

Université de Lille  
École Doctorale Biologie Santé



Thèse  
Pour l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue par

**Johanna BARTHELEMY**

Le 22 février 2022

**Infections virales respiratoires et tissus adipeux  
blancs : Exemple de la grippe et de la COVID-19**

Devant le jury composé de :

Pr. Steve Lancel	Président du Jury
Dr. Fabienne Fougelle	Rapporteur
Dr. Nicolas Meunier	Rapporteur
Dr. Christine Bourgeois	Examinatrice
Dr. Olivier Pluquet	Examineur
Dr. Isabelle Wolowczuk	Directrice de thèse
Dr. François Trottein	Directeur de laboratoire

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), Institut Pasteur de Lille,  
Inserm U1019, CNRS UMR9017, Université de Lille  
Équipe « Influenza, Immunité et Métabolisme » (I2M)



## Résumé de thèse

Les infections virales respiratoires demeurent un enjeu majeur de santé publique dans le monde entier. C'est notamment le cas de la grippe, causée par les virus influenza, et de la COVID-19, une maladie infectieuse émergente due au virus SARS-CoV-2. De manière notable, les populations les plus à risque de développer des formes sévères de grippe ou de COVID-19, sont les individus obèses et les personnes âgées. Bien que l'obésité et le vieillissement soient associées à des altérations fonctionnelles majeures du tissu adipeux blanc, la participation de ce dernier dans la physiopathologie de la grippe ou de la COVID-19 reste très peu étudiée. Le projet de thèse s'inscrit dans cette thématique générale.

Les travaux récents de notre équipe ont montré, chez la souris, que l'infection par le virus influenza entraîne une reprogrammation métabolique des dépôts sous-cutanés de tissu adipeux blanc, notamment caractérisée par le brunissement du tissu : un phénomène qui correspond à l'émergence d'adipocytes beiges présentant une activité thermogénique accrue. Lors de ma thèse, par des approches expérimentales *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* et *in silico* complémentaires, nous avons montré que la réponse au stress du réticulum endoplasmique induit par l'infection par le virus de la grippe, et plus spécifiquement la voie signalétique PERK, est impliquée dans le brunissement du tissu adipeux blanc. Outre identifier un nouveau mécanisme moléculaire de régulation de la thermogenèse, nos travaux précisent un peu plus la place du tissu adipeux blanc dans l'infection grippale.

En parallèle, nous avons étudié l'impact de l'infection par le virus SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs de hamsters jeunes adultes ou âgés - un modèle préclinique de COVID-19 récemment mis en place dans notre équipe. Nos résultats montrent que l'infection est plus sévère, en termes de morbi-mortalité, chez les animaux âgés que chez les jeunes adultes. L'analyse histomorphométrique des tissus adipeux blancs sous-cutanés et viscéraux a permis de montrer que l'infection par SARS-CoV-2 est associée à une diminution de la taille des adipocytes dans ces deux dépôts ; effet qui persiste uniquement chez les animaux âgés. De manière très intéressante, l'analyse histologique des tissus révèle la présence de nombreuses et larges zones de nécrose adipocytaire (ressemblant aux *crown-like structures* décrites dans les tissus adipeux blancs en contexte d'obésité) uniquement dans les dépôts sous-cutanés de tissu adipeux des animaux âgés, y compris à distance de l'infection. En cela, notre étude confirme et renforce les plus récentes données de la littérature qui décrivent un rôle majeur du tissu adipeux blanc dans la physiopathologie de la COVID-19.

## Thesis summary

Respiratory viral infections remain a major public health issue, worldwide. This is particularly the case with flu, caused by influenza viruses, and COVID-19, an emerging infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus. Importantly, the populations most at risk of developing severe forms of flu or COVID-19 are obese individuals and the elderly. Although obesity and aging are both associated with major functional alterations of the white adipose tissue, the latter's involvement in the pathophysiology of influenza or COVID-19 remains poorly studied. The thesis project falls within this general theme.

Recent work by our team has shown, in mice, that infection with the influenza virus causes metabolic reprogramming of the subcutaneous fat depots, mainly characterized by the browning of the tissue: a phenomenon which corresponds to the emergence of beige adipocytes with increased thermogenic activity. During my PhD, using complementary experimental *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* and *in silico* approaches, we showed that the response to influenza-infection-induced endoplasmic reticulum stress, and more specifically the PERK signaling pathway, is involved in white adipose tissue browning. Besides identifying a novel molecular mechanism that regulates thermogenesis, our work further specifies the role of the white adipose tissue in influenza infection.

In parallel, we studied the impact of infection with the SARS-CoV-2 virus on the white adipose tissues of young adult and old hamsters - a preclinical model of COVID-19 recently implemented in our team. Our results showed that the infection is more severe - in terms of morbidity and mortality - in older animals than in young adults. Histomorphometric analysis of subcutaneous and visceral white adipose tissues showed that infection with SARS-CoV-2 is associated with a decrease in the size of adipocytes in these two depots; an effect that persists only in the older animals. Remarkably, the histological analysis of the tissues reveals the presence of numerous and large areas of adipocyte necrosis (resembling the “crown-like structures” that can be observed in white adipose tissues in the context of obesity) only in the subcutaneous fat depots of the older animals, even at distance from infection. As such, our study confirms and strengthens the most recent data in the literature, which describes a major role of the white adipose tissue in the pathophysiology of COVID-19.

## Remerciements

Je tiens à remercier les Docteurs Fabienne Foufelle et Nicolas Meunier d'avoir accepté d'évaluer notre travail et ma thèse en tant que rapporteurs de thèse. Leurs remarques et suggestions pertinentes et complémentaires m'ont permis d'améliorer et corriger ce document. Le Docteur Fabienne Foufelle nous a permis de maintenir la soutenance de thèse dans des conditions optimales pour moi malgré la situation, merci également pour cela. Merci aux docteurs Christine Bourgeois et Olivier Pluquet de nous avoir accompagnées tout au long de la thèse en tant que membre de jury de mon CSI, de nous avoir guidées et conseillées, et de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineurs. Merci au président du jury, le Professeur Steve Lancel, avec qui nous avons collaboré, et qui nous a aidées à élaborer et réaliser ce projet.

Un grand merci à mon directeur de thèse, le docteur Isabelle Wolowczuk, qui m'a accompagnée pendant ces 3 ans et demi de thèse. Merci de m'avoir montré tous les aspects du métier avec transparence et honnêteté. Ton niveau d'exigence nous fait grandir et devenir de meilleurs chercheurs, et ça tout en douceur !

Je voudrais aussi remercier le docteur François Trottein de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir fait participer à d'autres projets-communs à l'équipe ; devoir s'impliquer dans plusieurs projets à la fois en thèse est un bon entraînement pour nous préparer à nos futures responsabilités.

Merci à Lucie de m'avoir formée et aidée à mon arrivée et pendant la thèse. Merci à Séverine, Marina et Corine pour leurs conseils, surtout en culture cellulaire. Merci à Valentin pour les premières infections de souris. Merci à Gaëlle et Amélie pour leur dur travail sur les Western Blots. Merci à Gemma pour son travail sur le projet COVID qui m'a permis de continuer d'avancer sur le projet grippe, merci de gérer la vie du labo avec moi et merci pour les pauses café. Merci à Charlotte (et Karine avant elle) d'être notre super-héros au quotidien et de gérer tous nos petits soucis administratifs. Merci également à Sophie et Elizabeth de la plateforme de microscopie pour leur aide.

Je voudrais remercier ma famille, en particulier mes parents, qui m'ont poussée jusqu'à ce niveau et m'ont donnée des bagages solides pour avancer dans la vie. Et

non maman, je ne ferais pas des expériences sur tatie même si ce serait utile ! Merci à mes amies qui malgré la distance sont toujours là et qui me trouvent toujours du temps quand je rentre. Merci également aux copains du krav pour votre accueil sur Lille, les séances baston, et d'avoir confirmé la réputation des gens du Nord.

Merci à Pixar, petite boule de poil toute mignonne, pour les pauses jeux de balle, laser et chasse.

Enfin, merci à ma Coraline d'avoir supporté des week ends de travail, d'accepter l'incertitude de l'avenir et de partir à l'aventure avec moi. Ton soutien a été essentiel ces deux dernières années et à grandement participer à ma réussite.

## Table des matières

Préambule .....	15
Introduction .....	17
Chapitre 1 : Les virus influenza et la grippe.....	18
I. Les virus influenza .....	18
1) Les virus influenza : Types, sous-types et variabilité génétique.....	18
2) Virus influenza A : Morphologie, structure et cycle viral.....	21
3) Virus influenza A : Tropismes cellulaire et tissulaire.....	24
II. La grippe humaine : Aspects épidémiologiques, cliniques et immunologiques ..	29
1) Modes de transmission.....	29
2) Symptômes et complications .....	30
3) Populations à risque.....	33
4) Prévention et traitements .....	36
5) Réponse immunitaire dirigée contre le virus de la grippe.....	37
6) Impact de l'infection par IAV sur le métabolisme énergétique .....	46
Chapitre 2 : Les tissus adipeux et le phénomène de brunissement .....	55
I. Les tissus adipeux .....	55
1) Les différents types de tissus adipeux .....	55
2) Rôle central du tissu adipeux blanc dans la physiologie de l'organisme ....	64
II. Brunissement du tissu adipeux blanc.....	68
1) Définition du brunissement du tissu adipeux blanc .....	68

2)	Mécanismes d'induction du brunissement du tissu adipeux blanc .....	69
3)	Le stress du réticulum endoplasmique : un nouvel acteur dans la régulation du brunissement du tissu adipeux blanc ?.....	86
	Chapitre 3 : Le stress du réticulum endoplasmique .....	88
I.	Stress du réticulum endoplasmique et réponse UPR.....	88
1)	Généralités sur le réticulum endoplasmique .....	88
2)	Stress du réticulum endoplasmique et réponses adaptatives.....	89
3)	Rôle de l'UPR dans la physiologie cellulaire .....	92
II.	Stress du réticulum endoplasmique et virus influenza .....	94
1)	Rôle de l'UPR dans les infections virales .....	94
2)	Rôle de l'UPR dans l'infection par le virus influenza A.....	95
	Chapitre 4 : Liens entre le virus influenza, le brunissement du tissu adipeux blanc et le stress du réticulum endoplasmique ?.....	97
I.	L'infection par le virus influenza A induit le brunissement du tissu adipeux blanc ( <i>in vivo</i> ) .....	97
II.	L'infection par le virus influenza initie la différenciation des préadipocytes blancs en adipocytes beiges ( <i>in vitro</i> ).....	99
III.	L'infection par le virus influenza induit un stress du réticulum endoplasmique dans les préadipocytes.....	100
	Objectifs de la Thèse.....	102
	Matériels et méthodes .....	105
	Résultats .....	112

Partie 1 : Contribution du stress du réticulum endoplasmique dans le brunissement du tissu adipeux blanc induit par l'infection .....	113
par le virus influenza A.....	113
I. Stress du réticulum endoplasmique et brunissement du tissu adipeux blanc induit par IAV ( <i>in vivo</i> ).....	113
1) Cinétique du brunissement du tissu adipeux blanc lors de l'infection par IAV	113
2) Évolution de la charge virale tissulaire au cours de l'infection .....	116
3) Induction du stress du réticulum endoplasmique et réponse UPR au cours de l'infection, <i>in vivo</i> .....	117
4) Liens entre virus, UPR et brunissement du tissu adipeux blanc (analyses de corrélations) .....	119
II. Stress du réticulum endoplasmique et thermogénèse des préadipocytes induite par IAV ( <i>in vitro</i> ) .....	124
1) Paramètres d'infection des cellules épithéliales pulmonaires et des préadipocytes, <i>in vitro</i> .....	124
2) Induction du stress du réticulum endoplasmique et réponse UPR au cours de l'infection, <i>in vitro</i> .....	126
3) Rôle de la voie PERK dans le brunissement des préadipocytes, <i>in vitro</i> ..	135
Partie 2 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs.....	142
I. Introduction et rationnel de l'étude .....	142
1) Coronavirus SARS-CoV-2 et COVID-19 .....	142
2) COVID-19 et tissus adipeux blancs : données bibliographiques .....	144

II. Matériels et méthodes .....	146
1) Animaux, virus et protocole d'infection .....	146
2) Procédure expérimentale.....	147
3) Analyse quantitative de l'expression de gènes dans les poumons et les tissus adipeux blancs .....	148
4) Histologie et histomorphométrie des tissus adipeux blancs .....	149
5) Quantification des facteurs sanguins .....	149
6) Analyses statistiques .....	149
III. Résultats .....	149
1) Impact de l'âge sur la sévérité de l'infection par SARS-CoV-2.....	149
2) Impact de l'âge sur les tissus adipeux blancs.....	151
3) Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs .....	155
IV. Discussion.....	162
Discussion générale .....	164
Références bibliographiques.....	179
Annexe .....	224

## Liste des Figures

F1 : Spécificité d'hôtes des virus influenza.....	18
F2 : Représentation schématique de la circulation des virus influenza de type A au cours des 100 dernières années.....	20
F3 : Mécanismes impliqués dans la variabilité génétique des virus influenza.....	20
F4 : Les principales morphologies des IAVs.....	21
F5 : Structure schématisée des IAVs.....	22
F6 : Cycle de réplication des virus influenza de type A.....	23
F7 : Principaux modes de transmission des virus respiratoires, dont les IAVs.....	29
F8 : Symptômes et complications de la grippe.....	31
F9 : Immunité innée et immunité adaptative.....	37
F10 : Détection des PAMPs de différents types de pathogènes par les récepteurs de l'immunité innée.....	36
F11 : Induction de la réponse immune innée dans une cellule infectée par IAV.....	40
F12 : ISGs impliqués dans la réponse antivirale lors de l'infection par IAV.....	41
F13 : Réponse immune pulmonaire altérée chez les obèses.....	45
F14 : Production de l'ATP par l'ATP synthase et la chaîne respiratoire mitochondriale.....	46
F15 : Description du métabolisme énergétique cellulaire.....	48
F16 : Induction de la lipolyse ou de la lipogenèse en fonction de l'apport nutritionnel.....	49
F17 : Utilisation du glucose durant l'inflammation induite par l'infection par IAV - Un mécanisme d'adaptation.....	51
F18 : Rôle des interférons (IFNs) dans les changements du métabolisme cellulaire associés à l'infection par IAV.....	52
F19 : Répartition des différents tissus adipeux chez la souris.....	56
F20 : Répartition des différents tissus adipeux chez l'Homme.....	57
F21 : Découplage de la respiration mitochondriale par UCP1.....	59
F22 : Caractéristiques principales des adipocytes bruns, blancs et beiges.....	60
F23 : Le tissu adipeux de la moelle osseuse.....	61
F24 : Le tissu adipeux « rose ».....	62
F25 : Origine des adipocytes blancs, bruns et beiges.....	63
F26 : Fonctions des adipokines.....	64
F27 : Composition en cellules immunes du tissu adipeux en condition mince ou obèse.....	66
F28 : Histologie du tissu adipeux beige.....	68
F29 : Induction du brunissement du tissu adipeux blanc.....	69
F30 : Contrôle du brunissement par le système nerveux sympathique.....	70
F31 : Modifications des cellules immunes du tissu adipeux blanc en contexte d'obésité.....	72
F32 : Rôle du système immunitaire dans le brunissement du tissu adipeux blanc.....	73
F33 : Rôle des hormones thyroïdiennes dans le brunissement du tissu adipeux blanc.....	76
F34 : Répression de l'action des hormones thyroïdiennes sur les adipocytes en contexte d'obésité.....	77
F35 : Rôle du FGF21 dans le brunissement du tissu adipeux blanc.....	78

F36 : Facteurs impliqués dans le brunissement du tissu adipeux blanc.....	82
F37 : Principaux facteurs de transcriptions impliqués dans le brunissement du tissu adipeux blanc.....	83
F38 : Régions régulatrices du promoteur d'UCP1.....	84
F39 : Cycle futile des triacylglycérols (TAG) dans les adipocytes.....	85
F40 : Schéma des mécanismes et facteurs impliqués dans le brunissement du TAB.....	87
F41 : Structure et fonctions du réticulum endoplasmique.....	88
F42 : Les 3 branches de la réponse UPR : IRE1a, ATF6 et PERK.....	90
F43 : Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans la régulation de l'inflammation .....	93
F44 : L'infection par le virus de la grippe induit le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané, 7 jours post-infection.....	98
F45 : Présence d'ARN viral dans le tissu adipeux sous-cutané, 7 jours post-infection.....	99
F46 : L'infection de préadipocytes par IAV induit l'expression des gènes thermogéniques.....	100
F47 : L'infection de préadipocytes par IAV induit des modifications structurales du réticulum endoplasmique.....	100
F48 : Détermination de la cinétique du brunissement du SCAT induit par IAV par analyse histologique.....	114
F49 : Expression de gènes liés au brunissement au cours de l'infection par IAV.....	115
F50 : Évolution de la charge virale dans les tissus de souris infectées par IAV.....	116
F51 : Induction d'un stress du RE dans les poumons et les tissus adipeux blancs au cours de l'infection par IAV.....	118
F52 : Liens corrélatifs entre la détection de l'ARN viral, l'expression des gènes relatifs au brunissement et l'induction des gènes de l'UPR dans le SCAT.....	119
F53 : Évolution de la charge virale dans les cellules épithéliales pulmonaires et les préadipocytes.....	124
F54 : Impact de l'infection par IAV sur la viabilité des cellules épithéliales pulmonaires et des préadipocytes.....	125
F55 : Impact de l'infection par IAV sur l'expression de gènes pro-apoptotiques, dans les cellules épithéliales pulmonaires et les préadipocytes.....	123
F56 : Expression des gènes de l'UPR dans les préadipocytes et cellules épithéliales pulmonaires infectés par IAV.....	127
F57 : Activation de l'UPR dans les préadipocytes traités avec un inducteur du stress du RE.....	129
F58 : Expression du gène <i>Ucp1</i> lors d'un stress du réticulum endoplasmique dans les préadipocytes.....	130
F59 : Liens corrélatifs entre la détection de l'ARN viral, l'expression des gènes relatifs au brunissement et l'induction des gènes de l'UPR, dans les préadipocytes infectés par IAV .....	130
F60 : Identification de sites putatifs de fixation pour ATF4, ATF3 et CHOP dans la séquence régulatrice du promoteur du gène <i>Ucp1</i> .....	136
F61 : Les différentes kinases qui phosphorylent eIF2 $\alpha$ .....	137
F62 : Expression de <i>Pkr</i> dans les préadipocytes infectés par IAV ou traités à la tunicamycine.....	137
F63 : Efficacité des siRNA.....	138

F64 : Impact de l'inhibition de facteurs de la voie PERK sur l'expression du gène <i>Ucp1</i> , dans le modèle de préadipocytes traités à la tunicamycine .....	139
F65 : Impact de l'inhibition de facteurs de la voie PERK sur l'expression du gène <i>Ucp1</i> par les préadipocytes infectés par IAV.....	140
F66 : Image de coronavirus en microscopie électronique.....	143
F67 : Dates marquantes de la progression de l'infection par SARS-CoV-2.....	144
F68 : Procédure expérimentale de l'étude de l'impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs.....	147
F69 : Paramètres cliniques associés à l'infection par SARS-CoV-2 chez des hamsters jeunes adultes vs. Agés.....	150
F70 : Impact de l'âge sur la taille des adipocytes des tissus adipeux sous-cutanés et viscéraux.....	151
F71 : Impact de l'âge sur le métabolisme des acides gras du tissu adipeux sous-cutané.....	152
F72 : Impact de l'âge sur le métabolisme des acides gras du tissu adipeux viscéral..	152
F73 : Impact de l'âge sur les cellules immunes des tissus adipeux blancs.....	153
F74 : Impact de l'âge sur le statut inflammatoire des tissus adipeux blancs.....	154
F75 : Figure 75 : Impact de l'âge sur la sénescence des tissus adipeux blancs.....	154
F76 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur la taille des adipocytes du tissu adipeux sous-cutané.....	155
F77 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur la taille des adipocytes du tissu adipeux viscéral.....	156
F78 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur le métabolisme lipidique du tissu adipeux sous-cutané.....	157
F79 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur le métabolisme lipidique du tissu adipeux viscéral.....	158
F80 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les cellules immunes du tissu adipeux sous-cutané.....	159
F81 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les cellules immunes du tissu adipeux viscéral.....	159
F82 : Quantification du génome viral dans les tissus adipeux blancs.....	160
F83 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur l'histologie des tissus adipeux blancs.....	161
F84 : Modèle proposé de <i>régulation de la thermogénèse par PERK lors de l'infection par IAV</i> .....	170
F85 : Variation du taux de T4 sanguin de souris infectées par IAV.....	173
F86: Crown-like structures (CLS).....	175
F87 : Cyst-like structures.....	175

## Liste des Tableaux

T1 : Tropisme cellulaire des virus influenza de type A.....	26
T2 : Tropisme tissulaire des virus influenza de type A.....	27-28
T3 : Liste des gènes impliqués dans l'activation des différentes voies UPR (IRE1a, PERK et ATF6).....	117
T4 : Corrélations significatives dans les SCATs, 4 jours post-infection.....	120
T5 : Corrélations significatives dans les SCATs, 7 jours post-infection.....	121
T6 : Corrélations significatives dans les SCATs, 14 jours post-infection.....	122
T7 : Prédipocytes infectés à 0,25 MOI pendant 4 heures : corrélations significatives.....	132
T8 : Prédipocytes infectés à 0,25 MOI pendant 6 heures : corrélations significatives.....	133
T9 : Prédipocytes infectés à 0,25 MOI pendant 24 heures : corrélations significatives.....	134
T10 : Séquences des amorces (sens et anti-sens) utilisées dans l'étude.....	148

## Liste des Abréviations

**ADCC** Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)  
**ADP** Adénosine diphosphate  
**AMPK** Protéine kinase AMP dépendante  
**ARNc** ARN complémentaire  
**ARNm** ARN messenger  
**ATF** Facteur de transcription activateur  
**ATP** Adénosine triphosphate  
**BAT** Tissu adipeux brun (*brown adipose tissue*)  
**CLS** *Crown-like structure*  
**CYLS** *Cyst-like structure*  
**DC** Cellule dendritique  
**EWAT** Tissu adipeux épидидymal  
**HA** Hémagglutinine  
**IAV** Virus influenza de type A (*influenza A virus*)  
**IFN** Interféron  
**ILC** Cellule lymphoïde innée  
**IRE1** *Inositol-requiring enzyme 1*  
**ISG** Gènes stimulés par l'interféron (*interferon-stimulated genes*)  
**JNK** Janus kinase  
**MAPK** *Mitogen-activated kinase*  
**NA** Neuraminidase  
**NK** *Lymphocyte natural killer*  
**NP** Nucléoprotéine  
**vRNP** Complexe ribonucléoprotéique viral (*viral ribonucleoprotein*)  
**PAMP** Motif moléculaire associé aux pathogènes (*pathogen-associated molecular pattern*)  
**PERK** *PKR-like ER protein kinase*  
**PKR** Protéine kinase activée par l'ARN  
**PRR** Récepteur de l'immunité innée (*pattern recognition receptor*)  
**RE** Réticulum endoplasmique  
**SCAT** Tissu adipeux sous-cutané (*subcutaneous adipose tissue*)  
**T3** Tri-iodothyronine  
**T4** Thyroxine  
**TA** Tissu adipeux  
**TAB** Tissu adipeux blanc  
**TCA** Acide tricarboxylique  
**TLR** Récepteur de type Toll (*Toll-like receptor*)  
**T reg** Lymphocyte T régulateur  
**UCP1** Protéine découplante 1 (*uncoupling protein 1*)  
**UPR** Réponse des protéines non repliées (*unfolded protein response*)  
**VAT** Tissu adipeux viscéral  
**WAT** Tissu adipeux blanc (*white adipose tissue*)

# Préambule

Ce travail de thèse s'est inscrit dans la continuité des travaux de l'équipe, qui a mis en évidence le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané lors de l'infection de souris par le virus influenza [H3N2]. L'infection de préadipocytes (précurseurs des adipocytes présents dans le tissu adipeux) induit l'expression des gènes liés au brunissement et provoque des modifications morphologiques des cellules, notamment un changement de structure du réticulum endoplasmique, suggérant que l'infection induit un stress du réticulum endoplasmique (Ayari et al., 2020). Le stress du réticulum endoplasmique est proposé par la littérature comme un nouveau régulateur du brunissement. L'objectif de mon projet de thèse a donc été de déterminer la contribution du stress du réticulum endoplasmique dans le brunissement du tissu adipeux blanc induit lors de l'infection par le virus influenza A. Dans le manuscrit, nous présentons une Introduction divisée en 4 chapitres (influenza, tissu adipeux, stress du réticulum endoplasmique, liens entre influenza/tissu adipeux/stress du réticulum endoplasmique), puis les Objectifs de la thèse sont listés avant de détailler les Résultats obtenus.

La pandémie de COVID-19 a débuté au cours de la réalisation de cette thèse. Notre équipe, étant spécialisée dans les infections respiratoires, s'est naturellement impliquée dans la recherche sur le SARS-CoV-2. Comme pour la grippe, les personnes obèses (en excès de tissu adipeux) sont plus à risque de développer des formes sévères de SARS-CoV-2. C'est pourquoi, lors de ma thèse nous avons déterminé les effets de l'infection par le SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs de hamsters jeunes adultes ou âgés infectés. Dans le manuscrit, cette partie est organisée sous forme d'article avec une brève introduction avant la présentation des résultats.

Une discussion générale est présentée, qui reprend les données et avancées obtenues à l'issue de la réalisation des deux aspects de mon travail de thèse, et propose des modèles d'interprétation et des perspectives.

# Introduction

---

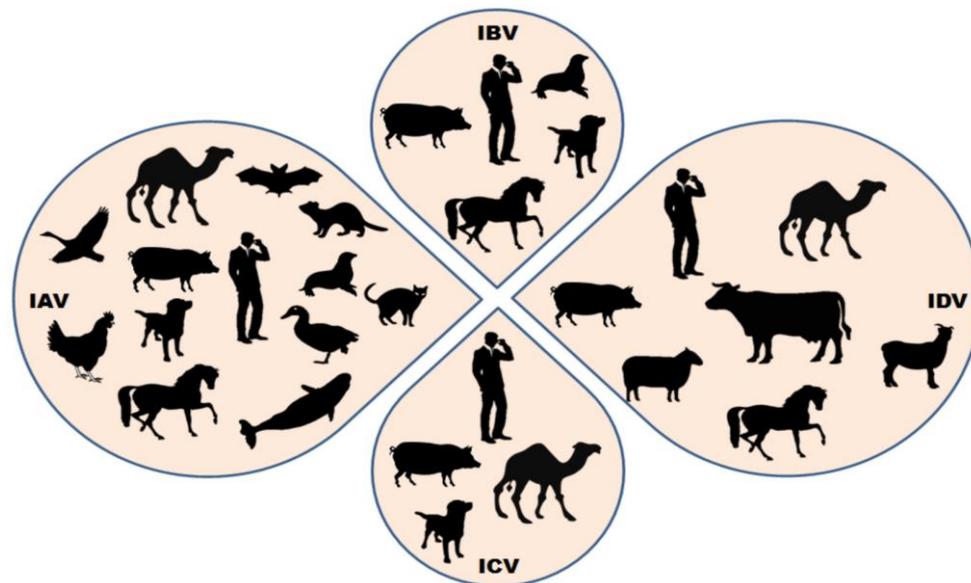
# Chapitre 1 : Les virus influenza et la grippe

---

## I. Les virus influenza

### 1) Les virus influenza : Types, sous-types et variabilité génétique

Les virus influenza, responsables d'infections respiratoires aiguës, appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* qui comprend elle-même 7 genres : les *Influenzavirus* (A-D), les *Thogotovirus*, les *Isavirus* et les *Quaranjavirus* (Bravo-Vasquez and Schultz-Cherry, 2021). Les virus influenza sont des virus à ARN monocaténaire de polarité négative (ARN(-)), segmentés (7 ou 8 segments) et enveloppés (Taubenberger and Kash, 2010). On distingue quatre **types** de virus influenza sur la base de l'antigénicité de la nucléoprotéine virale NP et de la protéine de matrice M : les types A (appartenant au genre *alphainfluenza*), B (appartenant au genre *betainfluenza*), C (appartenant au genre *gammainfluenza*) et D (appartenant au genre *deltainfluenza*), qui infectent des espèces animales différentes (**Figure 1**).



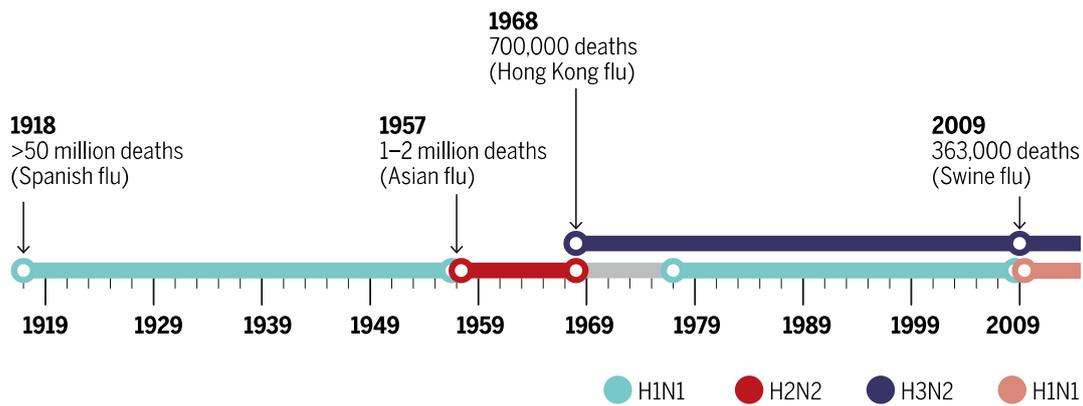
**Figure 1 : Spécificité d'hôtes des virus influenza.** Représentation des espèces infectées par les différents types de virus influenza. IAV : virus influenza de type A, IBV : virus influenza de type B, ICV : virus influenza de type C, et IDV : virus influenza de type D. Tiré de Asha and Kumar, 2019.

Les virus influenza de type A ont un spectre d'hôtes relativement étroit, majoritairement limité à une ou quelques espèces animales comme les porcs, les chevaux et les oiseaux aquatiques sauvages (canards, oies, etc.); ces derniers constituant leurs réserves naturelles (Parrish et al., 2015; Webster et al., 1992). Selon l'hôte d'origine, on parlera alors de virus aviaires, porcins ou autres. Bien qu'en règle générale les virus influenza de type A soient incapables d'infecter l'Homme, on observe régulièrement des événements de franchissement de barrière d'espèces favorisés par la grande variabilité des virus influenza ; un aspect qui sera détaillé dans la dernière partie de ce paragraphe (page 17).

Contrairement aux virus de type A, les virus influenza de type B et de type C sont presque exclusivement spécifiques de l'espèce humaine. Enfin, les virus influenza de type D, récemment identifiés et proches des virus du type C, sont retrouvés principalement chez les bovins et les ovins (Hause et al., 2013; Long et al., 2019; Roquilly and Trottein, 2017; Wohlgemuth et al., 2018).

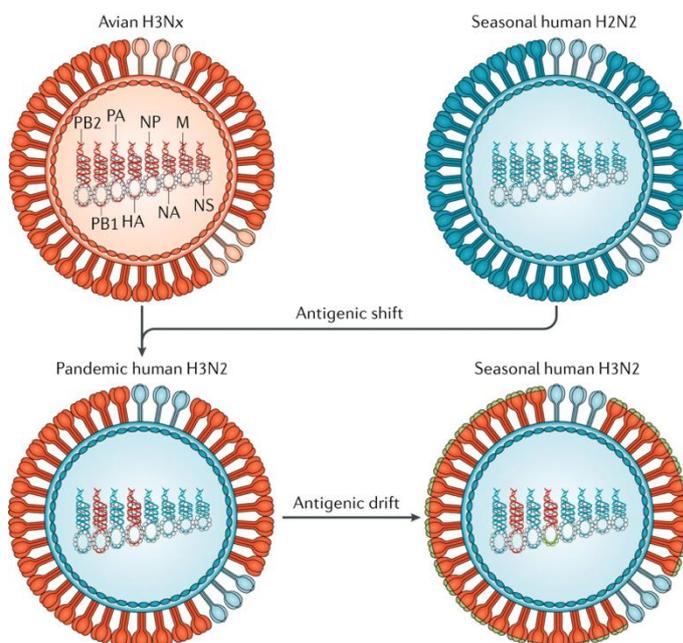
Seuls les virus influenza de type A et B sont responsables des épidémies annuelles chez l'Homme, les virus de type C et D ne causant que des syndromes grippaux peu sévères (fièvre et toux), rarement notifiés. En santé humaine, les virus influenza de type A sont prépondérants car ils provoquent les épidémies et les pandémies les plus importantes (Taubenberger and Morens, 2010).

La nomenclature des virus grippaux décrit successivement le type viral, l'hôte d'origine, le lieu d'isolement, le numéro de souche, et l'année d'isolement (exemple : A/Moscow/10/99) (Krammer et al., 2018). Pour les virus influenza de type A (IAV), les différents **sous-types** sont définis selon la combinaison des deux glycoprotéines de surface – l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N). A l'heure actuelle, 18 hémagglutinines (H1 à H18) et 11 neuraminidases (N1 à N11) ont été identifiées pour lesquelles 198 combinaisons seraient possibles et 131 ont été retrouvées parmi les virus isolés à partir d'hôtes infectés (Asha and Kumar, 2019; CDC, 2019). Seules les combinaisons [H17N10] et [H18N11] n'ont été identifiées que chez la chauve-souris (Tong et al., 2013; Wu et al., 2014). L'Homme peut être infecté par des virus aviaires et d'autres virus zoonotiques, tels que les virus aviaires de sous-types [H2N2], [H5N1], [H7N9], [H3N8] et [H9N2], et les virus porcins de sous-types [H1N1] et [H3N2], comme le montre la **Figure 2** qui illustre les principales pandémies grippales des cent dernières années, y compris la plus récente, ayant eu lieu en 2009 [H1N1].



**Figure 2 : Représentation schématique de la circulation des virus influenza de type A au cours des 100 dernières années.** Les dates des pandémies majeures sont indiquées : 1918 ; la grippe espagnole ([H1N1]), 1957 ; la grippe asiatique ([H2N2]), 1968 ; la grippe de Hong- Kong ([H3N2]), 1977 ; la grippe russe ([H1N1]), et 2009 ; la grippe porcine ([H1N1]). Le nombre de décès lors des pandémies est précisé. Tiré de Taubenberger et al., 2019.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les virus influenza possèdent une **très grande plasticité génétique**, ce qui leur permet de s'adapter très rapidement à un nouvel hôte. Il existe deux mécanismes responsables de la variabilité génétique des virus influenza : les glissements antigéniques (*antigenic drift*) et les cassures antigéniques (*antigenic shift*) (**Figure 3**, Bouvier and Palese, 2008; Kim et al., 2018; Krammer et al., 2018).



**Figure 3 : Mécanismes impliqués dans la variabilité génétique des virus influenza.**

Les glissements (*drift*) et les cassures (*shift*) antigéniques. Les glissements antigéniques sont causés par des mutations ponctuelles.

Les cassures antigéniques sont dues à des recombinaisons entre des segments génomiques entre deux virus au sein de la même cellule hôte. Tiré de Krammer et al., 2018.

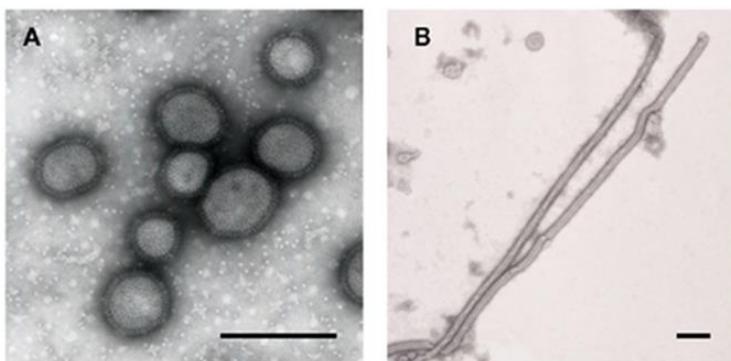
Les glissements (ou dérives) antigéniques résultent de mutations ponctuelles créées par les erreurs commises lors de la réplication virale, conduisant à l'apparition de nouveaux variants viraux, et potentiellement à l'émergence de nouvelles épidémies. Ceci est dû au fait que l'ARN polymérase virale ne possède pas de mécanisme de relecture lui permettant de corriger ses erreurs (Shao et al., 2017).

Beaucoup plus rares que les glissements antigéniques, les cassures antigéniques entraînent des modifications radicales de l'antigénicité des virus influenza. La cassure antigénique se produit à la suite d'un réarrangement génétique entre des virus humains et zoonotiques, et consiste en l'échange de segments génomiques entre les deux virus au sein d'une même cellule infectée. Les nouveaux virus ainsi créés sont généralement responsables des pandémies, dont les pandémies de [H1N1] en 1918 et 2009 (Krammer et al., 2018; More et al., 2018).

## 2) Virus influenza A : Morphologie, structure et cycle viral

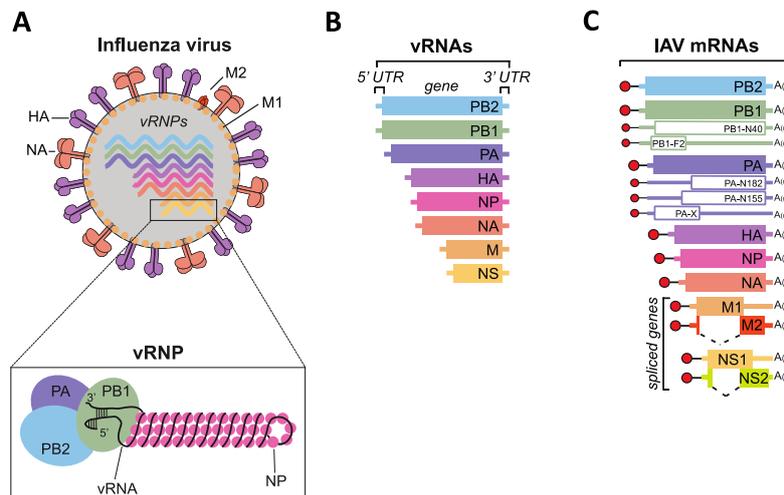
### a) Morphologie et structure des virus influenza de type A

Les virus influenza de type A (IAV) sont majoritairement de forme sphérique (diamètre de 100 à 130 nm) mais ils peuvent également présenter une morphologie filamenteuse (longueur de 250 nm) (**Figure 4**). Les formes sphériques sont généralement caractéristiques des souches virales de laboratoire alors que les formes filamenteuses sont plus fréquemment retrouvées dans les isolats provenant d'hôtes infectés (Noda, 2012). Le rôle de la morphologie des particules virales dans la pathogénèse reste actuellement mal connu et très débattu (Al-Mubarak et al., 2015; Conceição, 2019; Peiris et al., 2009).



**Figure 4 : Les principales morphologies des IAVs.** (A) Virus de forme sphérique. (B) Virus de forme filamenteuse. Vues au microscope électronique. Les barres représentent 200 nm. Modifié à partir de Noda, 2012.

Structurellement, les IAVs sont constitués de 8 segments d'ARN simple brin négatif (alors que les genres C et D ne contiennent que 7 segments (Bouvier and Palese, 2008; Ducatez et al., 2015)), codant 10 protéines essentielles (notamment les protéines de structure et l'ARN polymérase) et plusieurs protéines accessoires, dont le nombre est variable selon les souches. L'enveloppe virale est composée de lipides provenant de la cellule hôte infectée, de protéines virales (l'hémagglutinine (HA), la neuraminidase (NA) et la protéine M2), ainsi que de protéines de l'hôte (Shaw et al., 2008). Sous l'enveloppe virale se trouve la capside composée de la protéine de matrice M1. La capside renferme le génome viral qui est organisé sous la forme de complexes viraux ribonucléoprotéiques (vRNP). Les vRNPs sont constitués par les 8 segments d'ARN viraux associés à plusieurs nucléoprotéines (NP) et à un complexe polymérase formé par les protéines PB1, PB2 et PA (**Figure 5**).

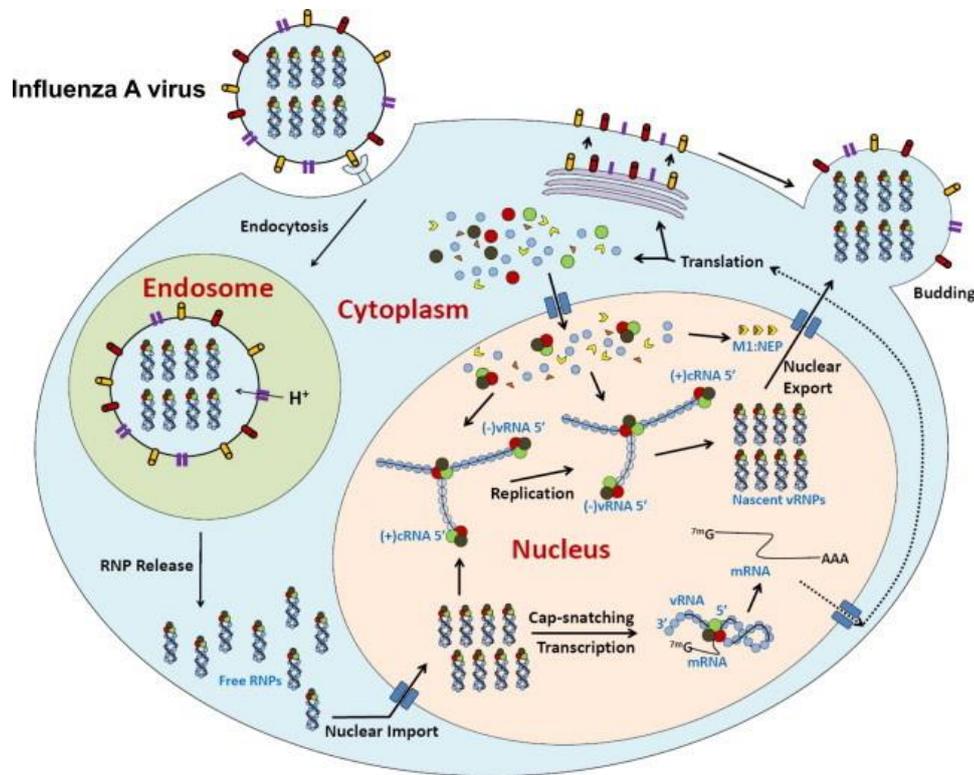


**Figure 5 : Structure schématisée des IAVs.** (A) Structure du virus : les protéines membranaires HA, NA et M2 sont représentées ainsi que les 8 complexes viraux ribonucléoprotéiques (vRNPs) et la protéine de matrice M1. L'agrandissement montre la composition d'un vRNP. (B) Schéma des 8 segments d'ARN du génome viral (vRNAs). (C) Représentation des ARN messagers (mRNAs) qui seront traduits en protéines virales : les rectangles indiquent les segments d'ARN viraux codant les protéines essentielles (rectangles colorés) et accessoires (rectangles transparents). Modifié d'après Dou et al., 2018.

## b) Cycle de répllication des virus influenza de type A

Le cycle de répllication des IAVs se divise en différentes étapes : entrée du virus dans la cellule hôte, transport des vRNPs dans le noyau cellulaire, transcription et répllication du génome viral, exportation des vRNPs du noyau, et assemblage et

bourgeoisement de nouvelles particules virales (virions) ((Zheng and Tao, 2013), **Figure 6**).



**Figure 6 : Cycle de répliation des virus influenza de type A.** Les différentes étapes du cycle viral des IAVs sont représentées : l'entrée du virus dans la cellule hôte, le transport dans l'endosome, la libération des vRNPs dans le cytoplasme et leur importation dans le noyau, la répliation virale dans le noyau, l'exportation des vRNPs du noyau vers le cytoplasme et le bourgeoisement, puis le relargage d'un nouveau virion dans le milieu extracellulaire. Tiré de Zheng W. & Tao Y. 2013.

L'infection d'une cellule commence par la fixation du virus à la surface de cette dernière par la reconnaissance spécifique entre la glycoprotéine virale HA et les acides sialiques des protéines membranaires présentes à la surface de la cellule cible. Le virus est alors internalisé dans la cellule par endocytose (ou par une voie alternative, la macropinocytose (Vries et al., 2011; Wang and Jiang, 2009)) puis véhiculé vers le noyau à l'intérieur d'un endosome. Les endosomes se déplacent à la périphérie de la cellule (mécanisme dépendant de l'actine) puis en direction du noyau (mécanisme dépendant de la dynéine et des microtubules) (Lakadamyali et al., 2003; Luo, 2012). Le pH acide au sein de l'endosome (pH 5) active la protéine M2 (canal ionique), ce qui conduit à l'acidification de l'intérieur du virus, et à une modification conformationnelle de HA qui va permettre la fusion de l'enveloppe virale et de la

membrane de l'endosome. L'acidification permet également la dissociation des vRNPs de la protéine M1, les vRNPs sont alors relargués dans le cytoplasme. Une séquence de localisation nucléaire (NLS : *nuclear localisation sequence*) présente dans la protéine NP permet aux vRNPs d'être dirigés vers le noyau et de s'associer avec l'importine- $\alpha$ . L'importine- $\alpha$  est ensuite reconnue par l'importine- $\beta$  qui permet l'importation nucléaire des vRNPs (Dou et al., 2018). La réplication virale a ensuite lieu dans le noyau. Le génome viral n'est pas directement codant (contrairement au génome des virus à ARN de polarité positive), c'est pourquoi le virus contient une ARN polymérase ARN-dépendante qui permet la production, d'une part, d'un ARN messager (ARNm) viral qui est nécessaire pour la synthèse des protéines virales, et d'autre part, d'un ARN complémentaire (ARNc) qui sert de modèle pour la réplication du génome viral. L'ARNm viral a les mêmes caractéristiques que les ARNm cellulaires : une coiffe à l'extrémité 5' et une queue poly(A) à l'extrémité 3'. La coiffe est ajoutée aux ARNms viraux par le phénomène de « *cap-snatching* » : la coiffe des ARNms cellulaires est clivée et utilisée pour l'initiation de la transcription de l'ARNm viral (Dou et al., 2018; Plotch et al., 1979). Le nouvel ARN viral, ainsi que les protéines virales PB1, PB2, PA et NP qui ont été synthétisées dans le cytoplasme et importées dans le noyau, s'associent pour former les vRNPs qui sont exportés du noyau suite à des interactions avec les protéines M1 et NS2. Les vRNPs sont ensuite transportés à la membrane plasmique (mécanisme dépendant de Rab11) où les nouveaux virions se forment avant le bourgeonnement et la libération de nouvelles particules virales (Amorim et al., 2011; de Castro Martin et al., 2017; Neumann et al., 2000; Zheng and Tao, 2013). La neuraminidase, de par sa capacité à cliver les acides sialiques, permet aux particules virales d'être détachées de la cellule après bourgeonnement.

### 3) Virus influenza A : Tropismes cellulaire et tissulaire

De façon générale, le tropisme d'un virus définit l'ensemble des cellules dites « cibles » : cellules sensibles et permissives à l'infection par ce virus. Le connaître permet donc de déterminer la ou les espèces animales pouvant être infectées (*cf.* paragraphe 1) ainsi que le ou les organes/tissus cibles.

Les virus influenza A pénètrent par le nez et la bouche et vont principalement infecter les cellules épithéliales des voies respiratoires (à la fois supérieures et inférieures). L'hémagglutinine virale assure la reconnaissance et l'attachement des

virus grippaux aux récepteurs présents à la surface des cellules cibles, ce qui initie l'infection. Plus précisément, l'hémagglutinine se fixe aux acides sialiques situés à l'extrémité des chaînes de glycoprotéines ou glycolipides membranaires (Dou et al., 2018). La spécificité de liaison entre hémagglutinine et acides sialiques est notamment déterminée par le type de liaison entre le carbone 2 de l'acide sialique et le dernier carbohydate de la chaîne glycosidique (galactose) : la liaison de type  $\alpha$ 2-3 (sial-2,3) se fait avec le carbone 3 du galactose et la liaison  $\alpha$ 2-6 (sial-2,6) avec le carbone 6. Ainsi, il a été montré que les virus ayant une glycoprotéine de surface H1, H2 ou H3 se fixent préférentiellement au sial-2,6 tandis que les virus ayant une glycoprotéine de surface H5 se fixent au sial-2,3. De façon générale, les virus aviaires se lient plutôt au sial-2,3 et les virus des mammifères se lient au sial-2,6 (Byrd-Leotis et al., 2017; McCullough et al., 2012). Chez l'homme, une grande quantité des sialyloligosaccharides terminés par la liaison sial-2,6 est présente sur les cellules de l'épithélium du tractus respiratoire supérieur. Les cellules portant des sialyloligosaccharides terminés par la liaison sial-2,3 se trouvent quant à elles dans la partie basse du tractus respiratoire (Shinya et al., 2006).

#### *Tropisme cellulaire des IAVs*

Outre les cellules épithéliales des voies respiratoires, les IAVs peuvent également infecter de nombreux types cellulaires tels que des cellules immunes, à la fois innées et adaptatives (Bedi et al., 2018; Manicassamy et al., 2010; Samarasinghe et al., 2017; Steurman et al., 2018) et, de façon intéressante, des cellules adipeuses (adipocytes et préadipocytes) (Ayari et al., 2020; Bouwman et al., 2008) ; les IAVs possèdent donc un tropisme cellulaire relativement varié. Les types cellulaires ayant été montrés dans la littérature comme pouvant être infectés par les IAVs sont présentés dans le **Tableau 1**, page suivante.

Organe/tissu	Matériel viral détecté	Souche virale	Cycle viral	Modèle animal	Références
Cellules épithéliales (voies respiratoires, intestins, cerveau, rein)	Antigène NP ARN viral Antigène NP Virus (FFU) RT-qPCR	H7N1 H3N2 H1N1 H5N1	Complet*	Furet Homme Porc Singe Chien	Chaves et al., 2011; Hemann et al., 2016; Li et al., 2009a; Richard et al., 2020; Wu et al., 2016
Cellules endothéliales	Antigène NP RT-qPCR Virus (TCID50)	H7N1 H7N7 H3N2	Complet*	Poulet Homme	Armstrong et al., 2012; Chaves et al., 2011, 2014; Van Riel et al., 2009
Neurones	Antigène NP Antigène M1 RT-qPCR Virus (TCID50)	H7N1 H1N1 H5N1 H2N3 H7N9	Complet (selon souche)	Poulet Souris Homme Rat	Chaves et al., 2011, 2014; Landreau et al., 2012; Li et al., 2009a; Marreiros et al., 2020; Ng et al., 2010, 2018; Schlesinger et al., 1989; Suarez et al., 1998
Astrocytes	Antigène NP RT-qPCR Virus (TCID50)	H7N1 H1N1	Complet (selon souche)	Poulet Homme	Chaves et al., 2011; Ng et al., 2010, 2018
Cardiomyocytes	Antigène NP Virus-GFP	H5N1 H7N7 H1N1 mutant H1N1	Complet*	Poulet Souris Homme Rat	Filgueiras-Rama et al., 2021; Kenney et al., 2021; Suarez et al., 1998; Van Riel et al., 2009
Cellules dendritiques (conventionnelles et plasmacytoïdes)	ARN viral RT-PCR Marquage intracellulaire anti-IAV HA Antigène NP RT-qPCR Virus (PFU)	H5N7 H1N1 H7N7 H2N2 H3N2 H5N1	Incomplet (pas de production de virions)	Souris Homme	Hao et al., 2008; Hemann et al., 2016; López et al., 2000; Thitithayanont et al., 2007; VanOosten Anderson et al., 2010; Vogel et al., 2010
Monocytes Macrophages	Antigène NP Antigène HA Marquage fluorescent Marquage anti-IAV Virus (PFU) RT-qPCR Autoradiogrammes	H3N2 H5N1 H1N1	Incomplet (non réplicatif)	Homme Souris Poulet	Carmona et al., 2011; Hoeve et al., 2012; Li et al., 2009a; Mock et al., 1987; Muramoto et al., 2006; Reading et al., 2000; Suarez et al., 1998; Thitithayanont et al., 2007; Wells et al., 1978
Cellules NK	Protéine M2 Antigène NP	H1N1	Complet*	Souris Homme	Guo et al., 2009; Mao et al., 2009
Eosinophiles	Antigène NP Antigène PB1	H1N1	Complet*	Souris	Samarasinghe et al., 2017
Neutrophiles	Antigène NP ARN viral	H1N1	?	Souris	Hufford et al., 2012
Lymphocytes (T et B)	RT-qPCR Autoradiogrammes Antigène NP	H1N1 H5N1	?	Homme Souris	Hufford et al., 2012; Li et al., 2009a; Mock et al., 1987
Préadipocytes Adipocytes	Antigène HA ARN viral Marquage fluorescent	H3N2 H1N1	Incomplet (pas de production de virions)	Souris Homme	Ayari et al., 2020; Bouwman et al., 2008

**Tableau 1 : Tropisme cellulaire des virus influenza de type A.** Les différents types cellulaires permissifs à l'IAV sont indiqués, avec les souches virales étudiées, l'état du cycle viral et l'espèce d'origine des cellules.

Complet\* : Pas d'information sur la production de virion, le virus est réplicatif.

### *Tropisme tissulaire des IAVs*

Concernant le tropisme tissulaire des IAVs, les poumons sont évidemment le principal tissu cible. Cependant, d'autres tissus/organes ont été identifiés comme sites d'infection, voire de réplication, des IAVs; c'est notamment le cas des tissus adipeux (Ayari et al., 2020). On peut également retrouver des particules virales, des antigènes viraux et/ou du génome viral dans la rate, les intestins, le foie, le cœur et le thymus (Ibricevic et al., 2006; Nishimura et al., 2000; Sellers et al., 2017; Uiprasertkul et al., 2005) (**Tableau 2**).

Organe/tissu	Matériel viral détecté	Souche virale	Cycle viral	Modèle animal	Références
Nez	Antigène NP Virus (TCID <sub>50</sub> )	H3N2 H1N1 H5N1 H7N1	Complet	Furet Poulet Homme	Brand et al., 2012; Chaves et al., 2011; Richard et al., 2020
Trachée	Antigène NP ARN viral Virus (PFU)	H1N1 H5N1	Complet	Furet Souris Macaque Marmoset	Brand et al., 2012; Iwatsuki- Horimoto et al., 2018; Kamiya et al., 2020; Kobasa et al., 2007
Poumons	Antigène NP ARN viral Virus (PFU, FFU, EID <sub>50</sub> et marquage anti IAV) RT-PCR RT-qPCR	H1N1 H3N2 H5N1 H7N2 H7N7 H5N2 H5N3	Complet	Furet Souris Homme Macaque Marmoset Poulet	Ayari et al., 2020; Brand et al., 2012; Fislová et al., 2009; Harms et al., 2010; Horsfall and Lennette, 1940; Ito et al., 2002; Iwatsuki- Horimoto et al., 2018; Keeler et al., 2018; Kobasa et al., 2007; Liu et al., 2014a; Muramoto et al., 2006; Tavares et al., 2017; Van Riel et al., 2009; Vogel et al., 2010; Zhang et al., 2019a
Cerveau	Antigène NP Antigène M1 Virus (TCID <sub>50</sub> , FFU, EID <sub>50</sub> ) ARN viral	H5N1 H1N1 H7N1 H3N2 H7N7 H5N2 H5N3	Complet (selon souche +/- réplicatif)	Furet Poulet Homme Souris Marmoset	Brand et al., 2012; Chaves et al., 2011, 2014; Fislová et al., 2009; Hosseini et al., 2018; Ito et al., 2002; Iwatsuki- Horimoto et al., 2018; Muramoto et al., 2006; Schlesinger et al., 1989; Simon et al., 2013; Vogel et al., 2010
Tissus adipeux blancs (SCAT>VAT)	Antigène HA	H3N2 H5N1	Incomplet	Souris	Ayari et al., 2020; Nishimura et al., 2000
Rate	Virus (TCID <sub>50</sub> , PFU, FFU, immunomarquages) Démonstration indirecte* RT-PCR	H5N1 H1N1 H3N2 H5N2 H7N7	Complet*	Furet Souris Macaque Marmoset Poulet	Boyden et al., 2012; Brand et al., 2012; Fislová et al., 2009; Iwatsuki- Horimoto et al., 2018; Kobasa et al., 2007; Muramoto et al., 2006; Turner et al., 2013; Van Riel et al., 2009; Vogel et al., 2010

Ganglions lymphatiques (trachéo-bronchial, médiastinal, péri-bronchial)	Antigène NP Virus (TCID <sub>50</sub> , FFU) Démonstration indirecte* RT-PCR	H1N1 H3N2 H5N1 H2N2 H7N7 H5N2	Complet*	Furet Souris	Boyden et al., 2012; Brand et al., 2012; Turner et al., 2013; VanOosten Anderson et al., 2010; Vogel et al., 2010
Intestins	Virus (TCID <sub>50</sub> ) ARN viral Antigène NP EID <sub>50</sub> RT-qPCR	H5N1 H3N2 H2N2/H3N2 H5N3 H7N7	Complet*	Furet Homme Canard Marmoset Poulet	Brand et al., 2012; Hatta et al., 2002; Hirose et al., 2016; Ito et al., 2002; Iwatsuki-Horimoto et al., 2018; Shu et al., 2010; Suarez et al., 1998; Van Riel et al., 2009; Webster et al., 1978
Foie	Virus (TCID <sub>50</sub> , PFU) Antigène NP	H1N1 H5N1 H7N2 H3N2 H7N7	Complet*	Furet Souris Marmoset Poulet	Brand et al., 2012; Fislóvá et al., 2009; Iwatsuki-Horimoto et al., 2018; Muramoto et al., 2006; Paget et al., 2012; Zhang et al., 2019a
Cœur	Virus (TCID <sub>50</sub> , PFU) NEP (ARNm) Antigène NP EID <sub>50</sub> Immunofluorescence RT-PCR	H1N1 et H1N1 mutant H5N1 H3N2 H7N7	Complet*	Furet Souris Macaque Marmoset Poulet	Brand et al., 2012; Filgueiras-Rama et al., 2021; Fislóvá et al., 2009; Iwatsuki-Horimoto et al., 2018; Kenney et al., 2021; Kobasa et al., 2007; Kotaka et al., 1990; Muramoto et al., 2006; Suarez et al., 1998; Van Riel et al., 2009
Reins	Virus (TCID <sub>50</sub> , EID <sub>50</sub> ) ARN viral RT-PCR Antigène NP	H5N1 H3N2 H1N1 H4N8 H7N7 H5N3	Complet*	Furet Souris Marmoset Homme Poulet	Brand et al., 2012; Carmona et al., 2011; Fislóvá et al., 2009; Ito et al., 2002; Iwatsuki-Horimoto et al., 2018; Muramoto et al., 2006; Suarez et al., 1998; Swayne and Slemmons, 1992; Van Riel et al., 2009
Pancréas	Virus (EID <sub>50</sub> )	H5N1 H5N3 H7N7	Complet*	Poulet	Ito et al., 2002; Van Riel et al., 2009
Amygdales (Palatines)	Virus (TCID <sub>50</sub> , FFU et PFU) Antigène NP	H1N1 H3N2 H5N1 H7N7 H5N2	Complet*	Furet Macaques	Brand et al., 2012; Kobasa et al., 2007
Thymus	RT-PCR Virus (FFU) RT-qPCR	H3N2 H1N1 H5N2 H7N7	Complet*	Souris	Fislóvá et al., 2009; Liu et al., 2014a; Vogel et al., 2010
Glandes surrénales	Virus (TCID <sub>50</sub> )	H5N1	Complet *	Furet Poulet	Brand et al., 2012; Suarez et al., 1998

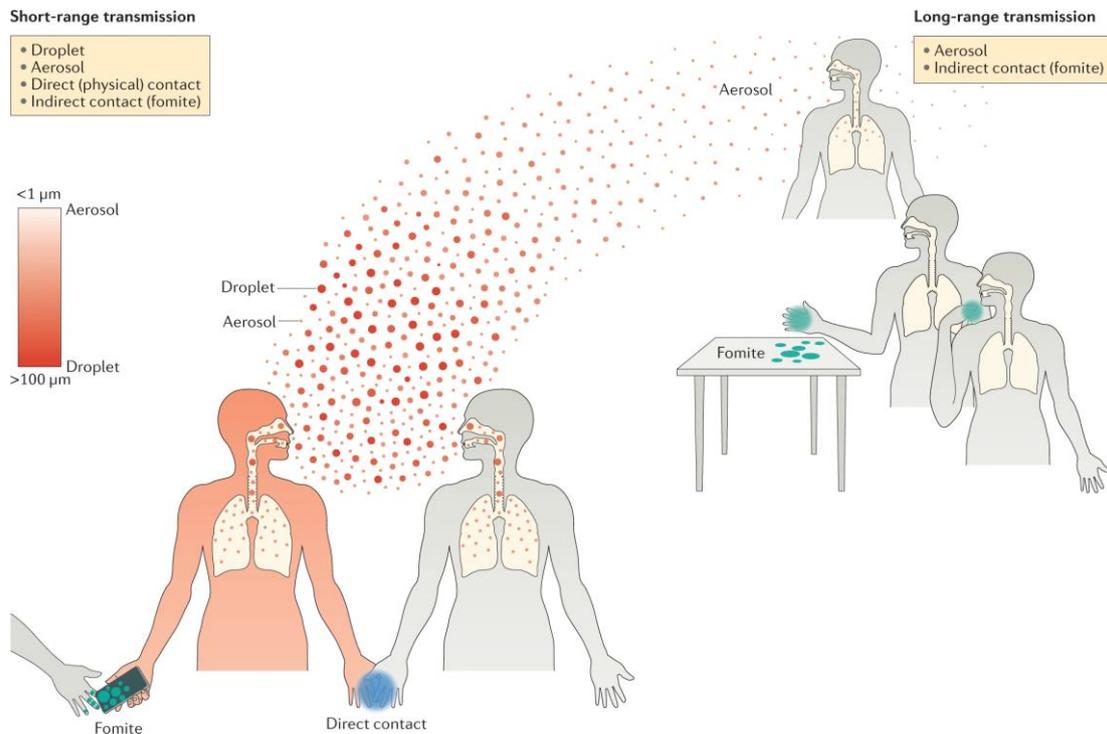
**Tableau 2 : Tropisme tissulaire des virus influenza de type A.** Les différents tissus pouvant contenir des IAVs lors d'une infection sont indiqués, ainsi que les souches d'IAV, l'état du cycle cellulaire et les espèces concernées. Démonstration indirecte : La génération de centres germinatifs dans les différents tissus suggère la présence d'antigène viral d'après les auteurs.

Complet\* : Pas d'information sur la production de virion, le virus est répliatif.

## II. La grippe humaine : Aspects épidémiologiques, cliniques et immunologiques

### 1) Modes de transmission

La grippe est une infection respiratoire aiguë très contagieuse. La transmission interhumaine du virus se fait principalement par voie aérienne *via* des microgouttelettes excrétées par des sujets infectés lorsqu'ils parlent, toussent ou éternuent. La contamination peut également se faire par un contact rapproché avec une personne infectée, voire même par contact avec une surface touchée par une personne infectée (Leung, 2021) (**Figure 7**).



**Figure 7 : Principaux modes de transmission des virus respiratoires, dont les IAVs.** Un individu infecté (rouge) peut libérer des virus lorsqu'il parle, tousse ou éternue, et peut également contaminer les objets ou les surfaces qu'il touche (*fomite*). Si un individu non infecté (gris) est proche du sujet infecté, le touche ou touche les surfaces ou objets contaminés par ce dernier, la transmission du virus peut avoir lieu (*short-range transmission*). Ces modes de transmission peuvent également avoir lieu même si le sujet non infecté est à distance du sujet infecté (*long-range transmission*). Tiré de Leung, 2021.

Les individus grippés excrètent du virus à partir de 24 heures avant le début des symptômes et jusqu'à 7 jours après le début des signes cliniques (5 jours en moyenne), sauf chez les patients immunodéprimés, les enfants ou les individus obèses pour lesquels l'excrétion peut être de plus longue durée et qui, donc, demeurent contagieux plus longtemps (Carrat et al., 2008; Klimov et al., 1995; Kumar, 2017; Maier et al., 2018; Vries et al., 2013).

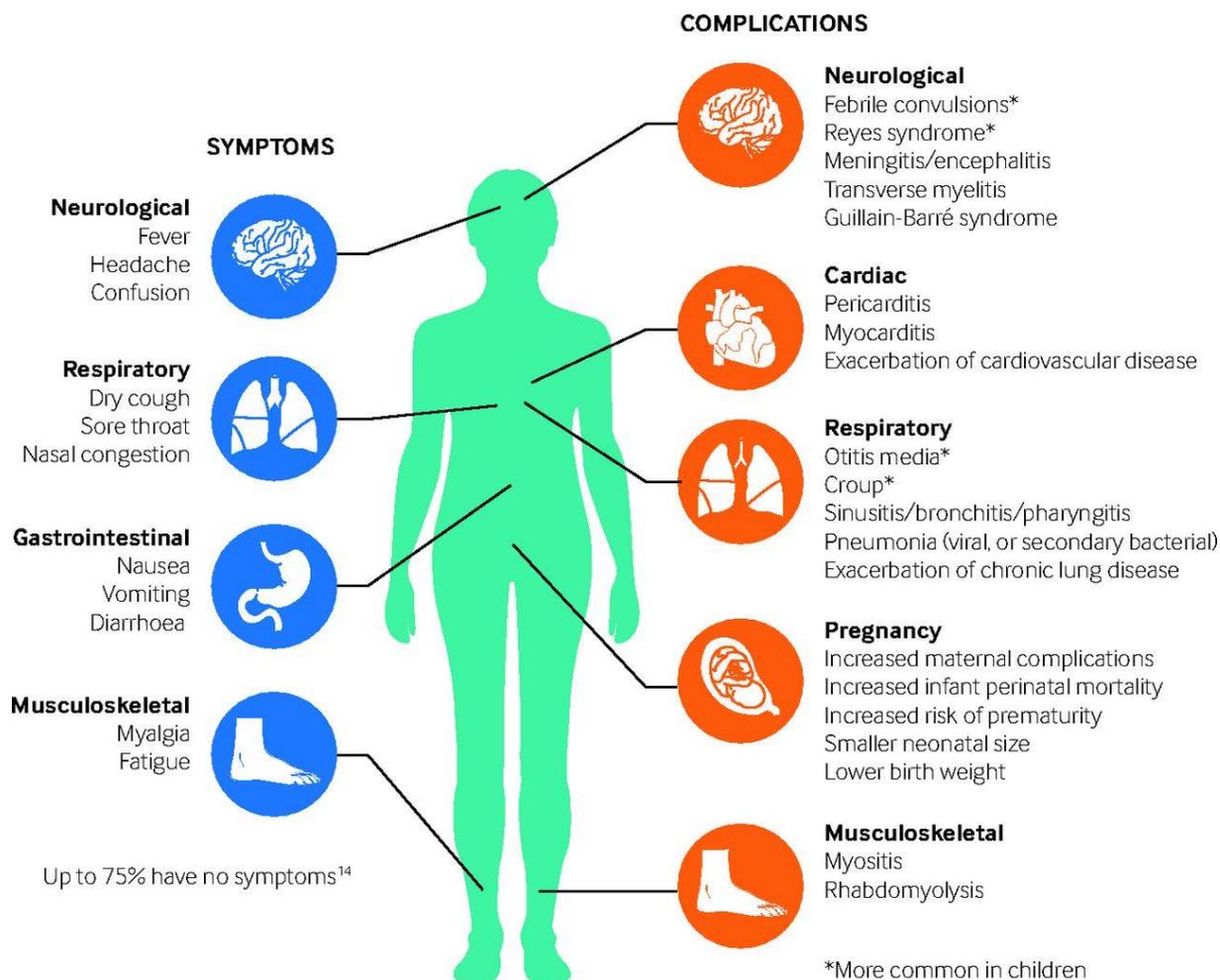
Bien que généralement bénigne, la grippe reste une préoccupation importante de santé publique, et ce, dans le monde entier. En effet, l'OMS estime que lors des épidémies saisonnières il y a entre 3 et 5 millions de cas sévères, et entre 290 000 et 650 000 décès liés à des défaillances respiratoires provoquées par la grippe. Outre le fait de demeurer une menace majeure pour la santé publique, la grippe représente également un problème médico-économique important en raison du très grand nombre de personnes touchées et des coûts résultants (arrêts maladie, soins).

## 2) Symptômes et complications

Les signes cliniques de la grippe sont très divers, allant de l'absence de symptômes à des formes sévères (**Figure 8**, panel gauche).

Après une phase initiale de multiplication virale (correspondant à la période d'incubation, qui dure de 1 à 2 jours), les symptômes suivants vont apparaître brutalement : toux sèche, écoulement nasal, fièvre élevée, céphalée, fatigue importante, myalgie, et tachycardie (Rothberg and Haessler, 2010).

Lors de pandémies, plus rarement lors des épidémies saisonnières, on peut également observer chez certains patients (en particulier les enfants) des troubles intestinaux tels que vomissement et diarrhées (Peteranderl et al., 2016). Ces symptômes disparaissent généralement au bout d'une semaine, à l'exception de l'asthénie qui peut persister plusieurs semaines. Chez la plupart des individus la guérison survient en quelques jours. Cependant, des complications peuvent survenir chez des populations plus fragiles comme les immunodéprimés, les personnes âgées, les nourrissons, et les femmes enceintes, ainsi que chez les personnes présentant des pathologies annexes (CDC, 2021a; Cocoros et al., 2014; Kerkhove et al., 2011; Martínez et al., 2019; Memoli et al., 2014; Rodríguez-Rieiro et al., 2012) (**Figure 8**, panel droit).



**Figure 8 : Symptômes et complications de la grippe.** Les symptômes sont présentés sur le panel gauche, les complications, sur le panel droit. Tiré de Ghebrehewet et al., 2016.

Le développement de complications est responsable de la majorité des décès chez les patients grippés. Il s'agit à la fois de complications pulmonaires et de complications affectant d'autres organes.

Il y a deux types de **complications pulmonaires** : les bronchites et les pneumonies (d'origine virales et/ou bactériennes) pouvant conduire au syndrome de détresse respiratoire aigüe (Kumar, 2017; Rothberg and Haessler, 2010). Les pneumonies d'origine bactériennes sont causées par des surinfections par *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* ou *Staphylococcus aureus* survenant 4 à 7 jours après le début de l'infection grippale (Morris et al., 2017; Roquilly and Trottein, 2017). L'épithélium respiratoire, fragilisé suite à l'invasion par le virus de la grippe, devient une porte d'entrée pour ces bactéries. Durant la

pandémie de grippe de 1918 (grippe espagnole), la majorité des patients décédés présentaient une co-infection bactérienne (Morens et al., 2008).

Les pneumonies virales, quant à elles, sont beaucoup plus rares et directement dues à l'infection primaire avec le virus influenza. Elles évoluent rapidement vers un syndrome de détresse respiratoire aigüe (Rello and Pop-Vicas, 2009; Shah and Wunderink, 2017). En effet, l'inflammation des poumons (notamment des structures alvéolaires et capillaires) qui découle de l'infection virale (ou surinfection post-grippale) peut être trop forte et provoquer des dégâts tissulaires, une augmentation de la perméabilité pulmonaire avec apparition d'un œdème, et conduire à une perte de fonction respiratoire induisant le syndrome de détresse respiratoire aigüe (Salihefendic et al., 2015).

Les **complications extra-pulmonaires** survenant pendant ou après une infection grippale sont relativement rares. Cependant, le lien direct avec la grippe n'a pas forcément été démontré (Sellers et al., 2017). Il s'agit de complications affectant les organes / tissus suivants :

- Le cœur : Lors d'épidémie de grippe il y a une augmentation des décès dus à des problèmes cardiovasculaires ; défaillance cardiaque, myocardite, ischémie, et risque d'accident vasculaire cérébral augmenté.
- Les yeux : conjonctivite, syndrome d'effusion uvéale\*, rétinopathies, névrite optique. Elles peuvent être induites par une infection directe de la conjonctive par le virus influenza.
- La gorge, le nez et les oreilles (sphère ORL) : otites, sinusites.
- Le cerveau : différentes encéphalopathies, syndrome de Guillain-Barré\*, encéphalomyélite aiguë disséminée\*, narcolepsie, syndrome de Reye\*. Les complications neurologiques sont plus courantes chez les enfants.
- Les muscles squelettiques : la rhabdomyolyse (destruction des cellules musculaires).
- Le foie : les complications hépatiques sont plus fréquentes dans des cas de grippe sévère.
- Les reins : granulonéphrite aigüe.
- Le tissu sanguin : Thromboses, syndrome hémolytique urémique\* et thrombocytopenie purpura thrombotique\* (rarement reportées), syndrome hémophagocytaire\*.

\***Syndrome d'effusion uvéale** : Extravasation de liquide à partir des vaisseaux de la choriocapillaire de l'œil. Provoque perte de vue et/ou vision floue.

\***Syndrome de Guillain-Barré** : Altération des nerfs périphériques par le système immunitaire. Provoque picotements, faiblesse musculaire, perte de sensation dans les membres, paralysie possible.

\***Encéphalomyélite aiguë disséminée** : Maladie auto-immune provoquant une démyélinisation du système nerveux central. Elle provoque faiblesse musculaire, trouble de la sensibilité, de l'équilibre et de la coordination, baisse de vision etc...

\***Syndrome de Reye** : Encéphalopathie aiguë associée à une infiltration graisseuse du foie. Elle provoque vomissements, amnésie, troubles de la vision et de l'audition, convulsions, agitation et désorientation, coma possible.

\***Syndrome hémolytique urémique** : Dû à une infection par *Escherichia Coli* produisant des shigatoxines ou des verotoxines. Caractérisé par des diarrhées sanglantes pouvant conduire à une anémie hémolytique (destruction des hématies), une thrombopénie, et une insuffisance rénale aiguë.

\***Thrombocytopénie purpura thrombotique** : Formation de nombreux petits caillots sanguins empêchant l'afflux du sang dans les organes vitaux.

\***Syndrome hémophagocytaire** : Activation anormale des macrophages qui filtrent le sang et phagocyte son contenu. Entraîne une altération de l'état général, une hépatite, pancytopenie (anémie, thrombopénie et leucopénie), hypofibrinémie et hyperferritinémie.

### 3) Populations à risque

Certaines populations sont plus à risque de développer des formes sévères de grippe, associées ou non à des complications, et nécessitant une hospitalisation. Ces populations subissent les plus forts taux de mortalité lors des épidémies et des pandémies grippales.

L'**âge** (notamment les âges « extrêmes » *i.e.* < 6 ans et ≥65 ans) est le premier facteur de risque lors des épidémies grippales. Chez les nouveau-nés et les jeunes enfants, la plus forte susceptibilité face à la grippe peut être expliquée par l'immaturité du système immunitaire et, en conséquence, l'absence de mémoire immunitaire face aux virus. Une étude a montré que lors d'une infection grippale les enfants produisent des anticorps uniquement dirigés contre la souche d'infection, alors que les adultes ont une production d'anticorps de spécificités plus larges, pouvant protéger contre différentes souches grâce à la réactivation de leur mémoire immunitaire et du phénomène de réactivité croisée (*i.e.* reconnaissance de plusieurs souches virales par un même anticorps) (Meade et al., 2020). De nombreuses données épidémiologiques montrent que chez les très jeunes enfants (0-59 mois), il y a plus d'hospitalisations et de mortalité chez les enfants de moins de 6 mois lors des périodes de grippe. Or les vaccins contre la grippe ne sont pas autorisés pour les enfants en bas âge (< 6 mois) ; ils restent donc une population fragile face à la grippe (Rasmussen et al., 2012). En plus d'être plus susceptibles à l'infection, les enfants sont par ailleurs d'importants vecteurs de contamination de la grippe puisqu'ils

peuvent excréter le virus jusque 10 jours après infection (contre 7 pour un jeune-adulte) (Kumar, 2017).

Les personnes âgées ( $\geq 65$  ans) sont également plus sensibles à l'infection par le virus de la grippe pour plusieurs raisons : les altérations anatomiques et physiologiques liées à l'âge, la présence de comorbidités (pathologies cardiorespiratoires, diabète, obésité...), et le vieillissement du système immunitaire (immunosénescence) qui se caractérise par un défaut de réponse aux nouveaux antigènes, un défaut de mise en place et maintien de la mémoire immunologique, une augmentation des réactions auto-immunes et une inflammation chronique (« *inflammaging* ») (Chinn et al., 2012; Fulop et al., 2018). En effet, il est plus fréquent chez les personnes âgées de retrouver des pathologies qui sont également des facteurs de risque face à la grippe ce qui accroît leur vulnérabilité. De plus, la vaccination des personnes âgées est moins protectrice que pour d'autres populations car leurs réponses cellulaires et humorales sont réduites avec l'âge (Jiang et al., 2011; Nakaya et al., 2015; Powers et al., 1989). Il a été montré que dans les poumons de souris âgées le virus est éliminé plus tardivement que chez des souris jeunes. Les souris âgées ont moins de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'hémagglutinine et ont une production de cytokines et chimiokines altérée et retardée, ce qui induit un recrutement tardif de cellules immunes (notamment granulocytes et cellules dendritiques) dans les poumons. De même l'activation des cellules immunes pulmonaires (cellules dendritiques et macrophages) est retardée chez les souris âgées (Toapanta and Ross, 2009) et le nombre et les fonctions des macrophage alvéolaires sont altérés, ce qui rend les souris plus susceptibles à l'infection par IAV (Wong et al., 2017).

