NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 28 Avril 2025

Elisa DOUKBI

Phénotypage du tissu adipeux épicardique et ses liens avec les complications de l'obésité

Discipline

Biologie-Santé

Spécialité

Pathologie Vasculaire et Nutrition

École doctorale

ED 659 – Recherches biomédicales

Laboratoire/Partenaires de recherche

Centre de recherche en CardioVasculaire et Nutrition (C2VN)

Composition du jury

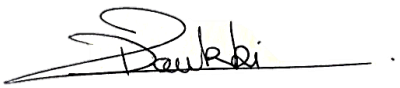
Jean-François TANTI	**Rapporteur**
INSERM U1065 - C3M	
Amine TOUBAL	**Rapporteur**
INSERM UMR S1151/CNRS UMR S8253	
Soazig LE LAY	**Examinatrice**
INSERM UMR1087 - CNRS UMR 6291	
Anne DUTOUR	**Examinatrice**
AMU - UMR 1263 - INRAE UMR 1260	
Frédéric CASTINETTI	**Président du jury**
INSERM, UMR 1251	
Bénédicte GABORIT	**Directrice de thèse**
AMU - UMR 1263 - INRAE UMR 1260	

Affidavit

Je soussignée, Elisa Doukbi, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique du Professeur Bénédicte Gaborit, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 24 février 2025



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

A celles qui étaient et
qui ne sont plus

Liste des publications et participations aux conférences

I. Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse

1. **Doukbi E**, Soghomonian A, Sengenès C, Ahmed S, Ancel P, Dutour A, Gaborit B. Browning Epicardial Adipose Tissue: Friend or Foe? *Cells,* 2022;11:991.

2. Barchuk M, Ancel P, Miksztowicz V, **Doukbi E**, Svilar L, Yñón D, Nogueira JP, Rubio M, Schreier L, Dutour A, Martin JC, Gaborit B, Berg G. Epicardial Adipose Tissue Ceramides Are Related to Lipoprotein Lipase Activity in Coronary Artery Disease: Unfolding a Missing Link. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology,* 2022;42:e242–e251.

3. **Doukbi E**, Lasbleiz A, Dutour A, Gaborit B. Le tissu adipeux dans tous ses états: dernières avancées: The different colours and functions of adipose tissue: what's new? *Nutrition Clinique et Métabolisme,* 2023;37:2S2-2S7.

4. Lasbleiz A, **Doukbi E**, Dutour A, Gaborit B. COVID-19 et obésité : quel rôle du tissu adipeux ?: COVID-19 and obesity : is there a role for adipose tissue? *Nutrition Clinique et Métabolisme,* 2023;37:2S40-2S45.

5. Ancel P, Martin JC, **Doukbi E**, Houssays M, Gascon P, Righini M, Matonti F, Svilar L, Valmori M, Tardivel C, Venteclef N, Julla JB, Gautier JF, Resseguier N, Dutour A, Gaborit B. Untargeted Multiomics Approach Coupling Lipidomics and Metabolomics Profiling Reveals New Insights in Diabetic Retinopathy. *International Journal of Molecular Sciences,* 2023;24:12053.

6. **Doukbi E**, Ancel P, Dutour A, Soghomonian A, Ahmed S, Castejon V, Piperoglou C, Gariboldi V, Lenoir M, Lechevallier E, Gondran-Tellier B, Boissier R, Ebbo M, Vély F, Gaborit B. Human epicardial fat has a beige profile and contains higher type 2 innate lymphoid cells than subcutaneous fat. *Obesity*. 2024;1-13. doi:10.1002/oby.24023

7. **Doukbi E** Ancel P, Lacroix R, Dutour A, Morange P, Dignat-George F, Chareyre C, Robert S, Lenoir M, Gariboldi V, Lechevallier E, Gondran-Tellier B, Boissier R, Deprade C, Dani C, Le Lay S, Gaborit B. Human epicardial adipose tissue derived extracellular vesicles modulate the adipocytes secretome via a pro-inflammatory profile. Manuscrit soumis au journal *JACC : basic to translational science* en Avril 2025.

II. Participations aux conférences au cours de la période de thèse

Titre : Le tissu adipeux épicardique humain présente un profil beige et contient plus de cellules immunitaires lymphoïdes innées de type 2 que le tissu adipeux sous-cutané

Auteurs : **Doukbi E**, Ancel P, Dutour A, Soghomonian A, Ahmed S, Castejon V, Piperoglou C, Gariboldi V, Lenoir M, Lechevallier E, Gondran-Tellier B, Boissier R, Ebbo M, Le Lay S, Vély F et Gaborit B

1) Communication orale, ***Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité*** (AFERO), 2024, Nantes, France

2) Communication orale, ***Société Francophone du Diabète*** **(SFD)**, 2024, Toulouse, France

3) Communication orale, ***Société Française d'Endocrinologie*** **(SFE)**, 2024, Clermont-Ferrand, France

Résumé

Le tissu adipeux épicardique (TAE) est un dépôt de graisse ectopique en contact direct avec le myocarde et les artères coronaires. Cardioprotecteur en conditions physiologiques, son phénotype devient inflammatoire avec l'obésité et l'insulinorésistance. Indépendamment des facteurs de risque cardiovasculaire classiques, la quantité de TAE est également un prédicteur d'événements cardiaques et de fibrillation atriale. Cependant, notre groupe et d'autres ont précédemment démontré que le TAE humain avait un profil transcriptomique unique et une signature adipocytaire beige comparé au TA sous-cutané. Cependant, les acteurs cellulaires et cibles moléculaires impliqués dans son inflammation ou son beiging restent à identifier.

Au cours de cette thèse, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle les cellules immunitaires de la fraction vasculaire stromale du TAE participeraient à la modification de son phénotype immuno-métabolique, notamment via des vésicules extracellulaires (VEs).

Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse transcriptomique rétrospective et un immunophénotypage prospectif comparant le TAE aux TAs viscéral (TAV), sous-cutané abdominal (scAbdo) et sous-cutané thoracique (scTh) humains. Nos résultats ont montré une corrélation entre des gènes du beiging et de la réponse immunitaire Th2. Nous avons ensuite identifié pour la première fois la présence de cellules lymphoïdes innées (ILCs) dans le TAE. Leur nombre était plus élevé dans le TAE et le TAV que dans les deux TAs sous-cutanés, avec une dominance des ILC1. Les ILC2, cellules de la réponse immunitaire Th2 connues pour leur implication dans le phénomène de beiging et leur effet anti-inflammatoire, étaient significativement plus nombreuses dans le TAE, que dans les autres TAs. De façon intéressante, leur quantité était corrélée à plusieurs gènes de la réponse Th2 (*HMMR*, *IL-13*, *TCF21*) et du beiging (*UCP-1*, *TNFRSF9* et *ALPL)*.

Nous avons ensuite analysé l'implication des VEs du TAE humain sur le caractère inflammatoire ou beige des cellules hMADS (*human multipotent adipose-derived stem*). Ces VEs présentaient une signature moléculaire unique, riche en cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-6, TNF-α, MCP-1), facteurs pro-sénescents (OPN), pro-fibrotiques (END, MMP9) et en molécules insulino-sensibilisatrices et du métabolisme lipidique (ADIPOQ, APOA1). L'exposition des hMADS aux VEs du TAE induisait une augmentation de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) et pro-thrombotiques (PAI-1), traduisant une réponse inflammatoire accrue, et un auto-entretient de l'inflammation du TAE par voie autocrine. Par ailleurs, nous avons identifié une modulation du sécrétome des hMADS via ces VEs : par une augmentation de l'expression de APOA1, relaxine 2 et SHBG, impliqués dans la régulation hormonale, la signalisation insulinique et la réduction du stress oxydatif et de l'apoptose. Aucun effet spécifique des VEs du TAE n'a cependant été observé sur le beiging, la respiration ou la production d'ATP des cellules hMADS.

Nos résultats suggèrent que le TAE possède un phénotype immuno-métabolique unique, et une présence d'ILCs. Par ailleurs, nos analyses sur les VEs ont révélé une signature moléculaire spécifique, enrichie en cytokines pro-inflammatoires, pro-sénescentes et pro-fibrotiques mais également en facteurs insulino-sensibilisateurs, comme l'adiponectine. L'exposition de cellules adipeuses à ces VEs a induit une augmentation de molécules prothrombotique, d'adhésion, du métabolisme glucido-lipidique et hormonal. En revanche, *in vitro*, nous n'avons pas mis en évidence d'effet des ces VEs sur le beiging.

Mots clés : Ectopie, Tissu adipeux épicardique, Cellules lymphoïdes innées, Vésicules extracellulaires, Beiging, Inflammation, Phénotypage, Maladies cardiovasculaires

Abstract

The epicardial adipose tissue (EAT) is an ectopic fat deposit in direct contact with the myocardium and coronary arteries. Cardioprotective under physiological conditions, its phenotype becomes inflammatory with obesity and insulin resistance. Independently of classical cardiovascular risk factors, the amount of EAT is also a predictor of cardiac events and atrial fibrillation. However, our group and others have previously demonstrated that human EAT has a unique transcriptomic profile and a beige adipocyte signature compared to subcutaneous adipose tissue. Nevertheless, the cellular actors and molecular targets involved in its inflammation or beiging remain to be identified.

During this thesis, we hypothesized that immune cells from the stromal vascular fraction of EAT contribute to the modification of its immuno-metabolic phenotype, particularly through extracellular vesicles (EVs).

First, we conducted a retrospective transcriptomic analysis and a prospective immunophenotyping comparing EAT to human visceral adipose tissue (VAT), abdominal subcutaneous adipose tissue (AbSAT), and thoracic subcutaneous adipose tissue (ThSAT). Our results showed a correlation between beiging-related genes and the Th2 immune response. We then identified for the first time the presence of innate lymphoid cells (ILCs) in EAT. Their number was higher in EAT and VAT than in the two subcutaneous adipose tissues, with a dominance of ILC1. ILC2, Th2 immune response cells known for their involvement in beiging and anti-inflammatory effects, were significantly more abundant in EAT than in the other adipose tissues. Interestingly, their quantity was correlated with several Th2 response genes (*HMMR*, *IL-13*, *TCF21*) and beiging markers (*UCP-1*, *TNFRSF9*, and *ALPL*).

We then analyzed the implication of human EAT-EVs on the inflammatory or beige characteristics of hMADS (human multipotent adipose-derived stem) cells. These EVs exhibited a unique molecular signature, rich in pro-inflammatory cytokines (IL-8, IL-6, TNF-α, MCP-1), pro-senescent factors (OPN), pro-fibrotic markers (END, MMP9), and insulin-sensitizing and lipid metabolism-related molecules (ADIPOQ, APOA1). Exposure of hMADS to EAT-derived EVs induced an increase in adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) and pro-thrombotic factors (PAI-1), reflecting an enhanced inflammatory response and self-sustained EAT inflammation via an autocrine pathway. Additionally, we identified a modulation of the hMADS secretome through these EVs with an increase in APOA1, relaxin 2 andSHBG, which are involved in hormonal regulation, insulin signaling, oxidative stress reduction, and apoptosis inhibition. However, no specific effect of EAT-EVs was observed on beiging, respiration, or ATP production in hMADS cells.

Our results suggest that EAT has a unique immuno-metabolic phenotype, characterized by the presence of ILCs. Furthermore, our analyses of EVs revealed a specific molecular signature enriched in pro-inflammatory, pro-senescent, and pro-fibrotic cytokines, but also in insulin-sensitizing factors such as adiponectin. The exposure of adipose cells to these EVs induced an increase in pro-thrombotic and adhesion molecules, as well as changes in glucose-lipid metabolism and hormonal regulation. However, *in vitro*, we did not observe any effect of these EVs on beiging.

Keywords: Epicardial adipose tissue, Innate lymphoid cells, Extracellular vesicles, Beiging, Inflammation, Cardiovascular diseases

Remerciements

Je souhaite remercier le **Dr. Jean-François Tanti** et le **Dr. Amine Toubal**, de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que le **Pr. Frédéric Castinetti** pour son rôle d'examinateur au sein de ce jury. Je remercie également chaleureusement le **Dr. Soazig Le Lay** avec qui j'ai eu la chance d'échanger à de nombreuses reprises et qui a été d'une très grande aide grâce à son expertise sur les vésicules extracellulaires. Je souhaite également exprimer ma profonde gratitude au **Pr. Anne Dutour** qui me fait aujourd'hui l'honneur d'être présidente de mon jury de thèse. J'ai été impressionnée dès les premiers instants, lors de notre tout premier entretien. Je lui suis reconnaissante pour son soutien, pour avoir pris le temps de m'écouter. La thèse est un travail qui exige beaucoup d'efforts et nécessite une collaboration d'équipe étroite. Dans les instants difficiles, vous avez su être présente et m'offrir une oreille attentive. Je vous en remercie !

Je voudrais à présent remercier le **Pr. Bénédicte Gaborit** pour m'avoir accueilli dans son équipe et m'avoir pris comme doctorante. Je lui exprime aussi, à travers ces quelques mots, ma profonde gratitude pour la chance qu'elle m'a donné de faire partie de son équipe. Ses conseils m'ont beaucoup aidé et j'ai eu la chance d'apprendre de nombreuses choses à ses côtés. Elle m'a, à sa façon, poussé à me surpasser et m'a appris une autre vision de la recherche. Durant cette thèse, tout n'a pas toujours été simple, mais avec le temps je me suis sentie encouragée et valorisée. Je ne la remercierais jamais assez pour ces années. Bien entendu, je ne pourrais pas remercier cette équipe sans remercier **Patricia Ancel**, merveilleuse ingénieure qui a été d'une aide précieuse ces trois dernières années. Je la remercie pour sa grande disponibilité tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir appris toutes ces techniques et d'avoir été encourageante lorsque j'étais stressée. Je me rends bien compte de la chance que j'ai eu de travailler à ses côtés.

Je tiens à présent à remercier toutes les personnes qui se sont investies dans mon projet de thèse. Je pense notamment au **Dr. Frédéric Vély**, au **Pr. Romaric Lacroix** et au **Pr. Jean-François Landrier** qui ont fait partie de mon comité de suivi de thèse. Je tiens particulièrement à les remercier pour leur bienveillance et l'attention qu'ils ont su porter à mon intégration dans mon équipe et à mon environnement de travail. Un grand merci ! De plus, je tiens à remercier l'équipe du Dr. Vély au Marseille Immunopôle, **Christelle Piperoglou** et **Amélie Pouchin** pour leur aide dans le phénotypage des ILCs. Ainsi que **Corinne Chareyre** de l'équipe du Pr. Lacroix pour son aide et sa patience lorsqu'elle m'apprenait à isoler les vésicules. Bien sûr, je voudrais remercier **Stéphane Robert** qui, dès mon premier stage de Master 1 au sein du C2VN a été d'une grande disponibilité. Merci d'ailleurs pour cette super formation ! J'ai vraiment apprécié travailler avec lui toutes ces années.

Durant cette thèse, mon équipe a su me montrer que les collaborations ne se cantonnent pas seulement à notre laboratoire. Grâce au Pr Gaborit j'ai eu la chance de collaborer avec de nombreux autres laboratoires. Bien sûr, le Marseille Immunopôle mais également avec l'institut du Thorax à Nantes et le Dr. Le Lay. Je tiens à remercier **Alexandre Altié** au CINAM pour m'avoir aidé en microscopie électronique et m'avoir permis de faire mes premières images de vésicules. Je me souviendrai de sa gentillesse. Nous avons également collaboré avec le **Dr. Christian Dani** de l'Institut de Biologie Valrose à Nice. Je le remercie de nous avoir fourni les principales cellules de notre étude !

Je souhaite remercier toutes les équipes de chirurgiens et de coordinateurs des prélèvements d'organes de l'AP-HM et de Toulon pour m'avoir aidé à réaliser cette thèse. Je voudrais remercier l'équipe de Chirurgie Urologique et transplantation rénale dirigée par le **Pr. Éric Lechevallier**, je remercie en particulier le **Pr. Romain Boissier** et le **Dr. Bastien Gondran-Tellier**. Merci également à l'équipe de chirurgie cardiaque et notamment au **Dr. Marien Lenoir** et au **Pr. Vlad Gariboldi**. Et bien évidemment, cette thèse n'aurait jamais pu être réalisée sans l'aide des **familles des patients** qui ont accepté de fournir des prélèvements de tissu adipeux pour la recherche. Leur aide a surement été la plus précieuse.

À l'équipe 2 du C2VN un grand merci pour m'avoir accueilli parmi vous. L'aide que j'ai pu y trouver auprès de tous les chercheurs m'a beaucoup touché. Merci alors au **Pr. Marie-Christine Alessi** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et dans son équipe. Merci au **Dr. Franck Peiretti** pour les discussions que nous avons eues et pour m'avoir challengé lors de nos réunions d'équipe. Merci au **Dr. Grace Thomas** pour m'avoir permis d'apprendre ce que c'était de préparer des conférences et pour m'avoir aidé lors de certaines expériences. Merci également au **Dr. Marjorie Poggi** pour sa gentillesse, sa joie et sa disponibilité. Je vous remercie tous très chaleureusement.

Je ne pourrais pas remercier cette équipe sans y remercier tous les étudiants qui en ont fait partie. Alors tout d'abord, un très très grand merci à **Elisa Gabinaud** qui a partagé ces 3 années de thèse avec moi. J'espère toujours me souvenir de la personne formidable que tu es, de tes folies et de tes conseils. Merci d'avoir toujours pris des nouvelles quand ça n'allait pas. Avoir partagé cette thèse avec toi a été un immense plaisir. Je remercie également le **Dr. Clara Bernard** avec qui j'ai pu énormément parler parce qu'elle est toujours tellement intéressante, même si elle ne se fait pas confiance. J'ai aimé apprendre à tes côtés. À tous mes compagnons de laboratoire, **Dr. Thimothée Bigot**, **Dr. Astrid Soghomonian**, **Dr. Mathilde Vénéziano-Boccia, Camille Roze** et **Juliette Rousseau** un grand merci pour m'avoir fait rire de nombreuses fois, pour toutes nos sorties, pour nos grandes conversations et pour avoir partagé pour la plupart le même bureau. C'est en partie grâce à vous tous que je garderais de bons souvenirs de ces trois années.

Au sein du C2VN j'ai également eu la chance d'avoir été accueilli par l'équipe 3 et notamment par le **Pr. Christophe Dubois** et le **Dr. Laurence Panicot-Dubois** lors de mes stages de Master. C'est dans votre équipe que j'ai pris confiance en moi. Vous avez fait partie de ceux qui m'ont fait adorer la recherche. Je vous en remercie infiniment. J'ai tellement apprécié travailler avec vous et j'ai beaucoup appris à vos côtés. Je me souviendrai longtemps de votre bienveillance à mon égard et de votre générosité. Merci d'avoir pris soin de moi, même durant ma thèse. Merci également au **Dr. Lydie Crescence** pour tous ses conseils et pour m'avoir poussée dans mes retranchements. Merci à leurs anciennes étudiantes, les Docteurs **Mélanie Langiu**, **Ana Luisa Palacios-Acedo, Julie Tourn** pour nos soirées, nos rires et nos discussions.

Je voudrais particulièrement remercier le **Dr. Mélanie Langiu** pour la personne qu'elle est. Pour être devenue une amie qui m'est très chère. Nos longues discussions, nos pleurs, nos rires, nos soirées, tous ceci je m'en souviendrais pour toujours. Tu as fait de cette thèse un moment des plus agréables. Toutes ces fois où l'on s'est aidé, où l'on s'est entrainé ensemble, je ne les oublie pas. Je garde en moi tous tes précieux conseils. Plus encore, je n'oublierai jamais

toutes ces heures passées ensemble à discuter de tout et de rien, à rigoler, à nous confier. Tu as été une véritable épaule sur laquelle je me suis appuyée, et je t'en suis immensément reconnaissante. Il y a un an, tu devenais Docteur et ce moment marquait la fin d'un travail acharné. Tu peux en être fière, moi je le suis !

À mes meilleurs amis, **Pauline** et **Alexandre**. Nous nous connaissons depuis le lycée et bien que nous ayons été éloignés physiquement durant certaines années, notre quatuor avec Tanguy est toujours resté soudé. Nous avons toujours trouvé le moyen de nous voir. Je ne pense pas pouvoir un jour rêver d'avoir de meilleures personnes dans ma vie. À toi **Alex** je voudrais dire que je suis si fière de toi et de ton parcours. Tu mérites tout le bonheur du monde ! À toi ma **Pauline**, je ne pense pas avoir besoin d'en dire beaucoup pour que tu saches à quel point je t'aime. Nous avons partagé 3 années de notre vie durant nos études à Montpellier, et je peux dire sans grand mal que c'étaient surement les plus belles années de ma vie. Et on les a vécus ensemble. Je n'ai jamais eu besoin de te parler tous les jours pour savoir que tu serais toujours là pour moi. Si je pleure, tu pleures ; si tu ris, je ris. Notre lien est fort et il dépasse les mots. Avoir une personne comme toi à mes côtés m'a toujours donnée confiance et j'ai toujours eu foi en notre amitié parce qu'elle s'est toujours apparentée à de la fraternité. Merci d'être encore à mes côtés aujourd'hui, parce que j'ai pu puiser en toi une force immense.

À la Famille Monge, à **Sonia**, **David** et **Gauthier**, je voudrais dire le plus grand des mercis. Je peux dire sans difficulté aujourd'hui que je vous considère comme des membres de ma famille. Toute la gentillesse que j'ai trouvée chez vous dès le premier jour me montre aujourd'hui toute la chance que j'ai de vous avoir. Merci pour absolument tout. Je voudrais aussi vous remercier ainsi que **Marie-Claude** de votre présence à l'un des jours le plus difficile de ma vie. Vous voir ce jour-là m'a montré tout votre soutien, vous prendre dans mes bras m'a apporté tant de force. Bien évidemment, je remercie la famille entière, les **grands-parents**, les **oncles**, les **tantes**, les **cousins**. Je vous remercie tous de m'avoir accepté, je suis tellement heureuse et fière d'être entrée dans votre famille.

À toute ma famille, je vous remercie du soutien inconditionnel dont vous avez fait preuve. Je remercie mes frères et sœurs, mes tantes, mes oncles et tous mes cousins et cousines. Je voudrais tout particulièrement remercier ma tante **Kheira** pour tout ce qu'elle a fait pour ma sœur et moi depuis que nous sommes petites. Merci d'avoir été présente. Merci d'avoir su combler l'écart d'âge qui nous éloignait avec mamie. Merci pour toutes ces fois où nous sommes sorties ensemble quand j'étais plus jeune. Merci d'avoir été aussi courageuse et aussi forte. Merci à ma cousine **Priscilla**. Merci pour nos sorties à quatre. Ce sont celles dont je me rappellerai jusqu'à la fin de ma vie. Ce sont les meilleurs souvenirs de mon enfance. Merci pour ta culture cinématographique. Parce que tu es celle qui nous a fait découvrir tellement de choses et qui nous a amenés pour la 1ère fois au cinéma. Merci pour les moments difficiles. Parce que tu étais toujours la première que mamie appelait et qui réglait les conflits. Merci d'être une femme forte. Parce que tu nous appris à l'être. Merci pour tout. Je t'aime ma sœur. Et puis, merci à **Marjorie** et toi d'avoir apporté **Noam** dans nos vies. Marjorie, tu fais depuis bien longtemps partie de ma famille, je t'aime comme une sœur ! Merci à ma tante **Samia** et à **Jean-Paul** pour m'avoir de nombreuses fois accueillie chez eux et s'être si bien occupé de moi. Merci pour nos débats et pour nos discussions si animées. J'ai trouvé chez vous beaucoup de générosité et de sérénité. Merci **Cédric** d'avoir pris les choses en main quand on n'y arrivait

plus. Merci à toi **Kamel**, pour toutes ces fois où on est sorti ensemble, pour ce vol en hélicoptère, pour nos rires, pour tes bras quand j'en ai eu le plus besoin. Je ne saurai jamais assez te remercier. Et puis, merci à **Emilie** ! Toutes nos virées, nos joies, nos discussions nous ont tellement rapprochés au fil des années. J'ai été tellement fière d'être à tes côtés le jour de l'arrivée de **Lyam**, tu n'aurais pas pu me rendre plus heureuse.

À ma ***mamie***, je voulais montrer à travers ces mots, qui je l'espère resteront, quelle femme extraordinaire m'a élevée. Je voudrais que le monde sache quelle femme généreuse, aimante et incroyablement forte à fait de moi celle que je suis aujourd'hui. Je ne pense jamais avoir autant compté pour personne. Cette thèse est pour moi, la meilleure manière de la remercier de tout ce qu'elle a enduré pendant près de vingt ans pour ma sœur et moi. Je la remercie d'avoir été la première personne à toujours croire en moi. Je sais que j'ai été une grande fierté pour elle. Le devenir a été une grande responsabilité et le rester en était une encore plus grande. Cela m'a demandé de toujours être à la hauteur de l'amour et des attentes qu'elle a placées en moi. Après ce jour, je deviendrai ma propre fierté.

À ma sœur, **Océane**. Que dire. Il est difficile de trouver les bons mots pour exprimer toute la gratitude que j'éprouve envers toi. Nous avons appris ensemble à traverser les difficultés de cette vie et les épreuves ont fait de nos liens un ciment qu'il est dur de détruire. Je ne pourrais jamais exprimer en quelques mots tout l'amour que je ressens pour toi. Plus que quiconque aujourd'hui, je sais que tu es fière, je vois déjà les étoiles briller dans tes yeux. Je te suis reconnaissante d'être toi et d'être là pour moi. Tes rires remplissent mon cœur de joie et tes pleurs éveillent en moi quelque chose d'indescriptible. On ne sait pas de quoi est fait l'avenir, mais il ne m'enlèvera jamais cet amour que j'ai pour toi.

À toi ***Tanguy***, je ne sais pas comment exprimer toute la gratitude que je ressens. Tu me soutiens chaque jour de cette vie et tu la rends tellement plus belle. Tu es aussi celui à qui je dois le plus. Je te remercie pour toutes ces belles années que j'ai vécues à tes côtés et pour toutes celles qui nous restent à partager. Notre complicité est unique et elle me comble de joie. Nous avons ri ensemble, nous avons appris ensemble et nous sommes devenus adultes ensemble. Et dans tous ces moments de la vie, tu es ce qui est resté constant. Tu prends toujours mon parti, peu importe le sujet, et c'est ce qui me plait. Ta manière de me comprendre sans jugement sont à mes yeux des trésors inestimables. Merci d'être à mes côtés ! PS : Merci aussi d'être toujours le premier qui me fait réviser (depuis le bac), qui m'écoute et me conseille pour mes oraux, et merci de t'être si souvent levé dans la nuit pour m'accompagner chercher les prélèvements.

Je ne garde à présent que les bons souvenirs.

Liste des abréviations générales

A	
AAM	Macrophages alternativement activé
AdEVs	Vésicule extracellulaire dérivée du TA
ADSC	Cellules souches dérivées du TA
AGL	Acides gras libres
APHM	Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille
ATM	Adipose Tissue Macrophages

B	
β3-AR	Récepteur β3-adrénergiques

C	
CAD	Maladie coronarienne *(coronary artery disease)*
CAC score	Score de calcification des artères coronaires
cDC	Cellule dendritique conventionnelle
CPA	Cellules progénitrices adipocytaires
CSA	Cellules souches adipeuses
CSH	Cellules souches hématopoïétiques

D	
DT2	Diabète de type 2
DC	Cellule dendritique
DDE	Dichlorodiphényltrichloroéthylène
DTT	Dichlorodiphényltrichloroéthane

F	
FA	Fibrillation atriale
FDR	*False Discovery Rate*
FVS	Fraction vasculaire stromale

G	
GWAS	*Genome-wide association studies*

H	
HDL	*High density lipoprotein*
HFD	Régime riche en graisse
HFpEF	Insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée

I	
IA	Intelligence artificielle
IC	Insuffisance cardiaque
IFATS	*International federation for adipose therapeutics and science*
ILC	Cellules lymphoïdes innée
ILV	Vésicule intraluminale
IMC	Indice de masse corporelle
iNKT	*Invariant natural killer T*
IPA	*Ingenuity Pathway Analysis*
ISCT	*International Society for Cell Therapy*
ISEV	*International Society for Extracellular Vesicles*

K	
KO	*Knock-out*

L	
LB	Lymphocyte B
LDL	Low density lipoproteins
Lin	Lineage
LT	Lymphocyte T

M	
mAT	TA médiastinal
MCV	Maladies cardiovasculaires
MESA	*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*
MetEnk	Méthionine-enképhalines
MHO	Obésité métaboliquement saine
MMA	Macrophages métaboliquement activés
MUO	Obésité métaboliquement non saine
MV	Microvésicule
MVE	Endosomes multivésiculaires

N	
NCD-RisC	*NCD Risk Factor Collaboration*
NK	*Natural killer*

O	
OMS	Organisation mondiale de la santé

P	
PBMC	Cellules mononuclées du sang Périphérique
pDC	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PE	Perturbateurs endocriniens
PMO	Prélèvements multi-organes

S	
scAbdo	Sous-cutané abdominal (AbSAT)
scTh	Sous-cutané thoracique (ThSAT)
SI	Système immunitaire
SNPs	*Single nucleotide polymorphisms*

T	
TA	Tissu adipeux
TAE	Tissu adipeux épicardique
TAsc	Tissu adipeux sous-cutané
TAT	Tissu adipeux thymique
TAV	Tissu adipeux viscéral
TEP	Tomographie par émission de positons
Th	*T helper*

V	
VE	Vésicule extracellulaire
VLDL	Very low density lipoprotein
VG/VD	Ventricule gauche / droit

Liste des abréviations des gènes et protéines

A	
AC	Adénylate cyclase
ACTC1	Actine alpha 1
ADIPOQ	Adiponectine
ALPL	Alkaline phosphatase, biomineralization associated
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANP	Peptide natriurétique atrial
ASC-1	Asc-type amino acid transporter 1

B	
BMP7	Bone morphogenetic protein 7
BNP	Peptide natriurétique cérébral
BUB1B	BUB1 mitotic checkpoint Serine/Threonine Kinase B

C	
CAH1	Carbonic anhydrase 1
CCL11	C-C motif chemokine ligand 11
CCL2	(MCP-1) Monocyte chemoattractant protein-1
CD137	(TNFRSF9) TNF receptor Superfamily member 9
CIDEA	Cell Death Inducing DFFA Like Effector A
CITED1	Cbp interacting transactivator with Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 1
Cox8b	Cytochrome c oxidase subunit 8B
Cox4	Cytochrome c oxidase subunit 4

D	
Dio2	Iodothyronine Deiodinase 2
DR3	Death receptor 3

E	
Ear2	Eosinophil cationic protein 2
EBF3	EBF transcription factor 3
Elov3	ELOVL fatty acid elongase 3
EPA	Acide eicosapentaénoïque
Epsti1	Epithelial Stromal Interaction 1
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport proteins
Eva-1	Protein eva-1 homolog A

F	
FASN	Fatty acid synthase
FBOX31	F-box protein 31
FGF21	Fibroblast growth factor 21
Fndc5	Fibronectin domain containing 5
FoxP3	Forkhead box P3
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1

G	
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GNDF	Glial cell derived neurotrophic factor
GSTP1	Glutathion S-transférase P

H	
HDAC	Histones désacétylases
HIF-1α	Hypoxia inducible factor 1α
HMMR	Hyaluronan mediated motility recept.
HO-1	Heme oxygenase 1
HoxC	HOXC homeobox C
HSP70	Heat shock protein family a

I	
ICOS-ICOSL	Inducible t cell costimulator ICOS ligand
IFN-γ	Interféron-γ
IGFBP3	Insulin like growth factor binding protein 3
IL	Interleukine
IRS-1	Insulin receptor substrate 1

K	
KIF23	Kinesin Family Member 23
KLRG1	Killer Cell Lectin Like Receptor G1
KLB	Receptor Klotho Beta

L	
LEP	Leptine
LHX8	LIM Homeobox 8

M	
MAPK	Mitogen-activated protein kinase 1
MCM6	Minichromosome maintenance complex component 6
MCP-1	Monocyte chemoattractant prot-1
MELK	Maternal embryonic leucine zipper kinase
METRNL	Meteorin like, glial cell differentiation regulator
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MIP-1α	Macrophage inflammatory prot-1α
MPZL2	Myelin protein zero like 2
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
Myf5	Myogenic factor 5

