous avons également montré que le contexte de l'infection par le VIH était associé à une augmentation de l'expression des récepteurs aux chimiokines, et que l'expression des récepteurs aux chimiokines était associée à un profil d'épuisement et de sénescence plus marqués. Enfin, nous avons observé **un profil d'expression des récepteurs aux chimiokines plus vaste sur les LyT CD8 spécifiques du VIH** par comparaison aux LyT CD8 totaux avec notamment un changement important dans l'expression de CXCR5 par les LyT CD8 mémoires centrales qui semblait un facteur fortement modulé au cours de l'infection. Ce premier travail a permis de confirmer notre hypothèse de l'intérêt des chimiokines dans la caractérisation des LyT CD8 au cours de l'infection par le VIH et a renforcé l'importance de l'analyse des réponses T qui intègrent la réponse dans les tissus. Nous avons ensuite souhaité caractériser les LyT CD8 du TA dans un contexte de coexistence des LyT CD8 et du pathogène. Le premier modèle envisagé a été celui de l'infection chronique par le SIV puisque le TA a été identifié comme réservoir viral. Dans ce modèle nous avons pu appréhender l'impact de l'infection chronique (contrôlée ou non par un TARV) sur le TA. De façon intéressante nous avons montré un impact de l'infection sur les fractions des progéniteurs mésenchymateux et des cellules hématopoïétiques du TA avec une diminution de la fraction CD45<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> et CD45<sup>+</sup> au sein de la FSV respectivement suggérant une **diminution du potentiel régénérateur et immunitaire du TA**. Cette première observation a été complétée par une analyse de la fraction lymphocytaire où nous rapportons une augmentation de la proportion de LyT CD8 chez les animaux infectés non traités (dans le TAV)

## Discussion

---

par comparaison aux animaux sains, et une absence de restauration CD8 sous TARV, même après un traitement initié très tôt après infection et maintenu sur plusieurs mois. Nous avons également pu montrer un profil métabolique des LyT CD8 du TA distinct de celui d'autres sites, et une absence d'inflammation locale après l'étude de l'expression de chimiokines. Cette étude met en évidence un impact de l'infection sur la FSV du TA au cours de l'infection chronique par le SIV avec un impact sur la fraction hématopoïétique et le compartiment des cellules souches mésenchymateuses adipeuses. Au sein du TASC, l'aggravation de l'atteinte de la fraction hématopoïétique chez les animaux infectés et traités par comparaison aux animaux virémiques, non traités, soutient à nouveau un **rôle direct de la toxicité du TARV sur le TA**, atteinte dont la cinétique d'apparition reste inchangée que le TARV soit initié à S4 ou S24.

En parallèle, nous avons également eu l'opportunité d'intégrer un deuxième modèle d'infection virale : le SARS-CoV-2. Dans un modèle simien d'infection non sévère par le SARS-CoV-2, nous avons tout d'abord confirmé la détection du virus dans le TASC et proposé une analyse des altérations immunologiques et en particulier des altérations des réponses T CD8 tissulaires dans le TA, que ce soit dans un site infecté, le TASC, ou non, le TAV. Dans un modèle simien d'infection modérée par le SARS-CoV-2, nous avons montré une **forte perturbation du compartiment T CD8 résident** avec une diminution drastique de la proportion de LyT CD8 CD69<sup>+</sup> à J7 post-infection.

Nous avons donc pu caractériser deux modèles d'infections avec une détection virale confirmée dans le TA. Dans ces deux modèles, que la détection du virus soit restreinte à certains sites ou non, temporaire ou persistante, qu'un traitement antiviral soit mis en place ou non, l'infection a un impact sur la physiologie du TA et en particulier sur la fraction hématopoïétique. Au cours de ces infections, le TA est soumis à des altérations majeures des réponses lymphocytaires, en lien direct ou non avec la présence virale, ce qui pourrait modifier non seulement les réponses immunitaires locales et systémiques ou encore impacter les fonctions métaboliques du TA du fait d'une réponse inflammatoire généralisée.

## **II. Discussion**

Un des atouts majeurs de ce travail de thèse a été de pouvoir travailler sur différents modèles d'infection (simiens et humains) mais aussi de pouvoir accéder à deux types d'infections virales (SARS-CoV-2 et VIH/SIV). Ceci nous a permis de combiner une approche fondamentale à des données cliniques, tissulaires et cellulaires du fait de collaborations avec une plateforme de primatologie et un centre de chirurgie bariatrique.

Bien que les modèles d'études aient été nombreux, ils ne sont pas toujours comparables du fait de particularités métaboliques (modèle d'obésité rare chez l'animal, difficultés d'accès aux prélèvements humains non obèses) ou infectieuses (complexité de l'élaboration d'un modèle simien avec une infection sévère à SARS-CoV-2, difficultés d'accès aux prélèvements de TA humains infectés par le SARS-Cov-2 ou par le VIH). Nous avons donc adressé chaque problématique à un modèle donné. Parmi les nombreux résultats obtenus, de nombreux points restent à approfondir. Je souhaiterais discuter ici de trois notions : la diversité de la mémoire, l'importance de la migration lymphocytaire et l'immunité du TA.

### ***Diversité de la mémoire***

La caractérisation des LyT CD8 mémoires, qu'il s'agisse de réponses systémiques ou tissulaires, qu'elle décrive une infection résolutive ou persistante est une problématique à laquelle nous nous sommes confrontés et dont les principaux fondements restent à ce jour controversés.

Alors que la notion de mémoire lymphocytaire systémique a été introduite il y a plus de deux décennies, son application aux contextes d'infections persistantes fait toujours débat. En effet, pendant longtemps et encore aujourd'hui, la définition stricte de la mémoire reste largement associée au phénomène de clairance antigénique qui se met en place en parallèle d'un phénomène de contraction des cellules effectrices. Au cours des infections persistantes, on assiste à une coexistence du pathogène et des LyT CD8 effecteurs (marqués d'un phénotype d'épuisement lymphocytaire) et des LyT CD8 mémoires dont la capacité de générer des réponses effectrices n'est pas totalement altérée. Il existe donc une mémoire lymphocytaire au cours d'infections persistantes, ce qui nécessite une meilleure compréhension de l'articulation des échanges avec les cellules effectrices au cours d'infections chroniques. La littérature actuelle fournit plusieurs hypothèses quant aux signaux potentiellement impliqués dans la mise en place de la mémoire et propose une notion d'équilibre entre l'environnement direct et les

## Discussion

---

cellules effectrices. Parmi les signaux susceptibles de modifier cet équilibre sont listés les antigènes (qualité des antigènes et de leur présentation par les CPAg, l'intensité du stimulus antigénique), pression inflammatoire du milieu mais aussi de la localisation de la réponse lymphocytaire (Achar et al., 2022; Ahmed & Gray, 1996; Stelekati et al., 2014). Ainsi, la mise en place d'une mémoire lymphocytaire apparaît comme dépendante du type d'infection. Au cours de la primo-infection VIH, la forte pression cytokinique associée à l'altération de l'homéostasie lymphocytaire du fait de l'infection des LyT CD4 concourent à la chronicisation de l'infection et donc à la coexistence VIH/LyT CD8 mémoires au long cours. Enfin, une littérature grandissante sur l'activation indépendante de l'antigène, dite « bystander » émerge. Elle est dans ce cas uniquement du fait de la pression inflammatoire locale et nous permet également d'envisager les réponses mémoires dans un contexte de persistance antigénique même avec une faible pression antigénique (Kim & Shin, 2019).

De la même manière que la définition de la mémoire selon le contexte infectieux interroge, la diversité de la mémoire peut surprendre. Ce terme unique est d'une simplicité trompeuse alors que la mémoire immunitaire est en réalité bien plus complexe. En effet, la mémoire, et en l'occurrence la mémoire T CD8, fait référence à un ensemble de cellules hétérogènes, de localisation diffuse, de phénotypes et fonctionnalités variables selon la sous-population considérée. Alors doit-on parler de la mémoire, ou des cellules mémoires ? Au cours des travaux de cette thèse, nous avons été amenés à étudier plusieurs compartiments : plasmatique et TA pour les travaux publiés, mais d'autres compartiments ont également été analysés comme les ganglions lymphatiques ou la moelle osseuse. Depuis plusieurs années, plusieurs approches quant à l'organisation de l'immunosurveillance au niveau de l'organisme coexistent et considèrent des caractérisations selon le compartiment étudié. Malgré tout, ces approches ne prennent pas en compte la diversité de la mémoire et des multiples sous-populations décrites. Et, dans notre travail, la diversité des compartiments étudiés a complexifié l'analyse et la comparaison inter-tissulaire des réponses T CD8. Parmi les stratégies de caractérisation de la mémoire au sein de l'organisme, plusieurs approches sont envisagées dans la littérature, la première consiste à envisager les LyT mémoires tissulaires qui seraient strictement maintenus à long terme dans les tissus, sans échanger avec le pool circulant. Cette approche a largement participé à rendre l'analyse des réponses T CD8 dépendantes du compartiment étudié, et rend l'analyse d'une réponse dynamique, circulante, plus complexe du fait de l'utilisation des

caractérisations phénotypiques singulières et relativement peu comparables. Cette vision d'une mémoire non circulante a récemment été en partie rediscutée par les travaux de Beura et al qui ont apporté la preuve d'une recirculation des  $T_{RM}$  (Beura et al., 2018). Une deuxième approche s'appuie sur un réseau efficace de recirculation lymphocytaire des cellules mémoires circulantes au sein des tissus lymphoïdes (parmi lesquelles on retrouverait les  $T_{CM}$ ) et les tissus non lymphoïdes (dont les  $T_{EM}$ ). Cette dernière approche semble plus représentative de réponses dynamiques au cours d'une infection chronique à persistance virale tissulaire (Sathaliyawala et al., 2013). Dans cette approche, la fonctionnalité des cellules mémoires (dont celle régissant les profils de localisation/migration) prend de l'importance et semble pertinente dans les contextes chroniques associés à une persistance virale tissulaire. Imaginer une stratégie qui pourrait caractériser la mémoire dans les contextes aigus et chroniques, dans les compartiments sanguins et tissulaires reste à l'étude. Jusque-là les réponses tissulaires étaient caractérisées de façon annexe, dans un compartiment autre que le compartiment circulant. Il est raisonnable de se questionner sur l'importance à donner aux réponses tissulaires dans les contextes chroniques? Au cours d'une réponse immunitaire, quelle mémoire est la plus importante, la mémoire circulante ou les cellules résidentes dans les tissus?

La plupart des études distinguent la mémoire circulante (essentiellement représentée par les  $T_{EM}$ ) de la mémoire tissulaire ( $T_{RM}$ ). Toutefois, peu d'études sont consacrées à la comparaison de la mémoire circulante et résidente dans les tissus. La première distinction  $T_{EM}/T_{RM}$  repose sur leur phénotype. Dans le compartiment circulant, les réponses sont caractérisées par les marqueurs : CD45RA, CD62L, CCR7, CD27, et peu de cellules expriment CD69. A l'inverse, dans le compartiment tissulaire, la caractérisation des  $T_{RM}$  repose sur la notion de rétention tissulaire. S'agissant des  $T_{RM}$ , même si les mécanismes qui régulent tous ces schémas de rétention/migration ne sont pas encore totalement identifiés, un élément central semble être le contrôle du facteur de sortie S1PR1 par l'expression de CD69, qui en se liant à cette protéine empêche son expression à la surface cellulaire. Ainsi, jusqu'à récemment, les cellules T  $CD69^+$  se retrouvaient retenues dans les tissus (Mackay et al., 2015). Dans les modèles d'études (murins, simiens et humains), CD69 est exprimé par la majorité des cellules  $T_{RM}$ , et cela dans plusieurs sites tissulaires. De là, l'expression de CD69 comme unique marqueur définissant une population résidente a été posée. Malgré tout, la question de savoir si CD69 peut délimiter à lui seul les  $T_{RM}$  a récemment été reposée avec les travaux de Beura et al (Beura et al., 2018) puisqu'ils ont permis d'identifier une recirculation des  $T_{RM}$  entre tissus lymphoïdes et non

## Discussion

---

lymphoïdes. Une question se pose alors, en quoi les  $T_{RM}$  diffèrent-ils des  $T_{EM}$  circulants ? Est-ce uniquement la notion de localisation ? Les travaux de Kumar et al ont permis de montrer dans un modèle murin que même si le CD69 confère une résidence instable, une signature transcriptionnelle est commune aux  $T_{RM}$  de tissus lymphoïdes et non lymphoïdes et que le CD69 permettait de distinguer les mémoires résidentes des mémoires circulantes (Kumar et al., 2017). La comparaison de  $T_{RM}$  de rate et de poumons sur plus de 130 gènes a révélé que le transcriptome des  $T_{RM}$  CD69<sup>+</sup> était distinct des  $T_{RM}$  CD69<sup>-</sup>, avec un certains nombres de gènes régulés à la hausse dans le groupe CD69<sup>+</sup> (CD103, CD49a, ICOS) et d'autres à la baisse (S1PR1 et son facteur de transcription KLF2) par comparaison à leurs homologues CD69<sup>-</sup>. Enfin, une comparaison des  $T_{RM}$ , CD69<sup>+</sup>, aux cellules mémoires CD69<sup>-</sup> du compartiment sanguin a permis de mettre en évidence une régulation à la hausse d'autres molécules d'adhésion telles que des récepteurs aux chimiokines comme CXCR6 et CX3CR1 et de la molécules inhibitrice PD-1.

Bien que les  $T_{RM}$  jouent un rôle bénéfique au cours d'infections virales, leur présence peut parfois avoir des conséquences négatives. Dans certains modèles de pathologies auto-immunes ou allergiques, la présence de  $T_{RM}$  est associée à une inflammation des tissus et contribue au développement de la pathologie. C'est le cas par exemple de  $T_{RM}$  CD4 dans les poumons qui contribuent au développement de l'asthme allergique, ou encore de la surreprésentation de  $T_{RM}$  CD8 associée à un développement accru du vitiligo chez les patients atteints de mélanome (Frączek et al., 2020; Hondowicz et al., 2018). Leur potentiel pro-inflammatoire et leur persistance au site des lésions suggèrent un rôle dans les lésions tissulaires responsables de certaines pathologies. Les LyT tissulaires résidents offrent ainsi une immunosurveillance, une immunité protectrice de longue durée et permettent une réponse rapide après une réexposition à un antigène. Ils peuvent aussi avoir des effets délétères sur les tissus et participer à la mise en place de pathologies inflammatoires. Nos données concernant l'étude du profil inflammatoire de l'environnement adipeux dans le contexte de l'infection chronique par le VIH ne montrent pas un environnement adipocytaire pro-inflammatoire. A la différence du contexte de l'obésité où il est clairement démontré une surexpression par le TA de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, nous ne retrouvons pas d'expression de médiateurs pro-inflammatoires surexprimés dans le contexte de l'infection chronique par le SIV. Ces résultats suggèrent non seulement une diversité parmi les  $T_{RM}$  mais aussi une fonction régulatrice de  $T_{RM}$ . Les  $T_{RM}$  pourraient être impliqués dans l'homéostasie tissulaire.

Dans notre travail, la caractérisation des LyT CD8 mémoires a permis de mettre à nouveau l'accent sur la grande diversité de la mémoire T. Il est maintenant reconnu que la majorité des cellules T mémoires des tissus non lymphoïdes sont les  $T_{RM}$ . Ils confèrent une protection immédiate contre les infections (Gebhardt et al., 2009). Mais les  $T_{RM}$  font partie d'une réponse mémoire complète à laquelle s'ajoutent les  $T_{CM}$  et  $T_{EM}$ . Les  $T_{CM}$ , avec leur potentiel de prolifération élevé, sont une source majeure de cellules effectrices lors d'une réponse antigénique secondaire ce qui concourt à la clairance des agents pathogènes (Sallusto et al., 2004). Les  $T_{EM}$  soutiennent l'activité des  $T_{RM}$  sur leurs fonctions effectrices immédiates et leurs capacités de réponse rapide sur les sites d'infection. Le maintien des sous-populations  $T_{CM}$  et  $T_{EM}$  est régulé par les cytokines homéostatiques IL-7 et IL-15, les facteurs qui maintiennent les  $T_{RM}$  ne sont pas clairement établis et semblent dépendre du micro-environnement tissulaire. Compte tenu de cette diversité, la discussion soulève une question importante : sur quels critères repose une réponse T CD8 efficace ? L'efficacité d'une réponse ne repose pas sur un seul critère mais dépend probablement de plusieurs facteurs comme le maintien d'un pool mémoire suffisant, la qualité des réponses et leur localisation aux lieux de persistance de l'antigène. Dans les modèles d'infections aiguës, comme la grippe, l'immunité protectrice est directement dépendante de la taille du pool de lymphocytes T mémoires et la perte de protection est proportionnelle à l'attrition du répertoire lymphocytaire dans les voies respiratoires (Liang et al., 1994; Pizzolla et al., 2017). Dans plusieurs modèles d'infections chroniques comme l'infection par le SIV ou le plasmodium, là aussi, l'importance de la fréquence des LyT CD8 mémoires spécifiques circulants dans l'immunité protectrice est rapportée (Hansen et al., 2009; Schmidt et al., 2008). Bien que cette notion quantitative renforce l'espoir du concept de la vaccination à LyT CD8, l'échec de l'essai STEP dans la prévention de l'infection au VIH rend nécessaire la considération de la qualité et/ou de la distribution anatomique des LyT CD8 mémoires.