Dans la population jeune-adulte (de 6 à 64 ans), c'est la présence de **comorbidités** chez les individus qui fait augmenter le risque de développer des formes sévères de grippe. Parmi ces comorbidités il y a les pathologies cardiaques ou rénales, les désordres métaboliques dont le diabète et l'obésité, et les états d'immunodépression (rencontrés chez des patients greffés, traités pour un cancer, ou des patients présentant le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)). Les patients immunodéprimés ont d'ailleurs la particularité d'excréter le virus plus longtemps que des personnes immunocompétentes (19 jours en moyenne contre 6 pour un patient non immunodéprimé) (Memoli et al., 2014).

Les femmes enceintes font également partie des populations à risque de complications sévères au cours de la grippe (Cox et al., 2004). Pendant la **grossesse**, les femmes enceintes subissent des changements physiologiques qui les rendent plus vulnérables aux infections, en particulier lors du second et troisième trimestre de grossesse. Elles ont notamment une consommation d'oxygène plus élevée associée à une capacité pulmonaire réduite, ce qui, dans le cadre d'une infection respiratoire, peut conduire plus facilement à des cas de détresse respiratoire. D'un point de vue immunitaire, les femmes enceintes ont une balance immune en faveur de la réponse humorale ce qui les rend plus susceptibles aux infections. Cependant, lors d'une infection par IAV (souche [H1N1] de 2009), elles ont une production d'IgG et IgG2 plus faible et une réponse inflammatoire plus forte (en termes de production de cytokines (et d'activation) par les cellules *Natural Killer* (NK) et lymphocytes T) que les femmes non-enceintes. Ce dérèglement immunitaire pourrait expliquer leur propension à développer des complications (notamment des surinfections bactériennes) lors d'une infection grippale. En plus d'être un risque pour les femmes enceintes, la grippe peut également avoir un impact sur le fœtus. Lors des pandémies de grippe, on peut notamment constater une augmentation des fausses couches et des naissances prématurées (Rasmussen et al., 2012; Somerville et al., 2018).

Enfin, le **poids corporel** est un facteur de risque important associé au développement de complications lors de la grippe. Lors de la pandémie de 2009, l'obésité (définie chez les adultes par un indice de masse corporelle (IMC)  $\geq 30$ ) a été identifiée comme la comorbidité la plus fréquemment associée aux formes sévères de grippe (1 cas sur 3). Les études chez la souris montrent que, chez les animaux obèses, l'infection grippale dure plus longtemps (10 jours contre 6-7 en général), qu'il y a un défaut de réparation de l'épithélium pulmonaire qui favorise le développement de complications (œdème et surinfections) et qu'il y a une altération de la réponse immune (le paragraphe **5d**, page 41, sera dédié à la réponse immune anti-grippale chez les individus obèses) (Honce and Schultz-Cherry, 2019; Louie et al., 2011; Meliopoulos et al., 2019; O'Brien et al., 2012). De plus, une étude suggère que l'infection de personnes obèses favoriserait l'émergence de souches plus virulentes car leur réponse interféron est plus faible, et ne permettrait pas de contrôler l'infection (Honce et al., 2020). Les individus obèses sont également plus contagieux car ils excrètent du virus plus longtemps et en émettent en plus grande quantité dans

l'air (Luzi and Radaelli, 2020). De façon intéressante, un poids corporel trop faible (IMC <18,5) est également un facteur de risque de développer des formes sévères de grippe (Moser et al., 2019).

#### 4) Prévention et traitements

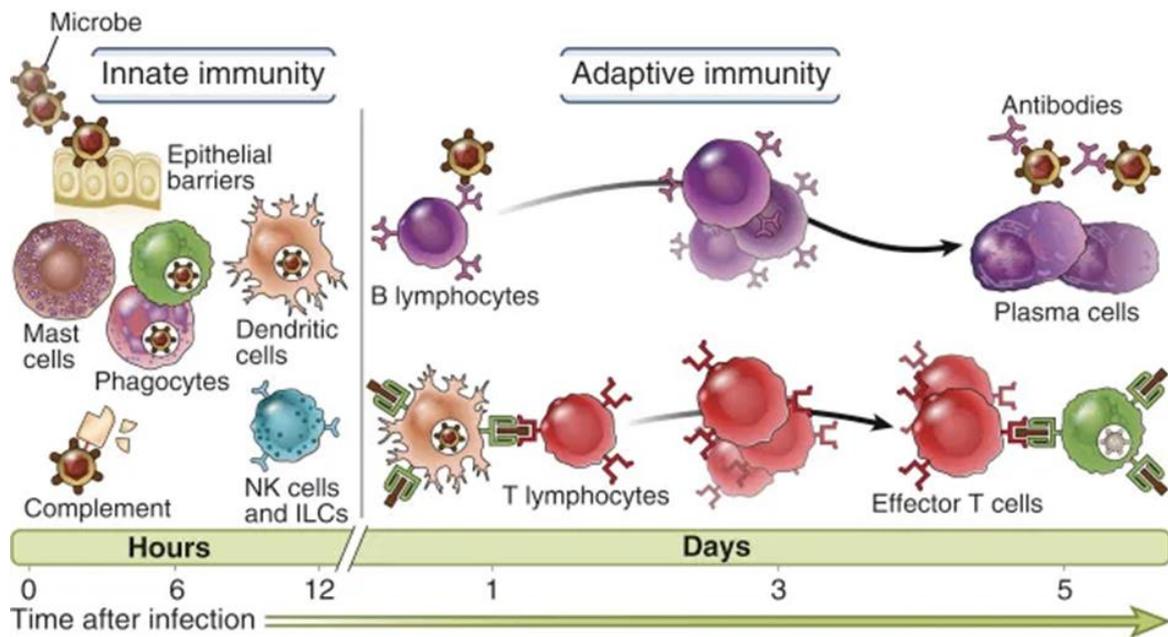
Pour traiter les infections par IAVs, l'utilisation d'antiviraux est notamment recommandée dès la détection de l'infection dans les populations fragiles. Il existe différentes classes d'antiviraux qui ont été ou sont encore utilisées aujourd'hui. Les adamantanes (amantadine et rimantadine) inhibent l'action de la protéine virale M2, empêchant ainsi la libération du virion dans le cytoplasme (Abed and Boivin, 2006). Les adamantanes ne sont plus des molécules recommandées actuellement car les souches circulantes d'IAVs y sont devenues résistantes (ECDC,2021). La seconde classe d'antiviraux utilisés pour traiter les infections par IAVs est constituée des inhibiteurs de la protéine virale NA (zanamivir, oseltamivir et peramivir). Ces inhibiteurs empêchent le clivage entre les acides sialiques et les glycoprotéines virales (HA et NA) et cellulaires, altérant ainsi la libération des virions en dehors de la cellule (Abed and Boivin, 2006; CDC, 2021b). Enfin le baloxavir marboxil est un inhibiteur de l'endonucléase dépendante de la coiffe 5' ; il permet de réprimer la transcription des ARNs viraux (CDC, 2021b).

Le meilleur moyen de lutte contre les infections par IAVs, notamment chez les populations fragiles, est la vaccination. Trois formes de vaccins contre les IAVs sont commercialisées : les vaccins avec le pathogène inactivé, les vaccins avec le pathogène atténué et les vaccins recombinants. Tous les vaccins visent à favoriser la production d'anticorps anti-HA, et sont multivalents : ils contiennent des éléments des virus influenza de types A et B qui sont supposés circuler lors de la prochaine saison (Houser and Subbarao, 2015). Cependant, l'efficacité des vaccins actuels dans certaines populations fragiles (jeunes enfants et personnes âgées) est insuffisante (Kim et al., 2021). De ce fait, de nombreuses autres stratégies vaccinales sont à l'étude telles que l'utilisation de vecteurs viraux, des vecteurs à ADN, les VLP (*virus-like particles*), l'utilisation d'autres adjuvants ou encore le développement de vaccins basés sur l'ARNm (Houser and Subbarao, 2015; Kim et al.; Lee and Ryu, 2021).

## 5) Réponse immunitaire dirigée contre le virus de la grippe

### a) Immunité innée et immunité adaptative : Généralités

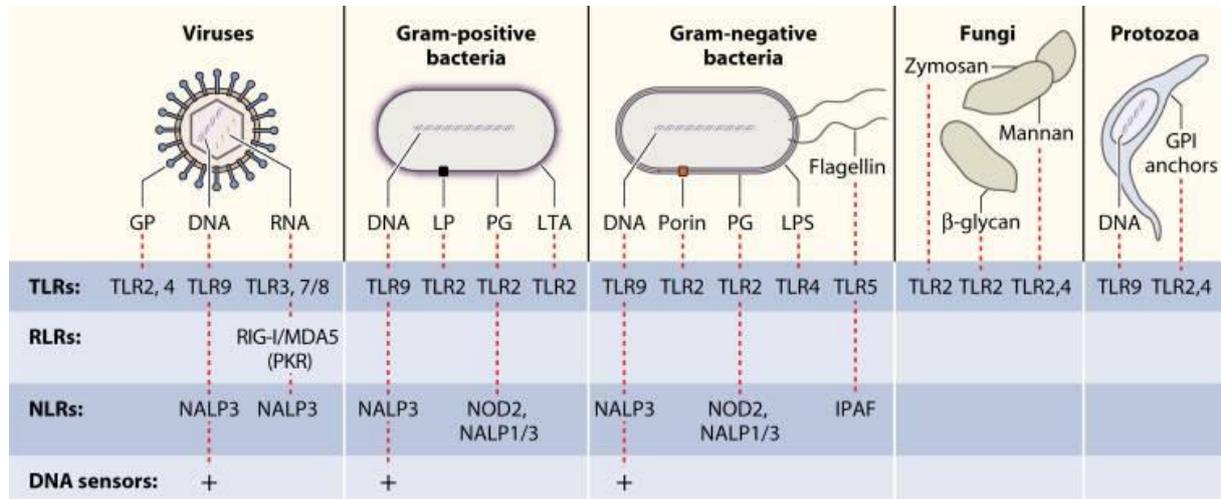
Il est habituel de distinguer, de manière simplifiée, l'immunité innée de l'immunité adaptative (**Figure 9**).



**Figure 9 : Immunité innée et immunité adaptative.** L'immunité innée comprend les barrières naturelles telles que les cellules épithéliales, et de nombreuses cellules immunes : cellules dendritiques, phagocytes (macrophages, neutrophiles, éosinophiles, basophiles, mastocytes), lymphocytes T invariants NK et cellules lymphoïdes innées (ILCs), ainsi que le système du complément. L'immunité adaptative est constituée des lymphocytes B et T. Tiré de Abbas et al., 2014.

L'**immunité innée** constitue la première ligne de défense vis-à-vis des agents pathogènes. Rapide et de courte durée, elle est majoritairement assurée par les cellules phagocytaires (macrophages, monocytes, neutrophiles, cellules dendritiques, cellules lymphoïdes innées (ILCs)) et les lymphocytes NK, ainsi que par le système du complément, et son activation conduit à la production des interférons. Les cellules de l'immunité innée expriment des récepteurs « spécialisés », appelés PRRs (*Pattern recognition receptors*), qui reconnaissent divers composés microbiens, appelés PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) (Mogensen, 2009). Plusieurs familles de PRRs existent : les NLRs (*NOD-like receptors*), les RLRs (*RIG-I-like helicases*) et les TLRs (*Toll-like receptors*), qui sont les plus étudiés (Almatrouk et

al., 2021; Carrat et al., 2008; Ferrandon et al., 2004; Kappler et al., 1993; Lemaitre et al., 1995). Chaque groupe de micro-organismes possède un certain nombre de PAMPs caractéristiques. Parmi les PAMPs, on trouve des composants des parois bactériennes (lipopolysaccharides, peptidoglycanes) et des flagelles (flagelline), des mannanes de champignons, ainsi que des acides nucléiques bactériens et viraux (**Figure 10**).



**Figure 10 : Détection des PAMPs de différents types de pathogènes par les récepteurs de l'immunité innée.** Les différents types de pathogènes sont reconnus par plusieurs classes de PRRs (TLRs, RLRs, NLRs) selon la nature du PAMP (ARN, ADN, polysaccharides...). Tiré de Mogensen, 2009.

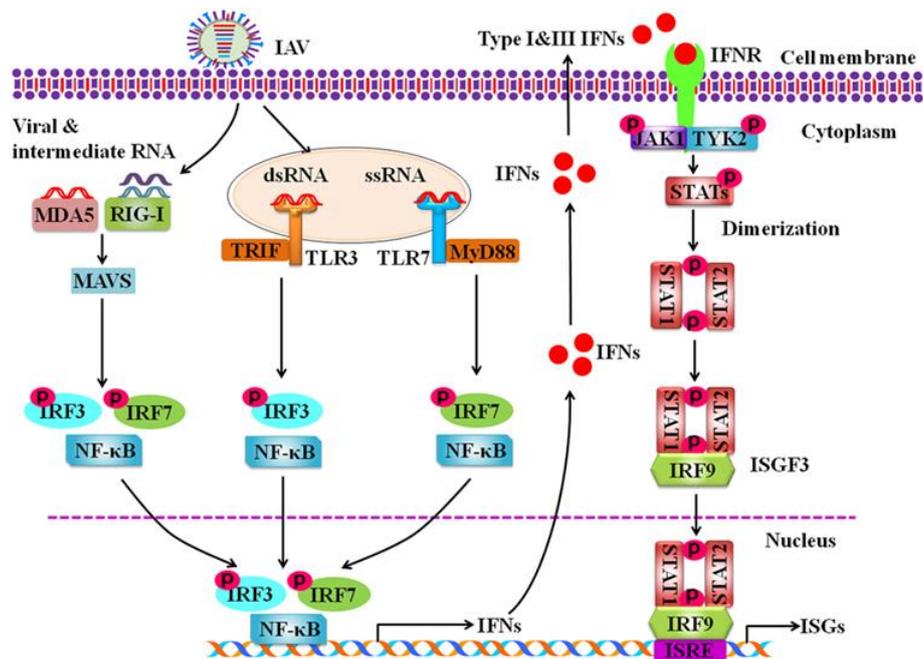
L'**immunité adaptative** (ou acquise), quant à elle, est plus tardive que l'immunité innée et nécessite la reconnaissance d'antigène(s) dérivant de l'agent pathogène par des récepteurs spécifiques exprimés à la surface des lymphocytes T (récepteur T ou TCR (*T cell receptor*)) et des lymphocytes B (récepteur B ou BCR (*B cell receptor*)). L'antigène dérivant du pathogène est présenté aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes, principalement les cellules dendritiques, ce qui initie classiquement la réponse immunitaire adaptative.

### **b) Immunité innée antigrippale : Détection du virus par les récepteurs de l'immunité innée et cellules impliquées**

Les PAMPs associés aux virus influenza sont perçus par les PRRs (membranaires ou cytoplasmiques) exprimés par les cellules immunes. L'activation des PRRs qui en résulte déclenche des voies de signalisation aboutissant à la production de cytokines proinflammatoires et des interférons de type I. Bien que majoritairement exprimés par les cellules immunes, les PRRs sont également exprimés par des cellules non

immunes (Takeuchi and Akira, 2010), telles que les cellules épithéliales respiratoires, ce qui permet d'initier la réponse immunitaire antigrippale dès l'infection de la première cellule.

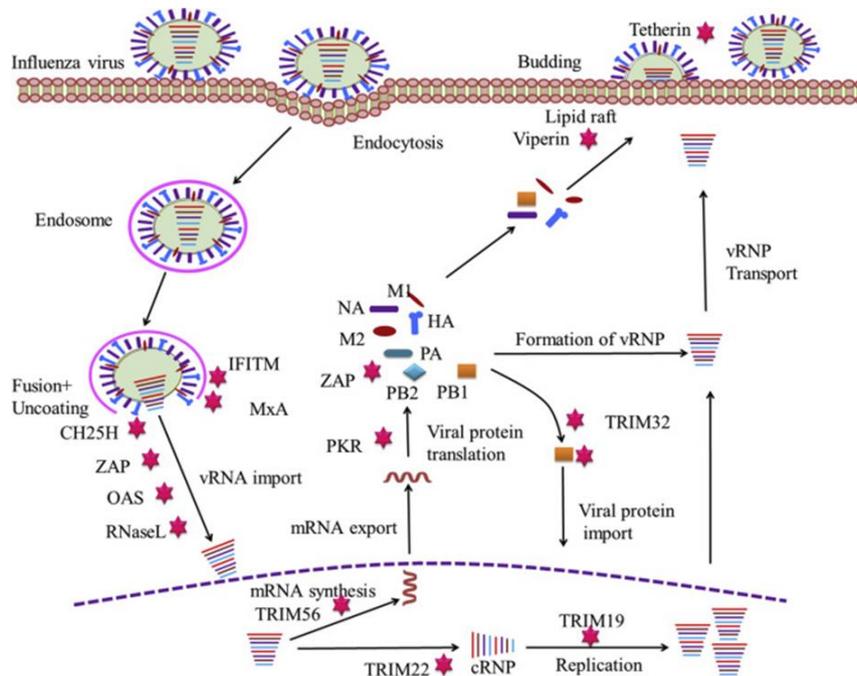
Dans le cadre de l'infection par IAV plusieurs PRRs sont impliqués, reconnaissant différents motifs viraux. Dans les endosomes de la cellule infectée, le TLR3 (*Toll-Like Receptor 3*) reconnaît les ARNs double brins (Alexopoulou et al., 2001; Guillot et al., 2005) tandis que les TLR7 et TLR8 (chez l'Homme, chez la souris uniquement le TLR7 a été décrit) reconnaissent les ARNs simple brins (Diebold, 2008; Heil et al., 2004; Lund et al., 2004). Les IAVs étant des virus à ARN simple brin, les TLR7 et TLR8 peuvent directement détecter les ARN viraux dans les cellules infectées, contrairement au TLR3 qui permet la reconnaissance des ARNs double brins, formés lors de la réplication et transcription virales ou dans des cellules infectées et en voie de mort cellulaire qui ont été phagocytées par les cellules dendritiques (Schulz et al., 2005). Lorsque le matériel génétique du virus et ses intermédiaires transcriptionnels se retrouvent dans le cytosol, ils sont détectés par des PRRs cytoplasmiques : RIG-I (*Retinoic acid-Inducible Gene I*) et Mda5 (*Melanoma differentiation-associated gene 5*). Une fois activés, ces derniers s'associent avec la protéine mitochondriale MAVS (*Mitochondrial antiviral signaling protein*). L'activation de ces TLRs et de la voie RIG-I/Mda5/MAVS conduit à l'induction des facteurs de transcription IRF (*Interferon regulatory factor*) 3 et 7, et de NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) qui permettent de déclencher la production de cytokines proinflammatoires et la réponse interféron. Les interférons de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) et les interférons de type III (IFN- $\lambda$ ) agissent de façon autocrine ou paracrine sur les cellules infectées *via* leurs récepteurs respectifs IFNAR (*Interferon-alpha/beta receptor*) et IFNLR (*Interferon lambda receptor*) pour activer la voie de signalisation JAK-STAT (*Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*). La phosphorylation de STAT1 et STAT2 entraîne leur association avec IRF9, formant ainsi le complexe ISGF3 (*Interferon-stimulated genes factor 3*). ISGF3 est alors « transloqué » dans le noyau pour induire la transcription des ISGs (*Interferon-stimulated genes*) (Chen et al., 2018) (**Figure 11**).



**Figure 11 : Induction de la réponse immunitaire innée dans une cellule infectée par IAV.** La détection du matériel viral induit l'activation de voies de signalisation conduisant à l'activation de NF-κB et à la production d'interférons de type I et III. Les interférons permettent l'expression de gènes (ISG) notamment impliqués dans la défense antivirale. dsRNA : ARN double brin, ssRNA : ARN simple brin, TRIF : protéine adaptatrice induisant l'IFN-β et contenant un domaine Toll/IL-1R, TYK2 : tyrosine kinase 2. Tiré de Chen et al., 2018.

Plusieurs ISGs sont impliqués dans la réponse immunitaire contre les IAVs et agissent sur différentes étapes du cycle viral (**Figure 12**) (Goraya et al., 2020). La famille des protéines Mx existe chez l'Homme (MxA et MxB) et chez la souris (Mx1 et Mx2). Les protéines Mx inhibent la réplication virale en empêchant la transcription : MxA altère le transport du génome viral du cytoplasme vers le noyau (Xiao et al., 2013), et Mx1 interagit avec NP et PB2 bloquant ainsi la bonne formation d'un vRNP (Verhelst et al., 2012). La famille des protéines IFITMs (*Interferon-induced transmembrane proteins*), notamment IFITM3, inhibe la libération du virus dans le cytoplasme en altérant la fusion des membranes de l'enveloppe virale et de l'endosome (Feeley et al., 2011). OAS (*2'-5' oligoadenylate synthase*) produit des 2'-5'-oligoadénylates qui permettent l'activation de la RNase L, responsable du clivage des ARNs viraux. La PKR (*protein kinase R*) inhibe la traduction *via* la phosphorylation d'eIF2α, limitant ainsi la réplication virale, maintient l'activation de la voie NF-κB et stabilise les ARN messagers des IFNs (IFNα et IFNβ). La vipérine empêche la formation des radeaux lipidiques ce qui réduit le relargage de nouveaux virions. La

CH25H (*cholesterol 25-hydroxylase*) transforme le cholestérol en 25-hydroxycholestérol, un inhibiteur de la fusion entre l'enveloppe virale et les membranes cellulaires. TRIM22 (*tripartite motif-containing protein 22*) induit la polyubiquitination puis la dégradation de NP *via* le protéasome. ISG15 s'associe aux protéines virales nouvellement formées et réduit l'infectivité du virus (Durfee et al., 2010; Iwasaki and Pillai, 2014). La *tetherin* retient les nouveaux virions à la membrane plasmique de la cellule infectée. Ces virions peuvent alors être endocytés et dégradés (Evans et al., 2010). Plus récemment, un nouvel ISG impliqué dans la défense contre les IAVs a été identifié : il s'agit de SERTAD3 (*SERTA domain-containing 3*), qui inhibe la réplication du virus en bloquant l'assemblage de la polymérase virale (Sun et al., 2020).



**Figure 12 : ISGs impliqués dans la réponse antivirale lors de l'infection par IAV.** Les ISGs indiqués avec des étoiles rouges inhibent différentes étapes de l'infection par IAV. vRNA : ARN viral, cRNP : ribonucléoprotéine complémentaire. Tiré de Goraya et al., 2020.

D'autres PRRs, avec des mécanismes d'action différents, sont impliqués dans la réponse immune contre les IAVs. NLRP3 (*NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*), un NOD-like receptor, associé à la protéine adaptatrice ASC et à la pro-caspase 1 forment l'inflammasome NLRP3. Cet inflammasome est activé par 3 signaux de danger : la détection du virus, l'activité de canal à protons de la protéine

virale M2, et l'accumulation de complexes PB1-F2 dans les lysosomes. L'activation de l'inflammasome NLRP3 permet la production des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 qui stimulent la réponse cellulaire (détaillée dans les sous-parties suivantes). Enfin, STING (*Stimulator of interferon gene*), récepteur du cGAMP (*cyclic GMP-AMP*) induit lors de la détection de virus à ADN par cGAS (*cyclic GMP-AMP synthase*), est important dans la défense contre les IAVs, mais de façon indépendante de cGAS (Holm et al., 2016). En effet STING peut également être activé suite à la détection d'un virus à ARN *via* des interactions directes avec RIGI ou MAVS (Lee et al., 2019).

Différentes cellules sont impliquées dans la défense pulmonaire lors de l'infection par IAV. Les cellules épithéliales des voies respiratoires sont les premières cellules infectées lors de l'infection par IAV. Elles produisent des cytokines et chimiokines, telles qu'IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 et CCL2, qui permettent notamment le recrutement et l'activation de cellules immunes lors de l'infection. Par exemple, l'IL-1 $\beta$  augmente l'expression des molécules d'adhésion permettant le recrutement des cellules immunes dans les poumons (Denney and Ho, 2018). L'action de l'IL-1 $\beta$  et du TNF- $\alpha$  permet le recrutement des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules NK (*Natural Killer*, Julkunen et al., 2001). CCL2 permet également le recrutement des monocytes. L'IL-6, produit par les cellules épithéliales alvéolaires de type II et les cellules bronchiques, stimule l'élimination du virus par les macrophages, limite l'apoptose des cellules épithéliales, et réduit le développement de la fibrose pulmonaire en inhibant la production de TGF- $\beta$  et en contrôlant le renouvellement de la matrice extracellulaire (Denney and Ho, 2018). Les cellules épithéliales respiratoires limitent également l'infection grâce à l'expression de la mucine 1 (MUC1) et de la mucine 5AC (MUC5AC) qui servent de « récepteurs leurres » au virus (Denney and Ho, 2018; McAuley et al., 2017).

Les macrophages alvéolaires limitent la diffusion du virus en phagocytant des cellules infectées, contribuent au recrutement d'autres monocytes et régulent la réponse immunitaire adaptative (Chen et al., 2018; Herold et al., 2006). De même, les cellules NK lysent les cellules infectées soit après reconnaissance *via* leurs récepteurs NKp44 et NKp46, soit *via* le mécanisme d'ADCC (*antibody-dependent cell cytotoxicity*; reconnaissance d'un anticorps sur la cellule infectée et lyse de la cellule) (Kreijtz et al., 2011). Deux types de cellules dendritiques interviennent dans la réponse immune contre un IAV : les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) et

les dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). Les cDCs sont localisées à la base de l'épithélium respiratoire. Leurs dendrites s'insèrent entre les cellules épithéliales, en direction de leur pôle apical pour drainer les antigènes présents dans le mucus à la surface des cellules (Denney and Ho, 2018). Les cDCs peuvent également capturer l'antigène viral par phagocytose de cellules épithéliales apoptotiques (Albert et al., 1998). Après capture de l'antigène, les cDCs vont induire la réponse immunitaire adaptative dans les ganglions périphériques (GeurtsvanKessel et al., 2008). Les pDCs sont quant à elles recrutées sur le site d'infection et participent à la production d'IFN- $\alpha$ , et seraient capables d'induire une réponse T CD8<sup>+</sup> cytotoxique (Lui et al., 2009; Thomas et al., 2014). Les neutrophiles font partie des premières cellules recrutées sur le site d'infection. Ils permettent de limiter la réplication virale par phagocytose des cellules infectées et par dégranulation de défensines qui ont un effet antiviral direct (Camp and Jonsson, 2017; Tate et al., 2011). En revanche, une trop forte activation des neutrophiles peut conduire à des dommages pulmonaires importants, notamment à cause de la production de ROS (dérivés réactifs de l'oxygène) et des NETs (*Neutrophil extracellular traps*), et est couramment associée au développement du syndrome de détresse respiratoire (Tang et al., 2019; To et al., 2020). Enfin, les iNKTs (cellules T *Natural Killer* invariantes) réduisent la réplication virale, protègent l'épithélium pulmonaire *via* la production d'IL-22 et stimulent le développement de la réponse T CD8<sup>+</sup> (Paget et al., 2012).

### **c) Immunité adaptative antigrippale**

Réponse cellulaire : Lors de l'infection par IAVs, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont activés dans les ganglions lymphatiques drainant par les DCs provenant des poumons. Les T CD4<sup>+</sup> se différencient majoritairement en lymphocytes T auxiliaires Th1 (*T helper 1*) qui produisent des cytokines proinflammatoires comme l'IFN $\gamma$ , le TNF et l'IL-2. Ces cytokines permettent d'activer et/ou stimuler les macrophages alvéolaires et de contrôler la différenciation des T CD8<sup>+</sup>. Des Th2, Th17 et des lymphocytes T régulateurs (Tregs) sont également générés. Les Th2 favorisent la mise en place de la réponse humorale. De même, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> se différencient en lymphocytes T cytotoxiques capables de « tuer » les cellules infectées, soit par dégranulation de granules contenant des perforines et des granzymes, soit par induction de l'apoptose *via* l'expression de TNF, FASL et TRAIL. Les Tregs régulent

la réponse des T auxiliaires et des T CD8<sup>+</sup>. Les Th17 stimulent la réponse T auxiliaire en produisant de l'IL-6 qui inhibe les Tregs (Kreijtz et al., 2011).

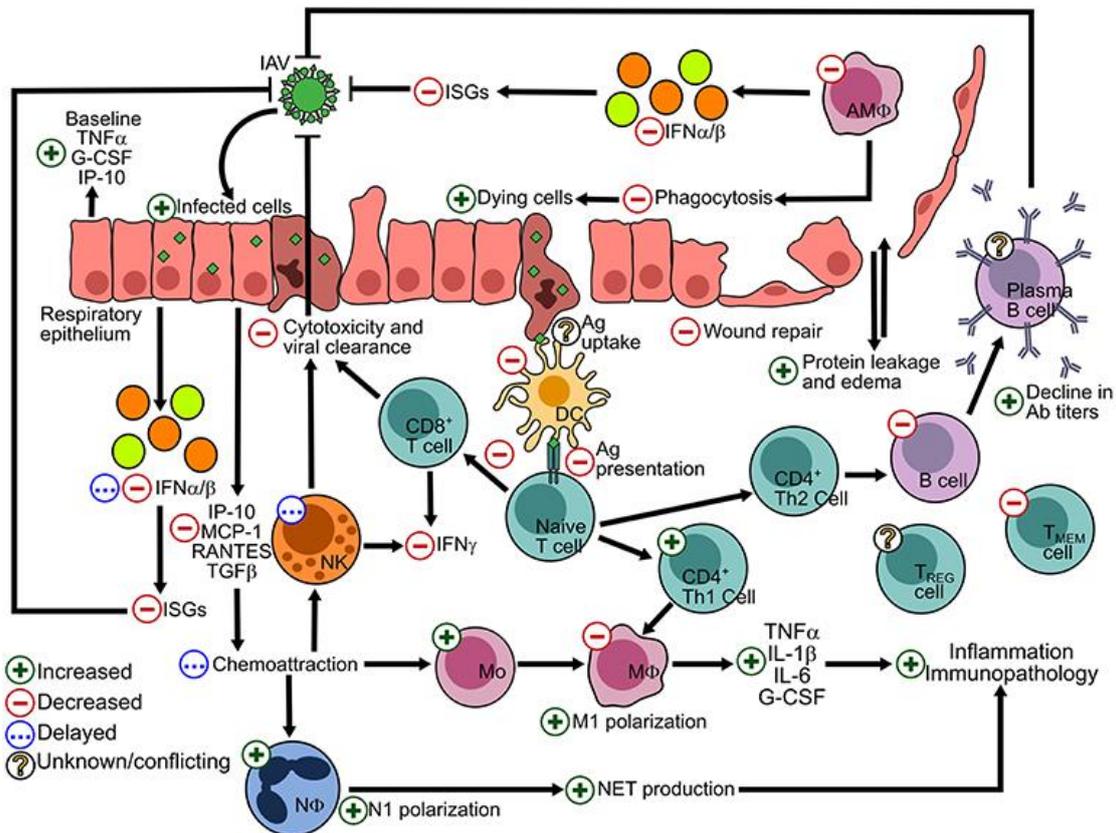
Réponse humorale : L'infection par IAV induit la production d'anticorps spécifiques du virus suite à l'activation des lymphocytes B. Les anticorps sont principalement dirigés contre les 2 protéines virales HA et NA, bien que des anticorps contre M2 et NP soient également produits. Les anticorps anti-HA inhibent l'entrée du virus dans les cellules et facilitent la phagocytose et l'ADCC. Certains de ces anticorps peuvent reconnaître les HA de différentes souches virales. Les anticorps anti-NA inhibent l'activité enzymatique de la protéine virale et les anticorps anti-NP seraient de bons activateurs de la lyse cellulaire *via* le système du complément (Kreijtz et al., 2011). Les lymphocytes B (LB) initient la réponse humorale par production d'IgM (immunoglobuline M). Ces IgMs sont nécessaires à l'expansion des LBs et la bonne production d'IgGs et de LBs mémoires spécifiques du virus (Nguyen et al., 2017). Les IgMs peuvent s'associer au système du complément pour neutraliser le virus. L'infection induit également une rapide production d'IgAs qui protègent localement l'épithélium respiratoire. Les IgGs ensuite produits apportent une protection à long terme (Kreijtz et al., 2011).

#### **d) Cas particulier : L'immunité antigrippale en contexte d'obésité**

L'obésité est caractérisée par un excès de tissus adipeux qui peut s'accompagner ou non de désordres métaboliques. Les tissus adipeux des individus obèses sécrètent plus de leptine (proinflammatoire, quantité proportionnelle à la masse du tissu adipeux), moins d'adiponectine (anti-inflammatoire), et plus de cytokines inflammatoires ; ce qui participe au développement d'une inflammation chronique entraînant l'installation progressive d'un état d'insulinorésistance et perturbant les réponses immunitaires (Ellulu et al., 2017; Luzi and Radaelli, 2020; Stepień et al., 2014).

Le développement de formes sévères de grippe est plus fréquent chez les individus obèses car le virus atteint plus fréquemment les voies aériennes inférieures (Easterbrook et al., 2011; Honce and Schultz-Cherry, 2019), causant des dégâts pulmonaires importants qui ne sont pas contrecarrés par la réparation épithéliale car

la réparation tissulaire est moins efficace chez les sujets obèses (O'Brien et al., 2012). De plus, la réponse immunitaire induite après l'infection par IAV est altérée chez les sujets obèses : le nombre et l'état d'activation des macrophages alvéolaires sont diminués, la maturation des DCs est altérée, il y a une réduction de prolifération et de fonction des lymphocytes T, plus d'infiltration de NK et les neutrophiles sont plus inflammatoires (**Figure 13**, Honce and Schultz-Cherry, 2019).



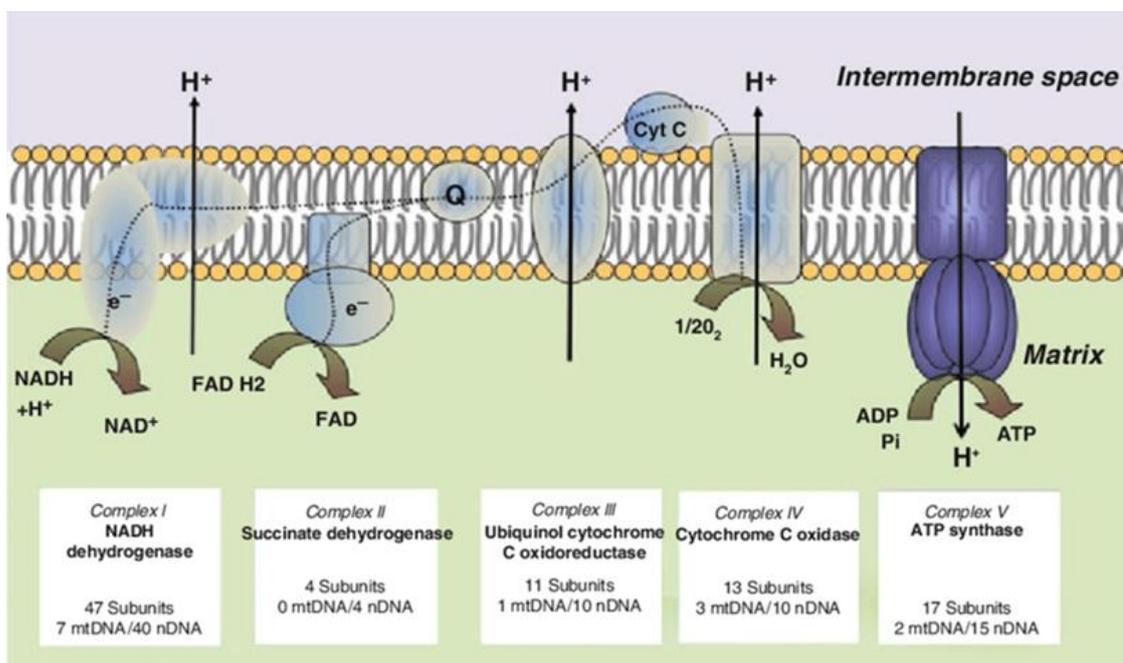
**Figure 13 : Réponse immunitaire pulmonaire altérée chez les obèses.** Les conséquences de l'obésité sur la réponse antivirale sont d'augmenter (+ vert), de diminuer (- rouge) ou de retarder (... bleu) chacun des mécanismes indiqués. Les ? noirs indiquent ce qui n'est pas connu et/ou reste débattu dans la littérature. Tiré de Honce R. and Schultz-Cherry, 2019.

Ces perturbations de la réponse immunitaire, notamment pulmonaire, dans le cadre d'une pathologie où le tissu adipeux est un acteur majeur, souligne le rôle du tissu adipeux dans l'immunité de l'organisme (cet aspect sera détaillé dans la partie sur les tissus adipeux, page 62).

## 6) Impact de l'infection par IAV sur le métabolisme énergétique

### a) Métabolisme énergétique cellulaire : Généralités

Pour assurer ses fonctions, une cellule consomme de l'énergie sous la forme d'un intermédiaire métabolique, l'ATP (adénosine triphosphate). L'ATP est produit dans la mitochondrie grâce à l'ATP synthase qui est alimentée par la chaîne respiratoire mitochondriale (CMR), localisée dans la membrane interne mitochondriale. Cette chaîne de transport des électrons est composée de 5 complexes, schématisés sur la **Figure 14**.



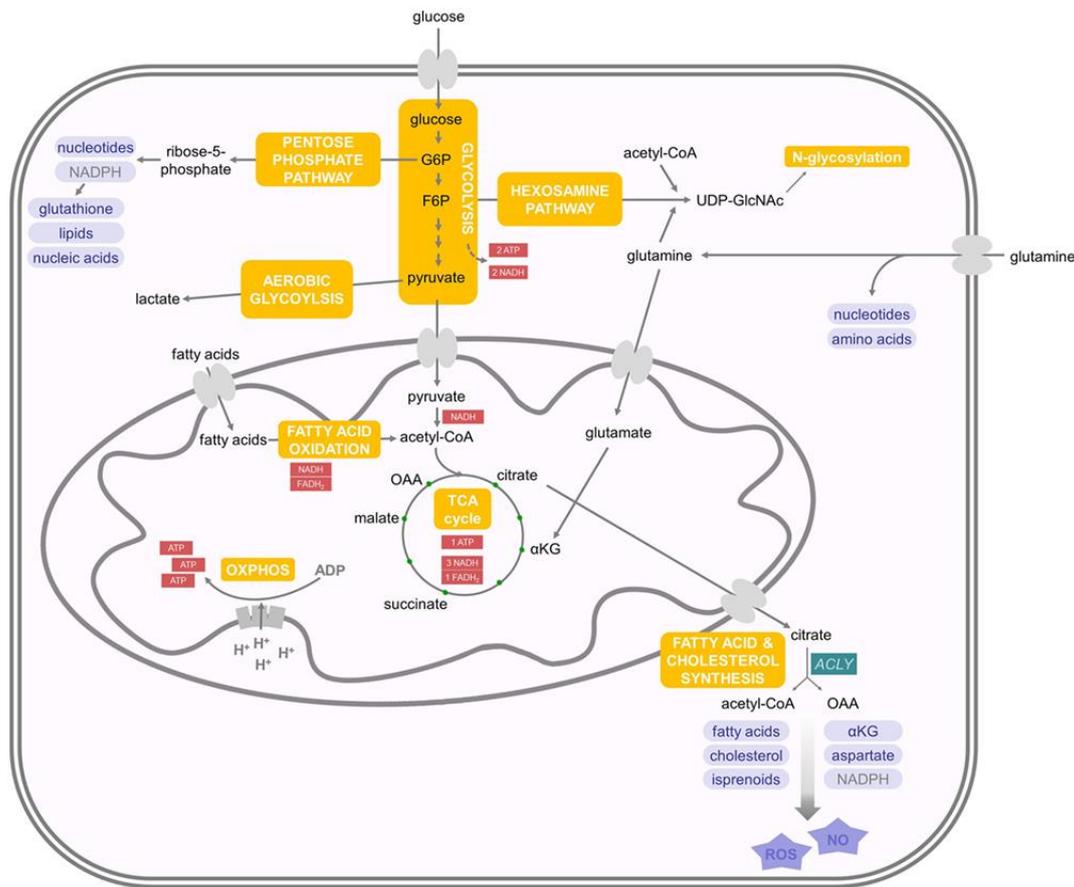
**Figure 14 : Production de l'ATP par l'ATP synthase et la chaîne respiratoire mitochondriale.** La CMR est composée de 5 complexes (I à V). Lors du transfert d'électrons, un gradient de protons ( $H^+$ ) se forme de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, permettant la synthèse d'ATP par le complexe V. Tiré de Benard et al., 2011.

L'ATP peut être produit à partir de différentes macromolécules telles que les carbohydrates (dont le glucose), les protéines, et les acides gras (Bonora et al., 2012; Fritsch and Weichhart, 2016; Hatefi, 1993). La glycolyse est un enchaînement de réactions enzymatiques qui conduisent à la transformation du glucose en pyruvate (**Figure 15**). Le pyruvate est ensuite importé dans la mitochondrie où il est oxydé et associé au coenzyme A, devenant de l'Acétyl-CoA. L'Acétyl-CoA peut également être produit suite à l'oxydation des lipides. L'Acétyl-CoA alimente le cycle TCA

(*TriCarboxylic Acid Cycle* ou cycle de Krebs). La glycolyse, l'oxydation des lipides et le cycle TCA produisent du NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) et FADH<sub>2</sub> (flavine adénine dinucléotide) qui créent un gradient de protons à la membrane interne de la mitochondrie et fournissent des électrons à la chaîne de transport des électrons (**Figure 14**). Ceci permet la formation de l'ATP à partir de l'ADP ; ce processus est appelé phosphorylation oxydative. De l'ATP est également généré directement par la glycolyse et le cycle TCA (2 ATP par la glycolyse et 2 ATP par le cycle TCA).

Les acides aminés peuvent également être une source d'énergie pour la cellule. La glutamine permet la formation de glutamate, lui-même est transformé en  $\alpha$ -cétoglutarate qui alimente le cycle TCA. L'utilisation du  $\alpha$ -cétoglutarate pour former du pyruvate et du NADPH est appelée glutaminolyse (Fritsch and Weichhart, 2016).

Les produits intermédiaires de la glycolyse et du cycle TCA sont utilisés par la cellule pour produire différentes macromolécules. Le glucose-6-phosphate peut être dérivé vers la voie des pentoses phosphates pour permettre la production de nucléotides, de lipides, d'acides nucléiques et de glutathion (antioxydant). Le fructose-6-phosphate permet la formation d'UDP-GlcNAc (uridine diphosphate-N-acétylglucosamine) qui est nécessaire à la N-glycosylation des protéines (c'est par exemple le cas pour les protéines virales dans le cadre d'une infection). Enfin, le citrate est utilisé pour la synthèse des lipides et du cholestérol. Lorsqu'il y a une forte augmentation de la glycolyse et de l'import du glucose, dans des cellules en prolifération par exemple, une partie du pyruvate est réduit en lactate en présence d'oxygène ; ce phénomène correspond à la glycolyse aérobie ou « effet Warburg » (Fritsch and Weichhart, 2016).



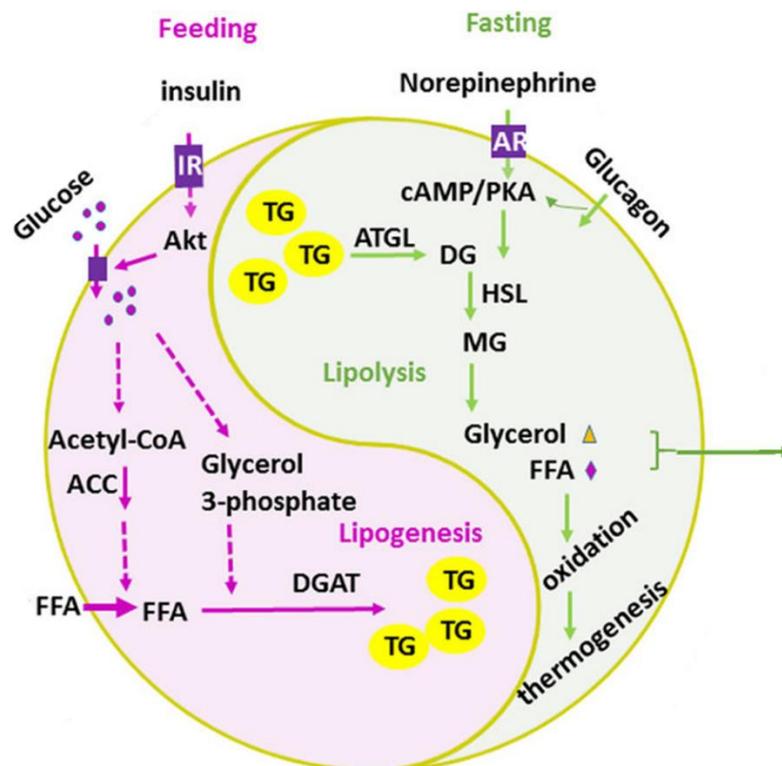
**Figure 15 : Description du métabolisme énergétique cellulaire.** Le glucose est capté par la cellule et métabolisé dans le cytoplasme en pyruvate par le processus de glycolyse. Le pyruvate est alors transporté dans la mitochondrie puis oxydé en Acétyl-CoA, qui entre dans le cycle de Krebs (TCA). Une autre source d'énergie importante est représentée par les lipides, dont l'oxydation conduit à la production d'Acétyl-CoA. Enfin, la glutamine, autre source de carbone pour la cellule, peut également entrer dans le cycle TCA. Tiré de Fritsch and Weichhart, 2016.

## b) Effets de l'infection par IAV sur le métabolisme

### *b1-Impact de l'infection par IAV sur le métabolisme de l'organisme*

L'infection de souris par IAV ([H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>]) induit une perte de poids corporelle et une réduction de la masse des tissus adipeux (associée à une réduction de la lipogenèse et de la lipolyse dans ces tissus), qui sont maximales 7 jours post-infection (Ayari et al., 2020). L'arrêt de la prise alimentaire par les souris lors des premiers jours d'infection peut expliquer ces résultats (**Figure 16**). Cependant, des perturbations métaboliques systémiques liées à l'infection sont également observées et persistent dans le temps, jusque 20 semaines après infection. Chez les souris infectées, les taux sanguins de glucose et de résistine (hormone impliquée dans la résistance à l'insuline) sont réduits, et le taux d'insuline est supérieur au taux des

souris non infectées. Ces différences n'ont étonnamment pas d'impact sur la tolérance au glucose des souris infectées (Ayari et al., 2020). Une étude sur l'infection par une autre souche d'IAV ([H1N1]) montre au contraire une altération de la tolérance au glucose (Ohno et al., 2020). Dans les deux modèles d'infection des souris par IAV, une diminution du cycle TCA est suggérée (Ohno et al., 2020), et une sous-expression dans les tissus adipeux est observée en transcriptomique (Ayari et al., 2020).



**Figure 16 : Induction de la lipolyse ou de la lipogénèse en fonction de l'apport nutritionnel.** Lors de la prise alimentaire, le glucose et les acides gras libres sont importés dans l'adipocyte et permettent la formation des triglycérides par le processus de la lipogénèse. Lors de l'arrêt de la prise alimentaire, la lipolyse permet de dégrader les triglycérides pour fournir du glycérol et des acides gras libres qui seront utilisés comme source d'énergie par la cellule. TG : triglycérides, IR : récepteur à l'insuline, FFA : acide gras libre, AR : récepteur adrénergique, DGAT : diacylglycérol O-acétyltransférase, ATGL : adipose triglycéride lipase, HSL : lipase hormono-sensible, MG : monoacyglycérol, DG : diacylglycérol. Modifié à partir de Luo and Liu, 2016a.

## b2- Impact de l'infection par IAV sur le métabolisme cellulaire

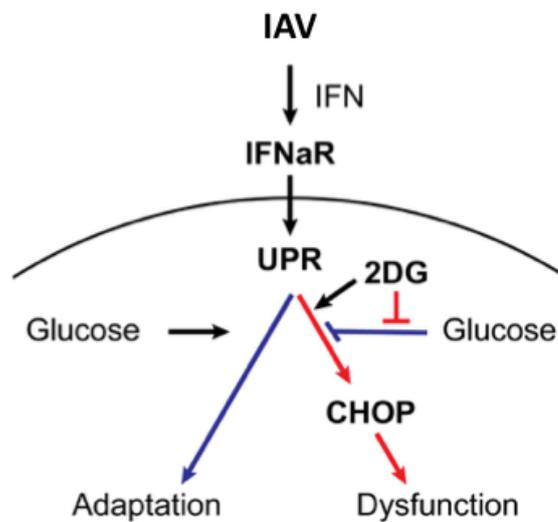
Pour se développer, les virus utilisent la machinerie cellulaire de leur hôte. De ce fait, les infections virales ont un impact important sur le métabolisme des cellules infectées.

L'infection d'embryons de poulet a permis de mettre en évidence l'augmentation de la glycolyse (1h30 après infection, Smith and Kun, 1954) et l'oxydation directe du glucose *via* la voie des pentoses phosphates (3h après infection, Klemperer, 1961). Ritter et co-auteurs ont approfondis ces résultats en mesurant les différents métabolites de la glycolyse, après infection de cellules MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*) par [H1N1] (Ritter et al., 2010). Ils ont notamment montré que l'infection induit une augmentation de l'import de glucose dans la cellule et une sécrétion de glutamate et de lactate, indiquant l'activation de la glycolyse aérobie. Les différents intermédiaires de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphates et du cycle TCA sont augmentés à partir de 10-12 heures après infection. En revanche, ils ont constaté une diminution de l'ATP cellulaire 12-18 heures après infection. Ces auteurs suggèrent que l'augmentation de la glycolyse est induite pour compenser la baisse de production d'ATP dans les cellules infectées qui seraient en voie de mort cellulaire. En effet, l'infection par IAV réduit la phosphorylation oxydative dans les cellules infectées *in vitro* (Derakhshan et al., 2006) mais également dans les poumons de souris infectées (Alsuwaidi et al., 2013). Plus le virus se multiplie, plus le potentiel de membrane mitochondriale diminue et plus la production d'ATP est réduite (Maruyama et al., 2018). Une analyse protéomique réalisée à partir de cellules primaires épithéliales bronchiques humaines (NHBE) infectées *in vitro* avec [H1N1], confirme que le métabolisme énergétique de la cellule est modifié à différents niveaux : augmentation de la glycolyse, du cycle TCA, du métabolisme des acides gras, de la phosphorylation oxydative, et de la voie des pentoses phosphates (Smallwood et al., 2017). Chez l'Homme, on constate également un import plus important de glucose dans la rate et les ganglions lymphatiques après une vaccination ou une infection par IAV (Bahadoran et al., 2020), qui permet de fournir de l'énergie supplémentaire aux cellules immunes.

Le glucose, la glycolyse, et l'ATP qui est produit, sont essentiels pour la réplication du virus : l'inhibition de la glycolyse diminue la quantité d'ATP produit, or l'ATP est nécessaire à l'acidification de l'endosome lors du cycle viral, ce qui réduit ainsi la

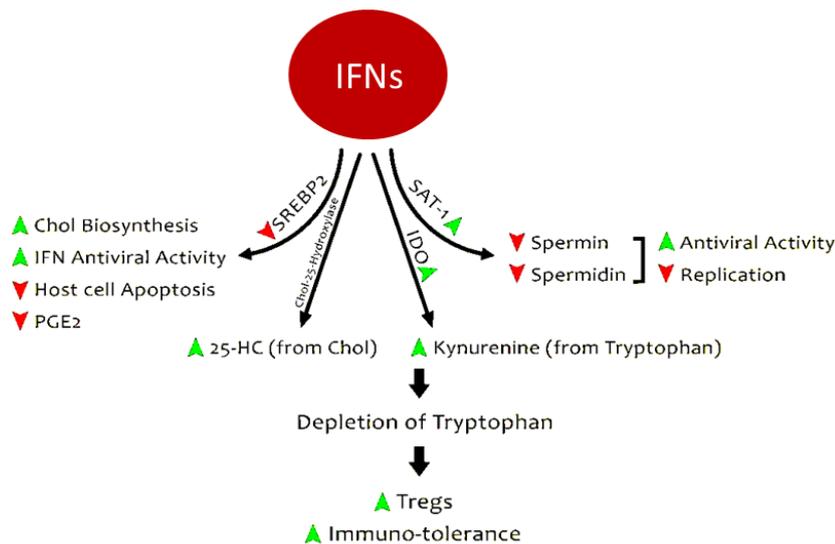
production de nouveaux virus (Kohio and Adamson, 2013). La régulation du métabolisme du glucose a un intérêt pour le virus mais également pour l'hôte infecté. Chez des souris infectées par IAV ([H1N1]), un apport calorique (solution de glucose ou régime équivalent à 1 kilocalorie) en parallèle de l'infection les protègent de la mortalité, alors que l'ajout d'un traitement avec un inhibiteur de la glycolyse (2DG, 2-déoxy-glucose) annule cet effet protecteur (Wang et al., 2016).

Lors de l'infection, l'inflammation induit l'activation d'une voie de réponse au stress appelée UPR (*unfolded protein response*) dans les neurones avec l'expression de la protéine apoptotique CHOP. Le glucose est importé dans le tronc cérébral et l'aire hypothalamique et protège d'une dysfonction neuronale en empêchant l'induction de l'apoptose *via* CHOP (**Figure 17**).



**Figure 17: Utilisation du glucose durant l'inflammation induite par l'infection par IAV - Un mécanisme d'adaptation.** Le glucose est nécessaire pour que la cellule s'adapte au stress du réticulum endoplasmique induit par l'inflammation associée à l'infection par IAV. Modifié à partir de Wang et al., 2016.

Les changements métaboliques lors de l'infection ne sont pas uniquement directement dûs au virus. La réponse immunitaire induite suite à l'infection, notamment la réponse interféron, impacte également le métabolisme cellulaire (Fritsch and Weichhart, 2016; Keshavarz et al., 2020). En effet, il a été montré que l'infection par IAV modifie le métabolisme des lipides et du cholestérol par l'intermédiaire des interférons (Keshavarz et al., 2020; Lin et al., 2010), comme représenté **Figure 18**.



**Figure 18 : Rôle des interférons (IFNs) dans les changements du métabolisme cellulaire associés à l'infection par IAV.** Les IFNs affectent notamment le métabolisme lipidique, ce qui se traduit par une augmentation de la synthèse du cholestérol. Adapté à partir de Keshavarz et al.,2020.

Comme montré sur cette Figure, lors de l'infection par IAV la synthèse des lipides est augmentée mais la  $\beta$ -oxydation est réduite ; suggérant le stockage des lipides pour la production de nouvelles particules virales. Il est important de noter que l'altération du métabolisme des lipides est corrélée à la sévérité de la pathologie. L'augmentation de diacyl glycérophosphocholine (PC) et de diacyl glycérophosphoéthanolamine (PE) est associée à la présence de lésions dans les poumons et la trachée. L'acide arachidonique (AA), fabriqué à partir de phospholipides composés de PC, s'accumule lors de l'infection et est également associé à l'inflammation. PC, PE et AA sont des lipides proinflammatoires qui favorisent la synthèse d'eicosanoïdes et d'autres médiateurs inflammatoires qui conduisent à la nécrose et aux dommages tissulaires dans les poumons (Keshavarz et al., 2020). En parallèle, les interférons favorisent la formation de 25-hydroxycholestérol (25-HC) à partir du cholestérol, qui est sécrété par les macrophages (Blanc et al., 2013). Le 25-HC est un facteur antiviral qui altère l'infection par des virus enveloppés, dont IAV, en inhibant la fusion entre les membranes virales et celles de la cellule hôte (Liu et al., 2013). Lors d'une infection par IAV, le 25-HC amplifie également la réponse inflammatoire (Gold et al., 2014). Suite à l'infection, les interférons stimulent la voie kynurénine, voie catabolique du tryptophane. L'IFN $\alpha$ , l'IFN $\beta$  et l'IFN $\gamma$  sont tous les trois capables d'induire la surexpression de IDO1 (indoléamine-pyrrole 2,3-dioxygénase), la première enzyme

de la voie. Cette surexpression conduit à l'augmentation de la production de dérivés de la kynurénine à partir du tryptophane (Gaelings et al., 2017). La déplétion du tryptophane, résultant de l'activation de la voie, et la production des intermédiaires de la kynurénine, conduisent à la mise en place d'un environnement tolérogénique (inhibition de l'activation et la prolifération des cellules T, apoptose des lymphocytes T, production de T régulateurs, Fallarino et al., 2006; Li et al., 2009; Terness et al., 2002). Par ailleurs, les interférons induisent l'expression de SAT-1, enzyme catabolisant la spermine et la spermidine, ce qui inhibe la production de nouveaux virus (vrai pour les virus à ARN de polarité positive, non testé pour IAV, Mounce et al., 2016).

Enfin, les interférons contribuent à la création d'un environnement oxydant *via* la production d'oxyde nitrique (NO) dans les poumons par les macrophages (Fritsch and Weichhart, 2016; Keshavarz et al., 2020). La mise en place de cet environnement oxydant est essentielle à la réplication virale (Amatore et al., 2015). Le virus est lui-même capable d'induire la production de ROS *via* la protéine M2 (Lazrak et al., 2009) et d'altérer leur gestion par la cellule (Shin et al., 2015).

De façon intéressante, les modifications métaboliques dues à l'infection pourraient avoir un effet sur la température cellulaire. L'infection de cellules pulmonaires humaines (lignée H292) par un IAV ([H1N1]) induit une augmentation de température cellulaire mesurée à la membrane plasmique jusqu'à 5°C pendant les 4 premières heures d'infection. Cette augmentation de température serait corrélée à la consommation d'ATP utilisée pour la synthèse d'ARN viral (Maruyama et al., 2018).

### **c) Effet de l'infection par IAV sur les organelles des cellules hôtes**

La morphologie des organelles est également impactée lors d'infection par IAV. Toutes les souches d'IAVs (aviaires et humaines) induisent des modifications du **noyau** et du **nucléole**. Cependant ces modifications sont spécifiques à chaque souche virale. Par exemple, [H3N2] (A/Moscow/10/99H3N2) et [H1N1] (A(H1N1) pdm2009) provoquent la disparition des centres fibrillaires et des éléments denses fibrillaires normalement présents dans le nucléole, et l'apparition de structures

tubulaires striées. Dans le cytoplasme, des inclusions entourées de ribosomes, dont le nombre augmente avec la progression de l'infection, sont observables. Une infection par [H2N2] (A/Singapore/4/57H2N2) induit une ségrégation du matériel nucléolaire sous forme de granules et l'apparition de structures globulaires dans le noyau (Terrier et al., 2012, 2014).

L'infection de cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549) par [H1N1] a révélé la présence de **mitochondries** allongées et non pas globulaires comme cela est observé dans les cellules non infectées. Cette élongation des mitochondries est associée à une réduction des sites de contact entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. La réduction des contacts entre le réticulum et la mitochondrie favorise la réplication virale en réduisant l'induction de la réponse immunitaire innée (signalisation MAVS-RIG-I altérée). L'élongation des mitochondries est caractéristique des virus influenza puisqu'elle se produit également lors d'infection avec [H3N2] et IBV (Pila-Castellanos et al., 2021). L'infection par IAV induit également un stress oxydant dans les mitochondries (Reshi et al., 2018).

La morphologie du **réticulum endoplasmique** peut également être modifiée. Lors de l'infection par IAV [H1N1] il y a une expansion du réticulum endoplasmique (RE) rugueux qui apparaît « gonflé » et de nombreuses vésicules au niveau du MTOC (*microtubule organizing center*). Dans le reste de la cellule infectée, le RE s'organise sous forme tubulaire orientée du noyau vers la membrane plasmique. Les membranes du RE sont majoritairement dépourvues de ribosomes ; les ribosomes étant regroupés au niveau des citernes du RE sous la surface de la cellule (de Castro Martin et al., 2017).

Enfin, l'**appareil de Golgi** est également impacté lors de l'infection par IAV. Dans une cellule infectée, l'appareil de Golgi est dispersé et semble se fragmenter au cours de l'infection (Yadav et al., 2016).

---

## Chapitre 2 : Les tissus adipeux et le phénomène de brunissement

---

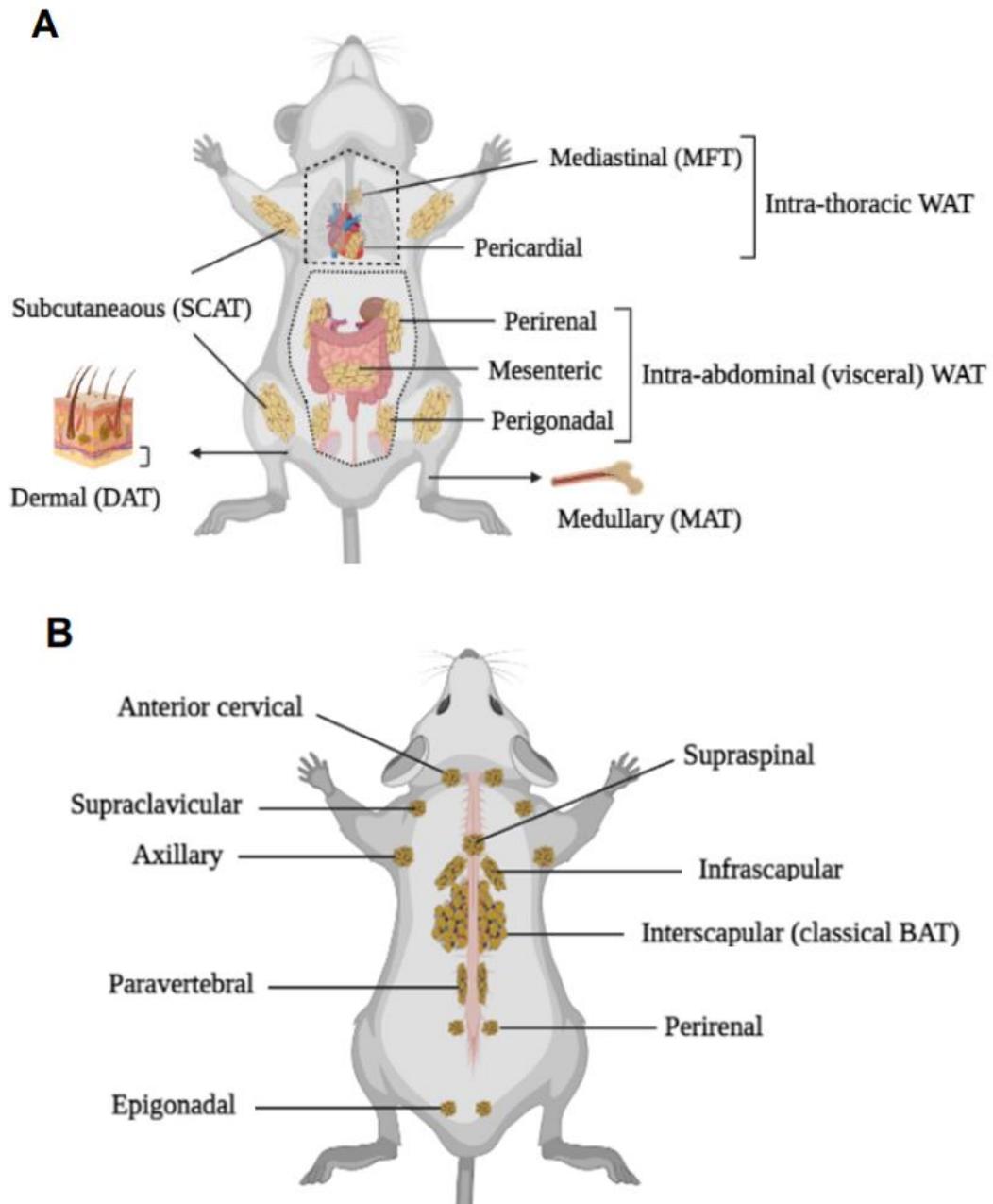
### I. Les tissus adipeux

Le tissu adipeux est l'un des principaux **organes métaboliques** de l'organisme à la fois quantitativement, puisqu'il représente en moyenne 20% du poids total d'un individu (ce chiffre pouvant atteindre 50% chez une personne obèse), et qualitativement, puisqu'il joue un rôle majeur dans le stockage et la libération des lipides ; assurant ainsi la gestion des réserves énergétiques de notre organisme en fonction des apports et des besoins. Le tissu adipeux assure également le maintien de la **température corporelle** (par isolation thermique et production de chaleur), et la **protection contre les chocs** mécaniques (Zwick et al., 2018).

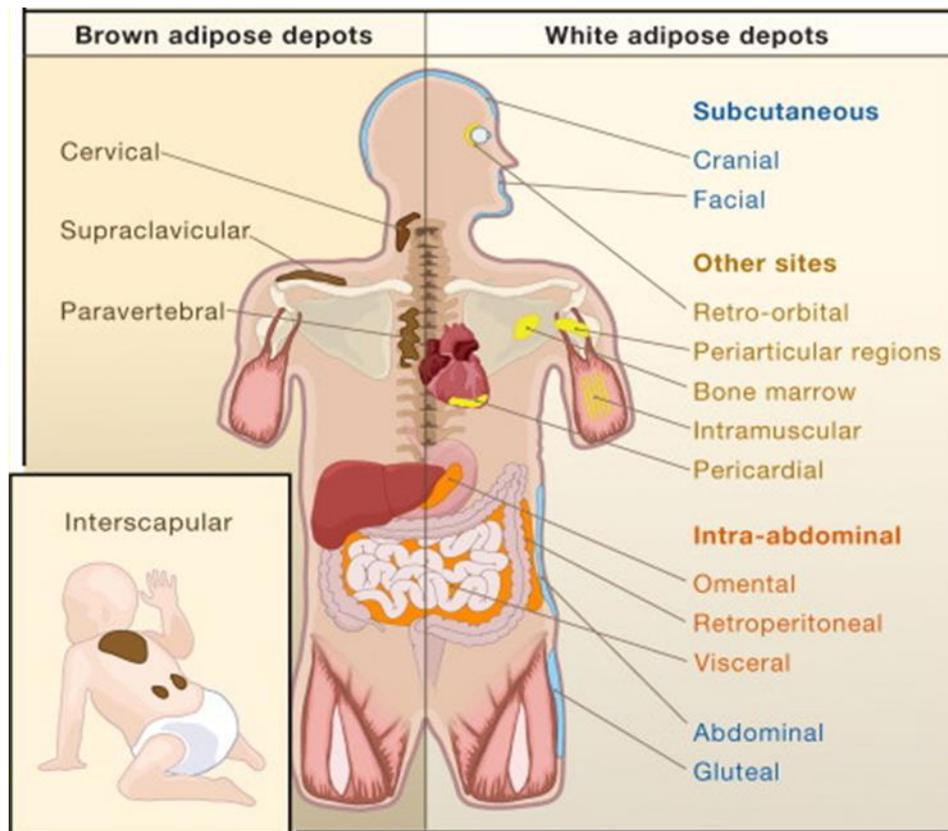
Bien que longtemps considéré comme un organe de stockage de l'énergie relativement inerte, il est admis depuis quelques années que le tissu adipeux est également un **organe endocrine et immunitaire** à part entière, capable de sécréter de nombreuses hormones, cytokines, et/ou peptides antimicrobiens, regroupés sous le terme générique d'adipokines (Fasshauer and Blüher, 2015; Funcke and Scherer, 2019; Hotamisligil et al., 1995). Les adipokines peuvent être sécrétées par de nombreux types cellulaires présents dans le tissu adipeux, tels que des préadipocytes (précurseurs des adipocytes), des adipocytes et/ou des cellules immunes (à la fois innées et adaptatives) (Mraz and Haluzik, 2014). Pouvant agir au niveau local (par voie autocrine ou paracrine) ou systémique, les adipokines pourront atteindre d'autres tissus/organes et ainsi réguler tous les grands systèmes de l'organisme, y compris le système immunitaire.

#### 1) Les différents types de tissus adipeux

Il existe différents types de tissus adipeux, avec une localisation (**Figures 19** (localisations chez la souris) et **20** (localisations chez l'Homme)) et des fonctions propres à chacun (détaillées dans les paragraphes qui leur sont dédiés).



**Figure 19 : Répartition des différents tissus adipeux chez la souris.** (A) Vue ventrale et (B) vue dorsale de la souris. WAT : tissu adipeux blanc, BAT : tissu adipeux brun, MAT : tissu adipeux médullaire. Il existe aussi du tissu adipeux au niveau de la face, non représenté ici. Tiré de Barthelemy, Bogard & Wolowczuk, MS en préparation (image créée grâce à BioRender).



**Figure 20 : Répartition des différents tissus adipeux chez l'Homme.** Les dépôts de tissu adipeux brun sont représentés sur la gauche de la figure. La partie droite de la figure montre les dépôts de tissu adipeux blancs. Tiré de Gesta et al., 2007.

### a) Le tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est le **principal réservoir énergétique** de l'organisme. Les adipocytes blancs qui le composent stockent les lipides sous forme de triglycérides, et les libèrent sous forme d'acide gras libres selon les besoins de l'organisme (Luo and Liu, 2016a). Selon sa localisation, le tissu adipeux blanc peut également assurer d'autres fonctions : par exemple, le tissu adipeux blanc du derme est impliqué dans la réparation des blessures cutanées et le cycle de vie du follicule pileux (Zhang et al., 2019c).

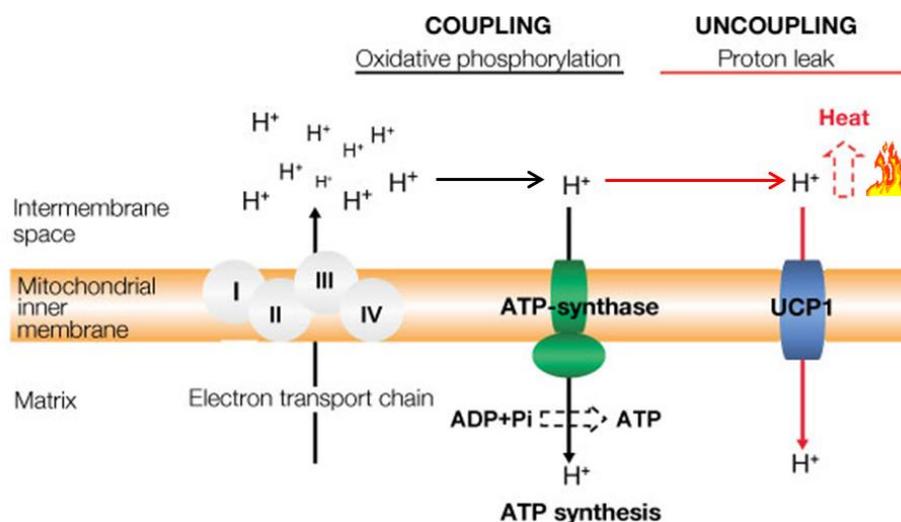
Le tissu adipeux blanc est réparti dans l'organisme en différents dépôts (cf. **Figures 19** (souris) et **20** (Homme)) : les deux dépôts majeurs sont le **dépôt sous-cutané** (SCAT) et le **dépôt viscéral** (VAT ; lui-même composé des dépôts rétropéritonéaux, péri-rénaux, mésentériques, périgonadaux et omentaux).

Outre ces 2 principaux dépôts (les plus étudiés), on distingue également le tissu adipeux du derme et le tissu adipeux intrathoracique (incluant les tissus adipeux péricardiques, épicaudiques et médiastinaux; Luong et al., 2019). Chaque dépôt de tissu adipeux blanc possède des caractéristiques métaboliques et inflammatoires propres ; ainsi le VAT est considéré comme plus inflammatoire et plus actif métaboliquement que le SCAT (Ibrahim, 2010; Lee et al., 2013a; Luo and Liu, 2016a).

### **b) Le tissu adipeux brun**

Le tissu adipeux brun (BAT) a la particularité d'être un **tissu thermogénique** : les adipocytes bruns qui le composent, très riches en mitochondries, oxydent les acides gras libres pour **produire de la chaleur** (Cannon and Nedergaard, 2004). Ce processus est d'une part, un mécanisme de régulation métabolique (par consommation des acides gras), et d'autre part, un mécanisme de thermogénèse adaptative. En effet, le tissu adipeux brun peut être activé par différents stimuli, dont la température environnementale, pour induire une thermogénèse sans frissons, en opposition à la thermogénèse induite par la contraction musculaire (Himms-Hagen, 1984). Cette thermogénèse particulière est rendue possible grâce aux nombreuses mitochondries contenues dans les adipocytes bruns composant le BAT qui expriment une protéine thermogénique appelée **UCP1 (*uncoupling-protein 1*)** (Ikeda and Yamada, 2020; Matthias et al., 2000).

UCP1 est exprimée à la membrane interne des mitochondries et permet de découpler la respiration mitochondriale (**Figure 21**). Lors de la respiration mitochondriale, la chaîne de transport des électrons crée un gradient de protons en augmentant la quantité de protons dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Ces protons sont pompés et renvoyés vers la matrice mitochondriale par l'ATP-synthase ce qui permet la production d'ATP (adénosine triphosphate). En présence d'acides gras libres, UCP1 est activée et transfère une partie des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale (découplant ainsi le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale). Ce transfert de protons est source d'une énergie motrice qui est dissipée sous forme de chaleur (Fedorenko et al., 2012).



**Figure 21 : Découplage de la respiration mitochondriale par UCP1.** La respiration mitochondriale crée un gradient de proton qui est utilisé par l'ATP-synthase pour la production d'ATP. Ce gradient de proton est partiellement détourné par UCP1 permettant ainsi la thermogénèse. ADP : adénosine diphosphate. Modifié à partir de Brondani et al., 2012.

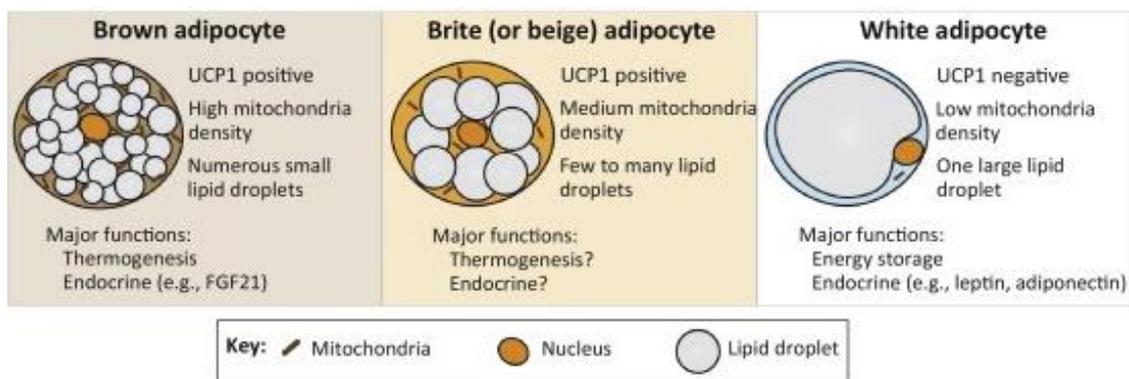
Le tissu adipeux brun chez la souris et chez l'Homme est situé dans les zones inter- et sub-scapulaires, cervicales, péri-rénales, péri-aortiques et paravertébrales (cf. **Figures 19** et **20**). Chez l'Homme, le tissu adipeux brun est particulièrement développé chez les nourrissons pour qui la thermorégulation est essentielle, alors que chez l'adulte, le BAT est présent et fonctionnellement actif mais dégénère progressivement avec l'âge (Sacks and Symonds, 2013; Sidossis and Kajimura, 2015; Virtanen et al., 2009). Les préadipocytes du BAT sont également toujours capables de former de nouveaux adipocytes bruns (Lee et al., 2011). La nature exacte du BAT humain n'est pas clairement définie. En effet, des études suggèrent que le BAT humain ne serait composé que d'adipocytes beiges, dont nous parlerons dans le prochain paragraphe, alors que d'autres montrent que le BAT humain serait un mélange d'adipocytes bruns et beiges (Sanchez-Gurmaches et al., 2016).

### c) Le tissu adipeux beige

Le tissu adipeux beige est un réel **intermédiaire entre le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun** : aussi bien au niveau morphologique, que transcriptomique et fonctionnel. Comme le BAT, le tissu adipeux beige est constitué d'adipocytes avec de nombreuses petites gouttelettes lipidiques, un grand nombre de mitochondries, et est capable de thermogénèse *via* l'expression d'UCP1. Le tissu

adipeux blanc est quant à lui constitué d'adipocytes avec une unique grosse gouttelette lipidique et peu de mitochondries (Sanchez-Gurmaches et al., 2016) (**Figure 22**).