N	
NE	Norépinéphrine
NRG4	Neuregulin 4
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NRF1	Nuclear respiratory factor 1

O	
Oprd1	Opioid Receptor Delta 1

P	
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PGC-1	Pparg coactivator 1 alpha
PKA	protein kinase A
PDGFRα	Platelet derived growth factor receptor α
PRDM16	PR/SET Domain 16
P2RX5	Purinergic receptor P2X 5
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1
Pex16	Peroxisomal biogenesis factor16
Ppargc1a	PPARG coactivator 1 alpha

R	
RET	Ret proto-oncogene
ROS	Reactive oxygen species

S	
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
SERCA2b	Sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ -ATPase
Sca1	Spinocerebellar ataxia type 1
sPLA2IIA	Secreted phospholipase A2 type IIA
SHOX2	Shox homeobox 2
SLC2A4	Solute carrier family 2 member 4

T	
TNF	Tumor necrosis factor
TSH	Thyroid stimulating hormone
TCF21	Transcription factor 21
Tbx1	T-box transcription factor 1
Tmem26	Transmembrane Protein 26
TNFRSF9	TNF receptor superfamily member 9

U	
UCP-1	Uncoupling protein 1
UHRF1	Ubiquitin like with PHD and ring Finger domains 1

Z	
Zic-1	Zic Family Member 1

Table des matières

Affidavit....1

Liste des publications et participations aux conférences....3

I. Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse....3

II. Participations aux conférences au cours de la période de thèse....4

Résumé....5

Abstract....6

Remerciements....7

Liste des abréviations....11

Introduction....16

I. Obésité et maladies cardiovasculaires....17

1. Définition et épidémiologie de l'obésité....17

2. Les déterminants de l'obésité....19

3. Complications cardiovasculaires et métaboliques de l'obésité....24

a) Les complications métaboliques....25

b) Les complications cardiovasculaires de l'obésité....27

4. L'obésité métaboliquement saine....30

5. Les dépôts de graisse ectopique....32

II. Les tissus adipeux....35

1. Généralités....35

2. Modification du tissu adipeux dans l'obésité....42

a) Modifications morphologiques....43

b) Modifications cellulaires et inflammation chronique....44

c) Modifications moléculaires....45

d) Focus sur la fraction vasculaire stromale (FVS)....46

e) Les cellules immunitaires de la FVS....47

f) Les vésicules extracellulaires (VEs) dans le tissu adipeux....55

3. Les différentes couleurs du tissu adipeux....63

a) Les tissus adipeux blanc et brun....63

b) Le tissu adipeux beige....66

c) Le tissu adipeux rose....66

4. Les marqueurs adipocytaires des différents tissus adipeux....67

a) Marqueurs des adipocytes blancs....68

b) Marqueurs des adipocytes bruns....68

c) Marqueurs des adipocytes beiges....69

5. Beiging du tissu adipeux et facteurs beigisants....69

a) Stimuli thermogéniques....69

b) Stimuli protéiques et lipidiques....70

c) Peptides natriurétiques....70

d) Muscle....71

e) Cellules immunitaires 71
f) Les vésicules extracellulaires 73
III. Le tissu adipeux épicardique (TAE) 74
1. Généralités 74
2. TAE et fonction endocrine 75
3. Implications du TAE dans les maladies cardiovasculaires 77
a) Maladie coronarienne 77
b) Fibrillation atriale (FA) 78
c) Morphologie et fonction cardiaque 79
4. Composition cellulaire du TAE 79
5. Phénotype beige du TAE 81
a) Preuves du phénotype beige du TAE 81
b) Proposition de facteurs beigisants dans le TAE 83
c) TAE et perte du beiging ou Whitening 84
Objectif global de l'étude 86
Résultats 88
PARTIE 1 : Immunophénotypage du tissu adipeux épicardique **89**
I. Objectif et contexte 89
II. Matériels et méthodes 90
III. Résultats 96
IV. Discussion 114
PARTIE 2 : Les vésicules extracellulaires comme médiateurs de la communication intercellulaire **120**
I. Objectif et contexte 120
II. Résultats 121
III. Discussion 157
Conclusion sur les travaux de thèse et perspectives 164
I. Synthèse 164
II. Perspectives 166
Bibliographie 169
Annexes 220

Introduction

I. Obésité et maladies cardiovasculaires

1. Définition et épidémiologie de l'obésité

➢ *Définition de l'obésité*

L'obésité est définie comme une pathologie chronique résultant d'un déséquilibre à long terme entre les apports et les dépenses énergétiques (Sørensen, 2009). Ce déséquilibre entraîne alors une accumulation anormale ou excessive de graisses pouvant se caractériser par des altérations du tissu adipeux (TA) et de son microenvironnement. En 2025, un consensus d'experts a redéfini l'obésité clinique comme une maladie chronique résultant d'un excès de masse grasse altérant la fonction des organes ou de l'organisme entier et la capacité à accomplir les tâches quotidiennes, indépendamment de la présence d'autres maladies liées à l'adiposité (Rubino *et al.*, 2025). L'excès de masse grasse est communément évalué au moyen de techniques anthropométriques telles que l'indice de masse corporelle (IMC), calculé en divisant le poids par la taille au carré (kg/m^2). Ainsi les diagnostics du surpoids et de l'obésité se définissent respectivement par un IMC supérieur ou égal à 25 kg/m² et 30 kg/m² (**Figure 1**). En 2009, une analyse de 57 études prospectives, publiée dans le *Lancet* mettait en avant qu'au-delà d'un IMC de 25 kg/m^2 et pour chaque augmentation de 5 unités d'IMC, la mortalité globale augmente de 29 %, la mortalité vasculaire de 41 % et la mortalité liée au diabète de 210 % (Prospective Studies Collaboration, 2009).

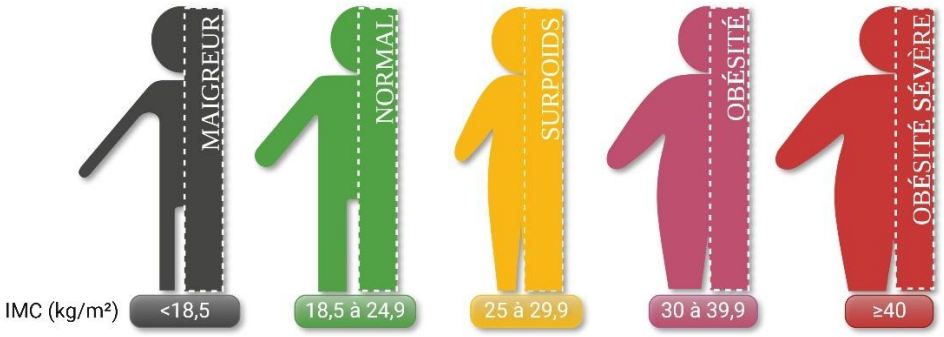


Figure 1 | Définition du surpoids et de l'obésité chez l'adulte selon l'indice de masse corporelle.

Cet indicateur, largement utilisé en clinique, est employé uniformément chez les adultes, indépendamment de leur âge et de leur sexe. De plus, uniquement basé sur les mesures du poids et de la taille, il ne prend pas en compte la répartition de l'adiposité, et ne la distingue pas des autres tissus de l'organisme. En conséquence, une même valeur d'IMC peut correspondre à des quantités de graisse différentes selon les individus et peut varier en fonction du sexe (Ross *et al.*, 1993, 1994), de l'âge (Forbes & Halloran, 1976; Rolland-Cachera *et al.*, 1991) ou encore de l'origine ethnique des patients (Deurenberg *et al.*, 1998; Swinburn *et al.*, 1996). De nombreuses corrélations ont tout de même été établies entre l'IMC et la quantité de TA total, notamment avec la graisse abdominale (Browning *et al.*, 2011; Sardinha *et al.*, 1998). Il est aujourd'hui reconnu que le TA viscéral (TAV) intra-abdominal pose un risque plus élevé pour la santé que le TA sous-cutanée (TAsc) (L. Wang et al., 2024), mais ceux-ci ne sont pas distingués par l'IMC. A cela s'ajoute également l'existence de patients chez lesquels on ne retrouve pas les séquelles attendues de leur poids (*cf. Obésité métaboliquement saine*).

Par conséquent, de nouveaux marqueurs d'identification de la santé métabolique telle que la mesure du tour de taille sont apparus. En 2018, Park *et al.* décrivaient un nouvel indice anthropométrique, l'indice de tour de taille ajusté au poids (WWI pour *Weight-adjusted-Waist Index*), permettant d'évaluer l'adiposité en standardisant le tour de taille par rapport au poids. Cette mesure, ainsi que le rapport taille-hanches, sont ainsi utilisés comme des informateurs indirects de la quantité de graisse abdominale. En 2020, la *Société internationale d'athérosclérose* et la *Commission internationale sur le risque cardiométabolique* demandaient alors que le tour de taille soit systématiquement inclus dans l'évaluation et la prise en charge des patients en situation d'obésité, en complément de l'IMC (Ross *et al.*, 2020). Des études ont notamment démontré que cette combinaison permettait de mieux prédire les risques liés à l'obésité et plus largement au syndrome métabolique (Doubki *et al.*, 2023; Gierach *et al.*, 2014; M. Yang *et al.*, 2023).

➢ *Epidémiologie*

En début d'année, le *Lancet* publiait un article sur les tendances mondiales de la malnutrition et de l'obésité de 1990 à 2022 (NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC), 2017). La *NCD Risk Factor Collaboration* (NCD-RisC) y regroupait une analyse de plus de 3600 études représentatives de la population, portant sur 222 millions d'enfants, adolescents et adultes. Les résultats de l'étude révèlent que la prévalence combinée de la malnutrition et de l'obésité aurait augmenté dans la plupart des pays depuis 1990. L'obésité est aujourd'hui qualifiée par l'Organisme Mondial de la Santé (OMS) de véritable problème de santé, voire d'épidémie mondiale, provoquant chaque année plus de 4 millions de décès depuis 2017. En 2022, son rapport sur l'obésité européenne indiquait que le surpoids et l'obésité affectaient 60 % des adultes de l'Union européenne (*WHO European Regional Obesity Report, 2022*). En France, deux grandes études ont mis en évidence l'augmentation de la prévalence de l'obésité dans le pays. En 2021, Czernichow *et al.* présentaient des résultats issus de la cohorte Constances incluant un échantillon de plus de 63 500 hommes et femmes adultes âgés entre 18 et 69 ans et suivis de 2013 à 2016 (Czernichow *et al.*, 2021). L'étude mettait en évidence une prévalence de l'obésité de près de 14 % en 2013, ayant légèrement augmenté à 15 % en 2016. Ils montraient également une augmentation significative de l'obésité de 50 % chez les femmes (p = 0,03) et 93% chez les hommes (p = 0,02) âgés de 18 à 29 ans. Plus récemment en 2023, la *Ligue contre l'obésité* publiait son édition 2020 de l'étude Obépi-Roche (Fontbonne *et al.*, 2023). Celle-ci a mis en évidence que près de la moitié de la population française (43,7 %) serait en situation de surpoids ou d'obésité (**Figure 2**) incluant une prévalence de l'obésité de 17 %. Les résultats de ces études montrent que l'obésité aurait alors augmenté de 2 points entre 2016 et 2020 (**Figure 2**).

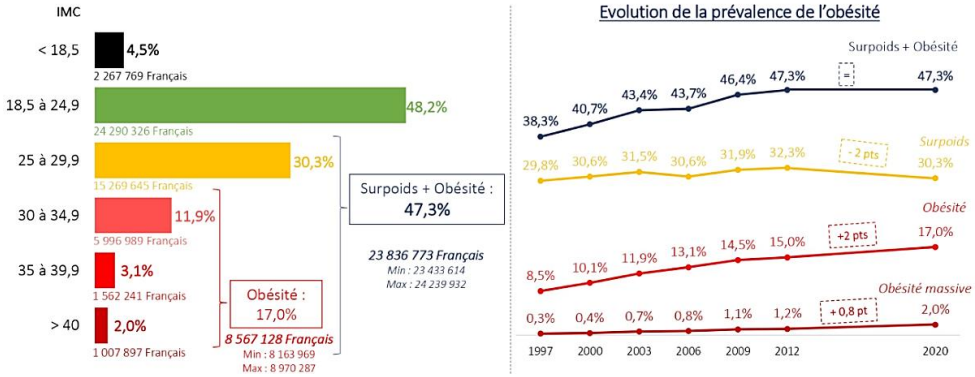


Figure 2 | Prévalence du surpoids et de l'obésité en France (d'après l'enquête épidémiologique nationale de la Ligue contre l'Obésité (Fontbonne *et al.*, 2023)).

2. Les déterminants de l'obésité

L'obésité est souvent attribuée à un déséquilibre entre une consommation énergétique excessive et une dépense énergétique insuffisante. Cependant l'étiologie de cette pathologie est en réalité plus complexe et résulte de la combinaison de facteurs génétiques, physiologiques, environnementaux, psychologiques, sociaux et économiques qui interagissent à divers degrés pour favoriser son développement (Aronne *et al.*, 2009; Wright & Aronne, 2012) (**Figure 3**).

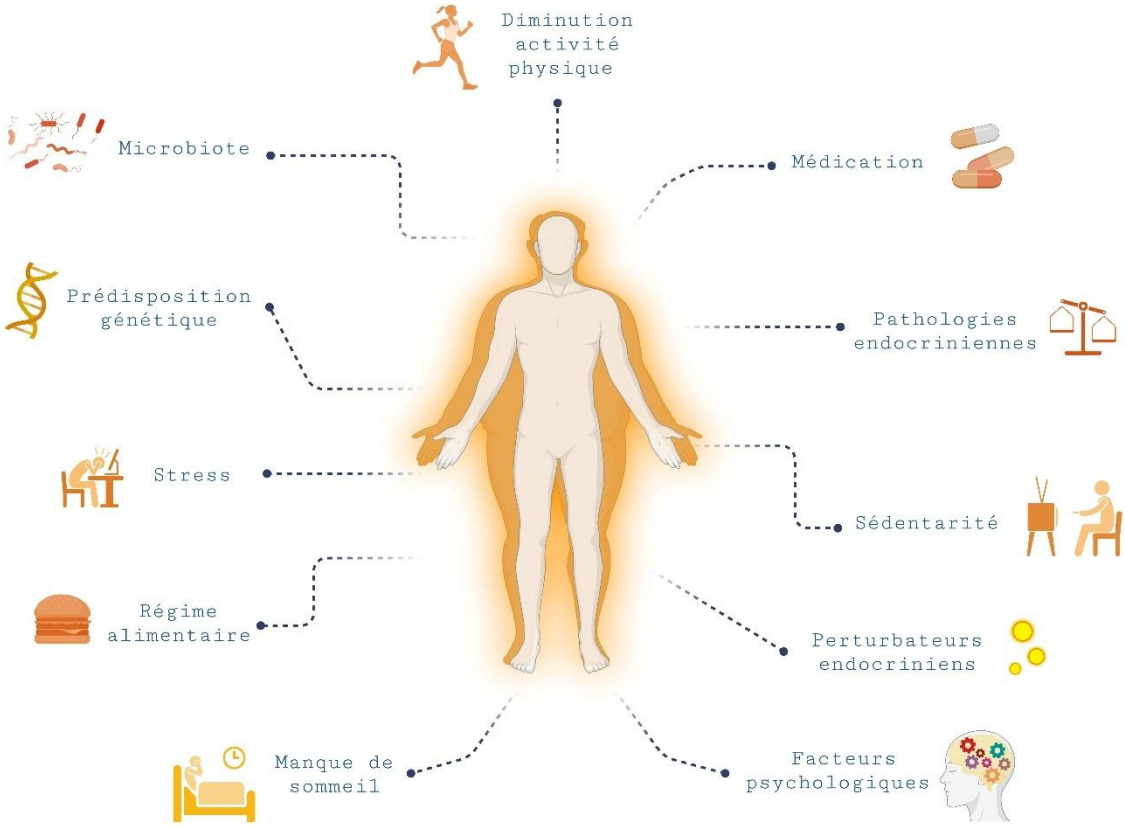


Figure 3 | Liste non exhaustive des facteurs favorisant le surpoids et l'obésité.

➢ *Les facteurs environnementaux*

L'obésité résulte ainsi de l'interaction de divers facteurs, incluant les habitudes alimentaires, le niveau d'activité physique, ainsi que les caractéristiques individuelles qui influencent la dépense énergétique. Parmi ces acteurs, l'environnement de vie dans lequel évolue les individus a fait l'objet de nombreuses recherches.

De nos jours, l'**environnement alimentaire** a évolué de manière à favoriser la suralimentation au travers de régimes alimentaires hypercaloriques, riches en sucres ajoutés et matières grasses (Lecerf, 2021). Ainsi les habitudes alimentaires, caractérisées par une importante densité calorique, associées à une diminution des apports en fibres et micronutriments contribuent au déséquilibre énergétique positif et à l'accumulation de TA. Des études ont notamment montré que lorsque la densité énergétique d'un repas augmente, l'apport calorique suit la même tendance, même si la quantité totale de nourriture consommée reste stable pour une personne donnée (Bell *et al.*, 1998).

Ajouté à cela, les modes de vie ont évolué au cours des dernières décennies. La tendance mondiale montre une diminution considérable du volume total de l'activité physique quotidienne. L'**inactivité physique** se manifeste de manière significative dans divers aspects de la vie quotidienne. Dans la vie professionnelle, de nombreux emplois modernes impliquent une réduction des opportunités de mouvement. Aujourd'hui, plus de 80 % des travailleurs pratiquent des emplois sédentaires (Bergouignan & Simon, 2021). L'essor massif des avancées technologiques en termes de transports et de moyens de communication ont aussi largement contribué à la diminution de l'activité physique. En 1995, les *Centres pour le contrôle et la prévention des maladies* et le *Collège américain de médecine du sport* préconisaient au moins 30 minutes d'activité physique chez l'adulte (Pate *et al.*, 1995). En 2005, leur rapport montrait que moins de la moitié des adultes américains pratiquaient ces niveaux d'activité physique (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2007). En France, Verdot *et al.* ont récemment présenté les résultats de deux enquêtes transversales basées sur la population française : l'*Etude Nationale Nutrition Santé* (2006-2007) et l'*Etude Esteban* (2014-2016) (Verdot *et al.*, 2022). Cette dernière montrait que seulement 71% des hommes et 53% des femmes respectaient les recommandations en matière d'activité physique.

L'inactivité est souvent exacerbée par la **sédentarité** et les loisirs sédentaires tels que regarder la télévision ou jouer à des jeux vidéo (Bergouignan & Simon, 2021). Une étude des années 90, incluant plus de 15 000 individus de 15 ans et plus, montrait notamment que le temps passé assis durant des loisirs est positivement associé à l'IMC, indépendamment du niveau d'activité physique du loisir (Martínez-González *et al.*, 1999). Les comportements sédentaires, qu'ils soient de loisir ou professionnels, comme passer de longues heures assis au travail, peuvent occuper jusqu'à 50 à 60 % du temps quotidien des adultes (Matthews *et al.*, 2008). En 2003, des chercheurs avaient examiné l'association entre les comportements sédentaires, en particulier le fait de regarder la télévision, et le risque d'obésité chez les femmes (F. B. Hu *et al.*, 2003). Ceux-ci avaient alors montré que chaque augmentation de deux heures par jour de temps passé devant la télévision était associée à une augmentation de 23 % du risque d'obésité (IC à 95 % : 17-30 %). De même, chaque augmentation de 2 heures par jour de la position assise au travail était associée à une augmentation du risque d'obésité de 5 % (IC 95 % : 0-10 %).

L'augmentation de la sédentarité a également augmenté chez l'enfant et l'adolescent avec moins d'éducation physique dans les écoles, et plus de temps consacré aux comportements sédentaires (télévision, Internet, jeux vidéo…) (Hills *et al.*, 2011; Zink *et al.*, 2024). L'analyse de Verdot *et al.* a mis en évidence que seuls 51 % des garçons et 33 % des filles respectaient les recommandations d'au moins 60 minutes d'activité physique d'intensité modérée à vigoureuse par jour (Verdot *et al.*, 2022). Trois quarts des enfants passaient deux heures ou plus devant un écran chaque jour (Verdot *et al.*, 2022). L'inactivité physique, exacerbée par ces nouveaux modes de vie sédentaires dans les pays occidentaux semblent alors avoir un impact significatif sur l'augmentation de l'obésité.

L'augmentation de l'utilisation et la diffusion de substances chimiques telles que les **perturbateurs endocriniens** (PE) dits « obésogènes » favorisent également la prise de poids (Arsenescu *et al.*, 2008; Darbre, 2017). Aujourd'hui largement reconnu comme un organe endocrinien, le TA est alors sujet à ces perturbateurs métaboliques qui modifient la programmation de l'adipogenèse (Heindel *et al.*, 2015). Ces composés peuvent agir de manière directe ou indirecte, en favorisant la différenciation des cellules précurseurs en adipocytes et en augmentant leur nombre, ou via la dérégulation du métabolisme et de l'équilibre énergétique

(Grün *et al.*, 2006; M. J. Kim *et al.*, 2021). Ainsi certains PE tels que le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), interdit en 1973, ou encore le dichlorodiphényltrichloroéthylène (DDE) ont montré des concentrations sériques positivement corrélées au volume de masse graisseuse globale (Cano-Sancho *et al.*, 2017; Rönn *et al.*, 2011). D'autres encore comme certains phtalates (mono-2-éthylhexyl, mono-n-butyl, mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl) sont positivement corrélés à l'IMC ou au tour de taille chez l'Homme (Amin *et al.*, 2018; Hatch *et al.*, 2008).

Certaines **conditions médicales** et **traitements médicamenteux** peuvent contribuer à l'obésité. Les troubles hormonaux, comme l'hypothyroïdie, peuvent altérer le métabolisme et provoquer une prise de poids significative. Mais les dérèglements hormonaux ne sont pas les seules conditions qui favorisent la prise pondérale. En effet, les médicaments agissant sur le système nerveux central tels que les antipsychotiques, les antidépresseurs, les régulateurs de l'humeur ou encore les antiépileptiques, les antihistaminiques et les hormones stéroïdes peuvent également être impliqués dans la prise de poids (Scheen, 2021).

Le **microbiote intestinal** joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme et du poids corporel. Son influence sur l'équilibre énergétique de l'hôte a d'abord été mis en évidence au travers d'études sur les modèles murins axéniques (Aron-Wisnewsky & Clément, 2016; Bäckhed *et al.*, 2004). Les premières études ont montré que les souris axéniques soumises à un régime riche en graisses, présentent une réduction de l'adiposité par rapport aux souris conventionnelles recevant le même régime, et ce, malgré une consommation calorique plus élevée et une dépense énergétique plus faible (Bäckhed *et al.*, 2004; Turnbaugh *et al.*, 2006, 2008). Cependant, après l'introduction de contenu fécal provenant de souris conventionnelles chez les souris axéniques, celles-ci prennent rapidement du poids et voient leur masse graisseuse augmenter sans modification de leur apport calorique. En 2013, une étude publiée dans *Science* a effectué un transfert de microbiote de jumelles adultes, l'une en situation d'obésité et l'autre mince, à des souris axéniques. Les résultats ont montré la transmission du phénotype pondéral des donneuses aux souris : augmentation de la masse corporelle totale et de la masse grasse, ainsi que des phénotypes métaboliques associés à l'obésité (Ridaura *et al.*, 2013). De plus, les maladies cardiométaboliques ont aussi été associées à des modifications de la composition du microbiote intestinal. Les technologies de séquençage à haut débit ont permis des études approfondies du microbiote et des métabolites bactériens, révélant que les patients atteints de maladies cardiométaboliques présentent souvent des variations dans certains groupes bactériens par rapport aux individus en bonne santé (Kennedy *et al.*, 2014; V. Thomas *et al.*, 2015). Ces approches ont notamment permis de montrer que la phosphatidylcholine alimentaire, convertie par le microbiote intestinal en triméthylamine N-oxide (TMAO) pourrait participer au risque cardiovasculaire (Z. Wang *et al.*, 2011).

Le **sommeil insuffisant** est un autre facteur crucial dans l'augmentation du risque d'obésité. Spiegel *et al.* ont montré que chez des individus sains, une réduction du sommeil à 4 heures entraînait une baisse de la tolérance au glucose et des concentrations de TSH, ainsi qu'une augmentation du cortisol en soirée et de l'activité du système nerveux sympathique, comparé à un sommeil de 10 heures (Spiegel *et al.*, 1999). Plus tard, la même équipe a observé que cette restriction de sommeil réduisait la leptine de 18 % et augmentait la ghréline de 28 %, tout en accroissant la faim de 24 %, et l'appétit de 23 %, notamment pour les aliments riches en calories et en glucides (33 % à 45 %) (Spiegel *et al.*, 2004). De nombreuses autres études épidémiologiques prospectives chez les enfants et les adultes s'accordent à dire qu'un sommeil

court aurait un rôle causal dans l'obésité (Cappuccio *et al.*, 2008; Knutson, 2010), et le surrisque de diabète de type 2 (DT2) (Knutson & Van Cauter, 2008; Schmid *et al.*, 2015).

Les **dimensions psychologiques** et émotionnelles sont également déterminantes dans l'augmentation du risque d'obésité. Le stress, la dépression et l'anxiété peuvent mener à des comportements alimentaires compulsifs. Sur une analyse de 70 études évaluant la relation entre les expériences de vie négatives et l'obésité, 87 % d'entre elles rapportent que ces expériences de vie négatives constituent un facteur de risque de développement de l'obésité et de l'hyperphagie boulimique (Palmisano *et al.*, 2016).

Les **inégalités socio-économiques** accentuent également le problème, puisqu'un niveau socio-économique plus bas est un indicateur fort de surpoids et d'obésité (Wells, 2013). Les personnes à faibles revenus ont souvent un accès limité à des aliments sains et à des environnements favorables à l'exercice physique (Drewnowski & Specter, 2004). De plus, les aliments peu coûteux ont souvent une haute densité énergétique, et un faible pouvoir satiétogène ce qui favorise l'augmentation de la prévalence du surpoids et de l'obésité (Drewnowski, 2009).

En outre, les environnements alimentaires, physiques, biologiques et psychologiques jouent un rôle déterminant : la disponibilité omniprésente d'aliments énergétiquement denses et peu coûteux, combinée à des environnements construits qui limitent les opportunités d'activité physique, contribuent à l'épidémie d'obésité.

Le modèle génétique proposé par James Neel en 1962, connu sous le nom de théorie du *thrifty gene* ou « gène économiseur » (Neel, 1962), souligne l'interaction entre facteurs environnementaux et prédispositions génétiques. Cette théorie proposait que l'augmentation de l'obésité et du diabète dans les sociétés occidentales pouvaient avoir des racines évolutives (**Figure 4**).

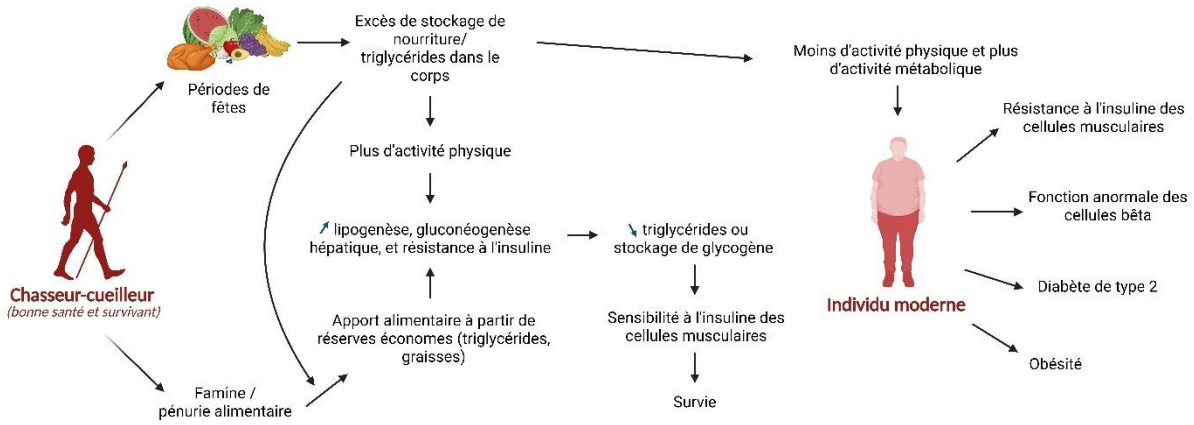


Figure 4 | Théorie du "*Thrifty gene*" (traduction d'après Gupta *et al., Curr Obes Rep*, 2024 (Gupta *et al.*, 2024)).

Hypothèse du gène économe : Le métabolisme alimentaire des chasseurs-cueilleurs dans un environnement de « festin » et de famines leur permet de survivre. Les individus modernes qui suivent un mode de vie occidental (ayant changé plus vite que les gènes) avec moins d'activité physique sont ainsi fortement prédisposés à l'obésité et au DT2 (Gupta *et al.*, 2024).

Ainsi certains gènes auraient évolué afin de favoriser le stockage des graisses comme mécanisme de survie durant les périodes de pénurie alimentaire. Ils auraient été alors sélectionnés et transmis aux générations suivantes. Dans les sociétés contemporaines où la nourriture est abondante, le *thrifty gene* devient alors un désavantage et contribuerait à l'obésité

(Neel, 1962). Peu de preuves existent aujourd'hui pour identifier ces gènes, ouvrant la voie à d'autres hypothèses (Johnson *et al.*, 2022). Des théories alternatives, comme la *drifty gene hypothesis* (hypothèse du gène dériveur), suggèrent que des gènes non spécifiquement liés à la gestion de la graisse pourraient également jouer un rôle (Speakman, 2018). D'autres encore ont proposé que la perte de certains gènes, tels que celui de l'uricase qui augmente les niveaux d'acide urique, aurait aidé à la survie de nos ancêtres, mais semble aujourd'hui accroître notre susceptibilité à l'obésité et au DT2 en réponse à un régime alimentaire occidental (Johnson *et al.*, 2022).

➢ *Les facteurs génétiques et épigénétiques*

Des études sur les familles et les jumeaux montrent une héritabilité élevée de l'IMC, estimée entre 70 % et 80 %. En outre, des formes monogéniques d'obésité, bien que plus rares et généralement plus sévères, peuvent résulter d'une seule mutation génétique, se manifestant souvent dès la petite enfance.

Les causes génétiques de l'obésité sont variées et impliquent des mécanismes physiopathologiques divers. On distingue d'ailleurs trois formes principales : ce sont les obésités **monogénique**, **syndromique** et **polygénique** chacune ayant des caractéristiques spécifiques et des implications cliniques différentes. L'obésité est principalement considérée comme une maladie **polygénique** et multifactorielle puisque cette forme représente près de 95 % des cas. Dans l'obésité polygénique, les facteurs environnementaux jouent un rôle crucial, mais une composante génétique significative est également reconnue. Elle résulte de l'interaction de nombreux variants génétiques, chacun ayant un effet modeste, mais cumulatif. Ce sont les études de séquençage du génome à grande échelle (GWAS, *genome-wide association studies*) qui ont permis d'identifier de nombreux loci associés au phénotype obèse (González-Muniesa *et al.*, 2017). En 2018, une méta-analyse combinant des études GWAS et comptabilisant près de 700 000 individus, a identifié 941 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) associés à l'IMC dont 751 SNPs étaient situés dans des loci encore non-identifiés auparavant (Yengo *et al.*, 2018). L'année suivante une autre méta-analyse de GWAS étudie cette fois-ci la répartition de la graisse corporelle, mesurée par le rapport taille-hanche et ajusté pour l'IMC, et identifie 463 signaux dans 346 loci (Pulit *et al.*, 2019). De plus, une forte héritabilité des traits appétitifs (réactivité à la satiété (21%) et signaux alimentaires (10 %)) liée aux influences environnementales partagées par les jumeaux, suggère que la vulnérabilité génétique à la prise de poids s'exerce aussi au travers de l'environnement (Carnell *et al.*, 2008).