### ***Importance de la migration lymphocytaire***

Afin de mieux appréhender la cinétique des réponses T CD8 à l'échelle de l'organisme au cours d'une infection persistante et de façon plus globale, au cours d'une infection virale, il est nécessaire de proposer une lecture des réponses T CD8 qui intègre davantage la fonctionnalité lymphocytaire. Parmi les signaux qui orientent les réponses immunitaires, la capacité des lymphocytes à migrer vers des sites infectés est essentielle à prendre en compte. Les LyT naïfs

## Discussion

---

recirculent constamment entre le compartiment sanguin et les organes lymphoïdes secondaires. Lorsqu'ils sont activés, ils acquièrent rapidement des fonctions effectrices. La principale fonction des LyT effecteurs mise en avant est la capacité à lyser les cellules infectées. Mais cette cytotoxicité nécessite un contact direct avec la cellule cible. Ainsi, un LyT effecteur doit se définir non seulement par ses capacités cytotoxiques mais aussi par son potentiel de migration afin de rendre compte d'une réponse effectrice efficace. De ce fait, intégrer la migration comme marqueur principal de sous-population est pertinent. Cette notion de migration n'est pas totalement omise des stratégies actuelles puisque l'on retrouve le récepteur CCR7 et CD62L pour caractériser les T<sub>CM</sub>/T<sub>EM</sub> ou encore un marqueur de rétention que l'on peut assimiler de façon schématique à de la non-migration avec l'expression de CD69 par les T<sub>RM</sub>. Certaines stratégies plus récentes se sont basées sur les récepteurs aux chimiokines CXCR3, CXCR5 ou encore CX3CR1 pour proposer une lecture des réponses T CD8 (Böttcher et al., 2015; Chu et al., 2016; Gerlach et al., 2016; He et al., 2016).

Le choix des récepteurs aux chimiokines à étudier n'a pas été si simple puisqu'une littérature grandissante concernant les récepteurs aux chimiokines associés aux LyT CD8 existe. La complexité réside dans la spécificité du potentiel de migration selon le récepteur considéré. Les récepteurs CCR4 et CCR10 sont fortement exprimés sur les LyT mémoires de la peau (Reiss et al., 2001), le récepteur CCR9 et l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  sont surtout exprimés par les LyT des sites intestinaux (Lefrançois et al., 1999; Zabel et al., 1999). Les récepteurs CXCR3 et CXCR6 sont quant à eux décrits pour une migration lymphocytaire vers le foie lorsque ce dernier était inflammatoire (Murai et al., 1999; Sato et al., 2005). A l'inverse, l'intégrine CD103 est présentée comme essentielle pour établir la résidence des LyT dans la peau et les sites intestinaux (Mackay et al., 2012; Masopust et al., 2006). S'agissant d'évaluer les réponses T CD8 dans le TA, plusieurs récepteurs aux chimiokines se sont révélés intéressants à étudier. Le premier récepteur envisagé a été CX3CR1 puisqu'il favorise l'attraction des cellules Th1, LyT CD8 mais aussi des macrophages, fractions les plus représentées au sein de la FSV. La signalisation CX3CR1-fractalkine au sein du TA est la plus souvent décrite dans un contexte d'inflammation métabolique puisqu'elle joue un rôle dans le développement des complications inflammatoires induites par l'obésité (Polyák et al., 2014). Mais CX3CR1 est aussi décrit dans des contextes infectieux, et plus précisément dans des contextes de persistance virale. Le deuxième récepteur a été CXCR3 puisque c'est un acteur majeur dans l'activation et le recrutement des LyT (CD4 et CD8) au cours de l'inflammation (Rocha et al., 2014). Mais tout comme CX3CR1, CXCR3 est

également décrit au cours de contextes infectieux et d'infections persistantes (Toxoplasmose par exemple) au cours desquels CXCR3 permet d'identifier une sous-population de maintenance de la mémoire. Dans le contexte de notre étude particulière sur l'infection par le VIH, CXCR3 avait un intérêt particulier puisque IP10, un des ligands de CXCR3, est inversement corrélé à la charge virale plasmatique (Noel et al., 2014). Enfin un troisième récepteur aux chimiokines a été étudié : CXCR5. Ce récepteur est associé au recrutement d'une fraction de LyT CD8, fraction qui dans le contexte de l'infection par le VIH est associée à une réplication virale limitée (He et al., 2016, p. 5; Leong et al., 2016; Perdomo-Celis et al., 2018). Par ailleurs, CXCR5 a aussi un intérêt dans l'étude concernant le TA. En effet, il a été montré une forte production de CXCL13 au cours de l'adipogenèse. L'hypoxie induit l'expression de CXCL13 et CXCR5 et toute inhibition de la signalisation CXCR5-CXCL13 inhibe l'inflammation métabolique. Certains vont même jusqu'à parler d'adipokine au sujet de CXCL13 ce qui renforce l'intérêt d'étude la signalisation CXCR5-CXCL13 (Kusuyama et al., 2019).

Dans notre étude, la caractérisation de l'expression des récepteurs aux chimiokines dans le compartiment sanguin de PVVIH nous a permis d'établir plusieurs conclusions. Tout d'abord, l'application des nouvelles stratégies de caractérisation des réponses T CD8 (CXCR3, CX3CR1 ou CXCR5) ne nous a pas permis de confirmer les données de la littérature dans notre modèle d'infection chronique par le VIH. Nous n'avons pas mis en évidence de sous-population mémoire spécifiquement présente dans le contexte de l'infection chronique par le VIH (CXCR3<sup>int</sup> ou CX3CR1<sup>int</sup> ou CXCR5<sup>+</sup>). Toutefois nous avons pu montrer que le stade de différenciation influençait l'expression des récepteurs aux chimiokines avec une expression constitutive de CXCR3 par les cellules de la mémoire, une expression préférentielle de CXCR5 sur les T<sub>CM</sub> et une expression préférentielle de CX3CR1 par les cellules effectrices. Ceci suggère que l'expression des récepteurs aux chimiokines n'est pas totalement indépendante de leur stade de différenciation. Enfin le potentiel de migration des LyT CD8 est une signalisation complexe et il est probable que l'étude de trois récepteurs aux chimiokines ne soit pas suffisante pour appréhender la question. En analysant l'expression de chacun des trois récepteurs nous n'avons mis en évidence aucune différence liée au contexte de l'infection chronique par le VIH ou le type de contrôle. Ce n'est que la combinaison de l'expression des trois récepteurs qui nous a permis d'observer des différences entre les différents groupes de patients. Cette étude a permis de rendre compte une fois de plus de l'hétérogénéité de la mémoire et de renseigner sur leur capacité de migration jusque-là sous-estimée.

## Discussion

---

En prenant du recul sur cette étude, plusieurs questions se posent. Les résultats mis en évidence dans le contexte de l'infection chronique par le VIH ne sont pas ceux observés dans les autres contextes. Les données de la littérature sont-elles applicables à d'autres modèles que ceux étudiés ? La combinaison de récepteurs doit-elle être réévaluée pour chaque pathogène ? Si c'est le cas, cela rend leur utilisation moins universelle. Envisager une combinaison de récepteurs aux chimiokines qui pourrait refléter le fonctionnement des réponses T semble être un véritable défi compte tenu de la diversité des récepteurs connus, de l'hétérogénéité de diffusion des différents pathogènes.

Les résultats mis en avant au cours de notre étude restent toutefois des informations partielles et ne renseignent pas totalement sur la capacité migratoire des LyT CD8. En effet, nous n'avons principalement évalué l'expression des récepteurs aux chimiokines au travers d'une analyse en cytométrie. C'est une première étape indispensable mais qui ne reflète pas les capacités de migration face aux chimiokines dans un environnement donné. De ce fait, nous avons aussi proposé une lecture des capacités de migration par une analyse *in vitro*, en Transwell. Cette technique possède l'avantage de pouvoir renseigner de la réactivité d'un récepteur quand il est placé face à son ligand. Cependant, même si les conditions choisies ont été réfléchies de façon à représenter la physiologie de notre modèle d'étude, les conditions restent artificielles et nous n'avons pas pu tester toutes les combinaisons/concentrations. Il aurait fallu pouvoir accéder à des analyses *ex-vivo*, plus représentatives des conditions physiologiques, et où il faudrait aussi pouvoir intégrer la complexité de la migration (gradient de ligands, combinaison de ligands, environnement modulable par des organoïdes par exemple).

L'étude de la migration lymphocytaire nous a amenés à nous attarder sur l'analyse des récepteurs aux chimiokines qui concourent à la chimiotaxie. Mais, comme la plupart des processus physiologiques, la migration des LyT n'est pas un processus univoque, il s'agit davantage d'un équilibre entre un phénomène de migration et un phénomène de rétention. Aussi, je souhaiterais aborder ici l'intérêt particulier pour le récepteur CD69 que nous avons largement intégré dans ce travail. S'agissant d'une caractérisation des LyT CD8 de tissus non lymphoïdes, la littérature attribue au CD69 un rôle incontournable dans l'identification de cellules résidentes (Masopust et al., 2010). Des travaux récents réalisés au laboratoire sur du TA de PVVIH a montré que près de 75% des LyT CD4 exprimaient CD69 et que cette expression de CD69 constituait une caractéristique des LyT du TA puisque très peu de LyT CD4 du sang

exprimaient CD69 (Damouche et al., 2017). Les mêmes observations ont été retrouvées dans une analyse encore non publiée sur les LyT CD8 du TA qu'il s'agisse du contexte VIH ou SIV. Dans le contexte de l'infection par le SARS-CoV-2 à l'inverse, les LyT expriment peu CD69. Le phénomène de résidence des LyT a initialement été identifié comme un stade où les LyT sont retenus dans les tissus et ne peuvent pas recirculer (Schenkel et al., 2013). Mais cette notion de résidence stricte marquée par l'expression de CD69 a été récemment rediscutée par l'identification d'une recirculation des  $T_{RM}$  des tissus non lymphoïdes. L'identification de ce profil de migration/résidence a réadressé la pertinence du choix du récepteur CD69 comme unique marqueur de résidence. Depuis, d'autres marqueurs de rétention lymphocytaire ont été décrits, avec des particularités de rétention liées aux tissus. On trouve donc les marqueurs CD103 (principalement retrouvé dans la rétention dans la peau (Floc'h et al., 2007)) ou encore Hobbit, identifié comme marqueur de résidence dans les tissus non lymphoïdes, (Parga-Vidal et al., 2021), Au cours de nos travaux, nous avons pu intégrer CD103 à notre panel de cytométrie. Toutefois, aucune expression franche de CD103 n'a été retrouvée sur les LyT de TA simien. Hobbit n'a pas pu être analysé dans cette étude. En dehors du marqueur de résidence CD69 qui donne une définition imparfaite de la résidence, il est également probable que la résidence soit un phénomène partiel et ne permette qu'une résidence temporaire ce qui pourrait favoriser l'immunosurveillance tissulaire tout en conservant une réponse immunitaire de proximité via les ganglions lymphatiques drainants (Mueller et al., 2013). Cette hypothèse attribuerait un rôle des  $T_{RM}$  aux réponses systémiques qu'il faudrait davantage évaluer. Mais le CD69 n'est pas qu'un marqueur de résidence, c'est aussi un marqueur d'activation lymphocytaire très largement utilisé pour décrire les réponses systémiques (Ziegler et al., 1994). En effet, l'expression de CD69 est rapidement induite à la surface des LyT après engagement du TCR ce qui concourt à la production de cytokines et la prolifération cellulaire. Dans les zones inflammatoires, le CD69 est exprimé sur les LyT, ceci est démontré dans plusieurs contextes inflammatoires chroniques tels que la polyarthrite rhumatoïde ou l'asthme allergique (Afeltra et al., 1993; Julius et al., 1999).

Dans un modèle simien d'infection modérée à SARS-CoV-2, nous avons pu montrer un effondrement de la proportion de LyT (CD4 et CD8) CD69<sup>+</sup> dans le TASC et dans le TAV, 7 jours après l'infection, chez les animaux infectés par comparaison aux animaux non infectés. En revanche, dans le compartiment sanguin, la variation inverse était observée. Les voies de régulation de l'expression de CD69, et la signalisation intracellulaire faisant intervenir le CD69

## **Discussion**

---

n'est pas encore totalement comprise. Aussi, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses face à cette réduction drastique de l'expression de CD69 sur les LyT du TA. Cette observation pourrait traduire un changement majeur du potentiel migratoire des LyT du TA où les LyT du TA pourraient contribuer, par remobilisation, à la restauration du nombre de cellules T dans le sang et à une hyperactivation systémique. Ceci pourrait également participer à la pathogenèse de l'infection. En effet, le blocage de la signalisation CD69, démontrée dans un modèle murin, a permis de mettre en évidence que l'expression de CD69 pouvait moduler la sévérité de différents contextes inflammatoires tels que l'asthme ou encore la clairance des pathogènes (Martín et al., 2010; Vega-Ramos et al., 2010). Enfin, la diminution des proportions de LyT exprimant CD69 peut également refléter des altérations métaboliques des LyT, ce qui a toute son importance dans le TA. Dans un modèle murin de colites induites, le CD69 est associé à la régulation de la balance Th1/Treg au profit du phénotype immuno-régulateur (Radulovic et al., 2012). Enfin un rôle métabolique plus large est attribué au CD69 puisque la signalisation intracellulaire de CD69 montre une implication de la voie de la rapamycine (mTOR) ou encore le facteur HIF-1 $\alpha$  impliqué dans l'activation de l'angiogenèse (Cibrián & Sánchez-Madrid, 2017). Les résultats observés dans le contexte de l'infection par le SARS-CoV-2 associés aux implications variées du CD69, restent encore mal comprises, redonnent de l'importance à la nécessité de comprendre la signalisation CD69 et son implication dans la fonctionnalité des LyT du TA.

### ***Immunité du tissu adipeux***

L'ensemble de ces travaux visait à caractériser les réponses T CD8 du TA et s'intégrait dans un objectif plus large de la compréhension du rôle immunitaire du TA. Ce travail a permis de venir compléter les données de la littérature et nous amène à discuter du potentiel anti-infectieux et la nature exacte de l'activité immunitaire du TA.

Il est désormais admis que le TA est un acteur de la réponse inflammatoire dans un contexte d'obésité. Mais au-delà de son implication dans l'inflammation métabolique, il est aussi impliqué dans les réponses anti-infectieuses avec une susceptibilité accrue à certaines infections dans le contexte d'obésité. L'apport de la composante cellulaire du TA, et en particulier des LyT, au cours des processus infectieux est démontré avec une implication dans une immunosurveillance sur site et de proximité (S.-J. Han et al., 2017; Masopust et al., 2001).

Nos travaux ont permis l'étude des LyT CD8 du TA dans deux contextes infectieux : l'infection chronique par le VIH et l'infection par le SARS-CoV-2.

Dans le modèle de l'infection chronique par le VIH, le TA est décrit comme un réservoir viral (Damouche et al., 2015). Mais le contexte de l'infection par le VIH ne se traduit pas uniquement par une infection des LyT CD4 (et macrophages) du TA il se traduit également par un effet délétère des protéines virales sur les cellules du TA, mais aussi à la toxicité directe des ARV, notamment sur les adipocytes. Parmi les effets indirects liés à l'infection, et suspectés d'être délétères sur le TA, l'inflammation a été évoquée. Toutefois, des données non publiées du laboratoire obtenues dans un modèle simien et visant à comparer le contexte de l'infection chronique par le SIV à des animaux non infectés n'ont pas permis de montrer une inflammation du tissu en se basant sur l'expression d'IL-6. Ces données sont assez surprenantes et viennent réadresser la question d'une inflammation du TA au cours de l'infection. L'ensemble de nos données suggèrent un effet délétère de l'infection par le SIV.

L'objectif de ce travail était davantage centré sur les LyT CD8. L'accès à un modèle infecté traité et infecté non traité n'a pas permis de montrer un effet bénéfique du traitement sur les LyT du TA. L'atteinte de la composante lymphocytaire du TA semble donc persister malgré la mise en place efficace du TARV. Ces données restent à compléter avant de pouvoir conclure à l'impact respectif de l'infection, de l'inflammation systémique observée (même si peu élevée dans les modèles utilisés), et le TARV. Ces données mériteraient aussi d'être complétées par un modèle d'infection aiguë par le SIV, modèle auquel nous n'avons pas accès pour cette étude. Ces données de phase aiguë pourraient renseigner sur la temporalité des altérations lymphocytaires observées. La persistance de ce défaut lymphocytaire dans le TA serait également à mettre en regard des données en sang circulant : le compartiment T CD8 présente également des défauts dans le sang, mais sont-ils comparables à ceux observés dans le TA ? L'analyse en sang circulant ne minore-t-elle pas les défauts du compartiment lymphocytaire T ?

Enfin, l'accumulation des LyT CD8 dans le TA dans le contexte de l'infection chronique doit également être évaluée en termes de répertoire clonal. Afin d'aborder le potentiel anti-infectieux des LyT CD8 du TA, nous avons également pu caractériser le profil de spécificité des LyT CD8 du TA. Dans ce travail préliminaire, ces données observées dans le TA humain nous ont permis de mettre en évidence la présence de LyT CD8 spécifiques du VIH mis aussi ceux d'autres virus tels que le CMV, EBV ou encore Influenza. Ces LyT CD8 ont une activité anti-

## Discussion

---

infectieuse propre, évaluée par ELISPOT IFN- $\gamma$ . Dans le contexte de l'infection par le VIH/SIV, l'équipe a précédemment observé la non-colocalisation des LyT CD4 et T CD8. Comprendre pourquoi les LyT CD8 spécifiques peuvent colocaliser avec les LyT CD4 infectés ou non dans un environnement non inflammatoire, restera à définir dans le futur. Une hypothèse est d'imaginer une organisation structurale du TA conduisant à une distribution différente des LyT CD4 et CD8, à l'image de ce qui est décrit dans les centres germinatifs des ganglions lymphatiques. Dans cette hypothèse, c'est la structure même du tissu qui serait favorable à la persistance du virus. La question du remodelage du TA dans les contextes d'obésité et leurs éventuelles perturbations des mécanismes de migration et de localisation spécifique reste à évaluer.