En conditions homéostatiques, il n'y a pas ou peu de tissu adipeux beige dans l'organisme. Ce tissu a la particularité de se développer uniquement dans certaines conditions (détaillées dans le paragraphe e), page 59, et le II de ce chapitre, page 66) et en particulier dans le SCAT, sous la forme d'îlots d'adipocytes beiges au sein du tissu adipeux blanc. Ce phénomène est appelé le « **brunissement du tissu adipeux blanc** ». Quelques études, plus rares, montrent que des adipocytes beiges peuvent également se développer dans le VAT (Contreras et al., 2017; Qiu et al., 2014; Rao et al., 2014; Suárez-Zamorano et al., 2015; Weiner et al., 2016; Yang et al., 2017).

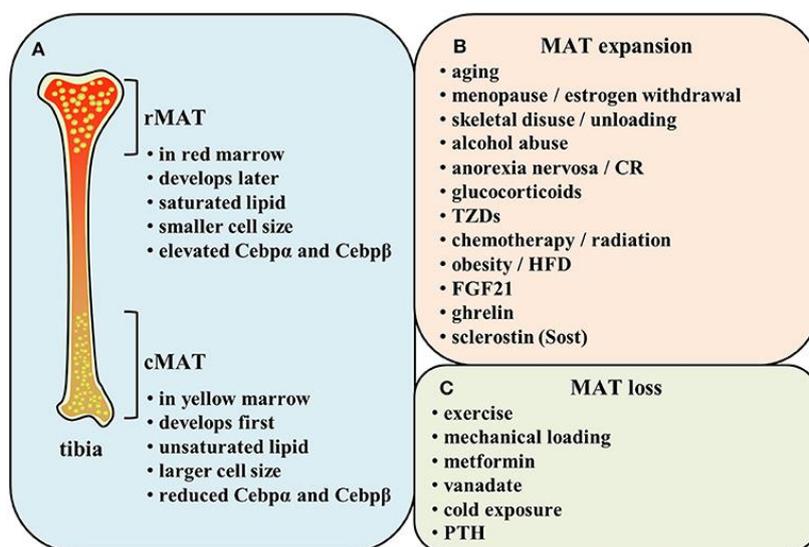


**Figure 22 : Caractéristiques principales des adipocytes bruns, blancs et beiges.** Les adipocytes bruns sont caractérisés par de nombreuses petites gouttelettes lipidiques, un grand nombre de mitochondries et l'expression de la protéine mitochondriale découplante UCP1. A l'inverse, les adipocytes blancs possèdent une unique grosse gouttelette lipidique, peu de mitochondries et n'expriment pas UCP1. Véritables intermédiaires entre les adipocytes blancs et les adipocytes bruns, les adipocytes beiges présentent plusieurs petites gouttelettes lipidiques, un nombre relativement important de mitochondries et expriment UCP1. Tiré de Sanchez-Gurmaches et al., 2016.

#### **d) Cas particuliers : le tissu adipeux médullaire et le tissu adipeux « rose »**

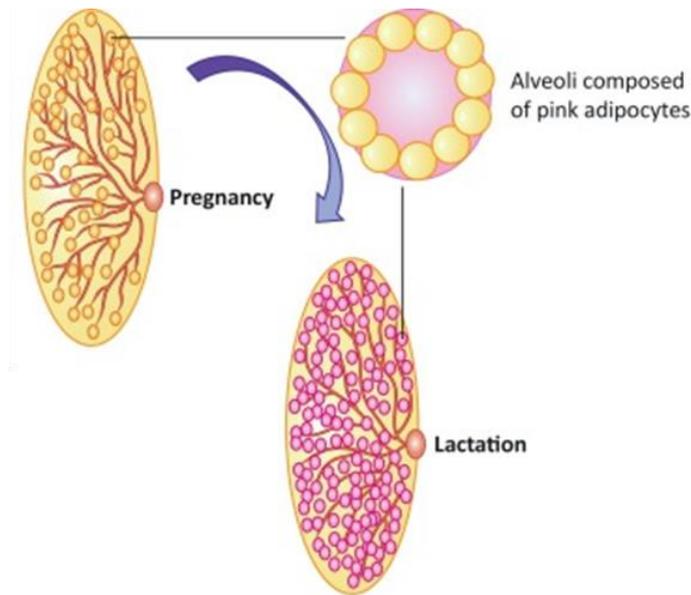
La moelle osseuse est constituée de cellules souches hématopoïétiques, de cellules stromales (comprenant notamment des préadipocytes), et d'adipocytes qui forment le **tissu adipeux de la moelle osseuse** (tissu adipeux médullaire ou MAT).

Le MAT représente 10% de la masse totale de tissus adipeux d'un adulte. Deux types de MAT existent : le MAT constitutif (cMAT) qui se forme tôt lors du développement et qui se situe dans la partie distale du squelette, et le MAT régulé (rMAT) qui est localisé dans les parties proximales du squelette (**Figure 23**). Comme tout tissu adipeux, le MAT présente également une très grande plasticité ; ainsi son volume change selon les conditions physiologiques. Il existe d'ailleurs un lien entre le volume du MAT et la densité osseuse : plus la masse du MAT est importante plus la densité osseuse est faible (c'est le cas dans l'ostéoporose). Comme les autres tissus adipeux également, le MAT a une capacité sécrétoire importante. Les adipokines sécrétées régulent le métabolisme osseux, notamment la balance adipogénèse/ostéogénèse (Li et al., 2019).



**Figure 23 : Le tissu adipeux de la moelle osseuse.** A) Répartition et caractéristique du tissu adipeux médullaire (rMAT et cMAT). B) et C) Conditions conduisant à une modification du volume du tissu adipeux osseux. Tiré de Li et al., 2019.

Le **tissu adipeux « rose »**, plus rarement décrit, est présent uniquement chez les femelles gestantes et disparaît après l'arrêt de la lactation. Durant la gestation, les adipocytes blancs de la glande mammaire se transforment (de manière réversible) en cellules épithéliales produisant le lait maternel. Ainsi, le tissu adipeux « rose » consiste en une couche unique de cellules épithéliales riches en lipides, contenant des gouttelettes lipidiques, des vésicules qui contiennent les protéines du lait maternel, et plusieurs microvilli au pôle apical. Ces cellules forment des alvéoles dans la glande mammaire (**Figure 24**). Ces adipocytes « roses » sécrètent les lipides qui composeront le lait maternel (Cinti, 2018).



**Figure 24 : Le tissu adipeux « rose ».**

Représentation schématique de l'anatomie de la glande mammaire lors de la lactation. Durant la gestation, des adipocytes blancs de la glande mammaire se convertissent en cellules épithéliales produisant le lait maternel : ce sont les adipocytes « roses ». Modifié à partir de Cinti, 2018.

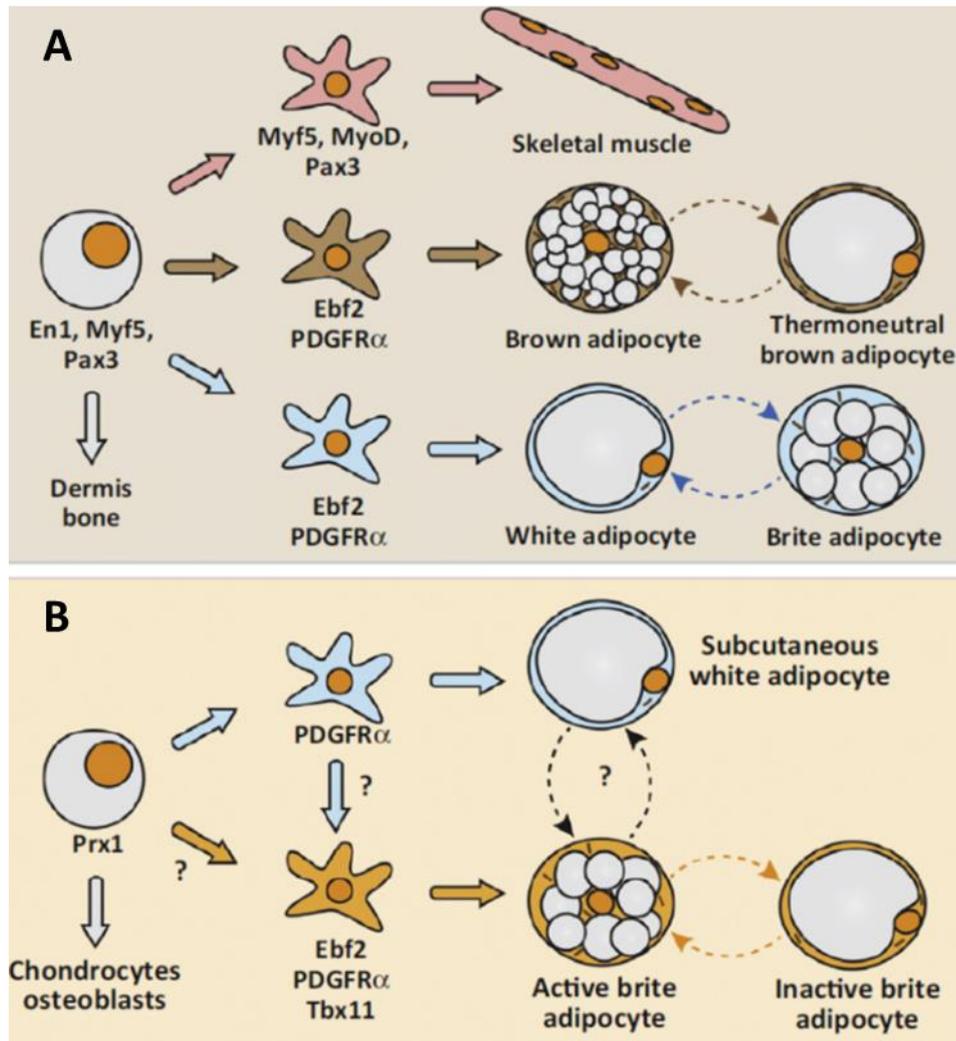
**e) Origine des adipocytes blancs, bruns et beiges**

L'identification des précurseurs des différents types d'adipocytes est complexe. En effet, des études suggèrent que l'origine des adipocytes varie selon les dépôts de tissu adipeux (Sanchez-Gurmaches et al., 2016). L'étude de différents dépôts de tissu adipeux permet de compléter notre connaissance sur le développement des différents tissus adipeux (**Figure 25**).

Les précurseurs des adipocytes sont formés à partir des cellules souches mésenchymateuses. Les adipocytes bruns et une partie des adipocytes blancs dérivent de cellules progénitrices qui sont communes avec les cellules musculaires squelettiques : ce sont les cellules exprimant les marqueurs *En1*, *Myf5* et *Pax3* (**Figure 25A**). De façon intéressante, les adipocytes blancs du TAB sous-cutané ont une origine différente des autres adipocytes blancs. En effet, ils proviennent des cellules souches mésenchymateuses exprimant le marqueur *Prx1*. Les adipocytes beiges, quant à eux, se développeraient soit à partir de cellules progénitrices exprimant les marqueurs *Ebf2*, *PDGFR $\alpha$*  et *Tbx11* (Sanchez-Gurmaches et al., 2016), ou soit à partir de la conversion d'un adipocyte blanc en adipocyte beige (le phénomène étant réversible) (Barbatelli et al., 2010). De même que pour les adipocytes blancs, les adipocytes beiges pourraient également avoir une origine différente selon leur localisation. Ainsi, les adipocytes beiges sous-cutanés proviendraient de la conversion des adipocytes blancs, ou de progéniteurs *Sca-1<sup>+</sup>*, ou

de progéniteurs de cellules musculaires lisses  $Myh11^+$ , alors que les adipocytes beiges viscéraux proviendraient de progéniteurs  $PDGFR\alpha^+$  (Zhang et al., 2016) (**Figure 25B**).

Il est important de mentionner que les différentes études ne permettent pas de savoir si les progéniteurs identifiés sont les mêmes d'une étude à l'autre à cause de la variété de marqueurs utilisés pour les identifier.

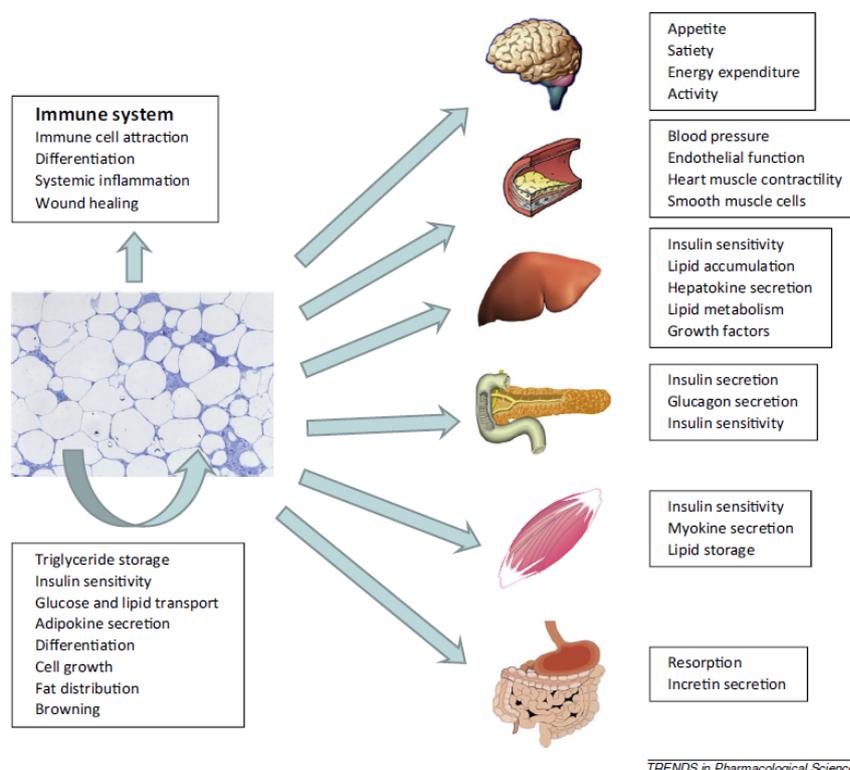


**Figure 25 : Origine des adipocytes blancs, bruns et beiges.** (A) Modèle de formation des cellules du muscle squelettique, des adipocytes bruns et des adipocytes blancs à partir d'un précurseur commun ( $En1^+Myf5^+Pax3^+$ ). (B) Modèle proposé pour la formation des adipocytes blancs ou beiges du tissu adipeux sous-cutané. Tiré de Sanchez-Gurmaches et al., 2016.

## 2) Rôle central du tissu adipeux blanc dans la physiologie de l'organisme

### a) Communication entre le tissu adipeux blanc et les autres tissus/organes

Le tissu adipeux régule de nombreux processus biologiques *via* la sécrétion de facteurs solubles nommés adipokines. Les adipokines ont un rôle autocrine et paracrine leur permettant de réguler notamment l'adipogenèse, et également un rôle endocrine important leur permettant d'agir sur de nombreux tissus/organes et, ainsi, de réguler plusieurs grandes fonctions (**Figure 26**).



**Figure 26 : Fonctions des adipokines.** Les adipokines, *via* leurs actions autocrines et endocrines, participent au maintien de l'homéostasie du tissu adipeux blanc (flèche courbe). Les effets endocrines des adipokines (flèches droites), qui s'exercent sur de nombreux tissus/organes, permettent de maintenir l'homéostasie et la « bonne santé » de l'ensemble de l'organisme. Tiré de Fasshauer and Blüher, 2015.

Ainsi, les adipokines permettent de réguler la prise alimentaire, le métabolisme énergétique (métabolisme glucidique et lipidique, sécrétion d'insuline, dépense énergétique), la fonction endothéliale (dont l'angiogenèse), la pression sanguine, la fonction cardiaque (notamment la contraction des myocytes), la croissance,

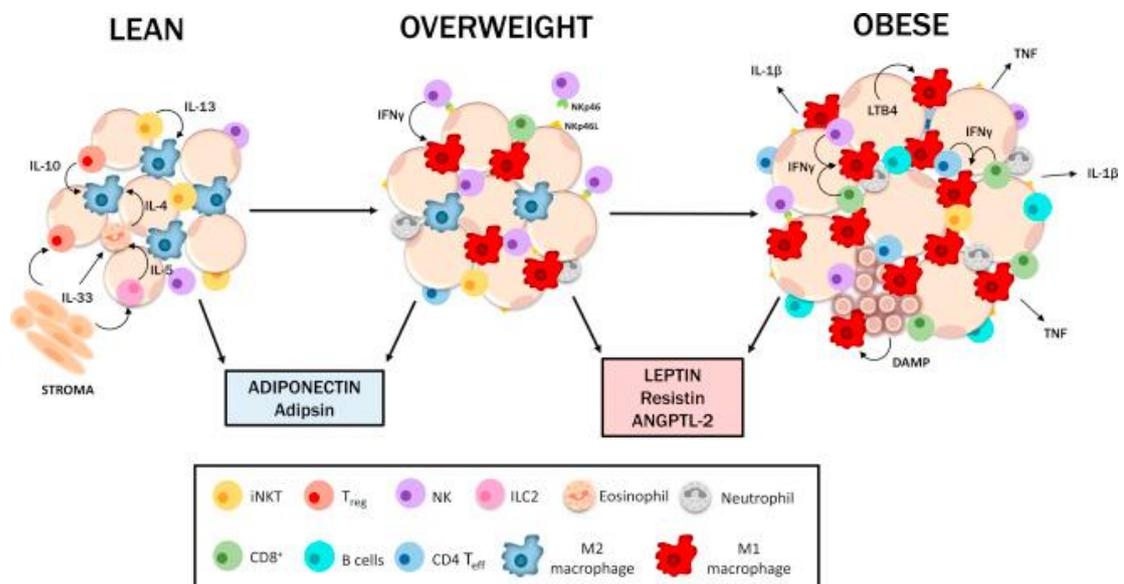
l'adhésion cellulaire, et la thermogénèse. Les adipokines agissent également sur le système immunitaire en favorisant le recrutement et la différenciation des cellules immunes et en régulant l'inflammation et la réparation tissulaire (Fasshauer and Blüher, 2015). Enfin, les adipokines régulent le système reproducteur (sécrétion des hormones sexuelles, maturation des follicules ovariens, spermatogénèse (Sara et al., 2020)). Majoritairement produites par le tissu adipeux, certaines adipokines ont été décrites comme pouvant être produites par d'autres tissus/organes. Par exemple, la leptine - qui est produite par le tissu adipeux en proportion de la masse de ce dernier (Shimizu et al., 1997) - est également produite par le cerveau, les poumons et l'estomac (Ayari and Wolowczuk, 2017).

### **b) Rôle immunitaire du tissu adipeux blanc**

Nous venons de l'évoquer, les adipokines produites par le tissu adipeux blanc peuvent agir directement sur le système immunitaire (*cf.* **Figure 26**). Cependant, il est important de noter que le tissu adipeux *per se* contient de nombreuses cellules immunes (innées et adaptatives) et peut donc, de ce fait, être considéré comme un organe ayant véritablement un rôle immunitaire.

Comme tout tissu/organe de l'organisme, le tissu adipeux est un site potentiel d'infection. De nombreux pathogènes (parasites, bactéries et virus) sont capables d'infecter et/ou d'impacter le tissu adipeux (Barthelemy, Bogard & Wolowczuk, MS en préparation, Trim and Lynch, 2021). Certains pathogènes semblent d'ailleurs associés au développement de l'obésité (Dhurandhar, 2001; Hegde and Dhurandhar, 2013). Le tissu adipeux n'est pas sans défense face à ces infections. En effet, il contient de nombreuses cellules immunes, à la fois innées et adaptatives (Ferrante, 2013; Kosteli et al., 2010; Weisberg et al., 2003; Wensveen et al., 2015) (**Figure 27**). Ces cellules participent à la physiologie du tissu. En contexte d'obésité, la composition du tissu adipeux en cellules immunes et ses sécrétions changent en faveur d'un profil proinflammatoire qui contribue à l'installation d'une inflammation chronique et des désordres métaboliques liés à l'obésité, notamment l'insulinorésistance (Fuster et al., 2016; Huh et al., 2014; Liu and Nikolajczyk, 2019; Lolmède et al., 2011; Trim and Lynch, 2021). Ces modifications pourraient participer à la plus forte susceptibilité des individus obèses aux infections, notamment aux infections respiratoires (Almond et al., 2013; Karlsson and Beck, 2010; Maccioni et

al., 2018) ; suggérant un rôle des cellules immunes du tissu adipeux blanc dans l'immunité générale de l'organisme.



**Figure 27 : Composition en cellules immunes du tissu adipeux en condition mince ou obèse.** Chez les individus minces (*lean*) les cellules immunes du tissu adipeux sont essentiellement de type anti-inflammatoire (type 2) (éosinophiles, iNKT, macrophages de type 2, Tregs, ILC2). Lors de l'installation de l'obésité (*overweight*), des neutrophiles, des cellules NK et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> s'accumulent et les macrophages se polarisent en macrophages de type 1. En condition d'obésité (*obese*), les cellules immunes du tissu adipeux sont majoritairement de type proinflammatoire (type 1). Tiré de Wensveen et al., 2015.

Ainsi, le tissu adipeux blanc contribue à l'immunité générale de l'organisme de 2 façons : par l'action des cellules immunes qu'il contient (*cf. Figure 27*) et par la régulation du système immunitaire *via* les adipokines (*cf. Figure 26*, page 62).

Le tissu adipeux blanc est notamment important pour la réponse immunitaire mémoire. En effet, ce tissu contient les différents sous-types de lymphocytes T mémoires : les T mémoires effecteurs, les T mémoires résidents et les T mémoires centraux (Han et al., 2017). Ces lymphocytes T mémoires confèrent une meilleure résistance lors d'une seconde infection : la transplantation du tissu adipeux blanc de souris précédemment infectées à des souris Rag1<sup>-/-</sup> (qui sont déficientes en lymphocytes), induit une protection lors d'une infection de ces souris avec une dose létale de bactéries *Yersinia pseudotuberculosis*. La contribution des cellules immunes du tissu adipeux lors d'infections a été peu étudiée dans un contexte physiologique sain. En revanche, leur rôle dans la susceptibilité aux infections en contexte d'obésité

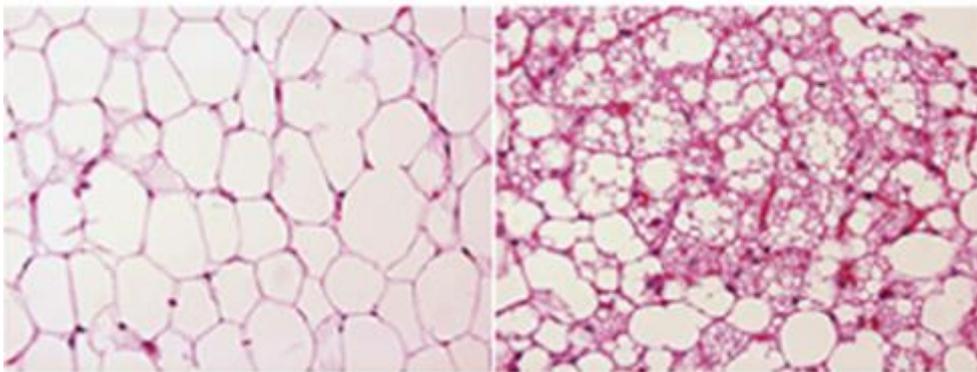
est mieux connu. L'infection de souris avec le virus LCMV (*lymphocytic choriomeningitis virus*) montre le développement de lymphocytes T mémoires dans le tissu adipeux blanc et dans la rate (moins dans le tissu adipeux que dans la rate mais les lymphocytes T mémoires du tissu adipeux produisent plus d'IFN $\gamma$  après restimulation *in vitro* que ceux de la rate) (Misumi et al., 2019). Chez les souris obèses ces lymphocytes T mémoires sont plus nombreux et persistent mieux après infection que chez les souris minces. Lors d'une seconde infection, ces T mémoires seraient à l'origine de la mortalité observée chez les souris obèses. En effet, chez les souris obèses on observe inflammation du pancréas associée à une nécrose du tissu adipeux qui entoure le pancréas. La déplétion des lymphocytes T, avant la seconde infection, empêche la mortalité accrue dans le groupe des souris obèses, qui ne présentent pas d'inflammation du pancréas. Ces études montrent que les cellules mémoires qui se développent dans le tissu adipeux lors d'une infection participent à la protection lors d'une seconde infection chez un sujet sain, mais peuvent être délétères en amplifiant l'inflammation systémique chez des sujets obèses.

Les adipokines sont des immunomodulateurs. Elles peuvent être classées en 2 catégories : les adipokines proinflammatoires comme la leptine, la résistine, et les adipokines anti-inflammatoires comme l'adiponectine. La leptine stimule l'activation et la prolifération des monocytes/macrophages, des granulocytes, des cellules dendritiques et NK. Elle favorise également la production de cytokines proinflammatoires par les lymphocytes T. La résistine améliore la réponse inflammatoire en stimulant la production de cytokines proinflammatoires telles que le TNF $\alpha$  et l'IL-6 et en favorisant l'activation du TLR4. La résistine aurait même un effet bactéricide. L'adiponectine réprime la voie NF- $\kappa$ B et favorise l'activation de l'AMPK, ce qui inhibe l'activation des cellules immunes. L'adiponectine réduit la phagocytose des macrophages et réduit leur production de cytokines inflammatoires en faveur de l'IL-10 et l'IL-1Ra, elle réduit la réponse des cellules T et diminue la production de lymphocytes B dans la moelle osseuse (Cava and Matarese, 2004; Li et al., 2021; Luo and Liu, 2016b; Wensveen et al., 2015).

## II. Brunissement du tissu adipeux blanc

### 1) Définition du brunissement du tissu adipeux blanc

Le brunissement du tissu adipeux blanc correspond au développement, au sein de ce tissu, d'îlots d'adipocytes possédant plus de mitochondries et renfermant des gouttelettes lipidiques plus nombreuses et de plus petite taille que les adipocytes blancs adjacents, et exprimant la protéine thermogénique UCP1 : ce sont les adipocytes beiges (**Figure 28**) (Sanchez-Gurmaches et al., 2016).

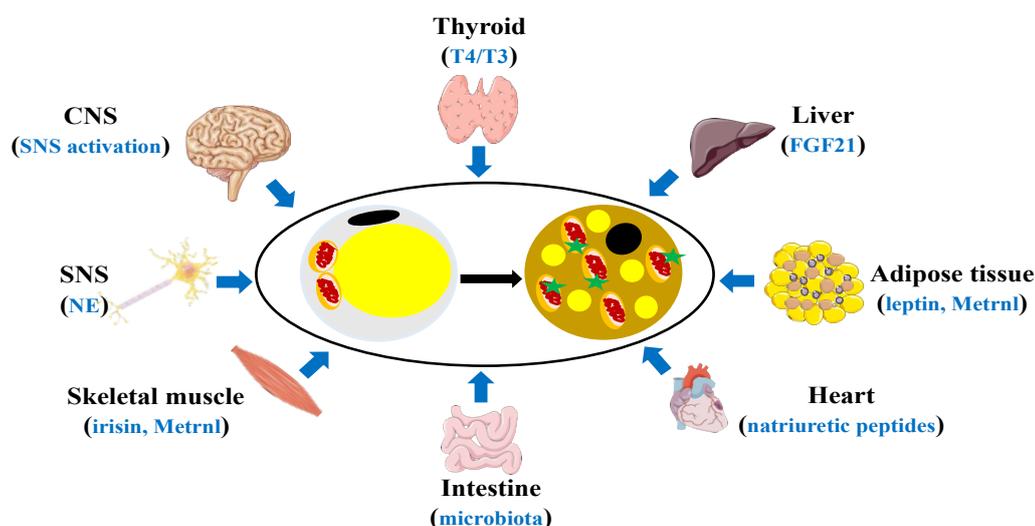


**Figure 28 : Histologie du tissu adipeux beige.** A gauche, l'histologie du tissu adipeux blanc, à droite, l'histologie du tissu adipeux beige montre la présence d'îlots d'adipocytes de plus petite taille contenant de nombreuses petites gouttelettes lipidiques. Coloration H&E. Tiré de Sanchez-Gurmaches et al., 2016.

L'expression d'UCP1 s'accompagne d'une plus forte biogénèse mitochondriale et d'une augmentation de la lipolyse et de la  $\beta$ -oxydation, expliquant la plus petite taille des adipocytes beiges comparativement aux adipocytes blancs (Calderon-Dominguez et al., 2016; Ježek et al., 2019; Lee et al., 2012, 2014). L'induction du brunissement et l'activation du tissu adipeux beige (mais également du tissu adipeux brun) sont associés à une amélioration métabolique de l'organisme, ce qui fait du brunissement une cible et/ou un outil thérapeutique potentiel pour traiter diabète, obésité et désordres métaboliques (Bartelt and Heeren, 2014; Cheng et al., 2021; Kaisanlahti and Glumoff, 2019). Cependant, le brunissement peut également être délétère notamment dans le cadre de cancers ou de brûlures sévères ; il serait responsable de cachexie et de stéatose hépatique (Abdullahi and Jeschke, 2016, 2017; Abdullahi et al., 2019).

## 2) Mécanismes d'induction du brunissement du tissu adipeux blanc

Le brunissement du tissu adipeux blanc peut être induit par différents stimuli, notamment par des modifications des conditions environnementales et comportementales : température, activité physique, alimentation\* et jeûne. Nous allons décrire les mécanismes ou facteurs connus impliqués dans le brunissement du tissu adipeux blanc (**Figure 29** et **Figure 40** récapitulative à la fin du chapitre, page 83).



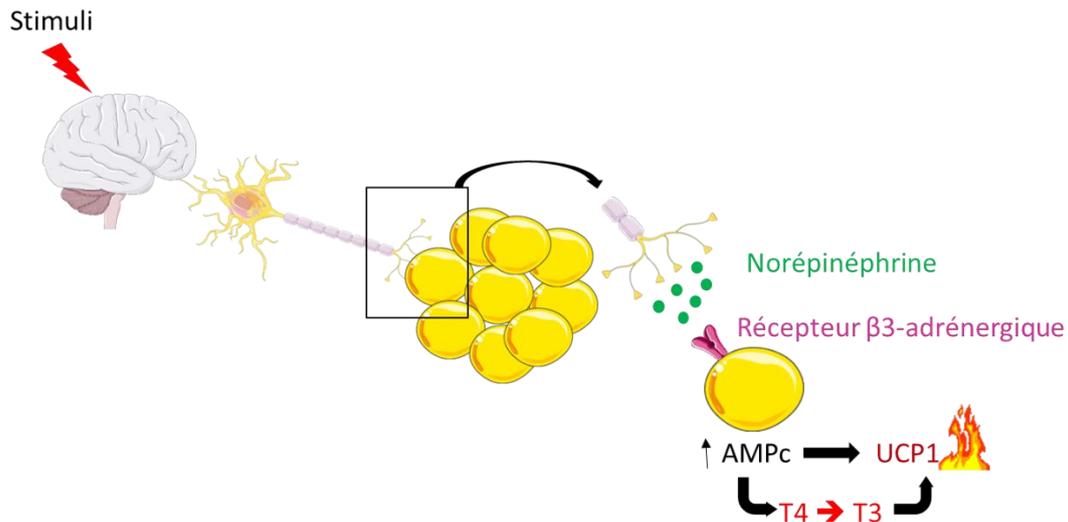
**Figure 29 : Induction du brunissement du tissu adipeux blanc.** CNS : système nerveux central, SNS : système nerveux sympathique, Hormone thyroïdienne T3 : tri-iodothyronine, T4 : thyroxine, FGF21 : *fibroblast growth factor* 21, Metrnl : *meteorin-like*. Tiré de Barthelemy and Wolowczuk, 2020.

\*Thé vert, curcumin, capsinoïdes (issus des piments rouges), resvératrol et berbérine (issus de fruits et de plantes) sont des inducteurs du brunissement du tissu adipeux blanc (Brandão et al., 2021).

### a) Rôle du système nerveux dans le brunissement du tissu adipeux blanc

L'augmentation de la thermogénèse correspondant au brunissement du tissu adipeux blanc, est une adaptation de l'organisme pour maintenir la température corporelle lors d'une baisse des températures environnementales. Ainsi, une exposition au froid déclenche le brunissement du tissu adipeux blanc (Barbatelli et al., 2010; Cousin et al., 1996; Gao et al., 2018; Hui et al., 2015; Knudsen et al., 2014;

Li et al., 2018a; Vitali et al., 2012). Le froid induit une activation du système nerveux sympathique qui innerve les tissus adipeux bruns et blancs (**Figure 30**).



**Figure 30 : Contrôle du brunissement par le système nerveux sympathique.** L'activation du système nerveux sympathique par un stimulus conduit à la libération de norépinéphrine par les nerfs innervant le tissu adipeux blanc. La norépinéphrine se lie au récepteur  $\beta$ 3-adrénergique exprimé par les adipocytes et induit une augmentation de l'AMPc qui permet la synthèse de la T3 et l'expression d'UCP1. Figure réalisée avec Servier Medical Art et BioRender.

L'activation des neurones POMC (neurones exprimant la proopiomélanocortine) de l'hypothalamus ventromédian (VMH) permet l'induction du brunissement (Dodd et al., 2015), tandis que l'activation des neurones AgRP (neurones exprimant l'*agouti-related protein*) réprime le brunissement (Ruan et al., 2014). Les nerfs sympathiques (activateurs) sécrètent ensuite la norépinéphrine activant les récepteurs  $\beta$ 3-adrénergiques exprimés par les adipocytes. Ceci provoque une augmentation de l'AMP cyclique (AMPc) dans le cytosol des adipocytes. L'AMPc stimule directement l'expression d'UCP1, et induit l'expression de l'enzyme D2 (iodothyronine désiodase), permettant ainsi la conversion de la T4 (tétra-iodothyronine ou thyroxine) en T3 (tri-iodothyronine), qui peut alors induire la biogénèse mitochondriale et l'expression des gènes liés au brunissement dont *Ucp1* (Chen et al., 2013; Jesus et al., 2001; Villarroya et al., 2017a; Weitzel and Alexander Iwen, 2011; Zhang et al., 2016).

De façon intéressante, un adipocyte beige qui a été exposé au froid puis qui est revenu à thermoneutralité garde cet événement en mémoire. En effet, lors d'une exposition au froid induisant l'apparition des adipocytes beiges, une marque épigénétique (H3K4me1 ; correspondant à une modification épigénétique de l'histone

H3) est enrichie dans les régions régulatrices des gènes thermogéniques et d'oxydation des lipides. Cette marque épigénétique persiste lors du retour à la thermoneutralité et indique que la chromatine est ouverte. Les régions régulatrices ainsi marquées permettraient une expression des gènes impliqués dans le brunissement plus rapide et plus forte lors d'une seconde exposition au froid (Roh et al., 2018).

## **b) Rôle du microbiote intestinal dans le brunissement du tissu adipeux blanc**

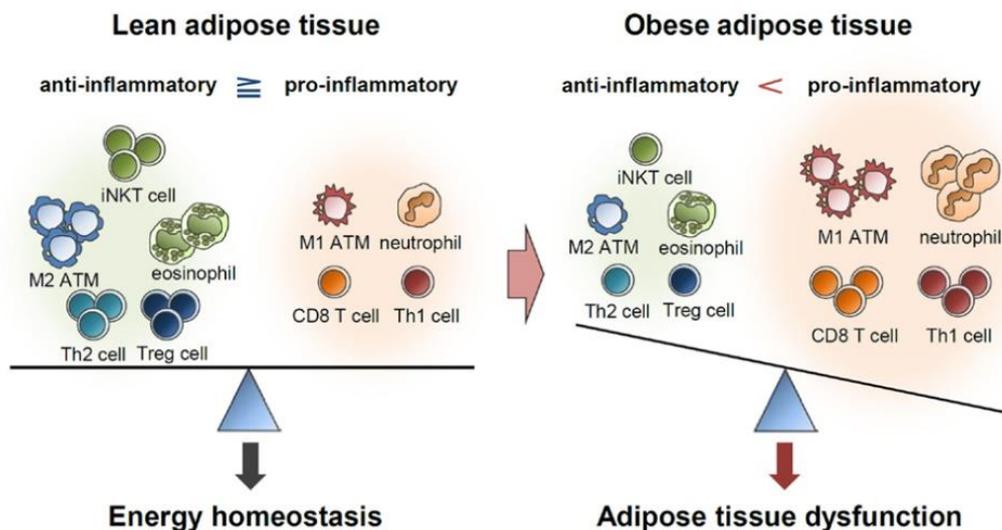
Lors d'un jeûne intermittent, la modification du microbiote intestinal est responsable du brunissement du tissu adipeux blanc (Li et al., 2017; Liu et al., 2019). La proportion de Firmicutes par rapport aux Bacteroïdètes, les deux phyla principaux dans l'intestin, est fortement augmentée lors du jeûne. Cette modification du microbiote provoque une plus forte sécrétion de lactate et d'acétate dans le sang qui sont importés dans les tissus adipeux *via* le transporteur MCT1 (*monocarboxylate transporter 1*). Le lactate et l'acétate sont tous les deux des inducteurs du brunissement (Hanatani et al., 2016; Kim et al., 2017b; Sahuri-Arisoylu et al., 2016; Yao et al., 2020b). L'exposition au froid est également associée à des modifications du microbiote intestinal démontrées comme étant responsables du brunissement du tissu adipeux blanc et d'une augmentation de la thermogénèse (Chevalier et al., 2015; Ziętak et al., 2016).

Les changements de composition du microbiote sont provoqués par une augmentation de la production d'acides biliaires (Worthmann et al., 2017). Les acides biliaires induisent le brunissement *via* l'activation du récepteur TGR5 (récepteur membranaire pour les acides biliaires) dans les tissu adipeux, ce qui permet l'induction de la lipolyse et la biogénèse mitochondriale (Velazquez-Villegas et al., 2018). Les acides biliaires pourraient également induire le brunissement en activant les récepteurs FXR (*farnesoid X receptor*) intestinaux. Les acides biliaires seraient ensuite transformés en acides biliaires secondaires (avec une majorité d'acide lithocholique) et permettraient ainsi l'activation de TGR5 (Fang et al., 2015). Étonnamment, la déplétion du microbiote intestinal conduit également au brunissement du tissu adipeux blanc (Suárez-Zamorano et al., 2015). Dans ce

modèle, le brunissement résulte du développement d'un profil immunitaire de type 2 dans le tissu adipeux blanc.

### c) Rôle du système immunitaire dans le brunissement du tissu adipeux blanc

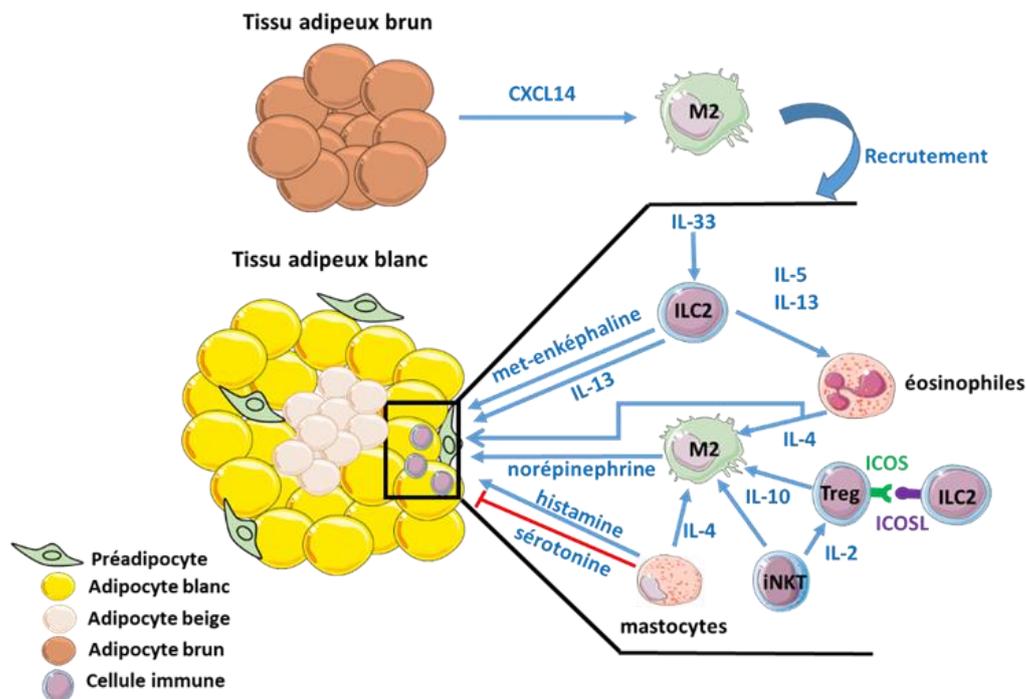
Le développement d'une immunité de type 2 (anti-inflammatoire) dans le tissu adipeux blanc semble essentiel au brunissement du tissu. En effet, en contexte d'obésité, dans lequel le tissu adipeux blanc a un profil immunitaire majoritaire de type 1 (proinflammatoire, **Figure 31**), le brunissement du TAB est réprimé. Nous allons ici décrire comment le système immunitaire permet le développement du tissu adipeux beige.



**Figure 31 : Modifications des cellules immunes du tissu adipeux blanc en contexte d'obésité.** Le tissu adipeux blanc d'un organisme normo-pondéral (*lean*) est majoritairement composé de cellules immunes de type 2, son profil sécrétoire est anti-inflammatoire. A l'inverse, le tissu adipeux d'un organisme obèse est majoritairement composé de cellules immunes de type 1, son profil est proinflammatoire et il est dysfonctionnel (notamment, insulino-résistant). Tiré de Choe et al., 2016.

Comme représenté sur la **Figure 32**, lors de l'induction du brunissement du tissu adipeux blanc, l'IL-33 (dont une source cellulaire a été identifiée en 2019 comme étant des cellules stromales exprimant le marqueur PDGFR $\alpha$  (Spallanzani et al., 2019)) permet le recrutement et l'activation des ILC2s (*type 2 innate lymphoid cells*). Les ILC2s sécrètent alors la méthionine-enképhaline, de l'IL-5 et de l'IL-13

(Brestoff et al., 2015). La méthionine-enképhaline se lie au récepteur opiacé delta des cellules adipeuses, ce qui entraîne une augmentation de l'AMPc et une augmentation de l'activité de PKA (*cAMP-dependent protein kinase*) ; induisant ainsi la lipolyse et le brunissement (Liu et al., 2003; Nestler and Tallman, 1988; Suo et al., 2018).



**Figure 32 : Rôle du système immunitaire dans le brunissement du tissu adipeux blanc.** Représentation des différentes cellules immunes du tissu adipeux blanc et de leurs sécrétions impliquées dans le brunissement. Le BAT sécrète également une chimiokine (CXCL14) permettant le recrutement des macrophages M2-like dans le tissu adipeux blanc. Schéma conçu à l'aide de Servier Medical Art et à partir de Brestoff et al., 2015; Cereijo et al., 2018; Finlin et al., 2017; Lee et al., 2015; Molofsky et al., 2013; Qiu et al., 2014; Wood et al., 2009; Zhang et al., 2019b.

L'IL-5 et l'IL-13 permettent le recrutement et l'activation d'éosinophiles. L'IL-13 peut induire directement la différenciation des préadipocytes en adipocytes beiges (Lee et al., 2015). Les éosinophiles produisent de l'IL-4 qui permet le recrutement et la polarisation des macrophages en macrophages « M2-like ». En parallèle, l'IL-4 agit directement sur les préadipocytes pour induire leur différenciation en adipocytes beiges (Lee et al., 2015). L'IL-4 est également sécrétée par les mastocytes. Les mastocytes activés libèrent également de l'histamine qui favorise le brunissement (Finlin et al., 2017). Cependant, les mastocytes auraient également un rôle inhibiteur du brunissement *via* la sécrétion de sérotonine (Zhang et al., 2019b). Les iNKT et les Tregs présents dans le tissu sécrètent de l'IL-10 qui participe à la polarisation des macrophages en macrophage « M2-like ». L'IL-2 sécrétée par les iNKT permet la

prolifération des Tregs et leur survie. Les Tregs sont retenus dans le tissu adipeux par leur interaction avec les ILC2s *via* les molécules ICOS (*inducible co-stimulator*, exprimé par les Tregs)-ICOSL (*ICOS ligand*, exprimé par les ILC2s) (Molofsky et al., 2015). Enfin, le BAT activé sécrète la chimiokine CXCL14 (*chemokine (C-X-C motif) ligand 4*) dans la circulation sanguine. Le CXCL14 favorise la migration des macrophages « M2-like » vers le tissu adipeux (Cereijo et al., 2018). Plusieurs études montrent que le brunissement est associé à la polarisation des macrophages en « M2-like » cependant leur rôle dans le brunissement n'est pas clairement défini. En effet, une étude montre que la sécrétion de catécholamines (NE) par les macrophages « M2-like » du tissu adipeux est nécessaire au brunissement lors d'une exposition au froid (Qiu et al., 2014). Cependant, une autre étude contredit la capacité des macrophages à produire des catécholamines et montre qu'ils ne sont pas nécessaires au brunissement et à la thermogénèse adaptative (Fischer et al., 2017).

#### **d) Rôle de l'autophagie dans le brunissement du tissu adipeux blanc**

Plusieurs études suggèrent un rôle de l'**autophagie** - un processus d'« autodigestion » consistant en la dégradation de composants intracellulaires par le lysosome (Mizushima, 2007) - dans le brunissement du tissu adipeux blanc. Cependant, les résultats de ces études sont contradictoires. Deux études montrent qu'une exposition de souris au froid (Altshuler-Keylin et al., 2016; Cairó et al., 2016) ou un traitement d'adipocytes bruns avec un agoniste  $\beta_3$ -adrénergique (Altshuler-Keylin et al., 2016), un inducteur de l'AMPc ou encore de la norépinéphrine (Cairó et al., 2016), entraînent la diminution de l'expression des gènes liées à l'autophagie. Ceci suggère que l'autophagie ne serait pas induite lors du brunissement du tissu adipeux blanc. D'autres études montrent au contraire que l'exposition au froid active l'autophagie dans le tissu adipeux brun et dans les neurones POMC de l'hypothalamus, et qu'elle est nécessaire à la thermogénèse du tissu adipeux brun (Martinez-Lopez et al., 2016; Yau et al., 2021). De plus, l'autophagie est essentielle pour la conversion d'un adipocyte beige en adipocyte blanc (Altshuler-Keylin et al., 2016). Ces résultats suggèrent que l'autophagie pourrait être impliquée dans le brunissement du tissu adipeux blanc (positivement ou négativement), notamment *via* deux formes particulières d'autophagie : la mitophagie et la lipophagie.

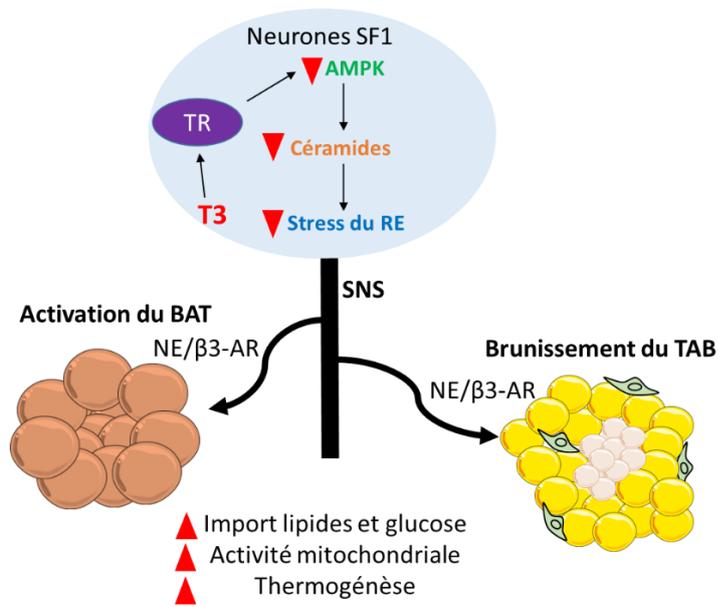
La **mitophagie** correspond à la dégradation sélective des mitochondries par un processus autophagique. Ce processus permet l'élimination des mitochondries exprimant UCP1 dans les adipocytes beiges ; favorisant ainsi le retour vers un phénotype d'adipocyte blanc (Altshuler-Keylin et al., 2016).

La **lipophagie**, quant à elle, correspond à la dégradation des gouttelettes lipidiques par autophagie, ce qui permet de libérer de l'énergie. La lipophagie survient dans le tissu adipeux brun lors de son activation suite à une exposition au froid et, en association avec la lipolyse, permet de fournir des acides gras libres pour la thermogénèse (Martinez-Lopez et al., 2016). Ainsi, il est très probable que ce mécanisme intervienne également lors du brunissement du tissu adipeux blanc.

### **e) Rôle des hormones, cytokines, métabolites, adipokines ou myokines sur le brunissement du tissu adipeux blanc.**

Plusieurs facteurs solubles impliqués dans le brunissement du tissu adipeux blanc ont été identifiés.

Les **hormones thyroïdiennes** peuvent moduler la thermogénèse adaptative en agissant directement sur le tissu adipeux ou, indirectement, en agissant sur le système nerveux central (**Figure 33**). En effet, les récepteurs des hormones thyroïdiennes, notamment le récepteur TR $\beta$ , sont exprimés dans l'hypothalamus et les tissus adipeux (blanc et brun) (Santini et al., 2014). L'administration directe de la T<sub>3</sub> dans le noyau ventromédian hypothalamique induit le brunissement du tissu adipeux blanc (Martínez-Sánchez et al., 2017). Plus précisément, dans l'hypothalamus la T<sub>3</sub> inhibe la voie AMPK (*AMP-activated protein kinase*) dans les neurones SF1 (*steroidogenic factor 1*) induisant une baisse de la quantité de céramides. La diminution des céramides entraîne une réduction du stress du réticulum endoplasmique (RE) dans les neurones hypothalamiques, ce qui permet l'activation du système nerveux sympathique et la signalisation  $\beta$ 3-adrénergique ; déclenchant le brunissement du tissu adipeux blanc (Martínez-Sánchez et al., 2017).

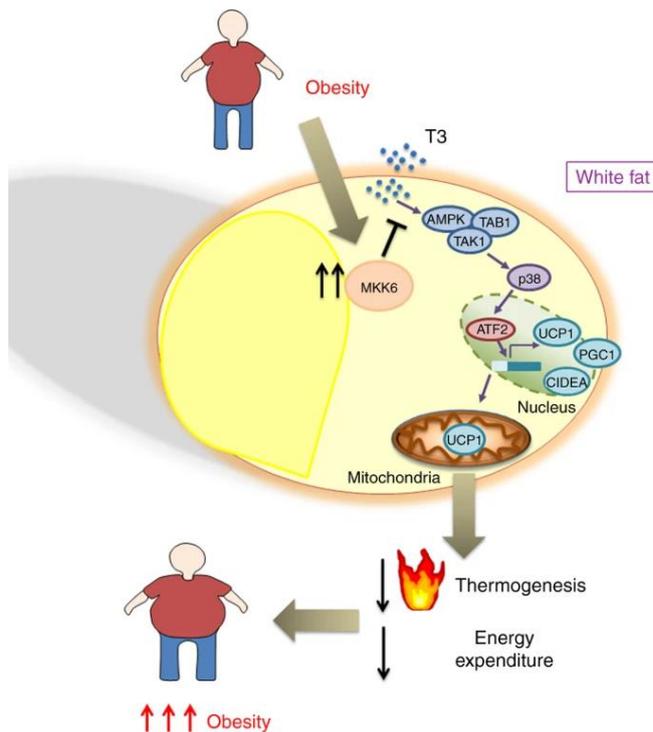


**Figure 33 : Rôle des hormones thyroïdiennes dans le brunissement du tissu adipeux blanc.**

Les hormones thyroïdiennes peuvent agir directement sur le tissu adipeux blanc, ou indirectement, sur le système nerveux central, au niveau des noyaux ventromédians hypothalamiques.

Les triangles rouges vers le bas indiquent une diminution, ceux vers le haut indiquent une augmentation. Modifié à partir de Martínez-Sánchez et al., 2017.

Au niveau cellulaire, il a été montré que la T3 provoque la lipolyse dans les cellules adipeuses et active la voie AMPK et le complexe TAB1/TAK1 qui permettent l'activation de la kinase p38. P38 permet la phosphorylation d'ATF2 (*Activating Transcription Factor 2*) qui est alors transloqué dans le noyau pour induire l'expression de gènes thermogéniques dont UCP1. En contexte d'obésité, cette cascade moléculaire initiée par la T3 est inhibée par une surexpression de la protéine MKK6 (**Figure 34**) (Matesanz et al., 2017). De plus, un site de liaison des récepteurs aux hormones thyroïdiennes existe dans la séquence régulatrice du promoteur d'UCP1, ce qui permettrait à la T3 de directement réguler l'expression d'UCP1 (Santini et al., 2014).



**Figure 34 : Répression de l'action des hormones thyroïdiennes sur les adipocytes en contexte d'obésité.**

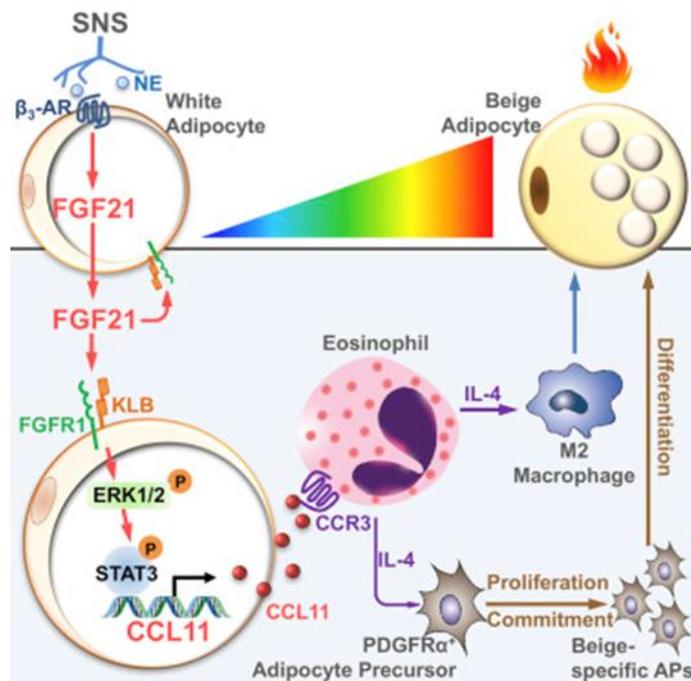
En contexte d'obésité, l'induction d'UCP1 par la T3 est inhibée par MKK6, ce qui diminue la thermogénèse et la dépense énergétique. Tiré de Matesanz et al., 2017.

Parmi les hormones sexuelles, l'**œstradiol** semble réguler le brunissement du tissu adipeux blanc. L'œstradiol agit d'une part sur l'activité du système nerveux sympathique et la sensibilisation du SCAT à la norépinephrine. En effet, l'œstradiol inhibe la voie AMPK dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus permettant l'activation du système nerveux sympathique (Martínez de Morentin et al., 2014). L'œstradiol provoque également une augmentation de l'expression de la tyrosine hydroxylase (nécessaire à la production de norépinephrine) dans les neurones innervant le SCAT et une augmentation de l'expression des récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques (Miao et al., 2016).

D'autre part, l'œstradiol induit l'expression de la hème oxygénase-1 dans les macrophages du tissu adipeux blanc, ce qui permet la réduction des ROS (espèces réactives de l'oxygène) cytoplasmiques et favorise la polarisation des macrophages en « M2-like » (Sul et al., 2021).

Le **FGF21** (*Fibroblast Growth Factor 21*) est produit principalement par le foie et est donc considéré comme une hépatokine (Markan et al., 2014). Cependant, le FGF21 peut également être sécrété par les tissus adipeux (blanc et brun), le pancréas et les muscles squelettiques (Owen et al., 2015). Lors d'exercices physiques ou d'une exposition au froid, la quantité de FGF21 produite dans les tissus adipeux et sécrétée dans le sang est augmentée (Cuevas-Ramos et al., 2012; Fisher et al., 2012; Kim et al.,

2013; Lee et al., 2013b, 2014; Tanimura et al., 2016). Le FGF21 induit le brunissement du tissu adipeux blanc en agissant sur le système nerveux central ou directement sur les adipocytes. Le FGF21 traverse la barrière hématoencéphalique et active le système nerveux sympathique, ce qui déclenche le brunissement du SCAT (Douris et al., 2015; Owen et al., 2014). Par ailleurs, le FGF21 produit suite à la stimulation des tissus adipeux par le système nerveux sympathique, agit de façon autocrine sur le tissu permettant l'expression de la chimiokine CCL11 (*C-C motif chemokine ligand 11*) par les adipocytes (**Figure 35**). CCL11 permet le recrutement des éosinophiles dans le tissu adipeux (Huang et al., 2017). De plus, le FGF21 stimule la production d'adiponectine qui est nécessaire à la prolifération des macrophages M2 (Hui et al., 2015).



**Figure 35 : Rôle du FGF21 dans le brunissement du tissu adipeux blanc.** La signalisation  $\beta_3$ -adrénergique provoque la production de FGF21 par les adipocytes. Le FGF21 provoque l'expression de CCL11 par les adipocytes, favorisant ainsi le recrutement des éosinophiles dans le tissu adipeux blanc et la polarisation des macrophages nécessaire au brunissement. Tiré de Huang et al., 2017.

Plusieurs **myokines** (cytokines sécrétées par les muscles) telles que l'irisine, la *meteorin-like*, la myostatine, et l'acide  $\beta$ -aminoisobutyrique, ainsi que l'IL-6, ont été rapportées comme étant impliquées dans le brunissement du TAB (Stanford et al., 2015).

L'irisine est produite principalement dans les muscles suite à l'exercice physique et est sécrétée dans la circulation sanguine. Il a été montré que l'irisine induit le

brunissement du SCAT en permettant la production du facteur de transcription PPAR $\alpha$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) (Boström et al., 2012). Chez l'Homme, une étude montre que l'irisine est produite également lors d'une exposition au froid, mais que cette production est liée aux frissons (donc à l'activité musculaire) et permet l'activation du tissu adipeux brun et des adipocytes beiges (Lee et al., 2014).

La *meteorin-like* (Mtrnl) est produite par les muscles lors d'exercices physiques et par les tissus adipeux lors d'une exposition au froid. Elle induit le brunissement du tissu adipeux blanc (SCAT et VAT) en favorisant le recrutement des éosinophiles dans le tissu et la production d'IL-4/IL-13 nécessaire à la polarisation des macrophages en « M2-like » (Rao et al., 2014).

L'acide  $\beta$ -aminoisobutyrique est produit lors d'un exercice physique par les muscles et induit l'expression de gènes thermogéniques dans le SCAT de souris également *via* l'action du facteur de transcription PPAR $\alpha$  (Roberts et al., 2014).

Contrairement aux autres myokines, la myostatine a plutôt un rôle inhibiteur sur le brunissement du tissu adipeux blanc. Elle régule la production d'un micro-ARN (miR-34a) qui inhibe, dans les muscles et les tissus adipeux, l'expression du gène *Fndc5* (codant la *fibronectin type III domain containing 5*), responsable de la production du précurseur de l'irisine (Ge et al., 2017). De plus, la myostatine empêche l'activation de la voie AMPK nécessaire à la production du facteur de transcription PGC1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha*) qui induit l'expression de *Fndc5* (Shan et al., 2013).

Enfin, L'IL-6 produite par les muscles, les tissus adipeux et la moelle osseuse semble participer au brunissement du TAB (Abdullahi et al., 2017; Kristóf et al., 2019; Phillips, 2019).

Le **succinate**, un intermédiaire métabolique du cycle de Krebs, est impliqué dans la thermogénèse UCP1-dépendante des tissus adipeux brun et beige. La quantité de succinate est augmentée dans les tissus adipeux lors de l'induction de la thermogénèse induite par le froid. Le succinate augmente la respiration mitochondriale qui est source de ROS. Les ROS produits permettraient de sensibiliser UCP1 aux acides gras *via* l'oxydation d'une de ses cystéines (Chouchani et al., 2016; Mills et al., 2018; Phillips, 2019).

La **PGE2** (prostaglandine E2) est un métabolite lipidique produit à partir de l'acide arachidonique grâce à l'action des cyclooxygénases (les enzymes COX). Lors d'une exposition au froid, l'expression des COX est augmentée et l'inhibition spécifique de COX2 réprime l'expression d'UCP1 (ARNm et protéine) dans le SCAT. La régulation de l'expression d'UCP1 par les protéines COX se fait par l'intermédiaire de PGE2. Bien que PGE2 n'ait pas été dosée lors de l'exposition au froid, l'utilisation d'inhibiteurs de ses récepteurs a permis de montrer qu'elle est nécessaire à la surexpression d'UCP1 (Madsen et al., 2010). De plus, PGE2 induit *in vitro* l'expression des gènes liés au brunissement chez des préadipocytes primaires (García-Alonso et al., 2013). Par ailleurs, PGE2 permettrait la polarisation des macrophages en « M2-like » (selon contexte) (Saleh et al., 2020).

Le **VEGF** (*vascular endothelial growth factor*) est produit par les adipocytes lors d'une exposition au froid, d'un jeûne intermittent et d'exercices physiques (During et al., 2015; Kim et al., 2017a; Xue et al., 2009). Le VEGF participe au brunissement du tissu adipeux blanc : il favorise la polarisation des macrophages en « M2-like » et améliore l'innervation et la production de norépinéphrine, la vascularisation et la réponse des tissus adipeux au système nerveux sympathique (par augmentation des récepteurs  $\beta$ 3-adrénergiques) (Kim et al., 2017; Zhao et al., 2018). Étonnamment, une autre étude montre que le VEGF aurait plutôt un rôle inhibiteur sur le brunissement du tissu adipeux blanc (Chen et al., 2019).

**SIRT1** (sirtuine 1) est une désacétylase qui joue un rôle important dans le brunissement du tissu adipeux blanc. L'activation de la voie AMPK dans les adipocytes entraîne une augmentation de l'expression de SIRT1 (Lai et al., 2021). SIRT1 désacétyle alors PPAR $\gamma$ , ce qui permet le détachement de son répresseur NCoR (*nuclear receptor co-repressor 1*) et le recrutement de PRDM16 (*PR-domain containing 16*) conduisant à l'induction des gènes liés au brunissement (Qiang et al., 2012).

Les **peptides natriurétiques**, produits par le cœur (lors de surcharge volémique du liquide extra-cellulaire), provoquent le brunissement du tissu adipeux blanc *in vivo* chez les souris, et induisent l'expression des gènes liés au brunissement et la biogénèse mitochondriale dans des cellules souches adipocytaires humaines *in vitro*. Les peptides natriurétiques provoquent une augmentation de GMP cyclique qui

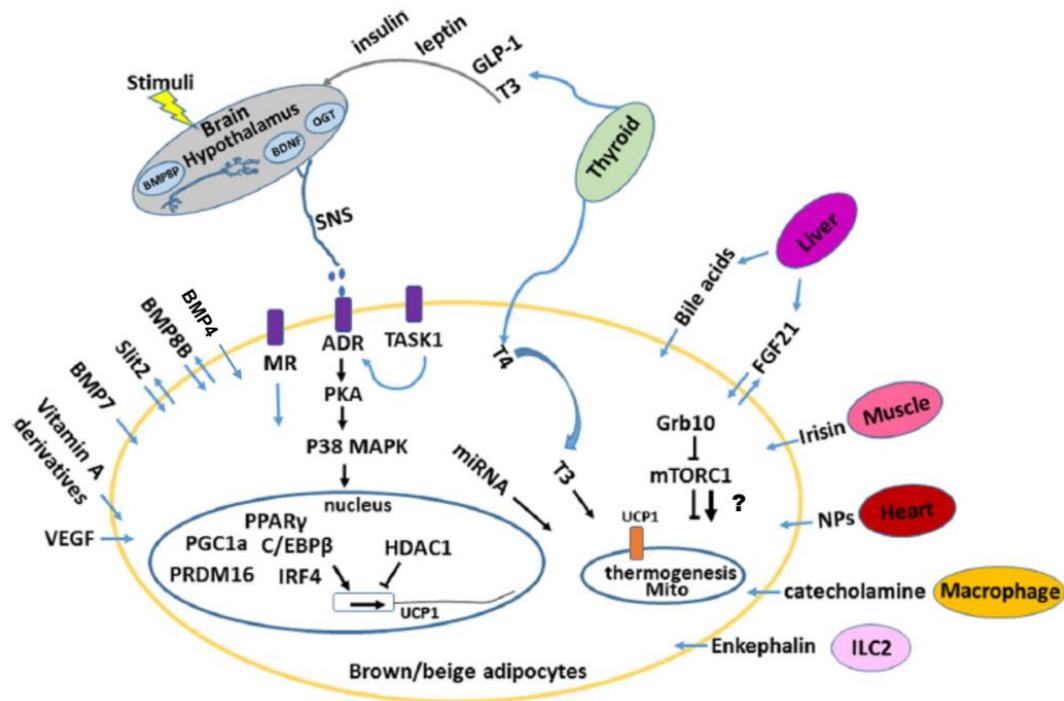
permet l'activation de la voie PKG (*cGMP-dependent protein kinase*). La voie PKG conduit à l'activation de la signalisation p38 MAPK et de mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) qui sont impliqués dans le brunissement du tissu adipeux blanc (Bordicchia et al., 2012; Liu et al., 2016, 2018). Cependant, le rôle de mTORC1 dans le brunissement n'est pas définitivement établi puisqu'une étude préalable avait plutôt identifié un rôle inhibiteur de mTORC1. En effet, lors d'une exposition au froid, il y a une plus forte production de Grb10 (*growth factor receptor binding protein-10*) dans les tissus adipeux. Le Grb10 inhibe mTORC1 permettant ainsi la lipolyse et le brunissement du SCAT (Liu et al., 2014).

L'**angiotensine II** (produit lors de déplétion volémique) induit le brunissement du tissu adipeux blanc chez la souris et induit les gènes thermogéniques dans des préadipocytes primaires traités *in vitro*. L'angiotensine II agit *via* une diminution de la voie ERK1/2 et une augmentation des voies de signalisation Akt et AMPK. *A contrario*, l'angiotensine I aurait plutôt un rôle inhibiteur sur le brunissement. L'angiotensine II semble être impliquée dans le brunissement induit par la T3 : la T3 augmente l'expression du récepteur de l'angiotensine II, et l'inhibition de ce récepteur par un antagoniste réduit l'expression des protéines PRDM16 et UCP1 (Than et al., 2017).

Une nouvelle adipokine, l'**asprosine**, inhibe le brunissement du SCAT *via* la réduction de l'expression de NRF2 (*Nuclear Respiratory Factor 2*), régulateur de l'expression de gènes mitochondriaux (Miao et al., 2021).

D'autres facteurs comme l'**insuline** et la **leptine** pourraient également participer au brunissement du tissu adipeux blanc puisqu'ils ont déjà un rôle identifié dans la thermogénèse du tissu adipeux brun (Luo and Liu, 2016a). C'est d'ailleurs le cas de l'**adiponectine** qui est nécessaire à la polarisation des macrophages en « M2-like » (Hui et al., 2015).

La **Figure 36** ci-dessous résume l'ensemble des facteurs identifiés à ce jour comme participant au brunissement du tissu adipeux blanc.

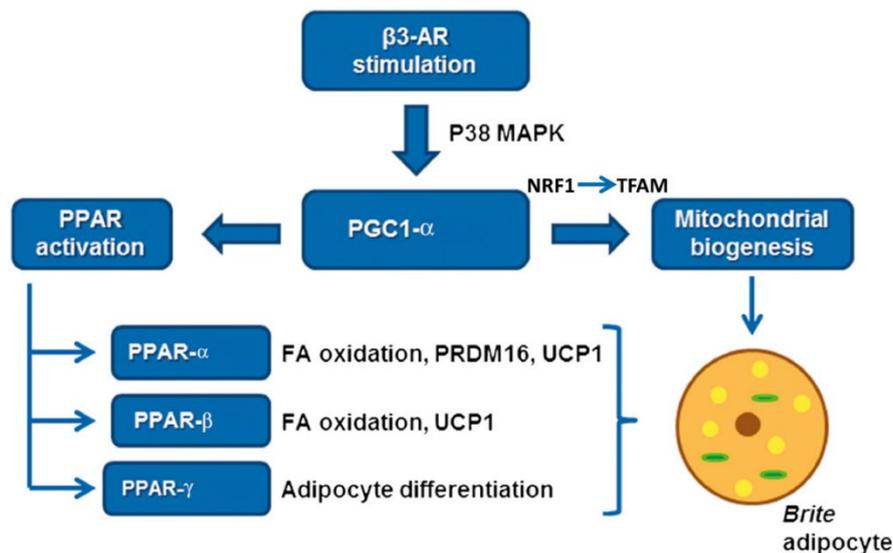


**Figure 36 : Facteurs impliqués dans le brunissement du tissu adipeux blanc.** Le BMP7 (*bone morphogenetic protein 7*) favorise la polarisation des macrophages M2 (effet indirect, mécanisme non connu ; Boon et al., 2013) et avec BMP4 induit l'expression des gènes liés au brunissement (Qian et al., 2013; Tseng et al., 2008). Le BMP8b augmente la thermogénèse dans le tissu adipeux brun et la phosphorylation d'AMPK dans l'hypothalamus (Whittle et al., 2012). Le GLP1 (*glucagon-like peptide-1*) est une incrétine, c'est-à-dire une hormone intestinale. Son récepteur : le GLP1R est exprimé par le système nerveux central et son activation inhibe la voie AMPK hypothalamique (Beiroa et al., 2014). La répression de MR (*mineralocorticoid receptor*) réduit l'autophagie dans les cellules adipeuses et favorise le brunissement (Armani et al., 2014). Slit2 est une protéine notamment produite par les adipocytes beiges et est surexprimée lors d'une exposition au froid. Elle favorise la thermogénèse *via* l'activation de la voie PKA dans les adipocytes (Svensson et al., 2016). TASK1 (*Twik-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel-1*) amplifierait la signalisation des récepteur  $\beta$ 3-adrenergique et MR (Pisani et al., 2016). Les dérivés de la vitamine A, notamment le rétinol, semble participer au brunissement du SCAT *via* l'induction de gènes thermogéniques et de gènes oxydatifs de la mitochondrie (Fenzl et al., 2020). L'expression de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) dans l'hypothalamus est nécessaire au brunissement du tissu adipeux blanc (Cao et al., 2011). Enfin, l'OGT (*O-GlcNac transferase*) inhibe le brunissement en régulant l'activité des neurones AgRP (Ruan et al., 2014). Modifié à partir de Luo and Liu, 2016.

## f) Régulation transcriptionnelle du brunissement du tissu adipeux blanc

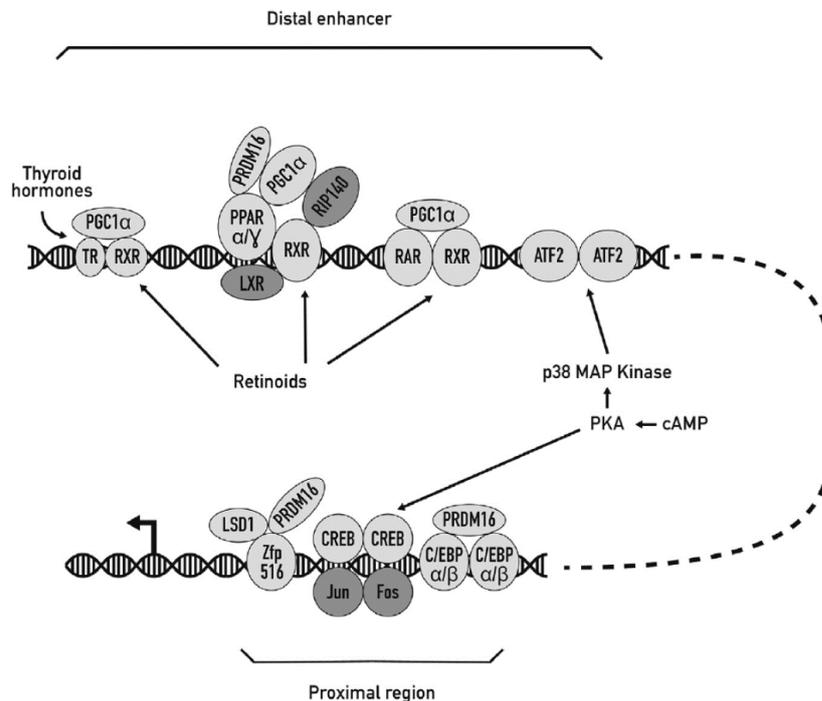
L'expression d'UCP1 et l'induction de la biogénèse mitochondriale sont essentielles au brunissement du tissu adipeux blanc et sont finement régulées au niveau transcriptionnel.

Régulation par des **facteurs de transcription** - L'activation de la signalisation  $\beta$ 3-adrénergique dans les cellules adipeuses active p38 MAPK qui phosphoryle le facteur de transcription ATF2 permettant la production de PGC1- $\alpha$  (**Figure 37**). PGC1- $\alpha$  déclenche la biogénèse mitochondriale, notamment *via* la production de NRF1 (*Nuclear Respiratory Factor 1*) qui induit l'expression de TFAM (*mitochondrial transcription factor A*), facteur responsable de la réplication mitochondriale (Bargut et al., 2017). PGC1- $\alpha$  permet également la production des facteurs de transcription PPARs. PPAR $\gamma$  contrôle la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures. PPAR- $\alpha$  et PPAR- $\beta$  sont impliqués dans l'oxydation des lipides et la transcription d'*Ucp1*. PPAR- $\alpha$  contrôle également l'expression de PRDM16 qui est essentiel à l'identité des adipocytes de type bruns/beiges (Seale et al., 2011). En effet, la perte d'expression de PRDM16 dans les adipocytes beiges induit leur retour vers un phénotype d'adipocytes blancs (Bargut et al., 2017).



**Figure 37 : Principaux facteurs de transcriptions impliqués dans le brunissement du tissu adipeux blanc.** La signalisation  $\beta$ -3 adrénérgique induit l'activation de la p38 MAPK permettant l'expression de PGC1- $\alpha$ . PGC1- $\alpha$  permet l'activation des facteurs PPAR et la biogénèse mitochondriale. Modifié à partir de Bargut et al., 2017.

La régulation de la transcription d'Ucp1 est effectuée au niveau de deux régions régulatrices situées dans la partie 5' non codante du gène (**Figure 38**).

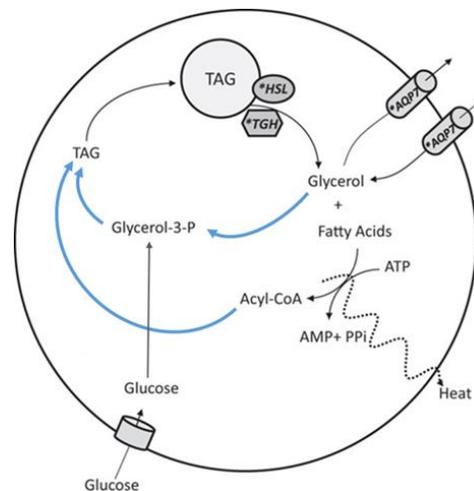


**Figure 38 : Régions régulatrices du promoteur d'UCP1.** LXR: *liver X receptor*, LSD1: *lysine-specific demethylase-1*, ATF2: *activation transcription factor 2*, RAR: *retinoic acid receptor*, TR: *thyroid hormone receptor*, RXR: *retinoid X receptor*, RIP140: *receptor-interacting protein 140*. Tiré de Villarroya et al., 2017.

La région proximale contient un site de liaison à CREB (*c-AMP Response Element-binding protein*) qui permet l'induction d'Ucp1 *via* l'AMPc et une répression *via* AP2 (*c-Jun/c-Fos*), et un site de liaison C/EBP (*CCAAT-enhancer-binding protein*) qui permet le recrutement de C/EBPα et C/EBPβ. Dans la région proximale il y a également un site de liaison du facteur Zfp16 (*Zinc finger protein 16*). La deuxième région régulatrice est une région « *enhancer* » qui contient des récepteurs nucléaires hétérodimériques PPARα/RXR, RAR/RXR, LXR/RXR, TR/RXR permettant la régulation d'Ucp1 par des dérivés d'acides gras, les acides rétinoïques (dérivés de la vitamine A), et les hormones thyroïdiennes, et elle contient un site de liaison d'ATF2 qui permet également une réponse à l'AMPc. Des co-régulateurs comme PGC1-α, RIP140 (*receptor-interacting protein 140*) et LSD1 (*lysine-specific demethylase-1*) se lient aux récepteurs nucléaires et régulent leur activité (Villarroya et al., 2017b). RIP140 inhibe l'expression des gènes spécifiques des adipocytes bruns/beiges dont Ucp1 et Prdm16, et favorise la synthèse de triglycérides *via* le cycle futile de recyclage

du glycérol\* (**Figure 39**) (cycle actif dans les adipocytes beiges, (Guan et al., 2002; Kiskinis et al., 2014; Mazzucotelli et al., 2007)).

**\*Cycle futile de recyclage du glycérol :** Les triglycérides sont formés à partir du glycérol (et non du glucose) et des acides gras libres. Cette réaction induit plus de consommation d'ATP (Kiskinis et al., 2014; Mazzucotelli et al., 2007).