En plus des mutations génétiques, les **facteurs épigénétiques** jouent un rôle important dans le développement de l'obésité. L'épigénétique correspond à des modifications héréditaires dans l'expression des gènes sans changement de la séquence d'ADN tel que par exemple la méthylation de l'ADN ou les modifications des histones (méthylation, acétylation…) (Jaenisch & Bird, 2003). Ces modifications peuvent être influencées par des facteurs environnementaux, tels que la nutrition prénatale et postnatale, le microbiote intestinal ou encore le stress et l'exposition à des toxines (Floris *et al.*, 2016; Herrera *et al.*, 2011). Des évidences de méthylation du gène de la leptine ont par exemple été associées à des facteurs périnataux et infantiles. Des analyses de sang maternel, de cordon et de placenta ont montré qu'une méthylation du promoteur de *LEP* dans ces tissus était, entre-autre, associée à un faible poids de naissance et à un gain de poids gestationnel excessif chez la mère (Bouchard *et al.*, 2010; Lesseur *et al.*, 2013). En 2020, une étude a montré qu'une alimentation maternelle déséquilibrée

avec dysglycémie durant la grossesse pouvait entraîner des modifications épigénétiques chez l'enfant (Antoun *et al.*, 2020). D'autres modifications épigénétiques seraient impliquées dans le développement de l'obésité. On peut notamment citer les études sur les histones désacétylases (HDAC) montrant un remodelage de la chromatine par ces histones et donc un changement d'expression de *Cebpα*, *FoxA1*, *Hnf4α* chez les souris obèses (Leung *et al.*, 2014). Certains microARNs circulants tels que les miR- 486-5p, 486-3p, 142-3p, 130 b et 423-5p ont été significativement associés à l'obésité, notamment infantile (Prats-Puig *et al.*, 2013).

Le développement des études de GWAS a favorisé la découverte de nombreux déterminants génétiques de l'obésité. On sait aujourd'hui que ces variations génétiques et épigénétiques peuvent prédisposer à la prise de poids, tandis que les facteurs environnementaux obésogènes peuvent exacerber ces prédispositions. De nombreuses stratégies thérapeutiques prometteuses émergent dans le but de lutter contre l'obésité et l'accumulation excessive de graisses que ce soit au niveau local ou systémique. Dans cette thèse, nous aborderons notamment l'idée du remodelage adipocytaire.

3. Complications cardiovasculaires et métaboliques de l'obésité

La principale complication de l'obésité réside dans son impact sur l'espérance de vie. Dans la population générale, le surpoids et l'obésité sont associés à l'augmentation de la mortalité toutes causes confondues (Berrington de Gonzalez *et al.*, 2010; Global BMI Mortality Collaboration *et al.*, 2016). A l'échelle de l'Union Européenne, une étude a montré que 70 % des décès attribuables à un excès de poids étaient d'origine cardiovasculaire (Banegas *et al.*, 2003). A l'échelle mondiale, une étude sur l'effet du surpoids et de l'obésité dans 195 pays a montré qu'un IMC élevé était responsable de 4 millions de décès en 2015, parmi lesquels plus des deux tiers étaient causés par des maladies cardiovasculaires (MCV) (GBD 2015 Obesity Collaborators et al., 2017). Bien que l'obésité soit une condition médicale en soi, celle-ci est capable d'aggraver des affections préexistantes et d'en déclencher de nouvelles (Safaei *et al.*, 2021) (**Figure 5**). En effet, l'obésité peut affecter presque tous les systèmes biologiques, comme les systèmes cardiovasculaire, endocrinien, nerveux central ou encore gastro-intestinal (Bischoff *et al.*, 2017). Les complications liées à l'obésité peuvent varier d'une personne à l'autre, elles dépendent à la fois du degré d'obésité, de la répartition du TA, de l'ancienneté de la surcharge pondérale et des facteurs de risque cardiovasculaire associés (âge, antécédents familiaux, tabagisme, diabète, hypertension artérielle et dyslipidémie) (Wilkins *et al.*, 2010; Emerging Risk Factors Collaboration *et al.*, 2011; Poirier *et al.*, 2006). De plus, les caractéristiques du TA, tant mécaniques que sécrétoires, ainsi que sa localisation (sous-cutanée ou viscérale), sont responsables de différentes complications, qu'elles soient cardiovasculaires, métaboliques ou inflammatoires (**Figure 5**).

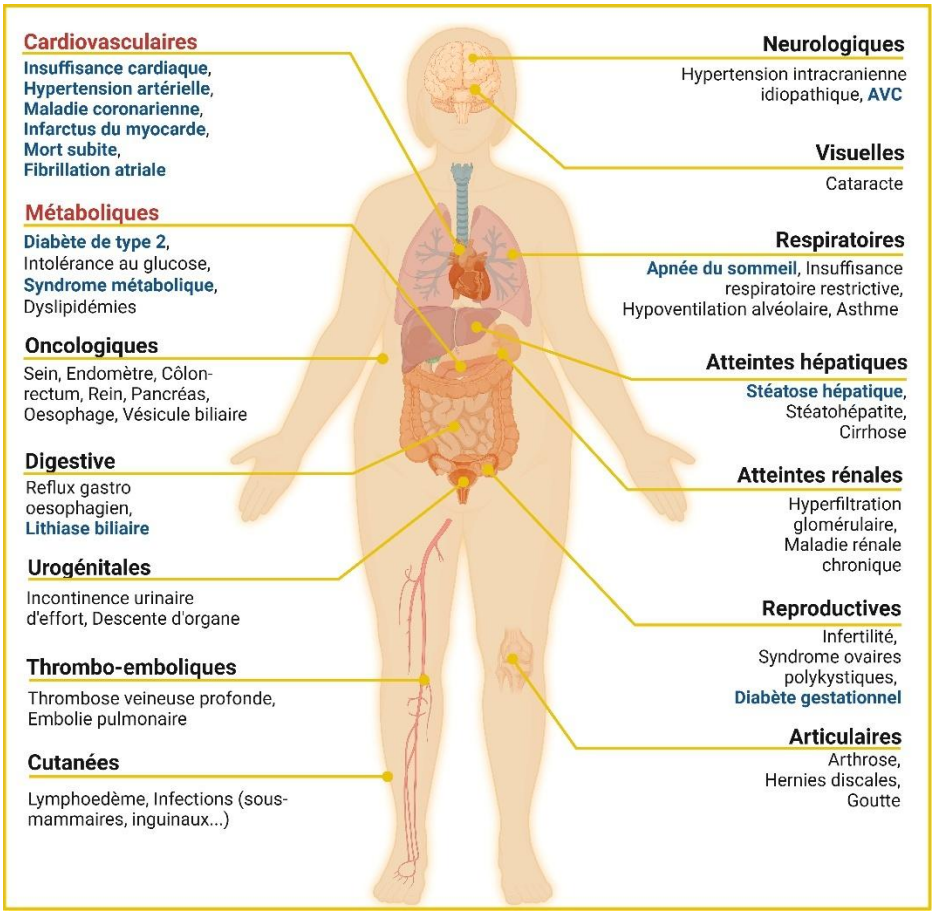


Figure 5 | Principales complications de l'obésité chez l'adulte.

En **bleu** : complications pour lesquelles le TAV abdominal est considéré comme facteur de risque indépendant de l'IMC.

a) Les complications métaboliques

En plus de la prise de poids, l'obésité entraîne des troubles métaboliques qui provoquent stress et dysfonctionnements tissulaires (Guilherme *et al.*, 2008). La dysfonction du TA prédispose alors les individus en situation d'obésité aux maladies métaboliques. Ceci peut survenir au travers de divers mécanismes tels que l'inflammation et l'hypoxie du TA, l'augmentation des acides gras libres circulants, le stress oxydatif, la lipotoxicité ainsi que le dépôt ectopique de graisses. Ces mécanismes peuvent alors directement ou indirectement contribuer au développement de maladies cardiométaboliques en modulant des facteurs de risque comme l'hypertension, le diabète, la dyslipidémie et le syndrome métabolique (Bays, 2011).

Le surpoids et l'obésité sont parmi les causes majeures de développement du **DT2**. Selon la fédération internationale du diabète (*Global Burden of Disease Study*), en 2021, 537 millions d'adultes entre 20 et 79 ans vivaient avec un diabète dont 90 % avec un DT2 (GBD 2021 Diabetes Collaborators, 2023). D'ici 2045, ce nombre pourrait atteindre 783 millions d'individus (GBD 2021 Diabetes Collaborators, 2023). Plus de 60 % des cas de DT2 sont directement attribuables à l'excès de poids (F. B. Hu *et al.*, 2001). L'excès de TA, particulièrement lorsqu'il est localisé au niveau viscéral, augmente le risque de DT2 en favorisant notamment la **résistance à l'insuline** qui précèderait le développement du DT2 de 10 à 15 ans (Freeman *et al.*, 2024). En conditions physiologiques, l'insuline exerce des effets anabolisants en inhibant la lipolyse et la gluconéogenèse hépatique, tout en augmentant

l'absorption du glucose dans le foie, le muscle et le TA (Fahed *et al.*, 2022). Cependant, lorsqu'une résistance se développe, les tissus sont moins sensibles à l'augmentation des taux de l'hormone, entrainant une augmentation du glucose sérique et une hyperinsulinémie compensatoire (Swarup *et al.*, 2024). Dans le TA obèse, la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires comme le PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) ou encore l'interleukine (IL)-6 et le TNF-α (*tumor necrosis factor α*) joue un rôle important dans la résistance à l'insuline et le DT2. En effet, ces cytokines induisent une réduction de la phosphorylation du récepteur à l'insuline lorsqu'il est en contact avec l'hormone entrainant une résistance post-récepteur (Bastin & Andreelli, 2021; Patti & Kahn, 2004). La mesure de cytokines inflammatoires dans le TA de patients atteints de DT2 et d'obésité a par exemple révélé des taux élevés d'IL-6 (Testa *et al.*, 2006). Chez le rongeur, une exposition chronique à cette cytokine conduit à une résistance à l'insuline accompagnée d'une hyperglycémie (Y. D. Kim *et al.*, 2012). Il en est de même pour le TNF-α qui lors d'une administration exogène à des souris minces, les conduit également à une insulinorésistance (Donath, 2014).

La résistance à l'insuline se traduit également par d'autres conséquences telles qu'une hyperglycémie, une hypertension, une dyslipidémie, une hyperuricémie, une élévation des marqueurs inflammatoires, un dysfonctionnement endothélial et un état pro-thrombotique (Freeman *et al.*, 2024). En 1988, l'endocrinologue Gerald Reaven a avancé l'idée que la résistance à l'insuline n'était pas seulement un défaut fondamental augmentant le risque de DT2, mais qu'elle était aussi une cause prévalente de MCV (Reaven, 1988). Il est alors le premier à proposer que la résistance à l'insuline soit un élément central d'un ensemble d'anomalies appelé aujourd'hui « syndrome métabolique » (Lemieux & Després, 2020).

En effet, la manifestation clinique des troubles métaboliques liés à l'obésité se présentent parfois sous la forme des paramètres du **syndrome métabolique** (Andersen *et al.*, 2016). Bien qu'encore discutée, la définition de ce syndrome se caractérise par la présence concomitante de facteurs de risque cardiovasculaires associés à l'obésité incluant : l'adiposité abdominale, la résistance à l'insuline, l'hypertriglycéridémie, la diminution du taux de HDL (*high density lipoprotein*) et/ou l'hypertension (Andersen *et al.*, 2016; Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001). Le diagnostic de ce syndrome s'effectue au travers de paramètres cliniques listés dans le **Tableau 1** et est défini par la présence d'au moins 3 des 5 critères suivants (Cleeman, s. d.). :

Facteurs de risque	Seuils
Glycémie à jeun	≥ 1,10 g/L (6,1 mmol/L) ou traitement anti-diabétique
Triglycérides	≥1,5 g/L (1,7 mmol/L)
HDL-cholestérol	< 0,40 g/L (1 mmol/L) ♂ < 0,50 g/L (1,3 mmol/L) ♀ ou traitement hypolipémiant
Pression artérielle	≥ 130 et/ou 85 mmHg ou traitement anti-hypertenseur
Tour de taille	≥ 102 cm ♂ ≥ 88 cm ♀

Tableau 1 | Critères diagnostiques du syndrome métabolique selon NCEP ATP III

Outre ces paramètres, l'obésité et le syndrome métabolique sont associés au dysfonctionnement endothélial, à la dyslipidémie athérogène et à une inflammation chronique de bas grade (Rh *et al.*, 2005; Galassi *et al.*, 2006; P. L. Huang, 2009). Ils représentent alors un risque important de développement de MCV et de DT2 (Kazemi *et al.*, 2013; Pucci *et al.*, 2017). On estime que les patients atteints du syndrome métabolique présentent un risque deux fois plus élevé de MCV athérosclérotiques, et un risque cinq fois plus élevé de DT2, par rapport à la population générale (Samson & Garber, 2014). Ce syndrome est également étroitement lié à l'accumulation de graisse viscérale/abdominale qui joue notamment un rôle dans le développement de multiples facteurs de risque tels que la résistance à l'insuline, l'hypertension et la dyslipidémie (Matsuzawa *et al.*, 2011). Pour une même quantité de graisse corporelle totale, les individus présentant un excès de graisse intra-abdominale, ou viscérale, sont nettement plus susceptibles de développer une insulinorésistance et les caractéristiques du syndrome métabolique (J.-P. Després, 2006) , par rapport à ceux ayant une accumulation de graisse sous-cutanée (Neeland *et al.*, 2019).

Parmi les complications métaboliques les plus fréquentes retrouvées chez les individus en situation d'obésité, on retrouve également la **dyslipidémie**. Dans le TA, la résistance à l'insuline altère la lipolyse médiée par l'insuline induisant une augmentation des acides gras libres circulants libérés par les adipocytes nécrotiques (Boden & Shulman, 2002). En conséquence, ces acides gras libres augmentent la synthèse de triglycérides et de VLDL (*Very low density lipoprotein*) dans les adipocytes survivants, entraînant une réduction des HDL, et la formation de petites particules de LDL denses appauvries en cholestérol (Eisenberg *et al.*, 1984; Murakami *et al.*, 1995). Ces modifications des concentrations de lipoprotéines constituent la caractéristique principale de la dyslipidémie athérogène causée par la résistance à l'insuline (Fahed *et al.*, 2022).

b) Les complications cardiovasculaires de l'obésité

L'obésité et les pathologies métaboliques qui lui sont liées constituent des facteurs de risque de MCV (Poirier *et al.*, 2006; Tune *et al.*, 2017). En effet, de nombreuses études ont mis en évidence une mortalité et une morbidité accrues liées à ces maladies chez les individus en situation d'obésité. Ces taux élevés sont en particulier liés à l'accumulation de graisse viscérale reconnue comme un facteur de risque indépendant pour les MCV (Din-Dzietham *et al.*, 2007). Les sujets en situation d'obésité sont plus susceptibles de développer des manifestations de MCV tels que des maladies coronaires, des infarctus du myocarde, de l'insuffisance cardiaque, de la fibrillation atriale (FA) ou encore une mort subite. Dans leur récente revue de la littérature sur le sujet, Piché *et al.*, ont résumé les conséquences cardiovasculaires et métaboliques de l'obésité (**Figure 6**) (Piché *et al.*, 2020).

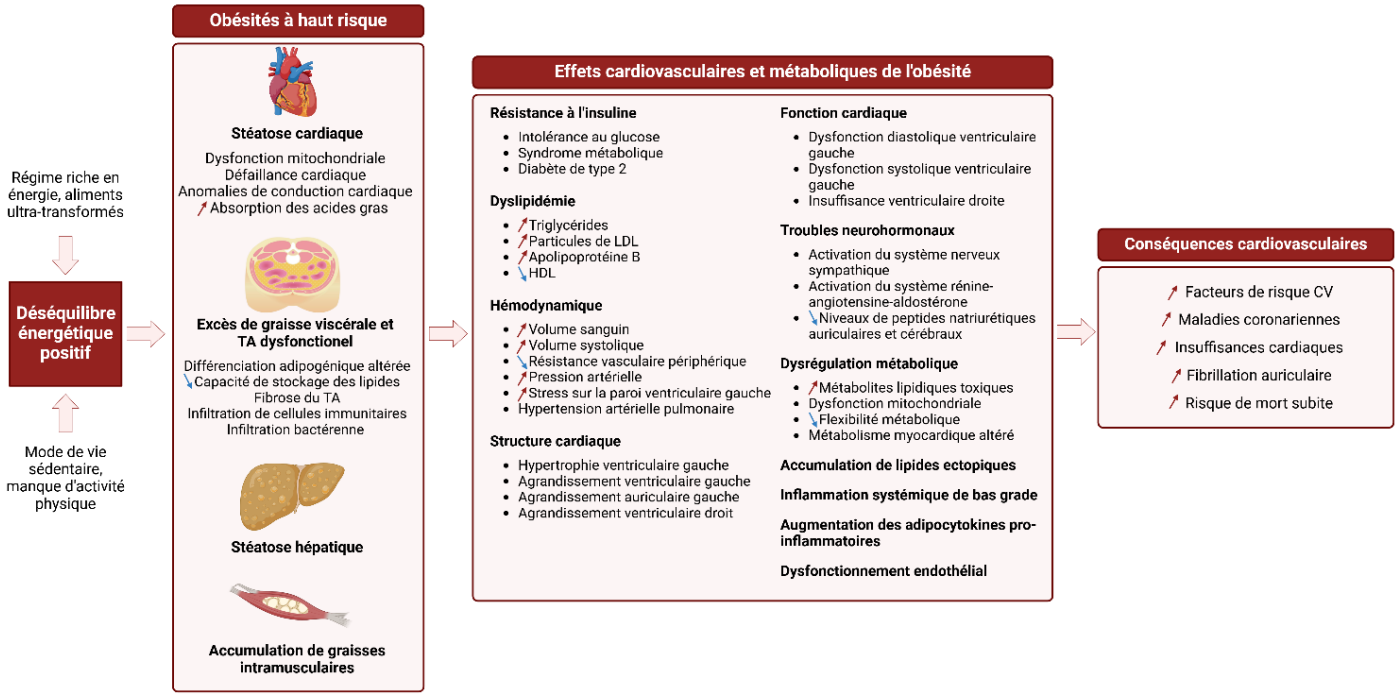


Figure 6 | Conséquences cardiovasculaires et métaboliques des obésités à haut risque (adapté de Piché *et al., Circulation Research,* 2020 *(Piché et al., 2020)*).

Parmi les principales complications, l'**hypertension artérielle** occupe une place centrale et constitue un facteur de risque majeur pour plusieurs MCV (Litwin & Kułaga, 2021). En effet, la prévalence de l'hypertension est de 15,3 % chez les sujets minces contre 42,5 % chez les individus en situation d'obésité qui auraient également 3,5 fois plus de chance de développer la pathologie (Landsberg *et al.*, 2013; Seravalle & Grassi, 2017). Déjà dans les années 80, Higgins *et al.* montraient que chaque prise de poids de 4,5 kg était indépendamment associée à une augmentation de la pression artérielle systolique (Higgins *et al.*, 1988). Des travaux ont mis en évidence que près de 60 % des cas d'hypertension artérielle seraient attribués à l'accumulation de TA (Landsberg *et al.*, 2013; Shu *et al.*, 2023). Dans l'obésité, l'hypertension se manifeste par divers mécanismes tels qu'une dérégulation de la fonction rénale, l'augmentation de l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone, et une augmentation du tonus sympathique (DeMarco *et al.*, 2014; Kurukulasuriya *et al.*, 2011). L'obésité viscérale entraîne l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone et l'augmentation du tonus sympathique, ce qui conduit à une réabsorption accrue du sodium rénal (Hall *et al.*, 2015). Des études ont notamment montré que la résistance à l'insuline, en particulier en présence de TAV, serait capable de stimuler et d'augmenter la réabsorption du sodium et des urates au niveau rénal (Borghi & Cicero, 2017). En 2006, une étude prospective de plus de 21 ans, avait mis en évidence que l'acide urique sérique était un marqueur prédictif de développement de l'hypertension artérielle (Perlstein *et al.*, 2006).

L'obésité est un facteur de risque indépendant de **maladies coronariennes** (CAD *: coronary artery disease*). Dans une méta-analyse de plus de 300 000 individus, des chercheurs ont observé une association entre l'IMC et une augmentation du risque de maladies coronariennes de 16 % (Bogers *et al.*, 2007). L'étude a par ailleurs montré que chaque augmentation de 5 kg/m^2 de l'IMC était associée à une augmentation de 29 % du risque de maladie coronaire (Bogers *et al.*, 2007). Une autre méta-analyse a montré que le risque relatif

de développer une cardiopathie ischémique chez un individu en surpoids était de 1,29 (IC à 95 % : 1,18 – 1,41) pour les hommes et 1,80 (IC à 95 % : 1,64 – 1,98) pour les femmes (Guh *et al.*, 2009). En cas d'obésité, ce risque augmentait à 1,81 (IC à 95 % : 1,45 – 2,25) pour les hommes et était de 1,78 (IC à 95 % : 1,07 – 2,95) pour les femmes (Guh *et al.*, 2009). Les grandes études de cohorte telles que la *Framingham Heart Study*, ont montré que plus que l'IMC, la répartition du TA et notamment le TAV serait un prédicteur du développement de facteurs de risque (HTA, dyslipidémie athérogène, syndrome métabolique) de MCV (Abraham *et al.*, 2015). Indépendamment de l'IMC, l'excès de TAV a été mis en évidence comme prédicteur de maladie coronarienne dans une cohorte d'hommes japonais suivis sur 10 ans (Fujimoto *et al.*, 1999). L'excès de graisse viscérale a également été identifié comme prédicteur indépendant d'infarctus du myocarde dans une population de femmes âgées de 70 à 79 ans (Nicklas *et al.*, 2004). Une étude longitudinale avec un suivi des participants sur 10 ans a également mis en évidence que les individus atteints de maladie coronaire avaient des taux plus élevés de graisse viscérale que les patients contrôles (Fujimoto *et al.*, 1999). La **dysfonction endothéliale**, résultant de l'obésité, apparait également comme un précurseur important de l'athérosclérose. Les altérations fonctionnelles de l'endothélium vasculaire sont induites par l'inflammation systémique et la résistance à l'insuline et contribuent ainsi au développement des plaques d'athérome. En plus de favoriser l'athérosclérose dans les grandes artères, l'excès de TA est étroitement associé à des anomalies de la microvasculature coronaire (Tona *et al.*, 2014). La maladie microvasculaire coronaire résulte d'une inflammation de l'endothélium et d'un remodelage des petits vaisseaux. Cette pathologie est indépendamment corrélée à l'IMC et constitue un indicateur pronostique précieux du risque cardiovasculaire chez les individus obèses (Bajaj *et al.*, 2018).

De nombreuses études ont également confirmé que l'obésité est un facteur de risque majeur dans le développement de l'**insuffisance cardiaque (IC)** (Balsaver *et al.*, 1967; Hatem & Sanders, 2014). Les patients en situation d'obésité ont 2 fois plus de risque de développer une IC comparé aux patients de poids normal. En effet, l'excès de poids impose une surcharge hémodynamique au cœur, entraînant une hypertrophie ventriculaire gauche (Alpert *et al.*, 2016; Maurice F *et al.*, 2019). À long terme, cette hypertrophie peut évoluer vers une IC, où le cœur ne parvient plus à assurer un débit sanguin suffisant pour répondre aux besoins métaboliques de l'organisme. Ainsi l'obésité augmente le risque d'IC de 79 % (Gaborit, 2021; Guh *et al.*, 2009) et chaque augmentation d'un point d'IMC augmente le risque de développer une insuffisance cardiaque de 5 % chez les hommes et 7 % chez les femmes (Kenchaiah *et al.*, 2002). Environ la moitié des personnes en situation d'obésité souffriraient d'IC à fraction d'éjection préservée (HFpEF : *heart failure with preserved ejection fraction*) (Piché *et al.*, 2020). Une étude sur plus de 51 000 patients a mis en évidence une association marquée entre un IMC élevé et le risque de HFpEF (Pandey *et al.*, 2017). Les individus qui présentaient un surpoids ou une obésité de classe 1 avaient respectivement un risque accru de HFpEF de 38 % et 56 %, indépendamment des autres facteurs de risque cardiovasculaire (Pandey *et al.*, 2017). D'autres paramètres anthropométriques de l'excès de TA comme le tour de taille ainsi que les rapports taille-hanches et taille-hauteur, ont également été indépendamment associés au risque d'IC (G. Hu *et al.*, 2010; Loehr *et al.*, 2009; Powell-Wiley *et al.*, 2021). Une étude rétrospective a montré que la réduction de l'excès de poids par chirurgie bariatrique diminuait significativement les risques de développer une IC (9,9 % ; odds ratio ajusté : 0,57 ; $p = 0,003$) (Shimada *et al.*, 2016). De plus les hospitalisations pour cette pathologie étaient réduites de 40

% chez les patients qui avaient des antécédents d'IC HFpEF et également d'IC à fraction d'éjection réduite (Shimada *et al.*, 2016).

L'excès de poids et l'obésité favorisent également le risque d'arythmies notamment de **fibrillation atriale (FA)**. Des études de cohortes ont montré que le risque de développer une FA augmentait avec la sévérité de l'obésité (Wong *et al.*, 2015; Lavie *et al.*, 2017). Plus que l'excès de graisse global, les dépôts de graisse ectopiques situés notamment au niveau du cœur tels que le tissu adipeux épicardique (TAE) ont été associés à la prévalence et la sévérité de la FA (Thanassoulis *et al.*, 2010). La quantité de TAE est également considérée comme un prédicteur de la persistance de la FA (Hatem *et al.*, 2016) (*cf. Implications du TAE dans les maladies cardiovasculaires*).

En somme, l'obésité engendre une série de complications cardiovasculaires et métaboliques sévères par des mécanismes intriqués et synergiques. Une prise en charge globale de l'obésité, incluant des interventions diététiques, l'exercice physique, des traitements pharmacologiques ou encore de la chirurgie bariatrique, est essentielle pour réduire ces risques et améliorer la santé cardiométabolique des patients.

4. L'obésité métaboliquement saine

Parmi les défis associés à l'obésité, il existe un groupe de patients chez lesquels on ne retrouve pas les séquelles attendues de leur poids (Mathew *et al.*, 2016). Bien que l'obésité soit fréquemment évoquée dans le cadre du syndrome métabolique, près d'un tiers des individus en situation d'obésité (selon leur IMC) ne manifeste ni dyslipidémie, ni hypertension ou hyperglycémie (Samson & Garber, 2014). On parle alors d'obésité métaboliquement saine ou MHO pour *Metabolically Healthy Obesity* (Karelis *et al.*, 2004). L'origine de ce concept apparaît dans les années 1950 d'après les travaux de Jean Vague, qui avait observé que les personnes en situation d'obésité ne présentaient pas toutes les mêmes prédispositions au diabète et à l'athérosclérose (Vague, 1956). Selon lui, ces différences étaient potentiellement liées à la distribution des graisses corporelles (Vague, 1956). Plus tard en 2001, d'autres chercheurs identifient « un sous-groupe de femmes ménopausées obèses mais métaboliquement normales […] qui pourraient être protégées contre le développement de comorbidités liées à l'obésité » (Brochu *et al.*, 2001). Ce concept défie alors la perception traditionnelle selon laquelle toute personne souffrant d'obésité est automatiquement à risque de développer des complications métaboliques. C'est pourquoi cette notion suscite aujourd'hui encore des débats parmi les chercheurs et les professionnels de santé (Muñoz-Garach *et al.*, 2016). Contrairement aux individus MHO, ceux qui présentent un profil métabolique malsain sont principalement désignés dans la littérature comme souffrant d'une obésité métaboliquement « anormale » ou « non saine » (MUO pour *Metabolically Unhealthy Obesity*). Le concept de MHO a ainsi été identifié au travers de nombreuses observations cliniques, d'études épidémiologiques, de cohortes prospectives ou encore de recherches interventionnelles (M. Blüher, 2020). Il est aujourd'hui largement admis que certaines personnes obèses ne présentent pas de complications métaboliques ou cardiovasculaires à un temps donné. Néanmoins, il reste à déterminer si ce concept représente un phénotype stable au cours du temps, ainsi que son importance clinique dans l'évaluation du risque de DT2 et de MCV. En effet, certaines études ont montré que le phénotype MHO n'était pas stable dans le temps (M. Blüher, 2020; Rey-López *et al.*, 2014;

van Vliet-Ostaptchouk *et al.*, 2014) , et que dans environ 50 % des cas, les individus cessent d'être MHO au bout de 10 ans (Magkos, 2019). En effet, en 2017 une méta-analyse, incluant un total de 5914 sujets MHO, a révélé qu'environ la moitié (49 % ; IC à 95 % : 38 % à 60 %) développaient une ou plusieurs anomalies métaboliques sur une période allant de 3 à 10 ans, cessant ainsi d'être métaboliquement sains (H. Lin et al., 2017). Un an plus tard, un rapport de l'étude *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*, montre que la transition d'un phénotype MHO à un phénotype MUO est associée à une augmentation significative du risque de MCV estimée à environ 60 % au cours d'un suivi médian de 12,2 ans (Mongraw-Chaffin *et al.*, 2018).

Les patients MHO répondent aux critères standards de l'IMC pour l'obésité mais ne montrent pas de signes de risque métabolique élevé et ont un faible risque de complications liées à leur poids (S. Blüher & Schwarz, 2014; Doubki *et al.*, 2023) (**Figure 7**). Cela signifie qu'ils ne présentent aucune anomalie métabolique telle que la résistance à l'insuline, l'hypertension et la dyslipidémie (Phillips, 2013). Malgré une masse grasse totale similaire, la MHO se caractérise également par un degré plus faible d'inflammation systémique et un profil immunitaire et hépatique favorable (Samocha-Bonet *et al.*, 2014; Stefan *et al.*, 2013) (**Figure 7**).

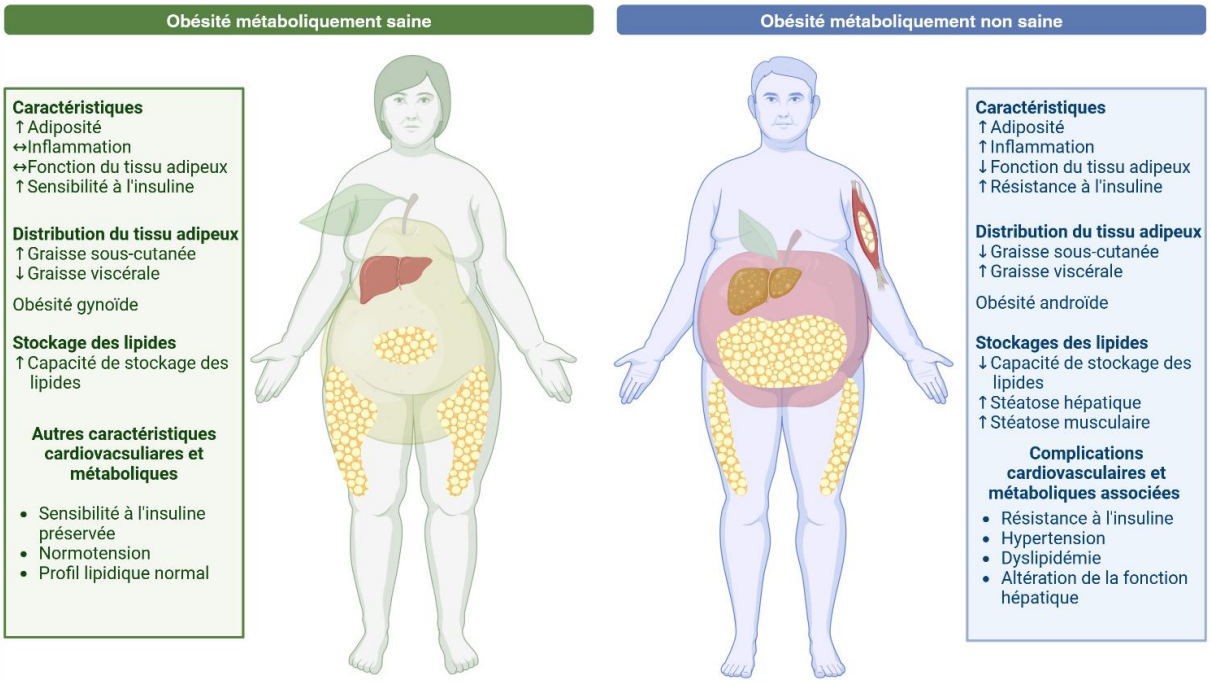


Figure 7 | Obésité métaboliquement saine (MHO) *versus* obésité métaboliquement non saine (MUO).

Bien qu'il n'existe encore aucun consensus sur les paramètres définissant la MHO, la plupart des auteurs s'accordent à dire qu'elle se distingue de la MUO par trois traits cliniques (Samocha-Bonet *et al.*, 2014; van Beek *et al.*, 2014; Velho *et al.*, 2010) (**Figure 7**) :

- une accumulation réduite de **TAV** et de **graisse ectopique** pour une masse grasse totale/un IMC similaire,
- une **sensibilité à l'insuline** préservée,
- une diminution de l'**inflammation systémique du TA**.