Dans le modèle de l'infection chronique par le SARS-CoV-2, une étude préalable a pu montrer, post-mortem, la présence du virus dans le TA de patients atteints d'une infection COVID sévère. Notre étude a permis de montrer la présence du virus dans le TA d'animaux infectés et présentant une forme non sévère de la COVID-19. Cette détection du virus a été observée 7 jours après l'infection, aucun virus n'a été détecté dans un délai plus tardif (J43) ce qui suggère une infection transitoire du TA. Ces résultats sont en défaveur de la notion de TA qui serait un site réservoir, mais ces résultats ont été obtenus dans un contexte d'infection modérée sur des animaux femelles, non obèses. Il serait intéressant de poursuivre cette étude sur des animaux obèses et/ou dans des formes plus sévères et de savoir si le virus présent est capable d'infecter d'autres cellules, ce qui ferait du TA, un réservoir viral et qui pourrait expliquer le phénomène de COVID long observé. De manière assez intéressante, malgré une infection systémique peu sévère et une infection transitoire du TA, nous avons observé une altération très marquée des réponses lymphocytaires. Cette diminution drastique de l'expression de CD69 sur les LyT du TA questionne. S'agit-il d'une atteinte *in situ* liée à la présence du virus ou bien d'une contribution des LyT du TA à une réaction inflammatoire systémique ? S'agit-il d'un défaut d'activation ? Quel impact cela a-t-il sur les réponses T ? Il est tentant de penser que le TA vienne contribuer aux réponses systémiques par une mobilisation des réponses locales vers le compartiment circulant.

Enfin de manière plus générale, nos données concourent à renforcer les données sur l'implication du TA dans la réponse immunitaire par sa composante inflammatoire et cellulaire. Au cours de ce travail, nous avons à de nombreuses reprises comparé nos données de modèles infectieux aux données de la littérature qui décrivent largement les réponses lymphocytaires

dans le contexte de l'obésité. Au terme de ce travail, il convient de remettre en question cette comparaison, qui à mon sens, n'est pas totalement adaptée. En dehors de tout contexte pathologique (obésité ou infection), le TA est décrit comme un environnement immunomodulateur avec une prédominance des macrophages de type M2, un ratio CD4/CD8 en faveur des LyT CD4, et une inflammation limitée et contrôlée. Dans le contexte de l'obésité, le TA se caractérise par une infiltration de macrophages pro-inflammatoires de type M1, une infiltration de LyT CD8 et une inflammation locale et systémique et enfin une atteinte de l'architecture même du TA avec le développement de fibrose. Enfin, le contexte de l'infection par le SIV se définit davantage par une infiltration limitée de macrophages de type M1, une infiltration de LyT CD8, une inflammation présente mais limitée et le développement d'une fibrose. Ces dernières données suggèrent une atteinte des réponses T CD8 du TA dans un contexte infectieux.

### **Conclusion et perspectives**

Le rôle des LyT CD8 tissulaires, et en particulier du TA, au cours de pathologies infectieuses bénéficie d'une attention croissante. Alors que leur caractérisation phénotypique et fonctionnelle est surtout décrite dans le contexte de l'obésité, le rôle des LyT CD8 du TA au cours d'infections reste à étudier de façon plus approfondie.

Si le rôle immuno-protecteur des LyT CD8 du TA, décrit par Han et al dans le contexte de l'infection létale à yersinia, est applicable à l'ensemble des contextes infectieux, alors le TA se placerait comme un acteur indispensable de la réponse immunitaire quel que soit le contexte infectieux. A ce jour, une vraie problématique se pose : comment expliquer la colocalisation des LyT CD8 et des cellules infectées au sein du tissu ? Est-ce le signe d'une réponse immunitaire défaillante localement ? Est-ce lié à un phénomène d'ignorance, qui pourrait être liée à la structure du TA, ne permettant pas ou peu d'interactions directes CD4/CD8 dans le TA ? Est-ce une caractéristique intrinsèque des LyT CD8 du TA ? L'environnement adipeux semble pouvoir moduler les propriétés des LyT CD8 par de multiples facteurs (cytokines, métabolites, cellules environnantes), cependant celui n'est sans doute pas irrémédiablement immunosuppresseur puisque certains LyT CD8 à capacités effectrices protectrices sont observés dans le TA métaboliquement sain. La nature de la modulation que l'environnement adipeux pourrait induire sur les voies métaboliques mériterait d'être plus finement détaillée (une étude en collaboration avec l'équipe du Pr C Junot, spécialiste en

## Discussion

---

métabolomique/lipidomique est initiée dans l'équipe). Est-ce un défaut de migration des LyT CD8 du TA ? Nos résultats n'ont pas permis une analyse fine du potentiel de migration des LyT CD8 du TA par comparaison aux LyT CD4. Nous avons pu analyser leur potentiel de migration *in vitro*, à travers une analyse en Transwell pour laquelle nous avons bénéficié de l'expertise de l'équipe d'Immunorégulation, Chimioquinas et Persistance Virale du Dr F. Bachelerie, U996. Ces tests pourront être complétés par une analyse sur explants, *ex vivo*, de TASC, TAV et ganglions de proximité par technologie de microscopie confocale. Cette technique a l'avantage de pouvoir évaluer le profil migratoire de LyT marqués, dans leur environnement structurel, le TA. Enfin, une étude de la dynamique de la mobilisation des LyT du TA avec l'impact de la fibrose sur la mobilité des LyT CD8 du TA pourront être envisagés.

En perspectives de ce travail, plusieurs ouvertures peuvent être envisagées. Nous avons noté en introduction que la SVF du TA comprend presque toutes les cellules immunitaires. C'est pourquoi une caractérisation des autres sous-populations reste à poursuivre. Au cours de l'infection par le SARS-CoV-2, une analyse des macrophages aurait été appréciée afin de connaître leur contribution dans l'inflammation systémique. Au cours de l'infection par le VIH/SIV, le rôle de la lignée monocyttaire macrophagique est fondamental, une caractérisation des réponses phénotypiques mais surtout fonctionnelles aux sites de persistance virales et leurs implications dans les comorbidités rend leur analyse pertinente.

Enfin, la diversité des altérations du TA touchant les fonctions métaboliques, régénératives et immunitaires du TA amène à réfléchir aux stratégies thérapeutiques de complément qui seraient susceptibles de restaurer les fonctions du TA.

# ***BIBLIOGRAPHIE***

---



- Acedo, S. C., Gambero, S., Cunha, F. G. P., Lorand-Metze, I., & Gambero, A. (2013). Participation of leptin in the determination of the macrophage phenotype: An additional role in adipocyte and macrophage crosstalk. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 49(6), 473-478. <https://doi.org/10.1007/s11626-013-9629-x>
- Achar, S. R., Bourassa, F. X. P., Rademaker, T. J., Lee, A., Kondo, T., Salazar-Cavazos, E., Davies, J. S., Taylor, N., François, P., & Altan-Bonnet, G. (2022). Universal antigen encoding of T cell activation from high-dimensional cytokine dynamics. *Science*, 376(6595), 880-884. <https://doi.org/10.1126/science.abl5311>
- Acosta, J. R., Douagi, I., Andersson, D. P., Bäckdahl, J., Rydén, M., Arner, P., & Laurencikiene, J. (2016). Increased fat cell size: A major phenotype of subcutaneous white adipose tissue in non-obese individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 59(3), 560-570. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3810-6>
- Afeltra, A., Galeazzi, M., Ferri, G. M., Amoroso, A., De Pita, O., Porzio, F., & Bonomo, L. (1993). Expression of CD69 antigen on synovial fluid T cells in patients with rheumatoid arthritis and other chronic synovitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 52(6), 457-460. <https://doi.org/10.1136/ard.52.6.457>
- Ahmed, R., & Gray, D. (1996). Immunological Memory and Protective Immunity: Understanding Their Relation. *Science*, 272(5258), 54-60. <https://doi.org/10.1126/science.272.5258.54>
- Anaya, D. A., & Dellinger, E. P. (2006). The Obese Surgical Patient: A Susceptible Host for Infection. *Surgical Infections*, 7(5), 473-480. <https://doi.org/10.1089/sur.2006.7.473>
- Aouadi, M., Vangala, P., Yawe, J. C., Tencerova, M., Nicoloso, S. M., Cohen, J. L., Shen, Y., & Czech, M. P. (2014). Lipid storage by adipose tissue macrophages regulates systemic glucose tolerance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 307(4), E374-E383. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00187.2014>
- Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G. M. A., Papagno, L., Ogg, G. S., King, A., Lechner, F., Spina, C. A., Little, S., Havlir, D. V., Richman, D. D., Gruener, N., Pape, G., Waters, A., Easterbrook, P., Salio, M., Cerundolo, V., ... Rowland-Jones, S. L. (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medicine*, 8(4), 379-385. <https://doi.org/10.1038/nm0402-379>
- Arita, Y. (2012). Reprint of "Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(3), 560-564. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.024>
- Autran, B., Carcelain, G., Li, T. S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., Katlama, C., Debré, P., & Leibowitch, J. (1997). Positive Effects of Combined Antiretroviral Therapy on CD4 + T Cell Homeostasis and Function in Advanced HIV Disease. *Science*, 277(5322), 112-116. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.112>
- Ayari, A., Rosa-Calatrava, M., Lancel, S., Barthelemy, J., Pizzorno, A., Mayeuf-Louchart, A., Baron, M., Hot, D., Deruyter, L., Soulard, D., Julien, T., Faveeuw, C., Molendi-Coste, O., Dombrowicz, D., Sedano, L., Sencio, V., Le Goffic, R., Trottein, F., & Wolowczuk, I. (2020). Influenza infection rewires energy metabolism and induces browning features in adipose cells and tissues. *Communications Biology*, 3(1), 237-237. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0965-6>
- Bachmann, M. F., Wolint, P., Schwarz, K., Jäger, P., & Oxenius, A. (2005). Functional Properties and Lineage Relationship of CD8 + T Cell Subsets Identified by Expression of IL-7 Receptor  $\alpha$  and CD62L. *The Journal of Immunology*, 175(7), 4686-4696. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4686>

- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., & Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, *439*(7077), 682-687. <https://doi.org/10.1038/nature04444>
- Basolo, A., Poma, A. M., Bonuccelli, D., Proietti, A., Macerola, E., Ugolini, C., Torregrossa, L., Giannini, R., Vignali, P., Basolo, F., Santini, F., & Toniolo, A. (2022). Adipose tissue in COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 in adipocytes and activation of the interferon-alpha response. *Journal of Endocrinological Investigation*. <https://doi.org/10.1007/s40618-022-01742-5>
- Beaupere, C., Garcia, M., Larghero, J., Fève, B., Capeau, J., & Lagathu, C. (2015). The HIV proteins Tat and Nef promote human bone marrow mesenchymal stem cell senescence and alter osteoblastic differentiation. *Aging Cell*, *14*(4), 534-546. <https://doi.org/10.1111/ace1.12308>
- Beigier-Bompadre, M., Montagna, G. N., Köhl, A. A., Lozza, L., Weiner, J., Kupz, A., Vogelzang, A., Mollenkopf, H.-J., Löwe, D., Bandermann, S., Dorhoi, A., Brinkmann, V., Matuschewski, K., & Kaufmann, S. H. E. (2017). Mycobacterium tuberculosis infection modulates adipose tissue biology. *PLOS Pathogens*, *13*(10), e1006676. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006676>
- Berhanu, D., Mortari, F., De Rosa, S. C., & Roederer, M. (2003). Optimized lymphocyte isolation methods for analysis of chemokine receptor expression. *Journal of Immunological Methods*, *279*(1-2), 199-207. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00186-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00186-8)
- Beura, L. K., Wijeyesinghe, S., Thompson, E. A., Macchietto, M. G., Rosato, P. C., Pierson, M. J., Schenkel, J. M., Mitchell, J. S., Vezys, V., Fife, B. T., Shen, S., & Masopust, D. (2018). T Cells in Nonlymphoid Tissues Give Rise to Lymph-Node-Resident Memory T Cells. *Immunity*, *48*(2), 327-338.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.015>
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y.-C. E., Mathison, J., Ulevitch, R., & Cerami, A. (1985). Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*, *316*(6028), 552-554. <https://doi.org/10.1038/316552a0>
- Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., Betts, M. R., Freeman, G. J., Vignali, D. A. A., & Wherry, E. J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology*, *10*(1), 29-37. <https://doi.org/10.1038/ni.1679>
- Bogner, J. R., Vielhauer, V., Beckmann, R. A., Michl, G., Wille, L., Salzberger, B., & Goebel, F.-D. (2001). Stavudine Versus Zidovudine and the Development of Lipodystrophy: *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, *27*(3), 237-244. <https://doi.org/10.1097/00126334-200107010-00004>
- Bose, A., Guilherme, A., Robida, S. I., Nicoloso, S. M. C., Zhou, Q. L., Jiang, Z. Y., Pomerleau, D. P., & Czech, M. P. (2002). Glucose transporter recycling in response to insulin is facilitated by myosin Myo1c. *Nature*, *420*(6917), 821-824. <https://doi.org/10.1038/nature01246>
- Böttcher, J. P., Beyer, M., Meissner, F., Abdullah, Z., Sander, J., Höchst, B., Eickhoff, S., Rieckmann, J. C., Russo, C., Bauer, T., Flecken, T., Giesen, D., Engel, D., Jung, S., Busch, D. H., Protzer, U., Thimme, R., Mann, M., Kurts, C., ... Knolle, P. A. (2015). Functional classification of memory CD8(+) T cells by CX3CR1 expression. *Nature Communications*, *6*, 8306. <https://doi.org/10.1038/ncomms9306>
- Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., & Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and

- Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15(6), 641-648. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>
- Bourlier, V., Zakaroff-Girard, A., Miranville, A., De Barros, S., Maumus, M., Sengenès, C., Galitzky, J., Lafontan, M., Karpe, F., Frayn, K. N., & Bouloumié, A. (2008). Remodeling Phenotype of Human Subcutaneous Adipose Tissue Macrophages. *Circulation*, 117(6), 806-815. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.724096>
- Bourry, O., Mannioui, A., Sellier, P., Roucairol, C., Durand-Gasselín, L., Dereuddre-Bosquet, N., Benech, H., Roques, P., & Le Grand, R. (2010). Effect of a short-term HAART on SIV load in macaque tissues is dependent on time of initiation and antiviral diffusion. *Retrovirology*, 7(1), 78. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-78>
- Boustany, C. M., Bharadwaj, K., Daugherty, A., Brown, D. R., Randall, D. C., & Cassis, L. A. (2004). Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(4), R943-R949. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00265.2004>
- Bouwman, J. J. M., Visseren, F. L. J., Bouter, K. P., & Diepersloot, R. J. A. (2008). Infection-induced inflammatory response of adipocytes in vitro. *International Journal of Obesity*, 32(6), 892-901. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.36>
- Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., & Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.003>
- Breen, J. D., & Karchmer, A. W. (1995). Staphylococcus aureus infections in diabetic patients. *Infectious Disease Clinics of North America*, 9(1), 11-24.
- Brestoff, J. R., & Artis, D. (2015). Immune Regulation of Metabolic Homeostasis in Health and Disease. *Cell*, 161(1), 146-160. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.022>
- Buggert, M., Nguyen, S., Salgado-Montes de Oca, G., Bengsch, B., Darko, S., Ransier, A., Roberts, E. R., del Alcazar, D., Brody, I. B., Vella, L. A., Beura, L., Wijeyesinghe, S., Herati, R. S., Del Rio Estrada, P. M., Ablanado-Terrazas, Y., Kuri-Cervantes, L., Sada Japp, A., Manne, S., Vartanian, S., ... Betts, M. R. (2018). Identification and characterization of HIV-specific resident memory CD8<sup>+</sup> T cells in human lymphoid tissue. *Science Immunology*, 3(24), eaar4526. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar4526>
- Camhi, S. M., Bray, G. A., Bouchard, C., Greenway, F. L., Johnson, W. D., Newton, R. L., Ravussin, E., Ryan, D. H., Smith, S. R., & Katzmarzyk, P. T. (2011). The Relationship of Waist Circumference and BMI to Visceral, Subcutaneous, and Total Body Fat: Sex and Race Differences. *Obesity*, 19(2), 402-408. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.248>
- Cancello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J. L., Hugol, D., Coussieu, C., Basdevant, A., Hen, A. B., Bedossa, P., Guerre-Millo, M., & Clément, K. (2006). Increased Infiltration of Macrophages in Omental Adipose Tissue Is Associated With Marked Hepatic Lesions in Morbid Human Obesity. *Diabetes*, 55(6), 1554-1561. <https://doi.org/10.2337/db06-0133>
- Capeau, J., Vigouroux, C., Magré, J., Lascols, O., Caron, M., & Bastard, J.-P. (2006). Les syndromes lipodystrophiques: Des adipopathies congénitales ou acquises. *Comptes Rendus Biologies*, 329(8), 639-652. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.11.008>
- Carbone, F., La Rocca, C., & Matarese, G. (2012). Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie*, 94(10), 2082-2088. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.05.018>
- Cariou, B., Hadjadj, S., Wargny, M., Pichelin, M., Al-Salameh, A., Allix, I., Amadou, C., Arnault, G., Baudoux, F., Bauduceau, B., Borot, S., Bourgeon-Ghittori, M., Bourron, O., Boutoille, D.,