**Figure 39 : Cycle futile des triacylglycérols (TAG) dans les adipocytes.** Le cycle futile est indiqué par les flèches bleues. Les triglycérides (TAG) sont formés à partir du glycérol et des acides gras libres. AMP : adénosine monophosphate, PPi : pyrophosphate inorganique. Modifié à partir de Kiskinis et al., 2014.

LSD1 inhibe l'expression de gènes spécifiques des tissus adipeux blancs et interagit avec NRF1 pour activer l'expression de gènes spécifiques du tissu adipeux brun (Duteil et al., 2016). LSD1 favorise également l'expression des gènes liés au métabolisme oxydatif dans les tissus adipeux blancs (Duteil et al., 2014). IRF4 (*interferon regulatory factor 4*) est induit dans les adipocytes lors du brunissement du tissu adipeux blanc (suite à un jeûne ou une exposition au froid) et stimule l'expression de PGC1 $\alpha$  et PRDM16. IRF4 interagit avec PGC1 $\alpha$  pour induire l'expression d'UCP1 (Kong et al., 2014).

De nombreux autres facteurs de transcription tels que Ebf2 (*Early  $\beta$ -cell factor 2*), Ews (*Ewing sarcoma*) et Ybx1 (*Y box binding protein*) sont également impliqués dans l'expression d'UCP1, la thermogénèse et le brunissement (Brandão et al., 2021).

**Régulation épigénétique** - L'expression d'Ucp1 et des gènes thermogéniques est également régulée *via* des mécanismes épigénétiques (Brandão et al., 2021). L'activation de la signalisation  $\beta$ 3-adrénergique permet l'augmentation de l'acétylation de l'acide aminé 27 de l'histone 3 (H3K27) et la réduction des

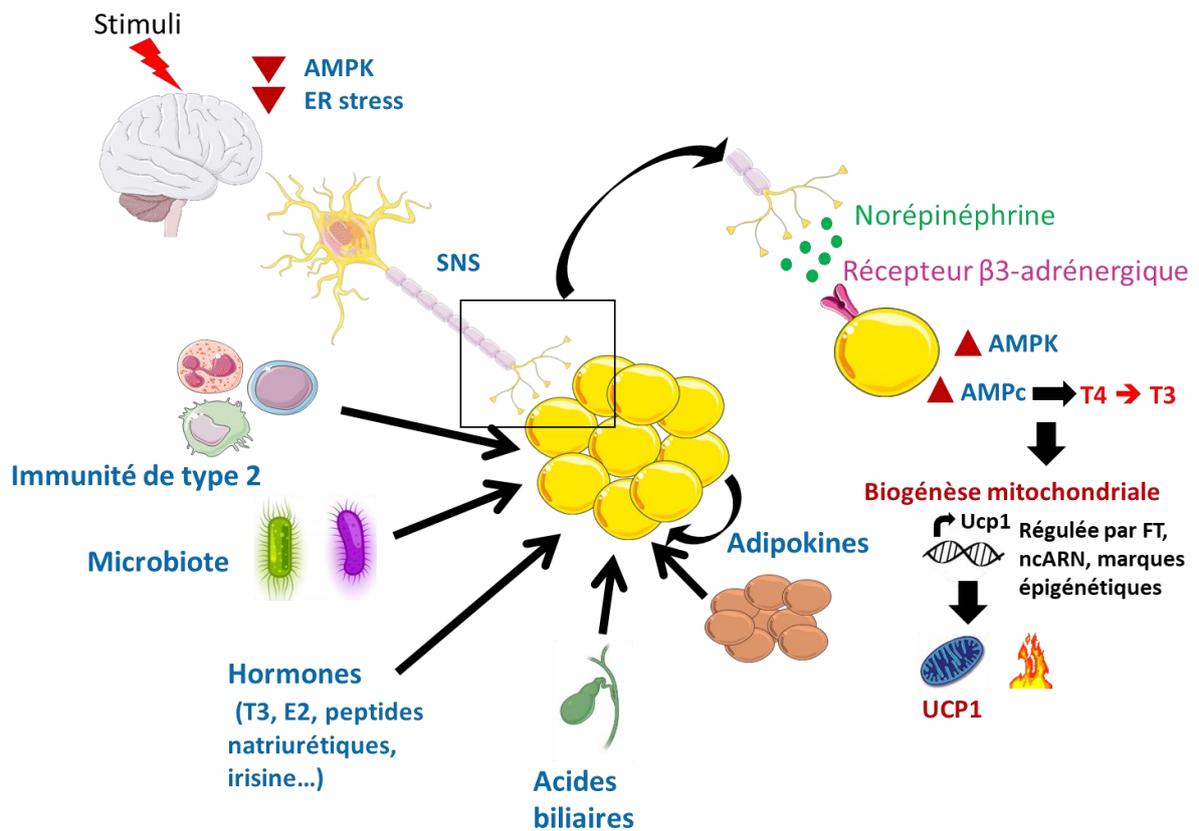
méthylations de H3K27, au niveau du promoteur d'Ucp1 (Li et al., 2016). Ces modifications des marques épigénétiques favorisent ainsi la transcription d'Ucp1. De même, LSD1 interagit avec Zfp516 et est recrutée sur les promoteurs des gènes spécifiques des adipocytes bruns/beiges, permettant leur activation via la déméthylation de l'acide aminé 9 de l'histone 3 (H3K9) (Sambeat et al., 2016).

Régulation par des **ARNs non codants**- Enfin, des ARN non codants (micro ARNs et ARNs long non codants (lncRNAs)) participent au bon développement des tissus adipeux et au brunissement du TAB (Brandão et al., 2021), notamment miR-30b/c qui réprime RIP140 permettant ainsi l'expression des gènes thermogéniques (Hu et al., 2015). De nombreux autres micro ARNs régulant le brunissement ont été répertoriés par Gharanei et al., 2020.

### 3) Le stress du réticulum endoplasmique : un nouvel acteur dans la régulation du brunissement du tissu adipeux blanc ?

L'obésité est un contexte physiopathologique dans lequel le tissu adipeux beige ne peut se développer. Pour expliquer l'incapacité du tissu adipeux blanc à « brunir » en contexte d'obésité, une hypothèse récemment proposée est l'implication du **stress du réticulum endoplasmique** (RE, que nous détaillerons dans le chapitre suivant). En effet, il a été montré qu'en condition d'obésité l'activation de la voie IRE1 $\alpha$  (une des voies signalétiques activées en réponse au stress du RE) dans les macrophages du tissu adipeux participe à l'inhibition du brunissement de celui-ci (Shan et al., 2017). De même, l'obésité est associée à un stress du RE au niveau hypothalamique également impliqué dans l'inhibition du brunissement du tissu adipeux blanc (Contreras et al., 2017). L'inhibition du stress du RE dans le cerveau de rats obèses permet l'activation du tissu adipeux brun et le brunissement des tissus adipeux blanc (SCAT et VAT), résultant en une perte de poids et une augmentation de température corporelle. De plus, le stress du RE, en particulier le facteur CHOP, semble impliqué dans la polarisation des macrophages en « M1-like » dans l'obésité (Suzuki et al., 2017), et empêcherait ainsi le brunissement du tissu adipeux blanc.

Ainsi, le stress du réticulum endoplasmique s'ajoute aux différents facteurs/inducteurs/mécanismes impliqués dans le brunissement du tissu adipeux blanc, comme nous l'avons synthétisé **Figure 40**.



**Figure 40 : Schéma des mécanismes et facteurs impliqués dans le brunissement du TAB.** Les nombreux régulateurs du brunissement (SNS, immunité de type 2, microbiote, hormones, peptides natriurétiques, acides biliaries, adipokines) sont représentés. Les conséquences de la signalisation β3-adrénergiques dans les adipocytes, dont l'induction du brunissement, sont également détaillées. Les cellules jaunes sont des adipocytes blancs, et les marrons sont des adipocytes bruns. Les triangles rouges vers le bas indiquent une diminution, ceux vers le haut indiquent une augmentation. FT : facteur de transcription, ncARN : ARN non codant.

---

## Chapitre 3 : Le stress du réticulum endoplasmique

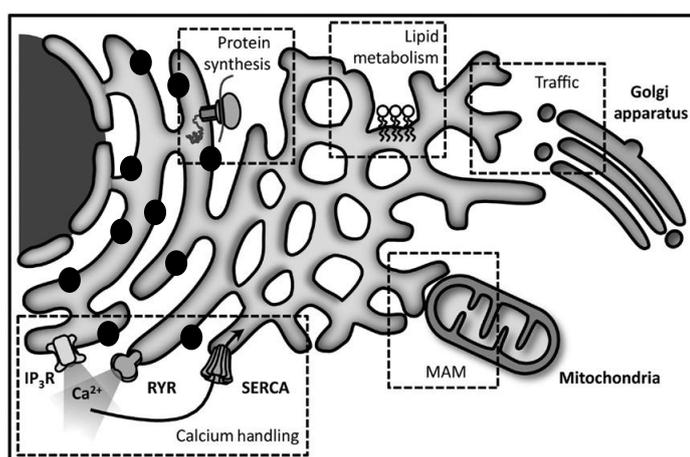
### endoplasmique

---

### I. Stress du réticulum endoplasmique et réponse UPR

#### 1) Généralités sur le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite cellulaire présent uniquement dans les cellules eucaryotes. Le RE apparaît sous la forme d'un réseau membranaire en continuité avec la membrane externe du noyau. Le RE est composé de tubules membranaires (souvent interconnectés) dispersés dans tout le cytoplasme et pouvant être lisses ou rugueux (quand associés à des ribosomes). Le RE est lié à d'autres organites comme les mitochondries, l'appareil de Golgi ou la membrane plasmique *via* des zones de contact intermembranaire. Le RE assure de nombreuses fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie cellulaire : synthèse, repliement, maturation, dégradation, et contrôle de la qualité des protéines, ainsi que synthèse des lipides, et stockage et régulation du calcium intracellulaire (Almanza et al., 2019) (**Figure 41**). Ainsi, l'abondance du RE sera proportionnelle aux besoins de la cellule.



**Figure 41 : Structure et fonctions du réticulum endoplasmique.** Le RE est un organite dynamique divisé en RE rugueux (présence de ribosomes (points noirs)) et RE lisse (absence de ribosomes). Le RE joue un rôle essentiel dans l'homéostasie calcique et la synthèse des protéines et des lipides. Ses connexions avec l'appareil de Golgi permettent l'export des produits de synthèse du RE vers la membrane plasmique. Le RE intervient également dans la régulation des activités mitochondriales *via* les zones d'interaction MAM (*mitochondria-ER associated membrane*). Modifié d'après Bravo et al., 2013.

## 2) Stress du réticulum endoplasmique et réponses adaptatives

Lorsque la capacité du RE à exercer une ou plusieurs de ses fonctions est dépassée, on parle alors de stress du RE. Ce stress, caractérisé par l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE, peut être délétère pour la cellule si elle ne parvient pas à rétablir l'homéostasie du RE. Deux types de réponses adaptatives sont décrites : la voie de l'ERAD (*ER-associated protein degradation*) et la réponse UPR (*unfolded protein response*). Ces réponses adaptatives ont pour but de rétablir et maintenir l'homéostasie du RE.

### a) Inducteurs du stress du RE

Les facteurs induisant un stress du RE peuvent être intrinsèques ou extrinsèques à la cellule : le stress du RE peut être provoqué par des mutations, une trop forte synthèse protéique, une indisponibilité des protéines chaperonnes, un stress nutritionnel (manque ou excès), l'hypoxie, un stress oxydatif, une température anormale (hyper ou hypothermie) ou une modification de la composition en lipides des membranes du RE (Almanza et al., 2019; Pluquet et al., 2014). Dans ce dernier cas, le stress du RE peut être associé ou non à l'accumulation de protéines mal repliées (Fun and Thibault, 2020).

Il est important de mentionner que les infections virales sont également inductrices de stress du réticulum endoplasmique (Pluquet et al., 2014). C'est notamment le cas pour les infections par les virus influenza, ce dont nous parlerons plus en détail dans le II (page 92). En effet, les virus détournent la machinerie cellulaire à leur propre profit, de manière à produire suffisamment de protéines virales qui serviront à la formation de nouveaux virions (Kaufman 2002).

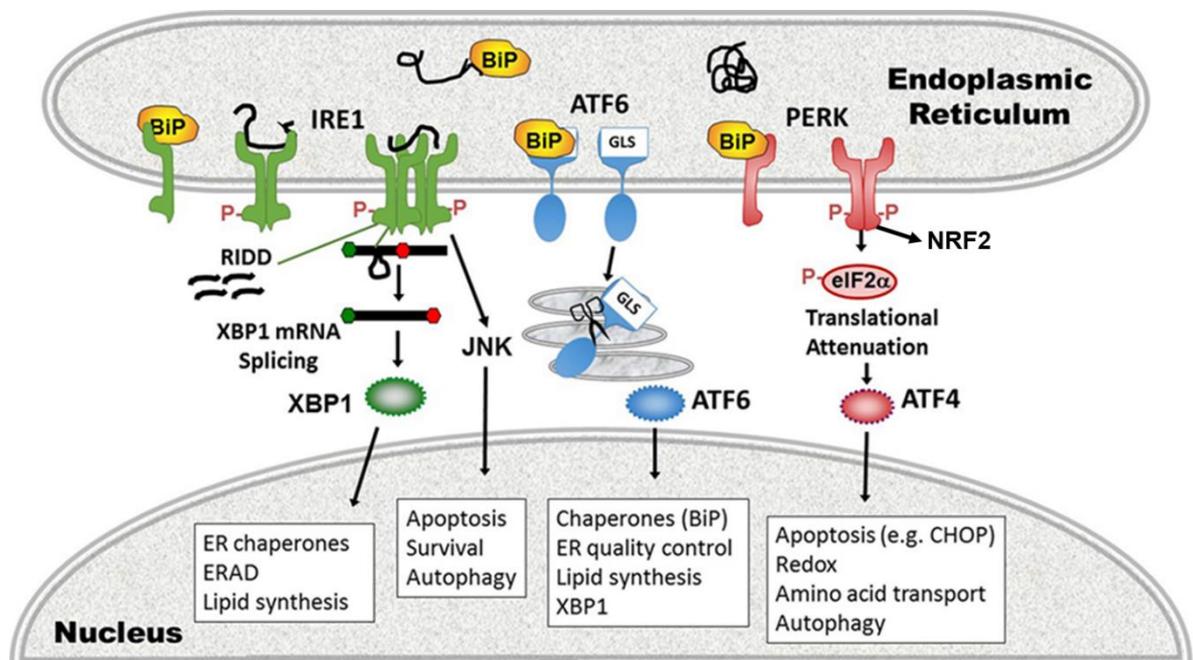
### b) Réponses adaptatives au stress du RE

Afin de gérer le stress du RE et de rétablir l'homéostasie du RE, deux mécanismes peuvent être mis en place par les cellules : le système ERAD (*ER-associated protein degradation*) et la réponse UPR (*unfolded protein response*).

Le **système ERAD** permet l'export des protéines mal repliées du RE vers le cytoplasme où elles seront dégradées par le système ubiquitine-protéasome. Je ne détaillerai pas plus ce processus, car au cours de ma thèse je me suis surtout intéressée à l'autre mécanisme de maintien de l'homéostasie du RE : la réponse UPR.

La **réponse UPR** consiste en l'activation de différentes voies de signalisation qui permettent la réduction de la synthèse protéique et l'expression de gènes impliqués, entres autres, dans l'ERAD, et de gènes codant pour des chaperonnes et des facteurs de l'autophagie. L'UPR contrôle également la synthèse des lipides, permettant ainsi l'expansion du RE et la réduction du stress du RE (Schuck et al., 2009). Lorsque le stress du RE perdure il conduit à la mort cellulaire (Pluquet et al., 2014).

La réponse UPR est composée de 3 voies de signalisations qui fonctionnent en parallèle. Ces différentes branches sont désignées par les senseurs du stress situé au niveau de la membrane du RE qui leur est spécifique : IRE1 $\alpha$  (*Inositol Requiring Enzyme-1 $\alpha$* ), PERK (*Protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*) et ATF6 (*Activating Transcription factor 6*) (**Figure 42**). Les voies UPR peuvent être activées simultanément ou de façon indépendante. Classiquement, la détection des protéines mal repliées par la protéine chaperonne BiP (*binding immunoglobulin protein*), également connue sous le nom de Grp78 (*glucose-regulated protein 78kDa*), induit sa dissociation des protéines senseurs, et permet l'activation des voies UPR (Liu and Kaufman, 2003).



**Figure 42 : Les 3 branches de la réponse UPR : IRE1 $\alpha$ , ATF6 et PERK.** Les 3 voies de l'UPR sont représentées ainsi que les processus qu'elles régulent. RIDD : *regulated-IRE1 dependent decay*, GLS : *Golgi localisation signal*. Modifié à partir de Smith, 2018.

**IRE1 $\alpha$**  est une protéine transmembranaire de type 1 du RE qui présente, au niveau de son domaine cytosolique C-terminal, une activité sérine/thréonine kinase et une activité endoribonucléase. Il s'agit de la branche de l'UPR la plus conservée et la plus étudiée. La forme monomérique d'IRE1 $\alpha$  est inactive. Son activation survient à la suite d'un changement conformationnel induit par la dimérisation des monomères, ce qui permet sa trans-autophosphorylation. Ceci conduit au recrutement de TRAF2 (*Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*) induisant la signalisation JNK (*Janus kinase*), et à l'activation de l'activité ribonucléase d'IRE1 $\alpha$ . IRE1 $\alpha$  permet la production du facteur de transcription Xbp1s *via* le clivage d'un intron de l'ARNm codant la protéine XBP1. IRE1 $\alpha$  est également impliqué dans le RIDD (*Regulated IRE1-dependant decay*), un processus de clivage de nombreux ARNs (ARNm, ARN ribosomiaux et micro-ARNs) au niveau d'une séquence consensus (CUGCAG suivi d'une structure en tige-boucle). Le RIDD permet de réduire la quantité d'ARNm à traduire et serait impliqué dans la régulation du métabolisme glucidique, de l'inflammation et de l'apoptose. La voie IRE1 $\alpha$  (*via* Xbp1s ou *via* JNK) permet l'expression de gènes de chaperonnes du RE, de gènes de l'ERAD, de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, dans l'apoptose, la survie et dans l'autophagie (Almanza et al., 2019; Hetz et al., 2020; Smith, 2018).

En parallèle de la branche IRE1 $\alpha$ /XBP1, la kinase transmembranaire (de type 1) **PERK** est également activée en réponse au stress du RE. Comme pour IRE1 $\alpha$ , l'activation de PERK induit son oligomérisation et sa trans-autophosphorylation. PERK activé phosphoryle alors le facteur d'initiation de la traduction, eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic initiation factor-2*), réprimant ainsi la traduction. Ceci permet de réduire la quantité de protéines entrant dans le RE. Malgré l'inhibition de la traduction, certaines protéines sont sélectivement produites, notamment le facteur de transcription ATF4. ATF4 est impliqué dans l'induction de l'apoptose (*via* l'expression de CHOP), le contrôle du statut rédox, le métabolisme des acides aminés et l'autophagie. Un autre substrat de PERK est le facteur de transcription NRF2 (*NF-E2-related factor 2*), facteur impliqué dans la réponse antioxydante (Almanza et al., 2019; Hetz et al., 2020).

Enfin, **ATF6** est une protéine transmembranaire de type 2 qui possède un domaine bZIP de liaison à l'ADN et 3 domaines structuraux : un domaine cytosolique N-terminal, un domaine transmembranaire et un domaine luminal C-terminal. A la suite de son activation, ATF6 est transloqué vers l'appareil de Golgi où il est clivé par

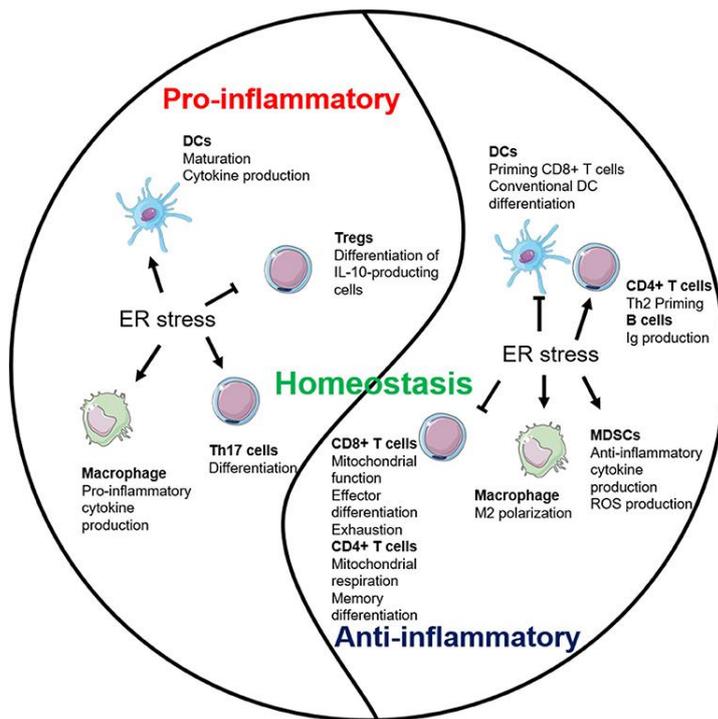
les protéases S1P (*Site-1 Protease*) et S2P (*Site-2 Protease*), puis son domaine cytosolique ATF6f est dirigé vers le noyau. ATF6 est impliqué dans l'expression de protéines chaperonnes, de gènes du métabolisme des lipides et des gènes de l'UPR, ainsi que dans la dégradation et la sécrétion des protéines (Almanza et al., 2019; Hetz et al., 2020).

Il est important de noter qu'il peut y avoir des **interactions entre les 3 voies de l'UPR** et que certaines fonctionnalités et cibles des voies se recoupent. En effet, les protéines des 3 voies peuvent interagir entre elles et engendrer une réponse différente de celle qui aurait été induite si une seule voie avait été activée. Ainsi, XBP1s peut interagir avec ATF6, activant ainsi l'expression de gènes différents de ceux qu'aurait activés XBP1s ou ATF6 (Shoulders et al., 2013).

### 3) Rôle de l'UPR dans la physiologie cellulaire

Le stress du réticulum endoplasmique peut apparaître dans de nombreux contextes physiologiques (développement, différenciation, prolifération...). L'induction de la réponse UPR est essentielle au maintien de l'homéostasie cellulaire dans ces différents contextes. Le rôle de l'UPR a été décrit dans différents types cellulaires : contrôle de la différenciation des cellules neuronales (souches et matures), des astrocytes et des oligodendrocytes par les voies PERK et IRE1 $\alpha$  (Murao and Nishitoh, 2017), survie des cellules acinaires pancréatiques et développement des glandes salivaires *via* XBP1 (Lee, 2005), différenciation des cellules épithéliales mammaires *via* XBP1 et ATF4 (Tsuchiya et al., 2017), et différenciation des ostéoblastes par la voie PERK-ATF4 (Saito et al., 2011).

Le stress du RE et l'UPR sont également impliqués dans le **développement et la fonctionnalité des cellules immunes**, et donc, dans le contrôle de l'inflammation (**Figure 43**). En effet, l'UPR participe au développement et à la survie des cellules immunes telles que les dendritiques et les éosinophiles, et module l'expression des PRRs et la production des cytokines (Smith, 2018). La voie IRE1 $\alpha$  est essentielle au développement des lymphocytes B et à la sécrétion des immunoglobulines (Reimold et al., 2001; Zhang et al., 2005). Enfin, les voies UPR peuvent favoriser la migration et la polarisation des macrophages en macrophages M2 notamment *via* CHOP et ATF3 (Li et al., 2018b; Sha et al., 2017).



### Figure 43 : Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans la régulation de l'inflammation.

Le stress du RE participe à la régulation de la balance pro/anti-inflammation en agissant sur de nombreux types de cellules immunes. Tiré de Li et al., 2020.

De façon intéressante, le stress du RE et l'UPR sont également impliqués dans la physiologie du tissu adipeux, et notamment dans l'**adipogenèse**. En effet, lors de la différenciation d'un préadipocyte HB2 (de type « brun ») un stress du RE est induit et favorise la formation de l'adipocyte brun mature. L'inhibition du stress du RE provoque une réduction de l'accumulation des lipides et de l'expression d'UCP1 (Kida et al., 2018). La voie IRE1 $\alpha$  semble jouer un rôle central dans ce processus.

Lors de la différenciation des préadipocytes en adipocytes blancs, le facteur pro-adipogénique C/EBP $\beta$  induit l'expression d'Xbp1 en se fixant directement sur son promoteur. XBP1 permet ensuite l'expression d'autres facteurs adipogéniques comme C/EBP $\alpha$  et inhibe la voie Wnt10b/ $\beta$ -caténine (Cho et al., 2013; Sha et al., 2009). Une autre étude, confirme l'activation de la voie IRE1 $\alpha$  lors de l'adipogenèse et montre également une induction de CHOP, décrit comme ayant un rôle inhibiteur de l'adipogenèse (Han et al., 2013). L'expression de Xbp1s étant 2 fois plus forte que l'expression de Chop (ARNm), l'adipogenèse est quand même possible malgré l'action inhibitrice de CHOP. Ces 2 études montrent bien que les facteurs de l'UPR ont des effets différents sur un même type cellulaire, et démontrent l'importance d'investiguer toutes les voies UPR dans un même contexte.

Certains éléments de l'UPR sont également impliqués dans la **thermogénèse** des tissus adipeux. L'activation de PERK, en absence de stress du RE, permet la

thermogénèse du tissu adipeux brun. PERK induit la phosphorylation de  $GBP\alpha$ , ce qui permet la biogénèse des protéines de la membrane interne de la mitochondrie dont UCP1 et des protéines impliquées dans la respiration mitochondriale. Dans cette étude, l'effet de PERK n'est pas induit par ATF4 (Kato et al., 2020). Une étude avait par ailleurs suggéré un rôle inhibiteur d'ATF4 sur la thermogénèse. En effet, chez des souris génétiquement déficientes en ATF4 (*Atf4* KO) il y a une plus forte lipolyse dans le tissu adipeux blanc, une plus forte expression des gènes liés à l'oxydation des acides gras, et une augmentation de l'expression d'UCP1 dans le tissu adipeux brun (Wang et al., 2010). De façon contradictoire, il a été rapporté que la voie PERK-ATF4 est impliquée dans la formation des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et dans la respiration mitochondriale (Balsa et al., 2019). De plus, la voie PERK est impliquée dans la transdifférenciation des adipocytes blancs en adipocytes beiges, notamment *via* le facteur ATF3 (Cheng et al., 2019). Enfin le stress du RE, notamment l'activation de la voie JNK, réprime l'expression d'UCP1 dans les adipocytes beiges (Yuliana et al., 2019).

Ainsi, bien que son rôle nécessite d'être clarifié, le stress du RE, et en particulier la voie PERK, semble impliquée dans le brunissement du tissu adipeux blanc. Cependant, à l'heure actuelle nous ne savons pas si le stress du RE a un rôle dans tous les modèles de brunissement, ni si ce potentiel rôle est identique entre les modèles.

## II. Stress du réticulum endoplasmique et virus influenza

### 1) Rôle de l'UPR dans les infections virales

L'induction d'un stress du RE et des voies UPR a été observé dans le cadre de nombreuses infections virales (Ambrose and Mackenzie, 2011; Carpenter et al., 2011; Catanzaro and Meng, 2020; Chan, 2014a; Lazar et al., 2014; Mulvey et al., 2007; Qian et al., 2012; Turpin et al., 2021; Xue et al., 2018; Yu et al., 2006). L'UPR peut autant être à l'avantage de l'hôte et permettre de limiter le développement de l'infection, qu'à l'avantage du virus et favoriser sa réplication et l'échappement à la réponse antivirale (Chan, 2014b).

L'infection par le **virus de l'hépatite C** conduit à l'activation de toutes les voies UPR et active l'autophagie. L'autophagie favorise ainsi la réplication virale et la persistance du virus en inhibant la réponse immunitaire innée, dont l'induction des interférons. De plus, l'autophagie induite par la voie PERK-NRF2 favorise la survie des cellules lors de l'infection (Dash et al., 2016, 2019; Shinohara et al., 2013). Chez l'Homme, l'infection par le **virus de l'hépatite B** active la voie IRE1 $\alpha$  qui conduit à l'activation de l'ERAD. L'ERAD permet de réduire la production de nouveaux virions (Lazar et al., 2014).

Les voies UPR peuvent avoir des rôles et des effets différents selon les virus étudiés. Par exemple, lors d'une infection par le TGEV (**transmissible gastroenteritis virus**) la voie PERK réduit la production virale par inhibition de la traduction (dont la traduction des protéines virales), et réprime la réplication virale par activation de NF $\kappa$ B qui permet la production des interférons de type I (Xue et al., 2018). En revanche, la voie PERK, notamment le facteur ATF4, est nécessaire à la réplication de l'ADN du **cytomégalovirus murin** et permet l'expression des gènes viraux tardifs (Qian et al., 2012). De plus, la voie PERK est responsable de la dégradation d'IFNAR1 dans de nombreux modèles d'infection permettant ainsi l'échappement du virus à la réponse immunitaire (Liu et al., 2009).

Ainsi, les nombreuses interactions entre les voies UPR et les infections virales font de l'UPR une potentielle cible thérapeutique dans le traitement de ces infections (Schögler et al., 2019).

## 2) Rôle de l'UPR dans l'infection par le virus influenza A

*Données in vitro* - Plusieurs études ont montré que l'infection *in vitro* de cellules épithéliales pulmonaires (humaines lignées HTBE, A549 et primaires NHBE) par IAV [H1N1] peut induire un stress du RE, avec l'activation de la voie UPR IRE1 $\alpha$  et induction de la signalisation JNK/MAPK (Hassan et al., 2012; Hrincius et al., 2015). L'activation de la voie PERK a également pu être observée. De façon intéressante, le stress du RE induit par un virus influenza pandémique participerait au développement d'une inflammation pathologique, délétère à la survie des souris infectées (Hrincius et al., 2015). L'activation de la voie IRE1 $\alpha$  lors de l'infection est nécessaire au virus. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur du stress du RE (acide tauroursodéoxycholique (TUDCA)) ou d'un inhibiteur spécifique de la voie IRE1 $\alpha$  (3,5-dibromosalicylaldehyde), préalablement à l'infection des cellules *in vitro* réduit

la production de virions (Hassan et al., 2012). De même, l'utilisation de siRNAs dirigés contre Erp57 (protéine chaperonne induite par la voie IRE1 $\alpha$ ) conduit à la réduction de la charge virale (souche [H1N1]) et de la mortalité cellulaire (Roberson et al., 2012). Cependant, l'activation de la voie IRE1 $\alpha$  est également bénéfique à la cellule hôte infectée. L'expression de la protéine virale HA induit l'expression d'Xbp1s qui permet la dégradation de HA *via* l'ERAD, réduisant ainsi la production de virions (Frabutt et al., 2018). La voie ATF6, quant à elle, ne semble pas induite lors de l'infection par IAV (Hassan et al., 2012; Hrinčius et al., 2015), elle serait même inhibée, sauf dans le modèle d'infection des cellules MTEC (cellules épithéliales thymiques médullaires) (Roberson et al., 2012).

*Données in vivo* - L'infection par [H1N1] induit un stress du RE avec l'activation d'ATF6 et l'expression de CHOP dans les poumons des souris infectées, et ce même après la disparition du virus dans le tissu (ATF6 détectable jusque 35 jours et CHOP jusque 21 jours après infection) (Pociask et al., 2017).

---

## Chapitre 4 : Liens entre le virus influenza, le brunissement du tissu adipeux blanc et le stress du réticulum endoplasmique ?

---

Bien que l'obésité - qui correspond à l'accumulation excessive de tissu adipeux blanc - soit un facteur de risque reconnu des formes sévères de grippe, l'impact de l'infection par IAV sur le tissu adipeux blanc et ses fonctions métaboliques, inflammatoires et immunologiques, a rarement été exploré.

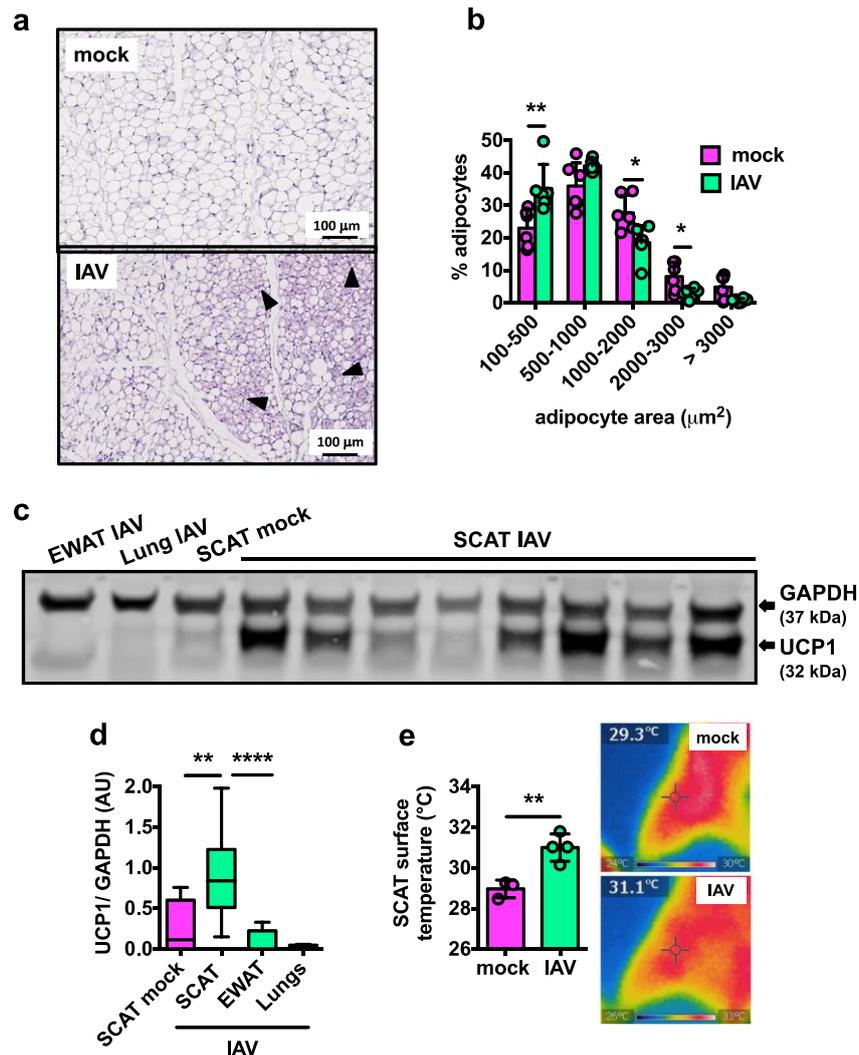
Les travaux récents réalisés dans notre équipe (Ayari et al, 2020), ont permis de montrer, chez la souris, que l'**infection par IAV** est associée à une **reprogrammation métabolique** du **tissu adipeux blanc sous-cutané**, pouvant partiellement résulter d'un effet direct du virus sur les préadipocytes. Les principales données en sont résumées dans les paragraphes suivants.

### I. L'infection par le virus influenza A induit le brunissement du tissu adipeux blanc (*in vivo*)

En étudiant l'impact de l'infection par IAV ([H3N2]) sur le tissu adipeux blanc, chez la souris, notre équipe a mis en évidence le **brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané** (et non du dépôt viscéral), **7 jours après infection (Figure 44)** (Ayari et al., 2020). A notre connaissance, il s'agissait de la première démonstration de l'induction du brunissement du tissu adipeux blanc lors d'une infection respiratoire virale aigüe.

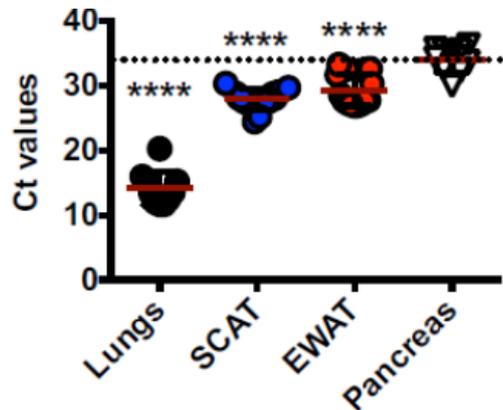
En effet, l'observation de coupes histologiques du tissu adipeux sous-cutané de souris infectées révèle la présence de nombreux îlots d'adipocytes beiges, comparativement au tissu des animaux non infectés (qui présente une histologie classique de tissu adipeux blanc) (**Figure 44a**). La quantification de la taille des adipocytes par histomorphométrie montre que les adipocytes du tissu adipeux de souris infectées sont plus petits que ceux du tissu de souris non infectées (**Figure 44b**), ce qui est

cohérent avec l'augmentation de la lipolyse qui caractérise le brunissement. De plus, l'expression de la protéine UCP1 - le facteur thermogénique prototypique - est plus importante dans le tissu adipeux des souris infectées, comparativement au tissu des animaux non infectés (**Figure 44c**). Enfin, confirmant l'induction d'une activité thermogénique dans le tissu, la température de surface (au niveau des tissus adipeux sous-cutanés) est plus élevée chez les souris infectées que chez les animaux non infectés (**Figure 44d**).



**Figure 44 : L'infection par le virus de la grippe induit le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané, 7 jours post-infection. a)** Images représentatives (coloration H&E) du tissu adipeux sous-cutané (SCAT) de souris infectées vs. non-infectées (*mock*). Les îlots d'adipocytes beiges sont indiqués par des têtes de flèches. **b)** Distribution de la fréquence (%) des adipocytes classés selon leur taille. **c)** Expression de la protéine UCP1 (*western-blot*) dans les poumons (*lungs*), SCAT et tissu adipeux viscéral (EWAT), et quantification en **d)**. **e)** Mesure de la température de surface des SCAT (thermographie infrarouge) de souris infectées vs. non-infectées. Tiré de Ayari et al., 2020.

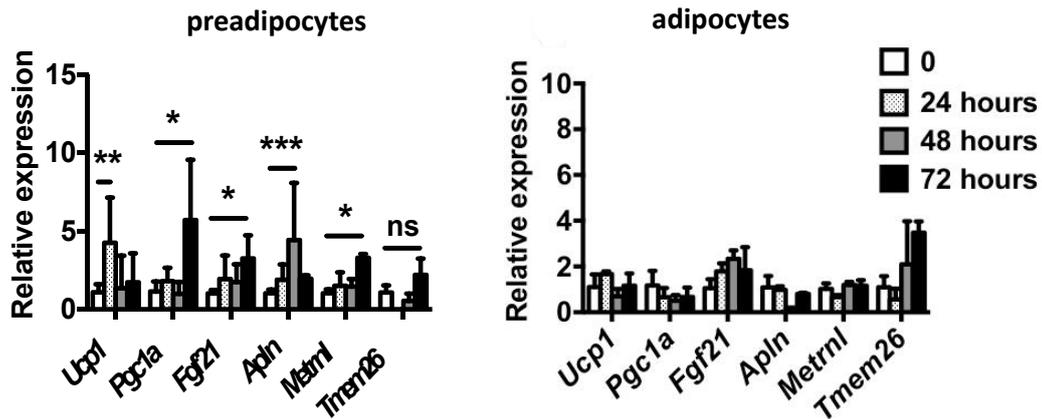
Le brunissement du tissu adipeux sous-cutané pourrait être lié à la présence du virus dans le tissu. En effet, le brunissement est concomitant de la présence du matériel génétique viral (ARN de la protéine M1). On retrouve de l'ARN viral dans les tissus adipeux ; en plus forte quantité dans le dépôt cutané (SCAT) que dans le dépôt viscéral (EWAT) (**Figure 45**).



**Figure 45 : Présence d'ARN viral dans le tissu adipeux sous-cutané, 7 jours post-infection.** Niveaux d'ARN viral (protéine M1), exprimés en valeurs de Ct. SCAT : tissu adipeux sous-cutané, EWAT : tissu adipeux viscéral. Tiré de Ayari et al., 2020.

## II. L'infection par le virus influenza initie la différenciation des préadipocytes blancs en adipocytes beiges (*in vitro*)

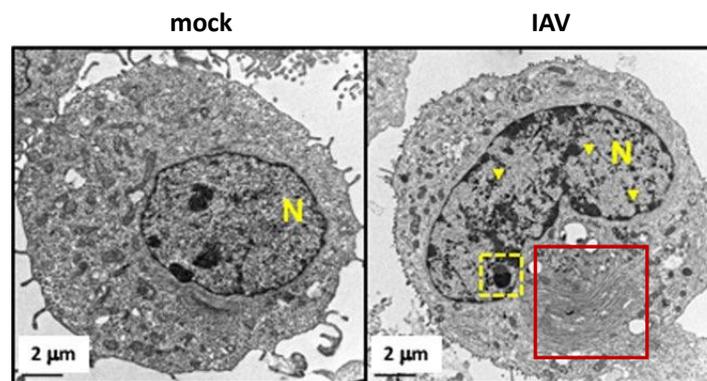
Pour vérifier un possible effet direct du virus sur le brunissement, des cellules adipeuses (préadipocytes et adipocytes) ont été infectées *in vitro*. L'infection des préadipocytes, et non des adipocytes, induit l'expression de gènes liés au brunissement du tissu adipeux blanc (**Figure 46**). Ce résultat indique que l'infection par IAV favorise une différenciation des préadipocytes en adipocytes beiges et non une transdifférenciation des adipocytes blancs en adipocytes beiges.



**Figure 46 : L'infection de préadipocytes par IAV induit l'expression des gènes thermogéniques.** L'expression des gènes thermogéniques (RT-qPCR) est induite lors de l'infection par IAV dans les préadipocytes (panel gauche) et pas dans les adipocytes (panel droit). Tiré de Ayari et al., 2020.

### III. L'infection par le virus influenza induit un stress du réticulum endoplasmique dans les préadipocytes

En plus des modifications nucléaires et nucléolaires classiquement associées à l'infection par IAV (Terrier et al., 2014), l'infection des préadipocytes par IAV induit des changements de la structure du réticulum endoplasmique (**Figure 47**). Ces changements structuraux du RE semblent caractéristiques d'un stress du RE (Montalbano et al., 2013).



**Figure 47 : L'infection de préadipocytes par IAV induit des modifications structurales du réticulum endoplasmique.** L'infection de préadipocytes par IAV induit des modifications nucléaires et nucléolaires (symboles jaunes) ainsi que des changements de structure du réticulum endoplasmique (carré rouge). Observation en microscopie électronique. N = noyau. Tiré de Ayari et al., 2020.

Ainsi, notre équipe a montré que l'infection par IAV induit le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané et que ce phénomène pourrait résulter d'un effet direct du virus sur les préadipocytes. Compte-tenu des changements structuraux du réticulum endoplasmique observés dans les préadipocytes infectés et des données de la littérature synthétisées dans l' Introduction, qui suggèrent un rôle du stress du réticulum endoplasmique dans la régulation du brunissement des tissus et cellules adipeuses, **l'objectif premier de ma thèse a été d'identifier les mécanismes impliqués dans la thermogénèse induite par IAV** (tissu adipeux blanc sous-cutané (*in vivo*) et préadipocytes (*in vitro*)), supposant que le stress du réticulum endoplasmique puisse être impliqué.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Partie 1 des Résultats (page 110).

Au cours de ma deuxième année de thèse, l'émergence dans le monde entier d'une nouvelle maladie infectieuse : la COVID-19, causée par le virus respiratoire SARS-CoV-2, et la mise en place, dans notre équipe, d'un modèle d'infection par SARS-CoV-2 chez le hamster, nous ont conduit à étudier **l'impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les dépôts majeurs de tissus adipeux blancs** : le dépôt sous-cutané et le dépôt viscéral.

Les résultats obtenus, précédés d'une introduction et d'un rationnel de l'étude, sont présentés dans la Partie 2 des Résultats (page 139).

# Objectifs de la Thèse

Les infections respiratoires - comme la grippe et, plus récemment, la COVID-19 - représentent un problème majeur de santé publique. En effet, certaines populations, dont les personnes obèses et les personnes âgées, sont plus à risque de développer des formes sévères de grippe et de COVID-19 conduisant à des hospitalisations de longue durée et, éventuellement, au décès du patient. En contexte d'obésité et de vieillissement, de nombreuses altérations des tissus adipeux blancs sont notables (changements métaboliques et immunologiques).

En étudiant, chez la souris, l'impact de l'infection par le virus de la grippe ([H3N2]) sur le tissu adipeux, notre équipe a mis en évidence le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané (SCAT), 7 jours après infection. L'infection de cellules adipeuses (préadipocytes et adipocytes) induit l'expression de gènes liés au brunissement uniquement dans les préadipocytes. Différents mécanismes induisant le brunissement du tissu adipeux sont décrits dans la littérature, nous en avons fait la synthèse dans l'Introduction. Cependant, le brunissement du SCAT n'avait jamais été observé dans le cadre d'une infection virale aiguë. Depuis peu, le stress du réticulum endoplasmique est proposé comme un nouveau régulateur du brunissement du tissu adipeux blanc. De plus, l'infection de préadipocytes montre une altération de la morphologie du réticulum endoplasmique ; suggérant l'induction d'un stress de cet organelle lors de l'infection.

Par ailleurs, la COVID-19 étant une maladie récente et actuelle, l'impact de l'infection par le SARS-CoV2 sur les tissus adipeux blancs n'est pas ou très peu connu à ce jour.

Les objectifs de ma thèse ont donc été de :

**1)** déterminer les mécanismes impliqués dans le brunissement du tissu adipeux blanc lors de l'infection par le virus influenza, notamment le rôle du stress du réticulum endoplasmique et de la réponse UPR, et

**2)** caractériser l'impact de l'infection par le SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs de hamsters infectés.

Pour chacun de ces objectifs, nous avons déterminé plusieurs axes de travail :

**1) Infection par le virus influenza et brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané (souris)**

- Détermination de la cinétique du brunissement (*in vivo* et *in vitro*).
- Analyse de la réponse UPR au cours de l'infection (*in vivo* et *in vitro*).
- Démonstration de l'implication de l'UPR dans le brunissement *in vivo* et *in vitro*.

**2) Infection par le virus SARS-CoV-2 et tissus adipeux blancs (hamsters)**

- Détermination de l'impact de l'infection sur les tissus adipeux de hamsters jeunes adultes et âgés en termes d'expression de gènes et d'histologie des tissus.
- Détermination des altérations métaboliques systémiques associées à l'infection.

# Matériels et méthodes

## 1) Animaux, protocole d'infection et prélèvements

Des souris mâles C57BL/6 (Janvier Labs) âgées de 5 semaines sont mises sous régime contenant 10 % de lipides (*Research Diets*) pendant 3 à 4 semaines. Les souris sont ensuite infectées par voie intranasale avec le virus influenza A [H3N2] (souche A/Scotland/20/1974, d'origine humaine et adaptée à la souris) à une dose non létale (50 PFUs « *Plaque forming units* », dans 50 µL de PBS), puis sacrifiées à différents temps après infection (2, 4, 7, 14, 28, 51 et 63 jours). Les temps J2 et J4 correspondent à des temps précoces, J7 étant le pic de l'infection (en terme d'inflammation et de charge virale pulmonaire), le temps J14 correspond à la phase de résolution de l'inflammation après infection, et les temps J28, J51 et J63 sont des temps tardifs auxquels le génome viral n'est plus détectable (selon les tissus) et permettent de voir les effets longs termes de l'infection. Les animaux contrôles (*mock*) reçoivent 50 µL de PBS par voie intranasale. Les poids corporels sont relevés tout au long de l'infection. Le sang, les poumons, ainsi que les tissus adipeux sous-cutanés (inguinaux) et viscéraux (épididymaux) sont récupérés à chaque temps de sacrifice.

## 2) Infection des cellules *in vitro*

Les cellules épithéliales pulmonaires murines (lignée MLE15, *Applied Biological Materials*, T0495) et les préadipocytes murins (lignée 3T3-L1, ATCC®, CL-173™) sont cultivés dans du milieu complet *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), supplémenté en GlutaMax™ (Gibco), sérum de veau fœtal décomplémenté (Gibco) (10%) et pénicilline/streptomycine (1%), dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont mises en plaque à une densité de 10<sup>6</sup> cellules par puits dans des plaques 6 puits la veille de l'infection. Juste avant infection, les cellules sont lavées avec du PBS (3 fois) et mises dans du milieu sans sérum le temps de l'heure de contact avec le virus. Les cellules sont infectées à différentes doses de [H3N2] : 0,01 ; 0,25 ; 0,5 et 1 MOI. Après l'heure de contact avec le virus, les cellules sont lavées avec le PBS (3 fois) puis remises en culture avec du milieu complet jusqu'à la fin de l'expérience. Les cellules sont ensuite décollées avec de la trypsine et congelées dans le tampon d'extraction d'ARN (350 µL de tampon RA1 du kit d'extraction d'ARN + 3,5 µL β-mercaptoéthanol par tube) ou dans le tampon de lyse pour l'extraction protéique (*Cell lysis buffer*, *Cell Signaling Technology*, 9803) supplémenté avec un mélange d'inhibiteurs de phosphatases (*Phosphatase Inhibitor Cocktail*, Sigma).

### 3) Extraction d'ARN

Pour les tissus adipeux : Les tissus sont broyés dans du QIAzol (*QIAzol Lysis Reagent*, Qiagen, 1 mL pour 100 mg de tissu) avec un Ultra-turrax. Un (1) mL de broyat est utilisé pour l'extraction. On ajoute 200 µL de chloroforme dans le broyat et on centrifuge à 12 000 g pendant 15 min à 4°C. Après centrifugation, la phase supérieure translucide contenant les ARNs est récupérée et on y ajoute un volume équivalent d'éthanol 70%. On poursuit l'extraction en utilisant le kit *Nucleospin RNA* (Macherey Nagel).

Pour les poumons : Les tissus sont broyés dans 1 mL de tampon RA1 + 3,5 µL de β-mercaptoéthanol. Cent (100) µL de broyat est dilué avec 200 µL de tampon RA1 avant de poursuivre le protocole du kit d'extraction.

Pour les cellules (3T3-L1 et MLE15) : On réalise l'extraction en utilisant le *kit Nucleospin RNA* (Macherey Nagel).

### 4) Rétrotranscription et PCR quantitative (RT-qPCR)

La rétrotranscription est réalisée avec le kit « *High capacity RNA-to-cDNA kit* » (*Applied Biosystems*) à partir de 0,2 à 1 µg d'ARN, selon les expériences. Pour la détection de l'ARN viral, une rétrotranscription spécifique de l'ARNm du gène M1 (segment 7) est réalisée. Les ARNs totaux sont traités à la RNase OUT (Invitrogen) et rétro-transcrit avec la *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) en utilisant un oligonucléotide spécifique du gène M1 (5'-TCT AAC CGA GGT CGA AAC GTA-3'). La qPCR est effectuée avec la technologie TaqMan (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems), des oligonucléotides de détection de M1 (sens : 5'-CAA AGC GTC TAC GCT GCA GTC C-3' et anti-sens : 5'-CAA AGC GTC TAC GCT GCA GTC C-3') ainsi qu'une sonde spécifique de M1 ((FAM) 5'-TTT GTG TTC ACG CTC ACC GTG CC-3' (TAMRA)). Pour les autres gènes, les qPCR ont été réalisées avec la technologie SYBR green et le *Power SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*). Les qPCR ont été réalisées avec les QuantStudio™ 5 et 12 K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Les expressions de gènes sont calculées par la méthode de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

## 5) Extraction protéique et Western Blot

A cause de l'importante quantité de lipides dans les tissus adipeux, les protocoles d'extraction protéiques classiques ne donnent pas de résultats satisfaisants. L'extraction de protéines à partir des tissus adipeux a finalement été effectuée selon le protocole établi par Diaz Marin et al. (Diaz Marin et al., 2019). Brièvement, 50 mg de tissu est broyé dans du tampon RIPA contenant des inhibiteurs de phosphatases, plusieurs cycles de broyage (5,65 m/s pendant 30 secondes) peuvent être nécessaires (entre chaque broyage, un refroidissement des échantillons (sur carboglace, 45 secondes) est effectué). Les échantillons sont ensuite plongés 1 heure dans la carboglace puis centrifugés 15 minutes (20 000g à 4 degrés). Les surnageants sont récupérés. On prélève ensuite le liquide sous la phase grasseuse (en ne prélevant pas de graisse) et on centrifuge à nouveau. Ces étapes doivent être répétées au moins 2 fois.

Pour les Western Blots, plusieurs protéines de ménages ont été testées (la GADPH et l'actine) et la vinculine a été sélectionnée (*anti-vinculin antibody*, Santa Cruz, sc-73614, dilué au 1/400, associé à l'anticorps secondaire *anti-mouse IgG antibody*, Cell Signaling, 7076S, dilué au 1/5000). Les protéines détectées par Western Blots sont UCP1 (*anti-UCP1 antibody*, Abcam, ab10983, dilué au 1/5000, associé à l'anticorps secondaire *anti-rabbit IgG antibody*, Cell Signaling, 7074S, dilué au 1/2000), BIP (*anti-BiP/GRP78 antibody*, BD Biosciences, 610979, dilué au 1/100, et associé à l'anticorps secondaire *anti-Mouse IgG (Fab specific) antibody*, Sigma, A9917 dilué au 1/2000), PERK (*anti-PERK antibody* (C33E10), Cell Signaling, 3192S, dilué au 1/1000 et associé à l'anticorps secondaire *anti-rabbit IgG H&L antibody*, Abcam, ab6721, dilué au 1/2000), Phospho-PERK (*anti-phospho-PERK antibody* (Thr980), Cell Signaling, MA5-15033, dilué au 1/1000, et associé à l'anticorps secondaire *anti-rabbit IgG H&L antibody*), ATF4 (*anti-ATF-4 antibody*, Abcam, ab23760, dilué au 1/800, et associé à l'anticorps secondaire *anti-rabbit IgG H&L antibody*), IRE1 $\alpha$  (*anti-IRE $\alpha$  (14C10) antibody*, Cell Signaling, 3294S, dilué au 1/500, et associé à l'anticorps secondaire *anti-rabbit IgG antibody*), phospho-IRE1 $\alpha$  (*anti-IRE $\alpha$  [p Ser 724] antibody*, Novus, 3294S, dilué au 1/500, et associé à l'anticorps secondaire *anti-rabbit IgG antibody*), CHOP (*anti-DDIT3 antibody* [9C8], Abcam, ab11419, dilué au 1/5000, et associé à l'anticorps secondaire *anti-mouse IgG antibody*), EIF2 $\alpha$  (*EIF2 $\alpha$  Antibody*, Cell Signaling, 9722S, dilué au 1/1000, et associé à l'anticorps secondaire *anti-rabbit IgG antibody*), et phospho-EIF2 $\alpha$  (*anti-EIF2S1 (phospho S51) antibody*

[E90], Abcam, ab32157, dilué au 1/500, et associé à l'anticorps secondaire *anti-rabbit IgG antibody*).

## 6) Mesure de la viabilité cellulaire (test MTT)

Les cellules sont mises en plaque 24 puits à la concentration de  $2,5 \times 10^5$  cellules par puits. Les cellules sont infectées le lendemain à la dose de 0,25, 0,5 ou 1 MOI pendant 4, 6 ou 24 heures. A la fin du temps d'infection, de l'éthanol 70% est mis à la place du milieu dans les puits contrôles (contrôle cellules mortes). Tous les puits sont ensuite lavés au PBS avant l'ajout de 500  $\mu$ L de MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, SIGMA, M5655) à 0,5 mg/mL. Les cellules sont incubées 2 heures à 37°C jusqu'à la formation de cristaux. Le milieu est alors retiré et remplacé par un mélange d'isopropanol/HCL 1N, et la plaque est mise sous agitation jusqu'à dissolution des cristaux. L'absorbance est lue à 570 et 640 nm.

## 7) Inhibition *in vitro* par utilisation de siRNAs

Les cellules sont traitées avec les siRNA 72 heures avant le début de l'expérience (infection ou traitement inducteur du stress du réticulum endoplasmique). Les cellules sont mises en plaque 6 puits à une concentration de  $1,5 \times 10^5$  cellules par puits. Pour chaque puits à transfecter on dilue 3  $\mu$ L de lipofectamine (RNAiMAX, Invitrogen, 13778-075) dans 500  $\mu$ L de PBS. Ce mélange est incubé 3 minutes à température ambiante. Ce mélange est utilisé pour préparer les siRNAs (Dharmacon) : pour chaque puits on mélange 1,5  $\mu$ L de siRNA à 20  $\mu$ M (15 nM final) ou 2,5  $\mu$ L (25 nM final) avec 500  $\mu$ L du mélange lipofectamine-PBS. Les cellules sont mises dans du milieu sans antibiotiques puis les siRNA sont distribués (500  $\mu$ L) et les cellules sont incubées pendant 72 heures à 37°C. Lors des expériences d'inhibition pendant l'infection par IAV, de nouveaux siRNAs sont ajoutés après l'heure de contact avec le virus.

## 8) Mesure de la température intracellulaire

La gamme de fluorescence en fonction de la température est établie au préalable avec des cellules non infectées selon le protocole fourni. Un temps d'acclimatation des cellules à chaque température paramétrée est nécessaire. Pour la mesure de la

température intracellulaire lors de l'infection des cellules, les cellules sont préparées à la fin du temps d'infection selon le protocole fourni avec la sonde fluorescente *Cellular Thermoprobe for Fluorescence Ratio* (Interchim, Funakoshi, FDV-0005). Les images sont prises avec le microscope confocal Zeiss LSM 880.

### 9) Mesure des métabolites

Les préadipocytes sont infectés par IAV [H3N2] à 1 MOI et préparés selon le protocole fourni par les kits à la fin du temps d'infection (24, 48 ou 72 heures). Pour la mesure du ratio ATP/ADP, nous avons utilisé le kit *ADP/ATP Ratio Assay Kit* (Bioluminescent) (Abcam, ab65313). Pour la mesure de l'AMP cyclique, nous avons utilisé le kit *Mouse/Rat cAMP Parameter Assay Kit* (Bio-Techne, KGE012B). Pour la mesure du ratio NADP/NADPH nous avons utilisé le kit *NADP/NADPH quantification kit* (Merck, MAK038-1KT).

### 10) Histologie des tissus adipeux blancs

Après récupération des tissus lors du sacrifice, ceux-ci sont mis 2 jours dans du paraformaldéhyde (4%) puis sont mis en éthanol avant l'inclusion en paraffine. Plusieurs sections (5 µm) ont été déparaffinées, réhydratées et colorées à l'hématoxyline et éosine (H&E). Les images ont été prises avec le microscope (Axioplan 2 Imaging, Zeiss).

### 11) Analyses *in silico*

Les analyses de la séquence en amont du promoteur du gène *Ucp1* (chez l'organisme *mus musculus*, version du génome mm9/MGSCv37, position génomique : chr8:85,810,000-85,815,000) et de la séquence régulatrice activatrice « *enhancer* » d'*Ucp1* (séquence obtenue à partir de Gaudry and Campbell, 2017) ont été réalisées sur le serveur ContraV3 (Kreft et al., 2017) en sélectionnant spécifiquement les facteurs de la voie PERK : ATF3 (Q6-01), ATF4 (Q6), et CHOP (V\$CHOP\_01) ainsi que la facteur pro-adipogénique CEBP (Q3).

### 12) Chromatine immunoprécipitation (ChIP)-PCR

Les expériences de ChIP-PCR seront réalisées à partir des préadipocytes infectés *in vitro* par IAV [H3N2] à 1 MOI, après différents temps d'infection (4-72 heures post-

infection). Les cellules seront traitées pour fixer les interactions entre les protéines et l'ADN avant la lyse cellulaire (conditions de fixation à définir). Nous procéderons ensuite à la sonication des échantillons (paramètres de sonication à définir) et à l'immunoprécipitation avec les anticorps ciblant les facteurs de la voie PERK (ATF3, ATF4, CHOP). Les séquences d'ADN associés aux facteurs de transcriptions récupérés après immunoprécipitation seront analysées par PCR pour valider la fixation ou non de ces facteurs au promoteur du gène *Ucp1*.

### 13) Tests statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec la version 8.0.2 de GraphPad Prism. Chaque groupe a été évalué individuellement par rapport au groupe contrôle avec un t test ou un test de Mann-Whitney U. Les analyses de corrélation et les calculs de la significativité de ces corrélations (test de corrélation de Pearson) ont été réalisés avec les fonctions « corrplot » et « cor.mtest » du logiciel Rstudio.

# Résultats

---

# Partie 1 : Contribution du stress du réticulum endoplasmique dans le brunissement du tissu adipeux blanc induit par l'infection par le virus influenza A

---

## I. Stress du réticulum endoplasmique et brunissement du tissu adipeux blanc induit par IAV (*in vivo*)

### 1) Cinétique du brunissement du tissu adipeux blanc lors de l'infection par IAV

Le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané (SCAT) lors de l'infection de souris par le virus influenza ([H3N2]) a été observé 7 jours après infection et n'est plus visible 20 semaines post-infection (Ayari et al., 2020).

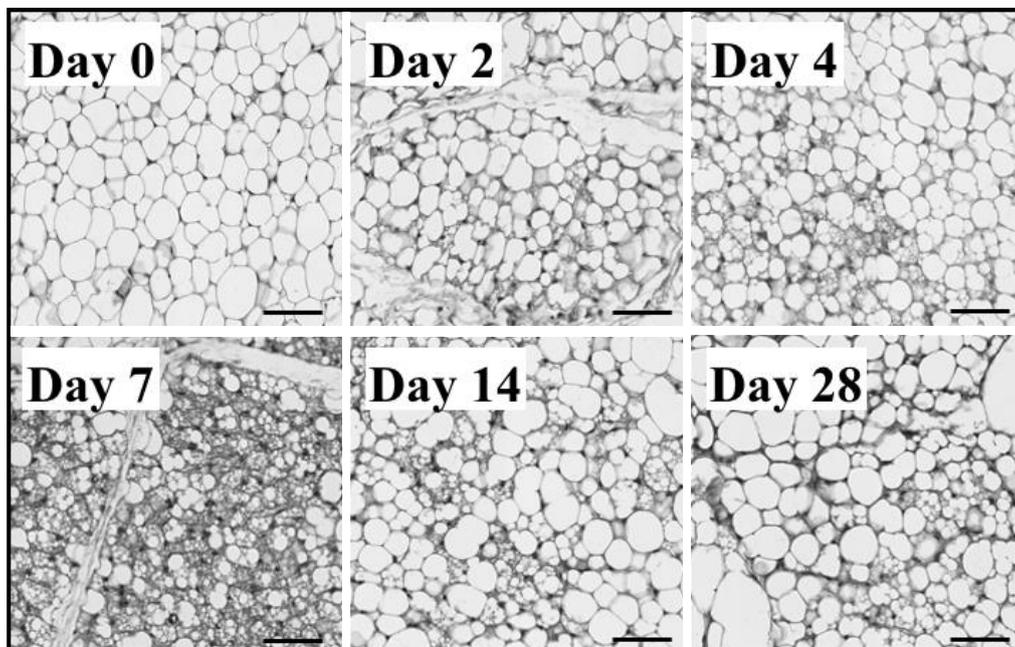
Dans un premier temps, nous avons déterminé la cinétique d'apparition, puis de disparition, du brunissement du SCAT suite à l'infection par IAV, par différentes approches expérimentales : analyse histologique, quantification de l'expression de gènes relatifs au brunissement (RT-qPCR), et quantification de l'expression de la protéine UCP1 (western-blot).

*Analyse histologique* - Les SCAT de souris infectées par IAV ont été récupérés à différents temps post-infection (aux jours J0 (n = 5 souris), J2 (n = 6 souris), J4 (n = 6 souris), J7 (n = 10 souris), J14 (n = 5 souris), J28 (n = 5 souris), J51 (n = 5 souris) et J63 (n = 5 souris)).

La **Figure 48** montre les images représentatives des coupes histologiques des SCAT de J0 à J28. En effet, aux temps plus tardifs d'infection (J51 et J63), l'histologie des tissus était comparable à celle des tissus de souris non infectées.

A J0, le SCAT montre une histologie classique de tissu adipeux blanc : adipocytes de taille homogène, présentant une unique grosse gouttelette lipidique. Dès J2, on peut observer quelques rares zones d'adipocytes de plus petite taille, qui pourraient correspondre à l'induction du phénomène de lipolyse ; lequel est associé au brunissement du tissu adipeux blanc, comme nous l'avons mentionné dans notre Introduction (page 66). Au jour 4 post-infection, quelques îlots d'un petit nombre d'adipocytes beiges sont présents (observable chez 5 souris sur 6). Le nombre et la taille des îlots d'adipocytes beige est maximal à J7, avec de nombreux adipocytes de petite taille contenant de plus petites gouttelettes lipidiques, fortement marqués à l'hématoxyline/éosine plus forte ; une histologie typique de tissu adipeux beige (cf. **Figure 28**, page 66) (observable chez 9 souris sur 10). A partir de J14, on n'observe plus que quelques rares zones éparses contenant quelques adipocytes beiges (observable chez 3 souris sur 5), qui persistent encore à J28 (observable chez 3 souris sur 5).

*Nota bene* : Cette même analyse histologique a été faite pour le tissu adipeux viscéral (EWAT), et a permis de confirmer que le brunissement induit par IAV ne concerne que le dépôt de gras sous-cutané. En effet, aucune zone d'adipocytes beiges n'a été observée dans l'EWAT, à quelque jour que ce soit après infection (résultats non montrés)

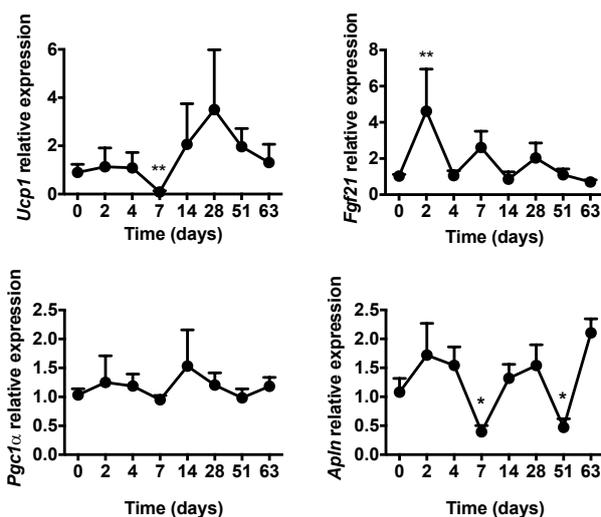


**Figure 48 : Détermination de la cinétique du brunissement du SCAT induit par IAV par analyse histologique.** Photos représentatives des SCAT de souris aux temps 0, 2, 4, 7, 14 et 28 post-infection (microscopie optique, coloration hématoxyline/éosine). Barre d'échelle = 100mm.

Il est à noter que, pour un petit nombre de souris par groupe, de larges îlots d'adipocytes beiges pouvaient encore être observés aux points tardifs d'infection (1 souris sur 5 à J14, 1 souris sur 5 à J28, 1 souris sur 5 à J51, et 1 souris sur 5 à J63).

Ainsi, d'après l'analyse histologique des tissus, nous pouvons conclure que le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané induit par l'infection par IAV est un phénomène précoce (observable dès J4) et transitoire (maximal à J7).

*Analyse d'expression de gènes (RT-qPCR)* - La cinétique du brunissement a également été analysée par la quantification de l'expression de gènes associés au brunissement : les gènes *Ucp1*, *Fgf21*, *Pgc1a*, *Apln*, *Pparγ*, *Metrnl* et *Tmem26* par RT-qPCR (**Figure 49**). L'expression des gènes étant très variable d'un gène à l'autre au cours de la cinétique, il est impossible de conclure uniquement avec ces données. Aucune variation de l'expression de *Pgc1a* n'est observée au cours de l'infection, alors que l'on observe un pic d'augmentation de l'expression de *Fgf21* à J2 (significatif) et un autre à J7 (non significatif). De manière intéressante, l'expression des gènes *Ucp1* et *Apln* est fortement diminuée à J7 post-infection. L'expression de l'ARN d'*Ucp1* étant inversé avec l'expression de la protéine dans notre modèle (Ayari et al., 2020), nous pouvons supposer que la protéine UCP1 est exprimée entre J4 et J14 (notamment à J7 lorsque l'ARN d'*Ucp1* s'effondre). Ces résultats confirment que le brunissement du SCAT suite à l'infection a lieu entre J4 et J14.



*Nota bene* : Les mêmes quantifications géniques ont été faites dans l'EWAT et ont montré que ces gènes ne sont pas induits par l'infection, voire même réprimés pour certains.

**Figure 49 : Expression de gènes liés au brunissement au cours de l'infection par IAV.** L'expression des gènes *Ucp1*, *Fgf21*, *Pgc1a* et *Apln* a été quantifiée (RT-qPCR) dans les SCAT de souris infectées par IAV, à J0, 2, 4, 7, 14, 28, 51 et 63 post-infection. Les résultats (expressions normalisées par

rapport à celle du gène de ménage *Eef2*, et relativisées par rapport aux expressions à J0) sont présentés en moyennes ± SEM. Analyse statistiques réalisée avec un test de Mann-Whitney, \* =  $p \leq 0.05$  (par rapport au J0).

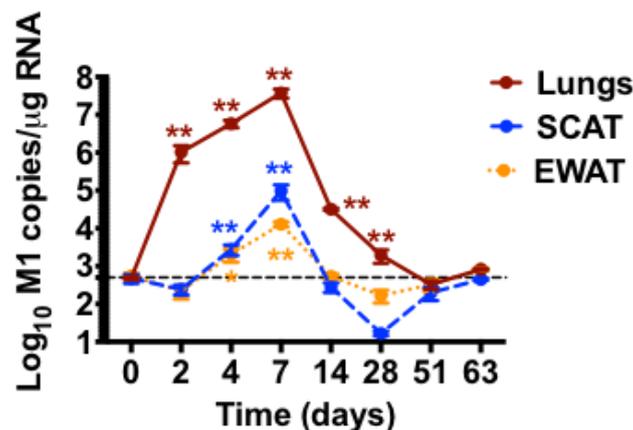
Quantification d'UCP1 (western-blot) – Enfin, les protéines ont été extraites des SCAT, les quantifications d'UCP1 sont en cours.

## 2) Évolution de la charge virale tissulaire au cours de l'infection

Afin de déterminer si le brunissement du SCAT est concomitant avec la présence du virus dans le tissu, nous avons suivi l'évolution de la charge virale au cours de l'infection dans les poumons, le SCAT et l'EWAT, *via* la mesure de l'ARNm de la protéine virale M1 (**Figure 50**).

Dans les poumons, la charge virale augmente très rapidement (dès J2) avant d'atteindre son maximum à J7 et de diminuer progressivement jusque J28. A partir de J51, aucun matériel viral n'est détecté dans les poumons.

Le profil d'évolution de la charge virale dans les tissus adipeux blancs est comparable à celui des poumons, quoique nettement plus faible et plus tardif : l'ARN viral est détectable à partir de J4, et est maximal à J7. A partir de J14 aucun matériel viral n'est détectable dans le SCAT ou l'EWAT. Il est à noter que de l'ARN viral est encore détectable dans les SCAT (et non les EWAT) de quelques rares souris, à J28 (1 souris sur 6 souris) et à J51 (2 souris sur 13 souris). Ceci pourrait peut-être expliquer, si l'on considère que le virus est l'inducteur du brunissement, les observations d'îlots d'adipocytes beiges faites dans les SCAT, chez un petit nombre de souris aux temps tardifs d'infection.



**Figure 50 : Évolution de la charge virale dans les tissus de souris infectées par IAV.** L'ARN viral de la protéine M1 a été quantifié par RT-qPCR dans les poumons (*lungs*), les tissus adipeux sous-cutanés (SCAT) et viscéraux (EWAT) de souris à différents temps après infection. Les résultats (Log<sub>10</sub> de copies du gène M1/mg ARN) sont présentés en moyennes ± SEM. Analyse statistique réalisée par un test de Mann-Whitney, \* =  $p \leq 0.05$ , \*\*  $\leq 0.01$  (par rapport au J0). La limite de détection est représentée par une ligne pointillée.

### 3) Induction du stress du réticulum endoplasmique et réponse UPR au cours de l'infection, *in vivo*

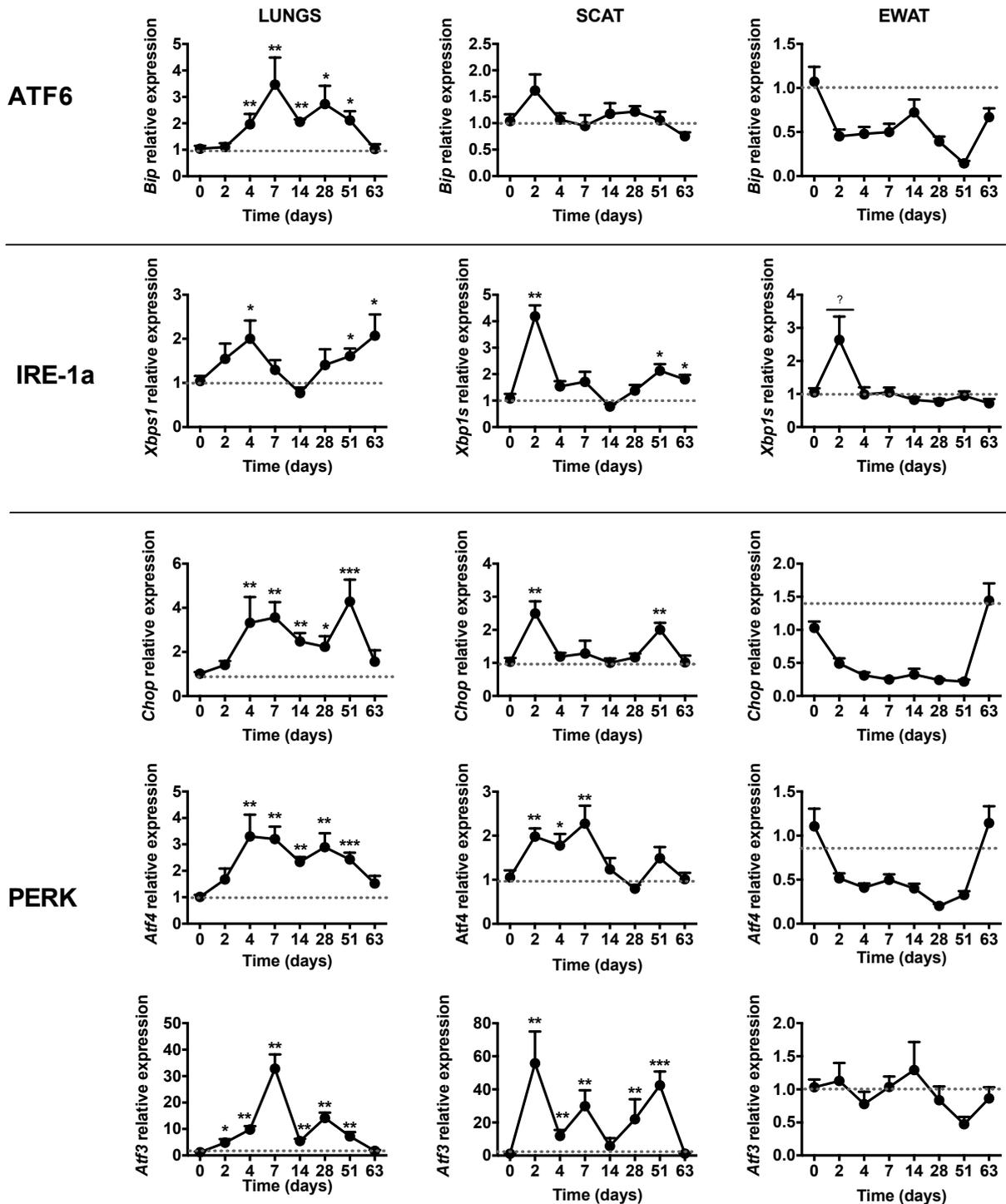
Avant de définir le rôle (potentiel) du stress du réticulum endoplasmique (RE) dans le brunissement du SCAT lors de l'infection par IAV, nous avons tout d'abord cherché à savoir si l'infection par le virus influenza induit un stress du RE dans les poumons, le SCAT et l'EWAT. Pour cela, nous avons quantifié l'expression des gènes impliqués dans les 3 principales voies UPR (liste des gènes présentée **Tableau 3**) dans ces tissus, à différents temps post-infection (Jours J0, J2, J4, J7, J14, J28, J51 et J63), par RT-qPCR (**Figure 51**).

Voie IRE1 $\alpha$	Voie PERK-ATF4	Voie PERK-NRF2	Voie ATF6
<i>Erdj4</i>	<i>Chop</i>	<i>Gclc</i>	<i>Bip</i>
<i>Xbp1s</i>	<i>Gadd34</i>	<i>Nqo1</i>	<i>Grp94</i>
<i>Ero1l</i>	<i>Atf4</i>		<i>Pdia4</i>
<i>Hrd1</i>	<i>Atf3</i>		<i>Herpud1</i>
<i>Pdia5</i>			<i>Sel1l</i>
<i>Pdia6</i>			<i>Pdia6</i>
<i>Pdia3</i>			<i>Pdia3</i>

**Tableau 3 : Liste des gènes impliqués dans l'activation des différentes voies UPR (IRE1 $\alpha$ , PERK et ATF6).** La voie PERK peut être subdivisée en 2 voies : PERK-ATF4 et PERK-NRF2.