De nombreuses études ont montré qu'une accumulation majoritaire de graisse dans le TAV, mesurée par tomodensitométrie, est associée à un phénotype MUO, caractérisé par une

hyperinsulinémie, une intolérance au glucose et une dyslipidémie athérogène (J.-P. Després *et al.*, 2008; Tchernof & Després, 2013). A l'inverse, les individus MHO se distinguent par une plus grande quantité de TAsc au niveau des hanches et des cuisses (graisse glutéofémorale) et une réduction de l'accumulation de TA au niveau viscéral, dans le foie et les muscles squelettiques (Manolopoulos *et al.*, 2010; Primeau *et al.*, 2011; Stefan *et al.*, 2013). L'accumulation de cette graisse sous-cutanée étant associée à un risque réduit de MCV (Neeland *et al.*, 2015). Conformément à cette idée, des études ont démontré que lors d'un excès calorique, l'augmentation du TAsc réduit le risque de débordement lipidique et d'accumulation de graisse viscérale abdominale et dans des sites ectopiques (Carobbio *et al.*, 2017; Virtue & Vidal-Puig, 2010). Certaines études d'association pangénomiques ont également identifié des loci contenant des gènes susceptibles de contrôler à la fois la distribution des graisses corporelles et le profil métabolique MHO ou MUO (Kilpeläinen *et al.*, 2011; Yaghootkar *et al.*, 2016; Scott *et al.*, 2014). Aujourd'hui, de nombreux variants génétiques (plus de 14) ont été associés à un plus faible risque de développer des anomalies métaboliques comme la dyslipidémie, l'hypertension et le DT2, malgré un IMC élevé (Iacobini *et al.*, 2019).

Ainsi, comme l'évoquait Jean Vague, la protection des sujets MHO contre les maladies cardiométaboliques pourrait être partiellement attribuée aux fonctions de régulation distinctes des dépôts sous-cutanés et viscéraux. En conséquence, les différences retrouvées entre les individus MHO et MUO au niveau des dépôts de graisse semble résider dans la qualité du TAsc. En effet, il existerait un TAsc sain chez les MHO, et un TAsc dysfonctionnel chez les patients MUO (Iacobini *et al.*, 2019). Cette distinction est cruciale car les dépôts de graisse ectopiques jouent un rôle central dans le développement des complications métaboliques. Un TAsc fonctionnel, qui aide à limiter l'accumulation de graisse dans les sites ectopiques, pourrait expliquer pourquoi les MHO sont moins susceptibles de développer des pathologies associées à une adiposité excessive. Dans le prochain paragraphe, nous examinerons plus en détail l'impact de ces dépôts de graisse ectopiques sur la santé métabolique et la manière dont ils contribuent aux différences observées entre les MHO et les MUO.

5. Les dépôts de graisse ectopique

Ainsi, comme nous avons pu le constater depuis le début de cette introduction, la répartition du TA se révèle être un déterminant majeur dans les complications liées à l'obésité. En effet, tous les dépôts de graisse ne sont pas égaux et tous n'ont pas le même impact sur la santé métabolique. La localisation anatomique mais également le type de graisse (qu'elle soit blanche, brune ou beige) peuvent faire la différence (Iacobini *et al.*, 2019). Depuis les premières descriptions de l'obésité "androïde" (viscérale/centrale) et "gynoïde" (sous-cutanée/périphérique) par Jean Vague, un nombre croissant d'études se sont concentrées sur la quantification de la graisse intra-abdominale. Après lui, dans les années 80, une équipe mettait en évidence que la distribution abdominale de la graisse était étroitement liée aux maladies métaboliques et notamment corrélée au DT2 chez l'homme (Krotkiewski *et al.*, 1983; Ohlson *et al.*, 1985). Au-delà d'une simple accumulation de graisse abdominale, c'est le TAV qui constitue un risque majeur pour la santé. Les avancées dans les techniques d'imagerie ont permis de mesurer avec précision la composition corporelle et les divers dépôts de graisse intra-abdominale (Matsuzawa, 2008) (**Figure 8**).

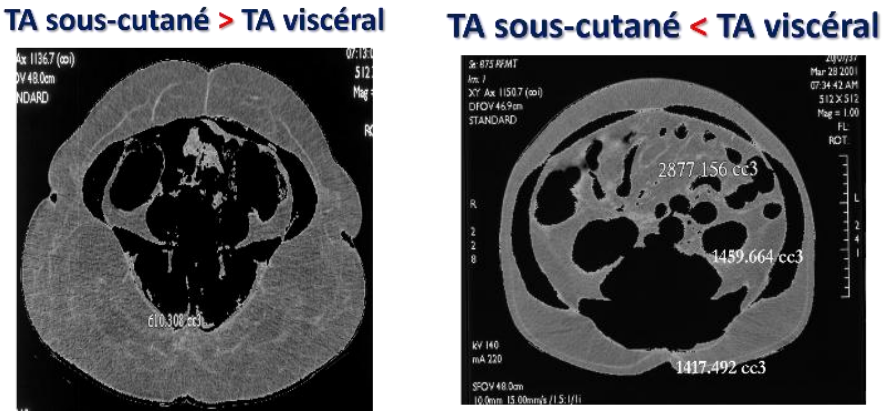


Figure 8 | Exemple de distribution du tissu adipeux sous-cutané (gauche) versus viscéral (droite) chez un patient ayant un IMC de 40 kg/m^2 (gauche) et de 35 kg/m^2 (droite).

Després *et al.* ont notamment montré que parmi un groupe d'individus en situation d'obésité, ceux pour lesquels la graisse viscérale intra-abdominale est majoritaire ont un risque plus élevé de développer un DT2 et une MCV (J. P. Després *et al.*, 1990). Depuis, il a été largement démontré que l'augmentation du TAV est associée à un risque accru de syndrome métabolique, de résistance à l'insuline, de stéatose hépatique ou encore d'intolérance au glucose, indépendamment de l'IMC et du volume de TAsc (Bergman *et al.*, 2006; J. P. Després *et al.*, 1989; Fujioka *et al.*, 1987). Tandis que l'expansion de ce dernier est associée à un profil métabolique plus favorable. Des études ont tout de même montré que le TAsc abdominal (scAbdo) joue un rôle dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline (de Mutsert & Després, 2023; Goodpaster *et al.*, 1997; de Mutsert *et al.*, 2018). Le TAsc glutéo-fémoral est quant à lui plutôt protecteur contre le risque de diabète et de MCV (Amati *et al.*, 2012; de Mutsert & Després, 2023; Snijder *et al.*, 2003).

Physiologiquement, la capacité de stockage du TAV est moins importante que celle du sous-cutané, puisqu'il représente environ 5 à 10 % de la masse grasse totale chez les femmes et 10 à 20 % chez les hommes (Lafontan *et al.*, 2008). Mais bien que l'accumulation de TAV favorise la survenue de certaines pathologies cardiovasculaires et métaboliques, elle n'explique pas à elle seule tout le risque cardiométabolique. Ainsi, au-delà de la distribution régionale du TA, des recherches ont mis en lumière le concept plus général de **TA ectopique** (J.-P. Després *et al.*, 2008). Dans leur première étude sur le sujet, Després *et al.* énonçaient que « l'obésité viscérale pourrait représenter un phénotype intermédiaire clinique, reflétant l'incapacité relative du TA sous-cutané à agir comme un réservoir métabolique protecteur […], conduisant ainsi à un dépôt de graisse ectopique dans les dépôts adipeux viscéraux, les muscles squelettiques, le foie, le cœur, etc. » (J.-P. Després *et al.*, 2008). Les dépôts de graisse ectopiques se réfèrent ainsi à l'accumulation de TAs dans des emplacements inhabituels ou "ectopiques" qui ne sont pas classiquement associés au stockage des lipides. Ces accumulations peuvent se produire dans divers organes et tissus, notamment le foie, le cœur, les muscles, ou même le pancréas (**Figure 9**).

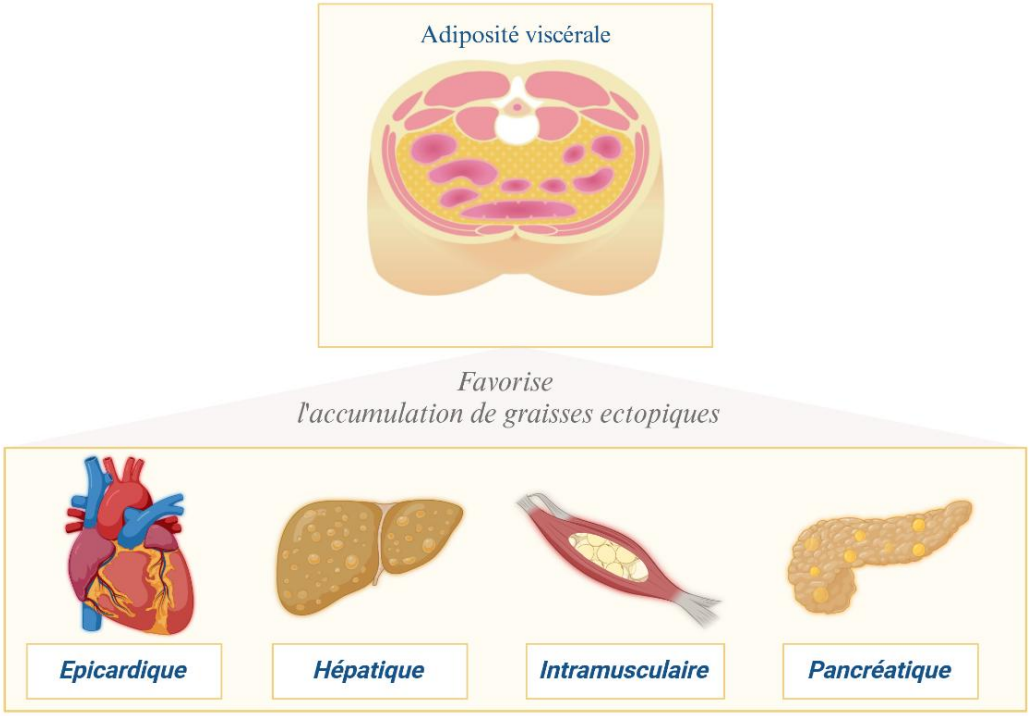


Figure 9 | Accumulation des tissus adipeux ectopiques avec l'augmentation de la graisse viscérale.

On parle alors souvent de stéatose (accumulation de triglycérides dans des cellules non adipeuses) telles que les stéatoses cardiaque, hépatique, musculaire ou pancréatique (Visiedo *et al.*, 2013). Les dépôts de graisses ectopiques exhibent des caractéristiques semblables au TA dysfonctionnel. En effet, ils présentent le plus souvent une hypertrophie des adipocytes, une biogenèse adipeuse altérée, une moins bonne absorption des acides gras libres, ou encore une infiltration immunitaire et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (de Mutsert & Després, 2023).

La répartition ainsi que la quantité des graisses peuvent être influencées et contrôlées par divers facteurs. Les principaux prédicteurs sont l'âge, le sexe et l'IMC (Iacobini *et al.*, 2019; Schleinitz *et al.*, 2014). Il existe également des preuves d'une régulation génétique de la distribution du TA pour un IMC donné (Iacobini *et al.*, 2019). En effet une méta-analyse regroupant 32 études de GWAS sur le rapport taille-hanches ajusté à l'IMC a permis d'identifier 13 loci situés dans ou près des gènes RSPO3, VEGFA, TBX15-WARS2, NFE2L3, GRB14, DNM3-PIGC, ITPR2-SSPN, LY86, HOXC13, ADAMTS9, ZNRF3-KREMEN1, NISCH-STAB1 et CPEB4 (Heid *et al.*, 2010). Ces loci étaient associés à une modulation de la répartition des graisses indépendamment de l'adiposité globale en faveur d'une adiposité ectopique viscérale (Heid *et al.*, 2010).

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'accumulation de graisse dans le cœur (*cf. Tissu adipeux épicardique*).

II. Les tissus adipeux

1. Généralités

Le TA est un tissu conjonctif provenant de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes au cours du développement. Les adipocytes dérivent à la fois de ces progéniteurs mésenchymateux résidants dans la fraction vasculaire stromale (FVS) du TA et de progéniteurs hématopoïétiques provenant de la moelle osseuse (Richard *et al.*, 2020). Historiquement, le TA était principalement reconnu comme stockeur d'énergie sous forme de triglycérides. C'est en 1987 que les fonctions sécrétoires des adipocytes sont révélées (Ks *et al.*, 1987). Il est depuis bien reconnu que les adipocytes et les autres cellules composant le TA sécrètent une variété de médiateurs tels que des vésicules extracellulaires, des miARN, des lipides, des cytokines pro et anti-inflammatoires et des hormones qui agissent à la fois de manière paracrine et endocrine (M & M, 2015; Richard *et al.*, 2020). L'activité sécrétoire du TA contribue ainsi à de nombreux processus physiologiques et pathologiques.

Ces dernières années, de nombreuses avancées scientifiques ont permis une meilleure compréhension du TA. Dans la revue suivante, nous avons voulu souligner ces récentes découvertes.

REVUE

Le tissu adipeux dans tous ses états : dernières avancées

Doukbi Elisa, Lasbleiz Adèle, Dutour Anne & Gaborit Bénédicte

Publiée dans *Nutrition Clinique et Métabolisme,* 2023

Nutrition clinique et métabolisme 37 (2023) 2S2-2S7

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

Physiopathologie

Le tissu adipeux dans tous ses états : dernières avancées

The different colours and functions of adipose tissue: what's new?

Elisa Doubki [a], Adèle Lasbleiz [b], Anne Dutour [a,b], Bénédicte Gaborit [a,b,*]

[a] *INSERM, INRAE, C2VN, Aix-Marseille University, F-13005 Marseille, France*
[b] *Department of Endocrinology, Metabolic Diseases and Nutrition, Pôle ENDO, APHM, F-13005 Marseille, France*

Mots clés :
Beiging
Cellules souches
Maladies métaboliques
Obésité
Sénescence
Thermogenèse
Tissu adipeux

RÉSUMÉ

L'obésité représente aujourd'hui un problème de santé mondial en constante augmentation. Comprendre les mécanismes qui sous-tendent la formation, la croissance et le fonctionnement du tissu adipeux semble crucial pour lutter contre cette maladie et ses complications, telles que le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. En France, l'obésité est en hausse, en particulier chez les jeunes adultes et les enfants. Dans cette revue, nous discutons de la composition cellulaire du tissu adipeux blanc, en mettant en lumière les avancées récentes dans la caractérisation des différentes populations cellulaires qui le composent. Nous explicitons également les conséquences métaboliques de la répartition des graisses corporelles, en soulignant l'importance des tissus adipeux brun et beige dans la régulation du métabolisme. Ces tissus thermogéniques offrent des avantages métaboliques notables, ouvrant ainsi la voie à des opportunités pour la recherche et le développement de stratégies thérapeutiques visant à lutter contre les affections métaboliques. De plus, nous abordons la relation entre sénescence cellulaire et dysfonctionnement métabolique lié à l'obésité, ainsi que les nouvelles perspectives de recherche dans le domaine de la communication intercellulaire et de la fonction mitochondriale. En définitive, cette revue propose une vue d'ensemble des avancées récentes dans la compréhension de l'obésité à l'échelle du tissu adipeux.

© 2023 Société francophone nutrition clinique et métabolisme (SFNCM). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Keywords:
Beiging
Stem cells
Metabolic disease
Obesity
Senescence
Thermogenesis
Adipose tissue

ABSTRACT

Obesity represents a growing global health issue today. Understanding the mechanisms underlying the formation, growth, and function of adipose tissue is crucial in combating this disease and its associated complications, such as type 2 diabetes and cardiovascular diseases. In France, obesity is on the rise, particularly among young adults and children. In this review, we discuss the cellular composition of white adipose tissue, highlighting recent advances in the characterisation of various cell populations. We also explore the metabolic implications of body fat distribution, emphasizing the importance of brown and beige adipose tissues in metabolism regulation. These thermogenic tissues offer significant metabolic benefits, opening up promising opportunities in research and development of therapeutic strategies to address obesity-related metabolic disorders. Furthermore, we discuss the relationship between cellular senescence and obesity-related metabolic dysfunction, along with new research in the field of intercellular communication and mitochondrial recycling. Finally, this review provides a comprehensive overview of recent developments in the understanding of obesity at adipose cells level.

© 2023 Société francophone nutrition clinique et métabolisme (SFNCM). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Ces dernières années, le nombre de personnes souffrant d'obésité dans le monde n'a cessé de grimper, suggérant que l'importance et la charge que représente cette maladie chronique ne doivent pas être sous-estimées. Selon le NCD-RisC, l'obésité est l'une des maladies les plus courantes du XXIe siècle [1]. En France, 47 % de la population est en situation de surpoids ou d'obésité [2]. Entre 2012 et 2020, le nombre de personnes en situation d'obésité a augmenté de 17 %, représentant plus de 8,5 millions d'individus [2].

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : benedicte.gaborit@ap-hm.fr (B. Gaborit).

0985-0562/© 2023 Société francophone nutrition clinique et métabolisme (SFNCM). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

De plus, la prévalence des personnes en situation d'obésité continue d'augmenter, elle aurait même gagné 2 points en 8 ans, soit 13 % de hausse. De plus, l'étude Constances a montré que cette prévalence a également augmenté chez les jeunes adultes âgés de 18 à 29 ans entre 2013 et 2016 (augmentation de 50 % chez les femmes et 93 % chez les hommes, soit +2,71 % et +3,26 %, point p = 0,03 et 0,02 respectivement) [3]. Ces chiffres montrent l'importante progression de l'obésité en France. Cette augmentation semble encore plus marquée dans les groupes d'âge les plus jeunes et pour les obésités sévères et complexes. Les données pédiatriques montrent ainsi que 34 % des enfants de 2 à 7 ans et 21 % des enfants de 8 à 17 ans sont en situation de surpoids et/ou d'obésité [2]. Tout comme pour les jeunes adultes, on remarque une tendance plus élevée chez les garçons avec 62 % d'entre eux en situation d'obésité contre 38 % chez les filles.

L'obésité est une maladie chronique due à un déséquilibre à long terme entre les apports et les dépenses énergétiques, conduisant à une accumulation anormale ou excessive de graisse. Cette pathologie se caractérise par des changements dans le micro-environnement adipeux, qui se manifestent principalement par une hypertrophie, un état inflammatoire chronique, une hypoxie et une fibrose, contribuant ainsi aux changements pathologiques d'autres tissus. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), ce problème aurait atteint des proportions épidémiques et plus de 4 millions de personnes meurent chaque année depuis 2017 de cette pathologie. Mais plus que l'obésité et le surpoids, ce sont les maladies qu'ils engendrent qui contribuent à cette importante mortalité. En effet, l'obésité et le diabète de type 2 (DT2) sont fortement associés aux maladies cardiovasculaires, qui restent un facteur important de la mortalité globale, malgré les progrès de la recherche et des soins cliniques [4].

1. Composition cellulaire du tissu adipeux blanc : nouvelles avancées

Du fait de sa dynamique, sa plasticité et de son hétérogénéité, le tissu adipeux (TA) blanc est impliqué dans un large éventail de processus biologiques. Une alimentation riche en graisses et d'autres facteurs de stress métabolique entraînent des changements dans sa morphologie, sa physiologie et sa composition cellulaire. En effet, il est à présent établi que la fraction vasculaire stromale (FVS) du TA présente de nombreux types cellulaires tels que des cellules immunitaires, des nerfs, des fibroblastes, des cellules souches, des progéniteurs adipocytaires ou encore des cellules endothéliales [5-7]. De plus, des approches de séquençage à cellule unique (*single-cell*) ont également été utilisées afin de mieux comprendre l'hétérogénéité cellulaire de ce tissu en se focalisant exclusivement sur la FVS [8-11]. Récemment, un atlas cellulaire détaillé des tissus adipeux blancs viscéraux (TAV) et sous-cutanés (TASC) (humain et murin) est paru dans le journal *Nature* [12]. Cette étude montre que le TA périgonadique de souris sous régime riche en graisses présentait une augmentation du nombre de macrophages et une réduction des autres cellules immunes tels que les lymphocytes T et B, les cellules *natural killers* (NK), les cellules dendritiques et les neutrophiles. De plus, chez l'humain, une population de macrophages nommée hMac3 serait induite dans le TAV avec l'augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) (Fig. 1). De surcroît, une augmentation de la communication intercellulaire macrophages-adipocytes humains a été détectée chez les individus souffrant d'obésité de grade III (> 40 kg/m^2) *vs* individus non obèses. En s'intéressant aux différents sous-types de cellules souches et de progéniteurs, cette étude a également montré que certains types cellulaires étaient plus présents dans un TA que dans l'autre. Ainsi l'on peut retrouver plus de cellules *Human Adipose Stem and Progenitor Cells 1* [hASPC1], hASPC4, et hASPC5 dans le TASC que dans le TAV avec une proportion plus importante de hASPC4 et hASPC5 chez les patients présentant un IMC plus élevé. À l'inverse, les types cellulaires plus représentés dans le TAV sont hASPC3 et hASPC6. L'originalité de cette étude est la découverte de 7 sous-types adipocytaires aux caractéristiques différentes dont 4 seraient associés au SAT (*Human Adipocyte* 1 [hAd1], hAd3, hAd4 et hAd7) et 2 exclusivement au TAV (hAd2 et hAd6). En effet, il a été montré que les adipocytes hAd6 expriment des gènes associés à la thermogenèse (*EBF Transcription Factor* 2 (*EBF2*), *Estrogen Related Receptor Gamma* (*ESRRG*), et *PPARG Coactivator 1 Alpha* (*PPARGC1A*)) et seraient caractérisés par une augmentation de l'expression de mitochondries connues pour être étroitement liées à la production de chaleur. Enfin, les adipocytes hAd7, présents dans le TASC, seraient associés au DT2 avec une corrélation inverse avec la résistance à l'insuline. Ces résultats constituent donc une nouvelle base de données intéressante pour l'exploration de la fonction des gènes et des types cellulaires dans le TA blanc à travers les espèces, les dépôts et les conditions nutritionnelles (Fig. 1).

2. Volumes de TA ajustés à l'IMC : association entre dépôts graisseux et maladies cardiométaboliques

Pour un IMC donné, la répartition des graisses peut varier considérablement d'un individu à l'autre et ainsi engendrer des conséquences importantes sur le risque cardiométabolique. Par conséquent, des études ont voulu identifier de nouveaux marqueurs de la santé métabolique. Ceci étant désormais un élément important puisque parmi les problématiques liées à l'obésité, il existe par exemple un sous-ensemble de patients n'ayant pas les séquelles attendues de leur poids [13]. En effet, ces patients métaboliquement sains, bien que répondant aux critères traditionnels de l'IMC pour l'obésité, ne présentent pas de profil métabolique à haut risque et ont peu de chance de développer des complications liées à leur obésité [14]. En 2020, le consensus du groupe de travail sur l'obésité viscérale regroupant l'IAS (*International Atherosclerosis Society*) et l'ICCR (*International Chair on Cardiometabolic Risk*) s'est accordé à dire que le tour de taille devait être inclus systématiquement dans l'évaluation et la prise en charge des patients en plus de l'IMC [15]. La variation de la répartition des graisses serait une explication possible des différences de risque cardiométabolique entre deux individus ayant le même IMC. Ainsi, l'étude Agrawal et al., publiée en janvier 2023, a utilisé des modèles d'apprentissage profond basés sur des projections bidimensionnelles d'imagerie par résonance magnétique (IRM) corporelle corps entier ajustés à l'IMC, pour estimer de façon précise les volumes de différents dépôts adipeux (TAV, TASC abdominal et TA glutéo-fémoral [GFAT]) et étudier leur association avec le DT2 et la maladie coronaire chez plus de 40 000 individus de la UK Biobank [16]. Cette étude a permis de confirmer que les hommes sont pourvus d'un plus grand volume de graisse viscérale que les femmes (médianes 4,8 *vs* 2,6 L respectivement). Leurs résultats ont particulièrement mis en évidence l'association entre DT2, maladie coronaire et TAV ajusté à l'IMC – *Odds Ratio* (OR) 1,49 (IC 95 % : 1,43-1,55 ; $p = 9{,}9 \times 10^{-76}$) et 1,17 (IC 95 % : 1,11-1,22 ; $p = 3 \times 10^{-11}$ pour chaque incrément de déviation standard [SD] respectivement). Ce papier a également montré que le TASC ajusté à l'IMC serait quant à lui largement neutre et que le GFAT ajusté à l'IMC serait quant à lui associé à un risque réduit de DT2 (OR/SD = 0,75 ; IC 95 % : 0,71-0,79 ; $p = 6{,}4 \times 10^{-28}$) et de coronaropathie (OR/SD = 0,89 ; IC 95 % : 0,84-0,94 ; $p = 3{,}5 \times 10^{-5}$). Ainsi, ces travaux illustrent l'impact cardiométabolique de trois dépôts de graisse métaboliquement distincts. Ces paramètres ajustés en fonction de l'IMC peuvent

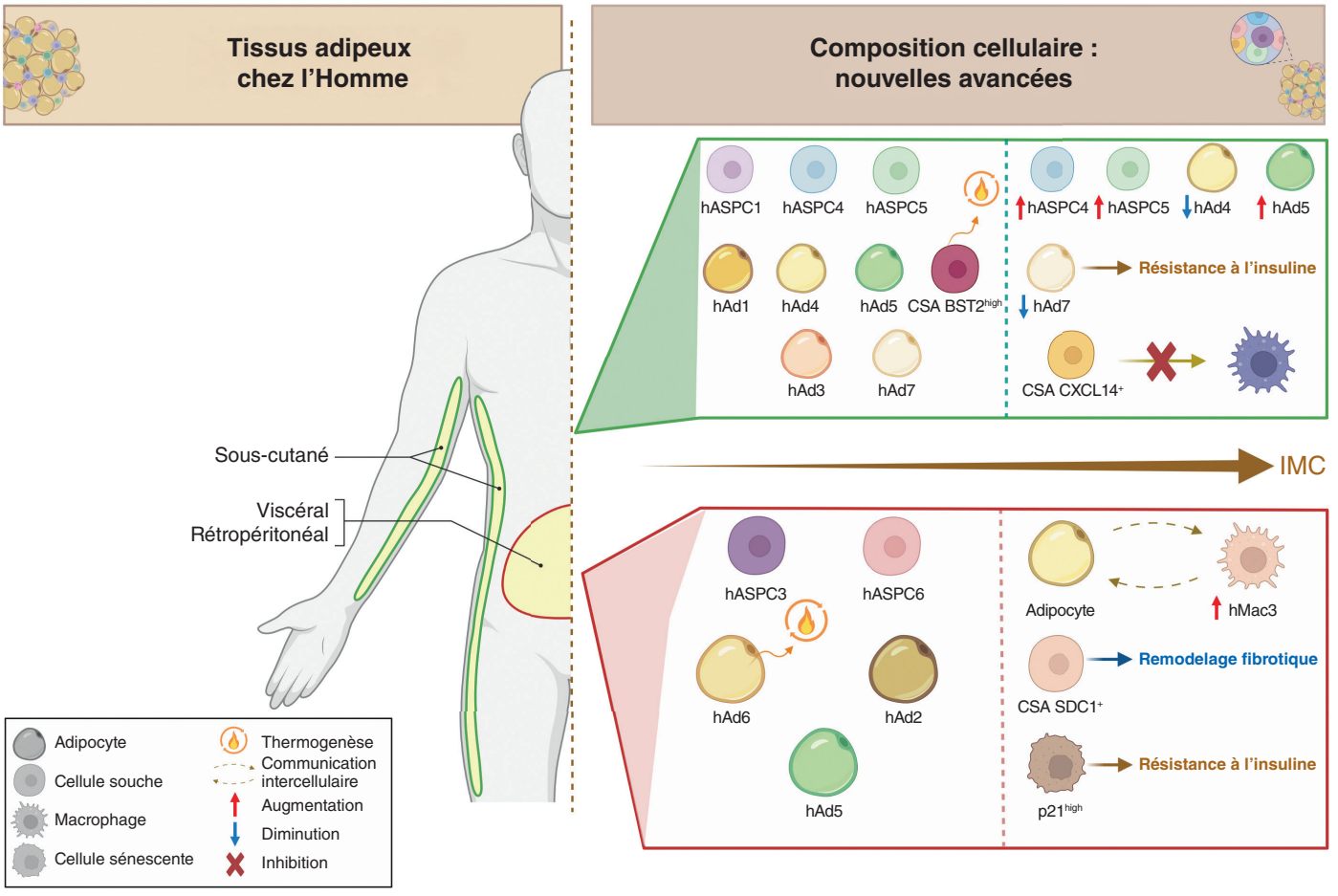


Fig. 1. Composition cellulaire des TAV et TASC. De nouveaux acteurs cellulaires des tissus adipeux ont été identifiés chez l'homme. Dans le TASC (encadré vert) et le TAV (encadré rouge), de nombreuses cellules ont été découvertes, notamment des sous-types de cellules souches (hASPC : *Human Adipose Stem and Progenitor Cells* et CSA : cellule souche adipeuse) mais également des sous-populations adipocytaires (hAd : *Human Adipocyte*). En condition d'obésité, certaines de ces sous-populations cellulaires sont augmentées (flèches rouges) ou diminuées (flèches bleues), d'autres joueraient un rôle dans l'inflammation, la fibrose ou la résistance à l'insuline.

servir d'évaluation supplémentaire pour les interventions sur l'obésité afin de mieux appréhender la santé métabolique associée à la composition corporelle.

3. Quoi de neuf chez les cellules souches du TA ?

Toutefois, il est depuis longtemps connu que l'accumulation de TAV est associée à des résultats métaboliques défavorables. Des preuves de ces différences se sont dès lors accumulées. Il a notamment été montré que ce risque pouvait être lié aux différences intrinsèques de comportement des adipocytes dans les différents dépôts de graisse. Les adipocytes eux-mêmes ne sont pas les seules cellules impliquées. Les cellules souches adipeuses (CSA) peuvent être d'importants facteurs dans l'explication des différences entre les TA. En effet, des études ont montré que les CSA du TA épididymaire viscéral et du TA inguinal sous-cutané différaient en termes de fonctionnalité [17,18]. Nahmgoong et al. ont caractérisé les CSA de ces deux tissus afin de pouvoir analyser si ce sont les caractéristiques intrinsèques ou le microenvironnement tissulaire qui détermine leur potentiel adipogénique [19]. À partir des profils d'expression génique des CSA de ces deux TA, ils ont mis en évidence plusieurs clusters de CSA (4 dans le TA épididymaire et 7 dans le TA inguinal) avec 3 stades de différenciation chacun (S1 : multipotent, S2 : préadipocytes précoces engagés, S3 : préadipocytes tardifs) et ont montré qu'ils étaient tous significativement différents, sous-entendant des caractéristiques biologiques différentes. En présence d'une suralimentation chronique, les TA épididymaire et inguinal subissent différents processus de remodelage, tels que l'adipogenèse, la fibrose et l'inflammation.

Cette étude a ainsi permis d'identifier des CSA spécifiques de ces dépôts de graisse et impliquées dans le remodelage tissulaire. Concernant l'adipogenèse *de novo*, ce papier a montré que ce processus était plus actif dans le TA épididymaire que dans le TA inguinal chez les souris maigres. Afin de déterminer si cette différence provenait des caractéristiques intrinsèques des cellules ou de facteurs microenvironnementaux, les auteurs ont réalisé différentes expériences de transplantation de CSA. Ils ont ainsi démontré que les caractéristiques intrinsèques des CSA *DPP4+ ES1* et *IS1* déterminaient principalement leur potentiel adipogénique. De plus, les CSA *DPP4+ ES1* spécifiques du TA épididymaire induiraient cette adipogenèse *de novo* en réponse à des stimuli (*Fibroblast Growth Factor* (FGF) et *Transforming Growth Factor Beta* (TGFβ)) au début de l'obésité. Après l'adipogenèse, les auteurs se sont intéressés au remodelage fibro-inflammatoire puisque dans l'obésité, le TA épididymaire subit rapidement fibrose et inflammation. Ils ont ainsi montré que, chez des souris obèses, une population de CSA du TA épididymaire, les CSA *SDC1+* favoriseraient le remodelage fibro-inflammatoire. À l'inverse, dans le TA inguinal obèse la population de CSA *CXCL14+* réprimerait l'infiltration macrophagique en inhibant la voie CXCL12-CXCR4 dans ces derniers. Toutes ces données suggèrent que les différentes propriétés des CSA détermineraient les caractéristiques métaboliques des dépôts adipeux. Ces découvertes ont ainsi permis d'identifier des groupes de CSA

clés qui seraient cruciaux pour le remodelage et l'inflammation du TA dans l'obésité.