- Cazenave-Roblot, F., Chaumeil, C., Cosson, E., Coudol, S., Darmon, P., ... for the CORONADO investigators. (2020). Phenotypic characteristics and prognosis of inpatients with COVID-19 and diabetes: The CORONADO study. *Diabetologia*, 63(8), 1500-1515. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05180-x>
- Caron, M., Auclair, M., Sterlingot, H., Kornprobst, M., & Capeau, J. (2003). Some HIV protease inhibitors alter lamin A/C maturation and stability, SREBP-1 nuclear localization and adipocyte differentiation: *AIDS*, 17(17), 2437-2444. <https://doi.org/10.1097/00002030-200311210-00005>
- Caron-Debarle, M., Lagathu, C., Boccara, F., Vigouroux, C., & Capeau, J. (2010). HIV-associated lipodystrophy: From fat injury to premature aging. *Trends in Molecular Medicine*, 16(5), 218-229. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.002>
- Champagne, P., Ogg, G. S., King, A. S., Knabenhans, C., Ellefsen, K., Nobile, M., Appay, V., Rizzardi, G. P., Fleury, S., Lipp, M., Förster, R., Rowland-Jones, S., Sékaly, R.-P., McMichael, A. J., & Pantaleo, G. (2001). Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature*, 410(6824), 106-111. <https://doi.org/10.1038/35065118>
- Charrière, G., Cousin, B., Arnaud, E., André, M., Bacou, F., Pénicaud, L., & Casteilla, L. (2003). Preadipocyte Conversion to Macrophage. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9850-9855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210811200>
- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: A descriptive study. *The Lancet*, 395(10223), 507-513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
- Cheuk, S., Schlums, H., Gallais Sérézal, I., Martini, E., Chiang, S. C., Marquardt, N., Gibbs, A., Detlofsson, E., Introvini, A., Forkel, M., Höög, C., Tjernlund, A., Michaëlsson, J., Folkersen, L., Mjösberg, J., Blomqvist, L., Ehrström, M., Stähle, M., Bryceson, Y. T., & Eidsmo, L. (2017). CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8 + T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin. *Immunity*, 46(2), 287-300. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.009>
- Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>
- Choi, I. K., & Hyun, S. (2012). Conserved microRNA miR-8 in fat body regulates innate immune homeostasis in Drosophila. *Developmental & Comparative Immunology*, 37(1), 50-54. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.12.008>
- Chu, H. H., Chan, S.-W., Gosling, J. P., Blanchard, N., Tsitsiklis, A., Lythe, G., Shastri, N., Molina-París, C., & Robey, E. A. (2016). Continuous Effector CD8(+) T Cell Production in a Controlled Persistent Infection Is Sustained by a Proliferative Intermediate Population. *Immunity*, 45(1), 159-171. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.013>
- Chun, T.-W., Stuyver, L., Mizell, S. B., Ehler, L. A., Mican, J. A. M., Baseler, M., Lloyd, A. L., Nowak, M. A., & Fauci, A. S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(24), 13193-13197. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13193>
- Chung, K.-J., Nati, M., Chavakis, T., & Chatzigeorgiou, A. (2018). Innate immune cells in the adipose tissue. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 19(4), 283-292. <https://doi.org/10.1007/s11154-018-9451-6>

- Cibrián, D., & Sánchez-Madrid, F. (2017). CD69: From activation marker to metabolic gatekeeper. *European Journal of Immunology*, 47(6), 946-953. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*, 46(11), 2347-2355. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200>
- Cipolletta, D., Feuerer, M., Li, A., Kamei, N., Lee, J., Shoelson, S. E., Benoist, C., & Mathis, D. (2012). PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature*, 486(7404), 549-553. <https://doi.org/10.1038/nature11132>
- Coleman, C. M., & Wu, L. (2009). HIV interactions with monocytes and dendritic cells: Viral latency and reservoirs. *Retrovirology*, 6(1), 51. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-51>
- Collins, D. R., Gaiha, G. D., & Walker, B. D. (2020). CD8+ T cells in HIV control, cure and prevention. *Nature Reviews Immunology*, 20(8), 471-482. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0274-9>
- Combadière, B., Faure, S., Autran, B., Debré, P., & Combadière, C. (2003). The chemokine receptor CX3CR1 controls homing and anti-viral potencies of CD8 effector-memory T lymphocytes in HIV-infected patients: *AIDS*, 17(9), 1279-1290. <https://doi.org/10.1097/00002030-200306130-00002>
- Combadiere, C., Salzwedel, K., Smith, E. D., Tiffany, H. L., Berger, E. A., & Murphy, P. M. (1998). Identification of CX 3CR1. *Journal of Biological Chemistry*, 273(37), 23799-23804. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.23799>
- Combs, T. P., Nagajyothi, Mukherjee, S., de Almeida, C. J. G., Jelicks, L. A., Schubert, W., Lin, Y., Jayabalan, D. S., Zhao, D., Braunstein, V. L., Landskroner-Eiger, S., Cordero, A., Factor, S. M., Weiss, L. M., Lisanti, M. P., Tanowitz, H. B., & Scherer, P. E. (2005). The Adipocyte as an Important Target Cell for Trypanosoma cruzi Infection. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 24085-24094. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412802200>
- Cook, K., Min, H., Johnson, D., Chaplinsky, R., Flier, J., Hunt, C., & Spiegelman, B. (1987). Adipsin: A circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science*, 237(4813), 402-405. <https://doi.org/10.1126/science.3299705>
- Corrales-Medina, V. F., Serpa, J., Rueda, A. M., Giordano, T. P., Bozkurt, B., Madjid, M., Tweardy, D., & Musher, D. M. (2009). Acute Bacterial Pneumonia is Associated With the Occurrence of Acute Coronary Syndromes. *Medicine*, 88(3), 154-159. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3181a692f0>
- Cousens, L. P., Peterson, R., Hsu, S., Dorner, A., Altman, J. D., Ahmed, R., & Biron, C. A. (1999). Two Roads Diverged: Interferon  $\alpha/\beta$ - and Interleukin 12-mediated Pathways in Promoting T Cell Interferon  $\gamma$  Responses during Viral Infection. *Journal of Experimental Medicine*, 189(8), 1315-1328. <https://doi.org/10.1084/jem.189.8.1315>
- Couturier, J., Suliburk, J. W., Brown, J. M., Luke, D. J., Agarwal, N., Yu, X., Nguyen, C., Iyer, D., Kozinets, C. A., Overbeek, P. A., Metzker, M. L., Balasubramanyam, A., & Lewis, D. E. (2015). Human adipose tissue as a reservoir for memory CD4+ T cells and HIV: *AIDS*, 29(6), 667-674. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000599>
- Couturier, J., Winchester, L. C., Suliburk, J. W., Wilkerson, G. K., Podany, A. T., Agarwal, N., Xuan Chua, C. Y., Nehete, P. N., Nehete, B. P., Grattoni, A., Sastry, K. J., Fletcher, C. V., Lake, J. E., Balasubramanyam, A., & Lewis, D. E. (2018). Adipocytes impair efficacy of antiretroviral therapy. *Antiviral Research*, 154, 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.04.002>

- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D., & Low, M. J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, *411*(6836), 480-484. <https://doi.org/10.1038/35078085>
- Dalgleish, A. G., Beverley, P. C. L., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., & Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, *312*(5996), 763-767. <https://doi.org/10.1038/312763a0>
- Damouche, A., Lazure, T., Avettand-Fènoël, V., Huot, N., Dejuq-Rainsford, N., Satie, A.-P., Mélard, A., David, L., Gommet, C., Ghosn, J., Noel, N., Pourcher, G., Martinez, V., Benoist, S., Béréziat, V., Cosma, A., Favier, B., Vaslin, B., Rouzioux, C., ... Bourgeois, C. (2015). Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection. *PLOS Pathogens*, *11*(9), e1005153. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005153>
- Damouche, A., Pourcher, G., Pourcher, V., Benoist, S., Busson, E., Lataillade, J.-J., Le Van, M., Lazure, T., Adam, J., Favier, B., Vaslin, B., Müller-Trutwin, M., Lambotte, O., & Bourgeois, C. (2017). High proportion of PD-1-expressing CD4+T cells in adipose tissue constitutes an immunomodulatory microenvironment that may support HIV persistence. *European Journal of Immunology*, *47*(12), 2113-2123. <https://doi.org/10.1002/eji.201747060>
- De Miguel, M., Fuentes-Julian, S., Blazquez-Martinez, A., Y. Pascual, C., A. Aller, M., Arias, J., & Arnalich-Montiel, F. (2012). Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications. *Current Molecular Medicine*, *12*(5), 574-591. <https://doi.org/10.2174/156652412800619950>
- Deng, T., Lyon, C. J., Minze, L. J., Lin, J., Zou, J., Liu, J. Z., Ren, Y., Yin, Z., Hamilton, D. J., Reardon, P. R., Sherman, V., Wang, H. Y., Phillips, K. J., Webb, P., Wong, S. T. C., Wang, R., & Hsueh, W. A. (2013). Class II Major Histocompatibility Complex Plays an Essential Role in Obesity-Induced Adipose Inflammation. *Cell Metabolism*, *17*(3), 411-422. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.02.009>
- Després, J. (2006). Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Annals of Medicine*, *38*(1), 52-63. <https://doi.org/10.1080/07853890500383895>
- Diraison, F., Dusserre, E., Vidal, H., Sothier, M., & Beylot, M. (2002). Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *282*(1), E46-E51. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2002.282.1.E46>
- Divoux, A., Tordjman, J., Lacasa, D., Veyrie, N., Hugol, D., Aissat, A., Basdevant, A., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Zucker, J.-D., Bedossa, P., & Clément, K. (2010). Fibrosis in Human Adipose Tissue: Composition, Distribution, and Link With Lipid Metabolism and Fat Mass Loss. *Diabetes*, *59*(11), 2817-2825. <https://doi.org/10.2337/db10-0585>
- Djedaini, M., Peraldi, P., Drici, M.-D., Darini, C., Saint-Marc, P., Dani, C., & Ladoux, A. (2009). Lopinavir co-induces insulin resistance and ER stress in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *386*(1), 96-100. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.148>
- Donnelly, R. P., & Finlay, D. K. (2015). Glucose, glycolysis and lymphocyte responses. *Molecular Immunology*, *68*(2), 513-519. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.034>
- Dufour, J. H., Dziejman, M., Liu, M. T., Leung, J. H., Lane, T. E., & Luster, A. D. (2002). IFN- $\gamma$ -Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking. *The Journal of Immunology*, *168*(7), 3195-3204. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3195>

- Dupin, N., Buffet, M., Marcelin, A.-G., Lamotte, C., Gorin, I., Ait-Arkoub, Z., Tréluyer, J.-M., Bui, P., Calvez, V., & Peytavin, G. (2002). HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV-infected patients with lipodystrophy: *AIDS*, *16*(18), 2419-2424. <https://doi.org/10.1097/00002030-200212060-00006>
- Eichinger, S., Hron, G., Bialonczyk, C., Hirschl, M., Minar, E., Wagner, O., Heinze, G., & Kyrle, P. A. (2008). Overweight, obesity, and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Archives of Internal Medicine*, *168*(15), 1678-1683. <https://doi.org/10.1001/archinte.168.15.1678>
- Engeli, S., Böhnke, J., Gorzelniak, K., Janke, J., Schling, P., Bader, M., Luft, F. C., & Sharma, A. M. (2005). Weight Loss and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Hypertension*, *45*(3), 356-362. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000154361.47683.d3>
- Engeli, S., Negrel, R., & Sharma, A. M. (2000). Physiology and Pathophysiology of the Adipose Tissue Renin-Angiotensin System. *Hypertension*, *35*(6), 1270-1277. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.35.6.1270>
- Faggioni, R., Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2001). Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition<sup>1</sup>. *The FASEB Journal*, *15*(14), 2565-2571. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0431rev>
- Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P., & 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*(5), 2273-2282. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1336>
- Fantuzzi, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *115*(5), 911-919. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.02.023>
- Farer, L. S., Lowell, A. M., & Meador, M. P. (1979). EXTRAPULMONARY TUBERCULOSIS IN THE UNITED STATES<sup>1</sup>. *American Journal of Epidemiology*, *109*(2), 205-217. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112675>
- Farmer, S. R. (2005). Regulation of PPAR $\gamma$  activity during adipogenesis. *International Journal of Obesity*, *29*(S1), S13-S16. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802907>
- Feuerer, M., Herrero, L., Cippolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A. B., Benoist, C., Shoelson, S., & Mathis, D. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature Medicine*, *15*(8), 930-939. <https://doi.org/10.1038/nm.2002>
- Fisher-Hoch, S. P., Mathews, C. E., & McCormick, J. B. (2013). Obesity, diabetes and pneumonia: The menacing interface of non-communicable and infectious diseases. *Tropical Medicine & International Health*, *18*(12), 1510-1519. <https://doi.org/10.1111/tmi.12206>
- Flaherty, S. E., Grijalva, A., Xu, X., Ables, E., Nomani, A., & Ferrante, A. W. (2019). A lipase-independent pathway of lipid release and immune modulation by adipocytes. *Science*, *363*(6430), 989-993. <https://doi.org/10.1126/science.aaw2586>
- Floc'h, A. L., Jalil, A., Vergnon, I., Chansac, B. L. M., Lazar, V., Bismuth, G., Chouaib, S., & Mami-Chouaib, F. (2007). AE $\beta$ 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *Journal of Experimental Medicine*, *204*(3), 559-570. <https://doi.org/10.1084/jem.20061524>
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Immunology*, *4*(4), 330-336. <https://doi.org/10.1038/ni904>

- Frączek, A., Owczarczyk-Saczonek, A., & Placek, W. (2020). The Role of TRM Cells in the Pathogenesis of Vitiligo—A Review of the Current State-Of-The-Art. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3552. <https://doi.org/10.3390/ijms21103552>
- Francisco, V., Pino, J., Campos-Cabaleiro, V., Ruiz-Fernández, C., Mera, A., Gonzalez-Gay, M. A., Gómez, R., & Gualillo, O. (2018). Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. *Frontiers in Physiology*, 9, 640. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00640>
- Franke-Fayard, B., Fonager, J., Braks, A., Khan, S. M., & Janse, C. J. (2010). Sequestration and Tissue Accumulation of Human Malaria Parasites: Can We Learn Anything from Rodent Models of Malaria? *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001032. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001032>
- Franke-Fayard, B., Janse, C. J., Cunha-Rodrigues, M., Ramesar, J., Büscher, P., Que, I., Löwik, C., Voshol, P. J., den Boer, M. A. M., van Duinen, S. G., Febbraio, M., Mota, M. M., & Waters, A. P. (2005). Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(32), 11468-11473. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503386102>
- Fraticelli, P., Sironi, M., Bianchi, G., D'Ambrosio, D., Albanesi, C., Stoppacciaro, A., Chieppa, M., Allavena, P., Ruco, L., Girolomoni, G., Sinigaglia, F., Vecchi, A., & Mantovani, A. (2001). Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *Journal of Clinical Investigation*, 107(9), 1173-1181. <https://doi.org/10.1172/JCI11517>
- Freemerman, A. J., Johnson, A. R., Sacks, G. N., Milner, J. J., Kirk, E. L., Troester, M. A., Macintyre, A. N., Goraksha-Hicks, P., Rathmell, J. C., & Makowski, L. (2014). Metabolic Reprogramming of Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 289(11), 7884-7896. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.522037>
- Fried, S. K., Bunkin, D. A., & Greenberg, A. S. (1998). Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid<sup>1</sup>. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(3), 847-850. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.3.4660>
- Fromentin, R., Bakeman, W., Lawani, M. B., Khoury, G., Hartogensis, W., DaFonseca, S., Killian, M., Epling, L., Hoh, R., Sinclair, E., Hecht, F. M., Bacchetti, P., Deeks, S. G., Lewin, S. R., Sékaly, R.-P., & Chomont, N. (2016). CD4<sup>+</sup> T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLOS Pathogens*, 12(7), e1005761. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005761>
- Fuhrman, C., Bonmarin, I., Paty, A. C., Duport, N., Chiron, E., Lucas, E., Bitar, D., Mailles, A., Herida, M., Vaux, S., & Lévy-Bruhl, D. (2010). Severe hospitalised 2009 pandemic influenza A(H1N1) cases in France, 1 July-15 November 2009. *Eurosurveillance*, 15(2). <https://doi.org/10.2807/ese.15.02.19463-en>
- Furuhashi, M., Ura, N., Takizawa, H., Yoshida, D., Moniwa, N., Murakami, H., Higashiura, K., & Shimamoto, K. (2004). Blockade of the renin-angiotensin system decreases adipocyte size with improvement in insulin sensitivity: *Journal of Hypertension*, 22(10), 1977-1982. <https://doi.org/10.1097/00004872-200410000-00021>
- Gaide, O., Emerson, R. O., Jiang, X., Gulati, N., Nizza, S., Desmarais, C., Robins, H., Krueger, J. G., Clark, R. A., & Kupper, T. S. (2015). Common clonal origin of central and resident memory T cells following skin immunization. *Nature Medicine*, 21(6), 647-653. <https://doi.org/10.1038/nm.3860>
- Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology*, 12(11), 1035-1044. <https://doi.org/10.1038/ni.2109>

- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C. M., Quigley, M. F., Almeida, J. R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., Wang, E., Douek, D. C., Price, D. A., June, C. H., Marincola, F. M., Roederer, M., & Restifo, N. P. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine*, *17*(10), 1290-1297. <https://doi.org/10.1038/nm.2446>
- Gealekman, O., Guseva, N., Hartigan, C., Apothecker, S., Gorgoglione, M., Gurav, K., Tran, K.-V., Straubhaar, J., Nicoloso, S., Czech, M. P., Thompson, M., Perugini, R. A., & Corvera, S. (2011). Depot-specific differences and insufficient subcutaneous adipose tissue angiogenesis in human obesity. *Circulation*, *123*(2), 186-194. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.970145>
- Gebhardt, T., Wakim, L. M., Eidsmo, L., Reading, P. C., Heath, W. R., & Carbone, F. R. (2009). Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nature Immunology*, *10*(5), 524-530. <https://doi.org/10.1038/ni.1718>
- Gerlach, C., Moseman, E. A., Loughhead, S. M., Alvarez, D., Zwijnenburg, A. J., Waanders, L., Garg, R., de la Torre, J. C., & von Andrian, U. H. (2016). The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis. *Immunity*, *45*(6), 1270-1284. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.018>
- Giacchetti, G., Faloia, E., Sardu, C., Camilloni, M., Mariniello, B., Gatti, C., Garrapa, G., Guerrieri, M., & Mantero, F. (2000). Gene expression of angiotensinogen in adipose tissue of obese patients. *International Journal of Obesity*, *24*(S2), S142-S143. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801305>
- Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2014). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *European Journal of Endocrinology*, *170*(5), R159-R171. <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0945>
- Giralt, M., Domingo, P., & Villarroya, F. (2011). Adipose tissue biology and HIV-infection. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *25*(3), 487-499. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.12.001>
- Gordon, S. (2007). Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(1), 1-4. <https://doi.org/10.1172/JCI30992>
- Gorwood, J., Bourgeois, C., Mantecon, M., Atlan, M., Pourcher, V., Pourcher, G., Le Grand, R., Desjardins, D., Fève, B., Lambotte, O., Capeau, J., Béréziat, V., & Lagathu, C. (2019). Impact of HIV/simian immunodeficiency virus infection and viral proteins on adipose tissue fibrosis and adipogenesis: *AIDS*, *33*(6), 953-964. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002168>
- Griffith, J. W., Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2014). Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annual Review of Immunology*, *32*(1), 659-702. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>
- Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S. I., Mateus, J., Dan, J. M., Moderbacher, C. R., Rawlings, S. A., Sutherland, A., Premkumar, L., Jadi, R. S., Marrama, D., de Silva, A. M., Frazier, A., Carlin, A. F., Greenbaum, J. A., Peters, B., Krammer, F., Smith, D. M., Crotty, S., & Sette, A. (2020). Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*, *181*(7), 1489-1501.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
- Guan, W., Ni, Z., Hu, Y., Liang, W., Ou, C., He, J., Liu, L., Shan, H., Lei, C., Hui, D. S. C., Du, B., Li, L., Zeng, G., Yuen, K.-Y., Chen, R., Tang, C., Wang, T., Chen, P., Xiang, J., ... Zhong, N. (2020).

- Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, 382(18), 1708-1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>
- Guerra, S., Sherrill, D. L., Bobadilla, A., Martinez, F. D., & Barbee, R. A. (2002). The Relation of Body Mass Index to Asthma, Chronic Bronchitis, and Emphysema. *Chest*, 122(4), 1256-1263. <https://doi.org/10.1378/chest.122.4.1256>
- Hamilton, J. A., & Kamp, F. (1999). How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes*, 48(12), 2255-2269. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.12.2255>
- Han, M. S., White, A., Perry, R. J., Camporez, J.-P., Hidalgo, J., Shulman, G. I., & Davis, R. J. (2020). Regulation of adipose tissue inflammation by interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(6), 2751-2760. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920004117>
- Han, S.-J., Glatman Zaretsky, A., Andrade-Oliveira, V., Collins, N., Dzutsev, A., Shaik, J., Morais da Fonseca, D., Harrison, O. J., Tamoutounour, S., Byrd, A. L., Smelkinson, M., Bouladoux, N., Bliska, J. B., Brenchley, J. M., Brodsky, I. E., & Belkaid, Y. (2017). White Adipose Tissue Is a Reservoir for Memory T Cells and Promotes Protective Memory Responses to Infection. *Immunity*, 47(6), 1154-1168.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.009>
- Hansen, S. G., Vieville, C., Whizin, N., Coyne-Johnson, L., Siess, D. C., Drummond, D. D., Legasse, A. W., Axthelm, M. K., Oswald, K., Trubey, C. M., Piatak, M., Lifson, J. D., Nelson, J. A., Jarvis, M. A., & Picker, L. J. (2009). Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nature Medicine*, 15(3), 293-299. <https://doi.org/10.1038/nm.1935>
- Hanses, F., Kopp, A., Bala, M., Buechler, C., Falk, W., Salzberger, B., & Schäffler, A. (2011). Intracellular Survival of Staphylococcus aureus in Adipocyte-Like Differentiated 3T3-L1 Cells Is Glucose Dependent and Alters Cytokine, Chemokine, and Adipokine Secretion. *Endocrinology*, 152(11), 4148-4157. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0103>
- Harari, A., Enders, F. B., Cellerai, C., Bart, P.-A., & Pantaleo, G. (2009). Distinct Profiles of Cytotoxic Granules in Memory CD8 T Cells Correlate with Function, Differentiation Stage, and Antigen Exposure. *Journal of Virology*, 83(7), 2862-2871. <https://doi.org/10.1128/JVI.02528-08>
- Hausman, D. B., DiGirolamo, M., Bartness, T. J., Hausman, G. J., & Martin, R. J. (2001). The biology of white adipocyte proliferation. *Obesity Reviews*, 2(4), 239-254. <https://doi.org/10.1046/j.1467-789X.2001.00042.x>
- He, R., Hou, S., Liu, C., Zhang, A., Bai, Q., Han, M., Yang, Y., Wei, G., Shen, T., Yang, X., Xu, L., Chen, X., Hao, Y., Wang, P., Zhu, C., Ou, J., Liang, H., Ni, T., Zhang, X., ... Ye, L. (2016). Follicular CXCR5-expressing CD8+ T cells curtail chronic viral infection. *Nature*, 537(7620), 412-416. <https://doi.org/10.1038/nature19317>
- Hernández-Pando, R., Jeyanathan, M., Mengistu, G., Aguilar, D., Orozco, H., Harboe, M., Rook, G., & Bjune, G. (2000). Persistence of DNA from Mycobacterium tuberculosis in superficially normal lung tissue during latent infection. *The Lancet*, 356(9248), 2133-2138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03493-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03493-0)
- Hikono, H., Kohlmeier, J. E., Takamura, S., Wittmer, S. T., Roberts, A. D., & Woodland, D. L. (2007). Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 204(7), 1625-1636. <https://doi.org/10.1084/jem.20070322>
- Hinney, A., Vogel, C. I. G., & Hebebrand, J. (2010). From monogenic to polygenic obesity: Recent advances. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 19(3), 297-310. <https://doi.org/10.1007/s00787-010-0096-6>

- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, *181*(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hombrink, P., Helbig, C., Backer, R. A., Piet, B., Oja, A. E., Stark, R., Brassler, G., Jongejan, A., Jonkers, R. E., Nota, B., Basak, O., Clevers, H. C., Moerland, P. D., Amsen, D., & van Lier, R. A. W. (2016). Programs for the persistence, vigilance and control of human CD8+ lung-resident memory T cells. *Nature Immunology*, *17*(12), 1467-1478. <https://doi.org/10.1038/ni.3589>
- Hondowicz, B. D., Kim, K. S., Ruterbusch, M. J., Keitany, G. J., & Pepper, M. (2018). IL-2 is required for the generation of viral-specific CD4<sup>+</sup> Th1 tissue-resident memory cells and B cells are essential for maintenance in the lung. *European Journal of Immunology*, *48*(1), 80-86. <https://doi.org/10.1002/eji.201746928>
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science*, *259*(5091), 87-91. <https://doi.org/10.1126/science.7678183>
- Hsu, A., Aronoff, D. M., Phipps, J., Goel, D., & Mancuso, P. (2007). Leptin improves pulmonary bacterial clearance and survival in *ob/ob* mice during pneumococcal pneumonia. *Clinical and Experimental Immunology*, *150*(2), 332-339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03491.x>
- Huber, K. (2001). Plasminogen activator inhibitor type-1 (part one): Basic mechanisms, regulation, and role for thromboembolic disease. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, *11*(3), 183-193. <https://doi.org/10.1023/a:1011955018052>
- Huh, J. Y., Park, Y. J., Ham, M., & Kim, J. B. (2014). Crosstalk between Adipocytes and Immune Cells in Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysregulation in Obesity. *Molecules and Cells*, *37*(5), 365-371. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0074>
- Hunter, G. R., Gower, B. A., & Kane, B. L. (2010). Age Related Shift in Visceral Fat. *International Journal of Body Composition Research*, *8*(3), 103-108.
- Iacobellis, G., Corradi, D., & Sharma, A. M. (2005). Epicardial adipose tissue: Anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, *2*(10), 536-543. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0319>
- Ibrahim, M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: Structural and functional differences. *Obesity Reviews*, *11*(1), 11-18. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x>
- Ikejima, S., Sasaki, S., Sashinami, H., Mori, F., Ogawa, Y., Nakamura, T., Abe, Y., Wakabayashi, K., Suda, T., & Nakane, A. (2005). Impairment of Host Resistance to *Listeria monocytogenes* Infection in Liver of *db/db* and *ob/ob* Mice. *Diabetes*, *54*(1), 182-189. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.182>
- Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiyama, H., Schall, T. J., & Yoshie, O. (1997). Identification and Molecular Characterization of Fractalkine Receptor CX3CR1, which Mediates Both Leukocyte Migration and Adhesion. *Cell*, *91*(4), 521-530. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80438-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80438-9)
- Jaafoura, S., de Goër de Herve, M. G., Hernandez-Vargas, E. A., Hendel-Chavez, H., Abdoh, M., Mateo, M. C., Krzysiek, R., Merad, M., Seng, R., Tardieu, M., Delfraissy, J. F., Goujard, C., & Taoufik, Y. (2014). Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core

- of less-differentiated CD4<sup>+</sup> memory T Cells. *Nature Communications*, 5, 5407. <https://doi.org/10.1038/ncomms6407>
- Jacob, S., Henriksen, E. J., Fogt, D. L., & Dietze, G. J. (1996). Effects of trandolapril and verapamil on glucose transport in insulin-resistant rat skeletal muscle. *Metabolism*, 45(5), 535-541. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(96\)90021-9](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(96)90021-9)
- Jain, S., Kamimoto, L., Bramley, A. M., Schmitz, A. M., Benoit, S. R., Louie, J., Sugerman, D. E., Druckenmiller, J. K., Ritger, K. A., Chugh, R., Jasuja, S., Deutscher, M., Chen, S., Walker, J. D., Duchin, J. S., Lett, S., Soliva, S., Wells, E. V., Swerdlow, D., ... Finelli, L. (2009). Hospitalized Patients with 2009 H1N1 Influenza in the United States, April–June 2009. *New England Journal of Medicine*, 361(20), 1935-1944. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0906695>
- Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Duncan, R. E., Ahmadian, M., & Sul, H. S. (2007). Regulation of Triglyceride Metabolism.IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293(1), G1-G4. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00554.2006>
- Joshi, M. B., Philippova, M., Ivanov, D., Allenspach, R., Erne, P., & Resink, T. J. (2005). T-cadherin protects endothelial cells from oxidative stress-induced apoptosis. *The FASEB Journal*, 19(12), 1737-1739. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3834fje>
- Jozwik, A., Habibi, M. S., Paras, A., Zhu, J., Guvenel, A., Dhariwal, J., Almond, M., Wong, E. H. C., Sykes, A., Maybeno, M., Del Rosario, J., Trujillo-Torralbo, M.-B., Mallia, P., Sidney, J., Peters, B., Kon, O. M., Sette, A., Johnston, S. L., Openshaw, P. J., & Chiu, C. (2015). RSV-specific airway resident memory CD8<sup>+</sup> T cells and differential disease severity after experimental human infection. *Nature Communications*, 6(1), 10224. <https://doi.org/10.1038/ncomms10224>
- Julius, P., Luttmann, W., Knoechel, B., Kroegel, C., Matthys, H., & Virchow Jr, J. C. (1999). CD69 surface expression on human lung eosinophils after segmental allergen provocation. *European Respiratory Journal*, 13(6), 1253-1259. <https://doi.org/10.1183/09031936.99.13612609>
- Kajimura, S., Spiegelman, B. M., & Seale, P. (2015). Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metabolism*, 22(4), 546-559. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.007>
- Kanda, H., Tateya, S., & Tamori, Y. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 116(6), 1494-1505. <https://doi.org/10.1172/JCI26498>
- Kao, C., Oestreich, K. J., Paley, M. A., Crawford, A., Angelosanto, J. M., Ali, M.-A. A., Intlekofer, A. M., Boss, J. M., Reiner, S. L., Weinmann, A. S., & Wherry, E. J. (2011). Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses during chronic infection. *Nature Immunology*, 12(7), 663-671. <https://doi.org/10.1038/ni.2046>
- Karastergiou, K., Smith, S. R., Greenberg, A. S., & Fried, S. K. (2012). Sex differences in human adipose tissues – the biology of pear shape. *Biology of Sex Differences*, 3(1), 13. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-3-13>
- Karlsson, C., Lindell, K., Ottosson, M., Sjöström, L., Carlsson, B., & Carlsson, L. M. S. (1998). Human Adipose Tissue Expresses Angiotensinogen and Enzymes Required for Its Conversion to Angiotensin II<sup>1</sup>. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(11), 3925-3929. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.11.5276>

- Keophiphath, M., Rouault, C., Divoux, A., Clément, K., & Lacasa, D. (2010). CCL5 Promotes Macrophage Recruitment and Survival in Human Adipose Tissue. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(1), 39-45. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.197442>
- Kern, P. A., Saghizadeh, M., Ong, J. M., Bosch, R. J., Deem, R., & Simsolo, R. B. (1995). The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2111-2119. <https://doi.org/10.1172/JCI117899>
- Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Reports*, 2(4), 282-286. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve071>
- Kilburn, S. A., Featherstone, P., Higgins, B., & Brindle, R. (2010). Interventions for cellulitis and erysipelas. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2020(12). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004299.pub2>
- Kim, T.-S., & Shin, E.-C. (2019). The activation of bystander CD8+ T cells and their roles in viral infection. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(12), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0316-1>
- Kimura, A., & Kishimoto, T. (2010). IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, 40(7), 1830-1835. <https://doi.org/10.1002/eji.201040391>
- Kiniry, B. E., Li, S., Ganesh, A., Hunt, P. W., Somsouk, M., Skinner, P. J., Deeks, S. G., & Shacklett, B. L. (2018). Detection of HIV-1-specific gastrointestinal tissue resident CD8+ T-cells in chronic infection. *Mucosal Immunology*, 11(3), 909-920. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.96>
- Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T. F. E., Dragun, D., Skurk, T., Hauner, H., Blüher, M., Unger, T., Wolf, A.-M., Knippschild, U., Hombach, V., & Marx, N. (2008). T-lymphocyte Infiltration in Visceral Adipose Tissue: A Primary Event in Adipose Tissue Inflammation and the Development of Obesity-Mediated Insulin Resistance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(7), 1304-1310. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.165100>
- Klatt, N. R., Chomont, N., Douek, D. C., & Deeks, S. G. (2013). Immune activation and HIV persistence: Implications for curative approaches to HIV infection. *Immunological Reviews*, 254(1), 326-342. <https://doi.org/10.1111/imr.12065>
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.-C., & Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, 312(5996), 767-768. <https://doi.org/10.1038/312767a0>
- Koenig, S. M. (2001). Pulmonary Complications of Obesity. *The American Journal of the Medical Sciences*, 321(4), 249-279. <https://doi.org/10.1097/00000441-200104000-00006>
- Koethe, J. R. (2017). Adipose Tissue in HIV Infection. In R. Terjung (Éd.), *Comprehensive Physiology* (p. 1339-1357). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160028>
- Kolumam, G. A., Thomas, S., Thompson, L. J., Sprent, J., & Murali-Krishna, K. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *Journal of Experimental Medicine*, 202(5), 637-650. <https://doi.org/10.1084/jem.20050821>
- Kosteli, A., Sgaru, E., Haemmerle, G., Martin, J. F., Lei, J., Zechner, R., & Ferrante, A. W. (2010). Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 120(10), 3466-3479. <https://doi.org/10.1172/JCI42845>