L'analyse de l'expression des gènes des voies de l'UPR (**Figure 51**) montre que l'infection par le virus influenza induit un stress du RE et l'activation de voies UPR dans les poumons et le SCAT des souris infectées. *A contrario*, l'infection par le virus influenza n'induit pas de stress du RE dans l'EWAT (à l'exception d'*Xbp1s* à J2).

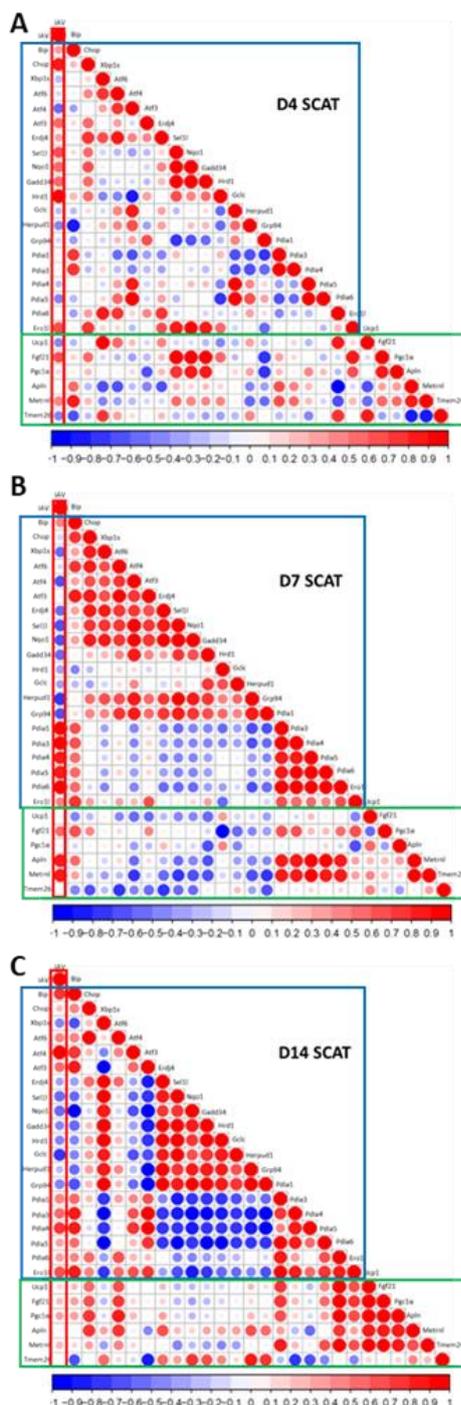
Dans les poumons, nous constatons que toutes les voies UPR sont activées, alors que seules les voie IRE1 $\alpha$  et PERK sont induites dans le SCAT. Le gène *Atf3* est très induit par l'infection dans les poumons (pic à J7) et dans le SCAT (pics à J2, J7 et J51). Une analyse plus approfondie (tenant compte du nombre de gènes induits par voie UPR et de leur niveau d'expression) des différents gènes étudiés (non montrés) montre que la voie PERK est prédominante par rapport aux autres voies dans les poumons et le SCAT au cours de l'infection.



**Figure 51 : Induction d'un stress du RE dans les poumons et les tissus adipeux blancs au cours de l'infection par IAV.** L'expression des gènes impliqués dans l'activation des principales voies de l'UPR (ATF6, IRE1a et PERK) a été quantifiée (RT-qPCR) dans les poumons (*Lungs*), le SCAT et l'EWAT de souris infectées par IAV, à Jo, 2, 4, 7, 14, 28, 51 et 63 post-infection. Les résultats (expressions normalisées par rapport à celle du gène de ménage *Eef2*, et relativisées par rapport aux expressions à Jo) sont présentés en moyennes  $\pm$  SEM. Analyse statistique réalisée par un test de Mann-Whitney, \* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$  (par rapport au Jo).

#### 4) Liens entre virus, UPR et brunissement du tissu adipeux blanc (analyses de corrélations)

Afin de voir si le stress du RE et la réponse UPR pourrait être impliqués dans le brunissement du SCAT lors de l'infection par le virus influenza, nous avons effectué des analyses de corrélation entre les expressions des gènes du brunissement, des gènes des voies UPR, et l'ARN viral (RStudio), à J4 (mise en place du brunissement) (**Figure 52A**), J7 (pic du brunissement) (**Figure 52B**), et J14 (disparition du brunissement) (**Figure 52C**).



**Figure 52 : Liens corrélatifs entre la détection de l'ARN viral, l'expression des gènes relatifs au brunissement et l'induction des gènes de l'UPR dans le SCAT.** Les analyses de corrélation entre les expressions des gènes ont été faites dans le SCAT à **A**) J4 post-infection, **B**) J7 post-infection, et **C**) J14 post-infection. Les ronds rouges correspondent aux corrélations positives et les ronds bleus aux corrélations négatives. En rouge, est encadrée la colonne correspondant aux corrélations avec l'ARN viral. En bleu, est encadré l'ensemble des gènes de l'UPR analysés et en vert, l'ensemble des gènes liés au brunissement. Toutes les corrélations sont représentées, y compris les non-significatives. Analyse par RStudio.

Les corrélations significatives ( $R$  proche de 1 et valeur de  $p \leq 0,05$ ) sont répertoriées dans les **Tableaux 4** (J4 post-infection), **5** (J7 post-infection) et **6** (J14 post-infection).

<p style="text-align: center;"><b>Virus- ERS</b> <i>IAV-Chop, IAV-Hrd1</i></p>	Positives
<p style="text-align: center;"><b>ERS-ERS</b> <i>Bip-Herpud1</i></p>	Négatives
<p style="text-align: center;"><b>ERS-ERS</b> <i>Xbp1s-Pdia6, Atf6-Erdj4, Atf4-Gclc, Atf4-Pdia4, Atf4-Pdia5, Sel1l-Nqo1, Sel1l-Gadd34, Sel1l-Ero1l, Nqo1-Gadd34, Nqo1-Ero1l, Gclc-Pdia4, Gclc-Pdia5</i></p>	Positives
<p style="text-align: center;"><b>Brunissement-brunissement</b> <i>Ucp1-Tmem26, Fgf21-Pgc1a, Apln-Metrnl</i></p>	Positives
<p style="text-align: center;"><b>Brunissement-brunissement</b> <i>Apln-Tmem26, Metrnl-Tmem26</i></p>	Négatives
<p style="text-align: center;"><b>ERS-brunissement</b> <i>Xbp1s-Ucp1, Sel1l-Fgf21, Nqo1-Fgf21, Nqo1-Pgc1a, Gadd34-Ero1l, Gadd34-Fgf21, Ero1l-Fgf21</i></p>	Positives
<p style="text-align: center;"><b>ERS-brunissement</b> <i>Pdia6-Apln</i></p>	Négative

**Tableau 4 : Corrélations significatives dans les SCATs, 4 jours post-infection.** Les corrélations significative (R proche de 1 et valeur de  $p \leq 0,05$ ) sont indiquées pour les SCATs à D4, et sont classées par catégorie de gènes. ERS = stress du réticulum endoplasmique.

<p style="text-align: center;"><b>Virus- ERS</b></p> <p><i>IAV-Pdia(1,3,5,6), IAV-Apln, IAV-Metrnl</i></p>	Positives
<p style="text-align: center;"><b>Virus-brunissement</b></p> <p><i>IAV-Apln, IAV-Metrnl</i></p>	Positives
<p style="text-align: center;"><b>ERS-ERS</b></p> <p><i>Bip-Atf3, Chop-Xbp1s, Chop-Atf6, Chop-Atf3, Chop-Erdj4, Chop-Nqo1, Xbp1s-Nqo1, Atf6-Atf3, Atf4-Atf3, Atf4-Sel1l, Atf4- Nqo1, Atf4-Gadd34, Atf4-Herpud1, Atf4-Grp94, Erdj4-Sel1l, Erdj4-Nqo1, Sel1l-Nqo1, Sel1l-Herpud1, Sel1l- Grp94, Nqo1-Herpud1, Herpud1-Grp94, Pdia1-Pdia(3,4,5,6), Pdia3-Pdia(4,5,6), Pdia4-Pdia(5,6), Pdia5-Pdia6</i></p>	Positives
<p style="text-align: center;"><b>Brunissement-brunissement</b></p> <p><i>Apln-Metrnl</i></p>	Positives
<p style="text-align: center;"><b>ERS-brunissement</b></p> <p><i>Pdia1-Apln, Pdia1-Metrnl, Pdia3-Apln, Pdia3-Metrnl, Pdia4-Apln, Pdia4-Metrnl, Pdia5-Apln, Pdia5-Metrnl, Pdia6-Apln, Pdia6-Metrnl</i></p>	Positives
<p style="text-align: center;"><b>ERS-brunissement</b></p> <p><i>Hrd1-Fgf21</i></p>	Négative

**Tableau 5 : Corrélations significatives dans les SCATs, 7 jours post-infection.** Les corrélations significative (R proche de 1 et valeur de  $p \leq 0,05$ ) sont indiquées pour les SCATs à D7, et sont classées par catégorie de gènes. ERS = stress du réticulum endoplasmique.

<p style="text-align: center;"><b>Virus- ERS</b></p> <p style="text-align: center;"><i>IAV-Atf4</i></p>	Positive
<p style="text-align: center;"><b>ERS-ERS</b></p> <p><i>Chop-Atf6, Xbp1s-Erdj4, Xbp1s-Sel1l, Xbp1s-Nqo1, Xbp1s-Gadd34, Xbp1s-Hrd1, Xbp1s-Herpud1, Xbp1s-Grp34, Atf3-Pdia3, Atf3-Pdia4, Erdj4-Gadd34, Erdj4-Hrd1, Erdj4-Hrd1, Erdj4-Herpud1, Erdj4-Grp94, Sel1l-Gadd4, Sel1l-Hrd1, Sel1l-Gclc, Nqo1-Grp94, Gadd34-Hrd1, Gadd34-Herpud1, Gadd34-Grp94, Hrd1-Gclc, Herpud1-Grp94, Pdia1-Pdia5, Pdia1-Ero1l, Pdia3-Pdia4</i></p>	Positives
<p style="text-align: center;"><b>ERS-ERS</b></p> <p><i>Bip-Nqo1, Xbp1s-Atf3, Xbp1s-Pdia(3,5), Atf3-Nqo1, Atf3-Gadd34, Nqo1-Herpud1, Atf3-Grp94, Sel1l-Pdia5, Nqo1-Pdia3, Gadd34-Pdia(3,5), Hrd1-Pdia5, Grp94-Pdia(3,4)</i></p>	Négatives
<p style="text-align: center;"><b>ERS-brunissement</b></p> <p><i>Pdia6-Ucp1, Pdia6-Fgf21, Pdia6-Pgc1α</i></p>	Positives
<p style="text-align: center;"><b>Brunissement-brunissement</b></p> <p><i>Ucp1-Fgf21, Ucp1-Pgc1α, Ucp1-Metrnl, Fgf21-Pgc1α, Fgf21-Metrnl</i></p>	Positives

**Tableau 6 : Corrélations significatives dans les SCATs, 14 jours post-infection.** Les corrélations significative (R proche de 1 et valeur de  $p \leq 0,05$ ) sont indiquées pour les SCATs à D14, et sont classées par catégorie de gènes. ERS : stress du réticulum endoplasmique.

Corrélations avec l'ARN viral ? Nous avons trouvé plusieurs corrélations avec la présence du génome viral : des corrélations entre le virus et l'UPR à J4 (**Tableau 4**) (IAV-*Chop*, IAV-*Hrd1*), à J7 (**Tableau 5**) (IAV-*Pdia(1,3,5,6)*) et à J14 (**Tableau 6**) (IAV-*Atf4*). Ces corrélations, toutes positives, confortent l'induction de l'UPR par l'infection. Des corrélations entre l'ARN viral et des gènes du brunissement sont également révélées, uniquement à J7 (IAV-*Apln*, IAV-*Metrnl*) ; appuyant l'hypothèse d'un lien entre la présence du virus (génome viral) et le brunissement du SCAT.

Corrélation entre UPR et brunissement ? Plusieurs corrélations sont identifiées entre les gènes du brunissement et de l'UPR : à J4 (**Tableau 4**) (*Xbp1s-Ucp1*, *Sel1l-Fgf21*, *Nqo1-Fgf21*, *Nqo1-Pgc1α*, *Gadd34-Ero1l*, *Gadd34-Fgf21*, *Ero1l-Fgf21*, *Pdia6-Apln*), à J7 (**Tableau 5**) (*Pdia1-Apln*, *Pdia1-Metrnl*, *Pdia3-Apln*, *Pdia3-Metrnl*, *Pdia4-Apln*, *Pdia4-Metrnl*, *Pdia5-Apln*, *Pdia5-Metrnl*, *Pdia6-Apln*, *Pdia6-Metrnl*, *Hrd1-Fgf21*) et à J14 (**Tableau 6**) (*Pdia6-Ucp1*, *Pdia6-Fgf21*, *Pdia6-Pgc1α*). Ceci suggère que l'UPR pourrait en effet avoir un rôle dans la régulation du brunissement au cours de l'infection par le virus influenza. Cependant, aucune corrélation entre *Ucp1* et un gène de l'UPR ne ressort et persiste tout au long de la cinétique, ne permettant pas de faire de lien direct entre l'induction du brunissement et une voie UPR particulière (excepté la corrélation *Xbp1s-Ucp1* à J4).

Les résultats des expériences *in vivo* montrent que le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané (SCAT) induit par l'infection par IAV, est un phénomène **précoce** (dès J4), qui est **maximal à J7** (au moment du pic de détection du génome viral dans le tissu), **transitoire** (disparaît à partir de J14) et donc **réversible**.

La coïncidence des pics de détection du génome viral et du brunissement (J7) laisse supposer que le virus (ou, tout au moins, le génome viral) pourrait être l'agent inducteur du brunissement.

De plus, nous montrons pour la première fois que l'infection par le virus de la grippe induit un stress du réticulum endoplasmique dans les poumons et le SCAT mais pas dans l'EWAT, tissu chez lequel aucun brunissement n'est observé. Bien que cela ne soit pas une preuve directe, cela pourrait signifier que le stress du réticulum endoplasmique induit par l'infection, participe au brunissement du SCAT. Enfin, nous montrons que la voie PERK est la voie de l'UPR majoritairement activée en réponse au stress du réticulum endoplasmique induit par l'infection par IAV.

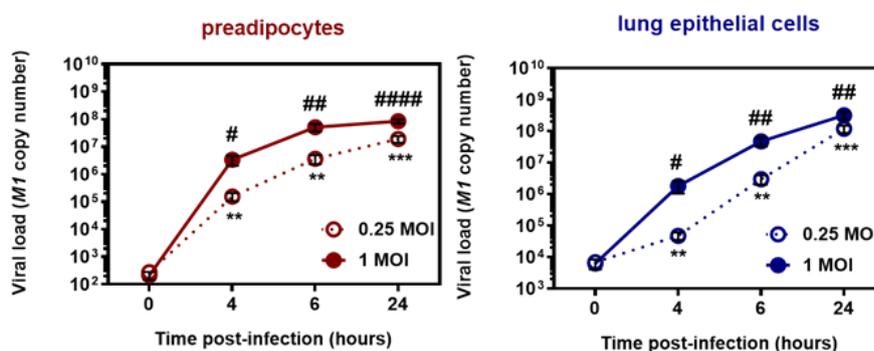
## II. Stress du réticulum endoplasmique et thermogénèse des préadipocytes induite par IAV (*in vitro*)

### 1) Paramètres d'infection des cellules épithéliales pulmonaires et des préadipocytes, *in vitro*

Afin de préciser les mécanismes par lesquels le stress du réticulum endoplasmique induit par IAV, participe au brunissement du tissu adipeux blanc lors de l'infection, nous avons utilisé un modèle d'infection de préadipocytes, *in vitro*.

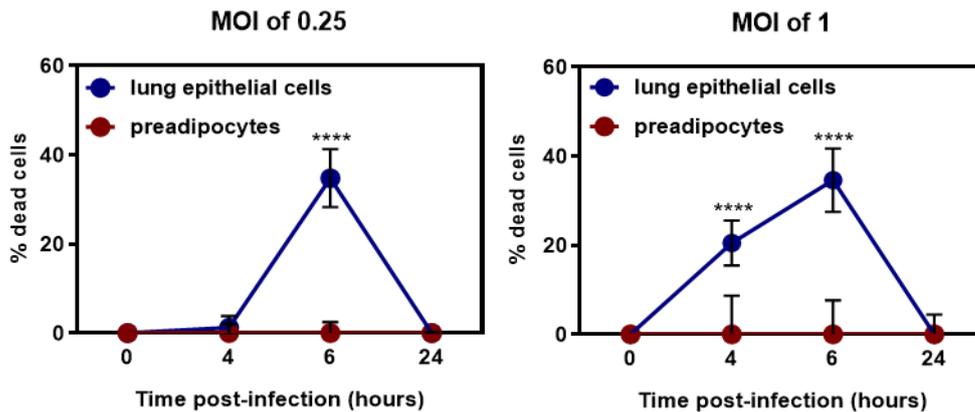
En effet, l'équipe a montré que le virus influenza induit l'expression des gènes liés au brunissement dans les préadipocytes (Ayari et al., 2020). Nous avons donc développé des modèles d'infection de **préadipocytes** (la lignée de cellules préadipocytaires murines 3T3-L1) et de **cellules épithéliales pulmonaires** (la lignée de cellules épithéliales pulmonaires murines MLE15, utilisée comme contrôle) par IAV ([H3N2]). Nous avons testé différentes doses d'infection (0,25 et 1 MOI) et analysé les cellules à différents temps post-infection (4, 6 et 24 heures).

L'évolution de la charge virale est similaire dans les 2 types cellulaires (**Figure 53**). A 24 heures post-infection, la quantité d'ARNm viral dans les MLE15 est à peine plus élevée que dans les préadipocytes, indiquant que la réplication virale est aussi efficace dans les préadipocytes que dans les cellules épithéliales pulmonaires.



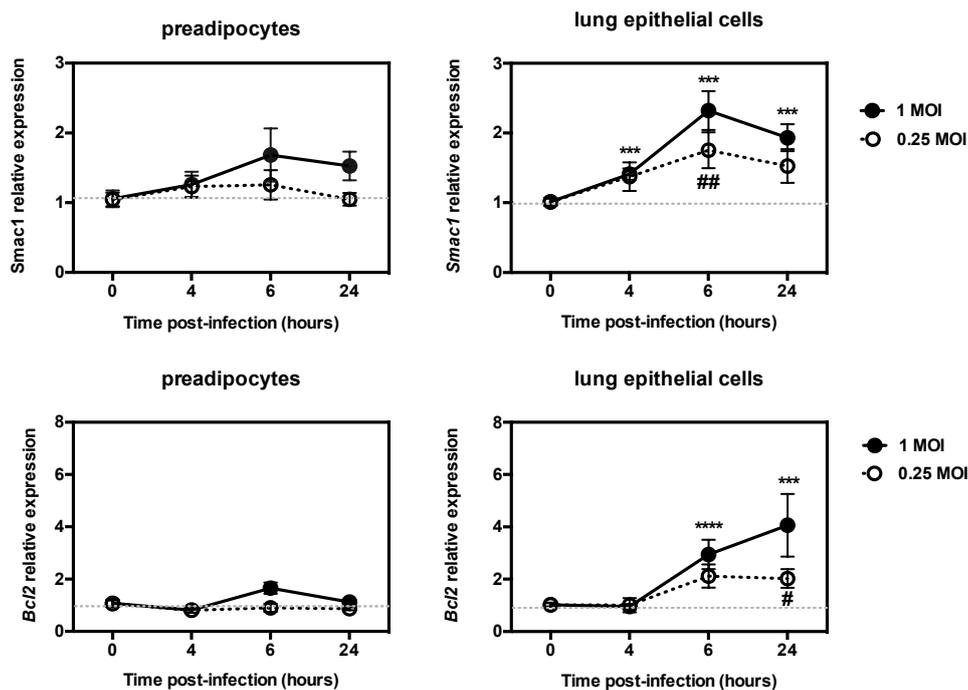
**Figure 53 : Évolution de la charge virale dans les cellules épithéliales pulmonaires et les préadipocytes.** L'ARN viral de la protéine M1 a été quantifié par RT-qPCR dans les préadipocytes (panel de gauche) et les cellules épithéliales pulmonaires (*lung epithelial cells*) (panel de droite). Deux doses d'infection (0,25 MOI et 1 MOI virus [H3N2]) et 4 temps d'analyse (0, 4, 6 et 24 heures) sont représentés. Les résultats (copies du gène M1) sont présentés en moyennes  $\pm$  SEM. n= 9-13 (0h), n= 9 (4h), n= 9-11 (6h et 24h). Analyse statistique réalisée par un test de Mann-Whitney, \* et # =  $p \leq 0.05$ , \*\* et ## =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , #### =  $p \leq 0,0001$  (par rapport au temps 0).

Nous avons ensuite évalué l'impact de l'infection sur la viabilité des cellules (test MTT), pour les deux doses d'infection (0,25 et 1 MOI), et aux différents temps post-infection (0, 4, 6 et 24 heures). Alors que l'infection par IAV entraîne une mortalité des cellules épithéliales pulmonaires (~ 35% aux deux doses d'infection, à 6 heures d'infection), aucune mortalité n'est observée chez les préadipocytes (**Figure 54**).



**Figure 54 : Impact de l'infection par IAV sur la viabilité des cellules épithéliales pulmonaires et des préadipocytes.** La mortalité cellulaire a été évaluée par un test MTT. Le pourcentage de préadipocytes ou de cellules épithéliales pulmonaires (*lung epithelial cells*) morts suite à l'infection à 0,25 MOI (panel de gauche) ou à 1 MOI (panel de droite) est indiqué pour chaque temps d'infection (0, 4, 6 et 24 heures). Les résultats sont présentés en moyenne des pourcentages par groupe  $\pm$  SEM. Analyse statistique réalisée par un test de Mann-Whitney, \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$  (par rapport au temps 0),  $n = 7$  par groupe.

Ces observations sont confirmées par l'analyse de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose (*Bcl2* et *Smac1*). Comme montré **Figure 55**, aucune variation de l'expression de ces gènes n'est observée au cours de l'infection des préadipocytes. En revanche dans le cas des cellules épithéliales pulmonaires, nous constatons une augmentation significative de l'expression de *Smac1* (de 4 à 6 heures post-infection) et de *Bcl2* (de 6 à 24 heures post-infection) à la dose d'infection de 1 MOI. A 0,25 MOI, on observe également une expression significative de *Smac1* (6 heures post-infection) et de *Bcl2* (24 heures post-infection).

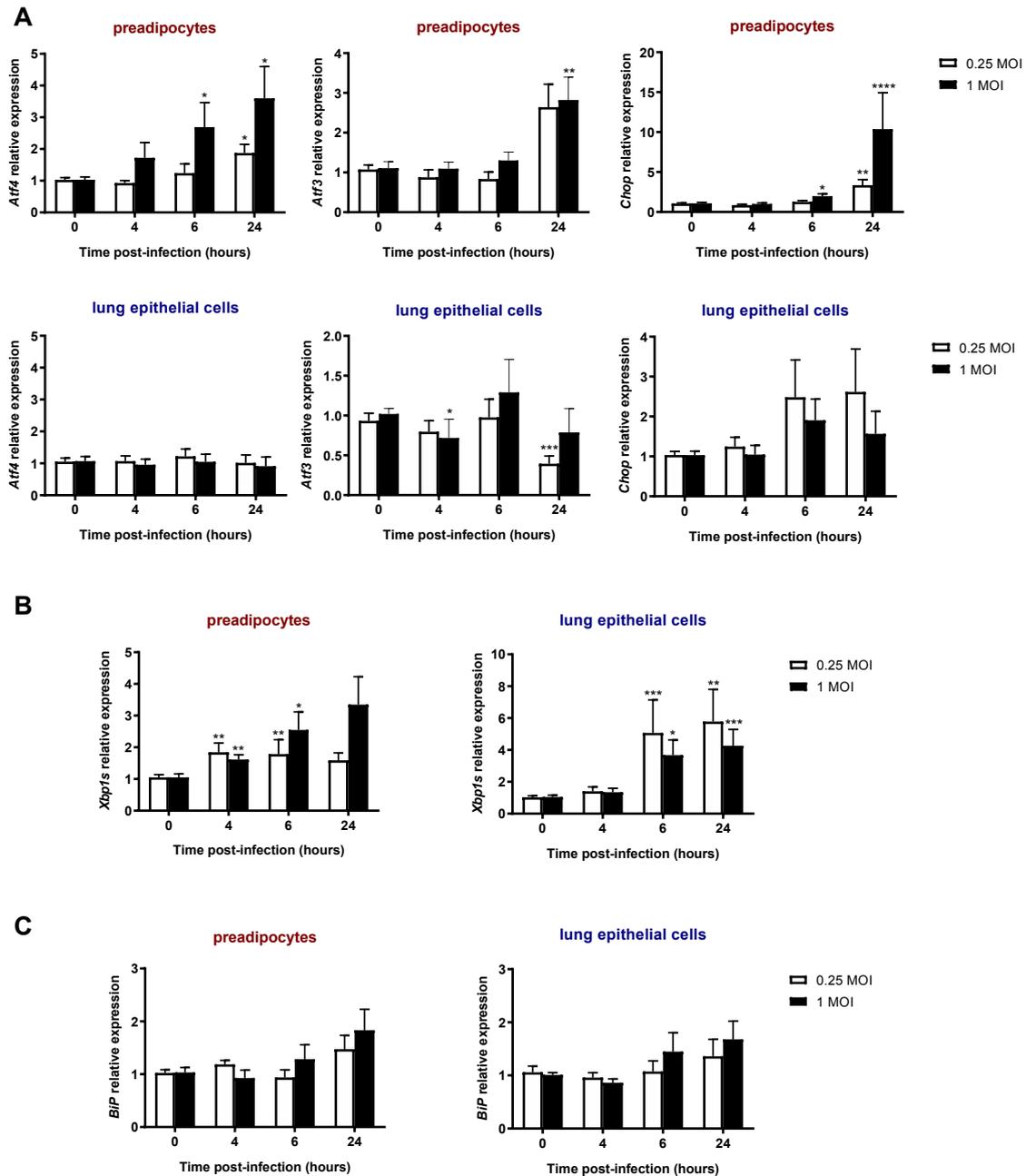


**Figure 55 : Impact de l'infection par IAV sur l'expression de gènes pro-apoptotiques, dans les cellules épithéliales pulmonaires et les préadipocytes.** Quantification de l'expression des gènes *Smac1* et *Bcl2* (RT-qPCR) dans des préadipocytes et des MLE15 (*lung epithelial cells*) à différents temps (0, 4, 6, 24 heures) après infection par IAV (à 0,25 et 1 MOI). Les résultats (expressions normalisées à celle du gène de ménage *Eef2* et relativisées par rapport aux expressions au temps 0) sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM. Analyse statistique réalisée par un test de Mann-Whitney, ## =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ , n= 9 -11.

## 2) Induction du stress du réticulum endoplasmique et réponse UPR au cours de l'infection, *in vitro*

### a) L'infection par IAV induit un stress du réticulum endoplasmique dans les préadipocytes

Comme indiqué dans l'Introduction (page 92), il a été rapporté que l'infection par IAV induit un stress du réticulum endoplasmique dans les cellules épithéliales pulmonaires (Hassan et al., 2012; Hrincius et al., 2015; Roberson et al., 2012). Afin de voir si cela est également le cas pour les préadipocytes, nous avons quantifié l'expression des gènes liés aux voies UPR (*Atf4*, *Atf3*, *Chop* pour la voie PERK, *Xbp1s* pour la voie IRE1 $\alpha$ , et *Bip* pour la voie ATF6) lors de l'infection de préadipocytes et de cellules épithéliales pulmonaires. Deux doses de virus ([H3N2]) (0,25 et 1 MOI) ont été testées, et 3 temps post-infection ont été analysés (4, 6 et 24 heures post-infection). La **Figure 56** représente les résultats obtenus pour certains de ces gènes.



**Figure 56 : Expression des gènes de l'UPR dans les préadipocytes et cellules épithéliales pulmonaires infectés par IAV.** Quantification de l'expression des gènes : **A)** *Atf4*, *Atf3*, *Chop* (voie PERK), **B)** *Xbp1s* (voie IRE1a), et **C)** *Bip* (voie ATF6), (RT-qPCR). Les cellules ont été infectées par différentes doses de virus [H3N2] (0,25 et 1 MOI) et ont récupéré aux temps 0, 4, 6 et 24 heures. Les histogrammes représentent la moyenne d'expression par groupe (normalisée à l'expression du gène de ménage *Eef2* et relativisée à l'expression au temps 0)  $\pm$  SEM. Analyse statistique réalisée par un test de Mann-Whitney, \* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ . n= 9-13 pour le temps 0, n=9 pour le temps 4 h, n= 9-11 pour les temps 6 et 24 h.

Les résultats montrent que l'infection induit l'expression des gènes liés à la **voie PERK** : *Atf4* (à 6h pour 1 MOI et à 24h pour 0,25 MOI et 1MOI), *Atf3* (à 24h pour 1 MOI, avec une tendance non significative à 24h pour 0,25 MOI due à l'hétérogénéité des données), et *Chop* (à 6h pour 1 MOI, et à 24h pour 0,25 et 1 MOI) dans les préadipocytes. A l'inverse, ces gènes ne sont pas induits dans les cellules épithéliales pulmonaires lors de l'infection ; l'on observe même une répression d'*Atf3* à 4 et 24h post-infection (pour 1 et 0,25 MOI, respectivement).

*Xbp1s*, représentant de la **voie IRE1 $\alpha$** , est induit au cours de l'infection aussi bien dans les préadipocytes que dans les cellules épithéliales pulmonaires. Cependant, son expression est 2 fois plus forte dans les cellules épithéliales pulmonaires (expression 4 à 6 fois plus forte comparé aux contrôles) que dans les préadipocytes (expression 2 à 3 fois plus forte comparé aux contrôles).

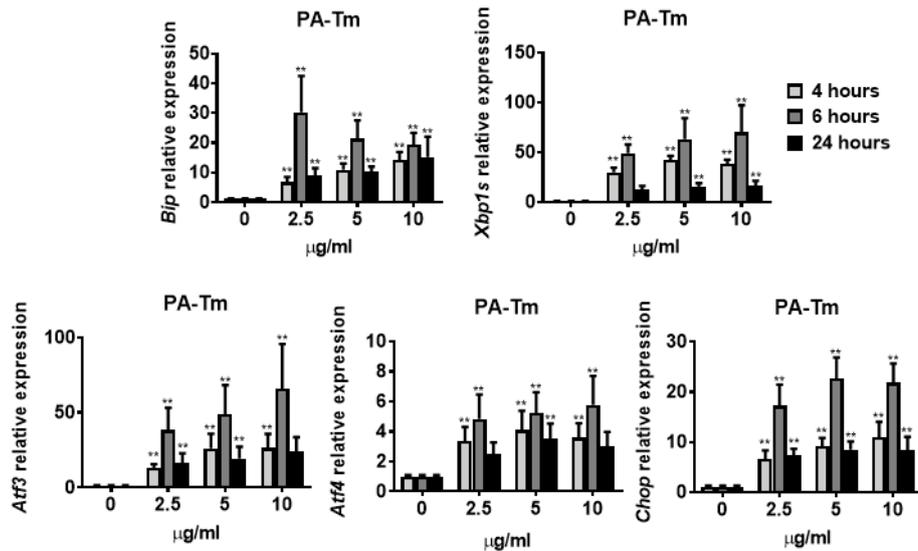
Enfin, la **voie ATF6** n'est pas activée dans les deux types cellulaires au cours de l'infection.

Ainsi, nos résultats **1)** confirment que l'infection par IAV induit un stress du réticulum endoplasmique dans les cellules épithéliales pulmonaires, avec activation de la voie IRE1 $\alpha$ , et **2)** montrent que l'infection par IAV induit un stress du réticulum endoplasmique dans les préadipocytes, avec l'activation minoritaire de la voie IRE1 $\alpha$  et l'activation majoritaire de la voie PERK.

### **b) Activation de l'UPR dans les préadipocytes lors d'un stress du réticulum induit par un inducteur chimique**

Nous avons montré que l'infection par IAV conduit à l'activation des voies PERK et IRE1 $\alpha$  dans les préadipocytes. Afin de déterminer si l'UPR induite dans les préadipocytes est une réponse stéréotypée ou spécifique de l'infection, nous avons traité les préadipocytes avec un inducteur chimique du stress du réticulum : la tunicamycine. Trois doses de tunicamycine ont été testées (2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), et les cellules ont été prélevées 4, 6 et 24 heures après traitement.

Les résultats, présentés **Figure 57**, montrent que la tunicamycine induit l'expression de tous les gènes testés (*Bip* pour la voie ATF6, *Xbp1s* pour la voie IRE1 $\alpha$ , et *Atf3*, *Atf4* et *Chop* pour la voie PERK), indiquant l'activation de toutes les voies UPR.



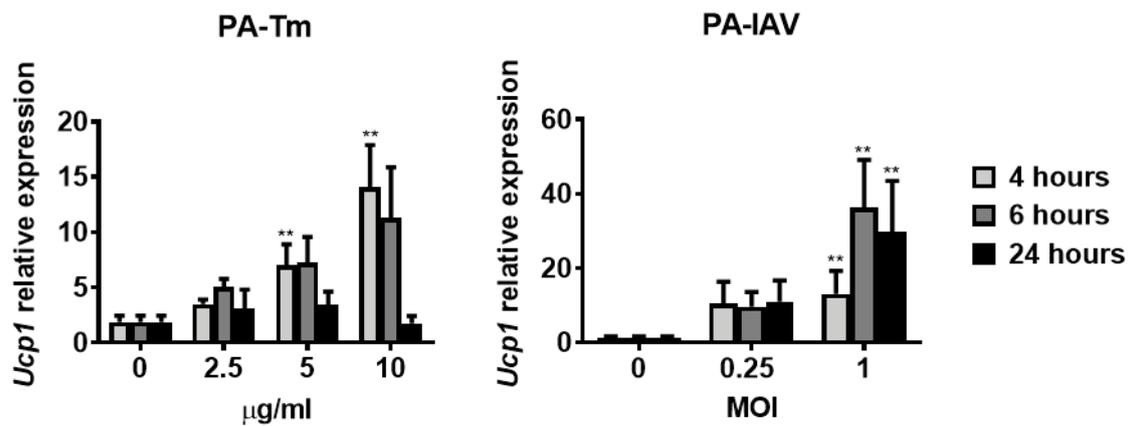
**Figure 57 : Activation de l'UPR dans les préadipocytes traités avec un inducteur du stress du RE.** La tunicamycine (Tm) a été utilisée à différentes doses (2,5, 5 et 10 mg/mL) pour traiter les préadipocytes pendant 4, 6 et 24 heures. Les histogrammes représentent la moyenne des expressions (normalisées au gène de ménage *Eef2* et relativisées par rapport à l'expression au traitement à la dose de 0 µg/mL) ± SEM. Analyse statistique réalisée par un test de Mann-Whitney, \*\* =  $p \leq 0.01$ ,  $n = 6$ .

Ces résultats montrent que la voie UPR activée en réponse au stress du réticulum endoplasmique induit par l'infection est spécifique du virus, et pas une réponse stéréotypée des préadipocytes en réponse à toute forme de stress du réticulum endoplasmique.

### c) Induction du brunissement dans les préadipocytes lors d'un stress du réticulum endoplasmique

L'équipe a précédemment montré que les gènes liés au brunissement étaient exprimés suite à un effet direct du virus sur les préadipocytes (Ayari et al., 2020). Nous avons alors voulu savoir si le stress du réticulum et la réponse UPR induite lors de l'infection par IAV des préadipocytes sont responsables de l'induction des gènes liés au brunissement. Pour cela, nous avons comparé l'expression des gènes liés au brunissement (dont *Ucp1*) lors d'un stress général du réticulum endoplasmique (induit par la tunicamycine) vs. un stress du réticulum endoplasmique induit par l'infection par IAV. Les préadipocytes ont été traités avec différentes doses de tunicamycine (0, 2,5, 5 et 10 µg/mL) ou de virus IAV ([H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>] (0, 0,25, et 1 MOI)

pendant 4, 6 et 24 heures. La **Figure 58** montre l'expression d'*Ucp1* dans les préadipocytes suite à l'infection par IAV ou au traitement à la tunicamycine.



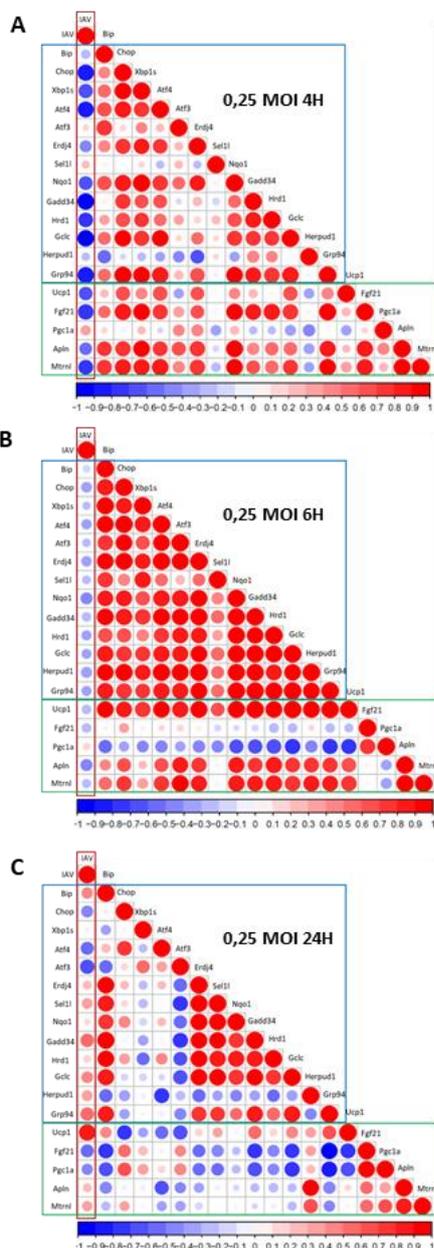
**Figure 58 : Expression du gène *Ucp1* lors d'un stress du réticulum endoplasmique dans les préadipocytes.** L'expression d'*Ucp1*, quantifiée par RT-qPCR, est comparée entre deux inducteurs du stress du réticulum endoplasmique : la tunicamycine (Tm ; 0, 2,5, 5 et 10 µg/mL) (panel de gauche), et l'infection par IAV (0, 0,25 et 1 MOI) (panel de droite). L'analyse a été réalisée 4, 6 ou 24 heures après traitement/infection. Les histogrammes représentent la moyenne des expressions (normalisées à celle du gène de ménage *Eef2* et relativisées par rapport à l'expression au traitement à 0 µg/mL). Analyse statistique réalisée par un test de Mann-Whitney, \*\* =  $p \leq 0.01$ , n=6.

Nous constatons que l'expression d'*Ucp1* est augmentée pour toutes les doses de traitement à la tunicamycine, et également lors de l'infection par IAV (non significative à certains temps de traitement pour la tunicamycine et à 0,25 MOI pour IAV à cause de l'hétérogénéité des données entre les expériences). Cependant, l'infection induit une plus forte augmentation d'*Ucp1* (expression entre 9 et 36 fois plus forte en moyenne que dans les contrôles) que le traitement à la tunicamycine (expression 1,7 à 14 fois plus forte en moyenne que dans les contrôles).

Ces résultats montrent que, *per se*, le stress du réticulum endoplasmique et la réponse UPR sont capables d'induire l'expression d'*Ucp1*, mais que le virus est un meilleur inducteur du brunissement (résultat à confirmer par les Western Blot). Ceci suggère que, **1**) c'est la réponse UPR spécifiquement induite par le virus qui est responsable du brunissement et/ou **2**) que l'UPR n'a qu'un rôle partiel dans l'induction du brunissement, et qu'un autre facteur (facteur viral ou réponse de l'hôte) pourrait également participer au brunissement.

#### d) Liens entre virus, UPR, et brunissement des préadipocytes (analyses de corrélations)

Pour établir un lien possible entre la présence du virus, l'UPR, et le brunissement (ou plutôt, l'induction de la thermogenèse) des préadipocytes, nous avons procédé à des analyses de corrélations entre les expressions des gènes de l'UPR, du brunissement, et l'ARN viral lors de l'infection des préadipocytes *in vitro* (2 doses d'infection : 0,25 et 1 MOI, et 3 temps de récupération : 4, 6 et 24h post-infection). La **Figure 59** montre les matrices de corrélation, présentées sous forme de corrélogrammes, obtenues pour les préadipocytes infectés à 0,25 MOI, à 4h (**Figure 59A**), 6h (**Figure 59B**), et 24h (**Figure 59C**). En complément à cette figure, les corrélations significatives sont indiquées dans les **Tableaux 7-9**.



**Figure 59 : Liens corrélatifs entre la détection de l'ARN viral, l'expression des gènes relatifs au brunissement et l'induction des gènes de l'UPR, dans les préadipocytes infectés par IAV.** Les corrélogrammes visualisent les corrélations obtenues pour les préadipocytes infectés à 0,25 MOI et récupérés à 4 h (A), 6 h (B) et 24 h (C) post-infection. En rouge, est encadrée la colonne des corrélations impliquant l'ARN viral, en bleu, les corrélations entre les gènes de l'UPR et en vert, les corrélations entre les gènes du brunissement. Les corrélations positives sont indiquées par les ronds rouges et les négatives par des ronds bleus. Analyse par RStudio.

Les analyses de corrélations lors de l'infection des préadipocytes par IAV révèlent un profil d'activation/répression génique complètement différent selon le temps post-infection. A 4 heures post-infection (**Figure 59A**), nous pouvons constater de nombreuses corrélations positives entre les gènes de l'UPR et les gènes du brunissement. A 6 heures post-infection (**Figure 59B**), nous observons de nombreuses corrélations positives entre les gènes de l'UPR entre eux. De façon intéressante, *Ucp1* semble corrélérer positivement avec tous les gènes de l'UPR. Plusieurs corrélations entre les gènes de l'UPR et du brunissement (notamment *Apln* et *Mtrnl*) persistent entre 4 et 6 heures post-infection. Enfin, à 24 heures post-infection (**Figure 59C**), l'ARN viral corrèle positivement avec *Ucp1*.

<p style="text-align: center;"><b>Virus-ERS</b></p> <p><i>IAV-Chop, IAV-Atf4, IAV-Gadd34, IAV-Gclc, IAV-Grp94</i></p>	Négatives
<p style="text-align: center;"><b>ERS-ERS</b></p> <p><i>Chop-Xbp1s, Chop-Atf4, Chop-Nqo1, Chop-Gclc, Chop-Grp94, Xbp1s-Nqo1, Xbp1s-Grp94, Atf4-Gclc, Atf4-Grp94, Erdj4-Nqo1, Nqo1-Grp94, Gadd34-Hrd1, Gadd34-Grp94, Gclc-Grp94</i></p>	Positives
<p style="text-align: center;"><b>ERS-Brunissement</b></p> <p><i>Chop-Fgf21, Chop-Metrnl, Xbp1s-Fgf21, Xbp1s-Apln, Xbp1s-Metrnl, Atf4-Metrnl, Nqo1-Fgf21, Nqo1-Apln, Nqo1-Metrnl, Gadd34-Fgf21, Hrd1-Fgf21, Grp94-Fgf21, Grp94-Apln, Grp94-Metrnl</i></p>	Positives
<p style="text-align: center;"><b>Brunissement-Brunissement</b></p> <p><i>Fgf21-Apln, Fgf21-Metrnl, Apln-Metrnl</i></p>	Positives

**Tableau 7 : Préadipocytes infectés à 0,25 MOI pendant 4 heures : corrélations significatives.** Les corrélations significatives (R proche de 1 et valeur de  $p \leq 0,05$ ) ont été calculées avec RStudio.

<p style="text-align: center;"><b>ERS-ERS</b></p> <p><i>Bip-Chop, Bip-Xbp1s, Bip-Atf4, Bip-Erdj4, Bip-Nqo1, Bip-Gadd34, Bip-Gclc, Bip-Herpud1, Bip-Grp94, Chop-Xbp1s, Chop-Atf4, Chop-Atf3, Chop-Erdj4, Chop-Nqo1, Chop-Gadd34, Chop-Herpud1, Xbp1s-Atf4, Xbp1s-Sel1l, Atf4-Atf3, Atf4-Erdj4, Atf4-Nqo1, Atf4-Gadd34, Atf4-Gclc, Atf4-Herpud1, Gclc-Herpud1, Gclc-Grp94, Atf3-Erdj4, Atf3-Nqo1, Atf3-Gadd34, Atf3-Hrd1, Atf3-Gclc, Atf3-Herpud1, Atf3-Grp94, Erdj4-Nqo1, Erdj4-Gadd34, Erdj4-Hrd1, Erdj4-Gclc, Erdj4-Herpud1, Erdj4-Grp94, Nqo1-Gadd34, Nqo1-Hrd1, Nqo1-Gclc, Nqo1-Herpud1, Nqo1-Grp94, Gadd34-Hrd1, Gadd34-Gclc, Gadd34-Herpud1, Gadd34-Herpud1, Gadd34-Grp94, Hrd1-Gclc, Hrd1-Herpud1, Hrd1-Grp94, Gclc-Herpud1, Gclc-Grp94, Herpud1-Grp94</i></p>	<p style="text-align: center;">Positives</p>
<p style="text-align: center;"><b>ERS-Brunissement</b></p> <p><i>Bip-Ucp1, Chop-Ucp1, Atf4-Ucp1, Atf3-Ucp1, Erdj4-Ucp1, Erdj4-Metrnl, Nqo1-Ucp1, Nqo1-Metrnl, Nqo1-Apln, Gadd34-Ucp1, Gadd34-Metrnl, Hrd1-Ucp1, Hrd1-Metrnl, Hrd1-Apln, Gclc-Ucp1, Herpud1-Ucp1, Herpud1-Metrnl, Grp94-Ucp1, Grp94-Metrnl</i></p>	<p style="text-align: center;">Positives</p>
<p style="text-align: center;"><b>Brunissement-Brunissement</b></p> <p><i>Apln-Metrnl</i></p>	<p style="text-align: center;">Positive</p>

**Tableau 8 : Prédipocytes infectés à 0,25 MOI pendant 6 heures : corrélations significatives.** Les corrélations significatives (R proche de 1 et valeur de  $p \leq 0,05$ ) ont été calculées avec RStudio.

<b>Virus-Brunissement</b> <i>IAV-Ucp1</i>	Positive
<b>ERS-ERS</b> <i>Bip-Erdj4, Bip-Sel1l, Bip-Gadd34, Bip-Hrd1, Bip-Gclc, Bip-Grp94, Erdj4-Sel1l, Erdj4-Nqo1, Erdj4-Gadd34, Erdj4-Hrd1, Erdj4-Gclc, Sel1l-Nqo1, Sel1l-Gadd34, Sel1l-Hrd1, Sel1l-Gclc, Nqo1-Hrd1, Gadd34-Hrd1, Gadd34-Gclc, Gadd34-Grp94, Gclc-Grp94</i>	Positives
<b>ERS-Brunissement</b> <i>Grp94-Fgf21</i>	Négative
<b>Brunissement-Brunissement</b> <i>Fgf21-Pgc1α, Apln-Metrnl</i>	Positives

**Tableau 9 : Prédipocytes infectés à 0,25 MOI pendant 24 heures : corrélations significatives.** Les corrélations significatives (R proche de 1 et valeur de  $p \leq 0,05$ ) ont été calculées avec RStudio.

*Corrélations avec l'ARN viral ?* Nous notons plusieurs corrélations entre la présence de l'ARN viral et l'expression de certains gènes du brunissement : *IAV-Ucp1* (positive, à 24H, 0,25 MOI), *IAV-Fgf21* (positive, à 6H, 1 MOI), *IAV-Apln* et *IAV-Metrnl* (négatives, à 6h, 1 MOI). Il existe également des corrélations entre la présence de l'ARN viral et l'expression de certains gènes de l'UPR (toutes négatives) : *IAV-Chop*, *IAV-Atf4*, *IAV-Gadd34*, *IAV-Grp94* (négatives, à 4h, 0,25 MOI), *IAV-Xbp1s*, *IAV-Atf4*, *IAV-Gclc*, *IAV-Grp94* (négatives, à 6h, 1 MOI).

*Corrélations entre l'UPR et le brunissement ?* Plusieurs corrélations entre l'UPR et le brunissement, notamment le gène *Ucp1* sont remarquables : *Bip-Ucp1*, *Chop-Ucp1*, *Atf4-Ucp1*, *Atf3-Ucp1*, *Erdj4-Ucp1*, *Nqo1-Ucp1*, *Gadd34-Ucp1*, *Hrd1-Ucp1*, *Gclc-Ucp1*, *Herpud1-Ucp1*, *Grp94-Ucp1* (positives, à 6h, 0,25 MOI), *Chop-Ucp1*, *Atf4-Ucp1*, *Atf3-Ucp1*, *Gclc-Ucp1* (positives, à 4h, 1 MOI), *Bip-Ucp1*, *Chop-Ucp1*, *Atf4-*

*Ucp1*, *Atf3-Ucp1*, *Erdj4-Ucp1*, *Sel1l-Ucp1*, *Nqo1-Ucp1*, *Hrd1-Ucp1*, *Herpud1-Ucp1*, *Grp94-Ucp1*, (positives, à 6h, 1 MOI), *Erdj4-Ucp1*, *Sel1l-Ucp1*, *Nqo1-Ucp1*, *Hrd1-Ucp1*, *Gclc-Ucp1*, *Grp94-Ucp1* (positives, à 24h, 1 MOI). Parmi ces corrélations (toutes positives), 16 concernent la voie PERK, 9 la voie ATF6 et 6 la voie IRE1.

Ainsi, les analyses corrélatives révèlent **1)** des corrélations entre la présence de l'ARN viral et le brunissement et entre la présence de l'ARN viral et des gènes de l'UPR (notamment de la voie PERK), et **2)** de nombreuses corrélations entre la voie PERK et les gènes du brunissement, lors de l'infection de préadipocytes par IAV.

Les résultats des expériences *in vivo* montrent une activation prédominante de la voie PERK dans le tissu adipeux sous-cutané des souris infectées par le virus de la grippe. Les expériences *in vitro* montrent une **activation des voies PERK (majoritaire) et IRE1 $\alpha$  (minoritaire) dans les préadipocytes** alors que seule la voie IRE1 $\alpha$  est activée par l'infection dans les cellules épithéliales pulmonaires. De manière intéressante, le traitement des préadipocytes par la tunicamycine, un inducteur chimique de stress du réticulum endoplasmique, conduit à l'activation des 3 voies UPR et une induction plus faible d'*Ucp1* que lors de l'infection par IAV. Nos résultats montrent également de nombreuses corrélations entre la présence de l'ARN viral, l'expression des gènes de la voie PERK, et l'expression des gènes liés au brunissement. Nos résultats, et des données récentes de la littérature (*cf.* Introduction sur le rôle de la voie PERK dans la thermogénèse), nous conduisent à émettre l'hypothèse que la voie PERK est responsable, au moins en partie, du brunissement du tissu adipeux blanc et des préadipocytes.

### 3) Rôle de la voie PERK dans le brunissement des préadipocytes, *in vitro*

#### a) Analyse de la région régulatrice du promoteur du gène *Ucp1*

Afin de déterminer si des facteurs de la voie PERK pourraient réguler l'expression d'*Ucp1*, nous avons analysé la séquence en amont du promoteur d'*Ucp1* (région régulatrice) à la recherche de potentiels sites de fixations spécifiques de facteurs de la

voie PERK (**Figure 60**) (travaux réalisés avec la collaboration du bio-informaticien Nicolas Loucheu). L'analyse a été réalisée sur le serveur ContraV3.

```
5kb upstream sequence from promoter UCP1 (chrom8 : 85.810,000 – 85.815,000)
AATTCCATGTGAA CGAATCTACCCTCACCCACTGGATCTGGGGACAGAAATATCTTCTTCTAGATG
TTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTCTGTTTGAATTGATTTTCCCCCTCCA TTGGCCTCAAACCCTATG
AGTTTCATTTTCC TAAATTGTTT ATGTCATCTTTCTGTCTTTTTCATCAAGTGCTACTGAAGAAGT
TTT TAGTCATA TAGGTATGTATGCCTCGGTATGTATATACCACATGTGTGAGGGTGCCCTGGAGG
CTAGACGAGGGCATTGGATGCCCTGAGGCTGGTATTGTAGATGGTTTTGAGCTAA CCAACTAGGAA
```

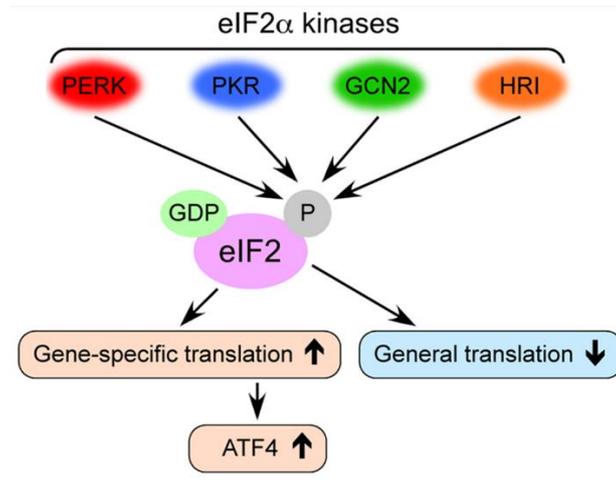
**Figure 60 : Identification de sites putatifs de fixation pour ATF4, ATF3 et CHOP dans la séquence régulatrice du promoteur du gène *Ucp1*.** La séquence de la région régulatrice du promoteur du gène *Ucp1* est représentée. Les sites potentiels de fixation des différents facteurs sont indiqués : en orange, le site de fixation de CHOP, en rose, le site de fixation d'ATF4, en bleu, le site de fixation d'ATF3, et en vert, les sites de fixation de C/EBP $\alpha$  (facteur adipogénique). Le site CARE (C/EBP-ATF *response element*) correspond à la juxtaposition d'un site C/EBP $\alpha$  (vert) et d'un site ATF (ici ATF4, en rose).

Des sites potentiels de fixation des facteurs ATF3, ATF4 et CHOP ont pu être identifiés dans la région régulatrice du promoteur du gène *Ucp1*. Un site CARE (C/EBP-ATF *response element* : site de fixation des facteurs C/EBP-ATF ; ayant pour séquence consensus XTTXCATCA) a également été trouvé. Les facteurs ATF4, ATF3, CHOP et C/EBP $\beta$  se fixent au site CARE des gènes cibles et répriment leur expression (Shan et al., 2009). Ceci montre que plusieurs facteurs de la voie PERK pourraient réguler l'expression du gène *Ucp1*.

Cependant, l'identification de sites putatifs devra être validée par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) suivi de PCR.

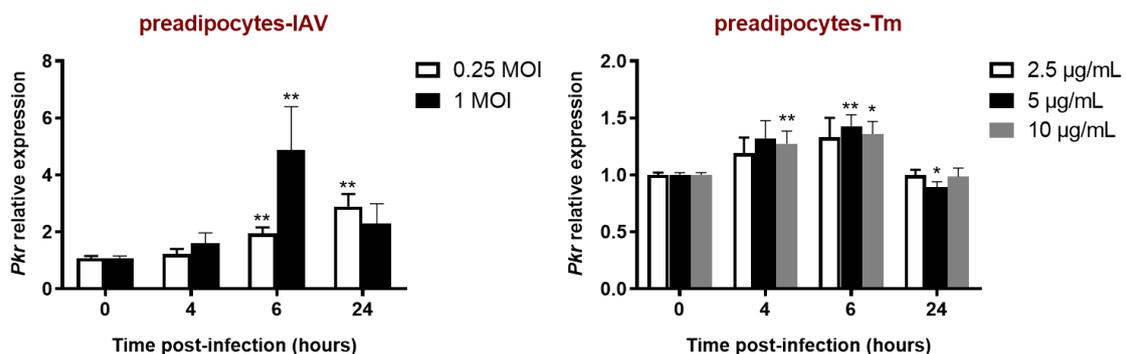
## **b) Inhibition de la voie PERK *in vitro***

Pour démontrer le rôle de la voie PERK dans le brunissement des préadipocytes induit par l'infection par IAV, nous avons procédé à des expériences d'inhibition par utilisation de siRNAs spécifiques. Les siRNA visent l'extinction de l'expression de *Perk*, d'*Atf4* (voie PERK) et de *Pkr*. PKR est l'une des kinases qui peuvent phosphoryler eIF2 $\alpha$  (élément central de la voie PERK) (**Figure 61**), et est connue pour être activée lors de l'infection par IAV. L'activation de PKR lors de l'infection pourrait interférer avec l'activation de la voie par PERK et nous induire en erreur lors de l'analyse des résultats. C'est pourquoi nous avons inclus un siRNA ciblant *Pkr* dans nos expériences d'inhibition.



**Figure 61 : Les différentes kinases qui phosphorylent eIF2α.** GCN2 : *general control non-derepressible-2 kinase*, HRI : *heme-regulated inhibitor kinase*. Modifié à partir de Ohno, 2014.

De plus, nous avons vérifié l'induction de l'expression de *Pkr* dans nos modèles de préadipocytes infectés par IAV (0,25 et 1 MOI pendant 4, 6 et 24 heures), et de préadipocytes traités à la tunicamycine (2,5, 5 et 10 µg/mL pendant 4, 6 et 24 heures) (**Figure 62**). L'expression de *Pkr* est induite lors de l'infection des préadipocytes par IAV (à 6 et 24 heures) alors qu'on observe qu'une très faible augmentation de son expression dans les préadipocytes traités à la tunicamycine. Ceci conforte que PKR pourrait interférer avec PERK lors de l'infection de préadipocytes par IAV (et non dans le modèle de traitement à la tunicamycine).

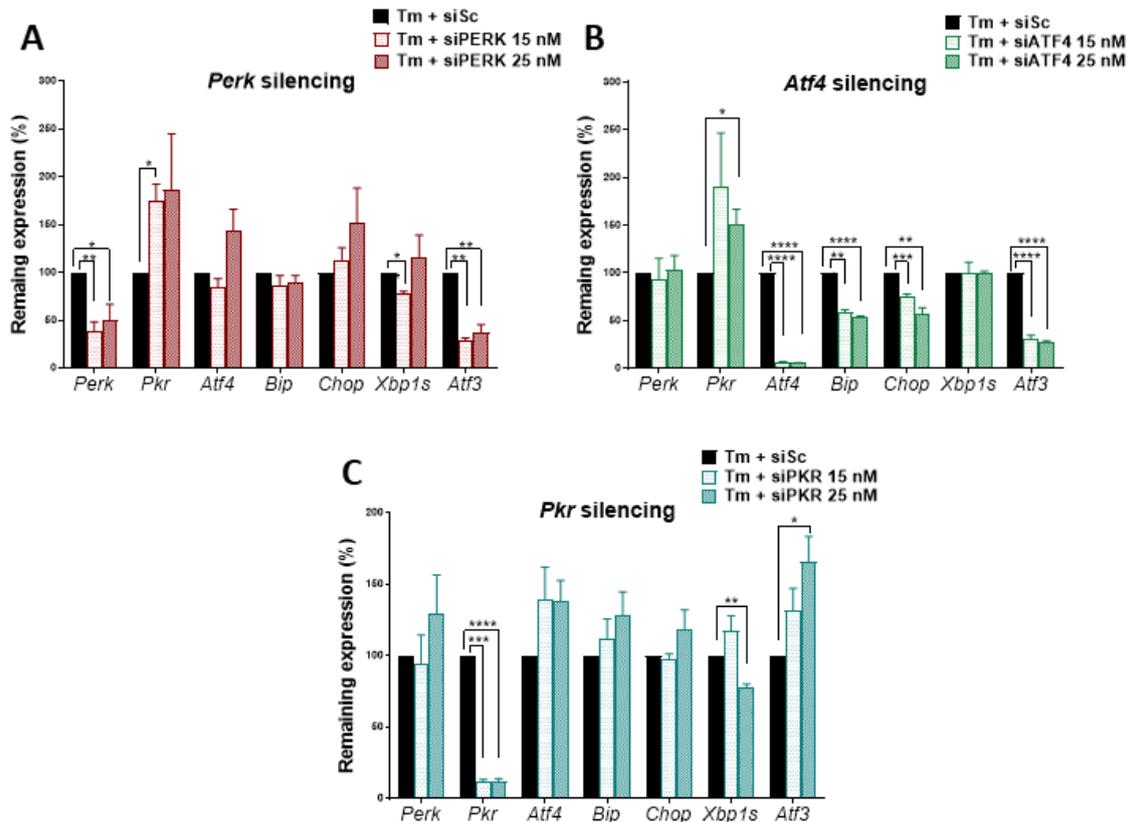


**Figure 62 : Expression de *Pkr* dans les préadipocytes infectés par IAV ou traités à la tunicamycine.** Quantification de l'expression du gène *Pkr* (RT-qPCR) dans des préadipocytes infectés (0,25 et 1 MOI) (panel de gauche) ou traités à la tunicamycine (0, 2,5, 5 et 10 µg/mL) (panel de droite). L'analyse a été réalisée 4, 6 ou 24 heures après traitement/infection. Les histogrammes représentent la moyenne des expressions (normalisées à celle du gène de ménage *Eef2*, et relativisées par rapport à l'expression au temps 0 d'infection ou au traitement à 0 µg/mL). Analyse réalisée par un test de Mann-Whitney, \* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , n=6.

## Inhibition de la voie PERK dans le modèle de traitement à la tunicamycine

Afin de valider l'efficacité des siRNAs, nous avons utilisé le modèle de préadipocytes traités à la tunicamycine (10 µg/mL, 6 heures de traitement), dans lequel les 3 branches de l'UPR (PERK, IRE1α et ATF6) sont activées.

Les préadipocytes ont été traités avec les siRNAs 72 heures avant le traitement à la tunicamycine. Deux doses de siRNAs ont été testées : 15 et 25 nM (**Figure 63**).

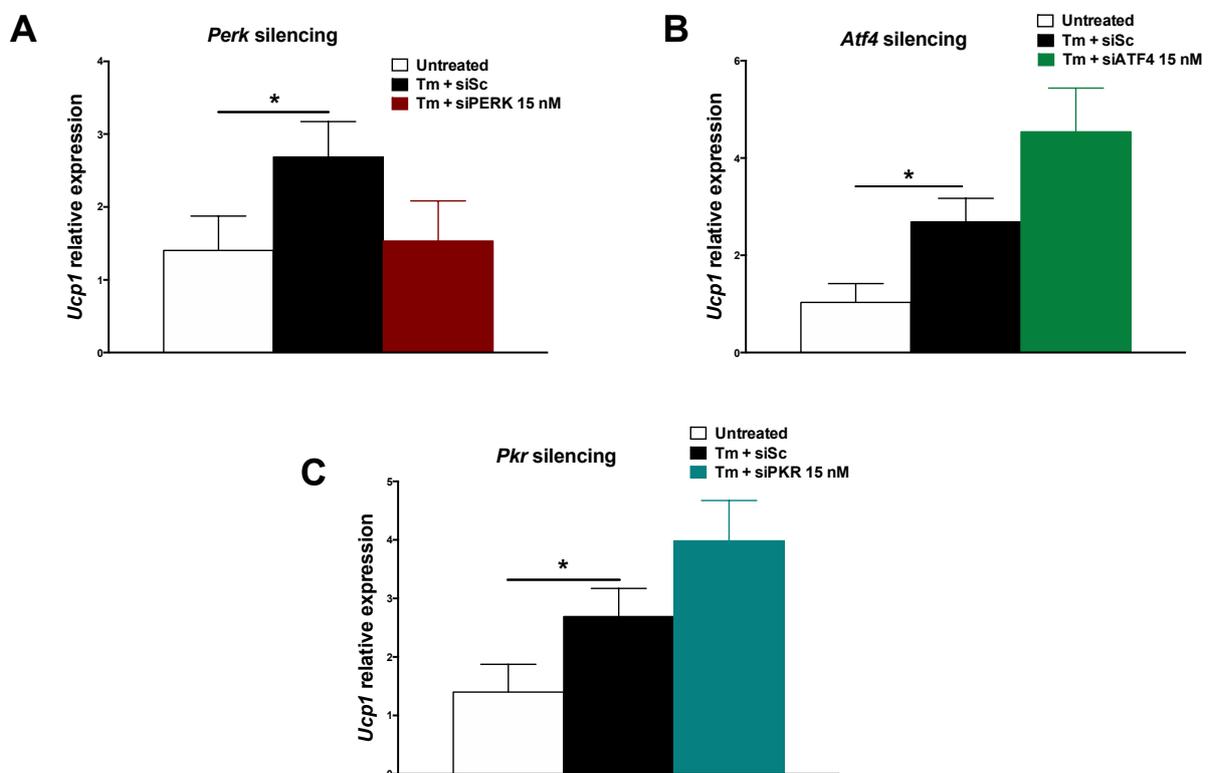


**Figure 63 : Efficacité des siRNA.** L'efficacité des siRNA a été évaluée pour deux concentrations de siRNAs (15 et 25 nM). Les préadipocytes ont été traités avec les siRNAs 72 heures avant le traitement à la tunicamycine (10 µg/mL pendant 6 heures). L'expression des gènes ciblés et des autres gènes de l'UPR a ensuite été évaluée par RT-qPCR (l'expression est normalisée à celle du gène de ménage *Eef2* et relativisée par rapport à celle des cellules non traitées). Résultats préliminaires, n=3 pour siPerk, n=6 pour siAtf4 et siPkr. siSC = siScrambled (contrôle siRNA), *silencing* = inhibition. Analyse statistique réalisée par un t test, \* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

L'expression d'*Atf4* est réduite de 93,6 % ( $\pm 1,3$ ) avec le siAtf4 à la dose de 15 nM et de 94,4 % ( $\pm 0,6$ ) à la dose de 25 nM. L'expression de *Perk* est réduite de 61,9 % ( $\pm 17,7$ ) avec le siPerk à la dose de 15 nM et de 50,3% ( $\pm 29,8$ ) à la dose de 25 nM. L'expression de *Pkr* est réduite de 88,4 % ( $\pm 3,6$ ) avec le siPkr à la dose de 15 nM et

de 87,7% ( $\pm 2,9$ ) à la dose de 25 nM. Les deux doses de siRNA ayant fonctionnées (à confirmer par Western Blot), nous avons poursuivi les expériences en utilisant la dose de 15 nM pour chaque siRNA. Nous pouvons observer que le siAtf4 réduit également l'expression d'Atf3 et de Chop, comme attendu. Nous constatons de plus que le siPerk réduit l'expression d'Xbp1s et Atf3, et le siPkr réduit l'expression d'Xbp1s (non attendu), démontrant des interactions entre les différentes voies.

L'efficacité de nos siRNAs étant validée, nous avons ensuite étudié l'impact de ces inhibitions/extinctions spécifiques sur l'expression d'Ucp1 dans ce modèle de préadipocytes traités à la tunicamycine (**Figure 64**).



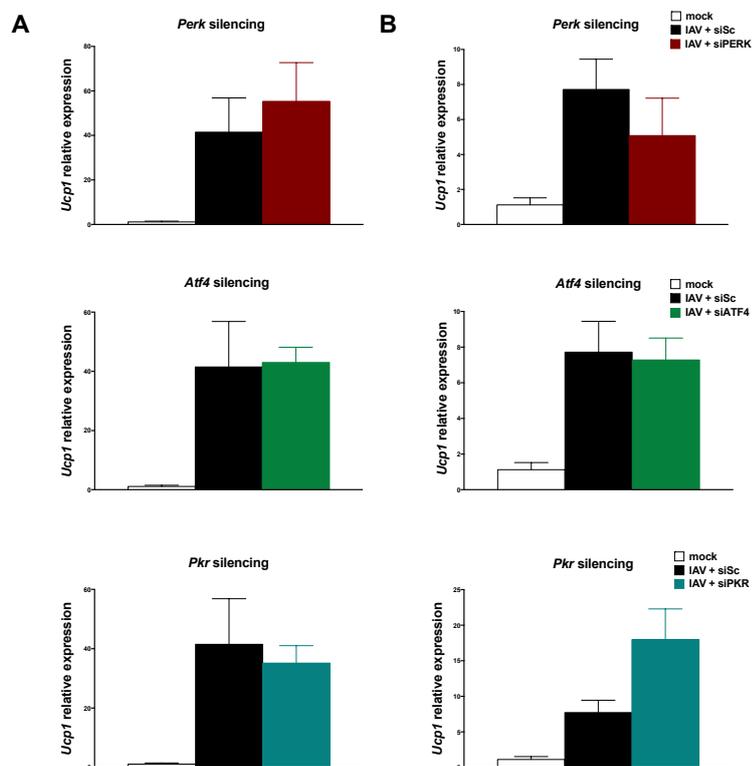
**Figure 64 : Impact de l'inhibition de facteurs de la voie PERK sur l'expression du gène *Ucp1*, dans le modèle de préadipocytes traités à la tunicamycine.** L'expression du gène *Ucp1* est mesurée par RT-qPCR (normalisée à celle du gène de ménage *Eef2* et relativisée par rapport aux cellules non traitées (*untreated*)) dans les préadipocytes traités avec les siRNAs siPerk (A), siAtf4 (B) et siPkr (C), 72 heures avant le traitement à la tunicamycine (10  $\mu$ g/mL pendant 6 heures). Analyse statistique réalisée par un test de Mann-Whitney, \* =  $p \leq 0.05$ , n=3 pour siPerk, n=6 pour siAtf4 et siPkr. siSC = siScrambled (contrôle siRNA), *silencing* = inhibition.

Nous vérifions que le traitement des préadipocytes par la tunicamycine, induit l'expression d'*Ucp1* (cf. **Figure 58**, page 127). De manière intéressante, le siPerk tend à réduire l'expression du gène *Ucp1* (pour le moment, nous sommes à n=3 pour le groupe Tm/siPerk), alors que, à l'inverse, le siPkr et le siAtf4 semblent augmenter l'expression du gène *Ucp1*. Ces résultats suggèrent que PERK serait capable d'induire en partie *Ucp1* mais que son effet pourrait passer par un autre facteur qu'ATF4, en tout cas dans le modèle des préadipocytes traités à la tunicamycine, dans lequel toutes les voies UPR sont activées.

### Inhibition de la voie PERK lors de l'infection par IAV

Pour déterminer le rôle de la voie PERK dans le brunissement des préadipocytes lors de l'infection par IAV, nous avons utilisé les siRNAs ciblant la voie PERK (siPerk, siAtf4, et siPkr en contrôle). Les préadipocytes ont été traités 72 heures avec les siRNAs (15 nM) avant d'être infectés par IAV (1 MOI, pendant 6 ou 24 heures).

La **Figure 65** présente les résultats (à compléter car nous n'avons pour le moment que n=3 pour chaque condition de traitement) de l'étude de l'impact de l'extinction/inhibition des facteurs de transcription de la voie PERK sur l'expression du gène *Ucp1* lors de l'infection de préadipocytes par le virus influenza.



**Figure 65 : Impact de l'inhibition de facteurs de la voie PERK sur l'expression du gène *Ucp1* par les préadipocytes infectés par IAV.** L'expression du gène *Ucp1* est mesurée par RT-qPCR (normalisée à celle du gène de ménage *Eef2* et relativisée par rapport aux cellules non traitées) dans les préadipocytes 6 heures (A) ou 24 heures (B) après infection (1 MOI) et 72 heures après traitement avec les siRNAs (15 nM). L'analyse statistique a été faite par un test de Mann-Whitney, n=3. siSC = siScrambled (siRNA contrôle), silencing = inhibition.

Pour les 3 siRNAs testés, aucun effet n'est observé sur l'expression d'*Ucp1* après 6 heures d'infection.

Après 24 heures de traitement par les siRNAs, bien que les analyses doivent être complétées pour avoir au moins  $n = 6$  par groupe et pouvoir définir la significativité statistique de nos résultats, nous constatons que le siAtf4 n'a aucun effet sur l'expression d'*Ucp1*, ce qui peut paraître surprenant compte-tenu du rôle répresseur sur l'expression d'*Ucp1* rapporté dans la littérature pour ATF4. De manière intéressante, l'inhibition de *Perk* semble diminuer l'expression d'*Ucp1* et, à l'inverse, l'inhibition de *Pkr* semble induire une augmentation de l'expression d'*Ucp1*.

Ces résultats pourraient indiquer que lors de l'infection des préadipocytes par IAV, l'expression du gène *Ucp1* (et donc, l'induction de la thermogénèse) pourrait être sous le contrôle opposé de PKR (effet répresseur) et de PERK (effet activateur).

Il est à noter que d'autres facteurs de la voie PERK ont été décrits comme pouvant réguler l'expression d'*Ucp1* (cf. page 90), c'est pourquoi d'autres siRNAs ciblant la voie PERK seront testés.

Les résultats des expériences *in vitro* confortent les résultats obtenus *in vivo*. L'infection par le virus influenza ([H3N2]) induit un stress du réticulum endoplasmique et l'activation de la réponse UPR dans les poumons et les SCATs de souris infectées, ainsi que dans les préadipocytes infectés *in vitro* ; la voie PERK étant prédominante dans les SCATs et les préadipocytes. Les analyses *in silico* de la région régulatrice du promoteur d'*Ucp1* ont révélé des sites potentiels de fixation des facteurs de la voie PERK qui pourraient ainsi réguler l'expression d'*Ucp1*, ATF4 ayant déjà été identifié comme un répresseur. Les expériences d'inhibition de la voie PERK par différents siRNAs indiquent que PERK induirait, au moins en partie, l'expression d'*Ucp1* (dans le modèle de traitement des préadipocytes à la tunicamycine et dans le modèle d'infection des préadipocytes par IAV), et que cet effet ne passerait pas par l'intermédiaire d'ATF4. Ceci suggère l'existence d'une voie alternative à la voie PERK-ATF4 qui serait responsable de l'induction de la thermogénèse dans les préadipocytes infectés par IAV.

La rédaction de l'article est en cours (soumission prévue en Mars 2022).

---

## Partie 2 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs

---

### I. Introduction et rationnel de l'étude

#### 1) Coronavirus SARS-CoV-2 et COVID-19

##### a) Les maladies infectieuses émergentes

Bien que Charles Nicolle en ait posé les prémices dès 1930 dans son livre « *Naissance, vie et mort des maladies infectieuses* », le concept d'émergence est assez contemporain (Grmek, 1993; Nicolle, 1930).

- En 1993, S. S. Morse définit les maladies infectieuses émergentes comme des « *infections récemment apparues dans une population\**, ou qui ont existé, mais dont l'incidence\*\* ou la zone géographique\*\*\* augmente rapidement » (Morse, 1993).

(\* comme le VIH au début des années 1980, \*\* comme le virus Ébola ou le virus de la fièvre jaune, \*\*\* comme le virus *West Nile*, apparu aux États-Unis en 1999).

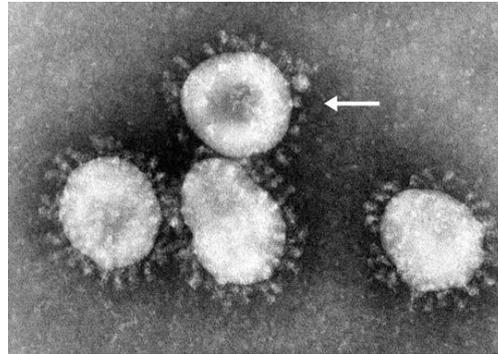
- En 1996, l'OMS (organisation mondiale de la santé) propose une définition plus large des maladies infectieuses émergentes : « *les maladies transmissibles émergentes et ré-émergentes sont des infections nouvelles ou réapparues ou devenues résistantes aux médicaments ou dont l'incidence a augmenté au cours des dix dernières années ou risque d'augmenter dans un avenir proche* » (OMS, 1996b)

- Actuellement, le concept d'émergence dépasse le cadre des maladies infectieuses pour englober des maladies non infectieuses dont l'incidence augmente et menace la santé publique, comme le diabète de type 2 ou l'obésité (Prentice, 2006).

Un nouveau coronavirus, initialement nommé 2019-nCoV puis SARS-CoV-2, a récemment émergé (2019) (Andrews et al., 2020; Huang et al., 2020). Le virus SARS-CoV-2 est l'agent responsable de cette nouvelle maladie infectieuse respiratoire appelée COVID-19 (CORonaVIRus Disease 19) au rythme de laquelle vit actuellement la planète.

## b) SARS-CoV-2, agent de la COVID-19

Les coronavirus (CoV) sont des virus à ARN simple brin (26 à 32 kb) de sens positif, enveloppés, appartenant à la famille des *Coronaviridae*. Ces virus doivent leur nom à la « couronne » que forment certaines de leurs protéines de surface (**Figure 66**) (Chathappady House et al., 2021).