De plus chez les mammifères, hormis le TA blanc spécialisé dans le stockage de l'énergie, il existe également les TA bruns et beiges spécialisés quant à eux dans le phénomène de thermogenèse. Ce phénomène de thermogenèse lorsqu'il est pleinement actif permet d'augmenter la dépense énergétique du corps entier de plus de 100 % chez la souris [20] et de 40 à 80 % chez l'homme [21]. En outre, l'augmentation de l'activité du TA thermogénique est une stratégie prometteuse pour accroître la dépense énergétique afin de lutter contre les maladies métaboliques et l'obésité. Le TA est capable de s'expandre par deux mécanismes : l'augmentation de taille des adipocytes (hypertrophie) ou la formation de nouveaux adipocytes à partir de la différenciation de précurseurs (préadipocytes), ou hyperplasie. Le nombre d'adipocytes dans un dépôt est déterminé de façon précoce et assez stable à l'âge adulte, mais des études de lignage cellulaire récentes ont montré que lors d'une balance énergétique positive de façon chronique, le TA était capable de s'expandre à nouveau grâce à la différenciation de nouveaux préadipocytes qui sont situés dans l'espace périvasculaire [22,23]. L'hyperplasie du TA est généralement considérée comme saine, adaptative, non hypoxique et associée à une obésité métaboliquement saine.

Lors de l'exposition au froid, des adipocytes beiges thermogéniques sont produits dans le TA inguinal, mais pas dans le TA épididymaire. Il a été montré que les CSA *BST2*^{high} spécifiques du TA inguinal joueraient un rôle central dans la biogenèse des adipocytes beiges, avec notamment l'expression de gènes impliqués dans le *beiging* tels que les gènes *Cxcl13*, *Il33* et *Tmem26* [19] (Fig. 1).

4. Sénescence et dysfonctionnement métabolique : un lien fort

Cet impact cardiométabolique peut également découler du vieillissement cellulaire induit par l'excès de graisse. En effet, l'obésité accélère ce processus de vieillissement conduisant à une accumulation de cellules sénescentes dans de nombreux tissus [24,25]. Un article publié dans *Cell Metabolism* a généré une signature de sénescence des cellules β du pancréas et constaté que la résistance à l'insuline accélère la sénescence de ces cellules [26]. Aguayo-Mazzucato et al. avaient déjà montré chez la souris en 2017 qu'une population de cellules β exprimaient des marqueurs de vieillissement connus, tels que l'activité de la β-galactosidase acide, p16^{INK4a} ou encore p53BP1 [27]. Ils avaient également montré que l'apparition des cellules β sénescentes, caractérisées par une sécrétion d'insuline basale plus élevée et un recrutement plus faible du glucose, était induite par des stress métaboliques (résistance à l'insuline et régime riche en graisses). Pour aller plus loin, cette équipe de recherche s'est intéressée aux stratégies visant à réduire la charge des cellules β âgées pour voir si elles pouvaient améliorer l'identité cellulaire, la fonction et les paramètres métaboliques [26]. Ainsi, ils ont montré qu'un composé sénolytique oral, ABT263, pouvait améliorer l'hyperglycémie et le profil d'expression génique des cellules β chez la souris. Ces travaux montrent ainsi l'intérêt de la sénolyse des cellules β en tant que thérapie potentielle pour inhiber la progression du DT2. D'autres études encore ont montré un rôle de la sénescence dans la promotion du dysfonctionnement métabolique en se basant sur des modèles de souris transgéniques dont le gène cible était également *p16*^{INK4a} [25,26,28]. Or, toutes les cellules sénescentes n'expriment pas obligatoirement des niveaux élevés de p16 [29]. C'est pourquoi, en se basant sur une analyse transcriptomique en *single-cell*, une équipe américaine s'est très récemment penchée sur d'autres cellules sénescentes et a ainsi identifié et caractérisé les cellules *p21*^{CIP1} (*p21*^{high}) [30]. Ces dernières étant bien distinctes des p16^{high} avec un nombre de cellules, des distributions cellulaires et des localisations tissulaires différents. Ils ont montré que ces cellules s'accumulent dans le TA en cas d'obésité. En utilisant un modèle de souris *p21*-Cre, ils ont montré que ces cellules peuvent prévenir et atténuer la résistance à l'insuline chez les sujets obèses. En effet, leurs analyses ont montré qu'elles surexprimaient la voie NF-κB, voie importante dans ce qu'on appelle le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). C'est pourquoi ils ont alors tenté d'inactiver cette voie dans les cellules *p21*^{high} et ont ainsi montré une atténuation de la résistance à l'insuline (Fig. 1). Enfin, en utilisant un modèle de transplantation de TAV gonadique, ils ont montré que la présence de cellules *p21*^{high} était suffisante pour provoquer une résistance à l'insuline *in vivo*. Chez l'homme, cette population de cellules sénescentes a également été retrouvée. En traitant du TAV humain *ex vivo* avec un cocktail sénolytique, puis en effectuant des xénogreffes à des souris immunodéficientes, Wang et al. ont montré une élimination des *p21*^{high} dans le TA et une atténuation de la résistance à l'insuline. Ainsi, leurs résultats ont permis de démontrer que ces cellules jouent un rôle causal dans le dysfonctionnement métabolique induit par l'obésité et qu'elles pourraient être ciblées en thérapeutique pour lutter contre l'insulinorésistance.

5. Le TA thermogénique : une voie de recherche toujours en expansion

L'entrain de la communauté scientifique pour le phénomène de thermogenèse pousse les chercheurs à se concentrer sur la capacité des adipocytes beiges et bruns à agir comme un réservoir métabolique pour les nutriments excédentaires. De nombreuses études ont montré que les souris dont l'activité thermogénique des TA est accrue sont protégées contre la prise de poids et les troubles métaboliques [31,32]. En effet, la transplantation de graisse brune [33] ou beige [34] chez des souris obèses ob/ob pourrait reverser la résistance à l'insuline et diminuerait leur masse grasse [33,34]. Il en est de même chez l'homme où l'augmentation de l'activité thermogénique est associée à des effets métaboliques bénéfiques [32,35,36]. Or, à ce jour, nous savons encore peu de choses sur la prévalence et la fonction métabolique de ce TA chez les personnes souffrant d'obésité sévère. Récemment, un article paru dans *Diabetes* a voulu répondre à cette problématique dans une étude transversale sur 40 personnes présentant un IMC supérieur à 35 kg/m^2 (dont 10 avec un IMC entre 35 et 40 kg/m^2 et 30 individus à plus de 40 kg/m^2) [36]. Cette étude a caractérisé les différences métaboliques entre la présence ou l'absence de TA brun chez des individus en obésité de classe II-III. Pour cela, Herz et al. ont utilisé un protocole de refroidissement personnalisé de 150 minutes suivi d'une tomographie par émission de positons au F-18-fluorodéoxyglucose (F-18-FDG). Ils ont avec ceci montré qu'une proportion significative de 35 % des individus souffrant d'obésité sévère possédaient du TA brun actif (BAT$_{pos}$). Après exposition au froid, les individus BAT$_{pos}$ avaient une dépense énergétique significativement plus élevée que les individus BAT$_{neg}$. Ces résultats suggèrent qu'en dépit d'une adiposité sévère, le TA brun pourrait encore être fonctionnel chez les personnes en situation d'obésité. De plus, malgré un taux de graisse corporelle totale plus au moins égal (BAT$_{pos}$ = 52,6 ± 2,3 % *vs* BAT$_{neg}$ = 50,1 ± 4,2 % ; p = 0,022), ces individus avaient un profil métabolique nettement plus sain avec un volume de TAV plus faible, moins de résistance à l'insuline (HOMA-IR : BAT$_{pos}$ 2,9 [2,1-4,1] *vs* BAT$_{neg}$ 4,7 [3,4-7]) et un meilleur contrôle de la glycémie (7 % de prédiabétiques dans le groupe BAT$_{pos}$ *vs* 31 % dans le groupe BAT$_{neg}$; p = 0,124). Ainsi, la présence de ce TA brun actif serait étroitement liée à un phénotype d'obésité métaboliquement saine.

De plus, quelques études avaient suggéré que la présence de TA brun actif était négativement corrélée à l'IMC et à la masse graisseuse [37-39]. Or les résultats de Herz et al. ont démontré que la captation du glucose par le TA brun n'était liée ni à l'IMC ni à la masse graisseuse, mais à l'accumulation de graisse viscérale. En effet, le TAV a montré de fortes corrélations inverses avec la thermogenèse induite par le froid, le volume de TA brun ainsi que la captation du glucose par celui-ci. Enfin, l'obésité étant fréquemment liée aux maladies métaboliques hépatiques, il a été montré dans cet article que les individus BAT_{pos} possédaient un état inflammatoire plus favorable ainsi qu'une réduction des signes de stéatose hépatique par rapport aux individus BAT_{neg}. Ces travaux peuvent ainsi mener la communauté scientifique à se concentrer sur l'efficacité des activateurs pharmacologiques du TA brun chez les personnes souffrant d'obésité.

6. Communication intercellulaire et recyclage mitochondrial en vue

L'activité des TA bruns et beiges implique la surexpression de gènes thermogéniques tels que *UCP-1* mais également une biogenèse mitochondriale. Une étude récente chez la souris montre qu'un transfert de mitochondries entre adipocytes du TA blanc et macrophages existe, et que son absence aggrave la fonction métabolique de l'animal et favorise l'obésité [40]. De plus, une déplétion des macrophages altère la thermogenèse dans les dépôts adipeux sous-cutanés [41]. Mais bien que les mitochondries des adipocytes bruns représentent une grande partie du volume cellulaire et qu'elles se réorganisent pour soutenir la thermogenèse, on ne sait toujours pas si un transfert mitochondrial intercellulaire se produit dans le TA brun et régule la thermogenèse adaptative. Très récemment, une étude a démontré que les adipocytes bruns soumis à un stress thermogénique libèrent des vésicules extracellulaires (VE) contenant des fragments de mitochondries endommagées par l'oxydation afin d'assurer la thermogenèse [42]. En effet, les mitochondries des TA bruns et beiges subissent de profonds réarrangements afin de produire de la chaleur. Cette étude a mis en évidence de façon originale que les adipocytes bruns répondent au stress mitochondrial, induit par l'exposition au froid, en produisant des vésicules dérivées des mitochondries (VDM) afin de délivrer les composants mitochondriaux oxydés dans les VE. Ces VE seront ensuite éliminées par les macrophages adipeux, évitant ainsi l'échec du programme thermogénique. Cette étude révèle un rôle des macrophages du TA dans le contrôle de la qualité mitochondriale. Ces résultats font écho à des publications mettant en lumière le rôle joué par les VE adipocytaires dans le remodelage du TA [43,44]. Ainsi, des adipocytes soumis à un stress énergétique libèrent des VE contenant des éléments mitochondriaux ciblant le cœur, conduisant à une réponse cardiaque antioxydante adaptative qui pourrait limiter les lésions ischémiques/de reperfusion cardiaque chez la souris et prévenir la lipotoxicité [45,46].

7. Conclusion

L'ensemble de ces nouvelles données soulignent que le TA est un organe complexe formé de cellules hétérogènes comme les cellules souches, les cellules immunitaires, ou les adipocytes qui ont des caractéristiques différentes en fonction de leur localisation (viscérale, sous-cutanée) et qui peuvent induire ou réprimer des processus d'inflammation, de remodelage de la matrice extracellulaire, de sénescence ou de thermogenèse adaptative *via* des phénomènes de communication intercellulaire. Ces modifications ont un impact sur le métabolisme, la résistance à l'insuline et les complications associées à l'excès de masse grasse. Une meilleure compréhension de ses phénomènes est un champ d'exploration immense pour découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'obésité ou le DT2.

Déclaration de liens d'intérêts

E. Doubki, A. Lasbleiz et A. Dutour déclarent ne pas avoir de liens d'intérêt avec cet article.

B. Gaborit déclare des liens d'intérêts pour sa participation à des essais cliniques en qualité de co-investigatrice, expérimentatrice non principale, collaboratrice à l'étude pour Boehringer Ingelheim, Lilly et Novo Nordisk ; pour des interventions ponctuelles (rapports d'expertise) pour Lilly, Novo Nordiks et Sanofi ; pour des interventions ponctuelles (activité de conseil) pour Cemka et Pfizer ; pour des invitations à des conférences en qualité d'intervenant par Novartis et Sanofi ainsi que pour avoir été invitée en qualité d'auditrice à des conférences (frais de déplacement et d'hébergement pris en charge) par Abott, Adelia, Isis diabète, Lilly, LVL et Novo Nordisk.

Cet article fait partie du supplément *Les obésités : état des lieux en 2023* réalisé avec le soutien institutionnel de Novo Nordisk.

Références

[1] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. Lancet 2017;390(10113):2627-42.
[2] Fontbonne A, Currie A, Tounian P, Picot MC, Foulatier O, Nedelcu M, et al. Prevalence of overweight and obesity in France: the 2020 Obepi-Roche study by the « Ligue contre l'obésité ». J Clin Med 2023;12(3):925.
[3] Czernichow S, Renuy A, Rives-Lange C, Carette C, Airagnes G, Wiernik E, et al. Evolution of the prevalence of obesity in the adult population in France, 2013–2016: the Constances study. Sci Rep 2021;11:14152.
[4] Main ML, Rao SC, O'Keefe JH. Trends in obesity and extreme obesity among US adults. JAMA 2010;303(17):1695; author reply 1695-6.
[5] Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. Cell 2008;135(2):240-9.
[6] Berry DC, Jiang Y, Graff JM. Mouse strains to study cold-inducible beige progenitors and beige adipocyte formation and function. Nat Commun 2016;7(1):10184.
[7] Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. Science 2008;322(5901):583-6.
[8] Schwalie PC, Dong H, Zachara M, Russeil J, Alpern D, Akchiche N, et al. A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots. Nature 2018;559(7712):103-8.
[9] Burl RB, Ramseyer VD, Rondini EA, Pique-Regi R, Lee YH, Granneman JG. Deconstructing adipogenesis induced by β3-adrenergic receptor activation with single-cell expression profiling. Cell Metab 2018;28(2):300-9.e4.
[10] Merrick D, Sakers A, Irgebay Z, Okada C, Calvert C, Morley MP, et al. Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue. Science 2019;364(6438):eaav2501.
[11] Hepler C, Shan B, Zhang Q, Henry GH, Shao M, Vishvanath L, et al. Identification of functionally distinct fibro-inflammatory and adipogenic stromal subpopulations in visceral adipose tissue of adult mice. Elife 2018;7:e39636.
[12] Emont MP, Jacobs C, Essene AL, Pant D, Tenen D, Colleluori G, et al. A single cell atlas of human and mouse white adipose tissue. Nature 2022;603(7903):926-33.
[13] Mathew H, Farr OM, Mantzoros CS. Metabolic health and weight: understanding metabolically unhealthy normal weight or metabolically healthy obese patients. Metabolism. janv 2016;65(1):73-80.
[14] Blüher S, Schwarz P. Metabolically healthy obesity from childhood to adulthood – Does weight status alone matter? Metabolism 2014;63(9):1084-92.
[15] Ross R, Neeland IJ, Yamashita S, Shai I, Seidell J, Magni P, et al. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a consensus statement from the IAS and ICCR working group on visceral obesity. Nat Rev Endocrinol 2020;16(3):177-89.
[16] Agrawal S, Klarqvist MDR, Diamant N, Stanley TL, Ellinor PT, Mehta NN, et al. BMI-adjusted adipose tissue volumes exhibit depot-specific and divergent associations with cardiometabolic diseases. Nat Commun 2023;14(1):266.
[17] Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. Cell 2012;150(2):366-76.

[18] Macotela Y, Emanuelli B, Mori MA, Gesta S, Schulz TJ, Tseng YH, et al. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. Diabetes 2012;61(7):1691-9.
[19] Nahmgoong H, Jeon YG, Park ES, Choi YH, Han SM, Park J, et al. Distinct properties of adipose stem cell subpopulations determine fat depot-specific characteristics. Cell Metab 2022;34(3):458-72.e6.
[20] Angueira AR, Shapira SN, Ishibashi J, Sampat S, Sostre-Colón J, Emmett MJ, et al. Early B cell factor activity controls developmental and adaptive thermogenic gene programming in adipocytes. Cell Rep 2020;30(9):2869-78.e4.
[21] Ouellet V, Labbé SM, Blondin DP, Phoenix S, Guérin B, Haman F, et al. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. J Clin Invest 2012;122(2):545-52.
[22] Jeffery E, Church CD, Holtrup B, Colman L, Rodeheffer MS. Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. Nat Cell Biol 2015;17(4):376-85.
[23] Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. Nat Med 2013;19(10):1338-44.
[24] Schafer MJ, White TA, Evans G, Tonne JM, Verzosa GC, Stout MB, et al. Exercise prevents diet-induced cellular senescence in adipose tissue. Diabetes 2016;65(6):1606-15.
[25] Palmer AK, Xu M, Zhu Y, Pirtskhalava T, Weivoda MM, Hachfeld CM, et al. Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. Aging Cell 2019;18(3):e12950.
[26] Aguayo-Mazzucato C, Andle J, Lee TB, Midha A, Talemal L, Chipashvili V, et al. Acceleration of β cell aging determines diabetes and senolysis improves disease outcomes. Cell Metab 2019;30(1):129-42.e4.
[27] Aguayo-Mazzucato C, van Haaren M, Mruk M, Lee TB, Crawford C, Hollister-Lock J, et al. β Cell aging markers have heterogeneous distribution and are induced by insulin resistance. Cell Metab 2017;25(4):898-910.e5.
[28] Xu M, Palmer AK, Ding H, Weivoda MM, Pirtskhalava T, White TA, et al. Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. Elife 2015;4:e12997.
[29] Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular senescence: defining a path forward. Cell 2019;179(4):813-27.
[30] Wang L, Wang B, Gasek NS, Zhou Y, Cohn RL, Martin DE, et al. Targeting p21Cip1-Highly-expressing cells in adipose tissue alleviates insulin resistance in obesity. Cell Metab 2022;34(1):75-89.e8.
[31] Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. Nat Med 2013;19(10):1252-63.
[32] Sakers A, Siqueira MKD, Seale P, Villanueva CJ. Adipose-tissue plasticity in health and disease. Cell 2022;185(3):419-46.
[33] Liu X, Wang S, You Y, Meng M, Zheng Z, Dong M, et al. Brown adipose tissue transplantation reverses obesity in Ob/Ob mice. Endocrinology 2015;156(7):2461-9.
[34] Min SY, Kady J, Nam M, Rojas-Rodriguez R, Berkenwald A, Kim JH, et al. Human "brite/beige" adipocytes develop from capillary networks and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. Nat Med 2016;22(3):312-8.
[35] Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, Porter C, Saraf MK, Annamalai P, et al. Brown adipose tissue activation is linked to distinct systemic effects on lipid metabolism in humans. Cell Metab 2016;23(6):1200-6.
[36] Herz CT, Kulterer OC, Prager M, Schmöltzer C, Langer FB, Prager G, et al. Active brown adipose tissue is associated with a healthier metabolic phenotype in obesity. Diabetes 2021;71(1):93-103.
[37] Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. Diabetes 2009;58(7):1526-31.
[38] Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Okamatsu-Ogura Y, Kameya T, Kawai Y, et al. Age-related decrease in cold-activated brown adipose tissue and accumulation of body fat in healthy humans. Obesity (Silver Spring) 2011;19(9):1755-60.
[39] Vijgen GHEJ, Bouvy ND, Teule GJJ, Brans B, Schrauwen P, Lichtenbelt WD van M. Brown adipose tissue in morbidly obese subjects. PLoS One 2011;6(2):e17247.
[40] Brestoff JR, Wilen CB, Moley JR, Li Y, Zou W, Malvin NP, et al. Intercellular mitochondria transfer to macrophages regulates white adipose tissue homeostasis and is impaired in obesity. Cell Metab 2021;33(2):270-82.e8.
[41] Henriques F, Bedard AH, Guilherme A, Kelly M, Chi J, Zhang P, et al. Single-cell RNA profiling reveals adipocyte to macrophage signaling sufficient to enhance thermogenesis. Cell Rep 2020;32(5):107998.
[42] Rosina M, Ceci V, Turchi R, Chuan L, Borcherding N, Sciarretta F, et al. Ejection of damaged mitochondria and their removal by macrophages ensure efficient thermogenesis in brown adipose tissue. Cell Metab 2022;34(4):533-48.e12.
[43] Crewe C, Joffin N, Rutkowski JM, Kim M, Zhang F, Towler DA, et al. An Endothelial-to-adipocyte extracellular vesicle axis governed by metabolic state. Cell 2018;175(3):695-708.e13.
[44] Flaherty SE, Grijalva A, Xu X, Ables E, Nomani A, Ferrante AW. A lipase-independent pathway of lipid release and immune modulation by adipocytes. Science 2019;363(6430):989-93.
[45] Crewe C, Funcke JB, Li S, Joffin N, Gliniak CM, Ghaben AL, et al. Extracellular vesicle-based interorgan transport of mitochondria from energetically stressed adipocytes. Cell Metab 2021;33(9):1853-68.e11.
[46] Loyer X, Boulanger CM, Le Lay S. Adipocyte extracellular vesicles: rescuers of cardiac mitochondrial stress. Trends Endocrinol Metab 2022;33(1):1-3.

2. Modification des tissus adipeux dans l'obésité

L'obésité est une pathologie endocrinienne et métabolique complexe qui entraîne des changements profonds dans le TA. Si la quantité de TA est liée au risque CV, de nombreuses études ont mis en évidence que ses autres caractéristiques sont également étroitement liées à la résistance à l'insuline, au risque cardiométabolique et à la mortalité toutes causes confondues (indépendamment du volume total de TA) (Fuster *et al.*, 2016; Baba *et al.*, 2010; Rosenquist *et al.*, 2013; Abraham *et al.*, 2015; Rosenquist *et al.*, 2015). Ainsi des modifications au niveau du TA peuvent devenir des facteurs clés dans la régulation du métabolisme systémique et entraîner des maladies cardiométaboliques, indépendamment de l'IMC (Fuster *et al.*, 2016). L'hypertrophie, l'inflammation, l'hypoxie ou encore la fibrose sont autant de changements interconnectés qui contribuent à la dysfonction du TA au cours de la pathogenèse des maladies métaboliques (**Figure 10**) (Sakers *et al.*, 2022).

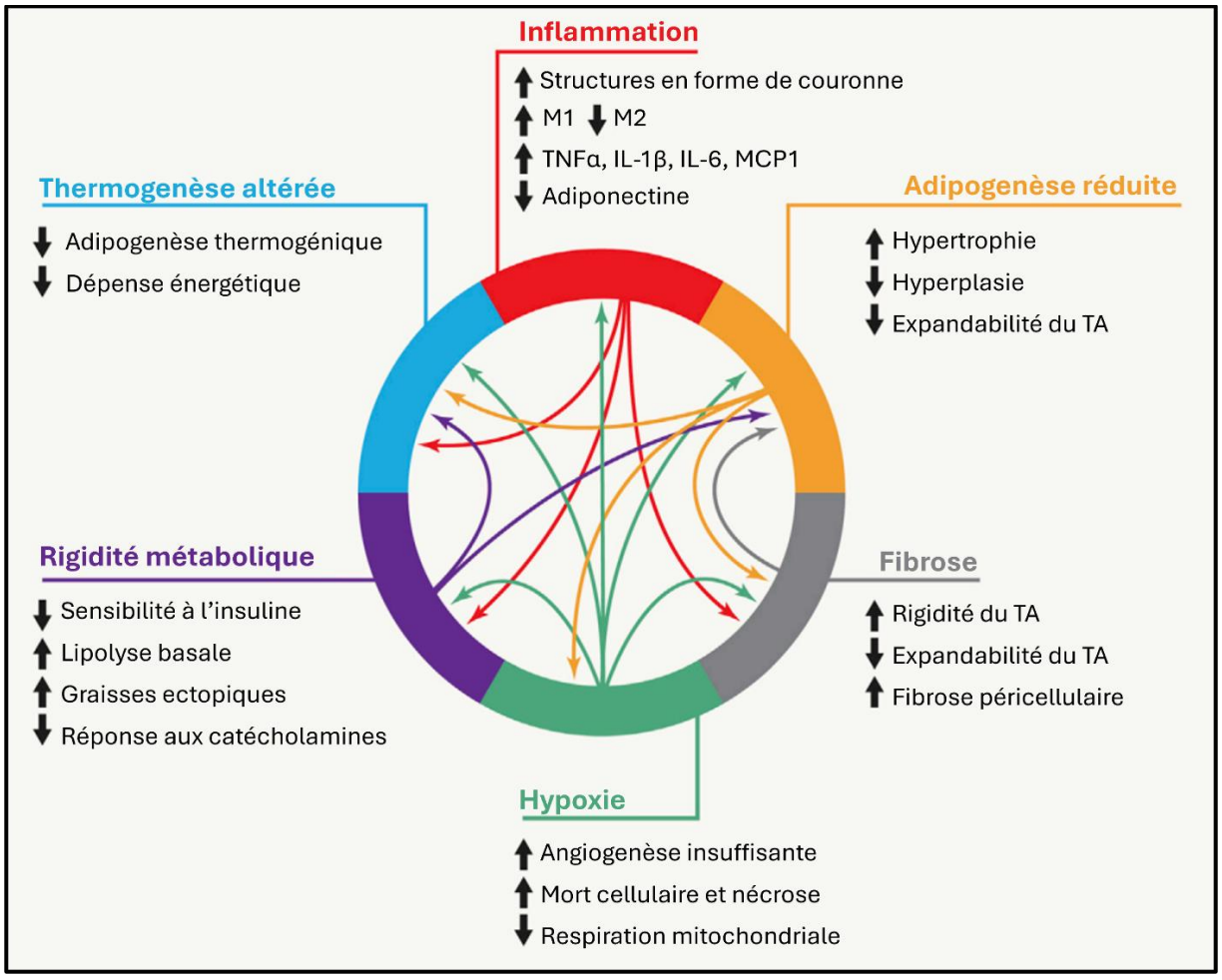


Figure 10 | Caractéristiques et processus interconnectés du tissu adipeux dans les maladies métaboliques (traduction d'après Sakers *et al.*, *Cell Review*, 2022 *(Sakers et al., 2022)*).

Ces anomalies qualitatives du TA, constituent un domaine de recherche de plus en plus intéressant et pourraient expliquer en partie l'observation clinique d'une obésité métaboliquement saine (*cf. L'obésité métaboliquement saine*).

a) Modifications morphologiques

L'expansion du TA est étroitement liée à la santé métabolique puisqu'une grande capacité d'expansion protège contre les maladies métaboliques. Dans l'obésité, lorsque le TA n'est plus capable de stocker l'excès de triglycérides, cela entraîne une expansion significative du TA qui se manifeste par deux processus distincts. D'une part, l'**hypertrophie** des adipocytes qui correspond à l'augmentation de leur taille dans le but de stocker davantage de triglycérides (Prins & O'Rahilly, 1997). D'autre part, l'**hyperplasie** adipocytaire se met en place en réponse à une surcharge lipidique chronique (Prins & O'Rahilly, 1997). Lorsque les adipocytes ont atteint la taille « seuil » à partir de laquelle ils ne peuvent plus grossir, une différenciation des préadipocytes en nouveaux adipocytes se met alors en place.

Du fait d'une saturation en lipides, les adipocytes hypertrophiques stockent moins rapidement les graisses alimentaires, conduisant à une redistribution des lipides vers d'autres organes métaboliques (Goossens, 2017). Cette capacité d'expansion limitée favorise finalement le stockage des graisses dans les TAs viscéraux et autres dépôts ectopiques (Fuster *et al.*, 2016; Gustafson & Smith, 2015). Dans l'obésité et la résistance à l'insuline, il a déjà été montré que les adipocytes du TAV subissent une hypertrophie beaucoup plus prononcée que ceux du TAsc (Hardy *et al.*, 2011; Kawai *et al.*, 2021; O'Connell *et al.*, 2010). De plus, le TA hypertrophique se caractérise par une infiltration de cellules immunitaires et une altération de la sécrétion des adipokines conduisant notamment au développement de la résistance à l'insuline (Goossens, 2017). Dans un environnement obésogène/diabétogène, les macrophages qui infiltrent le TA induisent une réponse pro-inflammatoire coordonnée (Russo & Lumeng, 2018). Cette infiltration favoriserait l'hypertrophie des adipocytes et contribuerait à la détérioration de la santé métabolique (T. Wang *et al.*, 2022). Dans le cadre de l'obésité, l'hypertrophie adipocytaire serait corrélée à une augmentation de la sécrétion, par les macrophages, de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-1β, l'IL-1RA et le CCL2 (MCP-1) et a une diminution de sécrétion d'IL-10 anti-inflammatoire (Skurk *et al.*, 2007). Ceci indique alors que la taille des adipocytes serait un déterminant important de la sécrétion d'adipokines dans le TA (Skurk *et al.*, 2007). En plus de l'inflammation du TA, l'hypertrophie favoriserait la fibrose et l'hypoxie du TA (Sakers *et al.*, 2022; Vishvanath & Gupta, 2019). À l'inverse, la croissance hyperplasique, associée à la présence d'adipocytes plus petits, ne déclenche pas ces altérations pathologiques, et est généralement plus bénéfique pour la santé métabolique (Sakers *et al.*, 2022). Des souris obèses (ob/ob) dépourvues de leptine mais surexprimant l'adiponectine ont par exemple montré des niveaux de glucose et d'insuline normalisés ainsi qu'une diminution de l'inflammation systémique (J.-Y. Kim *et al.*, 2007). Dans cette étude, la surexpression transgénique de l'adiponectine a conduit à une expansion massive du TA, cependant, le niveau d'infiltration des macrophages était très minime, dû au fait que les animaux présentaient une hyperplasie et non une hypertrophie adipocytaire (J.-Y. Kim *et al.*, 2007). Cela souligne le potentiel thérapeutique des stratégies visant à favoriser l'hyperplasie au détriment de l'hypertrophie comme moyen de prévenir les complications métaboliques et cardiovasculaires de l'obésité.

b) Modifications cellulaires et inflammation chronique

L'obésité modifie également la composition cellulaire du TA, notamment par une infiltration accrue de cellules immunitaires (**Figure 11**). Plus qu'une modification cellulaire, on parle d'une modification de l'état inflammatoire du TA qui engendre d'importantes conséquences sur la santé métabolique.

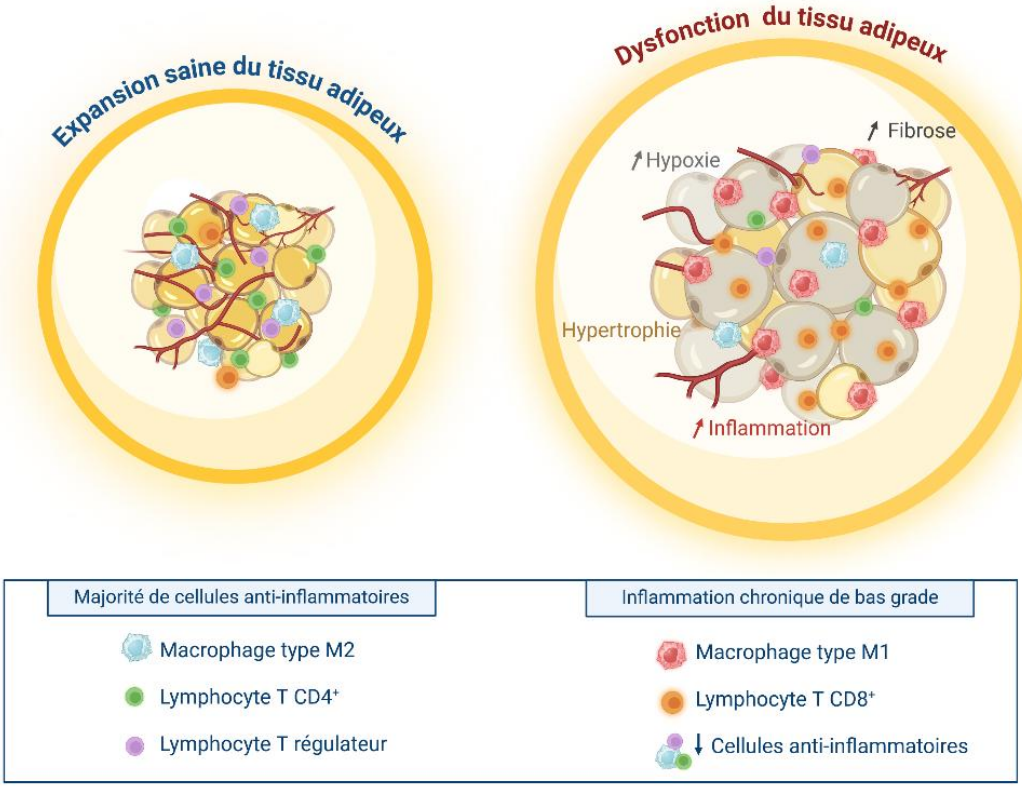


Figure 11 | Tissu adipeux sain *vs* tissu adipeux inflammatoire dans l'obésité.