- Kotzbeck, P., Giordano, A., Mondini, E., Murano, I., Severi, I., Venema, W., Cecchini, M. P., Kershaw, E. E., Barbatelli, G., Haemmerle, G., Zechner, R., & Cinti, S. (2018). Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *Journal of Lipid Research*, *59*(5), 784-794. <https://doi.org/10.1194/jlr.M079665>
- Kumar, B. V., Ma, W., Miron, M., Granot, T., Guyer, R. S., Carpenter, D. J., Senda, T., Sun, X., Ho, S.-H., Lerner, H., Friedman, A. L., Shen, Y., & Farber, D. L. (2017). Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *Cell Reports*, *20*(12), 2921-2934. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.078>
- Kusuyama, J., Bandow, K., Ohnishi, T., Amir, M. S., Shima, K., Semba, I., & Matsuguchi, T. (2019). CXCL13 is a differentiation- and hypoxia-induced adipocytokine that exacerbates the inflammatory phenotype of adipocytes through PHLPP1 induction. *Biochemical Journal*, *476*(22), 3533-3548. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190709>
- Lafontan, M., Barbe, P., Galitzky, J., Tavernier, G., Langin, D., Carpenne, C., Bousquet-Melou, A., & Berlan, M. (1997). Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *Human Reproduction*, *12*(suppl 1), 6-20. [https://doi.org/10.1093/humrep/12.suppl\\_1.6](https://doi.org/10.1093/humrep/12.suppl_1.6)
- Lafontan, M., & Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research*, *48*(5), 275-297. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.05.001>
- Lagathu, C., Bastard, J.-P., Auclair, M., Maachi, M., Capeau, J., & Caron, M. (2003). Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: Prevention by rosiglitazone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *311*(2), 372-379. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.013>
- Lagathu, C., Eustace, B., Prot, M., Frantz, D., Gu, Y., Bastard, J.-P., Maachi, M., Azoulay, S., Briggs, M., Caron, M., & Capeau, J. (2007). Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antiviral Therapy*, *12*(4), 489-500.
- Lago, F., Gómez, R., Gómez-Reino, J. J., Dieguez, C., & Gualillo, O. (2009). Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, *34*(10), 500-510. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.06.008>
- Lambotte, O., Boufassa, F., Madec, Y., Nguyen, A., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C., Venet, A., Delfraissy, J.-F., & SEROCO-HEMOCO Study Group. (2005). HIV controllers: A homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *41*(7), 1053-1056. <https://doi.org/10.1086/433188>
- Laparra, A., Tricot, S., Le Van, M., Damouche, A., Gorwood, J., Vaslin, B., Favier, B., Benoist, S., Ho Tsong Fang, R., Bosquet, N., Le Grand, R., Chapon, C., Lambotte, O., & Bourgeois, C. (2019). The Frequencies of Immunosuppressive Cells in Adipose Tissue Differ in Human, Non-human Primate, and Mouse Models. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00117>
- Le Lay, S., Briand, N., & Dugail, I. (2015). Adipocyte size fluctuation, mechano-active lipid droplets and caveolae. *Adipocyte*, *4*(2), 158-160. <https://doi.org/10.4161/21623945.2014.973774>
- Ledoux, S., Queguiner, I., Msika, S., Calderari, S., Rufat, P., Gasc, J.-M., Corvol, P., & Larger, E. (2008). Angiogenesis Associated With Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue in Severe Human Obesity. *Diabetes*, *57*(12), 3247-3257. <https://doi.org/10.2337/db07-1812>

- Lee, M.-J., Wu, Y., & Fried, S. K. (2013). Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.001>
- Lee, Y. S., Li, P., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Lu, M., Kim, J. I., Ham, M., Talukdar, S., Chen, A., Lu, W. J., Bandyopadhyay, G. K., Schwendener, R., Olefsky, J., & Kim, J. B. (2011). Inflammation Is Necessary for Long-Term but Not Short-Term High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes*, 60(10), 2474-2483. <https://doi.org/10.2337/db11-0194>
- Lee, Y. S., Wollam, J., & Olefsky, J. M. (2018). An Integrated View of Immunometabolism. *Cell*, 172(1-2), 22-40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.025>
- Lee, Y.-H., Petkova, A. P., & Granneman, J. G. (2013). Identification of an Adipogenic Niche for Adipose Tissue Remodeling and Restoration. *Cell Metabolism*, 18(3), 355-367. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.003>
- Lefrançois, L., Parker, C. M., Olson, S., Muller, W., Wagner, N., & Puddington, L. (1999). The Role of  $\beta 7$  Integrins in CD8 T Cell Trafficking During an Antiviral Immune Response. *Journal of Experimental Medicine*, 189(10), 1631-1638. <https://doi.org/10.1084/jem.189.10.1631>
- Lefterova, M. I., Zhang, Y., Steger, D. J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C. J., Liu, X. S., & Lazar, M. A. (2008). PPAR $\gamma$  and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes & Development*, 22(21), 2941-2952. <https://doi.org/10.1101/gad.1709008>
- Lehr, S., Hartwig, S., & Sell, H. (2012). Adipokines: A treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 6(1-2), 91-101. <https://doi.org/10.1002/prca.201100052>
- Lelic, A., Verschoor, C. P., Ventresca, M., Parsons, R., Eveleigh, C., Bowdish, D., Betts, M. R., Loeb, M. B., & Bramson, J. L. (2012). The Polyfunctionality of Human Memory CD8+ T Cells Elicited by Acute and Chronic Virus Infections Is Not Influenced by Age. *PLoS Pathogens*, 8(12), e1003076. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003076>
- Lenzi, H. L., Oliveira, D. N., Lima, M. T., & Gattass, C. R. (1996). Trypanosoma cruzi: Paninfectivity of CL Strain during Murine Acute Infection. *Experimental Parasitology*, 84(1), 16-27. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0086>
- Leong, Y. A., Chen, Y., Ong, H. S., Wu, D., Man, K., Deleage, C., Minnich, M., Meckiff, B. J., Wei, Y., Hou, Z., Zotos, D., Fenix, K. A., Atnerkar, A., Preston, S., Chipman, J. G., Beilman, G. J., Allison, C. C., Sun, L., Wang, P., ... Yu, D. (2016). CXCR5+ follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles. *Nature Immunology*, 17, 1187.
- Li, M.-Y., Li, L., Zhang, Y., & Wang, X.-S. (2020). Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infectious Diseases of Poverty*, 9(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00662-x>
- Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greenough, T. C., Choe, H., & Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426(6965), 450-454. <https://doi.org/10.1038/nature02145>
- Liang, S., Mozdzanowska, K., Palladino, G., & Gerhard, W. (1994). Heterosubtypic immunity to influenza type A virus in mice. Effector mechanisms and their longevity. *The Journal of Immunology*, 152(4), 1653.
- Lidell, M. E., Betz, M. J., Leinhard, O. D., Heglind, M., Elander, L., Slawik, M., Mussack, T., Nilsson, D., Romu, T., Nuutila, P., Virtanen, K. A., Beuschlein, F., Persson, A., Borga, M., & Enerbäck, S. (2013). Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nature Medicine*, 19(5), 631-634. <https://doi.org/10.1038/nm.3017>

- Lilla, J., Stickens, D., & Werb, Z. (2002). Metalloproteases and Adipogenesis: A Weighty Subject. *The American Journal of Pathology*, *160*(5), 1551-1554. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61100-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61100-5)
- Liu, J., Li, Y., Liu, Q., Yao, Q., Wang, X., Zhang, H., Chen, R., Ren, L., Min, J., Deng, F., Yan, B., Liu, L., Hu, Z., Wang, M., & Zhou, Y. (2021). SARS-CoV-2 cell tropism and multiorgan infection. *Cell Discovery*, *7*(1), 17. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00249-2>
- Liu, K., Zhao, E., Ilyas, G., Lalazar, G., Lin, Y., Haseeb, M., Tanaka, K. E., & Czaja, M. J. (2015). Impaired macrophage autophagy increases the immune response in obese mice by promoting proinflammatory macrophage polarization. *Autophagy*, *11*(2), 271-284. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1009787>
- Loetscher, M., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S. A., Piali, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., & Moser, B. (1996). Chemokine receptor specific for IP10 and mig: Structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, *184*(3), 963-969. <https://doi.org/10.1084/jem.184.3.963>
- Loiseau, C., Requena, M., Nayrac, M., Mavigner, M., Cazabat, M., Iscache, A. L., Carrere, N., Suc, B., Alric, L., Izopet, J., & Delobel, P. (2019). Increased CXCR3+ T Cells Impairs Recruitment of T-Helper Type 17 Cells via Interferon  $\gamma$  and Interleukin 18 in the Small Intestine Mucosa During Treated HIV-1 Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *220*(5), 830-840. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz123>
- Lowe, C. E., O'Rahilly, S., & Rochford, J. J. (2011). Adipogenesis at a glance. *Journal of Cell Science*, *124*(16), 2681-2686. <https://doi.org/10.1242/jcs.079699>
- Luster, A. D., Unkeless, J. C., & Ravetch, J. V. (1985).  $\gamma$ -Interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature*, *315*(6021), 672-676. <https://doi.org/10.1038/315672a0>
- Ma, E. H., Poffenberger, M. C., Wong, A. H.-T., & Jones, R. G. (2017). The role of AMPK in T cell metabolism and function. *Current Opinion in Immunology*, *46*, 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.04.004>
- Mackay, L. K., Braun, A., Macleod, B. L., Collins, N., Tebartz, C., Bedoui, S., Carbone, F. R., & Gebhardt, T. (2015). Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *194*(5), 2059-2063. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402256>
- Mackay, L. K., Minnich, M., Kragten, N. A. M., Liao, Y., Nota, B., Seillet, C., Zaid, A., Man, K., Preston, S., Freestone, D., Braun, A., Wynne-Jones, E., Behr, F. M., Stark, R., Pellicci, D. G., Godfrey, D. I., Belz, G. T., Pellegrini, M., Gebhardt, T., ... van Gisbergen, K. P. J. M. (2016). Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science*, *352*(6284), 459-463. <https://doi.org/10.1126/science.aad2035>
- Mackay, L. K., Rahimpour, A., Ma, J. Z., Collins, N., Stock, A. T., Hafon, M.-L., Vega-Ramos, J., Lauzurica, P., Mueller, S. N., Stefanovic, T., Tschärke, D. C., Heath, W. R., Inouye, M., Carbone, F. R., & Gebhardt, T. (2013). The developmental pathway for CD103+CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nature Immunology*, *14*(12), 1294-1301. <https://doi.org/10.1038/ni.2744>
- Mackay, L. K., Stock, A. T., Ma, J. Z., Jones, C. M., Kent, S. J., Mueller, S. N., Heath, W. R., Carbone, F. R., & Gebhardt, T. (2012). Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T ( $T_{RM}$ ) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(18), 7037-7042. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202288109>

- Magdy Beshbishy, A., Hetta, H. F., Hussein, D. E., Saati, A. A., C Uba, C., Rivero-Perez, N., Zaragoza-Bastida, A., Shah, M. A., Behl, T., & Batiha, G. E.-S. (2020). Factors Associated with Increased Morbidity and Mortality of Obese and Overweight COVID-19 Patients. *Biology*, *9*(9), E280. <https://doi.org/10.3390/biology9090280>
- Mahoney, J. R., Beutler, B. A., Le Trang, N., Vine, W., Ikeda, Y., Kawakami, M., & Cerami, A. (1985). Lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells produce a mediator that inhibits lipoprotein lipase in 3T3-L1 cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *134*(3), 1673-1675.
- Maier, H. E., Lopez, R., Sanchez, N., Ng, S., Gresh, L., Ojeda, S., Burger-Calderon, R., Kuan, G., Harris, E., Balmaseda, A., & Gordon, A. (2018). Obesity Increases the Duration of Influenza A Virus Shedding in Adults. *The Journal of Infectious Diseases*, *218*(9), 1378-1382. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy370>
- Malavazos, A. E., Corsi Romanelli, M. M., Bandera, F., & Iacobellis, G. (2020). Targeting the Adipose Tissue in COVID-19. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *28*(7), 1178-1179. <https://doi.org/10.1002/oby.22844>
- Mancuso, P., Gottschalk, A., Phare, S. M., Peters-Golden, M., Lukacs, N. W., & Huffnagle, G. B. (2002). Leptin-Deficient Mice Exhibit Impaired Host Defense in Gram-Negative Pneumonia. *The Journal of Immunology*, *168*(8), 4018-4024. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.4018>
- Marchionne, E. M., Diamond-Stanic, M. K., Prasonnarong, M., & Henriksen, E. J. (2012). Chronic renin inhibition with aliskiren improves glucose tolerance, insulin sensitivity, and skeletal muscle glucose transport activity in obese Zucker rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *302*(1), R137-R142. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00448.2011>
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G., & Hill, R. (2002). Leptin: A review of its peripheral actions and interactions. *International Journal of Obesity*, *26*(11), 1407-1433. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802142>
- Martín, P., Gómez, M., Lamana, A., Marín, A. M., Cortés, J. R., Ramírez-Huesca, M., Barreiro, O., López-Romero, P., Gutiérrez-Vázquez, C., de la Fuente, H., Cruz-Adalia, A., & Sánchez-Madrid, F. (2010). The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *126*(2), 355-365.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.05.010>
- Martínez-Colón, G. J., Ratnasiri, K., Chen, H., Jiang, S., Zanley, E., Rustagi, A., Verma, R., Chen, H., Andrews, J. R., Mertz, K. D., Tzankov, A., Azagury, D., Boyd, J., Nolan, G. P., Schürch, C. M., Matter, M. S., Blish, C. A., & McLaughlin, T. L. (2021). SARS-CoV-2 infects human adipose tissue and elicits an inflammatory response consistent with severe COVID-19 [Preprint]. *Immunology*. <https://doi.org/10.1101/2021.10.24.465626>
- Masopust, D., Choo, D., Vezys, V., Wherry, E. J., Duraiswamy, J., Akondy, R., Wang, J., Casey, K. A., Barber, D. L., Kawamura, K. S., Fraser, K. A., Webby, R. J., Brinkmann, V., Butcher, E. C., Newell, K. A., & Ahmed, R. (2010). Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(3), 553-564. <https://doi.org/10.1084/jem.20090858>
- Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L., & Lefrançois, L. (2001). Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue. *Science*, *291*(5512), 2413-2417. <https://doi.org/10.1126/science.1058867>
- Masopust, D., Vezys, V., Wherry, E. J., Barber, D. L., & Ahmed, R. (2006). Cutting Edge: Gut Microenvironment Promotes Differentiation of a Unique Memory CD8 T Cell

- Population. *The Journal of Immunology*, 176(4), 2079-2083. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.4.2079>
- Massiéra, F., Bloch-Faure, M., Ceiler, D., Murakami, K., Fukamizu, A., Gasc, J.-M., Quignard-Boulangé, A., Negrel, R., Ailhaud, G., Seydoux, J., Meneton, P., & Teboul, M. (2001). Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *The FASEB Journal*, 15(14), 1-25. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0457fje>
- Mathis, D., & Shoelson, S. E. (2011). Immunometabolism: An emerging frontier. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 81-83. <https://doi.org/10.1038/nri2922>
- Mathison, C. (2003). Skin and wound care challenges in the hospitalized morbidly obese patient. *Journal of WOCN*, 30(2), 78-83. <https://doi.org/10.1067/mjw.2003.22>
- Maury, E., & Brichard, S. M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.031>
- McCallister, J. W., Adkins, E. J., & O'Brien, J. M. (2009). Obesity and acute lung injury. *Clinics in chest medicine*, 30(3), 495-508, viii. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2009.05.008>
- McComsey, G. A., Paulsen, D. M., Lonergan, J. T., Hessenthaler, S. M., Hoppel, C. L., Williams, V. C., Fisher, R. L., Cherry, C. L., White-Owen, C., Thompson, K. A., Ross, S. T., Hernandez, J. E., & Ross, L. L. (2005). Improvements in lipotrophy, mitochondrial DNA levels and fat apoptosis after replacing stavudine with abacavir or zidovudine: *AIDS*, 19(1), 15-23. <https://doi.org/10.1097/00002030-200501030-00002>
- McLaughlin, T., Lamendola, C., Liu, A., & Abbasi, F. (2011). Preferential Fat Deposition in Subcutaneous Versus Visceral Depots Is Associated with Insulin Sensitivity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(11), E1756-E1760. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0615>
- McMahan, K., Yu, J., Mercado, N. B., Loos, C., Tostanoski, L. H., Chandrashekar, A., Liu, J., Peter, L., Atyeo, C., Zhu, A., Bondzie, E. A., Dagotto, G., Gebre, M. S., Jacob-Dolan, C., Li, Z., Nampanya, F., Patel, S., Pessaint, L., Van Ry, A., ... Barouch, D. H. (2021). Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*, 590(7847), 630-634. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03041-6>
- McMaster, S. R., Wilson, J. J., Wang, H., & Kohlmeier, J. E. (2015). Airway-Resident Memory CD8 T Cells Provide Antigen-Specific Protection against Respiratory Virus Challenge through Rapid IFN- $\gamma$  Production. *The Journal of Immunology*, 195(1), 203-209. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402975>
- Mead, J., Irvine, S., & Ramji, D. (2002). Lipoprotein lipase: Structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of Molecular Medicine*, 80(12), 753-769. <https://doi.org/10.1007/s00109-002-0384-9>
- Modica, S., Straub, L. G., Balaz, M., Sun, W., Varga, L., Stefanicka, P., Profant, M., Simon, E., Neubauer, H., Ukropcova, B., Ukropec, J., & Wolfrum, C. (2016). Bmp4 Promotes a Brown to White-like Adipocyte Shift. *Cell Reports*, 16(8), 2243-2258. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.048>
- Morris, D. L., Cho, K. W., DelProposto, J. L., Oatmen, K. E., Geletka, L. M., Martinez-Santibanez, G., Singer, K., & Lumeng, C. N. (2013). Adipose Tissue Macrophages Function As Antigen-Presenting Cells and Regulate Adipose Tissue CD4<sup>+</sup> T Cells in Mice. *Diabetes*, 62(8), 2762-2772. <https://doi.org/10.2337/db12-1404>
- Mudd, J. C., Panigrahi, S., Kyi, B., Moon, S. H., Manion, M. M., Younes, S.-A., Sieg, S. F., Funderburg, N. T., Zidar, D. A., Lederman, M. M., & Freeman, M. L. (2016). Inflammatory Function of CX3CR1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Cells in Treated HIV Infection Is Modulated by Platelet