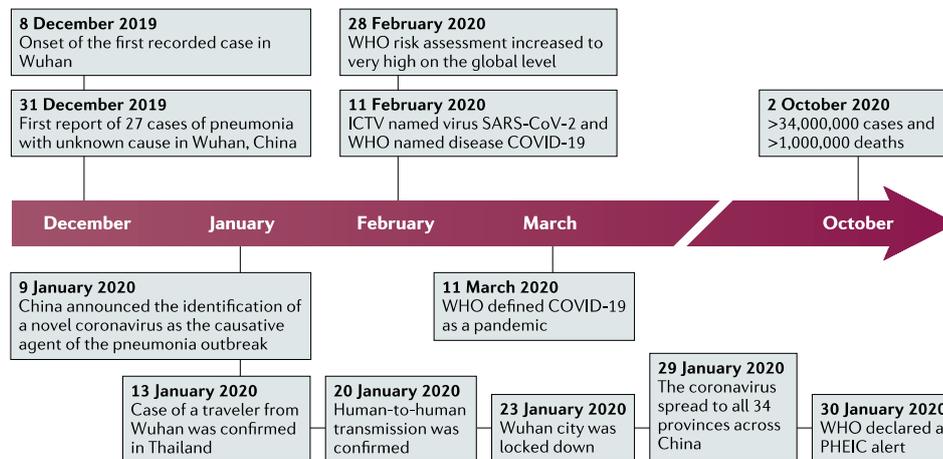
**Figure 66 : Image de coronavirus en microscopie électronique.** Certaines protéines de surface sont organisées en couronne (flèche). Photo de F. Murphy (CDC, n° identification 4814 (<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=15523>)).

Il existe de nombreux sous-types de coronavirus infectant différentes espèces animales, dont l'Homme.

Sur le plan médical, on distingue deux groupes de coronavirus qui infectent l'Homme : **(1)** les coronavirus **peu pathogènes** (on en dénombre quatre actuellement), qui circulent en France chaque année, à l'automne, pendant tout l'hiver et au printemps, puis disparaissent pendant l'été. Pour ces virus comme pour les autres virus saisonniers (grippe, rhume, gastro-entérite...), les raisons de cette « trêve estivale » sont mal connues, et **(2)** les coronavirus **hautement pathogènes**, dont on ne connaît actuellement que trois représentants :

- Le SARS-CoV-1 (qui a émergé en Chine en 2002), ou coronavirus à l'origine d'un syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), (10% mortalité) (Peiris et al., 2003).
- Le MERS-CoV (qui a émergé en Arabie Saoudite en 2012), ou coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS), (30% mortalité) (Zaki et al., 2012).
- Le SARS-CoV-2 (qui a émergé en Chine en 2019 et s'est très rapidement disséminé (**Figure 67**)), l'agent causal de la COVID-19, maladie à laquelle la planète fait face actuellement (Huang et al., 2020) (taux de létalité : Chine 4%,

Etats-Unis 1,2%, France 0,6%, monde 1,4% d'après <https://coronavirus.jhu.edu/data/mortality> et <https://www.worldometers.info/coronavirus/> à la date du 05/02/2022) .



**Figure 67 : Dates marquantes de la progression de l'infection par SARS-CoV-2.** ICTV = Comité international de taxonomie des virus. Tiré de Hu et al., 2021.

La COVID-19 est une maladie très contagieuse. Dans la majorité des cas, la période d'incubation est de 4 à 5 jours (jamais moins de 2 jours ni plus de 14 jours) (Lauer et al., 2020). Les formes cliniques de la COVID-19 s'étendent des formes asymptomatiques aux formes graves justifiant une prise en charge en réanimation (Gandhi et al., 2020; Gao et al., 2021; He et al., 2021; Wu et al., 2020b; Yao et al., 2020a). Les infections asymptomatiques, ou présentant des signes cliniques modérés (toux, fièvre, dyspnée, pharyngite, parfois associées à des céphalées, myalgies, ainsi qu'à certains troubles digestifs et/ou à l'ano-/hypo-smie et l'a-/hypo-geusie), sont les plus fréquentes. Environ 15% des patients COVID-19 présentent des signes cliniques plus sévères, nécessitant une hospitalisation, et 5% des patients présentent une forme critique (détresse respiratoire) justifiant l'admission en réanimation. Une partie des patients admis en réanimation devra être intubée pour conserver une chance de guérison.

## 2) COVID-19 et tissus adipeux blancs : données bibliographiques

Comme pour la grippe, l'âge et l'obésité représentent des facteurs de risque de complications de la COVID-19 (Bonanad et al., 2020; Caussy et al., 2020; Kassir, 2020; Simonnet et al., 2020). Ainsi que nous l'avons détaillé dans l'Introduction

générale, le tissu adipeux subit de profonds changements lors du développement de l'obésité. Une autre condition, physiologique celle-ci, est également associée à des altérations quantitatives et qualitatives du tissu adipeux blanc, il s'agit du vieillissement. En effet, lors du vieillissement la masse du tissu adipeux sous-cutané diminue tandis que celle du tissu adipeux viscéral augmente, et la cellularité et le profil sécrétoire des tissus adipeux sont modifiés au profit d'un profil de type proinflammatoire (Frasca and Blomberg, 2020; Kotani et al., 1994; Mancuso and Bouchard, 2019). A cela s'ajoute l'apparition de cellules sénescents au sein du tissu adipeux et la perte des capacités de renouvellement des cellules progénitrices (Karagiannides et al., 2001). Toutes ces modifications du tissu adipeux blanc liées à l'âge participent à l'altération de l'homéostasie générale ainsi qu'à l'inflammation associées au vieillissement (*inflammaging*) (Zamboni et al., 2021).

Principalement connus pour leur capacité à infecter les voies respiratoires supérieures et inférieures, les coronavirus peuvent également infecter d'autres tissus/organes, tels que le cerveau (Crunfli et al., 2021; Song et al., 2021) ou les tissus adipeux blancs (Martínez-Colón et al., 2021; Reiterer et al., 2021; Zickler et al., 2021; Olivio et al., MS soumis, communication personnelle du Dr. Christine Bourgeois). C'est notamment le cas pour SARS-CoV-2. En effet, les adipocytes expriment les facteurs (identifiés à ce jour) permettant l'entrée du virus dans les cellules : ACE2 et TMPRSS2 (Baughn et al., 2020; Gupte et al., 2008; Li et al., 2020b) . Ci-dessous, les principales données issues de la littérature concernant l'infection du tissu adipeux blanc par SARS-CoV-2, chez l'Homme, le hamster Syrien et le macaque :

# Reiterer et collaborateurs sont les premiers à rapporter que SARS-CoV-2 peut infecter des adipocytes primaires humains (issus de mastectomie) ainsi que des adipocytes murins différenciés à partir d'une lignée de préadipocytes, *in vitro*. Dans ces 2 modèles, l'infection des adipocytes entraîne une forte réduction de la production d'adiponectine, une adipokine proinflammatoire. Dans cette publication, les auteurs montrent également que le virus se réplique dans les tissus adipeux blancs de hamsters infectés par SARS-CoV-2 ; induisant une réponse antivirale, ainsi qu'un état inflammatoire et insulino-résistant (Reiterer et al., 2021).

# Martinez-Colón et collaborateurs isolent, à partir de différents dépôts de tissus adipeux blancs (sous-cutané, viscéral, péricardique, et épicaudique) prélevés chez des

personnes obèses non infectées, les adipocytes matures et les cellules de la fraction stromale vasculaire (SVF). Ils montrent que les adipocytes matures et les cellules de la SVF sont permissifs à l'infection par SARS-CoV-2, *in vitro*. Au sein de la SVF, ces auteurs montrent que ce sont les macrophages inflammatoires qui sont les cellules cibles de l'infection. De manière intéressante, les préadipocytes, quoique non permissifs à l'infection par SARS-CoV-2, adoptent un profil proinflammatoire (Martínez-Colón et al., 2021).

# Plus récemment, Zickler et collaborateurs montrent la présence de SARS-CoV-2 dans les tissus adipeux blancs de personnes en surpoids ou obèses, décédées de COVID-19. De plus, les auteurs confirment que les adipocytes matures, et non les préadipocytes ou les adipocytes en cours de différenciation, sont permissifs à l'infection par SARS-CoV-2. D'ailleurs, ils montrent une augmentation de l'expression d'ACE2 au cours de la différenciation adipocytaire. De manière très intéressante, ces auteurs démontrent que le processus de formation des gouttelettes lipidiques est critique pour l'infection par SARS-CoV-2, et que l'infection impacte le métabolisme lipidique (tissulaire et systémique) chez l'Homme et dans le modèle du hamster Syrien (Zickler et al., 2021). Nous verrons, lors de la Discussion des résultats que nous avons obtenus, que les observations faites par Zickler *et al.* sont capitales.

# Enfin, un travail réalisé dans un modèle de COVID-19 chez des primates-non-humains (en l'occurrence le macaque), identifie également la présence de SARS-CoV-2 dans le tissu adipeux blanc sous-cutané (et non dans le tissu adipeux viscéral ou épigastrique) des animaux infectés (communication personnelle du Dr. Christine Bourgeois).

Ainsi, l'objectif de notre étude a été de comparer l'impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs (sous-cutané et viscéral) de hamsters jeunes adultes ou âgés.

## II. Matériels et méthodes

### 1) Animaux, virus et protocole d'infection

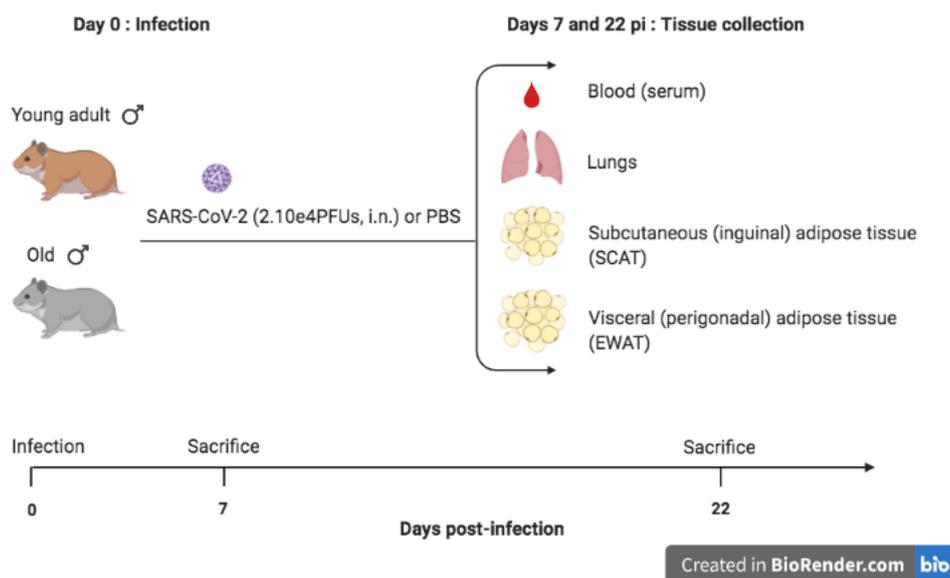
Les hamsters dorés, ou hamsters syriens (*Mesocricetus auratus*), mâles, âgés de 2 mois (hamsters jeunes adultes) ou de 24 mois (vieux hamsters) reçoivent une

alimentation standard pour rongeur. La souche BetaCoV/France/IDF0372/2020 du SARS-CoV-2 a été fournie par le Centre national de référence pour les virus respiratoires hébergé par l'Institut Pasteur de Paris. Les animaux sont infectés par voie intra-nasale avec  $2 \times 10^4$  virus (TCID<sub>50</sub>). Les animaux contrôles reçoivent le même volume de PBS.

*Nota bene* : Les expériences ont été réalisées dans le laboratoire de Biosécurité de niveau 3 (P3) de l'Institut Pasteur de Lille, en respect des réglementations locales, nationales et internationales concernant l'expérimentation animale.

## 2) Procédure expérimentale

Durant toute la procédure expérimentale, les poids corporels ont été régulièrement relevés. Aux jours 0, 7 et 22 post-infection, le sang a été prélevé au niveau du sinus rétro-orbital puis, après sacrifice des animaux, les poumons et les tissus adipeux blancs (le dépôt sous-cutané (inguinal) et le dépôt viscéral (épididymal)) ont été récupérés. La moitié des tissus a été fixée pour analyses histologiques, l'autre moitié a été immédiatement congelée dans l'azote liquide puis entreposée à  $-80^{\circ}\text{C}$ . La procédure expérimentale est présentée **Figure 68**.



**Figure 68 : Procédure expérimentale de l'étude de l'impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs.** Des hamsters dorés (mâles) jeunes adultes (*young adult*) ou âgés (*old*) sont infectés ou non par SARS-CoV-2 ( $2 \times 10^4$ , voie intra-nasale). Les animaux sont pesés régulièrement. Aux jours 0, 7 et 22, le sang est prélevé ainsi que les poumons et les tissus adipeux blancs. SCAT = tissu adipeux blanc sous-cutané, EWAT = tissu adipeux blanc viscéral. Schéma créé à l'aide de BioRender.com.

### 3) Analyse quantitative de l'expression de gènes dans les poumons et les tissus adipeux blancs

La quantification de l'ARN du virus SARS-CoV-2 est réalisée par RT-PCR en une seule étape en utilisant le mélange réactionnel TaqMan Takyon™ Low ROX Mastermix (Eurogentec) avec des amorces et une sonde, spécifiques du gène viral *E* (Séquence de l'amorce sens : 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3', séquence de l'amorce anti-sens : 5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3', séquence de la sonde : FAM-ACACTAGCCATC-CTTACTGCGCTTCG-MGB (*minor groove binder*)). Un gène synthétique contenant le gène *E* du virus SARS-CoV-2 (position 26269-26381) a été utilisé pour établir la courbe standard. Pour la quantification de l'expression des autres gènes par RT-qPCR, la technologie SYBR-Green a été utilisée. Les séquences des amorces sont présentées dans le **Tableau 10**. Les niveaux relatifs d'ARNm sont exprimés en utilisant la formule  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .

Gène	Séquence sens	Séquence anti-sens
<i>Mx1</i>	GGTCTGGAACACTTGGGGAG	GGTCTGGAACACTTGGGGAG
<i>Lipe</i>	GCATTGTGCCCTGCTCGGTT	CAGTGACGCAGAGGTTGCCG
<i>Pnpla2/3</i>	GCAGGGCTACAGAGACGGACT	TTTCCTGGGGGACAACCGGG
<i>Fasn</i>	TCAAGACTACACACCACGGC	CACTGCCGTCTTCAGTCCTT
<i>Acab</i>	GGACAGCTGAAGGCCCGAGA	CCAGCATGTGGCCTGGTGTG
<i>Cpta1</i>	CGAAAGTTGGACCGTGAGGA	ATCGTGGTAGAGCCAGACCT
<i>Acadvl</i>	GCAGGCGGGACGTAAGAGGA	CCGCCCCACACTCGGAGTTA
<i>Scd1</i>	ACGGGAGAAGCAGAAGACCGT	CCTGGTAGCTGGGGTCTGTGT
<i>Fads6</i>	GAAGGTGCCGTGCCTCAACC	AACGCTCGAGAGCGACCAGT
<i>Cd3</i>	AGGGAACGGCGAAAGTATGG	ACAGTTCTGGCACATTCGGT
<i>Cd4</i>	TCCCACTCCGCTCAAGATA	TGGCGCCGTTGGTGTC
<i>Cd8</i>	TCGTCTGCAACCAGCTAAG	GGGTGACCACCTTCTTAGGC
<i>Cd11b</i>	CCCGTCGAGAGCTTGATAACC	AGTGTGCTGATATCGAGGCG
<i>Cd11c</i>	GAGGCCTCTGCTCTTCACTC	AAGAAACAAACGCCGTCAGC
<i>Ifng</i>	TGTTGCTCTGCCTCACTCAGG	AAGACGAGGTCCCCTCCATTC
<i>Il10</i>	GGTTGCCAAACCTTATCAGAAATG	TTCACCTGTTCCACAGCCTT
<i>Il1b</i>	GAAGTCAAAACCAAGGTGGAGTTT	TCTGCTTGAGAGGTGCTGATGT
<i>P21</i>	AGCGATATTGTTCCGAGGCA	CTCTTGCAAAGACCAGCCG
<i>P16</i>	ACA GTA TCT ACG TGC GGC TG	TGT CTG GGC AGA AGT TACGC

**Tableau 10 : Séquences des amorces (sens et anti-sens) utilisées dans l'étude.**

#### 4) Histologie et histomorphométrie des tissus adipeux blancs

Les échantillons de tissus adipeux blancs (sous-cutané (inguinal) SCAT) et viscéral ((épididymal) EWAT) sont fixés (paraformaldéhyde 4%), inclus en paraffine, coupés (5µm) puis colorés (hématoxyline/éosine). L'évaluation du nombre et de la taille des adipocytes est faite par analyse morphométrique.

#### 5) Quantification des facteurs sanguins

Les taux sanguins de leptine, adiponectine, IL-6, TNF $\alpha$  et IL-1b sont quantifiés grâce à l'utilisation de trousse commerciales spécifiques (LSBio et MyBioSource). La glycémie est mesurée avec l'aide d'un glucomètre et de bandelettes réactives (Roche).

#### 6) Analyses statistiques

Les valeurs sont présentées individuellement, ainsi que les moyennes. Les analyses statistiques sont faites grâce au logiciel *GraphPad Prism* (V9). Un test Mann-Whitney U est utilisé pour comparer deux groupes. Les comparaisons entre plus de 2 groupes utilisent un test non paramétrique ANOVA Kruskal-Wallis. Les valeurs de *p* inférieures à 0.05 sont considérées comme indiquant une différence significative.

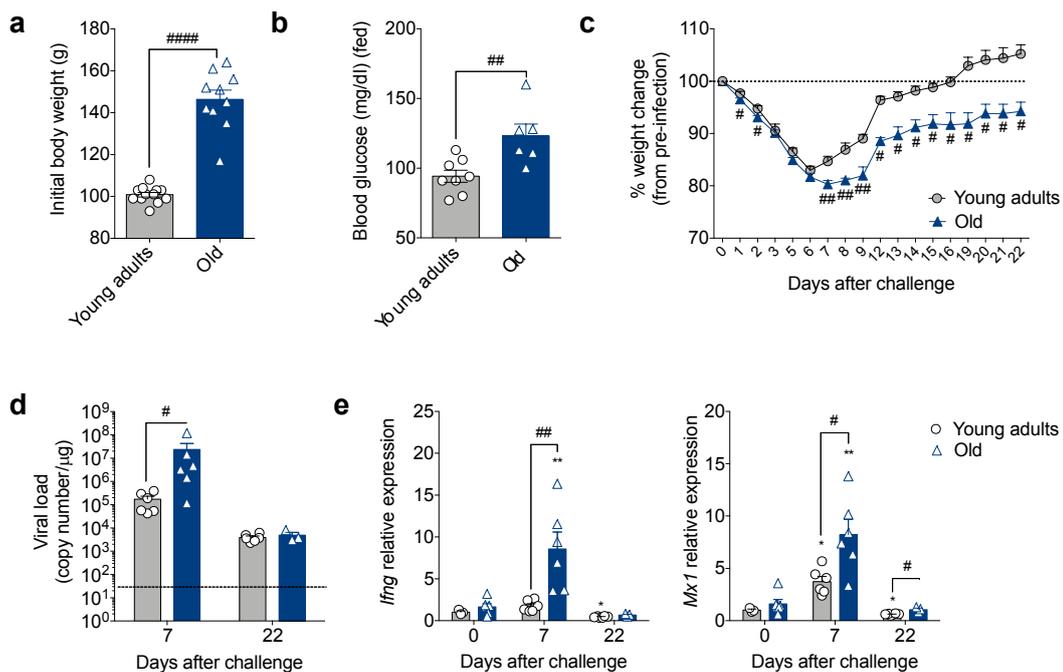
### III. Résultats

#### 1) Impact de l'âge sur la sévérité de l'infection par SARS-CoV-2

Plusieurs modèles animaux permettant de comprendre la pathologie liée à l'infection par le virus SARS-CoV-2 ont été décrits : souris, rats, porcs, furets, hamsters et primates-non-humains (Kim et al., 2020; Muñoz-Fontela et al., 2020; Roberts et al., 2005; Schlottau et al., 2020). Les souris (sauvages) ne sont pas permissives à l'infection par SARS-CoV-2 car l'un des récepteurs permettant l'entrée du virus dans les cellules (ACE2) a peu d'affinité pour la protéine Spike (Wan et al., 2020; Zhou et al., 2020). Des modèles de souris humanisées, immunodéprimées ou génétiquement modifiées sont actuellement en cours d'étude (Rathnasinghe et al., 2020; Sefik et al., 2021; Sun et al., 2021). C'est ainsi que le rongeur actuellement le plus utilisé dans les recherches sur la COVID-19 est le modèle du hamster doré (ou hamster syrien), qui possède un récepteur ACE2 avec une affinité similaire à celui présent chez l'Homme (Rosenke et al., 2020). Il est actuellement admis que le

hamster permet de reproduire la plupart des manifestations cliniques de la COVID-19 humaine (Chan et al., 2020a, 2020b; Imai et al., 2020; Sia et al., 2020).

Comme le montre la **Figure 69**, comparativement aux animaux jeunes adultes, les hamsters âgés ont un poids corporel (**Figure 69a**) et une glycémie (non à jeun, **Figure 69b**) plus élevés. Après infection par SARS-CoV-2, on constate que les 2 groupes d'animaux présentent des pertes de poids comparables (en %), avec un maximum de perte de poids observé au 7<sup>ième</sup> jour d'infection. Cependant, contrairement aux jeunes adultes, les animaux âgés n'ont toujours pas regagné leur poids initial au jour 22 post-infection (**Figure 69c**). La plus grande morbidité (reprise de poids corporel retardée) chez les animaux âgés est associée à une charge virale pulmonaire significativement plus élevée (**Figure 69d**) ainsi qu'à une réponse antivirale pulmonaire plus importante (**Figure 69e**), à J7 post-infection, comparativement aux animaux plus jeunes.



**Figure 69 : Paramètres cliniques associés à l'infection par SARS-CoV-2 chez des hamsters jeunes adultes vs. âgés.** Des hamsters dorés jeunes adultes (*young adult*) ou âgés (*old*) sont infectés par SARS-CoV-2. **a)** Poids corporels des hamsters jeunes adultes vs. âgés, avant infection (g). **b)** Taux de glucose sanguin des hamsters jeunes adultes vs. âgés, avant infection (mg/dl). **c)** Évolution des poids corporels des hamsters jeunes adultes vs. âgés au cours de l'infection (% par rapport au poids initial). **d)** Charge virale pulmonaire des hamsters jeunes adultes vs. âgés (RT-qPCR gène viral *E*) (nombre de copies/mg). La ligne pointillée indique la limite de détection. **e)** Expression des gènes impliqués dans la réponse antivirale. n = 6-7 par groupe, sauf pour J22 âgés : n = 3. Symbole \* = effet de l'infection ; symbole # = effet de l'âge. **a), b), d), e)** test de Man-Whitney, **c)** test de Kruskal-Wallis.

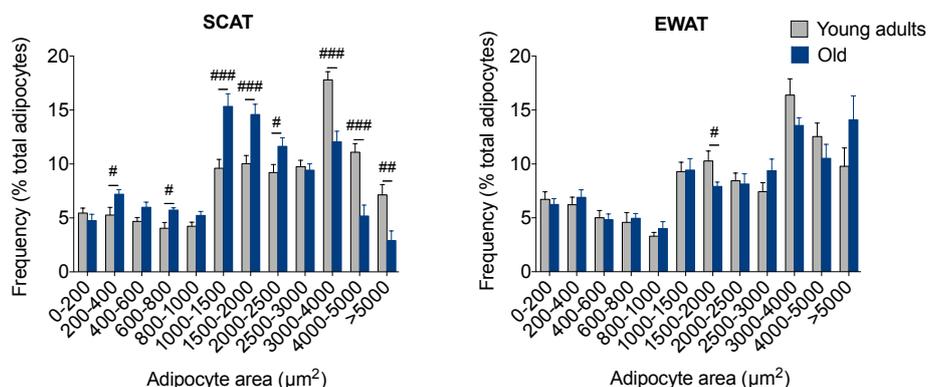
## 2) Impact de l'âge sur les tissus adipeux blancs

Nous avons commencé par analyser l'impact de l'âge sur les tissus adipeux blancs sous-cutanés (SCAT) et viscéraux (EWAT), en dehors de toute infection.

### a) Impact de l'âge sur la taille des adipocytes et le métabolisme des acides gras des tissus adipeux blancs

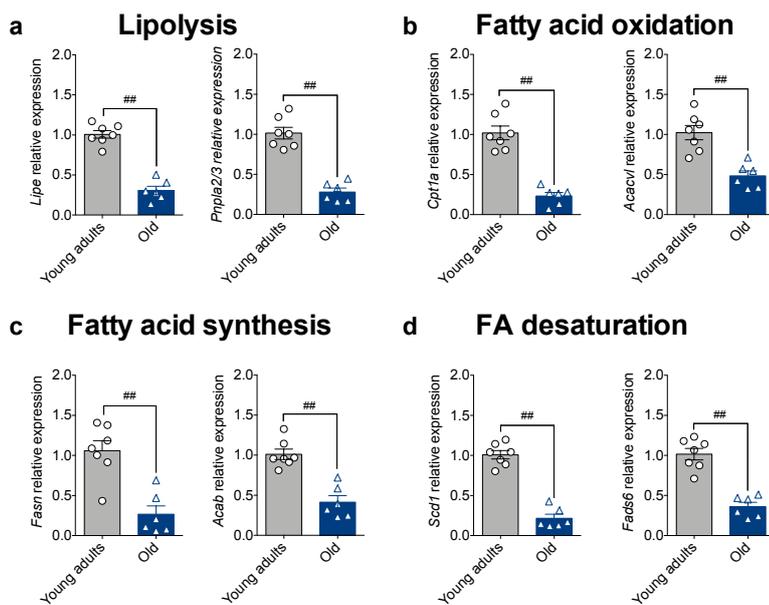
Une analyse morphométrique a été réalisée sur les tissus adipeux blancs sous-cutanés (SCAT) et viscéraux (EWAT) des hamsters jeunes adultes vs. âgés (non infectés).

Les résultats présentés **Figure 70** montrent que, chez le hamster doré, le vieillissement est associé à une diminution significative de la taille des adipocytes composant le SCAT (panel de gauche), alors qu'aucune différence significative n'est observée pour les adipocytes composant l'EWAT (panel de droite).



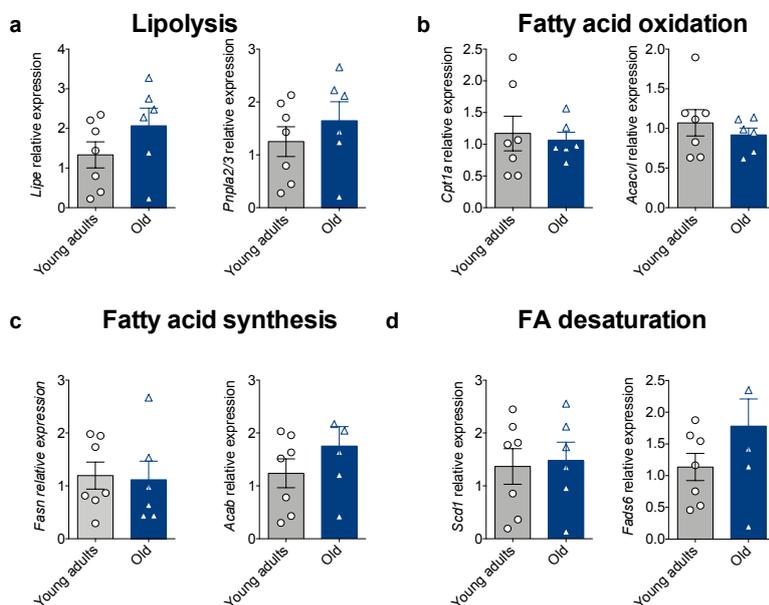
**Figure 70 : Impact de l'âge sur la taille des adipocytes des tissus adipeux blancs.** La taille des adipocytes a été déterminée par une analyse morphométrique du SCAT (panel gauche) et de l'EWAT (panel droit) de hamsters jeunes adultes ou âgés, non infectés. Les adipocytes ont été classés en fonction de leur taille et différentes classes de taille sont représentées. Les résultats sont présentés en fréquence d'adipocytes par classe. Symbole # = effet de l'âge. Test de Mann-Whitney.

De manière intéressante, la plus petite taille des adipocytes composant le SCAT des hamsters âgés est associée à des altérations importantes du métabolisme des acides gras de ce tissu (**Figure 71**) : en effet, nous observons une diminution significative de l'expression des gènes impliqués dans la lipolyse (*Lipe*, *Pnpla2/3*), ainsi que dans la synthèse (*Fasn*, *Acab*), l'oxydation (*Cpt1a*, *Acadvl*), et la désaturation (*Scd1*, *Fads6*) des acides gras, dans le SCAT des hamsters âgés, comparativement au tissu des animaux plus jeunes.



**Figure 71 : Impact de l'âge sur le métabolisme des acides gras du tissu adipeux sous-cutané.** Expression des gènes impliqués dans **a)** la lipolyse (*Lipe*, *Pnpla2/3*), et dans **b)** l'oxydation (*Cpt1a*, *Acadvl*), **c)** la synthèse (*Fasn*, *Acab*), et **d)** la désaturation des acides gras (*Scd1*, *Fads6*), dans le SCAT des hamsters jeunes adultes vs. âgés, non infectés, par RT-qPCR. n = 6-7 par groupe. Symbole # = effet de l'âge. Test de Mann-Whitney.

Concernant l'EWAT, pour lequel aucune différence de taille des adipocytes n'a été constatée entre les animaux âgés et jeunes adultes (cf. **Figure 70**), l'expression des gènes relatifs au métabolisme des lipides est comparable entre les 2 groupes d'animaux (**Figure 72**).



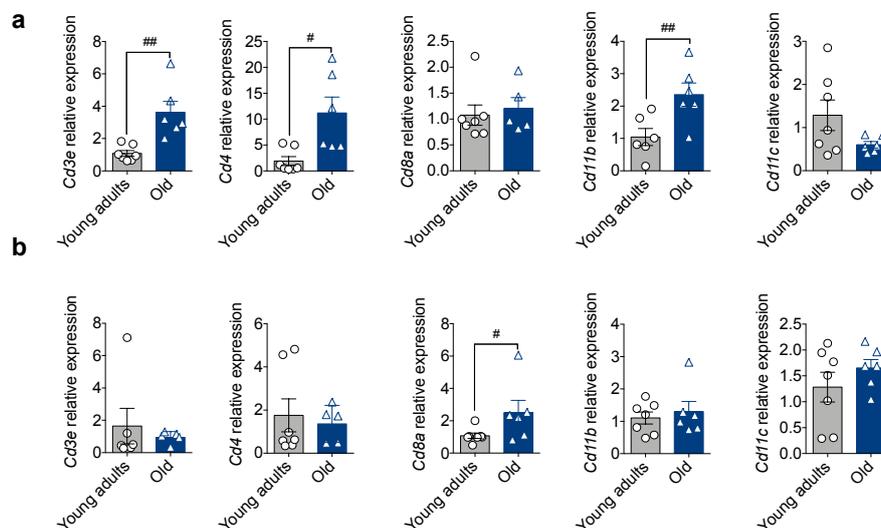
**Figure 72 : Impact de l'âge sur le métabolisme des acides gras du tissu adipeux viscéral.** Expression des gènes impliqués dans **a)** la lipolyse (*Lipe*, *Pnpla2/3*), et **b)** l'oxydation (*Cpt1a*, *Acadvl*), **c)** la synthèse (*Fasn*, *Acab*), et **d)** la désaturation des acides gras (*Scd1*, *Fads6*), dans l'EWAT des hamsters jeunes adultes vs. âgés, non infectés, par RT-qPCR. n = 6-7 par groupe. Test de Mann-Whitney.

## **b) Impact de l'âge sur la composition en cellules immunes et l'état inflammatoire des tissus adipeux blancs**

Aucune caractérisation phénotypique (et fonctionnelle) des cellules immunes des tissus adipeux blancs de nos animaux n'étant possible par cytométrie en flux (matériel non mis en place au P3, pour le moment), nous avons quantifié l'expression

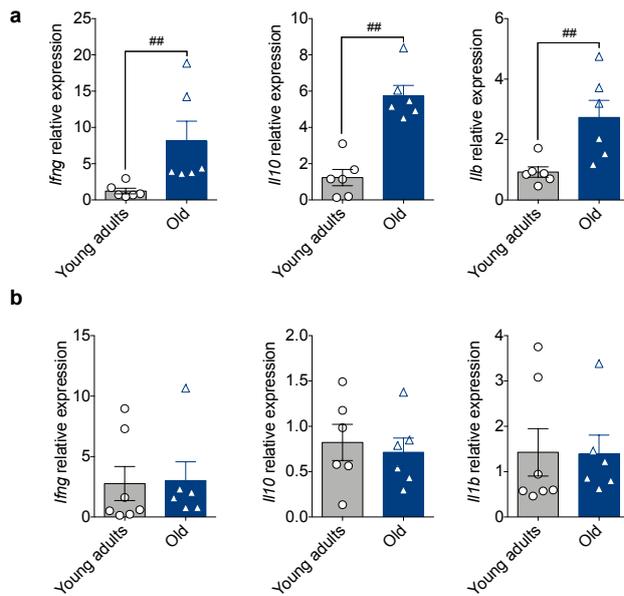
de gènes spécifiques de plusieurs types et sous-types de cellules immunes, dans le SCAT et l'EWAT de hamsters jeunes adultes vs. âgés : *Cd3* (pan-lymphocytes T), *Cd4* (majoritairement lymphocytes T auxiliaires), *Cd8* (lymphocytes T cytotoxiques), *Cd11b* (majoritairement monocytes/macrophages) et *Cd11c* (majoritairement cellules dendritiques).

Les résultats, présentés **Figure 73**, montrent que le vieillissement est associé à une augmentation significative de l'expression des gènes *Cd3*, *Cd4* et *Cd11b* dans le SCAT (**Figure 73a**), alors que dans l'EWAT seule l'expression de *Cd8* est significativement augmentée (**Figure 73b**).



**Figure 73 : Impact de l'âge sur les cellules immunes des tissus adipeux blancs.** Quantification de l'expression des gènes caractérisant différentes populations et sous-populations de cellules immunes *Cd3*, *Cd4*, *Cd8*, *Cd11b* et *CD11c* dans : **a**) le SCAT et **b**) l'EWAT des hamsters jeunes adultes vs. âgés, non infectés, par RT-qPCR. n = 6-7 par groupe. Symbole # = effet de l'âge. Test de Mann-Whitney.

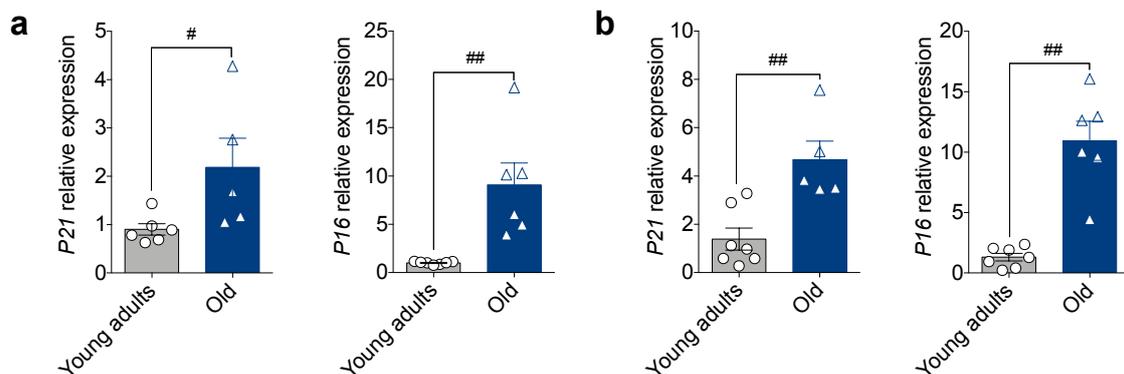
Afin d'évaluer le profil inflammatoire des tissus adipeux blancs des hamsters jeunes adultes vs. âgés, nous avons quantifié l'expression des gènes associés à l'inflammation : *Tnfa*, *Ifng*, *Tgfb*, *Il1b* et *Stat1* dans le SCAT et l'EWAT. L'expression de *Il-10*, cytokine anti-inflammatoire pouvant être produite en contexte inflammatoire pour réguler l'inflammation, a également été mesurée. Les résultats montrent que le vieillissement est associé à une augmentation significative de l'expression des gènes *Ifng*, *Il10* et *Il1b* dans le SCAT (**Figure 74a**), mais pas dans l'EWAT (**Figure 74b**). Aucune variation de l'expression des autres gènes analysés n'est notée dans le SCAT ou l'EWAT (résultats non présentés).



**Figure 74 : Impact de l'âge sur le statut inflammatoire des tissus adipeux blancs.** Quantification de l'expression des gènes associés à l'inflammation *Ifng*, *Il10* et *Il1b* dans : **a)** le SCAT et **b)** l'EWAT des hamsters jeunes adultes vs. âgés, non infectés, par RT-qPCR. n = 6-7 par groupe. Symbole # = effet de l'âge. Test de Mann-Whitney.

### c) Impact de l'âge sur la sénescence des tissus adipeux blancs

Le vieillissement est associé à la sénescence tissulaire, y compris dans les tissus adipeux blancs (Liu et al., 2020; Smith et al., 2021). En effet, nous montrons que l'expression des gènes de sénescence *P21* (*Cdkn1a*) et *P16* (*Cdkn2a*) est significativement plus élevée dans les dépôts sous-cutanés et viscéraux des hamsters âgés, comparativement aux tissus des jeunes adultes (**Figure 75**).



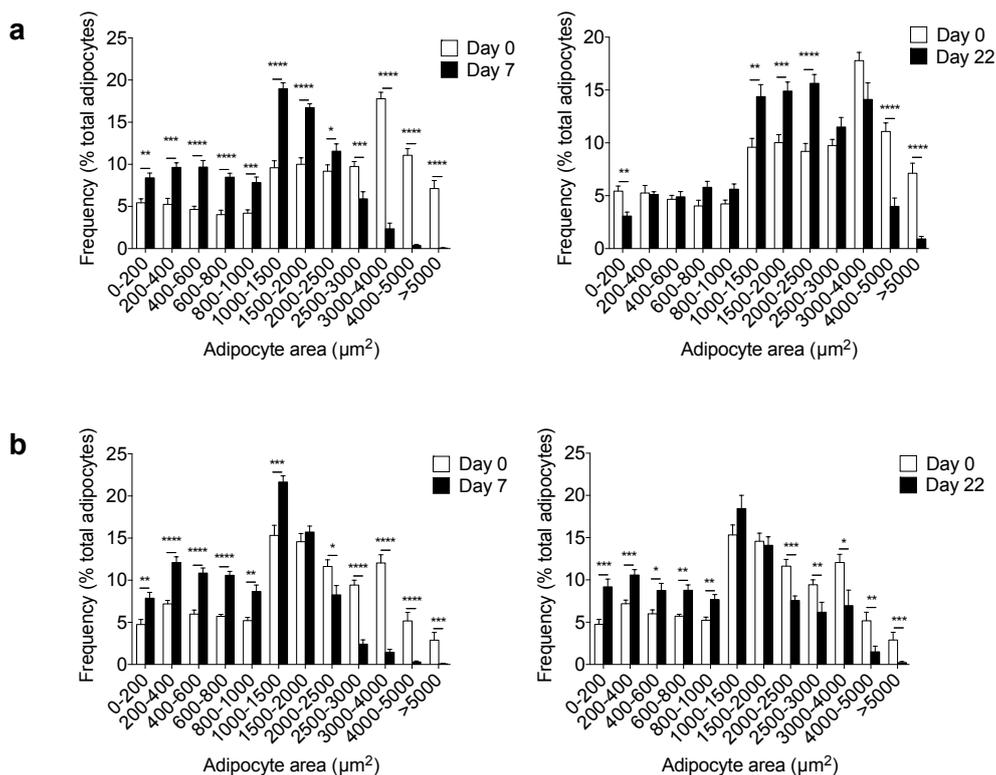
**Figure 75 : Impact de l'âge sur la sénescence des tissus adipeux blancs.** Quantification de l'expression des gènes associés à la sénescence *P21* et *P16* dans : **a)** le SCAT et **b)** l'EWAT des hamsters jeunes adultes vs. âgés, non infectés, par RT-qPCR. n = 6-7 par groupe. Symbole # = effet de l'âge. Test de Man-Whitney.

### 3) Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs

Nous avons ensuite étudié l'impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs des hamsters jeunes adultes vs. âgés.

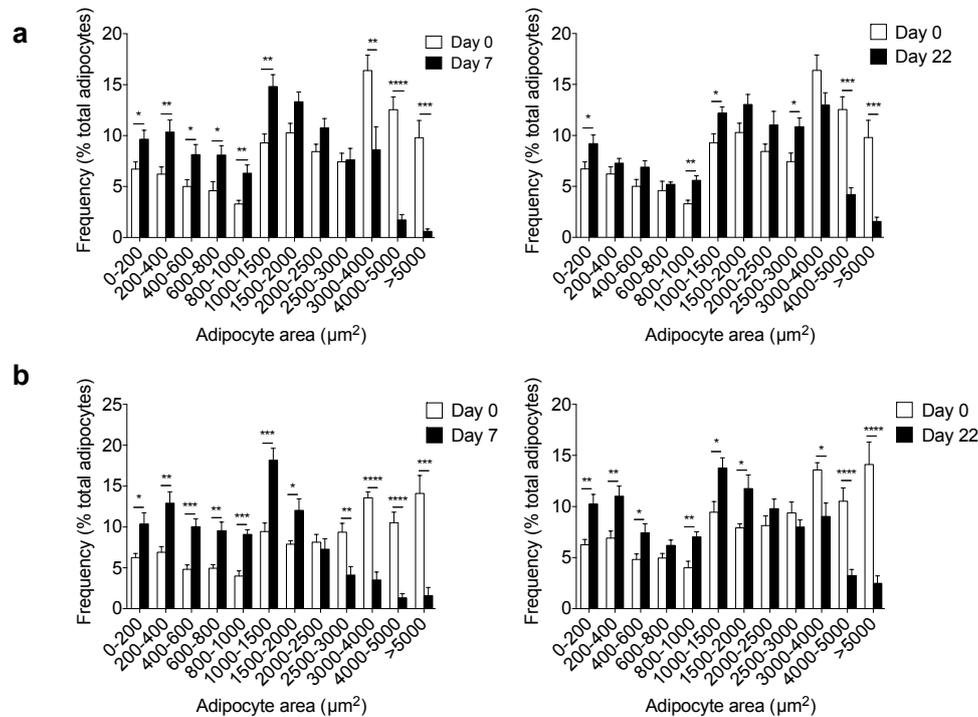
#### a) Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur la taille des adipocytes et le métabolisme des acides gras des tissus adipeux blancs

L'analyse histomorphométrique du tissu adipeux sous-cutané montre que l'infection entraîne une diminution de la taille des adipocytes, à la fois chez les hamsters jeunes adultes (**Figure 76a**) et les hamsters âgés (**Figure 76b**), à 7 jours post-infection (panels de gauche). De manière intéressante, cet effet de l'infection reste significatif à J22 post-infection (panels de droite).



**Figure 76 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur la taille des adipocytes du tissu adipeux sous-cutané.** La taille des adipocytes a été déterminée par une analyse morphométrique du SCAT de : **a)** hamsters jeunes adultes et **b)** hamsters âgés, aux jours 0, 7 et 22 post-infection. Les adipocytes ont été classés en fonction de leur taille et différentes classes de taille sont représentées. Les résultats sont présentés en fréquence d'adipocytes par classe. Symbole \* = effet de l'infection. Test de Mann-Whitney.

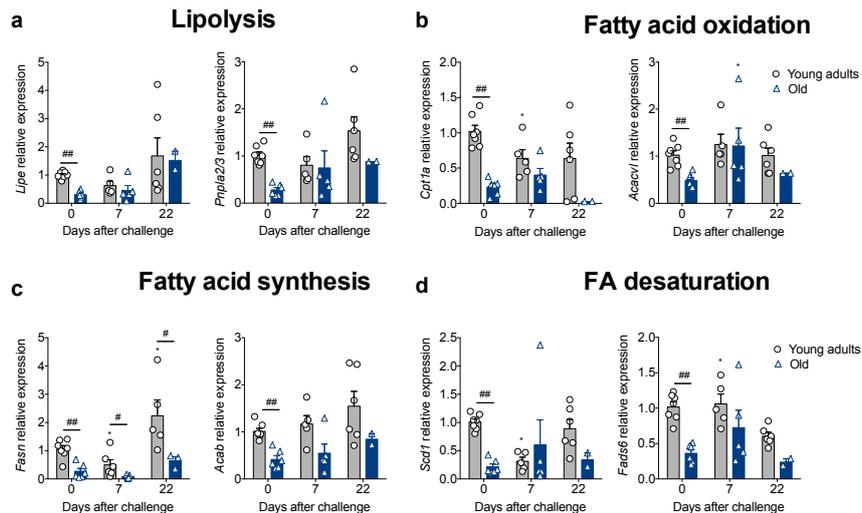
Ces mêmes conclusions sont également tirées des analyses histomorphométriques du tissu adipeux viscéral (**Figure 77**) : l'infection par SARS-CoV-2 entraîne une diminution de la taille des adipocytes à la fois chez les hamsters jeunes adultes (**Figure 77a**) et chez les animaux âgés (**Figure 77b**) à J7 post-infection (panels de gauche), et cet effet perdure à J22 post-infection (panels de droite).



**Figure 77 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur la taille des adipocytes du tissu adipeux viscéral.** La taille des adipocytes a été déterminée par une analyse morphométrique de l'EWAT de : **a)** hamsters jeunes adultes et **b)** hamsters âgés, aux jours 0, 7 et 22 post-infection. Les adipocytes ont été classés en fonction de leur taille et différentes classes de taille sont représentées. Les résultats sont présentés en fréquence d'adipocytes par classe. Symbole \* = effet de l'infection. Test de Mann-Whitney.

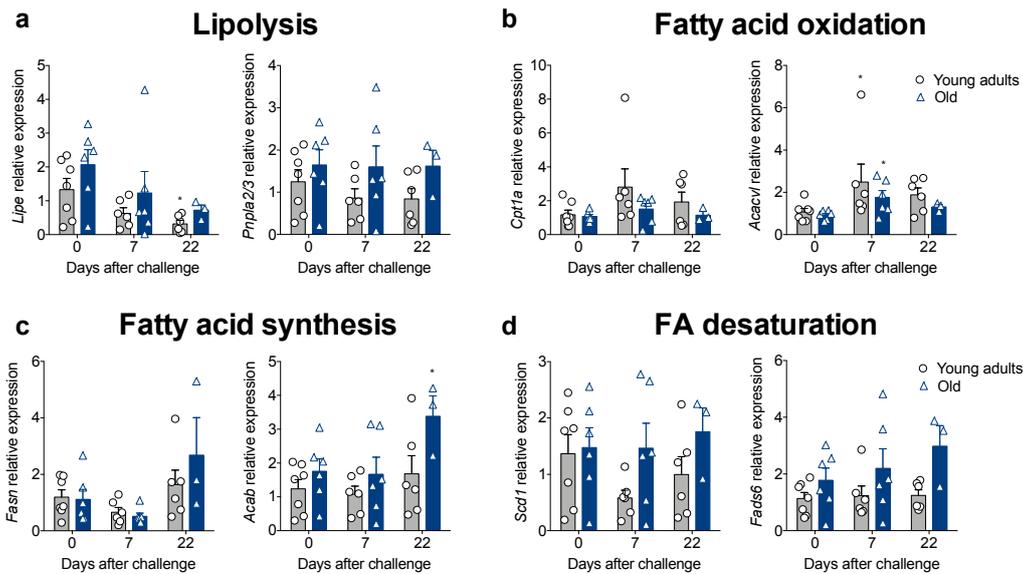
Afin de déterminer si l'effet de l'infection par SARS-CoV-2 sur la taille des adipocytes composant le SCAT est liée à des modifications du métabolisme lipidique du tissu, l'expression des gènes impliqués dans la lipolyse (*Lipe*, *Pnpla2/3*), ainsi que dans la synthèse (*Fasn*, *Acab*), l'oxydation (*Cpt1a*, *Acadvl*), et la désaturation (*Scd1*, *Fads6*) des acides gras, a été quantifiée au cours de l'infection.

Les résultats (**Figure 78**) montrent que, concernant le SCAT des hamsters âgés, l'infection a peu d'impact sur l'expression de l'ensemble de ces gènes, au jour 7 comme au jour 22. Chez les jeunes adultes, les expressions de *Cpt1a*, *Fasn* et *Scd1* sont significativement diminuées, 7 jours post-infection.



**Figure 78 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur le métabolisme lipidique du tissu adipeux sous-cutané.** Quantification de l'expression des gènes impliqués dans **a**) la lipolyse (*Lipe*, *Pnpla2/3*), ainsi que dans **b**) l'oxydation (*Cpt1a*, *Acadvl*), **c**) la synthèse (*Fasn*, *Acab*) et **d**) la désaturation des acides gras (*Scd1*, *Fads6*) dans le SCAT des hamsters jeunes adultes vs. âgés, aux jours 0, 7 et 22 post-infection, par RT-qPCR. n = 6-7 par groupe, sauf pour J22 âgés : n = 3. Symbole # = effet de l'âge, test de Mann-Whitney ; symbole \* = effet de l'infection, test de Kruskal-Wallis.

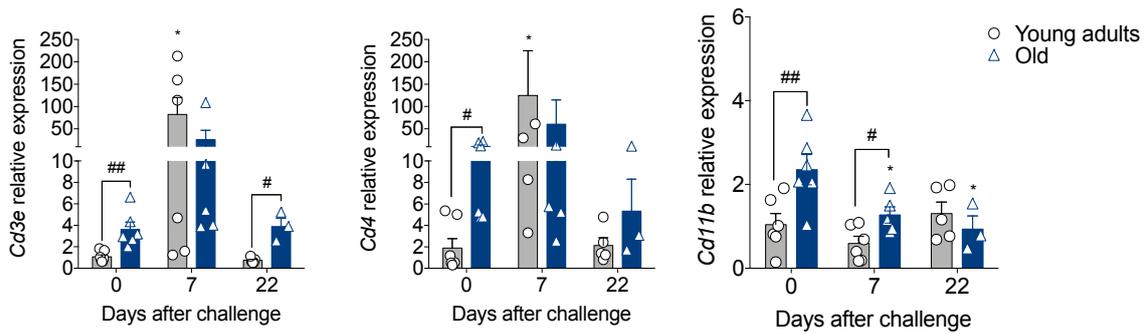
Concernant l'EWAT, nous pouvons observer (**Figure 79**) que l'infection par SARS-CoV-2 impacte de façon très marginale l'expression des gènes impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique dans l'EWAT, 7 jours et 22 jours post-infection.



**Figure 79 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur le métabolisme lipidique du tissu adipeux viscéral.** Quantification de l'expression des gènes impliqués dans **a)** la lipolyse (*Lipe*, *Pnpla2/3*), ainsi que dans **b)** l'oxydation (*Cpt1a*, *Acadvl*), **c)** la synthèse (*Fasn*, *Acab*) et **d)** la désaturation des acides gras (*Scd1*, *Fads6*) dans l'EWAT des hamsters jeunes adultes vs. âgés, aux jours 0, 7 et 22 post-infection, par RT-qPCR. n = 6-7 par groupe, sauf pour J22 âgés : n = 3. Symbole # = effet de l'âge test de Mann-Whitney ; symbole \* = effet de l'infection, test de Kruskal-Wallis.

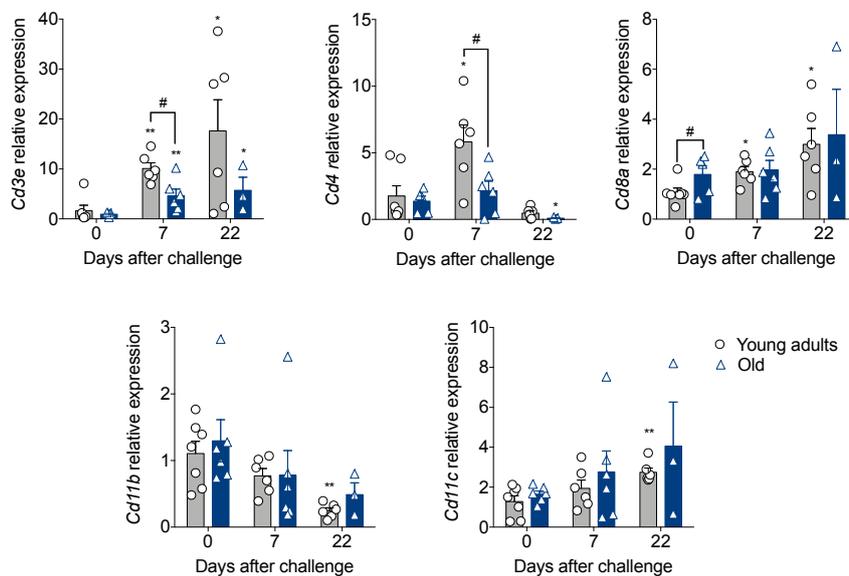
### **b) Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur la composition en cellules immunes des tissus adipeux blancs**

L'impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les cellules immunes du SCAT a été analysé *via* la quantification des gènes *Cd3*, *Cd4*, *Cd8*, *Cd11b* et *Cd11c*. Dans ce dépôt, seuls les gènes *Cd3*, *Cd4* et *Cd11b* présentent des variations de leur expression au cours de l'infection (**Figure 80**). Nous constatons une augmentation de *Cd3* et *Cd4* à J7 post-infection uniquement chez les hamsters jeunes adultes. De manière intéressante, seul le gène *Cd11b* voit son expression diminuée lors de l'infection chez les animaux âgés, effet qui reste significatif à J22 post-infection. Ces résultats suggèrent que la réponse immunitaire dans les SCATs des hamsters âgés infectés est altérée (pas de réponse des lymphocytes T et mortalité des macrophages ?).



**Figure 80 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les cellules immunes du tissu adipeux sous-cutané.** Quantification de l'expression des gènes *Cd3*, *Cd4* et *Cd11b* dans le SCAT des hamsters jeunes adultes vs. âgés, aux jours 0, 7 et 22 post-infection, par RT-qPCR. n = 6-7 par groupe, sauf pour J22 âgés : n = 3. Symbole # = effet de l'âge, test de Mann-Whitney ; symbole \* = effet de l'infection, test de Kruskal-Wallis.

Concernant l'EWAT, nous constatons que, selon le groupe d'âge ou le temps post-infection, l'ensemble des gènes analysés a une expression qui est modulée par l'infection par SARS-CoV-2 (**Figure 81**) : il est intéressant de noter l'augmentation de l'expression de *Cd3*, *Cd4* et *Cd8* chez les animaux jeunes adultes alors que seule l'expression de *Cd3* est augmentée chez les animaux âgés, suggérant également une altération de la réponse immunitaire dans les EWATs des hamsters âgés infectés.

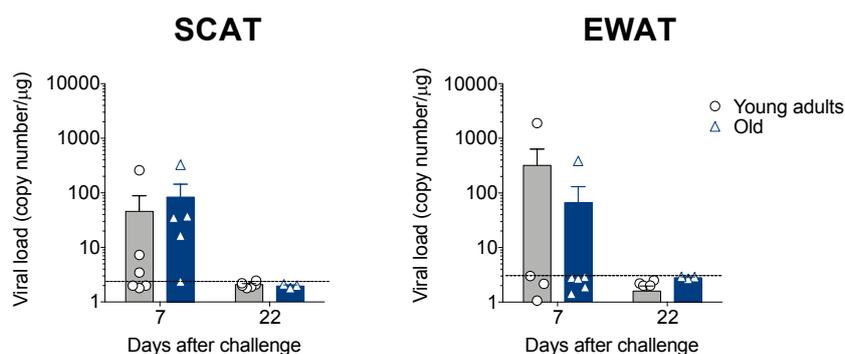


**Figure 81 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur les cellules immunes du tissu adipeux viscéral.** Quantification de l'expression des gènes *Cd3*, *Cd4*, *Cd8*, *Cd11b* et *Cd11c* dans l'EWAT des hamsters jeunes adultes vs. âgés, aux jours 0, 7 et 22 post-infection, par RT-qPCR. n = 6-7 par groupe, sauf pour J22 âgés : n = 3. Symbole # = effet de l'âge, test de Mann-Whitney ; symbole \* = effet de l'infection, test de Kruskal-Wallis.

### c) Présence de SARS-CoV-2 dans les tissus adipeux blancs

Les variations de certaines populations et sous-populations de cellules immunes induites par l'infection par SARS-CoV-2 nous ont ensuite amené à quantifier le génome viral dans les tissus adipeux blancs des hamsters jeunes adultes vs. âgés.

Les résultats montrent que du génome viral (gène *E*) est principalement détecté dans le SCAT des hamsters âgés (4 animaux sur 5), à J7 post-infection (**Figure 82**).



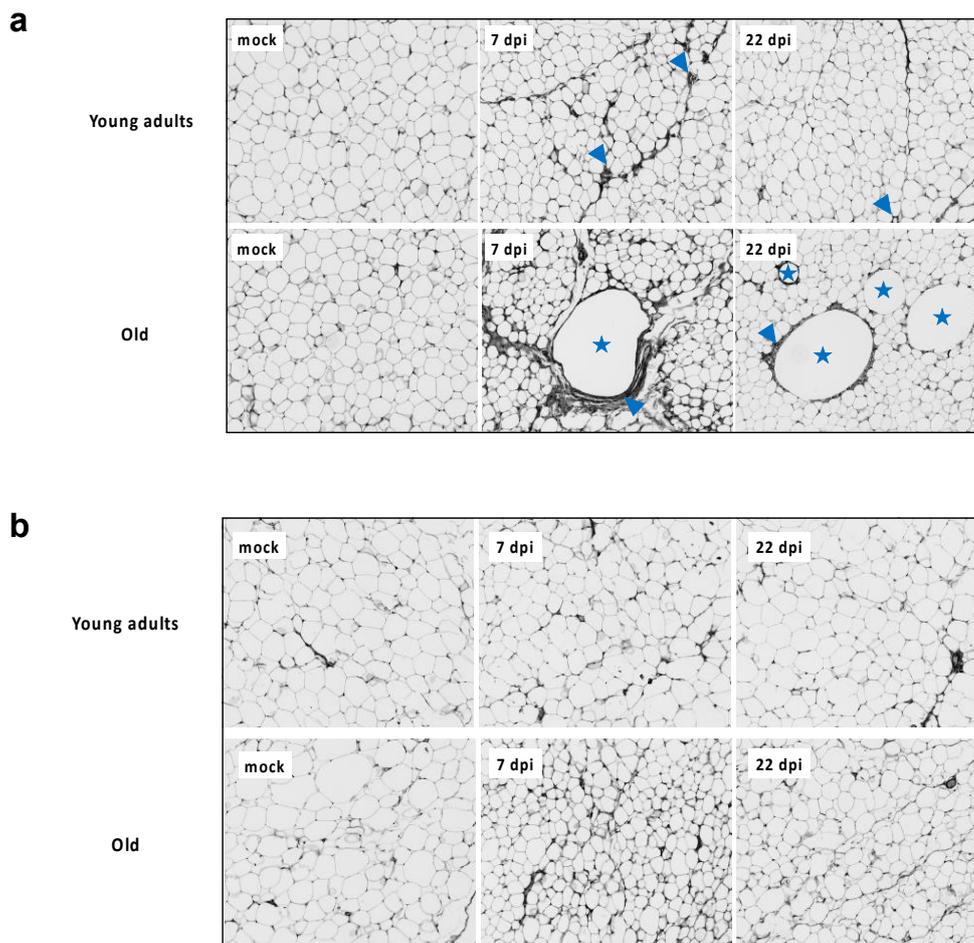
**Figure 82 : Quantification du génome viral dans les tissus adipeux blancs.** Charge virale dans le SCAT et l'EWAT des hamsters jeunes adultes vs. âgés, aux jours 0, 7 et 22 post-infection (RT-qPCR gène viral *E*) (nombre de copies/mg). La ligne pointillée indique la limite de détection. n = 5-7 par groupe, sauf pour J22 âgés : n = 3. Test de Mann-Whitney.

### d) Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur l'histologie des tissus adipeux blancs

L'analyse histologique des tissus adipeux (**Figure 83**), permet de visualiser l'impact de l'infection sur la taille des adipocytes composant le SCAT (**Figure 83a**) et l'EWAT (**Figure 83b**), effet qui persiste à J22 post-infection.

Cependant, l'observation la plus marquante et la plus originale est la présence de très nombreuses et très larges zones de nécrose adipocytaire, uniquement dans le SCAT des hamsters âgés, observation qui perdure au jour 22 post-infection.

*Nota bene* : Ces structures particulières avaient été exclues lors de l'analyse histomorphométrique.



**Figure 83 : Impact de l'infection par SARS-CoV-2 sur l'histologie des tissus adipeux blancs.** Images représentatives de coupes histologiques : **a)** du SCAT et **b)** de l'EWAT de hamsters jeunes adultes vs. âgés, aux jours 0, 7 et 22 post-infection (coloration hématoxyline/éosine, 5mm épaisseur).

Les structures mises en évidence dans le SCAT des animaux âgés infectés par SARS-CoV-2 rappellent les « *Crown-like structures* » (CLS) identifiées dans le tissu adipeux blanc dans un contexte d'obésité (Altintas et al., 2011; Cinti et al., 2005; Murano et al., 2008), et plus exactement les très larges CLS, dénommées « *Cyst-like structures* » (CyLS) identifiées dans le tissu adipeux blanc sous-cutané de personnes obèses présentant un diabète de type 2 (Camastra et al., 2017).

Nous réalisons actuellement des analyses complémentaires (marquages sur nos coupes histologiques, notamment) afin de confirmer que l'infection par SARS-CoV-2 conduit à la formation de CyLS dans les SCAT des hamsters âgés.

## IV. Discussion

Nos résultats montrent que, chez le hamster Syrien, le **vieillissement** est associé à l'apparition de **cellules sénescentes** (exprimant P21 et P16) dans les deux dépôts majeurs de **tissus adipeux blancs** que sont le dépôt **sous-cutané** inguinal et le dépôt **viscéral** épidydyal.

De manière intéressante, le **vieillissement** est associé à des changements du **métabolisme des acides gras** (se traduisant par une réduction de la taille des adipocytes), du profil de **cellules immunes** (se traduisant par une augmentation des lymphocytes CD4 et des monocytes/macrophages), et du **profil inflammatoire** (se traduisant par un état proinflammatoire : *l'inflammaging*) du dépôt **sous-cutané** de tissu adipeux blanc (alors qu'aucun changement n'est noté dans le dépôt viscéral). Cet effet dépôt-spécifique du vieillissement sur les tissus adipeux blancs n'a, à notre connaissance, jamais été décrit chez le hamster.

Concernant l'impact de l'infection par SARS-CoV-2, nos résultats montrent que :

(1) **L'infection par SARS-CoV-2 est plus sévère** - en termes de morbidité - chez les **hamsters âgés** que chez les animaux jeunes adultes, confirmant les données épidémiologiques obtenues chez l'Homme (Bonanad et al., 2020; Yanez et al., 2020). Au 7<sup>ème</sup> jour d'infection, la charge virale et la réponse antivirale sont plus importantes dans les poumons des hamsters âgés que dans les poumons des jeunes adultes, et à distance de l'infection (*i.e.* au jour 22), les animaux âgés n'ont toujours pas récupéré de la perte de poids corporel induite par l'infection.

(2) **L'infection par SARS-CoV-2 est associée à une réduction de la taille des adipocytes** du tissu adipeux blanc **sous-cutané et** du tissu adipeux blanc **viscéral**, en accord avec la récente bibliographie qui rapporte une augmentation de la lipolyse des triglycérides dans les tissus adipeux blancs de patients atteints de COVID-19, se traduisant notamment par une augmentation des taux sanguins d'acides gras libres (Thomas et al., 2020). De manière intéressante, cet effet **persiste** chez les **hamsters infectés** jusqu'à 22 jours post-infection.

(3) **L'infection par SARS-CoV-2 est associée à des changements du profil de cellules immunes** dans les tissus adipeux blancs, uniquement chez les **hamsters jeunes adultes**. L'état de sénescence des cellules immunes des tissus adipeux blancs

des animaux âgés est probablement responsable du manque de réponse immune induite par l'infection chez ces animaux.

(4) L'observation la plus intéressante, originale et novatrice, faite lors de notre étude est l'impact de l'**infection par SARS-CoV-2** sur l'**histologie** du tissu adipeux blanc **sous-cutané** des **hamsters âgés**. Dans ce dépôt, pour lequel nous avons montré une altération marquée du métabolisme des acides gras (préalablement à l'infection), de très larges zones de nécrose adipocytaire sont en effet observées. Ces structures sont semblables aux « **Crown-like structures** » (CLS) observables dans les tissus adipeux en contexte d'obésité (dans lequel la lipolyse est également augmentée) : les CLS correspondent à des adipocytes dysfonctionnels, nécrotiques ou apoptotiques, qui sont éliminés du tissu par des macrophages qui s'organisent en couronne autour de l'adipocyte (Altintas et al., 2011; Cinti et al., 2005; Murano et al., 2008). Les structures que nous observons sont semblables, mais non identiques aux CLS : elles sont de taille beaucoup plus importante (environ 10 fois plus larges qu'un adipocyte hypertrophique ou qu'un CLS classique) et sont en fait comparables aux « **Cyst-like structures** » (CyLS) décrites dans le tissu adipeux blanc sous-cutané (et non viscéral) de personnes obèses et diabétiques (Camastra et al., 2017). De manière remarquable, ces structures sont observables à J7 post-infection (jour auquel du virus est détecté dans le tissu) et persistent à distance de l'infection (J22).

Ainsi que nous le discuterons dans le Chapitre suivant, nos résultats pourraient mettre en évidence la régulation du métabolisme des acides gras (et notamment la régulation du ratio triglycérides/phospholipides) par le virus SARS-CoV-2. La rédaction de l'article est en cours (soumission prévue en Février 2022).

# Discussion générale

Les **infections virales respiratoires** représentent un **enjeu de santé publique et économique** important. Les virus influenza (dont les IAV, responsables de la grippe) et les coronavirus (dont le SARS-CoV-2, responsable de la COVID-19) font partie des virus les plus fréquemment détectés chez des patients présentant une infection des voies respiratoires inférieures, et ayant nécessité une hospitalisation (Nguyen et al., 2016). Par an, les épidémies de grippe touchent entre 2 et 6 millions de personnes en France (Bessis, 2020), et entraînent jusque 650 000 décès dans le monde (OMS). Le coût moyen des hospitalisations liées à la grippe en France est estimé à 79 millions d'euros (Bessis, 2020) auquel il faut ajouter les pertes économiques découlant des arrêts maladie. Des enquêtes ont été réalisées sur l'épidémie de grippe B (2005-2006) à la demande du Groupe d'Expertise et d'Information sur la Grippe, et rapportent un coût total de 103 millions d'euros en France (certainement sous-estimé, d'après <http://www.grippe-geig.com/impact-economique.html>). La COVID-19, maladie toujours en évolution à l'heure actuelle, a touché plus de 9 millions de personnes et a provoqué un peu plus de 120 000 décès en France. Dans le monde, plus de 5 millions de décès ont été recensés depuis le début de la pandémie en novembre 2019 (d'après <https://www.coronavirus-statistiques.com/stats-pays/coronavirus-nombre-de-cas-en-france/> et <https://www.santepubliquefrance.fr/dossiers/coronavirus-covid-19/coronavirus-chiffres-cles-et-evolution-de-la-covid-19-en-france-et-dans-le-monde> à la date du 29/12/2021). En France, l'arrêt partiel de l'activité économique lors du confinement en mars-avril 2020 a conduit à une réduction de 6% du produit intérieur brut (PIB). Malgré la reprise de l'activité économique, le PIB moyen en 2021 est inférieur de 2% à celui d'avant la pandémie (d'après <https://blog.insee.fr/larithmetique-de-la-crise-bien-comprendre-les-chiffres-de-croissance-en-temps-de-covid-19/>).

De façon intéressante, la **grippe** et la **COVID-19** partagent de nombreux **points communs**, notamment au niveau épidémiologique. En effet, les **mêmes facteurs de risques** favorisant le développement de formes sévères de la maladie ont été identifiés dans ces deux pathologies, notamment l'**âge** ( $\geq 65$  ans) et l'**obésité** (surpoids inclus). Il est important de relever que, chez les individus âgés comme chez les personnes en surpoids ou obèses, il y a de nombreuses **altérations des tissus adipeux blancs** (*i.e.* masses, répartition entre les dépôts sous-cutanés et viscéraux, changements métaboliques, modification des sécrétions, et de la composition en

cellules immunes). Les modifications (qualitatives et quantitatives) des cellules immunes présentes au sein du tissu adipeux blanc associées à l'âge ainsi qu'à l'obésité, pourraient contribuer à la plus grande susceptibilité des individus âgés ou obèses aux formes sévères de grippe ou de COVID-19. En effet, le tissu adipeux blanc a un rôle immunitaire important : il régule le système immunitaire par la sécrétion d'adipokines (Fasshauer and Blüher, 2015), et participe directement aux défenses contre les pathogènes en produisant des peptides antimicrobiens (comme les cathélicidines, dans le cas particulier des adipocytes du derme) (Zhang et al., 2015), et/ou en servant de tissu réservoir aux lymphocytes T mémoires (Han et al., 2017; Misumi et al., 2019). Le rôle des cellules immunes du tissu adipeux blanc en contexte infectieux dans des sujets normopondéraux (non obèses) n'a pas encore été étudié. En dépit des altérations majeures (métaboliques, immunitaires, inflammatoires) du tissu adipeux blanc associées au vieillissement et à l'obésité, le rôle du tissu adipeux blanc dans la physiopathologie des infections n'a que très peu été étudié (Damouche et al., 2015; Han et al., 2017; Misumi et al., 2019). C'est pourquoi notre équipe émet l'hypothèse que le **tissu adipeux blanc** pourrait jouer un **rôle important** (et sous-estimé) dans la **physiopathologie** de la **grippe** et de la COVID-19, ce qui est également suggéré par d'autres équipes pour la COVID-19.

En étudiant les conséquences de l'infection par le virus influenza A sur les tissus adipeux blancs, chez la souris, notre équipe a mis en évidence le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané (SCAT), et non du dépôt viscéral, à 7 jours post-infection (Ayari et al., 2020). Il s'agissait de la première observation du brunissement du tissu adipeux blanc lors d'une infection virale respiratoire. Le brunissement du tissu adipeux blanc avait déjà été reporté dans le cadre d'une infection parasitaire par un helminthe, *Heligmosomoides polygyrus* (Su et al., 2018). Notre équipe a également montré que l'infection de préadipocytes *in vitro* induit l'expression des gènes thermogéniques, dont *Ucp1*, et conduit à une modification de la morphologie du réticulum endoplasmique. Au vu de ces résultats et de la littérature, notre équipe a émis l'hypothèse d'un rôle possible du stress du réticulum endoplasmique et de la réponse UPR dans le brunissement du SCAT lors de l'infection par le virus influenza A. Par ailleurs, suite à l'émergence mondiale du virus SARS-CoV-2 et de la pandémie qui en résulte, notre équipe a mis en place un modèle d'étude de la COVID-19, chez le hamster (doré) Syrien. Nous en avons tiré profit pour étudier les effets de l'infection

par SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs, effets qui sont actuellement peu connus.

Ainsi, les objectifs de ma thèse étaient de **1)** déterminer le rôle du stress du réticulum endoplasmique et de la réponse UPR dans le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané observé lors de l'infection par le virus de la grippe, et **2)** étudier les effets de l'infection par le SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs des hamsters jeunes adultes ou âgés.

Le **brunissement du tissu adipeux blanc** lors de l'infection par le **virus influenza A** (souche saisonnière [H3N2]) a été observé 7 jours post-infection et n'est plus visible 20 semaines après l'infection (Ayari et al., 2020). Lors de ma thèse nous avons précisé la cinétique du brunissement par analyse des coupes histologiques du SCAT de souris infectées. Nous avons montré que le brunissement du SCAT se met en place dès J4 post-infection, est maximal à J7 et disparaît rapidement puisqu'il n'est plus observable à J14. Le caractère réversible du brunissement a déjà été documenté. En effet, après l'induction du brunissement par différents stimuli (traitement par un agoniste du récepteur  $\beta$ 3-adrénergique et exposition au froid), 5 jours après l'arrêt du stimulus, l'expression d'UCP1 par les adipocytes beiges régresse progressivement jusqu'à disparaître complètement au bout de 10 jours (agoniste du récepteur  $\beta$ 3-adrénergique) et après 15 jours (exposition au froid) (Altshuler-Keylin et al., 2016). De manière intéressante, dans notre modèle d'infection par IAV, l'évolution de la charge virale est concomitante au brunissement. Nous détectons du génome viral dans les tissus adipeux blancs à partir de J4 post-infection, le pic de la charge virale est à J7 comme le pic du brunissement, et l'ARN viral n'est plus détectable dans les tissus adipeux blancs des souris à J14. De ce fait, et parce que l'infection de préadipocytes *in vitro* par IAV induit l'expression des gènes thermogéniques, nous pensons que le brunissement (SCAT)/l'induction de la thermogénèse (préadipocytes) résultent, au moins partiellement, d'un effet direct de l'infection par IAV sur les cellules et tissus adipeux.

Les infections virales induisent un **stress du réticulum endoplasmique** et une réponse UPR dans les cellules hôtes. C'est notamment le cas du virus influenza A. A l'exception d'une étude montrant l'induction de l'UPR (activation d'ATF6 et expression de CHOP) dans les poumons de souris infectée par IAV ([H1N1]) (Pociask

et al., 2017), seules des études *in vitro* ont décrit la réponse UPR induite lors de l'infection par IAV de cellules épithéliales pulmonaires (Hassan et al., 2012; Hrinčius et al., 2015) ou de cellules épithéliales thymiques (Roberson et al., 2012).

Lors de ma thèse, nous avons confirmé et précisé l'induction d'un stress du RE et de la réponse UPR dans les poumons de souris infectées par IAV ([H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>]), et nous avons caractérisé pour la première fois, le stress du RE et la réponse UPR dans les tissus adipeux blancs au cours de l'infection. Nous montrons, chez la souris, que l'infection par IAV conduit à l'activation des 3 voies UPR (PERK, IRE1 $\alpha$ , ATF6) dans les poumons, alors que la voie PERK est majoritairement induite dans le tissu adipeux blanc sous-cutané (ainsi que, de manière moindre, la voie IRE1 $\alpha$ ) et qu'aucune réponse UPR n'est activée dans le tissu adipeux blanc viscéral. De façon similaire, la **voie PERK** est prédominante dans les poumons et le SCAT des souris « grippées ». Les analyses de corrélations entre les expressions des gènes du brunissement, de l'UPR et l'ARN viral ont révélé des corrélations entre l'ARN viral et l'UPR, et l'UPR et le brunissement ; confortant l'idée que l'infection induit une réponse UPR qui régulerait le brunissement dans le tissu adipeux blanc sous-cutané. D'ailleurs, le stress du réticulum endoplasmique et la réponse UPR ont été proposés comme nouveaux régulateurs du brunissement dans une littérature récente. La voie PERK n'est que depuis très récemment connue comme régulatrice du brunissement et de la thermogénèse. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'activation de la voie PERK est responsable de l'apparition du brunissement lors de l'infection de souris par IAV. L'activation de l'UPR dans les préadipocytes infectés *in vitro* renforce cette hypothèse. En effet, comme dans le SCAT, les voies IRE1 $\alpha$  et PERK sont activées dans les préadipocytes infectés par IAV ([H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>]), la voie PERK étant également prédominante dans les préadipocytes. De plus, les analyses de corrélations à partir des résultats *in vitro* montrent l'existence de corrélations entre l'ARN viral et l'UPR, entre l'UPR et le brunissement, ainsi qu'entre l'ARN viral et *Ucp1*.