Dans les années 1990, les premières preuves selon lesquelles l'obésité entraîne une **inflammation chronique** émergent. Ce sont Hotamisligil *et al.* qui révèlent les premiers une augmentation des concentrations de TNFα dans le TA de rats obèses (Hotamisligil *et al.*, 1993). Après cette étude, de nombreuses équipes de recherche ont démontré que l'inflammation chronique est une caractéristique de la dysfonction du TA et de la dérégulation métabolique systémique (Schleh *et al.*, 2023).

Chez le rongeur comme chez l'humain, l'obésité augmente considérablement l'infiltration de **macrophages** dans le TA, en lien avec l'activation de plusieurs voies inflammatoires (Sakers *et al.*, 2022; Patsouris *et al.*, 2008; Amano *et al.*, 2014). Des travaux ont montré que l'obésité induit un changement phénotypique des macrophages du TA d'un profil anti-inflammatoire à un état pro-inflammatoire (M. T. A. Nguyen *et al.*, 2007; Lumeng *et al.*, 2008). Cette transition est médiée par des chimiokines telles que CCL2 (Kanda *et al.*, 2006), qui recrutent les monocytes au site de l'inflammation. L'ablation des macrophages pro-inflammatoires chez les souris obèses diminue l'inflammation du TA, normalisant la sensibilité à l'insuline (Patsouris *et al.*, 2008). De même, la réduction du recrutement des macrophages

dans le TA permet d'atténuer les complications métaboliques chez le rongeur (Kanda *et al.*, 2006; Weisberg *et al.*, 2006).

Au cours de l'obésité, on observe également une augmentation des **lymphocytes T** (LT) $CD8^+$ pro-inflammatoires et une diminution des lymphocytes T régulateurs (Treg) exacerbant l'inflammation locale et systémique. (H. Wu *et al.*, 2007; Nishimura *et al.*, 2009). Les cellules T $CD8^+$ effectrices infiltrent le TA dès les premiers stades de l'obésité, stimulant ainsi le recrutement des macrophages et l'inflammation. À l'inverse, les Treg sont essentiels pour l'atténuation de l'inflammation et semblent plus abondants dans le TA de patients minces, leur nombre diminuant en cas d'obésité. L'élimination des Treg dans le TA augmente l'inflammation et la résistance à l'insuline, tandis que leur transfert adoptif réduit la réponse inflammatoire et améliore certains paramètres métaboliques (Sakers *et al.*, 2022; S. Zhao *et al.*, 2019).

D'autres types cellulaires peuvent également être touchés par l'obésité. Les **cellules progénitrices adipocytaires (**CPA) offrent une protection contre les complications métaboliques liées à l'obésité, via une amélioration du stockage des lipides (Longo *et al.*, 2019; T. Wang *et al.*, 2022).

c) Modifications moléculaires

Outre les changements cellulaires, il existe également des altérations moléculaires dans le TA obèse. Ces modifications sont alors liées à la sécrétion de cytokines/adipokines et autres médiateurs bioactifs. Les adipocytes stressés libèrent des acides gras libres et sécrètent des chimiokines, entraînant l'infiltration de cellules immunitaires inflammatoires qui sécrètent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires (L. Xu *et al.*, 2015). Au cours de l'obésité, de nombreuses voies de stress sont aussi activées. Le stress du réticulum endoplasmique, le stress oxydatif, l'inflammasome ou encore l'hypoxie, peuvent par exemple engendrer une polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire (Lasbleiz *et al.*, 2021). Ces changements sont alors associés à une inflammation du TA et à une résistance à l'insuline (Castoldi *et al.*, 2015; Lasbleiz *et al.*, 2021). Lors d'une expandabilité trop rapide du TA, les adipocytes sont soumis à une carence en oxygène. Cela induit alors une surexpression du facteur HIF-1α (*Hypoxia-Inducible Factor 1α*) qui entraîne l'activation d'un programme transcriptionnel pro-fibrotiques, favorisant l'accumulation de composants de la matrice extracellulaire et conduisant ainsi à la fibrose et à la dysfonction du TA (Halberg *et al.*, 2009).

De plus, une inflammation non résolue est souvent associée à un remodelage tissulaire altéré et évolue souvent vers la fibrose sous l'effet d'un stress inflammatoire prolongé. La fibrose étant caractérisée par un dépôt excessif de composants de la matrice extracellulaire. Cette matrice est composée de nombreuses protéines (structurelles et d'adhésion) telles que les collagènes et la fibronectine ou encore des protéoglycanes (Marcelin *et al.*, 2019). Dans leur revue sur le sujet, Marcelin *et al.* rapportent que dans le TA des patients en situation d'obésité, les collagènes s'accumulent autour des adipocytes pour former une fibrose péricellulaire (Marcelin *et al.*, 2019).

d) Focus sur la fraction vasculaire stromale (FVS)

Aujourd'hui considéré comme un tissu hétérogène, le TA était à l'origine perçu comme un tissu homogène principalement constitué d'adipocytes (**Figure 12**) dont nous reparlerons plus loin. En 1964, Rodbell réalise les premières expériences d'isolement de la FVS chez des rats (Rodbell, 1964). Il emploie alors des enzymes telles que la collagénase, qui lui permettent de mettre en évidence les cellules non adipocytaires du TA (Rodbell, 1964, 1966a, 1966b; Rodbell & Jones, 1966).

De nombreuses études ont par la suite montré que la FVS est composée d'un ensemble cellulaire hétérogène. Outre les adipocytes matures, cette fraction est composée d'un mélange comprenant des cellules souches mésenchymateuses, des cellules nerveuses, des précurseurs endothéliaux, des cellules musculaires lisses, des péricytes, des préadipocytes ou encore des cellules immunitaires (**Figure 12**).

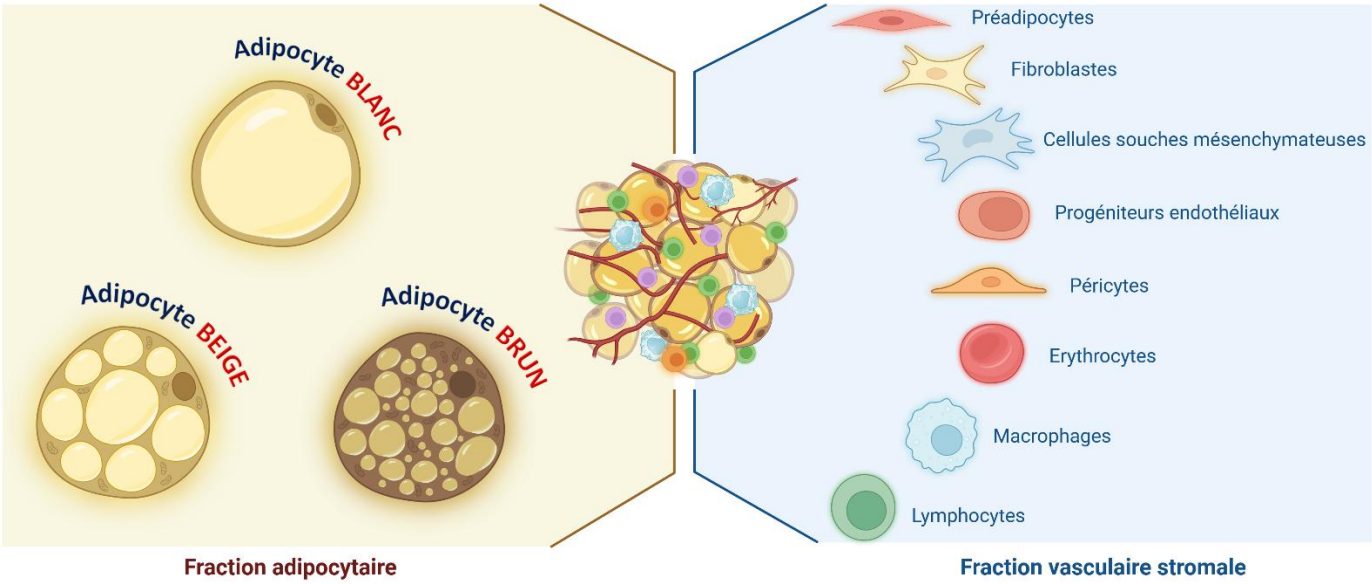


Figure 12 | Composition cellulaire des tissus adipeux.

Les cellules stromales et les cellules souches dérivées du TA sont une source riche et pratique pour de nombreuses approches thérapeutiques de médecine régénérative (Trevor *et al.*, 2020). Cependant, leur proportion dans la FVS n'étant pas totalement claire, la *Fédération internationale pour la science et la thérapeutique adipeuse* (IFATS) ainsi que la *Société internationale de thérapie cellulaire* (ISCT), ont envisagé de quantifier les cellules de cette fraction. Leurs travaux ont montré que les cellules progénitrices mésenchymateuses y représenteraient 15-30 %, les cellules endothéliales 10-20 %, les lymphocytes et les granulocytes 10-15 %, les monocytes 5-15 %, les péricytes 3-5 % et enfin il y aurait moins de 0,1 % de cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (Bourin *et al.*, 2013). Les autres types cellulaires n'ayant pas été étudiés dans cette étude.

Hormis les progéniteurs adipeux et les adipocytes eux-mêmes, la FVS est capable de réguler à la fois le destin et la fonction des adipocytes. Ces cellules sont ainsi des déterminants importants de la fonction et de la plasticité du TA, car leur composition peut varier en fonction des dépôts de TAs et de l'état physiologique.

e) Les cellules immunitaires de la FVS

➢ *Généralités sur le système immunitaire*

Le système immunitaire (SI) représente un ensemble de mécanismes biologiques assurant l'intégrité de l'organisme face à son environnement. C'est alors la première ligne de défense de notre organisme contre les agents pathogènes. Composé d'un réseau interconnecté d'organes lymphoïdes primaires et secondaires, de cellules immunitaires et de molécules de signalisation, il fonctionne de manière concertée pour maintenir l'homéostasie. Le SI est classiquement divisé en deux branches qui collaborent pour maintenir l'homéostasie de l'hôte : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif (Parkin & Cohen, 2001). Ces deux réponses se distinguent notamment par leur vitesse d'initiation et leur spécificité. Elles emploient également différents modes de détection du danger et possèdent des mécanismes effecteurs distincts. Toutefois, leurs actions sont étroitement interdépendantes et la qualité initiale de la réponse innée oriente les réponses adaptatives ultérieures.

Ces deux réponses immunitaires reposent sur l'activité de leucocytes. Ces derniers dérivent de la moelle osseuse, où ils sont produits au cours du processus d'hématopoïèse (Charles A Janeway *et al.*, 2001). Toutes les cellules sanguines sont ainsi formées à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces cellules pluripotentes ont la capacité de se différencier en diverses lignées cellulaires, elles donnent notamment naissance à des progéniteurs communs qui se diviseront en progéniteurs lymphoïde ou myéloïde (**Figure 13**).

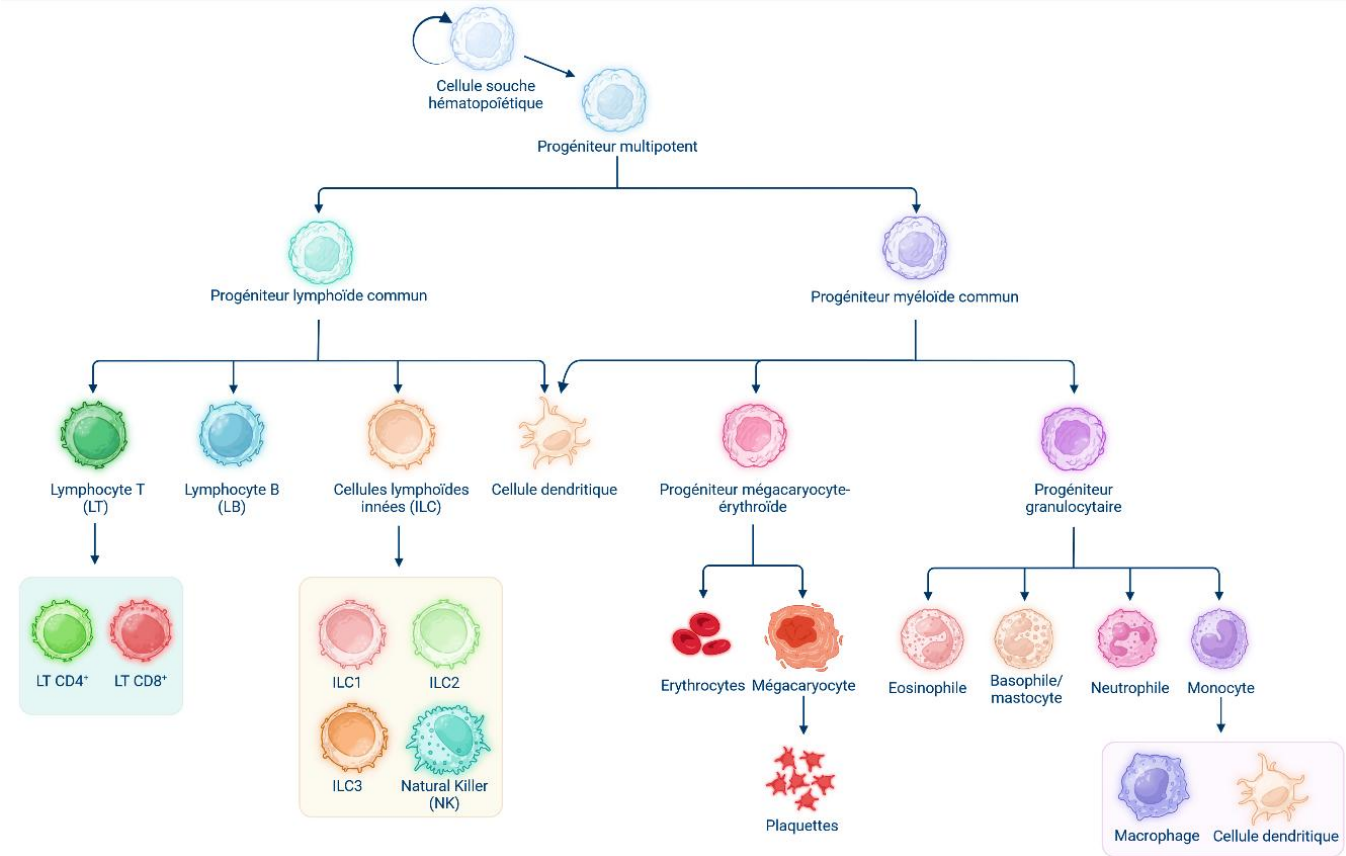


Figure 13 | Schéma simplifié de l'hématopoïèse.

- La lignée myéloïde comprend la plupart des cellules du SI inné. Le progéniteur myéloïde est ainsi le précurseur des macrophages, des cellules granulocytaires (neutrophiles, basophiles et éosinophiles), des mastocytes et des cellules dendritiques (DCs). Ces dernières peuvent être classifiées en sous-populations : les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). La signature génique des cDCs est similaire entre les tissus mais diffère de celle des pDC, des monocytes ou encore des macrophages (Eisenbarth, 2019). Ces cellules présentatrices d'antigènes sont principalement responsables du maintien de la tolérance immunologique et du couplage de l'immunité innée et adaptative (Mráz, Cinkajzlová, Kloučková, Lacinová, Kratochvílová, Lipš, Pořízka, Kopecký, Lindner, *et al.*, 2019).

- Le progéniteur lymphoïde commun, quant à lui, devient le précurseur des lymphocytes T (LT) et B (LB) spécifiques de l'antigène mais également des cellules lymphoïdes innées (ILCs, *innate lymphoid cells*) (**Figure 13**). À la fin de leur développement, les LT se répartissent en deux classes caractérisées par les marqueurs de surface CD4 ou CD8. Les LT $CD4^+$ effecteurs peuvent à leur tour se différencier en sous-ensembles, effectuant des réponses différentes : on parle le plus souvent des réponses immunitaires Th0, Th1, Th2 ou encore Th17. Les LT $CD4^+$ Th1 et Th17 sont des sous-types lymphocytaires pro-inflammatoires tandis que les LT $CD4^+$ Th2 sont anti-inflammatoires tout comme les Treg.

Les ILCs, dépourvues de spécificité à l'antigène, appartiennent au SI inné. On distingue ces cellules en 3 grands sous-types : ILC1 et *natural killer* (NK), ILC2 et ILC3 dont la classification est basée sur l'expression de facteurs de transcription, de marqueurs de surface et de la libération de différentes cytokines (Eberl *et al.*, 2015) (**Figure 14**). Chacun de ces sous-types mime respectivement les réponses immunitaires Th1, Th2 et Th17. Les ILC1 sont activées par l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 via lesquelles la signalisation IL-12R/STAT4 permet leur activation et stimulent la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron γ (INF-γ) et le TNF-α (Klose *et al.*, 2014; O'Sullivan *et al.*, 2016). Les NK sont bien connues pour leur capacité à tuer les cellules infectées par des virus (Brandstadter & Yang, 2011). L'activation des ILC1 et des NK par les cytokines locales agit comme une réponse auto-entretenue afin d'accroître un environnement pro-inflammatoire dans l'obésité (Brestoff *et al.*, 2015; Schleh *et al.*, 2023).

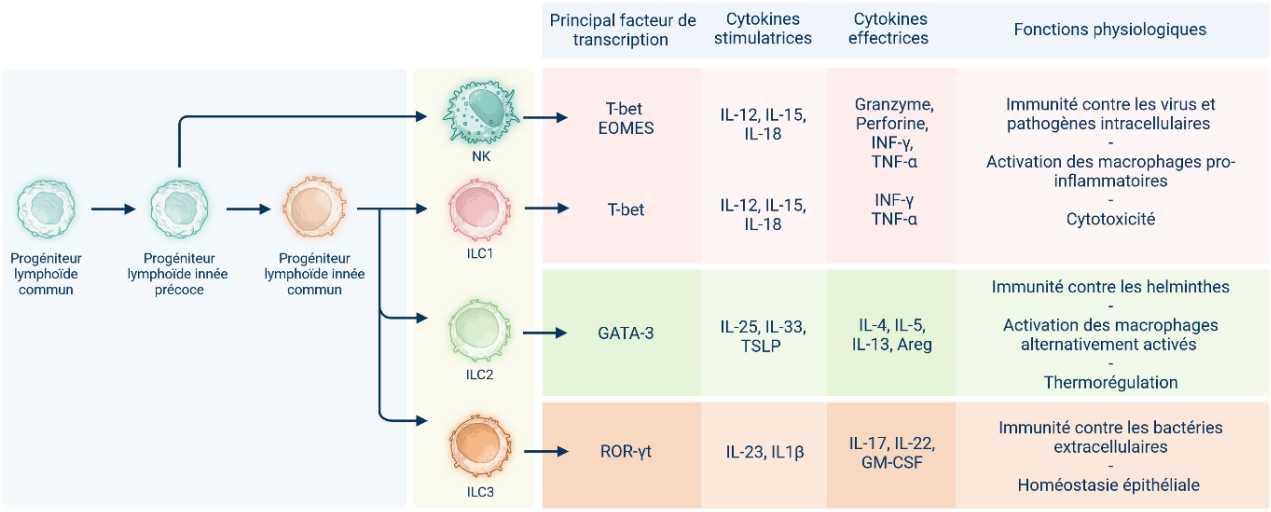


Figure 14 | Caractéristiques générales des sous-types de cellules lymphoïdes innées (ILCs).

Chez l'humain comme chez la souris, ces ILCs possèdent une plasticité importante leur permettant de changer de phénotype en réponse à des signaux environnementaux (Vivier *et al.*, 2018). Chez l'humain, une étude combinant analyses *in vitro* et *in vivo* a montré que les ILC3 peuvent, sous l'effet de l'IL-12, perdre l'expression de RORγt et acquérir un profil ILC1 exprimant T-bet et produisant de l'IFN-γ (Bernink *et al.*, 2015). Cette conversion étant réversible sous l'effet de l'IL-23 et de l'IL-1β. De même, les ILC2 activées à l'IL-1β et exposées à l'IL-12 se différencieraient en ILC1 (Bal *et al.*, 2016; Ohne *et al.*, 2016). Cette plasticité représentent à la fois un mécanisme d'adaptation immunitaire et une cible thérapeutique potentielle, notamment via un contrôle par des cytokines, comme l'IL-12 et l'IL-1β ou par des facteurs de transcription tels que T-bet et RORγt (Spits *et al.*, 2013).

➢ *Composition immunitaire du tissu adipeux*

Depuis près de deux décennies, le SI est reconnu comme un acteur majeur dans les processus métaboliques à la fois locaux et systémiques. Il est désormais évident que celui-ci surveille et réagit à des signaux métaboliques spécifiques, que ce soit dans des situations pathologiques ou non pathologiques, à travers un ensemble de mécanismes aujourd'hui désignés sous le terme d'immunométabolisme. L'expansion du TA, l'activation de la lipolyse ou encore la thermogenèse sans frisson conduisent au recrutement et à l'activation de cellules immunitaires dans des tissus métaboliques clés. Toutefois, certaines conditions, à l'image de l'obésité et des complications qui lui sont liées, activent à la fois les bras innés et adaptatifs du SI (Crewe *et al.*, 2017; Schipper *et al.*, 2012). Au cours de la prise de poids et avec l'excès de nutriments, les adipocytes s'hypertrophient et il existe alors une forte association entre leur taille et leur mort (Strissel *et al.*, 2007). En réponse à cela, des cellules immunitaires pro-inflammatoires entourent les cellules mortes et mourantes et éliminent ainsi les débris de la zone endommagée tout en produisant de nombreuses cytokines inflammatoires. Dans l'obésité, cette production aigüe de cytokines échoue à se résoudre devenant ainsi chronique et entraînant une altération de la signalisation de l'insuline dans les adipocytes, une inflammation accrue, et une détérioration continue du fonctionnement du TA (Crewe *et al.*, 2017; Richard *et al.*, 2000) (*cf. Modifications cellulaires et inflammation chronique*).

- En conditions physiologiques, les **macrophages** sont les cellules immunitaires les plus abondantes dans les TAs humain et murin (Ivanov *et al.*, 2018). Ces phagocytes représentent environ 10 % du nombre total de cellules. Néanmoins, ce pourcentage augmente jusqu'à 50 % chez les individus en situation d'obésité (Weisberg *et al.*, 2003). Les macrophages sont des cellules polyvalentes capables d'adopter des états inflammatoires différents : on parle alors de macrophages M1 ou *classically-activated macrophages*, pour les cellules aux fonctions pro-inflammatoires et de macrophages M2 ou *alternatively-activated macrophages (AAM)* pour celles aux propriétés anti-inflammatoires. Au sein d'un TA sain, les macrophages anti-inflammatoires sécrètent des cytokines telles que l'IL-10, l'IL-4 ou le TGF-β (Mosser & Edwards, 2008) qui maintiennent alors la sensibilité à l'insuline (D. Thomas & Apovian, 2017). En revanche, sous l'effet d'une stimulation à l'IFN-γ ou à des cytokines de la réponse Th1 telles que le TNF-α, ces mêmes cellules adoptent alors une forme pro-inflammatoire. Ces macrophages sécrètent en réponse une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α, l'IL-6 ou encore l'IL-12, entraînant inflammation chronique et résistance à l'insuline (D. Thomas & Apovian, 2017). De plus, les macrophages seraient la principale source cellulaire

de TNF-α dans le TA (Weisberg *et al.*, 2003), cytokine dont le rôle est largement reconnu dans l'obésité et le DT2 (Weisberg *et al.*, 2003; H. Xu *et al.*, 2003).

Dans les TAs murins et humains, les macrophages M1 et M2 partagent certains marqueurs tels que F4/80, CD11b et CD64. Si l'on se focalise sur les macrophages humains, les M1 expriment spécifiquement le CD11c, tandis que pour les M2, ce serait le CD206 (Muir *et al.*, 2022; Wentworth *et al.*, 2010). En 2009, l'étude d'Aron-Wisnewsky *et al.* mettait en évidence une augmentation de macrophages $CD40^+$ (pro-inflammatoires) corrélée à une réduction des macrophages $CD206^+$ dans le TAV par rapport au TAsc (Aron-Wisnewsky *et al.*, 2009). De plus, le TAV étant la principale localisation de la réponse inflammatoire durant l'obésité, l'infiltration des macrophages y est deux fois plus importante que celle du TAsc.

Néanmoins, la description des macrophages M1 et M2, basée sur une polarisation *in vitro,* ne reflète pas entièrement les phénotypes macrophagiques adipeux (Schleh *et al.*, 2023). *In vivo*, il existe un large spectre d'états de polarisation des macrophages, pouvant exprimer simultanément des gènes ou protéines des deux phénotypes M1 et M2 (Coats *et al.*, 2017; Kratz *et al.*, 2014; Schleh *et al.*, 2023). En 2010, des travaux sur la composition macrophagique du TAsc obèse ont mis en évidence une population de macrophages $CD206^+$ $CD11c^+$ positivement associée à la résistance à l'insuline (Muir *et al.*, 2022; Wentworth *et al.*, 2010). Ainsi, dans le contexte du TA et de l'obésité, on parle alors de macrophages métaboliquement activés (MMA) dont la polarisation est induite par des signaux du microenvironnement adipeux (lipides, glucose, hormones) (Coats *et al.*, 2017; Schleh *et al.*, 2023). Des travaux ont montré que la polarisation de ces MMA était caractérisée par l'expression de gènes impliqués dans la gestion des lipides (Kratz *et al.*, 2014). Des recherches ont par exemple mis en évidence des MMA $CD9^+$ contenant des taux élevés de lipides et exprimant des gènes liés au métabolisme lipidique lysosomal-dépendant. (Hill *et al.*, 2018). Des transferts adoptifs chez l'animal ont montré que les MMA $CD9^+$ étaient associés à l'inflammation induite au cours de l'obésité. D'après Schleh *et al.,* les MMA sont supposés contribuer à l'absorption et au stockage des lipides, dans le but de limiter l'accumulation lipidique ectopique (Schleh *et al.*, 2023).

En plus de leur implication dans le traitement des lipides, ces macrophages peuvent se rassembler autour des adipocytes et former des structures en couronne (*crown-like structures*) (Yao *et al.*, 2022), facilitant ainsi la récupération des lipides autour des adipocytes morts. Ces structures, souvent observées en réponse à l'accumulation excessive de graisse dans l'obésité, sont associées à des processus inflammatoires. Elles indiquent alors une dysfonction du TA et contribuent aux complications métaboliques de la pathologie telles que la résistance à l'insuline et l'inflammation chronique (Lumeng *et al.*, 2008). Plus récemment, des études de *single-cell* ont mis en évidence des *lipid-associated macrophages* (LAM) dans le TA, notamment dans le contexte de l'obésité (Jaitin *et al.*, 2019). Ces LAM sont ainsi caractérisés par l'expression de marqueurs tels que TREM2, CD9 et CD36, et présentent un profil transcriptionnel orienté vers la gestion du stress lipidique, la phagocytose des débris cellulaires et la régulation des voies métaboliques (Kratz *et al.*, 2014). Les LAM sont fréquemment localisés à proximité des structures en couronne, suggérant un rôle fonctionnel complémentaire dans la clairance des adipocytes morts et la modulation de la réponse inflammatoire locale (Stansbury *et al.,* 2023). De plus ces macrophages aideraient à l'absorption et au stockage des lipides dans les TAs afin de limiter l'accumulation ectopique de lipides (Schleh et al., 2023). Dans une étude

transcriptomique en *single-cell*, sur du TA humain, Hildreth *et al.* ont mis en évidence plusieurs populations macrophagiques : des macrophages périvasculaires exprimant LYVE1, des LAM caractérisés par l'expression de CD9, TREM2 et LPL, ainsi qu'une troisième population qu'ils ont nommés macrophages inflammatoires (MI), marquée par l'expression de CCL3L1, TNF et CXCL3 (Hildreth et al., 2021a). En cytométrie en flux, les chercheurs ont montré que les macrophages $CD206^{+}CD11c^{-}$ correspondent majoritairement aux périvasculaires, les MI à la population $CD206^{-}CD11c^{+}$, et les LAMs se retrouvent parmi les cellules double-positives $CD206^{+}CD11c^{+}$. Leur étude montre également que, dans un contexte d'obésité, les monocytes classiques, les LAM et les MI, sont présents en plus grand nombre dans le TA que les macrophages périvasculaires. Dans le TA sain, les monocytes auraient tendance à se différencier en périvasculaires alors que dans l'environnement inflammatoire et hypoxique du TA obèse, les monocytes se différencieraient plutôt en MI et les macrophages périvasculaires en LAM (Hildreth et al., 2021a).

- D'autres populations de cellules immunitaires innées résident également dans le TA. Celles-ci comprennent les **éosinophiles**, les **mastocytes**, les **neutrophiles**, les **DCs** et ou encore **ILCs**.

La contribution des éosinophiles et des mastocytes à l'homéostasie ou à la dysfonction du TA est encore controversée. Les **mastocytes** sont connus pour leur rôle dans plusieurs maladies inflammatoires et fibrosantes. Dans le TA, ces cellules seraient localisées préférentiellement au niveau des dépôts fibrosés (Divoux *et al.*, 2012). Les mastocytes $tryptase^{+}$ sont par ailleurs surreprésentés dans le TA omental de patients en situation d'obésité (Divoux *et al.*, 2012). Néanmoins, une étude a montré que les nombres de mastocytes et de progéniteurs mastocytaires étaient plus faibles chez les patients atteints de DT2 (dans les TAsc et omental) par rapport aux sujets prédiabétiques et non diabétiques (Lopez-Perez *et al.*, 2021).

Les **neutrophiles** sont, chez la souris, parmi les premières cellules à infiltrer le TA lors d'un régime riche en graisses (Komi *et al.*, 2020; Wensveen *et al.*, 2015). Recrutés dans le TA via l'IL-8 des adipocytes et le CXCL2 sécrété par les macrophages, ils libèrent en réponse diverses cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8, le CCL2/MCP-1, la MMP-9 et la myélopéroxydase, qui aggravent l'état inflammatoire (Chmelar *et al.*, 2013; Rouault *et al.*, 2013). Les neutrophiles libèrent également de l'élastase, jouant un rôle clé dans l'induction de la résistance à l'insuline (Wensveen *et al.*, 2015). Une déficience en élastase ou une inhibition chimique de l'enzyme entraînent une meilleure sensibilité à l'insuline chez les souris sous régime riche en graisse comparé aux sauvages (Talukdar *et al.*, 2012). Les **DCs**, sont souvent regroupées dans les TAs au sein de clusters de macrophages en raison d'une expression partagée du marqueur CD11c. Des études ont mis en évidence que le recrutement de ces cellules dans le TA, médié par les chimiokines CCR2 et CCR7, serait augmenté chez les souris sous HFD et associé positivement à l'IMC et à la résistance à l'insuline chez l'humain (Bertola *et al.*, 2012; Stefanovic-Racic *et al.*, 2012; K. W. Cho *et al.*, 2016). Les fonctions de ces DCs sont à l'heure actuelle encore mal comprises, mais étant significativement augmentées dans l'obésité, elles contribueraient à l'inflammation du TA en régulant l'accumulation et l'activation de macrophages et des LT (Sundara Rajan & Longhi, 2016).