- Interactions. *The Journal of Infectious Diseases*, 214(12), 1808-1816. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw463>
- Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R., & Heath, W. R. (2013). Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 137-161. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095954>
- Müller, G., Ertl, J., Gerl, M., & Preibisch, G. (1997). Leptin Impairs Metabolic Actions of Insulin in Isolated Rat Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(16), 10585-10593. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.16.10585>
- Murai, M., Yoneyama, H., Harada, A., Yi, Z., Vestergaard, C., Guo, B., Suzuki, K., Asakura, H., & Matsushima, K. (1999). Active participation of CCR5+CD8+ T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *Journal of Clinical Investigation*, 104(1), 49-57. <https://doi.org/10.1172/JCI6642>
- Murata, H., Hruz, P. W., & Mueckler, M. (2000). The Mechanism of Insulin Resistance Caused by HIV Protease Inhibitor Therapy. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20251-20254. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000228200>
- Myers, M. G., Leibel, R. L., Seeley, R. J., & Schwartz, M. W. (2010). Obesity and leptin resistance: Distinguishing cause from effect. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 21(11), 643-651. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.08.002>
- Nagajyothi, F., Desruisseaux, M. S., Machado, F. S., Upadhyay, R., Zhao, D., Schwartz, G. J., Teixeira, M. M., Albanese, C., Lisanti, M. P., Chua, S. C., Weiss, L. M., Scherer, P. E., & Tanowitz, H. B. (2012). Response of Adipose Tissue to Early Infection With *Trypanosoma cruzi* (Brazil Strain). *Journal of Infectious Diseases*, 205(5), 830-840. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir840>
- Nagashimada, M., Sawamoto, K., Ni, Y., Kitade, H., Nagata, N., Xu, L., Kobori, M., Mukaida, N., Yamashita, T., Kaneko, S., & Ota, T. (2021). CX3CL1-CX3CR1 Signaling Deficiency Exacerbates Obesity-induced Inflammation and Insulin Resistance in Male Mice. *Endocrinology*, 162(6), bqab064. <https://doi.org/10.1210/endo/bqab064>
- Nakata, M., Yada, T., Soejima, N., & Maruyama, I. (1999). Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes*, 48(2), 426-429. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.2.426>
- Neyrolles, O., Hernández-Pando, R., Pietri-Rouxel, F., Fornès, P., Tailleux, L., Payán, J. A. B., Pivert, E., Bordat, Y., Aguilar, D., Prévost, M.-C., Petit, C., & Gicquel, B. (2006). Is Adipose Tissue a Place for Mycobacterium tuberculosis Persistence? *PLoS ONE*, 1(1), e43. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000043>
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiyama, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., & Nagai, R. (2009). CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine*, 15(8), 914-920. <https://doi.org/10.1038/nm.1964>
- Noben-Trauth, N., Shultz, L. D., Brombacher, F., Urban, J. F., Gu, H., & Paul, W. E. (1997). An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(20), 10838-10843. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10838>
- Noel, N., Boufassa, F., Lécuroux, C., Saez-Cirion, A., Bourgeois, C., Dunyach-Remy, C., Goujard, C., Rouzioux, C., Meyer, L., Pancino, G., Venet, A., & Lambotte, O. (2014). Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4+ T-cell counts in HIV controller patients: *AIDS*, 28(4), 467-476. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000174>

- Noelle, R. J. (1996). CD40 and Its Ligand in Host Defense. *Immunity*, 4(5), 415-419. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80408-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80408-2)
- Norata, G. D., Caligiuri, G., Chavakis, T., Matarese, G., Netea, M. G., Nicoletti, A., O'Neill, L. A. J., & Marelli-Berg, F. M. (2015). The Cellular and Molecular Basis of Translational Immunometabolism. *Immunity*, 43(3), 421-434. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.023>
- OMS. (2000). *World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic—Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000;894:i–xii, 1–253.*
- O'Neill, L. A. J., Kishton, R. J., & Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 553-565. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.70>
- Opferman, J. T., Ober, B. T., & Ashton-Rickardt, P. G. (1999). Linear Differentiation of Cytotoxic Effectors into Memory T Lymphocytes. *Science*, 283(5408), 1745-1748. <https://doi.org/10.1126/science.283.5408.1745>
- Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L., Guo, R., Chen, T., Hu, J., Xiang, Z., Mu, Z., Chen, X., Chen, J., Hu, K., Jin, Q., Wang, J., & Qian, Z. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications*, 11(1), 1620. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 85-97. <https://doi.org/10.1038/nri2921>
- Ozata, M., Ozdemir, I. C., & Licinio, J. (1999). Human Leptin Deficiency Caused by a Missense Mutation: Multiple Endocrine Defects, Decreased Sympathetic Tone, and Immune System Dysfunction Indicate New Targets for Leptin Action, Greater Central than Peripheral Resistance to the Effects of Leptin, and Spontaneous Correction of Leptin-Mediated Defects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(10), 3686-3695. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.10.5999>
- Pallett, L. J., Davies, J., Colbeck, E. J., Robertson, F., Hansi, N., Easom, N. J. W., Burton, A. R., Stegmann, K. A., Schurich, A., Swadling, L., Gill, U. S., Male, V., Luong, T., Gander, A., Davidson, B. R., Kennedy, P. T. F., & Maini, M. K. (2017). IL-2high tissue-resident T cells in the human liver: Sentinels for hepatotropic infection. *Journal of Experimental Medicine*, 214(6), 1567-1580. <https://doi.org/10.1084/jem.20162115>
- Parga-Vidal, L., Behr, F. M., Kragten, N. A. M., Nota, B., Wesselink, T. H., Kavazović, I., Covill, L. E., Schuller, M. B. P., Bryceson, Y. T., Wensveen, F. M., van Lier, R. A. W., van Dam, T. J. P., Stark, R., & van Gisbergen, K. P. J. M. (2021). Hobit identifies tissue-resident memory T cell precursors that are regulated by Eomes. *Science Immunology*, 6(62), eabg3533. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abg3533>
- Park, S. L., Mackay, L. K., & Gebhardt, T. (2016). Distinct recirculation potential of CD69<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> and CD103<sup>+</sup> thymic memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunology & Cell Biology*, 94(10), 975-980. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.60>
- Parrish, N. M., Dick, J. D., & Bishai, W. R. (1998). Mechanisms of latency in Mycobacterium tuberculosis. *Trends in Microbiology*, 6(3), 107-112. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01216-5](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01216-5)
- Pasquarelli-do-Nascimento, G., Braz-de-Melo, H. A., Faria, S. S., Santos, I. de O., Kobinger, G. P., & Magalhães, K. G. (2020). Hypercoagulopathy and Adipose Tissue Exacerbated

- Inflammation May Explain Higher Mortality in COVID-19 Patients With Obesity. *Frontiers in endocrinology*, 11, 530-530. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00530>
- Patel, V. B., Shah, S., Verma, S., & Oudit, G. Y. (2017). Epicardial adipose tissue as a metabolic transducer: Role in heart failure and coronary artery disease. *Heart Failure Reviews*, 22(6), 889-902. <https://doi.org/10.1007/s10741-017-9644-1>
- Paton, N. I., Stöhr, W., Arenas-Pinto, A., Fisher, M., Williams, I., Johnson, M., Orkin, C., Chen, F., Lee, V., Winston, A., Gompels, M., Fox, J., Scott, K., & Dunn, D. T. (2015). Protease inhibitor monotherapy for long-term management of HIV infection: A randomised, controlled, open-label, non-inferiority trial. *The Lancet HIV*, 2(10), e417-e426. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(15\)00176-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(15)00176-9)
- Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2013). Metabolic Pathways in Immune Cell Activation and Quiescence. *Immunity*, 38(4), 633-643. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.005>
- Pearce, E. L., Walsh, M. C., Cejas, P. J., Harms, G. M., Shen, H., Wang, L.-S., Jones, R. G., & Choi, Y. (2009). Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature*, 460(7251), 103-107. <https://doi.org/10.1038/nature08097>
- Pekala, P., Kawakami, M., Vine, W., Lane, M. D., & Cerami, A. (1983). Studies of insulin resistance in adipocytes induced by macrophage mediator. *Journal of Experimental Medicine*, 157(4), 1360-1365. <https://doi.org/10.1084/jem.157.4.1360>
- Perdomo-Celis, F., Taborda, N. A., & Rugeles, M. T. (2018). Circulating CXCR5-Expressing CD8+ T-Cells Are Major Producers of IL-21 and Associate With Limited HIV Replication: *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 78(4), 473-482. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001700>
- Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2010). Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7153-7164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.053942>
- Piet, B., de Bree, G. J., Smids-Dierdorp, B. S., van der Loos, C. M., Remmerswaal, E. B. M., von der Thüsen, J. H., van Haarst, J. M. W., Eerenberg, J. P., ten Brinke, A., van der Bij, W., Timens, W., van Lier, R. A. W., & Jonkers, R. E. (2011). CD8+ T cells with an intraepithelial phenotype upregulate cytotoxic function upon influenza infection in human lung. *Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2254-2263. <https://doi.org/10.1172/JCI44675>
- Pietsch, J., Batra, A., Stroh, T., Fedke, I., Glaubien, R., Okur, B., Zeitz, M., & Siegmund, B. (2006). Toll-Like Receptor Expression and Response to Specific Stimulation in Adipocytes and Preadipocytes: On the Role of Fat in Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1072(1), 407-409. <https://doi.org/10.1196/annals.1326.021>
- Pizzolla, A., Nguyen, T. H. O., Smith, J. M., Brooks, A. G., Kedzierska, K., Heath, W. R., Reading, P. C., & Wakim, L. M. (2017). Resident memory CD8<sup>+</sup> T cells in the upper respiratory tract prevent pulmonary influenza virus infection. *Science Immunology*, 2(12), eaam6970. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aam6970>
- Poggi, M., Jager, J., Paulmyer-Lacroix, O., Peiretti, F., Gremeaux, T., Verdier, M., Grino, M., Stepanian, A., Msika, S., Burcelin, R., de Prost, D., Tanti, J. F., & Alessi, M. C. (2009). The inflammatory receptor CD40 is expressed on human adipocytes: Contribution to crosstalk between lymphocytes and adipocytes. *Diabetologia*, 52(6), 1152-1163. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1267-1>

- Polyák, Á., Ferenczi, S., Dénes, Á., Winkler, Z., Kriszt, R., Pintér-Kübler, B., & Kovács, K. J. (2014). The fractalkine/Cx3CR1 system is implicated in the development of metabolic visceral adipose tissue inflammation in obesity. *Brain, Behavior, and Immunity*, *38*, 25-35. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.01.010>
- Poma, A. M., Bonuccelli, D., Giannini, R., Macerola, E., Vignali, P., Ugolini, C., Torregrossa, L., Proietti, A., Pistello, M., Basolo, A., Santini, F., Toniolo, A., & Basolo, F. (2021). COVID-19 autopsy cases: Detection of virus in endocrine tissues. *Journal of endocrinological investigation*. <https://doi.org/10.1007/s40618-021-01628-y>
- Price, P., Eddy, K. S., Papadimitriou, J. M., Robertson, T. A., & Shellam, G. R. (1990). Cytomegalovirus infection of adipose tissues induces steatitis in adult mice. *International Journal of Experimental Pathology*, *71*(4), 557-571.
- Procaccini, C., Jirillo, E., & Matarese, G. (2012). Leptin as an immunomodulator. *Molecular Aspects of Medicine*, *33*(1), 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.012>
- Radermecker, R. P., Pi??rard, G. E., & Scheen, A. J. (2007). Lipodystrophy Reactions to Insulin: Effects of Continuous Insulin Infusion and New Insulin Analogs. *American Journal of Clinical Dermatology*, *8*(1), 21-28. <https://doi.org/10.2165/00128071-200708010-00003>
- Radulovic, K., Manta, C., Rossini, V., Holzmann, K., Kestler, H. A., Wegenka, U. M., Nakayama, T., & Niess, J. H. (2012). CD69 Regulates Type I IFN-Induced Tolerogenic Signals to Mucosal CD4 T Cells That Attenuate Their Colitogenic Potential. *The Journal of Immunology*, *188*(4), 2001-2013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100765>
- Rausch, M. E., Weisberg, S., Vardhana, P., & Tortoriello, D. V. (2008). Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *International Journal of Obesity*, *32*(3), 451-463. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803744>
- Reilly, S. M., & Saltiel, A. R. (2017). Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews Endocrinology*, *13*(11), 633-643. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.90>
- Reiss, Y., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Campbell, J. J., & Butcher, E. C. (2001). CC Chemokine Receptor (CCR)4 and the CCR10 Ligand Cutaneous T Cell-attracting Chemokine (CTACK) in Lymphocyte Trafficking to Inflamed Skin. *Journal of Experimental Medicine*, *194*(10), 1541-1547. <https://doi.org/10.1084/jem.194.10.1541>
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M., & Hanson, R. W. (2003). Glyceroneogenesis and the Triglyceride/Fatty Acid Cycle. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(33), 30413-30416. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300017200>
- Riba, R., Patel, B., Aburima, A., & Naseem, K. M. (2008). Globular adiponectin increases cGMP formation in blood platelets independently of nitric oxide. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *6*(12), 2121-2131. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03179.x>
- Ricard-Blum, S., & Ruggiero, F. (2005). The collagen superfamily: From the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathologie Biologie*, *53*(7), 430-442. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.12.024>
- Richardson, S., Hirsch, J. S., Narasimhan, M., Crawford, J. M., McGinn, T., Davidson, K. W., and the Northwell COVID-19 Research Consortium, Barnaby, D. P., Becker, L. B., Chelico, J. D., Cohen, S. L., Cockingham, J., Coppa, K., Diefenbach, M. A., Dominello, A. J., Duer-Hefele, J., Falzon, L., Gitlin, J., Hajizadeh, N., ... Zanos, T. P. (2020). Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA*, *323*(20), 2052. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6775>
- Rocha, V. Z., Folco, E. J., Ozdemir, C., Sheikine, Y., Christen, T., Sukhova, G. K., Tang, E. H. C., Bittencourt, M. S., Santos, R. D., Luster, A. D., Cohen, D. E., & Libby, P. (2014). CXCR3

- controls T-cell accumulation in fat inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(7), 1374-1381. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.303133>
- Rocha, V. Z., Folco, E. J., Sukhova, G., Shimizu, K., Gotsman, I., Vernon, A. H., & Libby, P. (2008). Interferon- $\gamma$ , a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation: A Role for Adaptive Immunity in Obesity. *Circulation Research*, 103(5), 467-476. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.177105>
- Rupnick, M. A., Panigrahy, D., Zhang, C.-Y., Dallabrida, S. M., Lowell, B. B., Langer, R., & Folkman, M. J. (2002). Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10730-10735. <https://doi.org/10.1073/pnas.162349799>
- Ryan, P. M., & Caplice, N. M. (2020). Is Adipose Tissue a Reservoir for Viral Spread, Immune Activation, and Cytokine Amplification in Coronavirus Disease 2019? *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 28(7), 1191-1194. <https://doi.org/10.1002/oby.22843>
- Rydzynski Moderbacher, C., Ramirez, S. I., Dan, J. M., Grifoni, A., Hastie, K. M., Weiskopf, D., Belanger, S., Abbott, R. K., Kim, C., Choi, J., Kato, Y., Crotty, E. G., Kim, C., Rawlings, S. A., Mateus, J., Tse, L. P. V., Frazier, A., Baric, R., Peters, B., ... Crotty, S. (2020). Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*, 183(4), 996-1012.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038>
- Sáez-Ciri3n, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., Potard, V., Versmisse, P., Melard, A., Prazuck, T., Descours, B., Guergnon, J., Viard, J.-P., Boufassa, F., Lambotte, O., Goujard, C., Meyer, L., Costagliola, D., Venet, A., ... Rouzioux, C. (2013). Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathogens*, 9, e1003211-. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003211>
- Saez-Cirion, A., Lacabaratz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., Barre-Sinoussi, F., Delfraissy, J.-F., Sinet, M., Pancino, G., Venet, A., & for the Agence Nationale de Recherches sur le Sida EP36 HIV Controllers Study Group. (2007). HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16), 6776-6781. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611244104>
- Saint-Marc, T., Partisani, M., Poizot-Martin, I., Bruno, F., Rouviere, O., Lang, J.-M., Gastaut, J.-A., & Touraine, J.-L. (1999). A syndrome of peripheral fat wasting (lipodystrophy) in patients receiving long-term nucleoside analogue therapy: *AIDS*, 13(13), 1659-1667. <https://doi.org/10.1097/00002030-199909100-00009>
- Sallusto, F., Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 745-763. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754), 708-712. <https://doi.org/10.1038/44385>
- Samaras, K., Wand, H., Law, M., Emery, S., Cooper, D., & Carr, A. (2007). Prevalence of Metabolic Syndrome in HIV-Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy Using International Diabetes Foundation and Adult Treatment Panel III Criteria. *Diabetes Care*, 30(1), 113-119. <https://doi.org/10.2337/dc06-1075>
- Sanchis-Gomar, F., Lavie, C. J., Mehra, M. R., Henry, B. M., & Lippi, G. (2020). Obesity and Outcomes in COVID-19: When an Epidemic and Pandemic Collide. *Mayo Clinic proceedings*, 95(7), 1445-1453. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.05.006>