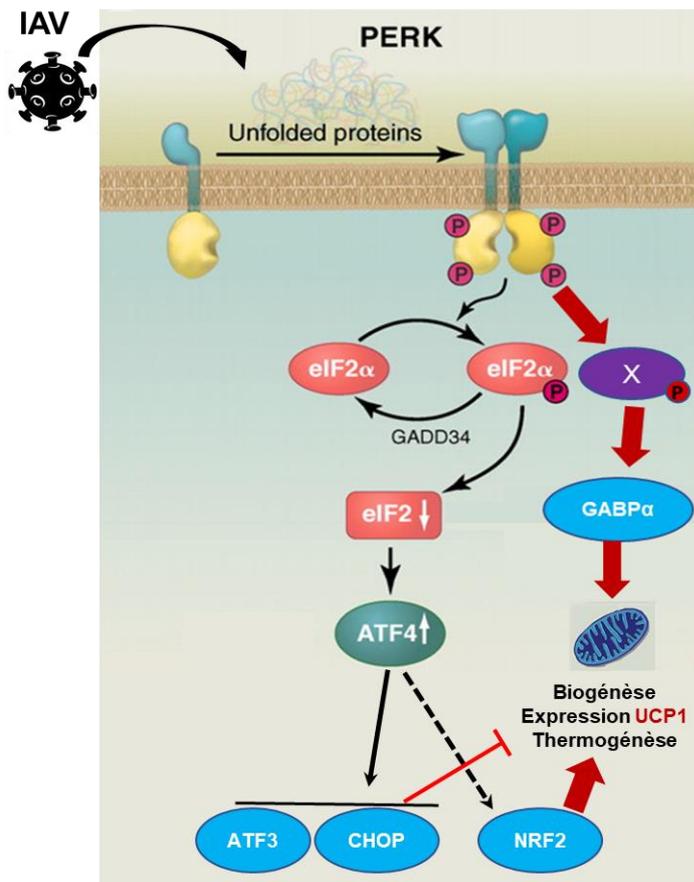
Pour confirmer le rôle de la voie PERK dans le brunissement du tissu adipeux blanc, nous avons utilisé une approche *in silico* consistant en l'analyse des sites de fixation putatifs de facteurs de transcription. Plusieurs sites de fixation potentiels pour des facteurs de la voie PERK (CHOP, ATF4, ATF3) ont été identifiés et également un site CARE. L'expression d'ATF4 permet dans un premier temps, l'augmentation de la transcription des gènes cibles contenant un site CARE, ce qui

permet la production des facteurs CHOP (Su and Kilberg, 2008), ATF3 (Pan et al., 2003, 2007) et C/EBP $\beta$  (Chen et al., 2005; Thiaville et al., 2008). Dans un second temps, ces facteurs vont se lier au site CARE et réprimer la transcription (Shan et al., 2009). Ceci suggère que la voie PERK aurait plutôt un rôle inhibiteur sur le brunissement du tissu adipeux blanc, en supposant que les facteurs de la voie PERK se fixent effectivement à la région régulatrice du promoteur d'*Ucp1* (des expériences de ChIP-PCR sont en cours). ATF4 avait notamment déjà été identifié comme un répresseur de la thermogénèse du tissu adipeux brun et de l'expression d'*Ucp1* (Wang et al., 2010).

Afin de préciser le rôle de la voie PERK dans l'induction de la thermogénèse nous avons eu recours à des expériences d'inhibition par des siRNAs dans deux modèles : le modèle de stress du réticulum endoplasmique induit par la tunicamycine (activation des 3 voies de l'UPR), et le modèle du stress du réticulum endoplasmique induit par l'infection par IAV (activation de la voie PERK). La comparaison des deux modèles nous a d'abord permis de montrer que la réponse UPR induite par le virus est spécifique de l'infection et non une réponse stéréotypée à toute forme de stress du RE. Les expériences d'inhibition lors de l'infection des préadipocytes par IAV semblent indiquer un rôle opposé entre PERK et PKR. PERK serait un inducteur de l'expression d'*Ucp1* (résultat également observé dans le modèle de traitement à la tunicamycine) alors que PKR serait plutôt un répresseur. Le rôle inducteur de PERK dans le brunissement est cohérent avec la littérature, d'autant plus qu'une étude récente montre que les souris déficientes en PERK sont intolérantes au froid et ont un défaut de brunissement du tissu adipeux blanc (Latorre-Muro et al., 2021). Cependant, l'activation de PERK et de PKR conduit dans les deux cas à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et à la production d'ATF4. De plus l'inhibition d'ATF4 n'a pas d'effet sur l'expression d'*Ucp1* (dans le modèle d'infection des préadipocytes par IAV), ou augmente l'expression d'*Ucp1* (donc ATF4 aurait un rôle inhibiteur, dans le modèle de traitement à la tunicamycine). Comment expliquer que 2 kinases (PERK et PKR) qui activent la même voie de signalisation auraient deux rôles opposés ? Une explication possible est l'existence de voies alternatives à la voie PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4. En effet, PERK joue un rôle essentiel dans la biologie des mitochondries *via* la phosphorylation d'autres facteurs que eIF2 $\alpha$  (Cannon and Nedergaard, 2021). PERK permet notamment la formation de nouvelles crêtes mitochondriales en phosphorylant la O-GlcNAc (*O-linked N-acetylglucosamine*) transférase (OGT)

(Latorre-Muro et al., 2021). PERK permet également la synthèse des protéines de la membrane interne mitochondriale, dont *Ucp1*, via l'induction de l'expression de GABPα (dans ce cas, la cible de la phosphorylation de PERK n'est pas connue) (Kato et al., 2020).

Ainsi, pour expliquer l'induction de la thermogénèse lors de l'infection par le virus influenza A, nous proposons le modèle suivant (**Figure 84**) : l'infection des préadipocytes par IAV induit un stress du réticulum endoplasmique et l'activation de PERK. L'activation de PERK déclenche la voie canonique de PERK *i.e.* la voie PERK-eIF2α-ATF4. ATF4 permet la production de facteurs de transcription tels que ATF3 et CHOP qui pourraient réprimer la thermogénèse (d'après notre analyse *in silico* et le rôle répresseur d'ATF4 montré par Wang et al., 2010) mais également de facteurs tel que NRF2 (*Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*) qui joue un rôle dans la biogénèse mitochondriale (Merry and Ristow, 2016) et pourrait ainsi favoriser la thermogénèse. Par ailleurs, l'activation de PERK permet la phosphorylation de GABPα qui permet la biogénèse des protéines de la membrane interne mitochondriale dont *Ucp1* qui est nécessaire à la thermogénèse (Kato et al., 2020).



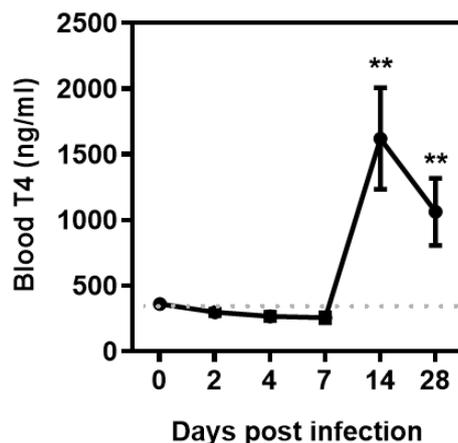
**Figure 84 : Modèle proposé de régulation de la thermogénèse par PERK lors de l'infection par IAV.** L'infection par IAV induit l'activation de PERK qui déclenche la voie PERK-ATF4 et également une ou des voies alternatives permettant la production GABPα. Les différents facteurs induits suite à l'activation de PERK régulent la thermogénèse. X = facteur non identifié. Modifié à partir de Walter and Ron, 2011.

A l'heure actuelle, il nous reste à compléter notre cinétique du brunissement du SCAT lors de l'infection de souris par IAV par les Western Blots quantifiant l'expression de la protéine UCP1 dans les tissus adipeux blancs. En parallèle, des Western Blots ciblant les voies UPR seront réalisés. Le rôle de la voie PERK dans le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané *in vivo* sera confirmé par l'utilisation d'un inhibiteur chimique de PERK, le GSK265657. Par ailleurs, nous confirmerons l'existence et la fonctionnalité des sites putatifs de fixation des facteurs de la voie PERK, localisés dans la région régulatrice du promoteur d'*Ucp1*, par des expériences de ChIP-PCR. Dans le modèle d'infection par IAV des préadipocytes *in vitro*, nous confirmerons au niveau protéique (Western Blots) ce que nous avons démontré au niveau génique (PCR) : **1**) l'activation des voies UPR, **2**) l'efficacité des siRNAs, et **3**) l'expression d'UCP1 lors de l'infection associée ou non au traitement par les différents siRNAs. Les expériences d'inhibition par des siRNAs seront reproduites et complétées avec des siRNAs ciblant les autres facteurs induits suite à l'activation de PERK, notamment GABP $\alpha$ , NRF2 et ATF3. L'induction de la thermogénèse suite à l'infection des préadipocytes par IAV sera confirmée par mesure de la température intracellulaire (sonde fluorescente thermosensible), et mesure de différents métabolites dont l'AMPc, la détermination du ratio ADP/ATP et du ratio NADP/NADPH, lesquels sont modifiés lors de la thermogénèse. A plus long terme, il pourrait être intéressant de vérifier si une autre souche d'IAV (par exemple, [H1N1]) conduit également au brunissement du tissu adipeux blanc chez les souris, et à l'activation de la thermogénèse dans les préadipocytes infectés. En complément, nous pourrions également essayer de reproduire nos résultats dans une lignée de préadipocytes humains.

Quelques remarques concernant notre modèle d'étude du brunissement *in vivo* peuvent être émises. En effet, les souris sont hébergées dans une animalerie où la température de l'air est maintenue à 20°C, ce qui ne correspond pas à la thermoneutralité (30°C) pour les souris. Le brunissement étant induit par le froid, les conditions d'hébergement représentent un biais important. Cependant, nous n'avons pas observé de brunissement des tissu adipeux blancs dans les souris non infectées (à l'exception de quelques adipocytes beiges - zone très restreinte - dans 2 souris). Les conditions d'hébergement n'ont donc pas d'impact significatif sur notre modèle d'étude, bien qu'on ne puisse pas totalement exclure qu'elles pourraient faciliter

l'apparition des adipocytes beiges. D'autre part, lors de l'infection par IAV les souris réduisent leur prise alimentaire (progressivement entre J4 et J6 post-infection, stable mais faible - moins d'1 gramme par souris - à J7 et J8) et recommencent à manger progressivement (entre J9 et J11) (Sencio et al., 2020). Cette modification dans l'alimentation des souris au cours de l'infection pourrait s'apparenter à un jeûne et ainsi favoriser le brunissement. Cependant, l'arrêt de la prise alimentaire n'est pas complet, et la modification du microbiote observée lors de l'infection ne correspond pas à celle observée lors d'un jeûne (pas d'augmentation de la proportion des Firmicutes) (Li et al., 2017; Liu et al., 2019; Sencio et al., 2020). C'est pourquoi nous ne pensons pas que la baisse de la prise alimentaire lors de l'infection participe au brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané.

Le brunissement du tissu adipeux blanc étant induit par différents mécanismes, il serait intéressant d'investiguer le rôle des autres mécanismes dans le brunissement du SCAT lors de l'infection par IAV, notamment **1)** le rôle des hormones thyroïdiennes, en supposant que l'infection provoque des variations des taux d'hormones thyroïdiennes (la mesure de la T4 dans le sang a été réalisée (**Figure 85**) et montre une augmentation de son taux à partir de J7, elle doit être complétée par la mesure de la T3) et surtout **2)** le rôle du système immunitaire (développement/maintien d'un profil de type 2 et activation des cellules immunes du tissu adipeux ?). L'impact de l'infection par IAV sur les cellules immunes du tissu adipeux blanc fait d'ailleurs l'objet d'un nouveau projet de thèse au sein de notre équipe. De plus, pour renforcer ou non, l'effet dépôt spécifique de l'infection (brunissement dans le SCAT et non dans l'EWAT, UPR induite dans le SCAT et non dans l'EWAT), nous pourrions vérifier si l'infection induit également l'activation de la thermogénèse dans le tissu adipeux brun des souris infectées.



**Figure 85 : Variation du taux de T4 sanguin de souris infectées par IAV.** Le sang des souris a été prélevé lors des sacrifices à chaque temps de la cinétique (J0, J2, J4, J7, J14, J28). La mesure du taux de T4 sanguin a été réalisée par ELISA. n=5 à J0 et n=6 de J2 à J28. Test de Kruskal-Wallis.

Induire le brunissement du tissu adipeux blanc est considéré comme une stratégie thérapeutique de lutte contre l'obésité et les désordres métaboliques. Étudier les mécanismes d'induction du brunissement pourrait permettre de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

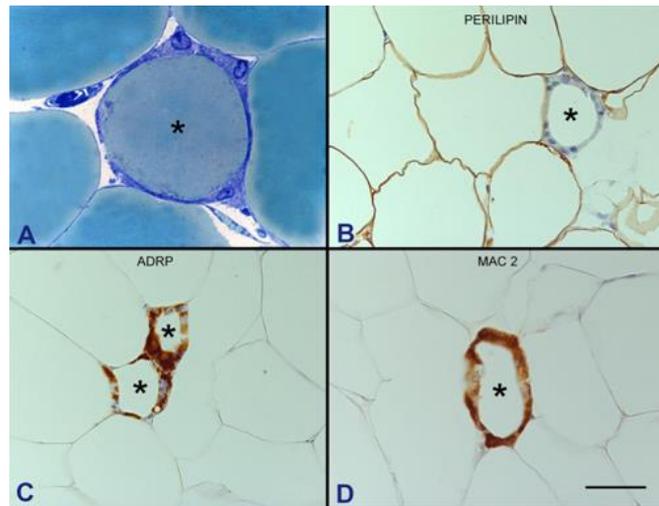
La découverte du brunissement du tissu adipeux blanc lors d'une infection virale pose la question de l'« intérêt » du brunissement pour le virus ou pour l'hôte infecté. De mon point de vue, le brunissement du tissu adipeux blanc est un mécanisme de défense, mis en place au cours de l'infection, pour restreindre la multiplication du virus dans le tissu et les cellules adipeuses. Lors de l'infection, nous observons une diminution de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative dans les tissus adipeux blancs sous-cutanés (Ayari et al., 2020). Or, la glycolyse et l'ATP produit par la phosphorylation oxydative sont essentiels à la réplication virale (cf. Introduction). Le brunissement du SCAT est un moyen supplémentaire de réduire la production d'ATP au sein du tissu. En effet, les protons générés après  $\beta$ -oxydation sont déviés par UCP1 au profit de la thermogénèse (réduisant ainsi l'ATP produit par l'ATP synthase). De plus, l'activation de la thermogénèse dans le tissu adipeux sous-cutané pourrait améliorer l'efficacité de la réponse immunitaire en augmentant la température localement. Chez l'Homme, nous pourrions imaginer que l'induction du brunissement lors de l'infection par IAV (sous réserve que l'infection induit aussi le brunissement du SCAT chez l'Homme), pourrait également contribuer à la fièvre

mise en place pour lutter contre l'infection (le tissu adipeux brun ayant été impliqué dans l'induction de la fièvre (Morrison et al., 2012)).

Dans le contexte de l'**infection par SARS-CoV-2** dans le modèle du hamster (doré) Syrien, nos résultats renforcent l'intérêt de prendre en compte les tissus adipeux blancs dans la recherche de la compréhension de la physiopathologie des infections virales respiratoires.

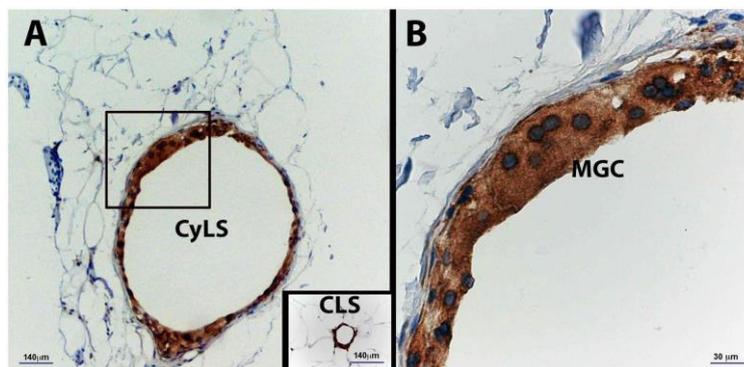
Outre confirmer que l'infection par SARS-CoV-2 est plus sévère chez les sujets âgés que chez les jeunes adultes (en termes de morbidité) (Bonanad et al., 2020; Yanez et al., 2020), nous mettons en effet en évidence que l'**infection par SARS-CoV-2** est associée à l'**augmentation de la lipolyse** (réduction de la taille des adipocytes) dans les dépôts sous-cutanés et viscéraux de tissus adipeux blancs, effet qui **persiste** à J22 uniquement chez les hamsters **âgés**. En cela, nos résultats sont en accord avec la littérature qui rapporte que l'infection par SARS-CoV-2 augmente la lipolyse du tissu adipeux blanc (Wu et al., 2020a; Zickler et al., 2021); participant ainsi aux importantes altérations du métabolisme lipidique systémique décrites chez des patients atteints de la COVID-19, notamment de ses formes les plus sévères (Casari et al., 2021; Schwarz et al., 2021; Song et al., 2020; Wu et al., 2020a).

De manière intéressante, la lipolyse basale du tissu adipeux blanc sous-cutané des animaux âgés est plus élevée que celle du tissu des animaux plus jeunes, et c'est justement dans ce dépôt (tissu adipeux sous-cutané) et dans ce groupe d'âge (individus âgés) que nous observons des structures comparables aux « **Crown-like structures** » (CLS) décrites dans les tissus adipeux blancs de sujets (souris et Homme) obèses (contexte dans lequel il y a également une augmentation de la lipolyse). En condition d'obésité, la majorité (90%) des macrophages proinflammatoires recrutés dans le tissu adipeux blanc s'organise en couronne (au niveau de laquelle les macrophages sont souvent fusionnés en syncytium) entourant la gouttelette lipidique résiduelle des adipocytes mourants ou morts : ce sont les CLS (**Figure 86**) (Cinti et al., 2005).



**Figure 86: Crown-like structures (CLS).** Histologie et immunohistochimie des structures en forme de couronne (CLS) (astérisques) présentes dans les tissus adipeux blancs de souris obèses. **A)** Macrophages entourant une gouttelette lipidique (marquage au bleu de toluidine). **B)** Marquage de la périlipine (immunomarquage), un marqueur des adipocytes vivants, absent des CLS. **C)** et **D)** respectivement, marquages de l'ADRP et de MAC2, deux marqueurs de macrophages fonctionnels. Échelle = 15 mm pour A et 25 mm pour B-D. Tiré de Cinti et al. 2006.

Cependant, les structures que nous observons dans le tissu adipeux blanc sous-cutané des hamsters âgés (à J7 et à J22) sont comparables, mais non identiques, aux CLS (*cf.* **Figure 83** page 158). En effet, leur taille est presque 10 fois plus importante que celle des CLS classiques. En cela, les structures que nous observons sont similaires aux « *Cyst-like-structures* » (CyLS) (**Figure 87**), qui ont été décrites dans le tissu adipeux blanc sous-cutané (et non viscéral, comme dans notre modèle) de patients obèses et diabétiques (Camastra et al., 2017)



**Figure 87: Cyst-like structures.** Images représentatives de coupes histologiques de SCAT d'individus obèses et diabétiques. **A)** CyLS formées de macrophages (marquage CD68) et de cellules géantes multinuclées (*multinucleated giant cells* = MGC) entourant des lipides ou un adipocyte hypertrophique. La taille énorme des CyLS est comparée à celle d'une CLS classique. **B)** Agrandissement de la partie encadrée sur le panel de gauche. Tiré de Camastra et al., 2017.

A ce stade, nous n'avons que des **hypothèses** (non mutuellement exclusives) pour expliquer la formation de ces CLS géantes : les CyLS, dans le tissu adipeux blanc sous-cutané (et non dans le dépôt viscéral) des hamsters âgés (et non chez les animaux plus jeunes) qui, remarquablement, persistent à distance de l'infection (J22).

- Il est connu que le vieillissement est associé à des altérations quantitatives et fonctionnelles des progéniteurs des adipocytes présents dans la fraction stromavasculaire du tissu adipeux blanc, notamment leur capacité à se différencier en adipocytes matures (De Carvalho et al., 2019). Ainsi, dans le SCAT des hamsters âgés, les adipocytes morts ne seraient pas remplacés par de nouveaux adipocytes formés par adipogenèse *in situ* : **défaut d'adipogenèse** dans le tissu adipeux sous-cutané des hamsters âgés.

- Le rôle essentiel des CLS est d'éliminer (*scavenger*) les débris d'adipocytes morts (*i.e.* essentiellement les lipides de la gouttelette lipidique), reconnus comme des corps étrangers, permettant ainsi le retour à l'homéostasie tissulaire. Le vieillissement altérant fonctionnellement les cellules immunes, dont les macrophages (Haynes, 2020; Mogilenko et al., 2021), y compris dans le tissu adipeux blanc (Lu et al., 2021), nous pouvons supposer un **défaut d'élimination des débris (*i.e.* gouttelette lipidique résiduelle) d'adipocytes morts** par les macrophages dysfonctionnels du tissu adipeux des hamsters âgés. Les différentes CLS à proximité les uns des autres fusionneraient ainsi en une CLS géante, entourée de syncytium de macrophages.

- Les CyLS ne sont observées que dans le dépôt sous-cutané de tissu adipeux blanc des hamsters âgés, et le seul groupe dans lequel du virus peut encore être détecté est le groupe tissu sous-cutané/hamsters âgés/J7 post-infection. Or, il est important de rappeler que la lipolyse basale de ce tissu est plus élevée chez les animaux âgés que chez les jeunes adultes. Compte-tenu du rôle des lipides dans le cycle de réplication du virus SARS-CoV-2, qui utilise les gouttelettes lipidiques comme plateforme de réplication virale (Dias et al., 2020; Nardacci et al., 2021; Theken et al., 2021), nous pouvons supposer que ces **CyLS géantes** sont une « réminiscence » des **adipocytes qui ont été infectés par le virus**.

En conclusion, les infections virales respiratoires, dont la grippe et la COVID-19, affectent principalement les voies respiratoires des sujets infectés, mais de nombreuses complications extra-pulmonaires peuvent survenir (associées ou non à la présence du virus dans les tissus impactés) (Sellers et al., 2017; Zheng et al., 2021). Étudier les effets des infections virales respiratoires sur d'autres organes que les poumons est donc essentiel à la compréhension de la physiopathologie des maladies respiratoires.

Depuis l'épidémie de grippe en 2009 ([H1N1]), et la découverte de l'obésité comme nouveau facteur de risque de développer des formes sévères de grippe (Kerkhove et al., 2011; Morgan et al., 2010; Sun et al., 2016), l'intérêt pour le rôle du tissu adipeux dans les maladies infectieuses n'a cessé de croître. Nos résultats sur les effets des infections par les virus influenza A et SARS-CoV-2 sur les tissus adipeux blancs renforcent l'importance de l'étude du tissu adipeux blanc en contexte infectieux. De surcroît, le tissu adipeux blanc est un site d'infection pour de nombreux pathogènes, dont les virus influenza et le SARS-CoV2 (Ayari et al., 2020; Barthelemy, Bogard & Wolowczuk, MS en préparation; Bourgeois et al., 2019; Martínez-Colón et al., 2021; Nishimura et al., 2000; Reiterer et al., 2021; Trim and Lynch, 2021; Zickler et al., 2021). Nous pouvons ainsi questionner l'intérêt d'un virus respiratoire à coloniser d'autres tissus/organes que les voies respiratoires. L'infection de tissus extra-pulmonaires pourrait être un effet secondaire de l'infection sans bénéfice particulier pour le virus ni effet sur le tissu impacté, ou pourrait favoriser la multiplication virale en augmentant le nombre de cellules productrices de virions (réplication d'IAV et de SARS-CoV2 dans les tissus adipeux blancs mais production de virions non évaluée). Le tissu adipeux blanc est d'ailleurs considéré comme un tissu réservoir contribuant à la sévérité de la maladie dans l'infection par le SARS-CoV2 (Martínez-Colón et al., 2021; Ryan and Caplice, 2020). Par ailleurs, le tissu adipeux blanc est déjà connu comme un tissu réservoir du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et simienne (SIV) (Damouche et al., 2015). Dans ce contexte, l'infection par le SIV induit une augmentation de la densité cellulaire de la fraction adipocytaire et de la SVF, avec notamment une augmentation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, et des macrophages (pro-inflammatoires).

Lors des infections virales respiratoires (virus IAV et SARS-CoV2), la présence du matériel génétique viral dans les tissus adipeux blancs soulève la question de la diffusion du virus au sein de l'organisme. L'hypothèse la plus courante est le

transport du virus par les cellules immunes *via* la circulation sanguine. Une autre possibilité, plus controversée, serait la diffusion du virus directement dans le sang induisant ainsi une virémie (Choi et al., 2012; Mori et al., 1995; Wagner, 1955; Wang et al., 2014). La virémie n'est pas observable chez tous les sujets infectés mais est associée à une sévérité accrue de la maladie (grippe et COVID-19) (Choi et al., 2012; Jacobs et al., 2021). Ceci suggère que la diffusion du virus dans l'organisme interviendrait principalement dans les formes modérées à sévères de la maladie. Une autre hypothèse possible est la diffusion du virus par infection de cellule à cellule voisine (Cifuentes-Muñoz et al., 2018).

Nos travaux démontrent l'importance de l'étude des effets des infections respiratoires sur les tissus adipeux blancs et surtout leur rôle dans la physiopathologie des infections. De façon intéressante, nous avons montré que des infections virales respiratoires ont un effet différent sur les tissus adipeux blancs (brunissement lors de l'infection par IAV de souris, apparition des CyLS lors de l'infection par SARS-CoV2 de hamsters). Nous avons également mis en évidence l'effet dépôt spécifique de ces infections sur les tissus adipeux blancs, soulignant l'importance d'étudier chaque dépôt de tissu adipeux blanc individuellement.

# Références bibliographiques

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2014). Cellular and Molecular Immunology E-Book (Elsevier Health Sciences).

Abdullahi, A., and Jeschke, M.G. (2016). White Adipose Tissue Browning: A Double-edged Sword. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27, 542–552.

Abdullahi, A., and Jeschke, M.G. (2017). Taming the Flames: Targeting White Adipose Tissue Browning in Hypermetabolic Conditions. *Endocr Rev* 38, 538–549.

Abdullahi, A., Chen, P., Stanojcic, M., Sadri, A.-R., Coburn, N., and Jeschke, M.G. (2017). IL-6 signal from the bone marrow is required for the browning of white adipose tissue post burn injury. *Shock* 47, 33–39.

Abdullahi, A., Samadi, O., Auger, C., Kanagalingam, T., Boehning, D., Bi, S., and Jeschke, M.G. (2019). Browning of white adipose tissue after a burn injury promotes hepatic steatosis and dysfunction. *Cell Death Dis* 10, 1–14.

Abed, Y., and Boivin, G. (2006). Treatment of respiratory virus infections. *Antiviral Res* 70, 1–16.

Albert, M.L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86–89.

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738.

Almanza, A., Carlesso, A., Chintla, C., Creedican, S., Doultzinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., et al. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal* 286, 241–278.

Almatrouk, S., Saba, I., Abozaid, S., Al-Qahtani, A.A., and Al-Ahdal, M.N. (2021). Virus sensing receptors in cellular infectivity of influenza A virus. *The Journal of Infection in Developing Countries* 15, 1–8.

Almond, M.H., Edwards, M.R., Barclay, W.S., and Johnston, S.L. (2013). Obesity and susceptibility to severe outcomes following respiratory viral infection. *Thorax* 68, 684–686.

Al-Mubarak, F., Daly, J., Christie, D., Fountain, D., and Dunham, S.P. (2015). Identification of morphological differences between avian influenza A viruses grown in chicken and duck cells. *Virus Research* 199, 9–19.

Alsuwaidi, A.R., Almarzooqi, S., Albawardi, A., Benedict, S., Kochiyil, J., Mustafa, F., Hartwig, S.M., Varga, S.M., and Souid, A.-K. (2013). Cellular bioenergetics, caspase activity and glutathione in murine lungs infected with influenza A virus. *Virology* 446, 180–188.

Altintas, M.M., Azad, A., Nayer, B., Contreras, G., Zaias, J., Faul, C., Reiser, J., and Nayer, A. (2011). Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *Journal of Lipid Research* 52, 480–488.

Altshuler-Keylin, S., Shinoda, K., Hasegawa, Y., Ikeda, K., Hong, H., Kang, Q., Yang, Y., Perera, R.M., Debnath, J., and Kajimura, S. (2016). Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metabolism* 24, 402–419.

Amatore, D., Sgarbanti, R., Aquilano, K., Baldelli, S., Limongi, D., Civitelli, L., Nencioni, L., Garaci, E., Ciriolo, M.R., and Palamara, A.T. (2015). Influenza virus replication in lung epithelial cells depends on redox-sensitive pathways activated by NOX4-derived ROS. *Cell Microbiol* 17, 131–145.

Ambrose, R.L., and Mackenzie, J.M. (2011). West Nile Virus Differentially Modulates the Unfolded Protein Response To Facilitate Replication and Immune Evasion. *Journal of Virology* 85, 2723–2732.

Amorim, M.J., Bruce, E.A., Read, E.K.C., Foeglein, Á., Mahen, R., Stuart, A.D., and Digard, P. (2011). A Rab11- and Microtubule-Dependent Mechanism for Cytoplasmic Transport of Influenza A Virus Viral RNA  $\nu$ . *J Virol* 85, 4143–4156.

Andrews, M.A., Areekal, B., Rajesh, K.R., Krishnan, J., Suryakala, R., Krishnan, B., Muraly, C.P., and Santhosh, P.V. (2020). First confirmed case of COVID-19 infection in India: A case report. *Indian J Med Res* 151, 490–492.

Armani, A., Cinti, F., Marzolla, V., Morgan, J., Cranston, G.A., Antelmi, A., Carpinelli, G., Canese, R., Pagotto, U., Quarta, C., et al. (2014). Mineralocorticoid receptor antagonism induces browning of white adipose tissue through impairment of autophagy and prevents adipocyte dysfunction in high-fat-diet-fed mice. *The FASEB Journal* 28, 3745–3757.

Armstrong, S.M., Wang, C., Tigdi, J., Si, X., Dumpit, C., Charles, S., Gamage, A., Moraes, T.J., and Lee, W.L. (2012). Influenza Infects Lung Microvascular Endothelium Leading to Microvascular Leak: Role of Apoptosis and Claudin-5. *PLOS ONE* 7, e47323.

Asha, K., and Kumar, B. (2019). Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far! *J Clin Med* 8.

Ayari, A., and Wolowczuk, I. (2017). Chapter 2 - Physiology and Pathophysiology of Adipose Tissue-Derived Cytokine Networks. In *Cytokine Effector Functions in Tissues*, M. Foti, and M. Locati, eds. (Academic Press), pp. 33–50.

Ayari, A., Rosa-Calatrava, M., Lancel, S., Barthelemy, J., Pizzorno, A., Mayeuf-Louchart, A., Baron, M., Hot, D., Deruyter, L., Soulard, D., et al. (2020). Influenza infection rewires energy metabolism and induces browning features in adipose cells and tissues. *Commun Biol* 3, 1–15.

Bahadoran, A., Bezavada, L., and Smallwood, H.S. (2020). Fueling influenza and the immune response: Implications for metabolic reprogramming during influenza infection and immunometabolism. *Immunological Reviews* 295, 140–166.

Balsa, E., Soustek, M.S., Thomas, A., Cogliati, S., García-Poyatos, C., Martín-García, E., Jedrychowski, M., Gygi, S.P., Enriquez, J.A., and Puigserver, P. (2019). ER and

Nutrient Stress Promote Assembly of Respiratory Chain Supercomplexes through the PERK-eIF2 $\alpha$  Axis. *Mol. Cell* 74, 877-890.e6.

Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J.P., De Matteis, R., and Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298, E1244–E1253.

Bargut, T.C.L., Souza-Mello, V., Aguila, M.B., and Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2017). Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 31.

Bartelt, A., and Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews Endocrinology* 10, 24–36.

Barthelemy, J., and Wolowczuk, I. (2020). Influenza A Virus Infection Induces White Adipose Tissue Browning: A Metabolic Adaptation to Infection? *Journal of Cellular Immunology* 2.

Baughn, L.B., Sharma, N., Elhaik, E., Sekulic, A., Bryce, A.H., and Fonseca, R. (2020). Targeting TMPRSS2 in SARS-CoV-2 Infection. *Mayo Clinic Proceedings* 95, 1989–1999.

Bedi, S., Noda, T., Kawaoka, Y., and Ono, A. (2018). A Defect in Influenza A Virus Particle Assembly Specific to Primary Human Macrophages. *MBio* 9.

Beiroa, D., Imbernon, M., Gallego, R., Senra, A., Herranz, D., Villarroya, F., Serrano, M., Fernø, J., Salvador, J., Escalada, J., et al. (2014). GLP-1 Agonism Stimulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Browning Through Hypothalamic AMPK. *Diabetes* 63, 3346–3358.

Benard, G., Bellance, N., Jose, C., and Rossignol, R. (2011). Relationships Between Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics. In *Mitochondrial Dynamics and Neurodegeneration*, B. Lu, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 47–68.

Bessis, S. (2020). Infections virales respiratoires (hors COVID-19). *Med Mal Infect* 50, 8S12-8S19.

Blanc, M., Hsieh, W.Y., Robertson, K.A., Kropp, K.A., Forster, T., Shui, G., Lacaze, P., Watterson, S., Griffiths, S.J., Spann, N.J., et al. (2013). The Transcription Factor STAT-1 Couples Macrophage Synthesis of 25-Hydroxycholesterol to the Interferon Antiviral Response. *Immunity* 38, 106–118.

Bonanad, C., García-Blas, S., Tarazona-Santabalbina, F., Sanchis, J., Bertomeu-González, V., Fácila, L., Ariza, A., Núñez, J., and Cordero, A. (2020). The Effect of Age on Mortality in Patients With COVID-19: A Meta-Analysis With 611,583 Subjects. *Journal of the American Medical Directors Association* 21, 915–918.

Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., De Marchi, E., Suski, J.M., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., et al. (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal* 8, 343–357.

Boon, M.R., Berg, S.A.A. van den, Wang, Y., Bossche, J. van den, Karkampouna, S., Bauwens, M., Saint-Hubert, M.D., Horst, G. van der, Vukicevic, S., Winther, M.P.J. de, et al. (2013). BMP7 Activates Brown Adipose Tissue and Reduces Diet-Induced Obesity Only at Subthermoneutrality. *PLOS ONE* 8, e74083.

Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., Dessì-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N., Sarzani, R., and Collins, S. (2012). Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest* 122, 1022–1036.

Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Boström, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., et al. (2012). A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481, 463–468.

Bourgeois, C., Gorwood, J., Barrail-Tran, A., Lagathu, C., Capeau, J., Desjardins, D., Le Grand, R., Damouche, A., Béréziat, V., and Lambotte, O. (2019). Specific Biological Features of Adipose Tissue, and Their Impact on HIV Persistence. *Frontiers in Microbiology* 10, 2837.

Bouvier, N.M., and Palese, P. (2008). THE BIOLOGY OF INFLUENZA VIRUSES. *Vaccine* 26, D49–D53.

Bouwman, J.J.M., Visseren, F.L.J., Bouter, K.P., and Diepersloot, R.J.A. (2008). Infection-induced inflammatory response of adipocytes in vitro. *Int J Obes* 32, 892–901.

Boyden, A.W., Legge, K.L., and Waldschmidt, T.J. (2012). Pulmonary Infection with Influenza A Virus Induces Site-Specific Germinal Center and T Follicular Helper Cell Responses. *PLOS ONE* 7, e40733.

Brand, J.M.A. van den, Stittelaar, K.J., Amerongen, G. van, Reperant, L., Waal, L. de, Osterhaus, A.D.M.E., and Kuiken, T. (2012). Comparison of Temporal and Spatial Dynamics of Seasonal H3N2, Pandemic H1N1 and Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus Infections in Ferrets. *PLOS ONE* 7, e42343.

Brandão, B.B., Poojari, A., and Rabiee, A. (2021). Thermogenic Fat: Development, Physiological Function, and Therapeutic Potential. *Int J Mol Sci* 22, 5906.

Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z.V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., et al. (2013). Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response: Dynamics and Metabolic Integration. *Int Rev Cell Mol Biol* 301, 215–290.

Bravo-Vasquez, N., and Schultz-Cherry, S. (2021). Avian Influenza Viruses (Orthomyxoviridae). In *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)*, D.H. Bamford, and M. Zuckerman, eds. (Oxford: Academic Press), pp. 117–121.

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

- Brondani, L. de A., Assmann, T.S., Duarte, G.C.K., Gross, J.L., Canani, L.H., and Crispim, D. (2012). The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab* 56, 215–225.
- Byrd-Leotis, L., Cummings, R.D., and Steinhauer, D.A. (2017). The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase. *Int J Mol Sci* 18, 1541.
- Cairó, M., Villarroya, J., Cereijo, R., Campderrós, L., Giralt, M., and Villarroya, F. (2016). Thermogenic activation represses autophagy in brown adipose tissue. *Int J Obes* 40, 1591–1599.
- Calderon-Dominguez, M., Sebastián, D., Fucho, R., Weber, M., Mir, J.F., García-Casarrubios, E., Obregón, M.J., Zorzano, A., Valverde, Á.M., Serra, D., et al. (2016). Carnitine Palmitoyltransferase 1 Increases Lipolysis, UCP1 Protein Expression and Mitochondrial Activity in Brown Adipocytes. *PLOS ONE* 11, e0159399.
- Camastra, S., Vitali, A., Anselmino, M., Gastaldelli, A., Bellini, R., Berta, R., Severi, I., Baldi, S., Astiarraga, B., Barbatelli, G., et al. (2017). Muscle and adipose tissue morphology, insulin sensitivity and beta-cell function in diabetic and nondiabetic obese patients: effects of bariatric surgery. *Sci Rep* 7, 9007.
- Camp, J.V., and Jonsson, C.B. (2017). A Role for Neutrophils in Viral Respiratory Disease. *Front Immunol* 8.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews* 84, 277–359.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2021). A PERKy way to make mitochondrial cristae. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 32, 417–419.
- Cao, L., Choi, E.Y., Liu, X., Martin, A., Wang, C., Xu, X., and During, M.J. (2011). White to Brown Fat Phenotypic Switch Induced by Genetic and Environmental Activation of a Hypothalamic-Adipocyte Axis. *Cell Metabolism* 14, 324–338.
- Carmona, F., Carlotti, A.P.C.P., Ramalho, L.N.Z., Costa, R.S., and Ramalho, F.S. (2011). Evidence of Renal Infection in Fatal Cases of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1). *American Journal of Clinical Pathology* 136, 416–423.
- Carpenter, J.E., Jackson, W., Benetti, L., and Grose, C. (2011). Autophagosome Formation during Varicella-Zoster Virus Infection following Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response. *Journal of Virology* 85, 9414–9424.
- Carrat, F., Vergu, E., Ferguson, N.M., Lemaître, M., Cauchemez, S., Leach, S., and Valleron, A.-J. (2008). Time Lines of Infection and Disease in Human Influenza: A Review of Volunteer Challenge Studies. *American Journal of Epidemiology* 167, 775–785.
- Casari, I., Manfredi, M., Metharom, P., and Falasca, M. (2021). Dissecting lipid metabolism alterations in SARS-CoV-2. *Progress in Lipid Research* 82, 101092.

de Castro Martin, I.F., Fournier, G., Sachse, M., Pizarro-Cerda, J., Risco, C., and Naffakh, N. (2017). Influenza virus genome reaches the plasma membrane via a modified endoplasmic reticulum and Rab11-dependent vesicles. *Nature Communications* 8, 1396.

Catanzaro, N., and Meng, X.-J. (2020). Induction of the unfolded protein response (UPR) suppresses porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) replication. *Virus Research* 276, 197820.

Caussy, C., Wallet, F., Laville, M., and Disse, E. (2020). Obesity is Associated with Severe Forms of COVID-19. *Obesity* 28, 1175–1175.

Cava, A.L., and Matarese, G. (2004). The weight of leptin in immunity. *Nature Reviews Immunology* 4, 371–379.

CDC (2019). Types of Influenza Viruses.

CDC (2021a). People at High Risk of Flu.

CDC (2021b). Influenza Antiviral Medications: Clinician Summary.

Cereijo, R., Gavaldà-Navarro, A., Cairó, M., Quesada-López, T., Villarroya, J., Morón-Ros, S., Sánchez-Infantes, D., Peyrou, M., Iglesias, R., Mampel, T., et al. (2018). CXCL14, a Brown Adipokine that Mediates Brown-Fat-to-Macrophage Communication in Thermogenic Adaptation. *Cell Metabolism* 28, 750-763.e6.

Chan, S.-W. (2014a). Unfolded protein response in hepatitis C virus infection. *Front Microbiol* 5, 233.

Chan, S.-W. (2014b). The unfolded protein response in virus infections. *Frontiers in Microbiology* 5, 518.

Chan, J.F.-W., Zhang, A.J., Yuan, S., Poon, V.K.-M., Chan, C.C.-S., Lee, A.C.-Y., Chan, W.-M., Fan, Z., Tsoi, H.-W., Wen, L., et al. (2020a). Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility. *Clinical Infectious Diseases* 71, 2428–2446.

Chan, J.F.-W., Yuan, S., Zhang, A.J., Poon, V.K.-M., Chan, C.C.-S., Lee, A.C.-Y., Fan, Z., Li, C., Liang, R., Cao, J., et al. (2020b). Surgical Mask Partition Reduces the Risk of Noncontact Transmission in a Golden Syrian Hamster Model for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clinical Infectious Diseases* 71, 2139–2149.

Chathappady House, N.N., Palissery, S., and Sebastian, H. (2021). Corona Viruses: A Review on SARS, MERS and COVID-19. *Microbiol Insights* 14, 11786361211002480.

Chaves, A.J., Busquets, N., Valle, R., Rivas, R., Vergara-Alert, J., Dolz, R., Ramis, A., Darji, A., and Majó, N. (2011). Neuropathogenesis of a highly pathogenic avian influenza virus (H7N1) in experimentally infected chickens. *Veterinary Research* 42, 106.

Chaves, A.J., Vergara-Alert, J., Busquets, N., Valle, R., Rivas, R., Ramis, A., Darji, A., and Majó, N. (2014). Neuroinvasion of the Highly Pathogenic Influenza Virus H7N1

Is Caused by Disruption of the Blood Brain Barrier in an Avian Model. *PLOS ONE* 9, e115138.

Chen, C., Dudenhausen, E., Chen, H., Pan, Y.-X., Gjymishka, A., and Kilberg, M.S. (2005). Amino-acid limitation induces transcription from the human C/EBP $\beta$  gene via an enhancer activity located downstream of the protein coding sequence. *Biochem J* 391, 649–658.

Chen, H.Y., Liu, Q., Salter, A.M., and Lomax, M.A. (2013). Synergism between cAMP and PPAR $\gamma$  Signalling in the Initiation of UCP1 Gene Expression in HIB1B Brown Adipocytes. *PPAR Res* 2013, 476049.

Chen, X., Liu, S., Goraya, M.U., Maarouf, M., Huang, S., and Chen, J.-L. (2018). Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Front Immunol* 9.

Chen, Y., Zhao, M., Zheng, T., Adlat, S., Jin, H., Wang, C., Li, D., Zaw Myint, M.Z., Yao, Y., Xu, L., et al. (2019). Repression of adipose vascular endothelial growth factor reduces obesity through adipose browning. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 316, E145–E155.

Cheng, C.-F., Ku, H.-C., Cheng, J.-J., Chao, S.-W., Li, H.-F., Lai, P.-F., Chang, C.-C., Don, M.-J., Chen, H.-H., and Lin, H. (2019). Adipocyte browning and resistance to obesity in mice is induced by expression of ATF3. *Communications Biology* 2, 1–18.

Cheng, L., Wang, J., Dai, H., Duan, Y., An, Y., Shi, L., Lv, Y., Li, H., Wang, C., Ma, Q., et al. (2021). Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. *Adipocyte* 10, 48–65.

Chevalier, C., Stojanović, O., Colin, D.J., Suarez-Zamorano, N., Tarallo, V., Veyrat-Durebex, C., Rigo, D., Fabbiano, S., Stevanović, A., Hagemann, S., et al. (2015). Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold. *Cell* 163, 1360–1374.

Chinn, I.K., Blackburn, C.C., Manley, N.R., and Sempowski, G.D. (2012). Changes in Primary Lymphoid Organs With Aging. *Semin Immunol* 24, 309–320.

Cho, Y.M., Kim, D.H., Kwak, S.-N., Jeong, S.-W., and Kwon, O.-J. (2013). X-box binding protein 1 enhances adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells through the downregulation of Wnt10b expression. *FEBS Letters* 587, 1644–1649.

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

Choi, S.-M., Xie, H., Campbell, A.P., Kuypers, J., Leisenring, W., Boudreault, A.A., Englund, J.A., Corey, L., and Boeckh, M. (2012). Influenza Viral RNA Detection in Blood as a Marker to Predict Disease Severity in Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *The Journal of Infectious Diseases* 206, 1872–1877.

Chouchani, E.T., Kazak, L., Jedrychowski, M.P., Lu, G.Z., Erickson, B.K., Szpyt, J., Pierce, K.A., Laznik-Bogoslavski, D., Vetrivelan, R., Clish, C.B., et al. (2016).

Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature* *532*, 112–116.

Cifuentes-Muñoz, N., Dutch, R.E., and Cattaneo, R. (2018). Direct cell-to-cell transmission of respiratory viruses: The fast lanes. *PLOS Pathogens* *14*, e1007015.

Cinti, S. (2018). Pink Adipocytes. *Trends in Endocrinology & Metabolism* *29*, 651–666.

Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research* *46*, 2347–2355.

Cocoros, N.M., Lash, T.L., DeMaria, A., and Klompas, M. (2014). Obesity as a risk factor for severe influenza-like illness. *Influenza and Other Respiratory Viruses* *8*, 25–32.

Conceição, C.L.B.T. da (2019). Role of budding morphology in pathogenesis and transmission of avian influenza A virus.

Contreras, C., González-García, I., Seoane-Collazo, P., Martínez-Sánchez, N., Liñares-Pose, L., Rial-Pensado, E., Fernø, J., Tena-Sempere, M., Casals, N., Diéguez, C., et al. (2017). Reduction of Hypothalamic Endoplasmic Reticulum Stress Activates Browning of White Fat and Ameliorates Obesity. *Diabetes* *66*, 87–99.

Cousin, B., Bascands- Viguerie, N., Kassis, N., Nibbelink, M., Ambid, L., Casteilla, L., and Pénicaud, L. (1996). Cellular changes during cold acclimation in adipose tissues. *Journal of Cellular Physiology* *167*, 285–289.

Cox, R.J., Brokstad, K.A., and Ogra, P. (2004). Influenza Virus: Immunity and Vaccination Strategies. Comparison of the Immune Response to Inactivated and Live, Attenuated Influenza Vaccines. *Scandinavian Journal of Immunology* *59*, 1–15.

Crunfli, F., Carregari, V.C., Veras, F.P., Vendramini, P.H., Valença, A.G.F., Antunes, A.S.L.M., Brandão-Teles, C., Zuccoli, G. da S., Reis-de-Oliveira, G., Silva-Costa, L.C., et al. (2021). SARS-CoV-2 infects brain astrocytes of COVID-19 patients and impairs neuronal viability.

Cuevas-Ramos, D., Almeda-Valdés, P., Meza-Arana, C.E., Brito-Córdova, G., Gómez-Pérez, F.J., Mehta, R., Oseguera-Moguel, J., and Aguilar-Salinas, C.A. (2012). Exercise Increases Serum Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Levels. *PLOS ONE* *7*, e38022.

Damouche, A., Lazure, T., Avettand-Fènoël, V., Huot, N., Dejuq-Rainsford, N., Satie, 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 Pathogens* *11*, e1005153.

Dash, S., Chava, S., Aydin, Y., Chandra, P.K., Ferraris, P., Chen, W., Balart, L.A., Wu, T., and Garry, R.F. (2016). Hepatitis C Virus Infection Induces Autophagy as a Prosurvival Mechanism to Alleviate Hepatic ER-Stress Response. *Viruses* *8*, 150.

Dash, S., Aydin, Y., and Wu, T. (2019). Integrated stress response in hepatitis C promotes Nrf2-related chaperone-mediated autophagy: A novel mechanism for host-microbe survival and HCC development in liver cirrhosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.

De Carvalho, F.G., Justice, J.N., Freitas, E.C. de, Kershaw, E.E., and Sparks, L.M. (2019). Adipose Tissue Quality in Aging: How Structural and Functional Aspects of Adipose Tissue Impact Skeletal Muscle Quality. *Nutrients* *11*, 2553.

Denney, L., and Ho, L.-P. (2018). The role of respiratory epithelium in host defence against influenza virus infection. *Biomedical Journal* *41*, 218–233.

Derakhshan, M., Willcocks, M.M., Salako, M.A., Kass, G.E.N., and Carter, M.J.Y. 2006 Human herpesvirus 1 protein US3 induces an inhibition of mitochondrial electron transport. *Journal of General Virology* *87*, 2155–2159.

Dhurandhar, N.V. (2001). Infectobesity: Obesity of Infectious Origin. *J Nutr* *131*, 2794S–2797S.

Dias, S.S.G., Soares, V.C., Ferreira, A.C., Sacramento, C.Q., Fintelman-Rodrigues, N., Temerozo, J.R., Teixeira, L., Silva, M.A.N. da, Barreto, E., Mattos, M., et al. (2020). Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. *PLOS Pathogens* *16*, e1009127.

Diaz Marin, R., Crespo-Garcia, S., Wilson, A.M., and Sapienza, P. (2019). RELi protocol: Optimization for protein extraction from white, brown and beige adipose tissues. *MethodsX* *6*, 918–928.

Diebold, S.S. (2008). Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors. *Advanced Drug Delivery Reviews* *60*, 813–823.

Dodd, G.T., Decherf, S., Loh, K., Simonds, S.E., Wiede, F., Balland, E., Merry, T.L., Münzberg, H., Zhang, Z.-Y., Kahn, B.B., et al. (2015). Leptin and Insulin Act on POMC Neurons to Promote the Browning of White Fat. *Cell* *160*, 88–104.

Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., and Daniels, R. (2018). Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front. Immunol.* *9*.

Douris, N., Stevanovic, D.M., Fisher, M., Ffolliott M., Cisu, T.I., Chee, M.J., Nguyen, N.L., Zarebidaki, E., Adams, A.C., Kharitononkov, A., Flier, J.S., et al. (2015). Central Fibroblast Growth Factor 21 Browns White Fat via Sympathetic Action in Male Mice. *Endocrinology* *156*, 2470–2481.

Ducatez, M.F., Pelletier, C., and Meyer, G. (2015). Influenza D Virus in Cattle, France, 2011–2014. *Emerg Infect Dis* *21*, 368–371.

Durfee, L.A., Lyon, N., Seo, K., and Huibregtse, J.M. (2010). The ISG15 Conjugation System Broadly Targets Newly Synthesized Proteins: Implications for the Antiviral Function of ISG15. *Molecular Cell* *38*, 722–732.

During, M.J., Liu, X., Huang, W., Magee, D., Slater, A., McMurphy, T., Wang, C., and Cao, L. (2015). Adipose VEGF Links the White-to-Brown Fat Switch With

Environmental, Genetic, and Pharmacological Stimuli in Male Mice. *Endocrinology* 156, 2059–2073.

Duteil, D., Metzger, E., Willmann, D., Karagianni, P., Friedrichs, N., Greschik, H., Günther, T., Buettner, R., Talianidis, I., Metzger, D., et al. (2014). LSD1 promotes oxidative metabolism of white adipose tissue. *Nat Commun* 5, 4093.

Duteil, D., Tomic, M., Lausecker, F., Nenseth, H.Z., Müller, J.M., Urban, S., Willmann, D., Petroll, K., Messaddeq, N., Arrigoni, L., et al. (2016). Lsd1 Ablation Triggers Metabolic Reprogramming of Brown Adipose Tissue. *Cell Reports* 17, 1008–1021.

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

Ellulu, M.S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., and Abed, Y. (2017). Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch Med Sci* 13, 851–863.

Evans, D.T., Serra-Moreno, R., Singh, R.K., and Guatelli, J.C. (2010). BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses. *Trends in Microbiology* 18, 388–396.

Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B.C., Cavener, D.R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Volpi, C., et al. (2006). The Combined Effects of Tryptophan Starvation and Tryptophan Catabolites Down-Regulate T Cell Receptor  $\zeta$ -Chain and Induce a Regulatory Phenotype in Naive T Cells. *The Journal of Immunology* 176, 6752–6761.

Fang, S., Suh, J.M., Reilly, S.M., Yu, E., Osborn, O., Lackey, D., Yoshihara, E., Perino, A., Jacinto, S., Lukasheva, Y., et al. (2015). Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nat Med* 21, 159–165.

Fasshauer, M., and Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 36, 461–470.

Fedorenko, A., Lishko, P.V., and Kirichok, Y. (2012). Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *Cell* 151, 400–413.

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

Fenzl, A., Kulterer, O.C., Spirk, K., Mitulović, G., Marculescu, R., Bilban, M., Baumgartner-Parzer, S., Kautzky-Willer, A., Kenner, L., Plutzky, J., et al. (2020). Intact vitamin A transport is critical for cold-mediated adipose tissue browning and thermogenesis. *Molecular Metabolism* 42, 101088.

Ferrandon, D., Imler, J.-L., and Hoffmann, J.A. (2004). Sensing infection in *Drosophila*: Toll and beyond. *Seminars in Immunology* 16, 43–53.

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

Filgueiras-Rama, D., Vasilijevic, J., Jalife, J., Noujaim, S.F., Alfonso, J.M., Nicolas-Avila, J.A., Gutierrez, C., Zamarreño, N., Hidalgo, A., Bernabé, A., et al. (2021). Human influenza A virus causes myocardial and cardiac-specific conduction system infections associated with early inflammation and premature death. *Cardiovascular Research* 117, 876–889.

Finlin, B.S., Zhu, B., Confides, A.L., Westgate, P.M., Harfmann, B.D., Dupont-Versteegden, E.E., and Kern, P.A. (2017). Mast Cells Promote Seasonal White Adipose Beiging in Humans. *Diabetes* 66, 1237–1246.

Fischer, K., Ruiz, H.H., Jhun, K., Finan, B., Oberlin, D.J., van der Heide, V., Kalinovich, A.V., Petrovic, N., Wolf, Y., Clemmensen, C., et al. (2017). Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nature Medicine* 23, 623–630.

Fisher, M., Ffolliott M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26, 271–281.

Fislová, T., Gocník, M., Sládková, T., Ďurmanová, V., Rajčáni, J., Varečková, E., Mucha, V., and Kostolanský, F. (2009). Multiorgan distribution of human influenza A virus strains observed in a mouse model. *Arch Virol* 154, 409–419.

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

Frasca, D., and Blomberg, B.B. (2020). Adipose tissue, immune aging and cellular senescence. *Semin Immunopathol* 42, 573–587.

Fritsch, S.D., and Weichhart, T. (2016). Effects of Interferons and Viruses on Metabolism. *Front. Immunol.* 7.

Fulop, T., Larbi, A., Dupuis, G., Le Page, A., Frost, E.H., Cohen, A.A., Witkowski, J.M., and Franceschi, C. (2018). Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Front Immunol* 8, 1960.

Fun, X.H., and Thibault, G. (2020). Lipid bilayer stress and proteotoxic stress-induced unfolded protein response deploy divergent transcriptional and non-transcriptional programmes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1865, 158449.

Funcke, J.-B., and Scherer, P.E. (2019). Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication. *Journal of Lipid Research* 60, 1648–1697.

- Fuster, J.J., Ouchi, N., Gokce, N., and Walsh, K. (2016). Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circulation Research* 118, 1786–1807.
- Gaelings, L., Söderholm, S., Bugai, A., Fu, Y., Nandania, J., Schepens, B., Lorey, M.B., Tynell, J., Ginste, L.V., Goffic, R.L., et al. (2017). Regulation of kynurenine biosynthesis during influenza virus infection. *The FEBS Journal* 284, 222–236.
- Gandhi, R.T., Lynch, J.B., and del Rio, C. (2020). Mild or Moderate Covid-19. *New England Journal of Medicine* 383, 1757–1766.
- Gao, Y., Qimuge, N.R., Qin, J., Cai, R., Li, X., Chu, G.Y., Pang, W.J., and Yang, G.S. (2018). Acute and chronic cold exposure differentially affects the browning of porcine white adipose tissue. *Animal* 12, 1435–1441.
- Gao, Z., Xu, Y., Sun, C., Wang, X., Guo, Y., Qiu, S., and Ma, K. (2021). A systematic review of asymptomatic infections with COVID-19. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 54, 12–16.
- García-Alonso, V., López-Vicario, C., Titos, E., Morán-Salvador, E., González-Pérez, A., Rius, B., Párrizas, M., Werz, O., Arroyo, V., and Clària, J. (2013). Coordinate Functional Regulation between Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 (mPGES-1) and Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in the Conversion of White-to-brown Adipocytes\*. *Journal of Biological Chemistry* 288, 28230–28242.
- Gaudry, M.J., and Campbell, K.L. (2017). Evolution of UCP1 Transcriptional Regulatory Elements Across the Mammalian Phylogeny. *Frontiers in Physiology* 8, 670.
- Ge, X., Sathiakumar, D., Lua, B.J.G., Kukreti, H., Lee, M., and McFarlane, C. (2017). Myostatin signals through miR-34a to regulate Fndc5 expression and browning of white adipocytes. *Int J Obes* 41, 137–148.
- Gesta, S., Tseng, Y.-H., and Kahn, C.R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* 131, 242–256.
- GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., et al. (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b– but not plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 205, 1621–1634.
- Gharanei, S., Shabir, K., Brown, J.E., Weickert, M.O., Barber, T.M., Kyrou, I., and Randeva, H.S. (2020). Regulatory microRNAs in Brown, Brite and White Adipose Tissue. *Cells* 9, 2489.
- Ghebrehewet, S., MacPherson, P., and Ho, A. (2016). Influenza. *BMJ* 355, i6258.
- Gold, E.S., Diercks, A.H., Podolsky, I., Podyminogin, R.L., Askovich, P.S., Treuting, P.M., and Aderem, A. (2014). 25-Hydroxycholesterol acts as an amplifier of inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 10666–10671.

- Goraya, M.U., Zaighum, F., Sajjad, N., Anjum, F.R., Sakhawat, I., and Rahman, S. ur (2020). Web of interferon stimulated antiviral factors to control the influenza A viruses replication. *Microbial Pathogenesis* 139, 103919.
- Grmek, M.D. (1993). [The concept of emerging disease]. *Hist Philos Life Sci* 15, 281–296.
- Guan, H.-P., Li, Y., Jensen, M.V., Newgard, C.B., Steppan, C.M., and Lazar, M.A. (2002). A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med* 8, 1122–1128.
- Guillot, L., Le Goffic, R., Bloch, S., Escriou, N., Akira, S., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2005). Involvement of Toll-like Receptor 3 in the Immune Response of Lung Epithelial Cells to Double-stranded RNA and Influenza A Virus\*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 5571–5580.
- Guo, H., Kumar, P., Moran, T.M., Garcia-Sastre, A., Zhou, Y., and Malarkannan, S. (2009). The functional impairment of natural killer cells during influenza virus infection. *Immunology & Cell Biology* 87, 579–589.
- Gupte, M., Boustany-Kari, C.M., Bharadwaj, K., Police, S., Thatcher, S., Gong, M.C., English, V.L., and Cassis, L.A. (2008). ACE2 is expressed in mouse adipocytes and regulated by a high-fat diet. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295, R781–R788.
- Han, J., Murthy, R., Wood, B., Song, B., Wang, S., Sun, B., Malhi, H., and Kaufman, R.J. (2013). ER stress signalling through eIF2 $\alpha$  and CHOP, but not IRE1 $\alpha$ , attenuates adipogenesis in mice. *Diabetologia* 56, 911–924.
- 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.
- Hanatani, S., Motoshima, H., Takaki, Y., Kawasaki, S., Igata, M., Matsumura, T., Kondo, T., Senokuchi, T., Ishii, N., Kawashima, J., et al. (2016). Acetate alters expression of genes involved in beige adipogenesis in 3T3-L1 cells and obese KK-Ay mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 59, 207–214.
- Hao, X., Kim, T.S., and Braciale, T.J. (2008). Differential Response of Respiratory Dendritic Cell Subsets to Influenza Virus Infection. *Journal of Virology* 82, 4908–4919.
- Harms, P.W., Schmidt, L.A., Smith, L.B., Newton, D.W., Pletneva, M.A., Walters, L.L., Tomlins, S.A., Fisher-Hubbard, A., Napolitano, L.M., Park, P.K., et al. (2010). Autopsy Findings in Eight Patients With Fatal H1N1 Influenza. *American Journal of Clinical Pathology* 134, 27–35.
- Hassan, I.H., Zhang, M.S., Powers, L.S., Shao, J.Q., Baltrusaitis, J., Rutkowski, D.T., Legge, K., and Monick, M.M. (2012). Influenza A Viral Replication Is Blocked by Inhibition of the Inositol-requiring Enzyme 1 (IRE1) Stress Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 287, 4679–4689.

- Hatefi, Y. (1993). ATP synthesis in mitochondria. *European Journal of Biochemistry* *218*, 759–767.
- Hatta, M., Halfmann, P., Wells, K., and Kawaoka, Y. (2002). Human Influenza A Viral Genes Responsible for the Restriction of Its Replication in Duck Intestine. *Virology* *295*, 250–255.
- Hause, B.M., Ducatez, M., Collin, E.A., Ran, Z., Liu, R., Sheng, Z., Armien, A., Kaplan, B., Chakravarty, S., Hoppe, A.D., et al. (2013). Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses. *PLOS Pathogens* *9*, e1003176.
- Haynes, L. (2020). Aging of the Immune System: Research Challenges to Enhance the Health Span of Older Adults. *Frontiers in Aging* *1*, 2.
- He, X., Cheng, X., Feng, X., Wan, H., Chen, S., and Xiong, M. (2021). Clinical Symptom Differences Between Mild and Severe COVID-19 Patients in China: A Meta-Analysis. *Frontiers in Public Health* *8*, 954.
- Hegde, V., and Dhurandhar, N.V. (2013). Microbes and obesity—interrelationship between infection, adipose tissue and the immune system. *Clinical Microbiology and Infection* *19*, 314–320.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* *303*, 1526–1529.
- Hemann, E.A., Sjaastad, L.E., Langlois, R.A., and Legge, K.L. (2016). Plasmacytoid Dendritic Cells Require Direct Infection To Sustain the Pulmonary Influenza A Virus-Specific CD8 T Cell Response. *Journal of Virology* *90*, 2830–2837.
- Herold, S., Wulffen, W. von, Steinmueller, M., Pleschka, S., Kuziel, W.A., Mack, M., Srivastava, M., Seeger, W., Maus, U.A., and Lohmeyer, J. (2006). Alveolar Epithelial Cells Direct Monocyte Transepithelial Migration upon Influenza Virus Infection: Impact of Chemokines and Adhesion Molecules. *The Journal of Immunology* *177*, 1817–1824.
- Hetz, C., Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* *21*, 421–438.
- Himms-Hagen, J. (1984). Nonshivering thermogenesis. *Brain Research Bulletin* *12*, 151–160.
- Hirose, R., Daidoji, T., Naito, Y., Watanabe, Y., Arai, Y., Oda, T., Konishi, H., Yamawaki, M., Itoh, Y., and Nakaya, T. (2016). Long-term detection of seasonal influenza RNA in faeces and intestine. *Clinical Microbiology and Infection* *22*, 813.e1-813.e7.
- Hoeve, M.A., Nash, A.A., Jackson, D., Randall, R.E., and Dransfield, I. (2012). Influenza Virus A Infection of Human Monocyte and Macrophage Subpopulations Reveals Increased Susceptibility Associated with Cell Differentiation. *PLOS ONE* *7*, e29443.

- Holm, C.K., Rahbek, S.H., Gad, H.H., Bak, R.O., Jakobsen, M.R., Jiang, Z., Hansen, A.L., Jensen, S.K., Sun, C., Thomsen, M.K., et al. (2016). Influenza A virus targets a cGAS-independent STING pathway that controls enveloped RNA viruses. *Nature Communications* 7, 10680.
- Honce, R., and Schultz-Cherry, S. (2019). Impact of Obesity on Influenza A Virus Pathogenesis, Immune Response, and Evolution. *Front. Immunol.* 10.
- Honce, R., Karlsson, E.A., Wohlgemuth, N., Estrada, L.D., Meliopoulos, V.A., Yao, J., and Schultz-Cherry, S. (2020). Obesity-Related Microenvironment Promotes Emergence of Virulent Influenza Virus Strains. *MBio* 11.
- Horsfall, F.L., Jr., and Lennette, E.H. (1940). THE SYNERGISM OF HUMAN INFLUENZA AND CANINE DISTEMPER VIRUSES IN FERRETS. *Journal of Experimental Medicine* 72, 247–259.
- Hosseini, S., Wilk, E., Michaelsen-Preusse, K., Gerhauser, I., Baumgärtner, W., Geffers, R., Schughart, K., and Korte, M. (2018). Long-Term Neuroinflammation Induced by Influenza A Virus Infection and the Impact on Hippocampal Neuron Morphology and Function. *J. Neurosci.* 38, 3060–3080.
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., and Spiegelman, B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95, 2409–2415.
- Houser, K., and Subbarao, K. (2015). Influenza Vaccines: Challenges and Solutions. *Cell Host Microbe* 17, 295–300.
- Hrincius, E.R., Liedmann, S., Finkelstein, D., Vogel, P., Gansebom, S., Samarasinghe, A.E., You, D., Cormier, S.A., and McCullers, J.A. (2015). Acute Lung Injury Results from Innate Sensing of Viruses by an ER Stress Pathway. *Cell Reports* 11, 1591–1603.
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., and Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 19, 141–154.
- Hu, F., Wang, M., Xiao, T., Yin, B., He, L., Meng, W., Dong, M., and Liu, F. (2015). miR-30 Promotes Thermogenesis and the Development of Beige Fat by Targeting RIP140. *Diabetes* 64, 2056–2068.
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., et al. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* 395, 497–506.
- Huang, Z., Zhong, L., Lee, J.T.H., Zhang, J., Wu, D., Geng, L., Wang, Y., Wong, C.-M., and Xu, A. (2017). The FGF21-CCL11 Axis Mediates Beiging of White Adipose Tissues by Coupling Sympathetic Nervous System to Type 2 Immunity. *Cell Metabolism* 26, 493-508.e4.
- Hufford, M., Richardson, G., Zhou, H., Manicassamy, B., García-Sastre, A., Enelow, R., and Braciale, T. (2012). Influenza-Infected Neutrophils within the Infected Lungs Act as Antigen Presenting Cells for Anti-Viral CD8+ T Cells. *PloS One*.

- Huh, J.Y., Park, Y.J., Ham, M., and Kim, J.B. (2014). Crosstalk between Adipocytes and Immune Cells in Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysregulation in Obesity. *Mol Cells* 37, 365–371.
- Hui, X., Gu, P., Zhang, J., Nie, T., Pan, Y., Wu, D., Feng, T., Zhong, C., Wang, Y., Lam, K.S.L., et al. (2015). Adiponectin Enhances Cold-Induced Browning of Subcutaneous Adipose Tissue via Promoting M2 Macrophage Proliferation. *Cell Metabolism* 22, 279–290.
- Ibrahim, M.M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews* 11, 11–18.
- Ibricevic, A., Pekosz, A., Walter, M.J., Newby, C., Battaile, J.T., Brown, E.G., Holtzman, M.J., and Brody, S.L. (2006). Influenza Virus Receptor Specificity and Cell Tropism in Mouse and Human Airway Epithelial Cells. *Journal of Virology* 80, 7469–7480.
- Ikeda, K., and Yamada, T. (2020). UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes. *Frontiers in Endocrinology* 11, 498.
- Imai, M., Iwatsuki-Horimoto, K., Hatta, M., Loeber, S., Halfmann, P.J., Nakajima, N., Watanabe, T., Ujie, M., Takahashi, K., Ito, M., et al. (2020). Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *PNAS* 117, 16587–16595.
- Ito, T., Kobayashi, Y., Morita, T., Horimoto, T., and Kawaoka, Y. (2002). Virulent influenza A viruses induce apoptosis in chickens. *Virus Research* 84, 27–35.
- Iwasaki, A., and Pillai, P.S. (2014). Innate immunity to influenza virus infection. *Nature Reviews Immunology* 14, 315–328.
- Iwatsuki-Horimoto, K., Nakajima, N., Kiso, M., Takahashi, K., Ito, M., Inoue, T., Horiuchi, M., Okahara, N., Sasaki, E., Hasegawa, H., et al. (2018). The Marmoset as an Animal Model of Influenza: Infection With A(H1N1)pdm09 and Highly Pathogenic A(H5N1) Viruses via the Conventional or Tracheal Spray Route. *Frontiers in Microbiology* 9, 844.
- Jacobs, J.L., Bain, W., Naqvi, A., Staines, B., Castanha, P.M.S., Yang, H., Boltz, V.F., Barratt-Boyes, S., Marques, E.T.A., Mitchell, S.L., et al. (2021). SARS-CoV-2 Viremia is Associated with COVID-19 Severity and Predicts Clinical Outcomes. *Clinical Infectious Diseases* ciab686.
- Jesus, L.A. de, Carvalho, S.D., Ribeiro, M.O., Schneider, M., Kim, S.-W., Harney, J.W., Larsen, P.R., and Bianco, A.C. (2001). The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest* 108, 1379–1385.
- Ježek, P., Jabůrek, M., and Porter, R.K. (2019). Uncoupling mechanism and redox regulation of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1860, 259–269.

Jiang, J., Fisher, E.M., and Murasko, D.M. (2011). CD8 T cell responses to influenza virus infection in aged mice. *Ageing Research Reviews* 10, 422–427.

Julkunen, I., Sareneva, T., Pirhonen, J., Ronni, T., Melén, K., and Matikainen, S. (2001). Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 12, 171–180.

Kaisanlahti, A., and Glumoff, T. (2019). Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes. *J Physiol Biochem* 75, 1–10.

Kamiya, Y., Fujisawa, T., Katsumata, M., Yasui, H., Suzuki, Y., Karayama, M., Hozumi, H., Furuhashi, K., Enomoto, N., Nakamura, Y., et al. (2020). Influenza A virus enhances ciliary activity and mucociliary clearance via TLR3 in airway epithelium. *Respiratory Research* 21, 282.

Kappler, C., Meister, M., Lagueux, M., Gateff, E., Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.M. (1993). Insect immunity. Two 17 bp repeats nesting a kappa B-related sequence confer inducibility to the dipterin gene and bind a polypeptide in bacteria-challenged *Drosophila*. *EMBO J* 12, 1561–1568.

Karagiannides, I., Tchkonina, T., Dobson, D.E., Steppan, C.M., Cummins, P., Chan, G., Salvatori, K., Hadzopoulou-Cladaras, M., and Kirkland, J.L. (2001). Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280, R1772–R1780.

Karlsson, E.A., and Beck, M.A. (2010). The burden of obesity on infectious disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 235, 1412–1424.

Kassir, R. (2020). Risk of COVID-19 for patients with obesity. *Obesity Reviews* 21, e13034.

Kato, H., Okabe, K., Miyake, M., Hattori, K., Fukaya, T., Tanimoto, K., Beini, S., Mizuguchi, M., Torii, S., Arakawa, S., et al. (2020). ER-resident sensor PERK is essential for mitochondrial thermogenesis in brown adipose tissue. *Life Sci Alliance* 3, e201900576.

Keeler, S.P., Agapov, E.V., Hinojosa, M.E., Letvin, A.N., Wu, K., and Holtzman, M.J. (2018). Influenza A Virus Infection Causes Chronic Lung Disease Linked to Sites of Active Viral RNA Remnants. *The Journal of Immunology* 201, 2354–2368.

Kenney, A., Aron, S., Gilbert, C., Kumar, N., Chen, P., Eddy, A., Zhang, L., Zani, A., Vargas-Maldonado, N., Speaks, S., et al. (2021). Influenza virus replication in cardiomyocytes drives heart dysfunction and fibrosis.

Kerkhove, M.D.V., Vandemaele, K.A.H., Shinde, V., Jaramillo-Gutierrez, G., Koukounari, A., Donnelly, C.A., Carlino, L.O., Owen, R., Paterson, B., Pelletier, L., et al. (2011). Risk Factors for Severe Outcomes following 2009 Influenza A (H1N1) Infection: A Global Pooled Analysis. *PLOS Medicine* 8, e1001053.

Keshavarz, M., Solaymani-Mohammadi, F., Namdari, H., Arjeini, Y., Mousavi, M.J., and Rezaei, F. (2020). Metabolic host response and therapeutic approaches to influenza infection. *Cell Mol Biol Lett* 25, 15.

Kida, R., Noguchi, T., Murakami, M., Hashimoto, O., Kawada, T., Matsui, T., and Funaba, M. (2018). Supra-pharmacological concentration of capsaicin stimulates brown adipogenesis through induction of endoplasmic reticulum stress. *Scientific Reports* 8.

Kim, H., Webster, R.G., and Webby, R.J. (2018). Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. *Viral Immunology* 31, 174–183.

Kim, K.H., Kim, S.H., Min, Y.-K., Yang, H.-M., Lee, J.-B., and Lee, M.-S. (2013). Acute Exercise Induces FGF21 Expression in Mice and in Healthy Humans. *PLOS ONE* 8, e63517.

Kim, K.-H., Kim, Y.H., Son, J.E., Lee, J.H., Kim, S., Choe, M.S., Moon, J.H., Zhong, J., Fu, K., Lenglin, F., et al. (2017a). Intermittent fasting promotes adipose thermogenesis and metabolic homeostasis via VEGF-mediated alternative activation of macrophage. *Cell Res* 27, 1309–1326.

Kim, N., Nam, M., Kang, M.S., Lee, J.O., Lee, Y.W., Hwang, G.-S., and Kim, H.S. (2017b). Piperine regulates UCP1 through the AMPK pathway by generating intracellular lactate production in muscle cells. *Sci Rep* 7, 41066.

Kim, Y.-H., Hong, K.-J., Kim, H., and Nam, J.-H. Influenza vaccines: Past, present, and future. *Reviews in Medical Virology* n/a, e2243.

Kim, Y.-I., Kim, S.-G., Kim, S.-M., Kim, E.-H., Park, S.-J., Yu, K.-M., Chang, J.-H., Kim, E.J., Lee, S., Casel, M.A.B., et al. (2020). Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host & Microbe* 27, 704-709.e2.

Kiskinis, E., Chatzeli, L., Curry, E., Kaforou, M., Frontini, A., Cinti, S., Montana, G., Parker, M.G., and Christian, M. (2014). RIP140 Represses the “Brown-in-White” Adipocyte Program Including a Futile Cycle of Triacylglycerol Breakdown and Synthesis. *Molecular Endocrinology* 28, 344–356.

Klemperer, H. (1961). Glucose breakdown in chick embryo cells infected with influenza virus. *Virology* 13, 68–77.

Klimov, A.I., Rocha, E., Hayden, F.G., Shult, P.A., Roumillat, L.F., and Cox, N.J. (1995). Prolonged Shedding of Amantadine-Resistant Influenza A Viruses by Immunodeficient Patients: Detection by Polymerase Chain Reaction-Restriction Analysis. *The Journal of Infectious Diseases* 172, 1352–1355.

Knudsen, J.G., Murholm, M., Carey, A.L., Biensø, R.S., Basse, A.L., Allen, T.L., Hidalgo, J., Kingwell, B.A., Febbraio, M.A., Hansen, J.B., et al. (2014). Role of IL-6 in Exercise Training- and Cold-Induced UCP1 Expression in Subcutaneous White Adipose Tissue. *PLoS One* 9.

Kobasa, D., Jones, S.M., Shinya, K., Kash, J.C., Copps, J., Ebihara, H., Hatta, Y., Hyun Kim, J., Halfmann, P., Hatta, M., et al. (2007). Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* *445*, 319–323.

Kohio, H.P., and Adamson, A.L. (2013). Glycolytic control of vacuolar-type ATPase activity: A mechanism to regulate influenza viral infection. *Virology* *444*, 301–309.

Kong, X., Banks, A., Liu, T., Kazak, L., Rao, R.R., Cohen, P., Wang, X., Yu, S., Lo, J.C., Tseng, Y.-H., et al. (2014). IRF4 is a key thermogenic transcriptional partner of PGC-1 $\alpha$ . *Cell* *158*, 69–83.

Kosteli, A., Sugaru, E., Haemmerle, G., Martin, J.F., Lei, J., Zechner, R., and Ferrante, A.W. (2010). Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest* *120*, 3466–3479.

Kotaka, M., Kitaura, Y., Deguchi, H., and Kawamura, K. (1990). Experimental influenza A virus myocarditis in mice. Light and electron microscopic, virologic, and hemodynamic study. *Am J Pathol* *136*, 409–419.

Kotani, K., Tokunaga, K., Fujioka, S., Kobatake, T., Keno, Y., Yoshida, S., Shimomura, I., Tarui, S., and Matsuzawa, Y. (1994). Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. *Int J Obes Relat Metab Disord* *18*, 207–202.

Krammer, F., Smith, G.J.D., Fouchier, R.A.M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P.C., Palese, P., Shaw, M.L., Treanor, J., Webster, R.G., et al. (2018). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers* *4*, 1–21.

Kreft, L., Soete, A., Hulpiau, P., Botzki, A., Saeys, Y., and De Bleser, P. (2017). ConTra v3: a tool to identify transcription factor binding sites across species, update 2017. *Nucleic Acids Research* *45*, W490–W494.

Kreijtz, J.H.C.M., Fouchier, R.A.M., and Rimmelzwaan, G.F. (2011). Immune responses to influenza virus infection. *Virus Research* *162*, 19–30.