Les ILCs constituent d'autres composants innés de la FVS, dont le rôle dans l'immunométabolisme connait aujourd'hui un grand intérêt. Il est suggéré que les ILCs soient des régulateurs et des répondeurs de la réponse inflammatoire dans le contexte de l'obésité (Schleh *et al.*, 2023). Les ILC1 et les NK sont activées via l'IL-12, qui stimule alors la libération d'IFN-γ. L'activation de ces cellules par des cytokines locales agit comme une réponse en cascade qui favorise un environnement pro-inflammatoire dans l'obésité (**Figure 15**). En effet, de nombreuses études ont montré l'implication des ILC1 adipeuses dans les dysfonctions métaboliques telles que le DT2. Chez la souris, l'IFN-γ dérivé de ces ILCs permettrait la polarisation des macrophages en phénotype pro-inflammatoire afin de promouvoir la résistance à l'insuline associée à l'obésité (O'Sullivan *et al.*, 2016). Pour les NK il est suggéré que leur recrutement, leur prolifération et leur activation sont stimulés par des produits sécrétoires dérivés des macrophages résidents (Bonamichi & Lee, 2017). Ces cellules NK recrutées dans le TA pourraient stimuler l'expression de MCP-1, ce qui entraînerait à son tour une infiltration de macrophages (Roda *et al.*, 2006).

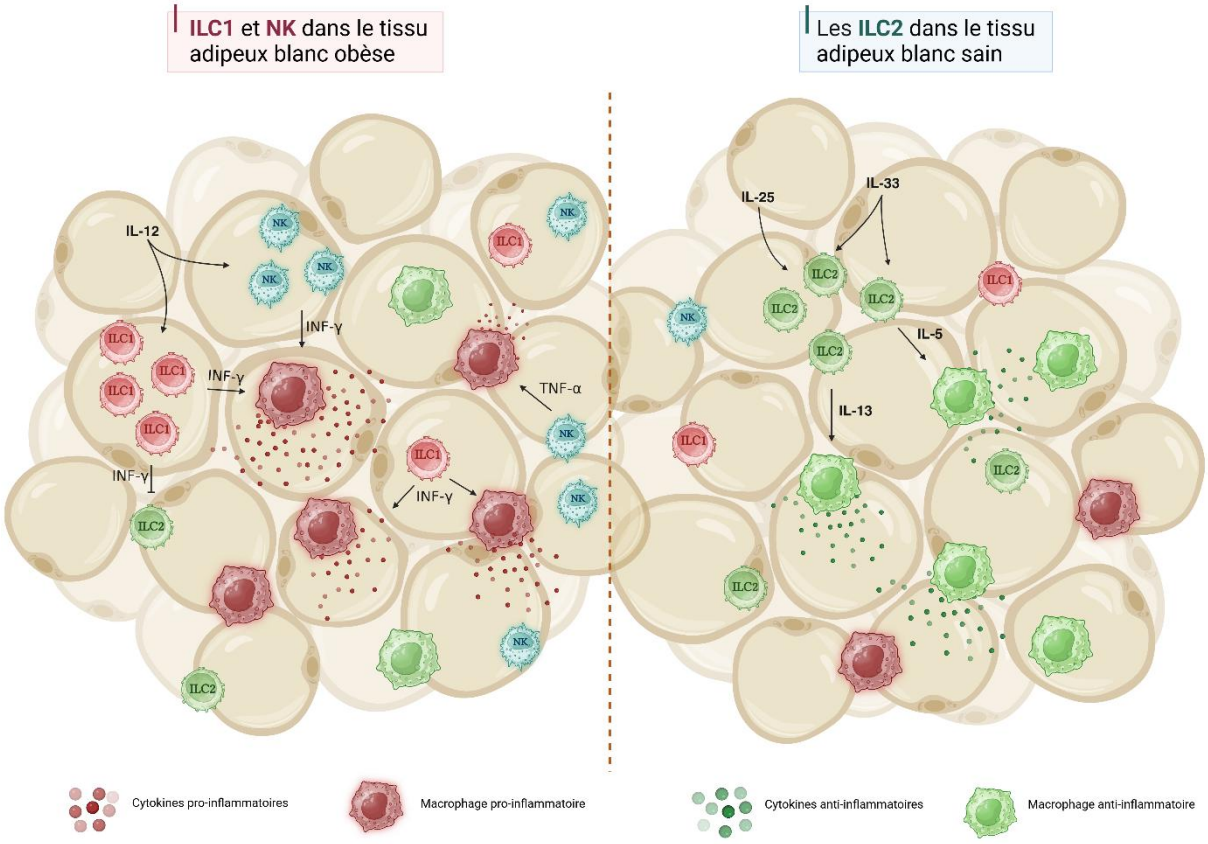


Figure 15 | Les cellules lymphoïdes innées (ILC) dans les tissus adipeux sain et obèse.

Dans le TA blanc sain (droite), les ILC2 favorisent un environnement anti-inflammatoire de type 2 en recrutant et induisant la différenciation de macrophages anti-inflammatoires. Ces ILC2 sont à l'inverse réduites dans le TA obèse (gauche), tandis que les ILC1 et les NK sont augmentées. La production d'IFN-γ dépendante de l'IL-12 par ces cellules induit le recrutement et l'activation de macrophages pro-inflammatoires. Ces macrophages sécrètent à leur tour des cytokines (IL-6, TNF-α…) qui favorisent un environnement pro-inflammatoire de type Th1, qui encourage le développement d'une intolérance au glucose et mène au DT2.

Au contraire, les ILC2 sont associées à l'immunité Th2 et contribuent à l'homéostasie du TA (Brestoff *et al.*, 2015). Elles y sécrètent de l'IL-5 et de l'IL-13, connues pour maintenir la sensibilité à l'insuline chez les souris maigres par le recrutement d'éosinophiles grâce à l'IL-5 et le maintien des macrophages M2/ anti-inflammatoires par l'IL-13 (Molofsky *et al.*, 2013;

Nussbaum *et al.*, 2013). En effet, ces cellules lymphoïdes activées par l'IL-33 et l'IL-25 se retrouvent diminuées chez les individus en situation d'obésité (humain et rongeur) (Brestoff *et al.*, 2015) (**Figure 15**). Les ILC2 pourraient également contrôler certaines caractéristiques de l'équilibre énergétique chez la souris, car les animaux déficients en IL-33 (possédant des ILC2 fonctionnelles réduites) développent un gain de poids spontané et de masse grasse sur un régime pauvre en graisses (Brestoff *et al.*, 2015). De manière intéressante, les ILC2 favorisent la différenciation des précurseurs adipocytaires vers un phénotype beige chez les souris, suggérant un rôle potentiel dans la régulation de l'homéostasie tissulaire par des signaux environnementaux, notamment déclenchés par l'IL-33. Nous reviendrons sur le lien entre ces ILC2 et le phénomène de beiging au prochain chapitre (*cf. Le tissu adipeux beige*).

Enfin, les **lymphocytes** représentent entre 8 et 16 % des cellules de la FSV. Parmi eux, les LT représentent la plus grande proportion de cellules adaptatives dans le TA, avec une prédominance des **LT CD4$^+$** et **CD8$^+$**. Ils y jouent respectivement un rôle dans l'homéostasie des TAs sains et dans l'inflammation des TAs pathologiques lors de l'obésité. Dans les TAs sains, le ratio de LT CD4$^+$ sur CD8$^+$ est de 3 pour 1. Cependant, avec l'obésité, la population de LT cytotoxiques s'accroit, entrainant une augmentation du ratio des cellules Th1 pro-inflammatoires au détriment des cellules Th2 (Nishimura *et al.*, 2009; Schleh *et al.*, 2023; Strissel *et al.*, 2010) et des Treg anti-inflammatoires (Feuerer *et al.*, 2009). Ces cellules initient alors une cascade inflammatoire pouvant précéder l'infiltration des macrophages. Nishimura *et al.* ont démontré une infiltration de LT CD8$^+$ dès les premiers stades du développement de l'obésité (Nishimura *et al.*, 2009). Ils ont également montré que le transfert de cellules T CD8$^+$ dans des souris obèses déficientes en CD8 induit l'infiltration de macrophages M1, entraînant une inflammation du TA. Cette augmentation des populations pro-inflammatoires serait plus fréquente dans les TAV que dans les TAsc. Dans une étude récente en *single cell RNAseq*, sur le TAV murin, les auteurs ont mis en évidence l'existence de deux populations distinctes de **Treg** dans ce tissu : des Treg typiques ST2$^+$, enrichies chez les mâles, et une nouvelle population Treg CXCR3$^+$, enrichies chez les femelles (Torres *et al.,* 2024). Cette étude a montré qu'une différenciation des Treg ST2$^+$, est favorisée par GATA-3, PPAR-γ et l'IL-33, et réprime les Treg CXCR3$^+$, tandis que ces derniers se différencient sous l'effet de T-bet et de l'INF-γ. Leur analyse a également souligné l'impact positif des cellules ST2$^+$ sur l'homéostasie du glucose et les effets limitants l'inflammation des CXCR3$^+$ dans le TAV des souris maigres (Torres *et al.,* 2024). Cette régulation de l'homéostasie métabolique par les Treg a également été mise en évidence dans le TAV épididymaire murin. En utilisant des modèles *in vitro* de culture cellulaire et de transfert *in vivo* des Treg dans le TAV épididymaire, une étude a constaté une diminution des progéniteurs adipocytaires (G. Wang *et al.*, 2024). Les auteurs ont cultivé des précurseurs adipeux avec un milieu conditionné de Treg épididymaires, et ont montré une diminution de la différenciation des précurseurs en adipocytes matures via une signalisation à l'oncostatine M (protéine de la famille de l'IL-6). Une déplétion de l'oncostatine M dans les Treg ou de son récepteur sur les précurseurs réduisait notamment la sensibilité à l'insuline, montrant ainsi le contrôle exercé par les Treg sur les précurseurs adipeux.

Parmi les LT, il existe aussi une population nommée LTγδ, représentant une proportion importante des LT totaux dans le TA (Zúñiga *et al.*, 2010; Guzik *et al.*, 2017). Des études ont mis en évidence une augmentation de leur nombre dans le TA murin obèse ainsi que la sécrétion cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17 et le TNF-α (Mehta *et al.*, 2015; Bruno *et al.*,

2022). L'IL-17 libérée par cette population lymphocytaire limiterait adipogenèse et tolérance au glucose et stimulerait la prolifération de macrophages M1 (Mehta *et al.*, 2015; Zúñiga *et al.*, 2010). Chez l'humain, il est possible d'observer une diminution des LTγδ circulants chez les individus en situation d'obésité, tandis que leur taux augmente dans les TAV tels que le TA omental (Kohlgruber *et al.*, 2018). Concernant la population lymphocytaire B, des études ont montré qu'ils favorisent le recrutement des macrophages au sein du TA et la production de TNF-α chez les souris sous HFD (Ying, Wollam, *et al.*, 2017). Chez l'humain, ces cellules semblent augmentées au cours de l'obésité et joueraient également un rôle délétère, pro-inflammatoire et insulinorésistant (DeFuria *et al.*, 2013). Certaines cellules à l'interface entre immunité innée et adaptative sont également présentes dans le T, telles que les cellules **iNKT** (*invariant natural killer T*) et **MAIT** (*mucosal-associated invariant T cells*). Ces deux types cellulaires représentent des sous-types de LT non-conventionnels exprimant des récepteurs T (TCR) semi-invariants (Le Bourhis et al., 2011; Magalhaes et al., 2015). Ces cellules jouent notamment un rôle important dans les contextes d'infections bactériennes et virales (Le Bourhis et al., 2010; Q. Lin et al., 2020; Loh et al., 2016). Les iNKT, reconnaissent les antigènes lipidiques, tel que l'α-galactosylcéramide, présentés par la molécule CD1d et non reconnus par les LT conventionnels (Baranek et al., 2022). Dans le TA sain, les iNKT exercent des fonctions régulatrices qui favorisent la sécrétion d'interleukines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et l'IL-4, favorisant une polarisation anti-inflammatoire des macrophages résidants (Lynch, 2014; Magalhaes et al., 2015). Chez le rongeur, l'absence de cellules iNKT a été associée à une accumulation de macrophages pro-inflammatoires et à une dysfonction métabolique, mettant en évidence leur rôle protecteur dans les dépôts adipeux (Lynch et al., 2012). De plus, dans le TA blanc des souris obèses, la fréquence des iNKT est réduite tandis que la perte de poids inverse cette fréquence (Lynch et al., 2012). Les cellules MAIT quant à elles, et reconnaissent des métabolites dérivés de la vitamine B2 via la molécule MR-1 (*MHC-class I related protein 1*) (Treiner et al., 2003). Chez l'humain, la fréquence des MAIT circulants est diminuée chez les patients en situation d'obésité et atteints de DT2 par rapport aux sujets sains (Carolan et al., 2015; Toubal & Lehuen, 2021). Cette fréquence est négativement corrélée à l'IMC et à la sensibilité à l'insuline (Carolan et al., 2015; Toubal & Lehuen, 2021). De plus, toujours dans l'obésité, chez l'humain comme chez la souris, leur fréquence devient plus élevée dans le TA que dans le sang, ce qui suggère un recrutement vers le TA (Carolan et al., 2015; Magalhaes et al., 2015; Toubal et al., 2020). Dans le sang, les MAIT expriment les marqueurs d'activation CD25 et CD69 (Carolan et al., 2015 ; Li et al., 2018 ; Magalhaes et al., 2015) tandis que dans le TA, ils expriment davantage le marqueur de maturation CD44, et moins le CD69, impliquant une rétention dans le tissu (Mueller & Mackay, 2016; Toubal & Lehuen, 2021). Leur phénotype en circulation change et devient alors inflammatoire, avec une augmentation de la sécrétion de l'IL-17 et une diminution de l'IFNγ et du TNF (Carolan et al., 2015; Y. Li et al., 2018; Toubal & Lehuen, 2021), et cytotoxique avec la production de granzyme B (Zinser et al., 2018). Dans le TA, la production d'IL-17 par les MAIT est encore plus élevée qu'en circulation, tandis que la production d'IL-10 est réduite (Carolan et al., 2015; Magalhaes et al., 2015).

Nous avons ainsi parcouru dans cette partie les divers rôles des cellules de la fraction stromale au sein des TAs pathologiques et non pathologiques. Il semble par conséquent crucial de tenir compte de leur présence et des interactions dynamiques entre ces différentes populations lors de l'étude des TAs.

f) Les vésicules extracellulaires (VEs) dans le tissu adipeux

➢ *Généralités sur les VEs*

Selon la *Société internationale des vésicules extracellulaires* (*ISEV*) les **vésicules extracellulaires** (VEs) sont des particules dont la taille varie du nanomètre au micromètre, délimitées par une bicouche lipidique (Welsh *et al.*, 2024). Les VEs sont généralement classées en trois principales catégories : **exosomes**, **microvésicules** (MVs) et **corps apoptotiques** (van der Pol *et al.*, 2012) (**Figure 16**).

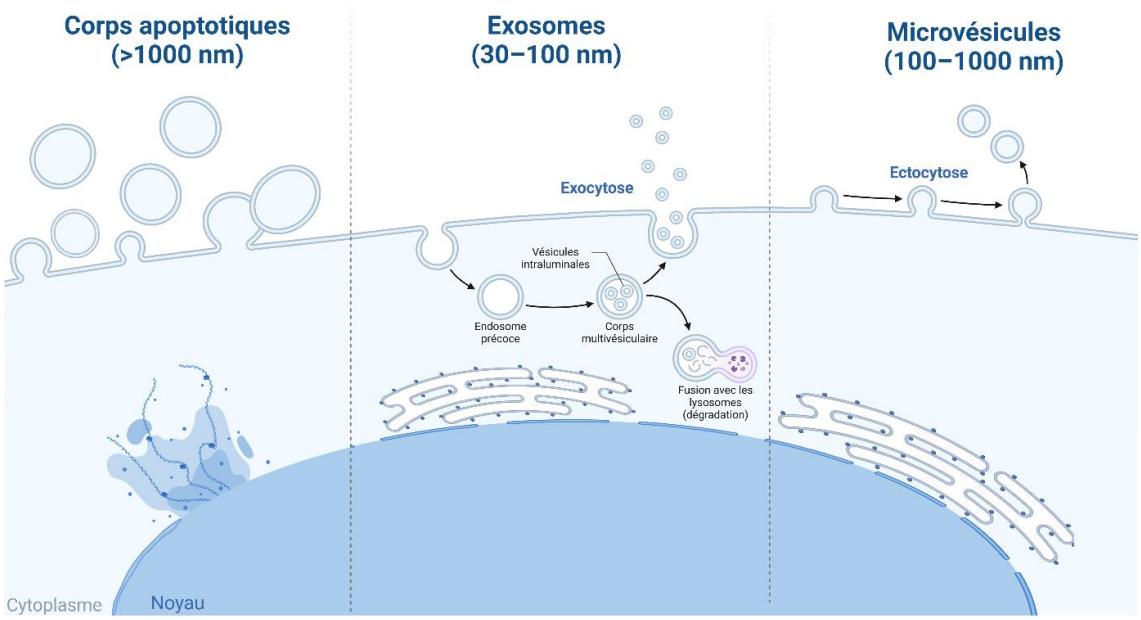


Figure 16 | Biogenèse des vésicules extracellulaires.

Le terme **exosome** désigne une population homogène de VEs dont le diamètre est compris entre 30 et 100 nm. Ces petites VEs sont générées sous forme de vésicules intraluminales (ILVs) à l'intérieur des endosomes durant leur maturation en endosomes multivésiculaires (MVEs) (Harding *et al.*, 1984; B. T. Pan *et al.*, 1985). Ces MVE peuvent alors soit fusionner avec les lysosomes (dégradation) ou avec la membrane plasmique afin de libérer les ILVs dans le milieu extracellulaire sous forme d'exosomes (Colombo *et al.*, 2014) (**Figure 16**). Le processus de formation des exosomes requiert des machineries de tri spécifiques qui regroupent dans un premier temps leur contenu sur des microdomaines de la membrane des MVEs, entraînant un bourgeonnement vers l'intérieur et une fission de petites vésicules membranaires contenant du cytoplasme séquestré. La cellule peut utiliser différentes manières de production d'exosomes. La machinerie ESCRT permet la fission de la membrane (Hurley, 2008). Cette machinerie agit de manière progressive, les sous-unités ESCRT0 et ESCRTI regroupent des cargaisons transmembranaires ubiquitinylées sur des microdomaines de la membrane des MVEs et recrutent, via ESCRTII, les sous-complexes ESCRTIII qui effectuent le bourgeonnement et la fission de ce microdomaine (Hurley, 2008) (**Figure 17**). Certaines protéines de la famille des tétraspanines régulent également le tri endosomal indépendamment de ESCRT. CD63, protéine particulièrement enrichie à la surface des exosomes, a par exemple été mise en évidence dans le tri endosomal dans les mélanocytes (van Niel *et al.*, 2011). Des études ont également montré que les tétraspanines CD81, CD82 et CD9 seraient aussi directement impliquées dans le tri de

diverses cargaisons vers les exosomes (Buschow *et al.*, 2009; Chairoungdua *et al.*, 2010). Ces tétraspanines s'organisent en formant des clusters formant des plateformes membranaires dynamiques avec d'autres tétraspanines et différentes protéines transmembranaires et cytoplasmiques, agissant probablement dans la formation des microdomaines qui bourgeonnent (Charrin *et al.*, 2014; van Niel *et al.*, 2018). Une étude a notamment montré que CD81 chez l'homme aurait une structure en forme de cône capable d'accueillir du cholestérol (Zimmerman *et al.*, 2016). Le regroupement de plusieurs tétraspanines en forme de cône pourrait alors induire un bourgeonnement vers l'intérieur du microdomaine dans lequel elles sont enrichies (Zimmerman *et al.*, 2016) (**Figure 17**). Tous ces mécanismes de biogenèse des exosomes (dépendants et indépendants de ESCRT) peuvent varier en fonction de leur contenu et du type cellulaire d'origine (van Niel *et al.*, 2018).

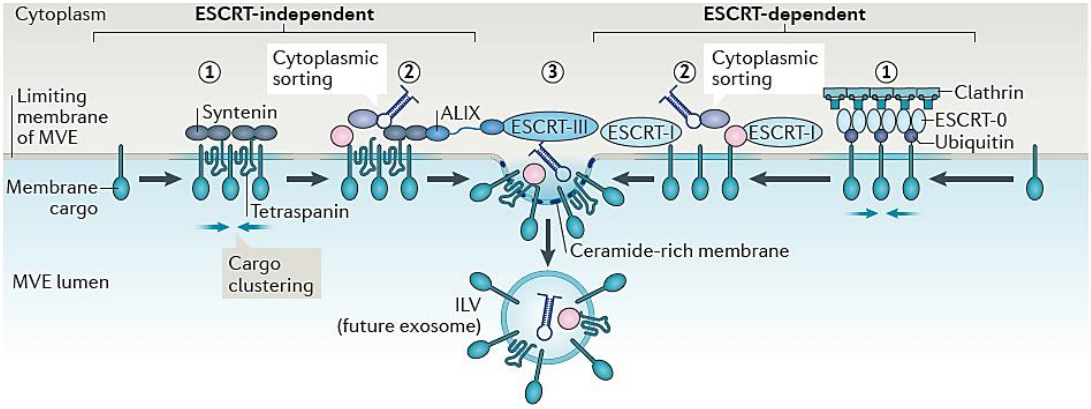


Figure 17 | Processus de formation des exosomes dépendant et indépendant de la machinerie ESCRT (adapté de Van Niel *et al.*, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2018).

Ces étapes sont cruciales pour la biogenèse des exosomes, qui seront ensuite libérés par exocytose du corps multivésiculaire fusionnant avec la membrane plasmique.

Les **MVs**, plus grandes, ont des tailles allant de 100 nm à 1 µm de diamètre. Dans certains cas, ces particules peuvent être encore plus grandes et atteindre jusqu'à 10 µm de diamètre dans le cas des oncosomes (Di Vizio *et al.*, 2009). Contrairement aux exosomes issus de la voie endolysosomale, les MVs sont formées par bourgeonnement vers l'extérieur et fission de la membrane plasmique, suivis de la libération des vésicules dans l'espace extracellulaire (Tricarico *et al.*, 2017; van der Pol *et al.*, 2012) (**Figure 16**). Dans le cas des MVs, les machineries sont différentes. On parle de réarrangement de la composition lipidique et protéique de la membrane plasmique, ainsi que de changements locaux des niveaux de Ca^{2+} (Minciacchi *et al.*, 2015). En effet, l'activation de machineries enzymatiques dépendantes du $Ca^{2+,}$ entraîne le réarrangement des phospholipides à la membrane cellulaire, notamment l'exposition de la phosphatidylsérine de la couche interne vers la surface de la cellule, ce qui provoque une courbure physique de la membrane vers l'extérieur (Al-Nedawi *et al.*, 2008; Piccin *et al.*, 2007). En parallèle avec le réarrangement du cytosquelette d'actine sous-jacent, ce processus favorise le bourgeonnement de la membrane et la formation des MVs (Piccin *et al.*, 2007) (**Figure 18**).

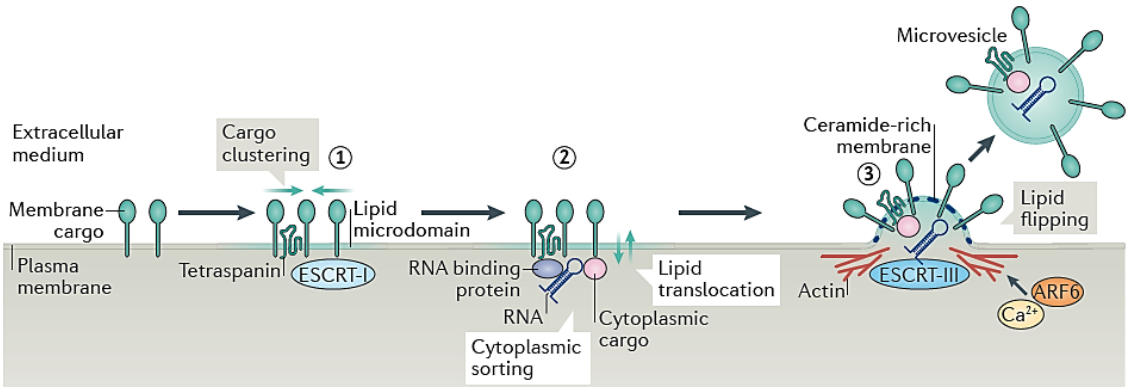


Figure 18 | Processus de formation des microvésicules
(adapté de Van Niel *et al.*, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2018).

Enfin, les vésicules libérées par les cellules subissant une apoptose sont appelées **corps apoptotiques** et possèdent un diamètre allant de 1 à 5 µm. Pour ces VEs, l'activation de l'apoptose déclenche la formation de protubérances de la membrane plasmique et la fragmentation nucléaire (Oberhammer *et al.*, 1994). Les corps apoptotiques libérés dans l'espace extracellulaire sont généralement éliminés par des cellules phagocytaires pour prévenir les dommages aux cellules adjacentes. Les corps apoptotiques, moins étudiés que les exosomes et les MVs, auraient des implications moins importantes dans la communication intercellulaire (Lauriane Y. M. Michel, 2023).

Toutes les cellules sont capables de sécréter les différents types de VEs et ce processus est conservé à travers l'évolution puisqu'on le retrouve aussi bien chez les bactéries, l'humain ou encore les plantes (Davis *et al.*, 2016; Deatherage & Cookson, 2012; van Niel *et al.*, 2018). Il est désormais bien établi que les VEs interviennent dans la communication intercellulaire, permettant aux cellules d'échanger de nombreux signaux. En effet, les VEs exercent leurs fonctions biologiques en transportant divers types de cargos bioactifs tels que des protéines, des lipides ou encore des acides nucléiques (ARNm, miARNs, ADN) vers leurs cellules cibles (Clement *et al.*, 2020; Hartwig *et al.*, 2019; Valadi *et al.*, 2007) (**Figure 19**).

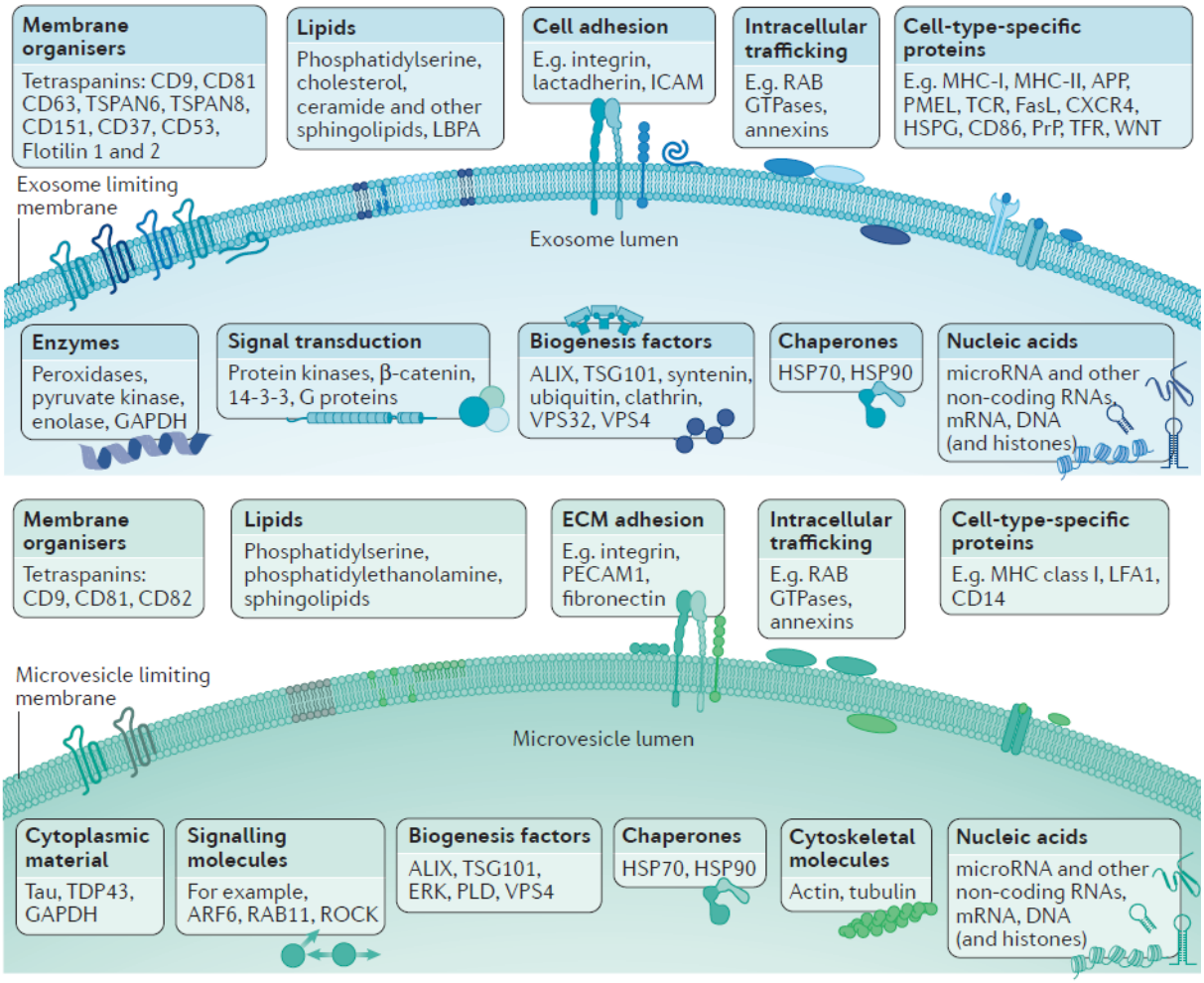


Figure 19 | Cargos membranaires et cytoplasmiques identifiés dans les exosomes (**haut**) et des microvésicules (**bas**) (d'après Van Niel *et al., Nature Reviews,* 2018).

La nature et l'abondance des contenus des VEs sont spécifiques aux types cellulaires et sont souvent influencées par plusieurs facteurs tels que : l'état physiologique ou pathologique de la cellule d'origine, les stimuli qui modulent leur production/libération et les mécanismes moléculaires qui conduisent à leur biogenèse (Kalra *et al.*, 2016; Minciacchi *et al.*, 2015). Les cargos des VEs sont contrôlés via différents mécanismes qui contribuent à leur ciblage, qu'ils soient solubles ou associés à la membrane. Pour les exosomes, la séquestration des protéines solubles dans les ILVs peut résulter de l'interaction de protéines chaperonnes telles que HSP70 et HSC70, que l'on retrouve dans les exosomes provenant de la plupart des types cellulaires (Géminard *et al.*, 2004; Théry *et al.*, 2001). Pour les MVs, les lipides et autres contenus associés à la membrane se localisent aux sites de bourgeonnement grâce à leur affinité pour les radeaux lipidiques (Shen *et al.*, 2011; J.-M. Yang & Gould, 2013). Les protéines cytoplasmiques sont quant à elles localisées au site de bourgeonnement grâce à leur ancrage aux lipides de la membrane plasmique (Shen *et al.*, 2011; J.-M. Yang & Gould, 2013). En ce qui concerne les acides nucléiques, des études ont montré que miARNs sont triés différemment vers les exosomes en fonction de la présence de motifs spécifiques dans leur séquence (Villarroya-Beltri *et al.*, 2013). À ce jour, les mécanismes de chargement passif et actif des ARN dans les VEs ne sont pas encore totalement compris (Mateescu *et al.*, 2017).

Les VEs possèdent à leur surface les mêmes protéines transmembranaires que leur cellule d'origine, elles sont ainsi capables d'agir comme des ligands qui se lient aux récepteurs de

surface des cellules cibles pour initier une signalisation cellulaire (Hawari *et al.*, 2004; Mallegol *et al.*, 2007). Cela sous-entend, entre autres, que la cellule qui sécrète les VEs peut également en être la receveuse, générant alors une réponse autocrine (Matsumoto *et al.*, 2017). Plus encore, une fois libérées dans l'espace extracellulaire, ces VEs peuvent délivrer leur contenu aux cellules réceptrices. Cette communication nécessite un ancrage des VEs à la membrane plasmique de la cellule receveuse, suivi d'une internalisation des VEs soit par endocytose, soit par leur fusion avec la cellule. Les interactions entre VEs et cellules cibles peuvent être médiées par différents acteurs tels que les tétraspanines, les intégrines, les lipides, les lectines, les protéoglycanes à héparane sulfate (CD44) ainsi que les composants de la matrice extracellulaire (fibronectine et la laminine) (Leiss *et al.*, 2008; Morelli *et al.*, 2004; Purushothaman *et al.*, 1652; Sung *et al.*, 2015).