- Sarjeant, K., & Stephens, J. M. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), a008417-a008417. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008417>
- Sartipy, P., & Loskutoff, D. J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 7265-7270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1133870100>
- Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J. J. C., Bickham, K. L., Lerner, H., Goldstein, M., Sykes, M., Kato, T., & Farber, D. L. (2013). Distribution and Compartmentalization of Human Circulating and Tissue-Resident Memory T Cell Subsets. *Immunity*, 38(1), 187-197. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.020>
- Sato, T., Thorlacius, H., Johnston, B., Staton, T. L., Xiang, W., Littman, D. R., & Butcher, E. C. (2005). Role for CXCR6 in Recruitment of Activated CD8<sup>+</sup> Lymphocytes to Inflamed Liver. *The Journal of Immunology*, 174(1), 277-283. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.1.277>
- Saucillo, D. C., Gerriets, V. A., Sheng, J., Rathmell, J. C., & MacIver, N. J. (2014). Leptin Metabolically Licenses T Cells for Activation To Link Nutrition and Immunity. *The Journal of Immunology*, 192(1), 136-144. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301158>
- Schäffler, A., Müller-Ladner, U., Schölmerich, J., & Büchler, C. (2006). Role of Adipose Tissue as an Inflammatory Organ in Human Diseases. *Endocrine Reviews*, 27(5), 449-467. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0022>
- Scheinfeld, N. S. (2004). Obesity and dermatology. *Clinics in Dermatology*, 22(4), 303-309. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.01.001>
- Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., & Lodish, H. F. (1995). A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26746-26749. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26746>
- Schmidt, N. W., Podyminogin, R. L., Butler, N. S., Badovinac, V. P., Tucker, B. J., Bahjat, K. S., Lauer, P., Reyes-Sandoval, A., Hutchings, C. L., Moore, A. C., Gilbert, S. C., Hill, A. V., Bartholomay, L. C., & Harty, J. T. (2008). Memory CD8 T cell responses exceeding a large but definable threshold provide long-term immunity to malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), 14017-14022. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805452105>
- Schwarz, J.-M., Linfoot, P., Dare, D., & Aghajanian, K. (2003). Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(1), 43-50. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.1.43>
- Sethi, J. K., & Hotamisligil, G. S. (1999). The role of TNF $\alpha$  in adipocyte metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 10(1), 19-29. <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0273>
- Shen, W., Wang, Z., Punyanita, M., Lei, J., Sinav, A., Kral, J. G., Imielinska, C., Ross, R., & Heymsfield, S. B. (2003). Adipose Tissue Quantification by Imaging Methods: A Proposed Classification. *Obesity Research*, 11(1), 5-16. <https://doi.org/10.1038/oby.2003.3>
- Sheridan, P. A., Paich, H. A., Handy, J., Karlsson, E. A., Hudgens, M. G., Sammon, A. B., Holland, L. A., Weir, S., Noah, T. L., & Beck, M. A. (2012). Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *International Journal of Obesity*, 36(8), 1072-1077. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.208>
- Shin, H., & Wherry, E. J. (2007). CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Current Opinion in Immunology*, 19(4), 408-415. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.06.004>
- Shoelson, S. E. (2006). Inflammation and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1793-1801. <https://doi.org/10.1172/JCI29069>

- Shoemaker, J. P., Hoffman, R. V., & Huffman, D. G. (1970). Trypanosoma cruzi: Preference for brown adipose tissue in mice by the Tulahuen strain. *Experimental Parasitology*, 27(3), 403-407. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(70\)90045-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894(70)90045-7)
- Sigal, L. J. (2016). Activation of CD8 T Lymphocytes during Viral Infections. In *Encyclopedia of Immunobiology* (p. 286-290). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.14009-3>
- Simon, M. A., Brodie, S. J., Sasseville, V. G., Chalifoux, L. V., Desrosiers, R. C., & Ringler, D. J. (1994). Immunopathogenesis of SIVmac. *Virus Research*, 32(2), 227-251. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(94\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0168-1702(94)90043-4)
- Simonnet, A., Chetboun, M., Poissy, J., Raverdy, V., Noulette, J., Duhamel, A., Labreuche, J., Mathieu, D., Pattou, F., Jourdain, M., & LICORN and the Lille COVID-19 and Obesity study group. (2020). High Prevalence of Obesity in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) Requiring Invasive Mechanical Ventilation. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 28(7), 1195-1199. <https://doi.org/10.1002/oby.22831>
- Smith, A. G., Sheridan, P. A., Harp, J. B., & Beck, M. A. (2007). Diet-Induced Obese Mice Have Increased Mortality and Altered Immune Responses When Infected with Influenza Virus. *The Journal of Nutrition*, 137(5), 1236-1243. <https://doi.org/10.1093/jn/137.5.1236>
- Smith, C. J., Caldeira-Dantas, S., Turula, H., & Snyder, C. M. (2015). Murine CMV Infection Induces the Continuous Production of Mucosal Resident T Cells. *Cell Reports*, 13(6), 1137-1148. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.076>
- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Rydén, M., Frisén, J., & Arner, P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453(7196), 783-787. <https://doi.org/10.1038/nature06902>
- Steinert, E. M., Schenkel, J. M., Fraser, K. A., Beura, L. K., Manlove, L. S., Igyártó, B. Z., Southern, P. J., & Masopust, D. (2015). Quantifying Memory CD8 T Cells Reveals Regionalization of Immunosurveillance. *Cell*, 161(4), 737-749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.031>
- Stelekati, E., Shin, H., Doering, T. A., Dolfi, D. V., Ziegler, C. G., Beiting, D. P., Dawson, L., Liboon, J., Wolski, D., Ali, M.-A. A., Katsikis, P. D., Shen, H., Roos, D. S., Haining, W. N., Lauer, G. M., & Wherry, E. J. (2014). Bystander Chronic Infection Negatively Impacts Development of CD8+ T Cell Memory. *Immunity*, 40(5), 801-813. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.010>
- Stephens, J. M. (2012). The Fat Controller: Adipocyte Development. *PLoS Biology*, 10(11), e1001436. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001436>
- Stewart, G. R., Robertson, B. D., & Young, D. B. (2003). Tuberculosis: A problem with persistence. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), 97-105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro749>
- Strissel, K. J., DeFuria, J., Shaul, M. E., Bennett, G., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2010). T-Cell Recruitment and Th1 Polarization in Adipose Tissue During Diet-Induced Obesity in C57BL/6 Mice. *Obesity*, 18(10), 1918-1925. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.1>
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24(6), 490-502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- Sun, K., Kusminski, C. M., & Scherer, P. E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2094-2101. <https://doi.org/10.1172/JCI45887>
- Surmi, B. K., & Hasty, A. H. (2010). The role of chemokines in recruitment of immune cells to the artery wall and adipose tissue. *Vascular Pharmacology*, 52(1-2), 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2009.12.004>

- Tang, Y., Liu, J., Zhang, D., Xu, Z., Ji, J., & Wen, C. (2020). Cytokine Storm in COVID-19: The Current Evidence and Treatment Strategies. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1708-1708. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01708>
- Tanowitz, H. B., Kirchhoff, L. V., Simon, D., Morris, S. A., Weiss, L. M., & Wittner, M. (1992). Chagas' disease. *Clinical Microbiology Reviews*, *5*(4), 400-419. <https://doi.org/10.1128/CMR.5.4.400>
- Taylor, R. W., Grant, A. M., Williams, S. M., & Goulding, A. (2010). Sex Differences in Regional Body Fat Distribution From Pre- to Postpuberty. *Obesity*, *18*(7), 1410-1416. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.399>
- Tchkonia, T., Morbeck, D. E., Von Zglinicki, T., Van Deursen, J., Lustgarten, J., Scrable, H., Khosla, S., Jensen, M. D., & Kirkland, J. L. (2010). Fat tissue, aging, and cellular senescence: Fat tissue and aging. *Aging Cell*, *9*(5), 667-684. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00608.x>
- Terawaki, S., Chikuma, S., Shibayama, S., Hayashi, T., Yoshida, T., Okazaki, T., & Honjo, T. (2011). IFN- $\alpha$  Directly Promotes Programmed Cell Death-1 Transcription and Limits the Duration of T Cell-Mediated Immunity. *The Journal of Immunology*, *186*(5), 2772-2779. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003208>
- Thompson, B. R., Lobo, S., & Bernlohr, D. A. (2010). Fatty acid flux in adipocytes: The in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *318*(1-2), 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.08.015>
- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, *6*(10), 772-783. <https://doi.org/10.1038/nri1937>
- Tobin, A.-M., Ahern, T., Rogers, S., Collins, P., O'Shea, D., & Kirby, B. (2013). The dermatological consequences of obesity: Dermatological consequences of obesity. *International Journal of Dermatology*, *52*(8), 927-932. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2012.05624.x>
- Toubal, A., Kiaf, B., Beaudoin, L., Cagninacci, L., Rhimi, M., Fruchet, B., da Silva, J., Corbett, A. J., Simoni, Y., Lantz, O., Rossjohn, J., McCluskey, J., Lesnik, P., Maguin, E., & Lehuen, A. (2020). Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and intestinal dysbiosis leading to metabolic dysfunction during obesity. *Nature Communications*, *11*(1), 3755. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17307-0>
- Tran, T. T., Yamamoto, Y., Gesta, S., & Kahn, C. R. (2008). Beneficial Effects of Subcutaneous Fat Transplantation on Metabolism. *Cell Metabolism*, *7*(5), 410-420. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.04.004>
- Trayhurn, P., & Wood, I. S. (2004). Adipokines: Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, *92*(3), 347-355. <https://doi.org/10.1079/BJN20041213>
- Trinchieri, G., & Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews Immunology*, *7*(3), 179-190. <https://doi.org/10.1038/nri2038>
- Valle-Casuso, J. C., Angin, M., Volant, S., Passaes, C., Monceaux, V., Mikhailova, A., Bourdic, K., Avettand-Fenoel, V., Boufassa, F., Sitbon, M., Lambotte, O., Thoulouze, M.-I., Müller-Trutwin, M., Chomont, N., & Sáez-Cirión, A. (2019). Cellular Metabolism Is a Major Determinant of HIV-1 Reservoir Seeding in CD4+ T Cells and Offers an Opportunity to Tackle Infection. *Cell Metabolism*, *29*(3), 611-626.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.015>

- Van Harmelen, V., Reynisdottir, S., Eriksson, P., Thörne, A., Hoffstedt, J., Lönnqvist, F., & Arner, P. (1998). Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes*, *47*(6), 913-917. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.6.913>
- Vega-Ramos, J., Alari-Pahissa, E., Valle, J. del, Carrasco-Marín, E., Esplugues, E., Borràs, M., Martínez-A, C., & Lauzurica, P. (2010). CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology & Cell Biology*, *88*(7), 707-715. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.62>
- Verboven, K., Wouters, K., Gaens, K., Hansen, D., Bijnen, M., Wetzels, S., Stehouwer, C. D., Goossens, G. H., Schalkwijk, C. G., Blaak, E. E., & Jocken, J. W. (2018). Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. *Scientific Reports*, *8*(1), 4677. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22962-x>
- Vernon, R. G. (1992). Effects of diet on lipolysis and its regulation. *Proceedings of the Nutrition Society*, *51*(3), 397-408. <https://doi.org/10.1079/PNS19920053>
- Vilahur, G., Ben-Aicha, S., & Badimon, L. (2017). New insights into the role of adipose tissue in thrombosis. *Cardiovascular Research*, *113*(9), 1046-1054. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx086>
- Wajchenberg, B. L. (2000). Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews*, *21*(6), 697-738. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.6.0415>
- Walli, R., Herfort, O., Michl, G. M., Demant, T., Jäger, H., Dieterle, C., Bogner, J. R., Landgraf, R., & Goebel, F. D. (1998). Treatment with protease inhibitors associated with peripheral insulin resistance and impaired oral glucose tolerance in HIV-1-infected patients: *AIDS*, *12*(15), F167-F173. <https://doi.org/10.1097/00002030-199815000-00001>
- Wang, Y., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2005). Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *81*(3), 555-563. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.3.555>
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1796-1808. <https://doi.org/10.1172/JCI200319246>
- Wernstedt Asterholm, I., Tao, C., Morley, T. S., Wang, Q. A., Delgado-Lopez, F., Wang, Z. V., & Scherer, P. E. (2014). Adipocyte Inflammation Is Essential for Healthy Adipose Tissue Expansion and Remodeling. *Cell Metabolism*, *20*(1), 103-118. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.005>
- Wherry, E. J., Teichgräber, V., Becker, T. C., Masopust, D., Kaech, S. M., Antia, R., von Andrian, U. H., & Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature Immunology*, *4*(3), 225-234. <https://doi.org/10.1038/ni889>
- Whigham, L. D., Israel, B. A., & Atkinson, R. L. (2006). Adipogenic potential of multiple human adenoviruses in vivo and in vitro in animals. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *290*(1), R190-R194. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00479.2005>
- Whitney, J. B., Hill, A. L., Sanisetty, S., Penalzoza-MacMaster, P., Liu, J., Shetty, M., Parenteau, L., Cabral, C., Shields, J., Blackmore, S., Smith, J. Y., Brinkman, A. L., Peter, L. E., Mathew, S. I., Smith, K. M., Borducchi, E. N., Rosenbloom, D. I. S., Lewis, M. G., Hattersley, J., ... Barouch, D. H. (2014). Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature*, *512*(7512), 74-77. <https://doi.org/10.1038/nature13594>

- Wieland, C. W., Florquin, S., Chan, E. D., Leemans, J. C., Weijer, S., Verbon, A., Fantuzzi, G., & van der Poll, T. (2005). Pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection in leptin-deficient ob/ob mice. *International Immunology*, 17(11), 1399-1408. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh317>
- Wilairatana, P., Riganti, M., Puchadapirom, P., Punpoowong, B., Vannaphan, S., Udomsangpetch, R., Krudsood, S., Brittenham, G. M., & Looareesuwan, S. (2000). Prognostic significance of skin and subcutaneous fat sequestration of parasites in severe falciparum malaria. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 31(2), 203-212.
- Winkler, T. W., Justice, A. E., Graff, M., Barata, L., Feitosa, M. F., Chu, S., Czajkowski, J., Esko, T., Fall, T., Kilpeläinen, T. O., Lu, Y., Mägi, R., Mihailov, E., Pers, T. H., Rieger, S., Teumer, A., Ehret, G. B., Ferreira, T., Heard-Costa, N. L., ... Loos, R. J. F. (2016). Correction: The Influence of Age and Sex on Genetic Associations with Adult Body Size and Shape: A Large-Scale Genome-Wide Interaction Study. *PLOS Genetics*, 12(6), e1006166. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006166>
- Wolf, A. M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B., & Tilg, H. (2004). Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323(2), 630-635. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.145>
- Wood, I. S., de Heredia, F. P., Wang, B., & Trayhurn, P. (2009). Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity: Symposium on 'Frontiers in adipose tissue biology'. *Proceedings of the Nutrition Society*, 68(4), 370-377. <https://doi.org/10.1017/S0029665109990206>
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., & Spiegelman, B. M. (2012). Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell*, 150(2), 366-376. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016>
- Wurzinger, B., Dünser, M. W., Wohlmuth, C., Deutinger, M. C., Ulmer, H., Torgersen, C., Schmittinger, C. A., Grander, W., & Hasibeder, W. R. (2010). The association between body-mass index and patient outcome in septic shock: A retrospective cohort study. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 122(1-2), 31-36. <https://doi.org/10.1007/s00508-009-1241-4>
- Xie, J. H., Nomura, N., Lu, M., Chen, S.-L., Koch, G. E., Weng, Y., Rosa, R., Di Salvo, J., Mudgett, J., Peterson, L. B., Wicker, L. S., & DeMartino, J. A. (2003). Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(6), 771-780. <https://doi.org/10.1189/jlb.1102573>
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N. H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., ... Kadowaki, T. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 423(6941), 762-769. <https://doi.org/10.1038/nature01705>
- Yin, X., Wang, Z., Wu, T., Ma, M., Zhang, Z., Chu, Z., Hu, Q., Ding, H., Han, X., Xu, J., Shang, H., & Jiang, Y. (2019). The combination of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 levels during primary HIV infection predicts HIV disease progression. *Journal of Translational Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02172-3>

- Yosipovitch, G., DeVore, A., & Dawn, A. (2007). Obesity and the skin: Skin physiology and skin manifestations of obesity. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *56*(6), 901-916. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.12.004>
- Zabel, B. A., Agace, W. W., Campbell, J. J., Heath, H. M., Parent, D., Roberts, A. I., Ebert, E. C., Kassam, N., Qin, S., Zovko, M., LaRosa, G. J., Yang, L.-L., Soler, D., Butcher, E. C., Ponath, P. D., Parker, C. M., & Andrew, D. P. (1999). Human G Protein–Coupled Receptor Gpr-9-6/Cc Chemokine Receptor 9 Is Selectively Expressed on Intestinal Homing T Lymphocytes, Mucosal Lymphocytes, and Thymocytes and Is Required for Thymus-Expressed Chemokine–Mediated Chemotaxis. *Journal of Experimental Medicine*, *190*(9), 1241-1256. <https://doi.org/10.1084/jem.190.9.1241>
- Zatterale, F., Longo, M., Naderi, J., Raciti, G. A., Desiderio, A., Miele, C., & Beguinot, F. (2020). Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Frontiers in Physiology*, *10*, 1607. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01607>
- Zeyda, M., Huber, J., Prager, G., & Stulnig, T. M. (2011). Inflammation Correlates With Markers of T-Cell Subsets Including Regulatory T Cells in Adipose Tissue From Obese Patients. *Obesity*, *19*(4), 743-748. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.123>
- Zhang, L., Guerrero-Juarez, C. F., Hata, T., Bapat, S. P., Ramos, R., Plikus, M. V., & Gallo, R. L. (2015). Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. *Science*, *347*(6217), 67-71. <https://doi.org/10.1126/science.1260972>
- Zhang, N., & Bevan, M. J. (2011). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity*, *35*(2), 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.010>
- Zhang, X., Lam, K. S. L., Ye, H., Chung, S. K., Zhou, M., Wang, Y., & Xu, A. (2010). Adipose Tissue-specific Inhibition of Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  Induces Obesity and Glucose Intolerance by Impeding Energy Expenditure in Mice\*. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(43), 32869-32877. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.135509>
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, *372*(6505), 425-432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>
- Ziegler, S. F., Ramsdell, F., & Alderson, M. R. (1994). The activation antigen CD69. *STEM CELLS*, *12*(5), 456-465. <https://doi.org/10.1002/stem.5530120502>
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., & Hedrick, M. H. (2002). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(12), 4279-4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>
- Zwezdaryk, K. J., Ferris, M. B., Strong, A. L., Morris, C. A., Bunnell, B. A., Dhurandhar, N. V., Gimble, J. M., & Sullivan, D. E. (2016). Human cytomegalovirus infection of human adipose-derived stromal/stem cells restricts differentiation along the adipogenic lineage. *Adipocyte*, *5*(1), 53-64. <https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1119957>