Kristóf, E., Klusóczki, Á., Veress, R., Shaw, A., Combi, Z.S., Varga, K., Gyóry, F., Balajthy, Z., Bai, P., Bacso, Z., et al. (2019). Interleukin-6 released from differentiating human beige adipocytes improves browning. *Experimental Cell Research* *377*, 47–55.

Kumar, V. (2017). Influenza in Children. *Indian J Pediatr* *84*, 139–143.

Lai, J., Qian, Q., Ding, Q., Zhou, L., Fu, A., Du, Z., Wang, C., Song, Z., Li, S., and Dou, X. (2021). Activation of AMP-Activated Protein Kinase-Sirtuin 1 Pathway Contributes to Salvianolic Acid A-Induced Browning of White Adipose Tissue in High-Fat Diet Fed Male Mice. *Front. Pharmacol.* *o*.

Lakadamyali, M., Rust, M.J., Babcock, H.P., and Zhuang, X. (2003). Visualizing infection of individual influenza viruses. *PNAS* *100*, 9280–9285.

Landreau, F., Galeano, P., Caltana, L.R., Masciotra, L., Chertcoff, A., Pontoriero, A., Baumeister, E., Amoroso, M., Brusco, H.A., Tous, M.I., et al. (2012). Effects of Two

Commonly Found Strains of Influenza A Virus on Developing Dopaminergic Neurons, in Relation to the Pathophysiology of Schizophrenia. *PLOS ONE* 7, e51068.

Latorre-Muro, P., O'Malley, K.E., Bennett, C.F., Perry, E.A., Balsa, E., Tavares, C.D.J., Jedrychowski, M., Gygi, S.P., and Puigserver, P. (2021). A cold-stress-inducible PERK/OGT axis controls TOM70-assisted mitochondrial protein import and cristae formation. *Cell Metabolism* 33, 598-614.e7.

Lauer, S.A., Grantz, K.H., Bi, Q., Jones, F.K., Zheng, Q., Meredith, H.R., Azman, A.S., Reich, N.G., and Lessler, J. (2020). The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med* 172, 577-582.

Lazar, C., Uta, M., and Branza-Nichita, N. (2014). Modulation of the unfolded protein response by the human hepatitis B virus. *Frontiers in Microbiology* 5, 433.

Lazrak, A., Iles, K.E., Liu, G., Noah, D.L., Noah, J.W., and Matalon, S. (2009). Influenza virus M2 protein inhibits epithelial sodium channels by increasing reactive oxygen species. *The FASEB Journal* 23, 3829-3842.

Lee, S., and Ryu, J.-H. (2021). Influenza Viruses: Innate Immunity and mRNA Vaccines. *Front Immunol* 12, 710647.

Lee, J., Ghonime, M.G., Wang, R., and Cassady, K.A. (2019). The Antiviral Apparatus: STING and Oncolytic Virus Restriction. *Molecular Therapy - Oncolytics* 13, 7-13.

Lee, J.-Y., Takahashi, N., Yasubuchi, M., Kim, Y.-I., Hashizaki, H., Kim, M.-J., Sakamoto, T., Goto, T., and Kawada, T. (2012). Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 302, C463-C472.

Lee, M.-J., Wu, Y., and Fried, S.K. (2013a). Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 1-11.

Lee, M.-W., Odegaard, J.I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Yun, K., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2015). Activated Type 2 Innate Lymphoid Cells Regulate Beige Fat Biogenesis. *Cell* 160, 74-87.

Lee, P., Swarbrick, M.M., Zhao, J.T., and Ho, K.K.Y. (2011). Inducible Brown Adipogenesis of Supraclavicular Fat in Adult Humans. *Endocrinology* 152, 3597-3602.

Lee, P., Brychta, R.J., Linderman, J., Smith, S., Chen, K.Y., and Celi, F.S. (2013b). Mild Cold Exposure Modulates Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Diurnal Rhythm in Humans: Relationship between FGF21 Levels, Lipolysis, and Cold-Induced Thermogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 98, E98-E102.

Lee, P., Linderman, J.D., Smith, S., Brychta, R.J., Wang, J., Idelson, C., Perron, R.M., Werner, C.D., Phan, G.Q., Kammula, U.S., et al. (2014). Irisin and FGF21 Are Cold-Induced Endocrine Activators of Brown Fat Function in Humans. *Cell Metabolism* 19, 302-309.

Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1995). Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in *Drosophila*. *EMBO J* 14, 536–545.

Leung, N.H.L. (2021). Transmissibility and transmission of respiratory viruses. *Nat Rev Microbiol* 19, 528–545.

Li, A., Song, N.-J., Riesenber, B.P., and Li, Z. (2020a). The Emerging Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Balancing Immunity and Tolerance in Health and Diseases: Mechanisms and Opportunities. *Frontiers in Immunology* 10, 3154.

Li, F., Wu, R., Cui, X., Zha, L., Yu, L., Shi, H., and Xue, B. (2016). Histone Deacetylase 1 (HDAC1) Negatively Regulates Thermogenic Program in Brown Adipocytes via Coordinated Regulation of Histone H3 Lysine 27 (H3K27) Deacetylation and Methylation. *J Biol Chem* 291, 4523–4536.

Li, G., Xie, C., Lu, S., Nichols, R.G., Tian, Y., Li, L., Patel, D., Ma, Y., Brocker, C.N., Yan, T., et al. (2017). Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. *Cell Metabolism* 26, 672-685.e4.

Li, I.W.S., Chan, K.H., To, K.W.K., Wong, S.S.Y., Ho, P.L., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Tsoi, H.W., Chan, J.F.W., Cheng, V.C.C., et al. (2009a). Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses. *Journal of Clinical Virology* 46, 325–330.

Li, J., Yang, Q., Bai, Z., Zhou, W., Semenza, G.L., and Ge, R.-L. (2018a). Chronic cold exposure results in subcutaneous adipose tissue browning and altered global metabolism in Qinghai-Tibetan plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 500, 117–123.

Li, M.-Y., Li, L., Zhang, Y., and Wang, X.-S. (2020b). Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infectious Diseases of Poverty* 9, 45.

Li, R., Wei, F., Yu, J., Li, H., Ren, X., and Ren, X. (2009b). IDO inhibits T-cell function through suppressing Vav1 expression and activation. *Cancer Biology & Therapy* 8, 1402–1408.

Li, Y., Xie, Y., Hao, J., Liu, J., Ning, Y., Tang, Q., Ma, M., Zhou, H., Guan, S., Zhou, Q., et al. (2018b). ER-localized protein-Herpu1 is a new mediator of IL-4-induced macrophage polarization and migration. *Experimental Cell Research* 368, 167–173.

Li, Y., Meng, Y., and Yu, X. (2019). The Unique Metabolic Characteristics of Bone Marrow Adipose Tissue. *Front. Endocrinol.* 10.

Li, Y., Yang, Q., Cai, D., Guo, H., Fang, J., Cui, H., Gou, L., Deng, J., Wang, Z., and Zuo, Z. (2021). Resistin, a Novel Host Defense Peptide of Innate Immunity. *Frontiers in Immunology* 12, 2436.

Lin, S., Liu, N., Yang, Z., Song, W., Wang, P., Chen, H., Lucio, M., Schmitt-Kopplin, P., Chen, G., and Cai, Z. (2010). GC/MS-based metabolomics reveals fatty acid

biosynthesis and cholesterol metabolism in cell lines infected with influenza A virus. *Talanta* *83*, 262–268.

Liu, C.Y., and Kaufman, R.J. (2003). The unfolded protein response. *Journal of Cell Science* *116*, 1861–1862.

Liu, R., and Nikolajczyk, B.S. (2019). Tissue Immune Cells Fuel Obesity-Associated Inflammation in Adipose Tissue and Beyond. *Front Immunol* *10*, 1587.

Liu, B., Zhang, X., Deng, W., Liu, J., Li, H., Wen, M., Bao, L., Qu, J., Liu, Y., Li, F., et al. (2014a). Severe influenza A(H1N1)pdm09 infection induces thymic atrophy through activating innate CD8 + CD44 hi T cells by upregulating IFN-  $\gamma$ . *Cell Death & Disease* *5*, e1440–e1440.

Liu, B., Page, A.J., Hutchison, A.T., Wittert, G.A., and Heilbronn, L.K. (2019). Intermittent fasting increases energy expenditure and promotes adipose tissue browning in mice. *Nutrition* *66*, 38–43.

Liu, D., Bordicchia, M., Zhang, C., Fang, H., Wei, W., Li, J.-L., Guilherme, A., Guntur, K., Czech, M.P., and Collins, S. (2016). Activation of mTORC1 is essential for  $\beta$ -adrenergic stimulation of adipose browning. *J Clin Invest* *126*, 1704–1716.

Liu, D., Ceddia, R.P., and Collins, S. (2018). Cardiac natriuretic peptides promote adipose 'browning' through mTOR complex-1. *Molecular Metabolism* *9*, 192–198.

Liu, J., HuangFu, W.-C., Kumar, K.G.S., Qian, J., Casey, J.P., Hamanaka, R.B., Grigoriadou, C., Aldabe, R., Diehl, J.A., and Fuchs, S.Y. (2009). Virus-Induced Unfolded Protein Response Attenuates Antiviral Defenses via Phosphorylation-Dependent Degradation of the Type I Interferon Receptor. *Cell Host & Microbe* *5*, 72–83.

Liu, M., Bai, J., He, S., Villarreal, R., Hu, D., Zhang, C., Yang, X., Liang, H., Slaga, T.J., Yu, Y., et al. (2014b). Grb10 Promotes Lipolysis and Thermogenesis by Phosphorylation-Dependent Feedback Inhibition of mTORC1. *Cell Metabolism* *19*, 967–980.

Liu, S.-Y., Aliyari, R., Chikere, K., Li, G., Marsden, M.D., Smith, J.K., Pernet, O., Guo, H., Nusbaum, R., Zack, J.A., et al. (2013). Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Broadly Inhibits Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol. *Immunity* *38*, 92–105.

Liu, X.-H., Huang, D.-A., Yang, F.-Y., Hao, Y.-S., Du, G.-G., Li, P.-F., and Li, G. (2003). A new cytokine: the possible effect pathway of methionine enkephalin. *World J Gastroenterol* *9*, 169–173.

Liu, Z., Wu, K.K.L., Jiang, X., Xu, A., and Cheng, K.K.Y. (2020). The role of adipose tissue senescence in obesity- and ageing-related metabolic disorders. *Clinical Science* *134*, 315–330.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* *25*, 402–408.

- Lolmède, K., Duffaut, C., Zakaroff-Girard, A., and Bouloumié, A. (2011). Immune cells in adipose tissue: Key players in metabolic disorders. *Diabetes & Metabolism* 37, 283–290.
- Long, J.S., Mistry, B., Haslam, S.M., and Barclay, W.S. (2019). Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nature Reviews Microbiology* 17, 67–81.
- López, C.B., Fernandez-Sesma, A., Czelusniak, S.M., Schulman, J.L., and Moran, T.M. (2000). A Mouse Model for Immunization with Ex Vivo Virus-Infected Dendritic Cells. *Cellular Immunology* 206, 107–115.
- Louie, J.K., Acosta, M., Samuel, M.C., Schechter, R., Vugia, D.J., Harriman, K., and Matyas, B.T. (2011). A Novel Risk Factor for a Novel Virus: Obesity and 2009 Pandemic Influenza A (H1N1). *Clin Infect Dis* 52, 301–312.
- Lu, B., Huang, L., Cao, J., Li, L., Wu, W., Chen, X., and Ding, C. (2021). Adipose tissue macrophages in aging-associated adipose tissue function. *The Journal of Physiological Sciences* 71, 38.
- Lui, G., Manches, O., Angel, J., Molens, J.-P., Chaperot, L., and Plumas, J. (2009). Plasmacytoid Dendritic Cells Capture and Cross-Present Viral Antigens from Influenza-Virus Exposed Cells. *PLOS ONE* 4, e7111.
- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., and Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *PNAS* 101, 5598–5603.
- Luo, M. (2012). Influenza Virus Entry. In *Viral Molecular Machines*, M.G. Rossmann, and V.B. Rao, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 201–221.
- Luo, L., and Liu, M. (2016a). Adipose tissue in control of metabolism. *Journal of Endocrinology* 231, R77–R99.
- Luo, Y., and Liu, M. (2016b). Adiponectin: a versatile player of innate immunity. *J Mol Cell Biol* 8, 120–128.
- Luong, Q., Huang, J., and Lee, K.Y. (2019). Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity. *Biology* 8, 23.
- Luzi, L., and Radaelli, M.G. (2020). Influenza and obesity: its odd relationship and the lessons for COVID-19 pandemic. *Acta Diabetol* 57, 759–764.
- Maccioni, L., Weber, S., Elgizouli, M., Stoehlker, A.-S., Geist, I., Peter, H.-H., Vach, W., and Nieters, A. (2018). Obesity and risk of respiratory tract infections: results of an infection-diary based cohort study. *BMC Public Health* 18, 271.
- Madsen, L., Pedersen, L.M., Lillefosse, H.H., Fjære, E., Bronstad, I., Hao, Q., Petersen, R.K., Hallenborg, P., Ma, T., Matteis, R.D., et al. (2010). UCP1 Induction during Recruitment of Brown Adipocytes in White Adipose Tissue Is Dependent on Cyclooxygenase Activity. *PLOS ONE* 5, e11391.

Maier, H.E., Lopez, R., Sanchez, N., Ng, S., Gresh, L., Ojeda, S., Burger-Calderon, R., Kuan, G., Harris, E., Balmaseda, A., et al. (2018). Obesity Increases the Duration of Influenza A Virus Shedding in Adults. *The Journal of Infectious Diseases* 218, 1378–1382.

Mancuso, P., and Bouchard, B. (2019). The Impact of Aging on Adipose Function and Adipokine Synthesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10, 137.

Manicassamy, B., Manicassamy, S., Belicha-Villanueva, A., Pisanelli, G., Pulendran, B., and García-Sastre, A. (2010). Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11531–11536.

Mao, H., Tu, W., Qin, G., Law, H., Sia, S., Chan, P., Liu, Y., Lam, K.-T., Zheng, J., Peiris, M., et al. (2009). Influenza Virus Directly Infects Human Natural Killer Cells and Induces Cell Apoptosis. *Journal of Virology*.

Markan, K.R., Naber, M.C., Ameka, M.K., Anderegg, M.D., Mangelsdorf, D.J., Kiewer, S.A., Mohammadi, M., and Potthoff, M.J. (2014). Circulating FGF21 Is Liver Derived and Enhances Glucose Uptake During Refeeding and Overfeeding. *Diabetes* 63, 4057–4063.

Marreiros, R., Müller-Schiffmann, A., Trossbach, S.V., Prikulis, I., Hänsch, S., Weidtkamp-Peters, S., Moreira, A.R., Sahu, S., Soloviev, I., Selvarajah, S., et al. (2020). Disruption of cellular proteostasis by H1N1 influenza A virus causes  $\alpha$ -synuclein aggregation. *PNAS* 117, 6741–6751.

Martínez, A., Soldevila, N., Romero-Tamarit, A., Torner, N., Godoy, P., Rius, C., Jané, M., Domínguez, À., and Group, and the S. of H.C. of S.I. in C.W. (2019). Risk factors associated with severe outcomes in adult hospitalized patients according to influenza type and subtype. *PLOS ONE* 14, e0210353.

Martínez-Colón, G.J., Ratnasiri, K., Chen, H., Jiang, S., Zanley, E., Rustagi, A., Verma, R., Chen, H., Andrews, J.R., Mertz, K.D., et al. (2021). SARS-CoV-2 infects human adipose tissue and elicits an inflammatory response consistent with severe COVID-19.

Martínez de Morentin, P.B., González-García, I., Martins, L., Lage, R., Fernández-Mallo, D., Martínez-Sánchez, N., Ruíz-Pino, F., Liu, J., Morgan, D.A., Pinilla, L., et al. (2014). Estradiol Regulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis via Hypothalamic AMPK. *Cell Metab* 20, 41–53.

Martinez-Lopez, N., Garcia-Macia, M., Sahu, S., Athonvarangkul, D., Liebling, E., Merlo, P., Cecconi, F., Schwartz, G.J., and Singh, R. (2016). Autophagy in the CNS and Periphery Coordinate Lipophagy and Lipolysis in the Brown Adipose Tissue and Liver. *Cell Metabolism* 23, 113–127.

Martínez-Sánchez, N., Moreno-Navarrete, J.M., Contreras, C., Rial-Pensado, E., Fernø, J., Nogueiras, R., Diéguez, C., Fernández-Real, J.-M., and López, M. (2017a). Thyroid hormones induce browning of white fat. *Journal of Endocrinology* 232, 351–362.

- Martínez-Sánchez, N., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Varela, L., Villarroya, J., Rial-Pensado, E., Buqué, X., Aurrekoetxea, I., Delgado, T.C., Vázquez-Martínez, R., et al. (2017b). Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metabolism* 26, 212-229.e12.
- Maruyama, H., Kimura, T., Liu, H., Ohtsuki, S., Miyake, Y., Isogai, M., Arai, F., and Honda, A. (2018). Influenza virus replication raises the temperature of cells. *Virus Research* 257, 94-101.
- Matesanz, N., Bernardo, E., Acín-Pérez, R., Manieri, E., Pérez-Sieira, S., Hernández-Cosido, L., Montalvo-Romeral, V., Mora, A., Rodríguez, E., Leiva-Vega, L., et al. (2017). MKK6 controls T3-mediated browning of white adipose tissue. *Nature Communications* 8.
- Matthias, A., Ohlson, K.B.E., Fredriksson, J.M., Jacobsson, A., Nedergaard, J., and Cannon, B. (2000). Thermogenic Responses in Brown Fat Cells Are Fully UCP1-dependent: UCP2 OR UCP3 DO NOT SUBSTITUTE FOR UCP1 IN ADRENERGICALLY OR FATTY ACID-INDUCED THERMOGENESIS \*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 25073-25081.
- Mazzucotelli, A., Viguerie, N., Tiraby, C., Annicotte, J.-S., Mairal, A., Klimcakova, E., Lepin, E., Delmar, P., Dejean, S., Tavernier, G., et al. (2007). The Transcriptional Coactivator Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$  and the Nuclear Receptor PPAR $\alpha$  Control the Expression of Glycerol Kinase and Metabolism Genes Independently of PPAR $\gamma$  Activation in Human White Adipocytes. *Diabetes* 56, 2467-2475.
- McAuley, J.L., Corcilius, L., Tan, H.-X., Payne, R.J., McGuckin, M.A., and Brown, L.E. (2017). The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection. *Mucosal Immunology* 10, 1581-1593.
- McCullough, C., Wang, M., Rong, L., and Caffrey, M. (2012). Characterization of Influenza Hemagglutinin Interactions with Receptor by NMR. *PLOS ONE* 7, e33958.
- Meade, P., Kuan, G., Strohmeier, S., Maier, H.E., Amanat, F., Balmaseda, A., Ito, K., Kirkpatrick, E., Javier, A., Gresh, L., et al. (2020). Influenza Virus Infection Induces a Narrow Antibody Response in Children but a Broad Recall Response in Adults. *MBio* 11.
- Meliopoulos, V., Livingston, B., Van de Velde, L.-A., Honce, R., and Schultz-Cherry, S. (2019). Absence of  $\beta$ 6 Integrin Reduces Influenza Disease Severity in Highly Susceptible Obese Mice. *J Virol* 93.
- Memoli, M.J., Athota, R., Reed, S., Czajkowski, L., Bristol, T., Proudfoot, K., Hagey, R., Voell, J., Fiorentino, C., Ademposi, A., et al. (2014). The Natural History of Influenza Infection in the Severely Immunocompromised vs Nonimmunocompromised Hosts. *Clinical Infectious Diseases* 58, 214-224.
- Merry, T.L., and Ristow, M. (2016). Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice. *The Journal of Physiology* 594, 5195-5207.

- Miao, Y., Su, W., Dai, Y., Wu, W., Huang, B., Barros, R.P.A., Nguyen, H., Maneix, L., Guan, Y., Warner, M., et al. (2016). An ER $\beta$  agonist induces browning of subcutaneous abdominal fat pad in obese female mice. *Sci Rep* 6, 38579.
- Miao, Y., Qin, H., Zhong, Y., Huang, K., and Rao, C. (2021). Novel adipokine asprosin modulates browning and adipogenesis in white adipose tissue. *Journal of Endocrinology* 249, 83–93.
- Mills, E.L., Pierce, K.A., Jedrychowski, M.P., Garrity, R., Winther, S., Vidoni, S., Yoneshiro, T., Spinelli, J.B., Lu, G.Z., Kazak, L., et al. (2018). Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature* 560, 102–106.
- 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.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21, 2861–2873.
- Mock, D.J., Domurat, F., Roberts, N.J., Walsh, E.E., Licht, M.R., and Keng, P. (1987). Macrophages are required for influenza virus infection of human lymphocytes. *J Clin Invest* 79, 620–624.
- Mogensen, T.H. (2009). Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev* 22, 240–273.
- Mogilenko, D.A., Shchukina, I., and Artyomov, M.N. (2021). Immune ageing at single-cell resolution. *Nat Rev Immunol* 1–15.
- Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Liang, H.-E., Van Dyken, S.J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Chawla, A., and Locksley, R.M. (2013). Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 210, 535–549.
- Molofsky, A.B., Van Gool, F., Liang, H.-E., Van Dyken, S.J., Nussbaum, J.C., Lee, J., Bluestone, J.A., and Locksley, R.M. (2015). Interleukin-33 and Interferon- $\gamma$  Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. *Immunity* 43, 161–174.
- Montalbano, R., Waldegger, P., Quint, K., Jabari, S., Neureiter, D., Illig, R., Ocker, M., and Di Fazio, P. (2013). Endoplasmic Reticulum Stress Plays a Pivotal Role in Cell Death Mediated by the Pan-Deacetylase Inhibitor Panobinostat in Human Hepatocellular Cancer Cells. *Transl Oncol* 6, 143–157.
- More, S., Yang, X., Zhu, Z., Bamunuarachchi, G., Guo, Y., Huang, C., Bailey, K., Metcalf, J.P., and Liu, L. (2018). Regulation of influenza virus replication by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *PLOS ONE* 13, e0191010.
- Morens, D.M., Taubenberger, J.K., and Fauci, A.S. (2008). Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness. *J Infect Dis* 198, 962–970.

- Morgan, O.W., Bramley, A., Fowlkes, A., Freedman, D.S., Taylor, T.H., Gargiullo, P., Belay, B., Jain, S., Cox, C., Kamimoto, L., et al. (2010). Morbid Obesity as a Risk Factor for Hospitalization and Death Due to 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Disease. *PLOS ONE* 5, e9694.
- Mori, I., Komatsu, T., Takeuchi, K., Nakakuki, K., Sudo, M., and Kimura, Y. (1995). Viremia induced by influenza virus. *Microbial Pathogenesis* 19, 237–244.
- Morris, D.E., Cleary, D.W., and Clarke, S.C. (2017). Secondary Bacterial Infections Associated with Influenza Pandemics. *Front Microbiol* 8.
- Morrison, S., Madden, C., and Tupone, D. (2012). Central Control of Brown Adipose Tissue Thermogenesis. *Frontiers in Endocrinology* 3, 5.
- Moser, J.-A.S., Galindo- Fraga, A., Ortiz- Hernández, A.A., Gu, W., Hunsberger, S., Galán- Herrera, J.-F., Guerrero, M.L., Ruiz- Palacios, G.M., and Beigel, J.H. (2019). Underweight, overweight, and obesity as independent risk factors for hospitalization in adults and children from influenza and other respiratory viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 13, 3–9.
- Mounce, B.C., Poirier, E.Z., Passoni, G., Simon-Lorriere, E., Cesaro, T., Prot, M., Stapleford, K.A., Moratorio, G., Sakuntabhai, A., Levraud, J.-P., et al. (2016). Interferon-Induced Spermidine-Spermine Acetyltransferase and Polyamine Depletion Restrict Zika and Chikungunya Viruses. *Cell Host & Microbe* 20, 167–177.
- Mraz, M., and Haluzik, M. (2014). The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *Journal of Endocrinology* 222, R113–R127.
- Mulvey, M., Arias, C., and Mohr, I. (2007). Maintenance of Endoplasmic Reticulum (ER) Homeostasis in Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Cells through the Association of a Viral Glycoprotein with PERK, a Cellular ER Stress Sensor. *Journal of Virology* 81, 3377–3390.
- Muñoz-Fontela, C., Dowling, W.E., Funnell, S.G.P., Gsell, P.-S., Riveros-Balta, A.X., Albrecht, R.A., Andersen, H., Baric, R.S., Carroll, M.W., Cavaleri, M., et al. (2020). Animal models for COVID-19. *Nature* 586, 509–515.
- Muramoto, Y., Ozaki, H., Takada, A., Park, C.-H., Sunden, Y., Umemura, T., Kawaoka, Y., Matsuda, H., and Kida, H. (2006). Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus Causes Coagulopathy in Chickens. *Microbiology and Immunology* 50, 73–81.
- Murano, I., Barbatelli, G., Parisani, V., Latini, C., Muzzonigro, G., Castellucci, M., and Cinti, S. (2008). Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *Journal of Lipid Research* 49, 1562–1568.
- Murao, N., and Nishitoh, H. (2017). Role of the unfolded protein response in the development of central nervous system. *The Journal of Biochemistry* 162, 155–162.
- Nakaya, H.I., Hagan, T., Duraisingham, S.S., Lee, E.K., Kwissa, M., Roupheal, N., Frasca, D., Gersten, M., Mehta, A.K., Gaujoux, R., et al. (2015). Systems Analysis of

Immunity to Influenza Vaccination across Multiple Years and in Diverse Populations Reveals Shared Molecular Signatures. *Immunity* 43, 1186–1198.

Nardacci, R., Colavita, F., Castilletti, C., Lapa, D., Matusali, G., Meschi, S., Del Nonno, F., Colombo, D., Capobianchi, M.R., Zumla, A., et al. (2021). Evidences for lipid involvement in SARS-CoV-2 cytopathogenesis. *Cell Death Dis* 12, 1–12.

Nestler, E.J., and Tallman, J.F. (1988). Chronic morphine treatment increases cyclic AMP-dependent protein kinase activity in the rat locus coeruleus. *Mol Pharmacol* 33, 127–132.

Neumann, G., Hughes, M.T., and Kawaoka, Y. (2000). Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J* 19, 6751–6758.

Ng, Y.P., Lee, S.M.Y., Cheung, T.K.W., Nicholls, J.M., Peiris, J.S.M., and Ip, N.Y. (2010). Avian influenza H5N1 virus induces cytopathy and proinflammatory cytokine responses in human astrocytic and neuronal cell lines. *Neuroscience* 168, 613–623.

Ng, Y.P., Yip, T.F., Peiris, J.S.M., Ip, N.Y., and Lee, S.M.Y. (2018). Avian influenza A H7N9 virus infects human astrocytes and neuronal cells and induces inflammatory immune responses. *J. Neurovirol.* 24, 752–760.

Nguyen, C., Kaku, S., Tintera, D., Kuschner, W.G., and Barr, J. (2016). Viral Respiratory Infections of Adults in the Intensive Care Unit. *J Intensive Care Med* 31, 427–441.

Nguyen, T.T.T., Graf, B.A., Randall, T.D., and Baumgarth, N. (2017). sIgM–FcμR Interactions Regulate Early B Cell Activation and Plasma Cell Development after Influenza Virus Infection. *The Journal of Immunology* 199, 1635–1646.

Nicolle, C. Naissance, vie et mort des maladies infectieuses / par Charles Nicolle,... (Paris : Félix Alcan).

Nishimura, H., Itamura, S., Iwasaki, T., Kurata, T., and Tashiro, M. (2000). Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection. *Journal of General Virology* 81, 2503–2510.

Noda, T. (2012). Native Morphology of Influenza Virions. *Front. Microbiol.* 2.

O'Brien, K.B., Vogel, P., Duan, S., Govorkova, E.A., Webby, R.J., McCullers, J.A., and Schultz-Cherry, S. (2012). Impaired Wound Healing Predisposes Obese Mice to Severe Influenza Virus Infection. *J Infect Dis* 205, 252–261.

Ohno, M. (2014). Roles of eIF2α kinases in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7, 22.

Ohno, M., Sekiya, T., Nomura, N., Daito, T. ji, Shingai, M., and Kida, H. (2020). Influenza virus infection affects insulin signaling, fatty acid-metabolizing enzyme expressions, and the tricarboxylic acid cycle in mice. *Scientific Reports* 10, 10879.

Owen, B.M., Ding, X., Morgan, D.A., Coate, K.C., Bookout, A.L., Rahmouni, K., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2014). FGF21 Acts Centrally to Induce

Sympathetic Nerve Activity, Energy Expenditure, and Weight Loss. *Cell Metabolism* 20, 670–677.

Owen, B.M., Mangelsdorf, D.J., and Kliewer, S.A. (2015). Tissue-specific actions of the metabolic hormones FGF15/19 and FGF21. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 26, 22–29.

Paget, C., Ivanov, S., Fontaine, J., Renneson, J., Blanc, F., Pichavant, M., Dumoutier, L., Ryffel, B., Renauld, J.C., Gosset, P., et al. (2012). Interleukin-22 Is Produced by Invariant Natural Killer T Lymphocytes during Influenza A Virus Infection: POTENTIAL ROLE IN PROTECTION AGAINST LUNG EPITHELIAL DAMAGES \*. *Journal of Biological Chemistry* 287, 8816–8829.

Pan, Y., Chen, H., Siu, F., and Kilberg, M.S. (2003). Amino Acid Deprivation and Endoplasmic Reticulum Stress Induce Expression of Multiple Activating Transcription Factor-3 mRNA Species That, When Overexpressed in HepG2 Cells, Modulate Transcription by the Human Asparagine Synthetase Promoter \*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 38402–38412.

Pan, Y.-X., Chen, H., Thiaville, M.M., and Kilberg, M.S. (2007). Activation of the ATF3 gene through a co-ordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation. *Biochem J* 401, 299–307.

Parrish, C.R., Murcia, P.R., and Holmes, E.C. (2015). Influenza Virus Reservoirs and Intermediate Hosts: Dogs, Horses, and New Possibilities for Influenza Virus Exposure of Humans. *Journal of Virology* 89, 2990–2994.

Peiris, J.S.M., Lai, S.T., Poon, L.L.M., Guan, Y., Yam, L.Y.C., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W.K.S., Yan, W.W., Cheung, M.T., et al. (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *The Lancet* 361, 1319–1325.

Peiris, J.S.M., Poon, L.M., Nicholls, J.M., and Guan, Y. (2009). The role of influenza virus gene constellation and viral morphology on cytokine induction, pathogenesis, and viral virulence. *Hong Kong Med J* 15, 21–23.

Peteranderl, C., Herold, S., and Schmoldt, C. (2016). Human Influenza Virus Infections. *Semin Respir Crit Care Med* 37, 487–500.

Phillips, K.J. (2019). Beige Fat, Adaptive Thermogenesis, and Its Regulation by Exercise and Thyroid Hormone. *Biology* 8, 57.

Pila-Castellanos, I., Molino, D., McKellar, J., Lines, L., Graca, J.D., Tauziet, M., Chanteloup, L., Mikaelian, I., Meyniel-Schicklin, L., Codogno, P., et al. (2021). Mitochondrial morphodynamics alteration induced by influenza virus infection as a new antiviral strategy. *PLOS Pathogens* 17, e1009340.

Pisani, D.F., Beranger, G.E., Corinus, A., Giroud, M., Ghandour, R.A., Altirriba, J., Chambard, J.-C., Mazure, N.M., Bendahhou, S., Durantou, C., et al. (2016). The K+

channel TASK1 modulates  $\beta$ -adrenergic response in brown adipose tissue through the mineralocorticoid receptor pathway. *The FASEB Journal* 30, 909–922.

Plotch, S.J., Bouloy, M., and Krug, R.M. (1979). Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1618–1622.

Pluquet, O., Pourtier, A., and Abbadie, C. (2014). The unfolded protein response and cellular senescence. A Review in the Theme: Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 308, C415–C425.

Pociask, D.A., Robinson, K.M., Chen, K., McHugh, K.J., Clay, M.E., Huang, G.T., Benos, P.V., Janssen-Heininger, Y.M.W., Kolls, J.K., Anathy, V., et al. (2017). Epigenetic and Transcriptomic Regulation of Lung Repair during Recovery from Influenza Infection. *The American Journal of Pathology* 187, 851–863.

Powers, D.C., Sears, S.D., Murphy, B.R., Thumar, B., and Clements, M.L. (1989). Systemic and local antibody responses in elderly subjects given live or inactivated influenza A virus vaccines. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 2666–2671.

Prentice, A.M. (2006). The emerging epidemic of obesity in developing countries. *International Journal of Epidemiology* 35, 93–99.

Qian, S.-W., Tang, Y., Li, X., Liu, Y., Zhang, Y.-Y., Huang, H.-Y., Xue, R.-D., Yu, H.-Y., Guo, L., Gao, H.-D., et al. (2013). BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *PNAS* 110, E798–E807.

Qian, Z., Xuan, B., Chapa, T.J., Gualberto, N., and Yu, D. (2012). Murine Cytomegalovirus Targets Transcription Factor ATF4 To Exploit the Unfolded-Protein Response. *Journal of Virology* 86, 6712–6723.

Qiang, L., Wang, L., Kon, N., Zhao, W., Lee, S., Zhang, Y., Rosenbaum, M., Zhao, Y., Gu, W., Farmer, S.R., et al. (2012). Brown Remodeling of White Adipose Tissue by SirT1-Dependent Deacetylation of Ppar $\gamma$ . *Cell* 150, 620–632.

Qiu, Y., Nguyen, K.D., Odegaard, J.I., Cui, X., Tian, X., Locksley, R.M., Palmiter, R.D., and Chawla, A. (2014). Eosinophils and Type 2 Cytokine Signaling in Macrophages Orchestrate Development of Functional Beige Fat. *Cell* 157, 1292–1308.

Rao, R.R., Long, J.Z., White, J.P., Svensson, K.J., Lou, J., Lokurkar, I., Jedrychowski, M.P., Ruas, J.L., Wrann, C.D., Lo, J.C., et al. (2014). Meteorin-like Is a Hormone that Regulates Immune-Adipose Interactions to Increase Beige Fat Thermogenesis. *Cell* 157, 1279–1291.

Rasmussen, S.A., Jamieson, D.J., and Uyeki, T.M. (2012). Effects of influenza on pregnant women and infants. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 207, S3–S8.

Rathnasinghe, R., Strohmeier, S., Amanat, F., Gillespie, V.L., Krammer, F., García-Sastre, A., Coughlan, L., Schotsaert, M., and Uccellini, M.B. (2020). Comparison of

transgenic and adenovirus hACE2 mouse models for SARS-CoV-2 infection. *Emerging Microbes & Infections* 9, 2433–2445.

Reading, P.C., Miller, J.L., and Anders, E.M. (2000). Involvement of the Mannose Receptor in Infection of Macrophages by Influenza Virus. *Journal of Virology* 74, 5190–5197.

Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallese, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., and Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300–307.

Reiterer, M., Rajan, M., Gómez-Banoy, N., Lau, J.D., Gomez-Escobar, L.G., Ma, L., Gilani, A., Alvarez-Mulett, S., Sholle, E.T., Chandar, V., et al. (2021). Hyperglycemia in acute COVID-19 is characterized by insulin resistance and adipose tissue infectivity by SARS-CoV-2. *Cell Metabolism*.

Rello, J., and Pop-Vicas, A. (2009). Clinical review: Primary influenza viral pneumonia. *Crit Care* 13, 235.

Reshi, L., Wang, H.-V., and Hong, J.-R. (2018). Modulation of Mitochondria During Viral Infections (IntechOpen).

Richard, M., van den Brand, J.M.A., Bestebroer, T.M., Lexmond, P., de Meulder, D., Fouchier, R.A.M., Lowen, A.C., and Herfst, S. (2020). Influenza A viruses are transmitted via the air from the nasal respiratory epithelium of ferrets. *Nature Communications* 11, 766.

Ritter, J.B., Wahl, A.S., Freund, S., Genzel, Y., and Reichl, U. (2010). Metabolic effects of influenza virus infection in cultured animal cells: Intra- and extracellular metabolite profiling. *BMC Systems Biology* 4, 61.

Roberson, E.C., Tully, J.E., Guala, A.S., Reiss, J.N., Godburn, K.E., Pociask, D.A., Alcorn, J.F., Riches, D.W.H., Dienz, O., Janssen-Heininger, Y.M.W., et al. (2012). Influenza Induces Endoplasmic Reticulum Stress, Caspase-12–Dependent Apoptosis, and c-Jun N-Terminal Kinase–Mediated Transforming Growth Factor- $\beta$  Release in Lung Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46, 573–581.

Roberts, A., Vogel, L., Guarner, J., Hayes, N., Murphy, B., Zaki, S., and Subbarao, K. (2005). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection of Golden Syrian Hamsters. *J Virol* 79, 503–511.

Roberts, L.D., Boström, P., O’Sullivan, J.F., Schinzel, R.T., Lewis, G.D., Dejam, A., Lee, Y.-K., Palma, M.J., Calhoun, S., Georgiadi, A., et al. (2014).  $\beta$ -Aminoisobutyric Acid Induces Browning of White Fat and Hepatic  $\beta$ -Oxidation and Is Inversely Correlated with Cardiometabolic Risk Factors. *Cell Metabolism* 19, 96–108.

Rodríguez-Rieiro, C., Carrasco-Garrido, P., Hernández-Barrera, V., Andrés, A.L. de, Jimenez-Trujillo, I., Miguel, A.G. de, and Jiménez-García, R. (2012). Pandemic influenza hospitalization in Spain (2009): Incidence, in-hospital mortality, comorbidities and costs. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 8, 443–447.

Roh, H.C., Tsai, L.T.Y., Shao, M., Tenen, D., Shen, Y., Kumari, M., Lyubetskaya, A., Jacobs, C., Dawes, B., Gupta, R.K., et al. (2018). Warming Induces Significant Reprogramming of Beige, but Not Brown, Adipocyte Cellular Identity. *Cell Metabolism* 27, 1121-1137.e5.

Roquilly, A., and Trottein, F. (2017). La grippe et les surinfections bactériennes: Menaces et traitements. *médecine/sciences* 33, 528–533.

Rosenke, K., Meade-White, K., Letko, M., Clancy, C., Hansen, F., Liu, Y., Okumura, A., Tang-Huau, T.-L., Li, R., Saturday, G., et al. (2020). Defining the Syrian hamster as a highly susceptible preclinical model for SARS-CoV-2 infection. *Emerging Microbes & Infections* 9, 2673–2684.

Rothberg, M.B., and Haessler, S.D. (2010). Complications of seasonal and pandemic influenza. *Critical Care Medicine* 38, e91.

Ruan, H.-B., Dietrich, M.O., Liu, Z.-W., Zimmer, M.R., Li, M.-D., Singh, J.P., Zhang, K., Yin, R., Wu, J., Horvath, T.L., et al. (2014). O-GlcNAc Transferase Enables AgRP Neurons to Suppress Browning of White Fat. *Cell* 159, 306–317.

Ryan, P.M., and Caplice, N.M. (2020). Is Adipose Tissue a Reservoir for Viral Spread, Immune Activation, and Cytokine Amplification in Coronavirus Disease 2019? *Obesity* 28, 1191–1194.

Sacks, H., and Symonds, M.E. (2013). Anatomical Locations of Human Brown Adipose Tissue: Functional Relevance and Implications in Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 62, 1783–1790.

Sahuri-Arisoylu, M., Brody, L.P., Parkinson, J.R., Parkes, H., Navaratnam, N., Miller, A.D., Thomas, E.L., Frost, G., and Bell, J.D. (2016). Reprogramming of hepatic fat accumulation and “browning” of adipose tissue by the short-chain fatty acid acetate. *Int J Obes* 40, 955–963.

Saito, A., Ochiai, K., Kondo, S., Tsumagari, K., Murakami, T., Cavener, D.R., and Imaizumi, K. (2011). Endoplasmic Reticulum Stress Response Mediated by the PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 Pathway Is Involved in Osteoblast Differentiation Induced by BMP2\*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 4809–4818.

Saleh, L.S., Vanderheyden, C., Frederickson, A., and Bryant, S.J. (2020). Prostaglandin E2 and Its Receptor EP2 Modulate Macrophage Activation and Fusion in Vitro. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6, 2668–2681.

Salihefendic, N., Zildzic, M., and Ahmetagic, S. (2015). Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) from Endemic Influenza A/H1N1: Prehospital Management. *Med Arch* 69, 62–63.

Samarasinghe, A.E., Melo, R.C.N., Duan, S., LeMessurier, K.S., Liedmann, S., Surman, S.L., Lee, J.J., Hurwitz, J.L., Thomas, P.G., and McCullers, J.A. (2017). Eosinophils Promote Antiviral Immunity in Mice Infected with Influenza A Virus. *The Journal of Immunology* 198, 3214–3226.

Sambeat, A., Gulyaeva, O., Dempersmier, J., Tharp, K.M., Stahl, A., Paul, S.M., and Sul, H.S. (2016). LSD1 Interacts with Zfp516 to Promote UCP1 Transcription and Brown Fat Program. *Cell Reports* 15, 2536–2549.

Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C.-M., and Guertin, D.A. (2016). Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity. *Trends in Cell Biology* 26, 313–326.

Santini, F., Marzullo, P., Rotondi, M., Ceccarini, G., Pagano, L., Ippolito, S., Chiovato, L., and Biondi, B. (2014). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: The crosstalk between thyroid gland and adipose tissue: signal integration in health and disease. *European Journal of Endocrinology* 171, R137–R152.

Sara, P., Massimiliano, C., Francesco, G., Riccardo, C., and Giovanni, L. (2020). Adipokines: A Rainbow of Proteins with Metabolic and Endocrine Functions. *Protein & Peptide Letters* 27, 1204–1230.

Schlesinger, R.W., Bradshaw, G.L., Barbone, F., Reinacher, M., Rott, R., and Husak, P. (1989). Role of hemagglutinin cleavage and expression of M1 protein in replication of A/WS/33, A/PR/8/34, and WSN influenza viruses in mouse brain. *Journal of Virology* 63, 1695–1703.

Schlottau, K., Rissmann, M., Graaf, A., Schön, J., Sehl, J., Wylezich, C., Höper, D., Mettenleiter, T.C., Balkema-Buschmann, A., Harder, T., et al. (2020). Experimental Transmission Studies of SARS-CoV-2 in Fruit Bats, Ferrets, Pigs and Chickens (Rochester, NY: Social Science Research Network).

Schögler, A., Caliaro, O., Brügger, M., Oliveira Esteves, B.I., Nita, I., Gazdhar, A., Geiser, T., and Alves, M.P. (2019). Modulation of the unfolded protein response pathway as an antiviral approach in airway epithelial cells. *Antiviral Research* 162, 44–50.

Schuck, S., Prinz, W.A., Thorn, K.S., Voss, C., and Walter, P. (2009). Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J Cell Biol* 187, 525–536.

Schulz, O., Diebold, S.S., Chen, M., Näslund, T.I., Nolte, M.A., Alexopoulou, L., Azuma, Y.-T., Flavell, R.A., Liljeström, P., and Reis e Sousa, C. (2005). Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433, 887–892.

Schwarz, B., Sharma, L., Roberts, L., Peng, X., Bermejo, S., Leighton, I., Casanovas-Massana, A., Minasyan, M., Farhadian, S., Ko, A.I., et al. (2021). Cutting Edge: Severe SARS-CoV-2 Infection in Humans Is Defined by a Shift in the Serum Lipidome, Resulting in Dysregulation of Eicosanoid Immune Mediators. *The Journal of Immunology* 206, 329–334.

Seale, P., Conroe, H.M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S., and Spiegelman, B.M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* 121, 96–105.

Sefik, E., Israelow, B., Mirza, H., Zhao, J., Qu, R., Kaffe, E., Song, E., Halene, S., Meffre, E., Kluger, Y., et al. (2021). A humanized mouse model of chronic COVID-19. *Nat Biotechnol* 1–15.

Sellers, S.A., Hagan, R.S., Hayden, F.G., and Fischer, W.A. (2017). The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. *Influenza and Other Respiratory Viruses* *11*, 372–393.

Sencio, V., Barthelemy, A., Tavares, L.P., Machado, M.G., Soulard, D., Cuiat, C., Queiroz-Junior, C.M., Noordine, M.-L., Salomé-Desnoullez, S., Deryuter, L., et al. (2020). Gut Dysbiosis during Influenza Contributes to Pulmonary Pneumococcal Superinfection through Altered Short-Chain Fatty Acid Production. *Cell Reports* *30*, 2934-2947.e6.

Sha, H., He, Y., Chen, H., Wang, C., Zenno, A., Shi, H., Yang, X., Zhang, X., and Qi, L. (2009). The IRE1 $\alpha$ -XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response Is Required for Adipogenesis. *Cell Metabolism* *9*, 556–564.

Sha, H., Zhang, D., Zhang, Y., Wen, Y., and Wang, Y. (2017). ATF3 promotes migration and M1/M2 polarization of macrophages by activating tenascin- C via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Molecular Medicine Reports* *16*, 3641–3647.

Shah, R.D., and Wunderink, R.G. (2017). Viral Pneumonia and Acute Respiratory Distress Syndrome. *Clin Chest Med* *38*, 113–125.

Shan, B., Wang, X., Wu, Y., Xu, C., Xia, Z., Dai, J., Shao, M., Zhao, F., He, S., Yang, L., et al. (2017). The metabolic ER stress sensor IRE1 $\alpha$  suppresses alternative activation of macrophages and impairs energy expenditure in obesity. *Nature Immunology* *18*, 519–529.

Shan, J., Örd, D., Örd, T., and Kilberg, M.S. (2009). Elevated ATF4 Expression, in the Absence of Other Signals, Is Sufficient for Transcriptional Induction via CCAAT Enhancer-binding Protein-activating Transcription Factor Response Elements \*. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 21241–21248.

Shan, T., Liang, X., Bi, P., and Kuang, S. (2013). Myostatin knockout drives browning of white adipose tissue through activating the AMPK-PGC1 $\alpha$ -Fndc5 pathway in muscle. *The FASEB Journal* *27*, 1981–1989.

Shao, W., Li, X., Goraya, M.U., Wang, S., and Chen, J.-L. (2017). Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *Int J Mol Sci* *18*.

Shaw, M.L., Stone, K.L., Colangelo, C.M., Gulcicek, E.E., and Palese, P. (2008). Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog* *4*, e1000085.

Shimizu, H., Shimomura, Y., Hayashi, R., Ohtani, K., Sato, N., Futawatari, T., and Mori, M. (1997). Serum leptin concentration is associated with total body fat mass, but not abdominal fat distribution. *Int J Obes* *21*, 536–541.

Shin, N., Pyo, C.-W., Jung, K.I., and Choi, S.-Y. (2015). Influenza A virus PB1-F2 is involved in regulation of cellular redox state in alveolar epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *459*, 699–705.

- Shinohara, Y., Imajo, K., Yoneda, M., Tomeno, W., Ogawa, Y., Kirikoshi, H., Funakoshi, K., Ikeda, M., Kato, N., Nakajima, A., et al. (2013). Unfolded protein response pathways regulate Hepatitis C virus replication via modulation of autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *432*, 326–332.
- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N., and Kawaoka, Y. (2006). Influenza virus receptors in the human airway. *Nature* *440*, 435–436.
- Shoulders, M.D., Ryno, L.M., Genereux, J.C., Moresco, J.J., Tu, P.G., Wu, C., Yates, J.R., Su, A.I., Kelly, J.W., and Wiseman, R.L. (2013). Stress-Independent Activation of XBP1s and/or ATF6 Reveals Three Functionally Diverse ER Proteostasis Environments. *Cell Rep* *3*, 1279–1292.
- Shu, Y., Li, C.K., Li, Z., Gao, R., Liang, Q., Zhang, Y., Dong, L., Zhou, J., Dong, J., Wang, D., et al. (2010). Avian Influenza A(H5N1) Viruses Can Directly Infect and Replicate in Human Gut Tissues. *The Journal of Infectious Diseases* *201*, 1173–1177.
- Sia, S.F., Yan, L.-M., Chin, A.W.H., Fung, K., Choy, K.-T., Wong, A.Y.L., Kaewpreedee, P., Perera, R.A.P.M., Poon, L.L.M., Nicholls, J.M., et al. (2020). Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* *583*, 834–838.
- Sidossis, L., and Kajimura, S. (2015). Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* *125*, 478–486.
- Simon, M., Hernu, R., Cour, M., Casalegno, J.-S., Lina, B., and Argaud, L. (2013). Fatal Influenza A(H1N1)pdm09 Encephalopathy in Immunocompetent Man. *Emerg Infect Dis* *19*, 1005–1007.
- Simonnet, A., Chetboun, M., Poissy, J., Raverdy, V., Noulette, J., Duhamel, A., Labreuche, J., Mathieu, D., Pattou, F., Jourdain, M., et al. (2020). High Prevalence of Obesity in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) Requiring Invasive Mechanical Ventilation. *Obesity* *28*, 1195–1199.
- Smallwood, H.S., Duan, S., Morfouace, M., Rezinciuc, S., Shulkin, B.L., Shelat, A., Zink, E.E., Milasta, S., Bajracharya, R., Oluwaseun, A.J., et al. (2017). Targeting Metabolic Reprogramming by Influenza Infection for Therapeutic Intervention. *Cell Reports* *19*, 1640–1653.
- Smith, J.A. (2018). Regulation of Cytokine Production by the Unfolded Protein Response; Implications for Infection and Autoimmunity. *Front. Immunol.* *9*.
- Smith, M.H.D., and Kun, E. (1954). Morphological and Biochemical Studies on the Chorio-Allantois of the Chick Embryo following Infection with Certain Viruses. *Br J Exp Pathol* *35*, 1–10.
- Smith, U., Li, Q., Rydén, M., and Spalding, K.L. (2021). Cellular senescence and its role in white adipose tissue. *Int J Obes* *45*, 934–943.
- Somerville, L.K., Basile, K., Dwyer, D.E., and Kok, J. (2018). The impact of influenza virus infection in pregnancy. *Future Microbiology* *13*, 263–274.

Song, E., Zhang, C., Israelow, B., Lu-Culligan, A., Prado, A.V., Skriabine, S., Lu, P., Weizman, O.-E., Liu, F., Dai, Y., et al. (2021). Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *J Exp Med* 218, e20202135.

Song, J.-W., Lam, S.M., Fan, X., Cao, W.-J., Wang, S.-Y., Tian, H., Chua, G.H., Zhang, C., Meng, F.-P., Xu, Z., et al. (2020). Omics-Driven Systems Interrogation of Metabolic Dysregulation in COVID-19 Pathogenesis. *Cell Metabolism* 32, 188-202.e5.

Spallanzani, R.G., Zemmour, D., Xiao, T., Jayewickreme, T., Li, C., Bryce, P.J., Benoist, C., and Mathis, D. (2019). Distinct immunocyte-promoting and adipocyte-generating stromal components coordinate adipose-tissue immune and metabolic tenors. *Sci Immunol* 4, eaaw3658.

Stanford, K.I., Middelbeek, R.J.W., and Goodyear, L.J. (2015). Exercise Effects on White Adipose Tissue: Being and Metabolic Adaptations. *Diabetes* 64, 2361–2368.

Stępień, M., Stępień, A., Wlazeł, R.N., Paradowski, M., Banach, M., and Rysz, J. (2014). Obesity indices and inflammatory markers in obese non-diabetic normo- and hypertensive patients: a comparative pilot study. *Lipids Health Dis* 13, 29.

Steuerman, Y., Cohen, M., Peshes-Yaloz, N., Valadarsky, L., Cohn, O., David, E., Frishberg, A., Mayo, L., Bacharach, E., Amit, I., et al. (2018). Dissection of Influenza Infection In Vivo by Single-Cell RNA Sequencing. *Cels* 6, 679-691.e4.

Su, N., and Kilberg, M.S. (2008). C/EBP Homology Protein (CHOP) Interacts with Activating Transcription Factor 4 (ATF4) and Negatively Regulates the Stress-dependent Induction of the Asparagine Synthetase Gene \*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 35106–35117.

Su, C. wen, Chen, C.-Y., Li, Y., Long, S.R., Massey, W., Kumar, D.V., Walker, W.A., and Shi, H.N. (2018). Helminth infection protects against high fat diet-induced obesity via induction of alternatively activated macrophages. *Sci Rep* 8, 4607.

Suarez, D.L., Perdue, M.L., Cox, N., Rowe, T., Bender, C., Huang, J., and Swayne, D.E. (1998). Comparisons of Highly Virulent H5N1 Influenza A Viruses Isolated from Humans and Chickens from Hong Kong. *J Virol* 72, 6678–6688.

Suárez-Zamorano, N., Fabbiano, S., Chevalier, C., Stojanović, O., Colin, D.J., Stevanović, A., Veyrat-Durebex, C., Tarallo, V., Rigo, D., Germain, S., et al. (2015). Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nat Med* 21, 1497–1501.

Sul, O.-J., Hyun, H.-J., Rajasekaran, M., Suh, J.-H., and Choi, H.-S. (2021). Estrogen enhances browning in adipose tissue by M2 macrophage polarization via heme oxygenase-1. *Journal of Cellular Physiology* 236, 1875–1888.

Sun, C.-P., Jan, J.-T., Wang, I.-H., Ma, H.-H., Ko, H.-Y., Wu, P.-Y., Kuo, T.-J., Liao, H.-N., Lan, Y.-H., Sie, Z.-L., et al. (2021). Rapid generation of mouse model for emerging infectious disease with the case of severe COVID-19. *PLOS Pathogens* 17, e1009758.

Sun, N., Li, C., Li, X.-F., Deng, Y.-Q., Jiang, T., Zhang, N.-N., Zu, S., Zhang, R.-R., Li, L., Chen, X., et al. (2020). Type-II Interferon-Inducible SERTAD3 Inhibits Influenza A Virus Replication by Blocking the Assembly of Viral RNA Polymerase Complex. *Cell Reports* 33, 108342.

Sun, Y., Wang, Q., Yang, G., Lin, C., Zhang, Y., and Yang, P. (2016). Weight and prognosis for influenza A(H1N1)pdm09 infection during the pandemic period between 2009 and 2011: a systematic review of observational studies with meta-analysis. *Infectious Diseases* 48, 813–822.

Suo, J., Zhao, X., Guo, X., and Zhao, X. (2018). Met-enkephalin improves metabolic syndrome in high fat diet challenged mice through promotion of adipose tissue browning. *Toxicology and Applied Pharmacology* 359, 12–23.

Suzuki, T., Gao, J., Ishigaki, Y., Kondo, K., Sawada, S., Izumi, T., Uno, K., Kaneko, K., Tsukita, S., Takahashi, K., et al. (2017). ER Stress Protein CHOP Mediates Insulin Resistance by Modulating Adipose Tissue Macrophage Polarity. *Cell Reports* 18, 2045–2057.

Svensson, K.J., Long, J.Z., Jedrychowski, M.P., Cohen, P., Lo, J.C., Serag, S., Kir, S., Shinoda, K., Tartaglia, J.A., Rao, R.R., et al. (2016). A Secreted Slit2 Fragment Regulates Adipose Tissue Thermogenesis and Metabolic Function. *Cell Metabolism* 23, 454–466.

Swayne, D.E., and Slemons, R.D. (1992). Evaluation of the Kidney as a Potential Site of Avian Influenza Virus Persistence in Chickens. *Avian Diseases* 36, 937–944.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820.

Tang, B.M., Shojaei, M., Teoh, S., Meyers, A., Ho, J., Ball, T.B., Keynan, Y., Pisipati, A., Kumar, A., Eisen, D.P., et al. (2019). Neutrophils-related host factors associated with severe disease and fatality in patients with influenza infection. *Nature Communications* 10, 3422.

Tanimura, Y., Aoi, W., Takanami, Y., Kawai, Y., Mizushima, K., Naito, Y., and Yoshikawa, T. (2016). Acute exercise increases fibroblast growth factor 21 in metabolic organs and circulation. *Physiological Reports* 4, e12828.

Tate, M.D., Ioannidis, L.J., Croker, B., Brown, L.E., Brooks, A.G., and Reading, P.C. (2011). The Role of Neutrophils during Mild and Severe Influenza Virus Infections of Mice. *PLoS One* 6.

Taubenberger, J.K., and Kash, J.C. (2010). Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation. *Cell Host & Microbe* 7, 440–451.

Taubenberger, J.K., and Morens, D.M. (2010). Influenza: The Once and Future Pandemic. *Public Health Rep* 125, 16–26.

Taubenberger, J.K., Kash, J.C., and Morens, D.M. (2019). The 1918 influenza pandemic: 100 years of questions answered and unanswered. *Science Translational Medicine* 11.

- Tavares, L.P., Garcia, C.C., Machado, M.G., Queiroz-Junior, C.M., Barthelemy, A., Trottein, F., Siqueira, M.M., Brandolini, L., Allegretti, M., Machado, A.M., et al. (2017). CXCR1/2 Antagonism Is Protective during Influenza and Post-Influenza Pneumococcal Infection. *Frontiers in Immunology* 8, 1799.
- Terness, P., Bauer, T.M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. (2002). Inhibition of Allogeneic T Cell Proliferation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase-expressing Dendritic Cells. *J Exp Med* 196, 447–457.
- Terrier, O., Moules, V., Carron, C., Cartet, G., Frobert, E., Yver, M., Traversier, A., Wolff, T., Riteau, B., Naffakh, N., et al. (2012). The influenza fingerprints: NS1 and M1 proteins contribute to specific host cell ultrastructure signatures upon infection by different influenza A viruses. *Virology* 432, 204–218.
- Terrier, O., Carron, C., Cartet, G., Traversier, A., Julien, T., Valette, M., Lina, B., Moules, V., and Rosa-Calatrava, M. (2014). Ultrastructural fingerprints of avian influenza A (H7N9) virus in infected human lung cells. *Virology* 456–457, 39–42.
- Than, A., Xu, S., Li, R., Leow, M.-S., Sun, L., and Chen, P. (2017). Angiotensin type 2 receptor activation promotes browning of white adipose tissue and brown adipogenesis. *Sig Transduct Target Ther* 2, 1–12.
- Theken, K.N., Tang, S.Y., Sengupta, S., and FitzGerald, G.A. (2021). The roles of lipids in SARS-CoV-2 viral replication and the host immune response. *Journal of Lipid Research* 62, 100129.
- Thiaville, M.M., Dudenhausen, E.E., Zhong, C., Pan, Y.-X., and Kilberg, M.S. (2008). Deprivation of protein or amino acid induces C/EBP $\beta$  synthesis and binding to amino acid response elements, but its action is not an absolute requirement for enhanced transcription. *Biochem J* 410, 473–484.
- Thitithanyanont, A., Engering, A., Ekchariyawat, P., Wiboon-ut, S., Limsalakpetch, A., Yongvanitchit, K., Kum-Arb, U., Kanchongkittiphon, W., Utaisincharoen, P., Sirisinha, S., et al. (2007). High Susceptibility of Human Dendritic Cells to Avian Influenza H5N1 Virus Infection and Protection by IFN- $\alpha$  and TLR Ligands. *The Journal of Immunology* 179, 5220–5227.
- Thomas, J.M., Pos, Z., Reinboth, J., Wang, R.Y., Wang, E., Frank, G.M., Lusso, P., Trinchieri, G., Alter, H.J., Marincola, F.M., et al. (2014). Differential Responses of Plasmacytoid Dendritic Cells to Influenza Virus and Distinct Viral Pathogens. *Journal of Virology* 88, 10758–10766.
- Thomas, T., Stefanoni, D., Reisz, J.A., Nemkov, T., Bertolone, L., Francis, R.O., Hudson, K.E., Zimring, J.C., Hansen, K.C., Hod, E.A., et al. (2020). COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status. *JCI Insight* 5.
- To, E.E., Erlich, J.R., Liang, F., Luong, R., Liang, S., Esaq, F., Oseghale, O., Anthony, D., McQualter, J., Bozinovski, S., et al. (2020). Mitochondrial Reactive Oxygen Species Contribute to Pathological Inflammation During Influenza A Virus Infection in Mice. *Antioxid Redox Signal* 32, 929–942.

- Toapanta, F.R., and Ross, T.M. (2009). Impaired immune responses in the lungs of aged mice following influenza infection. *Respiratory Research* 10, 112.
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S., Gomez, J., et al. (2013). New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLOS Pathogens* 9, e1003657.
- Trim, W.V., and Lynch, L. (2021). Immune and non-immune functions of adipose tissue leukocytes. *Nat Rev Immunol* 1–16.
- Tseng, Y.-H., Kokkotou, E., Schulz, T.J., Huang, T.L., Winnay, J.N., Taniguchi, C.M., Tran, T.T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., et al. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454, 1000–1004.
- Tsuchiya, M., Koizumi, Y., Hayashi, S., Hanaoka, M., Tokutake, Y., and Yonekura, S. (2017). The role of unfolded protein response in differentiation of mammary epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 484, 903–908.
- Turner, D.L., Bickham, K.L., Farber, D.L., and Lefrançois, L. (2013). Splenic Priming of Virus-Specific CD8 T Cells following Influenza Virus Infection. *Journal of Virology* 87, 4496–4506.
- Turpin, J., El-Safadi, D., Lebeau, G., Frumence, E., Desprès, P., Viranaïcken, W., and Krejbich-Trotot, P. (2021). CHOP Pro-Apoptotic Transcriptional Program in Response to ER Stress Is Hacked by Zika Virus. *Int J Mol Sci* 22, 3750.
- Uprasertkul, M., Puthavathana, P., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Srisook, K., Peiris, M., Nicholls, J.M., Chokeyphaibulkit, K., Vanprapar, N., and Auewarakul, P. (2005). Influenza A H5N1 Replication Sites in Humans. *Emerging Infectious Diseases* 11, 1036–1041.
- Van Riel, D., Van Den Brand, J.M.A., Munster, V.J., Bestebroer, T.M., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D.M.E., and Kuiken, T. (2009). Pathology and Virus Distribution in Chickens Naturally Infected with Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus (H7N7) During the 2003 Outbreak in The Netherlands. *Vet Pathol* 46, 971–976.
- VanOosten Anderson, R., McGill, J., and Legge, K.L. (2010). Quantification of the Frequency and Multiplicity of Infection of Respiratory- and Lymph Node-Resident Dendritic Cells During Influenza Virus Infection. *PLoS One* 5, e12902.
- Velazquez-Villegas, L.A., Perino, A., Lemos, V., Zietak, M., Nomura, M., Pols, T.W.H., and Schoonjans, K. (2018). TGR5 signalling promotes mitochondrial fission and beige remodelling of white adipose tissue. *Nature Communications* 9.
- Verhelst, J., Parthoens, E., Schepens, B., Fiers, W., and Saelens, X. (2012). Interferon-Inducible Protein Mx1 Inhibits Influenza Virus by Interfering with Functional Viral Ribonucleoprotein Complex Assembly. *Journal of Virology* 86, 13445–13455.

- Villarroya, F., Peyrou, M., and Giralt, M. (2017a). Transcriptional regulation of the uncoupling protein-1 gene. *Biochimie* 134, 86–92.
- Villarroya, F., Peyrou, M., and Giralt, M. (2017b). Transcriptional regulation of the uncoupling protein-1 gene. *Biochimie* 134, 86–92.
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S., et al. (2009). Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults (Massachusetts Medical Society).
- Vitali, A., Murano, I., Zingaretti, M.C., Frontini, A., Ricquier, D., and Cinti, S. (2012). The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *Journal of Lipid Research* 53, 619–629.
- Vogel, A.B., Haasbach, E., Reiling, S.J., Droebner, K., Klingel, K., and Planz, O. (2010). Highly Pathogenic Influenza Virus Infection of the Thymus Interferes with T Lymphocyte Development. *The Journal of Immunology* 185, 4824–4834.
- Vries, E. de, Tscherne, D.M., Wienholts, M.J., Cobos-Jiménez, V., Scholte, F., García-Sastre, A., Rottier, P.J.M., and Haan, C.A.M. de (2011). Dissection of the Influenza A Virus Endocytic Routes Reveals Macropinocytosis as an Alternative Entry Pathway. *PLOS Pathogens* 7, e1001329.
- Vries, E. van der, Stittelaar, K.J., Amerongen, G. van, Kroeze, E.J.B.V., Waal, L. de, Fraaij, P.L.A., Meesters, R.J., Luider, T.M., Nagel, B. van der, Koch, B., et al. (2013). Prolonged Influenza Virus Shedding and Emergence of Antiviral Resistance in Immunocompromised Patients and Ferrets. *PLOS Pathogens* 9, e1003343.
- Wagner, R.R. (1955). A pantropic strain of influenza virus: Generalized infection and viremia in the infant mouse. *Virology* 1, 497–515.
- Walter, P., and Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science*.
- Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R.S., and Li, F. (2020). Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *Journal of Virology*.
- Wang, H., and Jiang, C. (2009). Influenza A virus H5N1 entry into host cells is through clathrin-dependent endocytosis. *SCI CHINA SER C* 52, 464–469.
- Wang, A., Huen, S.C., Luan, H.H., Yu, S., Zhang, C., Gallezot, J.-D., Booth, C.J., and Medzhitov, R. (2016). Opposing Effects of Fasting Metabolism on Tissue Tolerance in Bacterial and Viral Inflammation. *Cell* 166, 1512-1525.e12.
- Wang, C., Huang, Z., Du, Y., Cheng, Y., Chen, S., and Guo, F. (2010). ATF4 regulates lipid metabolism and thermogenesis. *Cell Research* 20, 174–184.
- Wang, X., Tan, J., Zhao, J., Ye, Z., and Hewlett, I. (2014). Highly pathogenic avian influenza A virus (H5N1) can be transmitted in ferrets by transfusion. *BMC Infectious Diseases* 14, 192.

- Webster, R.G., Yakhno, M., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., and Copal Murti, K. (1978). Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84, 268–278.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., and Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56, 152–179.
- Weiner, J., Kranz, M., Klötting, N., Kunath, A., Steinhoff, K., Rijntjes, E., Köhrle, J., Zeisig, V., Hankir, M., Gebhardt, C., et al. (2016). Thyroid hormone status defines brown adipose tissue activity and browning of white adipose tissues in mice. *Scientific Reports* 6, 38124.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796–1808.
- Weitzel, J.M., and Alexander Iwen, K. (2011). Coordination of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology* 342, 1–7.
- Wells, M.A., Albrecht, P., Daniel, S., and Ennis, F.A. (1978). Host defense mechanisms against influenza virus: interaction of influenza virus with murine macrophages in vitro. *Infection and Immunity* 22, 758–762.
- Wensveen, F.M., Valentić, S., Šestan, M., Turk Wensveen, T., and Polić, B. (2015). Interactions between adipose tissue and the immune system in health and malnutrition. *Seminars in Immunology* 27, 322–333.
- Whittle, A.J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vázquez, M.J., Morgan, D., Csikasz, R.I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., et al. (2012). BMP8B Increases Brown Adipose Tissue Thermogenesis through Both Central and Peripheral Actions. *Cell* 149, 871–885.
- Wohlgemuth, N., Lane, A.P., and Pekosz, A. (2018). Influenza A Virus M2 Protein Apical Targeting Is Required for Efficient Virus Replication. *Journal of Virology* 92.
- Wong, C.K., Smith, C.A., Sakamoto, K., Kaminski, N., Koff, J.L., and Goldstein, D.R. (2017). Aging Impairs Alveolar Macrophage Phagocytosis and Increases Influenza-Induced Mortality in Mice. *The Journal of Immunology* 199, 1060–1068.
- Wood, I.S., Wang, B., and Trayhurn, P. (2009). IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 384, 105–109.
- Worthmann, A., John, C., Rühlemann, M.C., Baguhl, M., Heinsen, F.-A., Schaltenberg, N., Heine, M., Schlein, C., Evangelakos, I., Mineo, C., et al. (2017). Cold-induced conversion of cholesterol to bile acids in mice shapes the gut microbiome and promotes adaptive thermogenesis. *Nat Med* 23, 839–849.
- Wu, D., Shu, T., Yang, X., Song, J.-X., Zhang, M., Yao, C., Liu, W., Huang, M., Yu, Y., Yang, Q., et al. (2020a). Plasma metabolomic and lipidomic alterations associated with COVID-19. *Natl Sci Rev* 7, 1157–1168.

- Wu, J., Liu, X., Zhou, D., Qiu, G., Dai, M., Yang, Q., Pan, Z., Zhou, N., and Wu, P. (2020b). Identification of RT-PCR-Negative Asymptomatic COVID-19 Patients via Serological Testing. *Frontiers in Public Health* 8, 267.
- Wu, N.-H., Yang, W., Beineke, A., Dijkman, R., Matrosovich, M., Baumgärtner, W., Thiel, V., Valentin-Weigand, P., Meng, F., and Herrler, G. (2016). The differentiated airway epithelium infected by influenza viruses maintains the barrier function despite a dramatic loss of ciliated cells. *Sci Rep* 6, 39668.
- Wu, Y., Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y., and Gao, G.F. (2014). Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol* 22, 183–191.
- Xiao, H., Killip, M.J., Staeheli, P., Randall, R.E., and Jackson, D. (2013). The Human Interferon-Induced MxA Protein Inhibits Early Stages of Influenza A Virus Infection by Retaining the Incoming Viral Genome in the Cytoplasm. *Journal of Virology* 87, 13053–13058.
- Xue, M., Fu, F., Ma, Y., Zhang, X., Li, L., Feng, L., and Liu, P. (2018). The PERK Arm of the Unfolded Protein Response Negatively Regulates Transmissible Gastroenteritis Virus Replication by Suppressing Protein Translation and Promoting Type I Interferon Production. *Journal of Virology* 92.
- Xue, Y., Petrovic, N., Cao, R., Larsson, O., Lim, S., Chen, S., Feldmann, H.M., Liang, Z., Zhu, Z., Nedergaard, J., et al. (2009). Hypoxia-Independent Angiogenesis in Adipose Tissues during Cold Acclimation. *Cell Metabolism* 9, 99–109.
- Yadav, V., Panganiban, A.T., Honer Zu Bentrup, K., and Voss, T.G. (2016). Influenza infection modulates vesicular trafficking and induces Golgi complex disruption. *Virusdisease* 27, 357–368.
- Yanez, N.D., Weiss, N.S., Romand, J.-A., and Treggiari, M.M. (2020). COVID-19 mortality risk for older men and women. *BMC Public Health* 20, 1742.
- Yang, K.T., Wang, F., Lu, X., Peng, K., Yang, T., and David Symons, J. (2017). The soluble (Pro) renin receptor does not influence lithium-induced diabetes insipidus but does provoke being of white adipose tissue in mice. *Physiological Reports* 5, e13410.
- Yao, W., Wang, T., Jiang, B., Gao, F., Wang, L., Zheng, H., Xiao, W., Yao, S., Mei, W., Chen, X., et al. (2020a). Emergency tracheal intubation in 202 patients with COVID-19 in Wuhan, China: lessons learnt and international expert recommendations. *British Journal of Anaesthesia* 125, e28–e37.
- Yao, Z., Yan, Y., Zheng, X., Wang, M., Zhang, H., Li, H., and Chen, W. (2020b). Dietary Lactate Supplementation Protects against Obesity by Promoting Adipose Browning in Mice. *J. Agric. Food Chem.* 68, 14841–14849.
- Yau, W.W., Wong, K.A., Zhou, J., Thimmukonda, N.K., Wu, Y., Bay, B.-H., Singh, B.K., and Yen, P.M. (2021). Chronic cold exposure induces autophagy to promote fatty acid oxidation, mitochondrial turnover, and thermogenesis in brown adipose tissue. *IScience* 24, 102434.

Yu, C.-Y., Hsu, Y.-W., Liao, C.-L., and Lin, Y.-L. (2006). Flavivirus Infection Activates the XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response To Cope with Endoplasmic Reticulum Stress. *Journal of Virology* 80, 11868–11880.

Yuliana, A., Daijo, A., Jheng, H.-F., Kwon, J., Nomura, W., Takahashi, H., Ara, T., Kawada, T., and Goto, T. (2019). Endoplasmic Reticulum Stress Impaired Uncoupling Protein 1 Expression via the Suppression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Binding Activity in Mice Beige Adipocytes. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 274.

Zaki, A.M., van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Osterhaus, A.D.M.E., and Fouchier, R.A.M. (2012). Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia (Massachusetts Medical Society).

Zamboni, M., Nori, N., Brunelli, A., and Zoico, E. (2021). How does adipose tissue contribute to inflammaging? *Experimental Gerontology* 143, 111162.

Zhang, G., Sun, Q., and Liu, C. (2016). Influencing Factors of Thermogenic Adipose Tissue Activity. *Front. Physiol.* 7.

Zhang, K., Wong, H.N., Song, B., Miller, C.N., Scheuner, D., and Kaufman, R.J. (2005). The unfolded protein response sensor IRE1 $\alpha$  is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J Clin Invest* 115, 268–281.

Zhang, L., Guerrero-Juarez, C.F., Hata, T., Bapat, S.P., Ramos, R., Plikus, M.V., and Gallo, R.L. (2015). Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. *Science* 347, 67–71.

Zhang, S., Hu, B., Xu, J., Ren, Q., Wang, L., and Wang, S. (2019a). Influenza A virus infection induces liver injury in mice. *Microb Pathog* 137, 103736.

Zhang, X., Wang, X., Yin, H., Zhang, L., Feng, A., Zhang, Q.-X., Lin, Y., Bao, B., Hernandez, L.L., Shi, G.-P., et al. (2019b). Functional Inactivation of Mast Cells Enhances Subcutaneous Adipose Tissue Browning in Mice. *Cell Reports* 28, 792-803.e4.

Zhang, Z., Shao, M., Hepler, C., Zi, Z., Zhao, S., An, Y.A., Zhu, Y., Ghaben, A.L., Wang, M., Li, N., et al. (2019c). Dermal adipose tissue has high plasticity and undergoes reversible dedifferentiation in mice. *J Clin Invest* 129, 5327–5342.

Zhao, Y., Li, X., Yang, L., Eckel-Mahan, K., Tong, Q., Gu, X., Kolonin, M.G., and Sun, K. Transient Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor A in Adipose Tissue Promotes Energy Expenditure via Activation of the Sympathetic Nervous System. *Molecular and Cellular Biology* 38, e00242-18.

Zheng, W., and Tao, Y.J. (2013). Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *FEBS Letters* 587, 1206–1214.

Zheng, K.I., Feng, G., Liu, W.-Y., Targher, G., Byrne, C.D., and Zheng, M.-H. (2021). Extrapulmonary complications of COVID-19: A multisystem disease? *Journal of Medical Virology* 93, 323–335.

Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., et al. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273.

Zickler, M., Stanelle-Bertram, S., Ehret, S., Heinrich, F., Lange, P., Schaumburg, B., Kouassi, N.M., Beck, S., Jaekstein, M.Y., Mann, O., et al. (2021). Replication of SARS-CoV-2 in adipose tissue determines organ and systemic lipid metabolism in hamsters and humans. *Cell Metabolism*.

Ziętak, M., Kovatcheva-Datchary, P., Markiewicz, L.H., Ståhlman, M., Kozak, L.P., and Bäckhed, F. (2016). Altered Microbiota Contributes to Reduced Diet-Induced Obesity upon Cold Exposure. *Cell Metabolism* 23, 1216–1223.

Zwick, R.K., Guerrero-Juarez, C.F., Horsley, V., and Plikus, M.V. (2018). Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metabolism* 27, 68–83.

(1996). *New, Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases: Prevention and Control*. (WHO Regional Office for South-East Asia).

(2005). XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *The EMBO Journal* 24, 4368–4380.

(2014). Taking control over intracellular fatty acid levels is essential for the analysis of thermogenic function in cultured primary brown and brite/beige adipocytes. *EMBO Reports* 15, 1069–1076.

# Annexe

## Publications

### *Acceptées*

- Influenza infection rewires energy metabolism and induces browning features in adipose cells and tissues. Ayari A., Rosa-Calatrava M., Lancel S., Barthelemy J. et al., *Commun. Biol.* (2020). 4<sup>ième</sup> position.
- Influenza A Virus Infection induces White Adipose Tissue Browning: A Metabolic Adaptation to Infection? Barthelemy J., Wolowczuk I., *J. Cell. Immunol.* (2020). Première position.
- Influenza Virus Infection Impairs the Gut's Barrier Properties and Favors Secondary Enteric Bacterial Infection through Reduced Production of Short-Chain Fatty Acids. Sencio V. et al. *Infect Immun.* (2021). 7<sup>ième</sup> position.

### *Soumises*

- SARS-CoV-2 infection aggravates disease in diet-induced obese NASH hamsters. Briand F. et al. *Journal of Hepatology Reports.* 7<sup>ième</sup> position.

### *En cours de rédaction*

- Impact of SARS-CoV-2 infection on adipose tissue morphology and functionality in young adult vs. aged hamsters (titre provisoire). Barthelemy J., Bogard G., Sencio V., Robil C., Trottein F., Wolowczuk I. 1<sup>ière</sup> position (co-auteur).
- PERK signaling pathway is involved in influenza-induced fat browning (titre provisoire). Barthelemy J. et al. 1<sup>ière</sup> position.
- Adipose Tissues: Newly Recognized Contributors to Host Defense against Pathogens. Barthelemy J., Bogard G., Wolowczuk I., Revue prévue pour *Nat. Microbiol.* Première position.