➢ *Les VEs dans le tissu adipeux*

Bien que le TA soit composé en majorité de cellules, son sécrétome est également enrichi en VEs. On parle alors de vésicules extracellulaires dérivées du TA (**AdEVs - *adipose derived extracellular vesicles***). En effet, la présence de VEs dans le milieu de culture d'explants de TA a été démontrée à la fois dans des études murines et humaines (Deng *et al.*, 2009; Kranendonk *et al.*, 2014). Dans le TA, les adipocytes matures, qu'ils soient beiges, bruns ou blancs (*cf. Les différentes couleurs du TA*), les macrophages, les cellules souches dérivées du TA (ADSCs) et les cellules endothéliales, sont connues pour libérer des VEs (Chen *et al.*, 2016; Connolly *et al.*, 2018; Deng *et al.*, 2009; Kranendonk *et al.*, 2014).

Les premières études ayant montré l'existence des AdEVs exploraient leur impact sur le métabolisme systémique en injectant des VEs purifiées chez la souris (Crewe, 2022; Deng *et al.*, 2009). Ces études ont mis en évidence leur rôle crucial dans la communication intercellulaire et inter-organe, par voies paracrine ou endocrine, pour influencer la modulation du TA ainsi que l'homéostasie systémique. En effet, les AdEVs sont activement impliquées dans la modulation du microenvironnement immunitaire, l'adipogenèse, le beiging du TA blanc, la libération d'adipokines, le remodelage tissulaire, le métabolisme énergétique ou encore la sensibilité à l'insuline (Y. Pan *et al.*, 2019; Thomou *et al.*, 2017; Ying, Riopel, *et al.*, 2017; Y. Zhang *et al.*, 2015; H. Zhao *et al.*, 2018). Par exemple, en utilisant un modèle murin de *knock-out* (KO) spécifique aux adipocytes pour la cavéoline 1, Crewe *et al.*, ont montré que les cellules endothéliales pouvaient transférer la protéine, via des VEs, aux adipocytes (Crewe *et al.*, 2018). De plus, ce transfert semblait être affecté par l'état métabolique des souris, car la sécrétion de VEs par les cellules endothéliales augmentait en conditions de jeûne, via la signalisation du glucagon tandis qu'au contraire cet effet était bloqué lorsque les animaux étaient soumis à un régime HFD (Crewe *et al.*, 2018). Une autre étude, utilisant des souris sous HFD traitées avec des VEs dérivées d'adipocytes blancs ou beiges, a mis en évidence une amélioration de la stéatose hépatique et de la tolérance au glucose chez les animaux ayant reçu des VEs dérivées d'adipocytes beiges (Jung *et al.*, 2020). Les résultats de ces études suggèrent ainsi que le contenu libéré dans les VEs varie en fonction du type d'adipocyte et de l'état métabolique.

Parmi les cellules adipeuses, les macrophages produisent un grand nombre de VEs afin de moduler les réponses inflammatoires et l'homéostasie métabolique. *In vitro*, des études ont mis en évidence la sécrétion d'exosomes macrophagiques dans le milieu de culture de lignées

THP-1 humaines (De Silva *et al.*, 2018; H. Zhao *et al.*, 2018). Deng *et al.* ont mis en évidence que les AdEVs pouvaient médier l'activation des macrophages (Deng *et al.*, 2009). Dans leur étude, ils ont montré que la protéine RBP4, enrichie dans les AdEVs obèses, induisait la production de TNF-α et d'IL-6 dans les macrophages et serait corrélée au développement de la résistance à l'insuline (Deng *et al.*, 2009). *In vitro*, les exosomes sécrétés par des macrophages activés au LPS favoriseraient effectivement l'expression des gènes liés à l'inflammation dans les adipocytes (De Silva *et al.*, 2018). D'autres chercheurs ont montré que lorsque des macrophages THP-1 sont polarisés en phénotypes M1 ou M2, les exosomes dérivés des macrophages M1 altèrent la signalisation de l'insuline dans les adipocytes humains, tandis que ceux provenant des macrophages M2 améliorent la signalisation de l'insuline et l'absorption du glucose dans les adipocytes (H. Zhao *et al.*, 2018). La même équipe a également démontré, chez la souris, que les VEs adipocytaires issues d'animaux nourris sous HFD entraînaient, *in vitro*, la polarisation des macrophages dérivés de la moelle osseuse vers le phénotype pro-inflammatoire (Y. Zhang *et al.*, 2016). Ce processus serait médié par le miR-155, qui inhibe l'expression protéique de SOCS1, entraînant ainsi la suppression de la voie STAT6 (facteur de transcription lié à la polarisation M2) (Y. Zhang *et al.*, 2016). Par ailleurs, il a été observé que les macrophages adipeux libèrent des VEs contenant des miARN, capables d'affecter le métabolisme systémique lorsqu'ils sont injectés chez des souris (Ying, Riopel, *et al.*, 2017). De nombreuses autres études ont montré que les AdEVs seraient capables d'exercer leurs actions métaboliques dans des organes distaux (foie, muscle squelettique, pancréas, cerveau) notamment par l'envoi d'informations génétiques, principalement sous forme de miARN (Z. Huang & Xu, 2021).

Plusieurs études ont révélé que les interactions entre AdEV et miARN changent significativement au cours du développement de l'obésité et de ses comorbidités, et pourraient servir de biomarqueurs pour le diagnostic de ces maladies (Thomou *et al.*, 2017; Zhou & Tan, 2020). Un certain nombre de miARN sécrétés par les AdEVs ont déjà été étudiés. En 2020, Li *et al.* ont démontré que les AdEVs favorisaient la résistance à l'insuline associée à l'obésité via le miR-222 (D. Li *et al.*, 2020). Ce miARN affectait notamment le foie et les muscles squelettiques des souris sous HFD, en inhibant l'expression d'IRS-1, protéine clé impliquée dans la signalisation métabolique initiée par l'insuline et ses récepteurs (Araki *et al.*, 1994; D. Li *et al.*, 2020). L'altération de l'activité d'IRS-1 entraînait des complications métaboliques telles qu'une insulinorésistance (Lavin *et al.*, 2016). D'autres miARNs; miR-23b, miR-4429, miR-148b ou encore miR-4269 ont également été identifiés comme différentiellement exprimés dans les VEs adipocytaires des patients en situation d'obésité *vs* normo-pondéraux, notamment via une altération des signalisations du TGF-β et de la voie Wnt/β-caténine (Ferrante *et al.*, 2015). Ces interactions jouent un rôle clé dans le développement et la progression des processus inflammatoires et fibrotiques, la signalisation TGF-β étant impliquée dans la fibrose (Akhmetshina *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que la régulation de ces voies via des miRNAs pourrait constituer une approche thérapeutique pour traiter les comorbidités liées à l'obésité, telles que l'inflammation chronique ou la fibrose.

Parmi les cellules du microenvironnement adipeux, les adipocytes représentent une source majeure de VEs. Ces dernières participent à des interactions locales dans le TA, ainsi qu'à des mécanismes systémiques influençant diverses pathologies, notamment dans le contexte de l'obésité. L'importance des VEs adipocytaires a été mise en lumière pour la

première fois par l'équipe de Thomou *et al.,* qui a démontré le rôle clé des VEs circulantes dérivées des adipocytes *in vivo* (Thomou *et al.*, 2017). En utilisant un modèle murin de KO du gène Dicer spécifique aux adipocytes, afin d'inhiber la biogenèse des miARN, leur équipe a observé une réduction significative des niveaux de la plupart des miARN associés aux VEs circulantes (Thomou *et al.*, 2017). Ces résultats ont ainsi révélé que les adipocytes constituent la principale source de miARN transportés par VEs dans la circulation (Thomou *et al.*, 2017). Les VEs adipocytaires humaines et notamment les exosomes sont également connues pour libérer de nombreuses protéines. La nature de ces protéines a été caractérisée en protéomique et comparée au sécrétome du TA (Hartwig *et al.*, 2019). L'analyse a identifié 884 protéines, nommées exo-adipokines, parmi lesquelles 212 protéines étaient communes aux deux sécrétome et principalement impliquées dans l'inflammation et la fibrose. 672 protéines étaient spécifiques des exosomes et liées à des voies de signalisation et des processus médiés par la membrane plasmique.

Dans le contexte pathologique de l'obésité, des études ont identifié des niveaux de VEs circulantes significativement plus élevés chez les patients souffrant de la pathologie comparé à des sujets minces, suggérant que ce sont les VEs libérées par l'augmentation du TA qui contribueraient à ces observations (Le Lay *et al.*, 2021; Camino *et al.*, 2022; Eguchi *et al.*, 2016). De plus, des niveaux circulants de VEs enrichies en périlipine A corrélés à des marqueurs d'insulinorésistance (HOMA-IR) ont également été mis en évidence chez des patients en situation d'obésité (Eguchi *et al.*, 2016). De même, le nombre d'exosomes isolés à partir de TAV humain était plus élevé chez les patients insulinorésistants (Kranendonk *et al.*, 2014). Chez la souris, une étude a identifié des niveaux 2 fois plus élevés de VEs adipocytaires circulantes remplies de lipides, chez les souris obèses par rapport aux animaux normo-pondéraux (Flaherty *et al.*, 2019). D'autres analyses protéomiques ont révélé des profils vésiculaires adipocytaires différents entre les rats obèses diabétiques et non diabétiques (J.-E. Lee *et al.*, 2015). Les exosomes dérivés des rats obèses diabétiques sont notamment enrichis en protéines impliquées dans la lipolyse et l'exportation du glycérol. Les auteurs ont conclu que cette caractéristique pourrait expliquer l'accumulation ectopique de lipides dans les organes métaboliques, contribuant ainsi au développement de la résistance systémique à l'insuline (J.-E. Lee *et al.*, 2015).

Les VEs adipocytaires participent également à la communication entre les adipocytes et les macrophages. Des études *in vitro* ont montré que les VEs dérivées d'adipocytes humains induisent la différenciation des monocytes en macrophages similaires aux ATMs (*Adipose Tissue Macrophages*). Parmi les sous-populations de VEs, celles contenant de l'adiponectine se sont révélées particulièrement efficaces pour favoriser cette différenciation, induisant l'expression de marqueurs pro- et anti-inflammatoires caractéristiques des ATMs (Kranendonk *et al.*, 2014). *In vivo,* les macrophages locaux capturent les VEs adipocytaires riches en lipides dérivés, qui servent à la fois de source de lipides et qui favorisent également leur différenciation (Flaherty *et al.*, 2019). Ce transfert de lipides et l'activation des macrophages via les VEs jouent un rôle dans la modulation de l'inflammation associée au TA en contexte d'obésité.

REVUE

Browning Epicardial Adipose Tissue: Friend or Foe?

Doukbi Elisa, Soghomonian Astrid, Sengenès Coralie, Ahmed Shaista, Ancel Patricia, Dutour Anne & Gaborit Bénédicte

Publiée dans *Cells,* 2022

Dans cette partie, les paragraphes entre guillemets proviennent d'une traduction de la revue de la littérature ***Browning Epicardial Adipose Tissue: Friend or Foe?*** **Doukbi *et al.*, 2022** rédigée au cours de cette thèse (*cf. Annexe 1*).

3. Les différentes couleurs du tissu adipeux

a) Les tissus adipeux blanc et brun

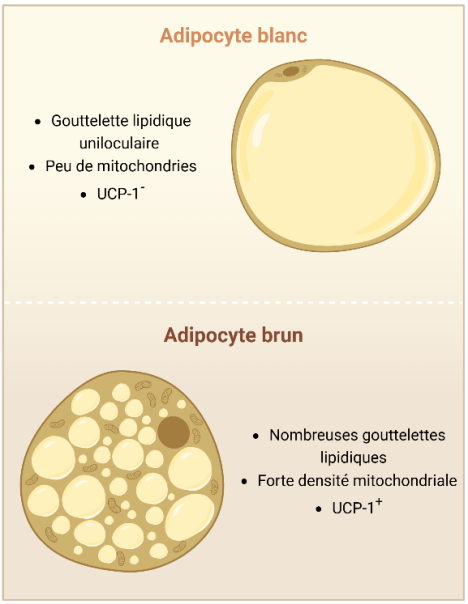


Figure 20 | Morphologie des adipocytes blanc (haut) et brun (bas).

« Jusqu'à il y a quelques années, les TAs blancs et bruns étaient les principaux TAs trouvés et étudiés chez les mammifères. Les TAs blancs et bruns sont dynamiques et capables d'une certaine forme d'adaptation. En effet, ils sont capables de réagir à différentes formes de stress, telles que l'exposition au froid pour le TA brun et la famine ou la suralimentation pour le TA blanc (Bartelt & Heeren, 2014; Cannon & Nedergaard, 2004; Cinti, 2012). L'une des principales fonctions du **TA blanc** est en effet de stocker une grande quantité de nutriments, en particulier des lipides sous forme de triglycérides, qui peuvent être libérés sous forme d'acides gras lorsque la nourriture devient rare (Zechner *et al.*, 2012). C'est probablement pour cela que ces cellules contiennent une grande vacuole capable de stocker des lipides (**Figure 20**). » Le TA blanc inclut le TAsc et les TAV intra-abdominal et intrathoracique. Le TAsc, principalement distribué dans les zones abdominale et glutéofémorale, stocke plus de 80 % de la graisse corporelle totale. Le TAV stocke quant à lui entre 5 et 20 % de la graisse corporelle et inclut divers dépôts adipeux, tels que les dépôts mésentériques, périrénaux, omentaux, épicardiques et gonadaux (Booth *et al.*, 2014).

« Le **TA brun** est quant à lui un système de défense naturel contre l'hypothermie chez les mammifères (Ballinger & Andrews, 2018; Barger *et al.*, 2006; Burlington *et al.*, 1969; Malatesta *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2006). Celui-ci est composé de plus petites gouttelettes lipidiques multiloculaires et de nombreuses mitochondries (**Figure 20**). » Les dépôts de TAs bruns sont localisés principalement dans les régions interscapulaires chez les nourrissons et les jeunes enfants et régressent peu après la naissance (Becher *et al.*, 2021; Cypess *et al.*, 2009) (**Figure 21**). « Des études récentes utilisant la tomographie par émission de positons (TEP) ont rapporté la présence de TA brun métaboliquement actif dans les régions cervicales et supraclaviculaires chez environ 3 à 7 % des adultes (Cypess *et al.*, 2009; Nedergaard *et al.*, 2007) (**Figure 21**).

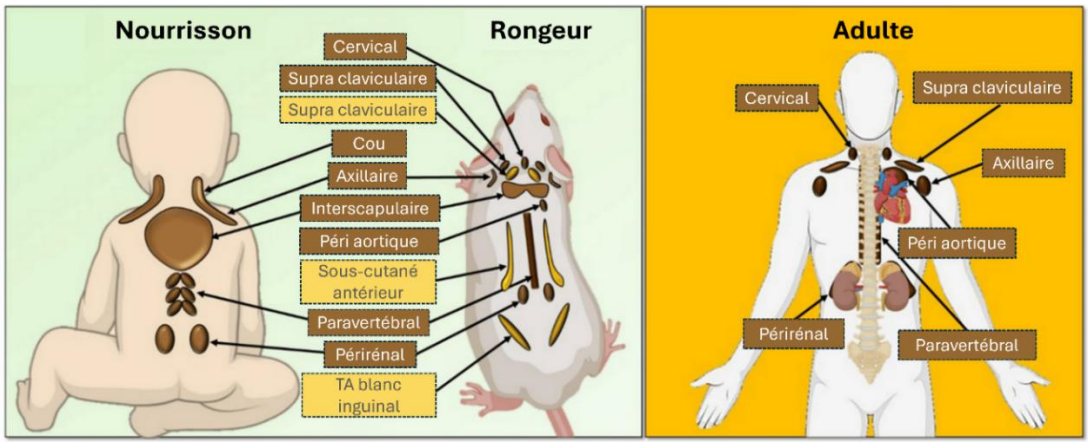


Figure 21 | Localisation des tissus adipeux brun et beige chez l'humain (enfant et adulte) et le rongeur (traduction d'après Suchacki & Stimson, *Nutrients*, 2021).

Le TA brun est principalement défini comme un producteur de chaleur (Cannon & Nedergaard, 2004). La particularité de ce tissu provient de sa capacité à dissiper l'énergie sous forme de chaleur, un processus appelé thermogenèse de non-frisson qui constitue la principale différence entre TA blanc et brun (Cannon & Nedergaard, 2004). Cette fonction thermogénique provient notamment de la protéine UCP-1 (*uncoupling protein 1*) (Lowell & Spiegelman, 2000) (**Figures 20 et 22**). »

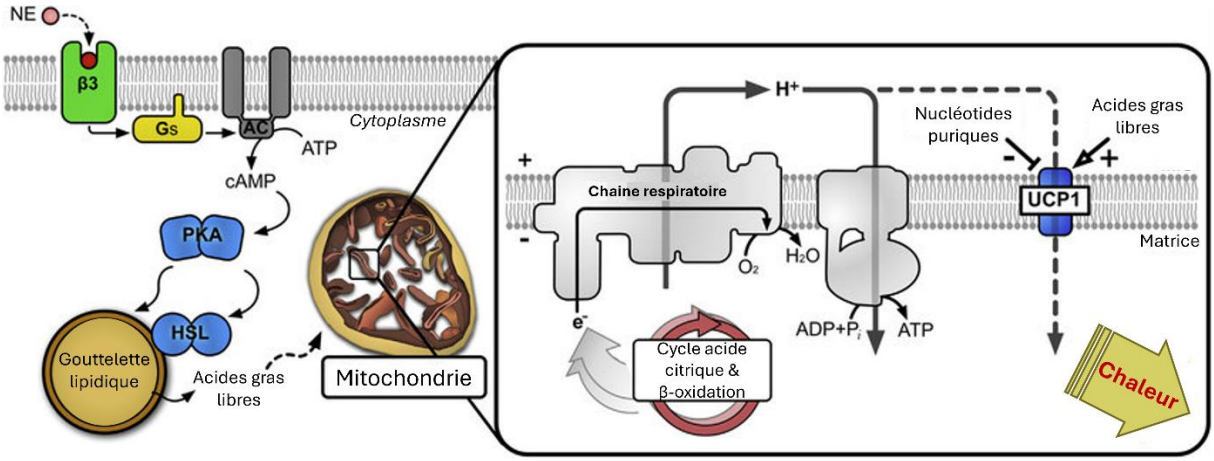


Figure 22 | Signalisation et activation de la protéine UCP-1 dans les adipocytes bruns (d'après Crichton *et al., Biochimie*, 2017 *(Crichton et al., 2017)*).

Des données chez le rongeur montrent que lors d'une exposition au froid, la thermogenèse est activée via une signalisation sympathique. La noradrénaline, libérée par les neurones sympathiques, agit sur les récepteurs β3-adrénergiques (β3-AR) des adipocytes bruns. Cela entraine l'activation de la protéine kinase A par la voie de l'adénylate cyclase (AC), augmentant la production intracellulaire de cAMP (Emorine *et al.*, 1989). La voie de signalisation de la PKA active la lipolyse via l'activation de lipases et augmente la biogenèse mitochondriale ainsi que l'activation et la surexpression de UCP-1 (Medvedev *et al.*, 2001). « Cette protéine, insérée dans la membrane interne des mitochondries, peut être activée par l'exposition au froid ou l'ingestion de nourriture. Elle agit tel un canal à protons qui dissipe le gradient électrochimique produit par la phosphorylation oxydative sans permettre la synthèse d'ATP : l'énergie est alors libérée sous forme de chaleur (Nedergaard *et al.*, 2001; Nicholls & Locke, 1984) (**Figure 22**). » Chez l'humain, la signalisation β3-adrénergique a également été mise en évidence, cependant l'importance des β3-AR est débattue, des données récentes attribuant l'effet thermogénique des adipocytes bruns à d'autres récepteurs bêta-adrénergiques, comme les β2-AR (Blondin *et al.*, 2020; Riis-Vestergaard *et al.*, 2020).

Bien qu'il soit aujourd'hui largement établi que UCP-1 est un contributeur majeur de la thermogenèse, une autre voie alternative a été mise en évidence, celle des cycles futiles. Les cycles futiles sont caractérisés par un ensemble de réactions biochimiques se déroulant simultanément dans des directions opposées, l'une d'entre elles étant la consommation d'ATP (Brownstein *et al.*, 2022). Le principe étant que le produit de la première réaction sert de substrat pour la seconde et que le produit de la seconde devient le substrat de la première, *in fine,* ce cycle entraîne une diminution de l'ATP (Newsholme, 1978). Les cycles futiles jouent un rôle essentiel en consommant les nutriments excédentaires et en produisant de la chaleur (**Tableau 2**). Ils permettent également de maintenir un pool stable de métabolites et d'enzymes actives,

assurant une production continue d'intermédiaires et une réponse rapide aux besoins cellulaires (Brownstein *et al.*, 2022).

Cycle Futile	Tissus	Rôle Physiologique	Protéines impliquées	ATP Dépendant	Références
Découplage médié par UCP1	TA brun	Thermogenèse	UCP1	—	Fedorenko et al, 2012 Parker et al, 2009 Foster et al, 1978 Rothwell et al, 1979 Lowel et al, 2000
Cycle futile du Calcium	TA brun, Muscle squelettique	Thermogenèse	SERCA1, RyR1, SLN	✓	Bal et al, 2012, 2016 Sahoo et al, 2013 De Meis et al, 2003, 2005, 2006 Periasamy et al, 2017
Découplage mitochondrial endogène	TA brun	Production d'ATP, Thermogenèse	AAC	✓	Bertholet et al, 2019 Kreiter et al, 2021
Cycle futile du Calcium	TA beige	Thermogenèse, Homéostaise du glucose	SERCA2b, RyR2	✓	Ikeda et al, 2017 Ukropec et al, 2006 Gamu et al, 2017 Mottillo et al, 2018
Cycle ADP/ ATP dépendant de la créatine	TA beige	Thermogenèse	CK, AAC	✓	Kazak et al, 2015 Bertholet et al, 2017 Rahbani et al, 2021 Sun et al, 2021 Kazak et al, 2017, 2019
Cycle des acides gras sans glycérolipides	TA blanc, TA brun, Cellules β	Lipolyse, Synthèse des triglycérides	ATGL, HSL, MAGL, GK, MPC	✓	Reshef et al, 2003 Prentki et al, 2008, 2012 Hammond et al, 1975 Mottillo et al, 2014 Veliova et al, 2020
Glycéronéogenèse - cycle lipidique	Foie, TA blanc, TA brun	Formation du G3P, Synthèse des triglycérides	PEPCK-C, Glycerol Kinase	✓	Guan et al, 2002 Reshef et al, 2003 Ballard et al, 1967 Feldman et al, 1978 Bertin et al, 1976
Cycle de Cori	Muscle squelettique, Foie	Production lactate et glucose	LDH	✓	Sharma et al, 2019

Tableau 2 | Liste des cycles futiles (adapté de Brownstein *et al., Rev Endocr Metab Disord.,* 2022).

En effet, des études récentes ont montré que les adipocytes thermogéniques (bruns et beiges) peuvent augmenter leur dépense énergétique en activant des cycles futiles consommateurs d'ATP (Oeckl *et al.*, 2022). Leur demande accrue en ATP permet aux mitochondries de rester couplées pour répondre à ce besoin énergétique et alimenter ces cycles futiles, évitant ainsi les risques associés à une forte dépolarisation caractéristique du découplage mitochondrial. Dans leur revue sur le sujet, Brownstein *et al.* ont listé les cycles futiles dépendants de la synthèse et de la consommation d'ATP qui contribuent à la dissipation d'énergie de manière indépendante d'UCP-1 (**Tableau 2**) (Brownstein *et al.*, 2022).

b) Le tissu adipeux beige

« Dans le TA blanc, d'autres changements adaptatifs existent et sont liés à la fonction thermogénique du TA brun. Dans certaines conditions, il est possible d'observer l'apparition d'adipocytes de type brun dans le TA blanc (Ishibashi & Seale, 2010; Klingenspor *et al.*, 2012; Petrovic *et al.*, 2010). On parle alors de *beiging* ou *browning* du TA blanc. Le phénomène de beiging est défini comme l'induction d'une fonction thermogénique dans le TA blanc. Ces cellules sont alors appelées adipocytes beiges ou "brite" (*brown-in-white*) et ont été observées pour la première fois chez des souris acclimatées au froid (Young *et al.*, 1984). Ces découvertes ont alors suggéré que le TA blanc pouvait acquérir des propriétés thermogéniques.

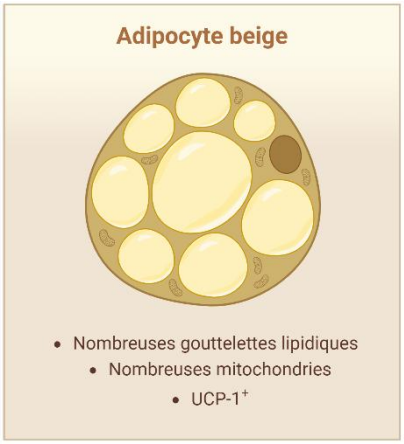


Figure 23 | Morphologie de l'adipocyte beige.

Les adipocytes beiges sont caractérisés par de multiples gouttelettes lipidiques et de nombreuses mitochondries (**Figure 23**). Le changement d'un adipocyte blanc vers un adipocyte beige survient lorsque la cellule est activée par des stimuli thermogéniques tels que l'exposition au froid (Barbatelli *et al.*, 2010; J. Wu *et al.*, 2012) ou stimulées par des facteurs beigisants comme les agonistes β3-adrénergiques (Buemann *et al.*, 2000; Himms-Hagen *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 2002; Sacco *et al.*, 2014; van Baak *et al.*, 2002; Weyer *et al.*, 1998), ou les agonistes du *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) (Beiroa *et al.*, 2014; Kooijman *et al.*, 2015; Lockie *et al.*, 2012; F. Xu *et al.*, 2016). Les adipocytes beiges sont principalement caractérisés par leur expression de la protéine UCP-1, tout comme les adipocytes bruns, bien qu'ils présentent une signature moléculaire distincte chez la souris et chez l'humain (J. Wu *et al.*, 2012). »

Tout comme pour les adipocytes bruns, des travaux récents ont montré que les adipocytes beiges peuvent effectuer la thermogenèse au travers de cycles futiles. Une grande partie de la capacité thermogénique des adipocytes beiges a été attribuée au cycle futile de Ca^{2+} induit par la SERCA2b (Ikeda *et al.*, 2017). Dans les adipocytes beiges, ce cycle futile est alimenté par une glycolyse accrue et une augmentation de l'oxydation du glucose, ce qui contribuerait aux effets bénéfiques du TA beige, notamment dans l'amélioration du métabolisme du glucose (Finlin *et al.*, 2020; Ikeda *et al.*, 2017).

c) Le tissu adipeux rose

Un autre type de TA a fait son apparition il y a quelques années : le **TA rose**. Chez les rongeurs, il a été montré que durant la gestation et la lactation, une transformation du TAsc glandulaire mammaire s'opérait en TA rose, capable de synthétiser et de sécréter du lait (Fève *et al.*, 2024; Morroni *et al.*, 2004). Des travaux récents principalement menés par l'équipe de S. Cinti, basés sur des expériences impliquant des souris transgéniques, ont démontré que ce processus correspond à une transdifférenciation des adipocytes blancs en cellules alvéolaires mammaires/ adipocytes roses au cours de la gestation et de la lactation (L. Li *et al.*, 2017; Morroni *et al.*, 2004). Ce phénomène serait réversible, car en phase post-lactation, les adipocytes roses retrouvent un phénotype d'adipocytes blancs. Les mécanismes moléculaires sous-jacents restent encore mal compris (Fève *et al.*, 2024).

4. Les marqueurs adipocytaires des différents tissus adipeux

Lorsqu'on s'intéresse à l'origine cellulaire des trois types adipocytaires, il est prouvé que le TA brun provient de précurseurs de la lignée *Myf5*$^{+}$, tandis que les précurseurs des adipocytes beiges sont *Myf5*$^{-}$ et *PDGFRα*$^{+}$ (J. Wu *et al.*, 2012; X. Zhang *et al.*, 2019). Ainsi, les adipocytes beiges partageraient un précurseur *Myf5*$^{-}$ commun avec les adipocytes blancs. Mais seuls 25 % des adipocytes beiges émergeant dans le TA blanc seraient issus de ces précurseurs, le reste étant dû à la transdifférenciation d'adipocytes blancs en beiges sous l'effet de facteurs beigisants (Y.-H. Lee *et al.*, 2012).

De plus, pour prouver que les adipocytes beiges et bruns sont distincts, Wu *et al.* ont étudié les cellules beiges à partir des dépôts de graisse blanche murine (J. Wu *et al.*, 2012). Ils ont observé un profil d'expression génique distinct de celui de la graisse blanche ou brune dans ces adipocytes beiges. Mais bien qu'une lignée cellulaire beige existe, des preuves de transdifférenciation des adipocytes blancs en adipocytes beiges *in vivo* ont également été rapportées (Frontini *et al.*, 2013) (**Figure 24**). »

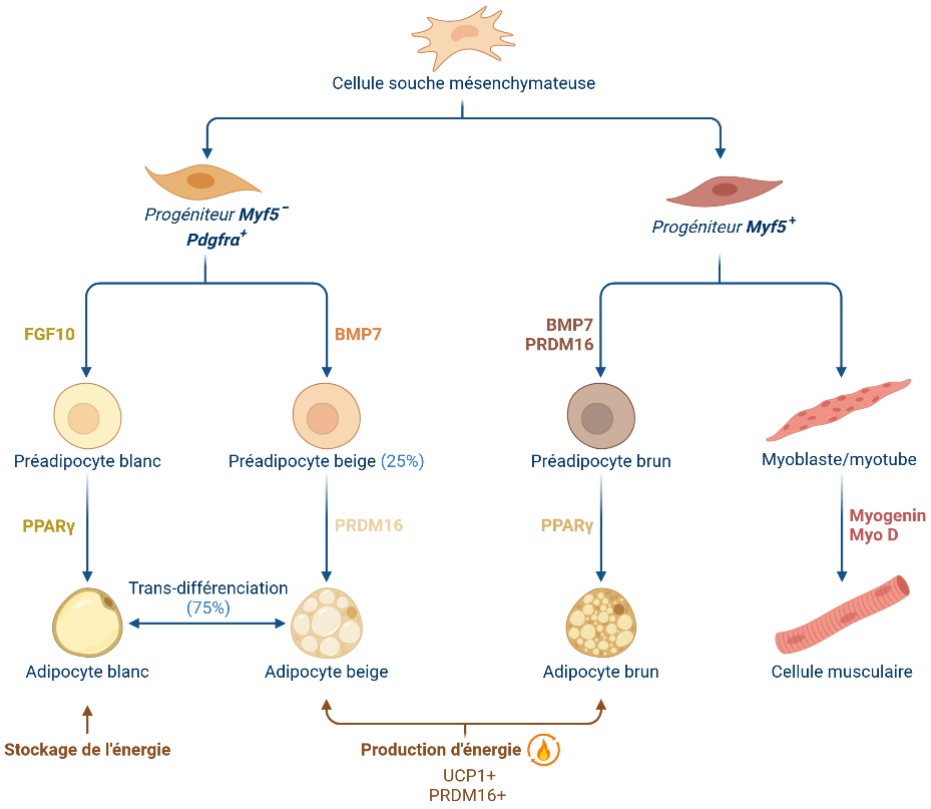


Figure 24 | Origine cellulaire des trois types d'adipocytes.

L'analyse des lignées adipocytaires blanche et brune révèle une origine embryologique distincte et implique des facteurs spécifiques, notamment le marqueur myogénique Myf5. Les adipocytes bruns se définissent par l'expression de Myf5+, également présent dans les myoblastes. Les adipocytes blancs proviennent de précurseurs Myf5-. Les adipocytes beiges proviennent de précurseurs Myf5- exprimant des facteurs thermogéniques tels que PRDM16 et UCP-1 ou de la tras-différenciation d'adipocytes blancs.

Afin de mieux comprendre les mécanismes du beiging, il est essentiel de pouvoir distinguer les différents sous-types d'adipocytes. À cette fin, de nombreux marqueurs existent afin de différencier les adipocytes blancs, bruns et beiges chez la souris et l'humain. La figure suivante résume la majorité des marqueurs adipocytaires connus en 2022 (**Figure 25**).

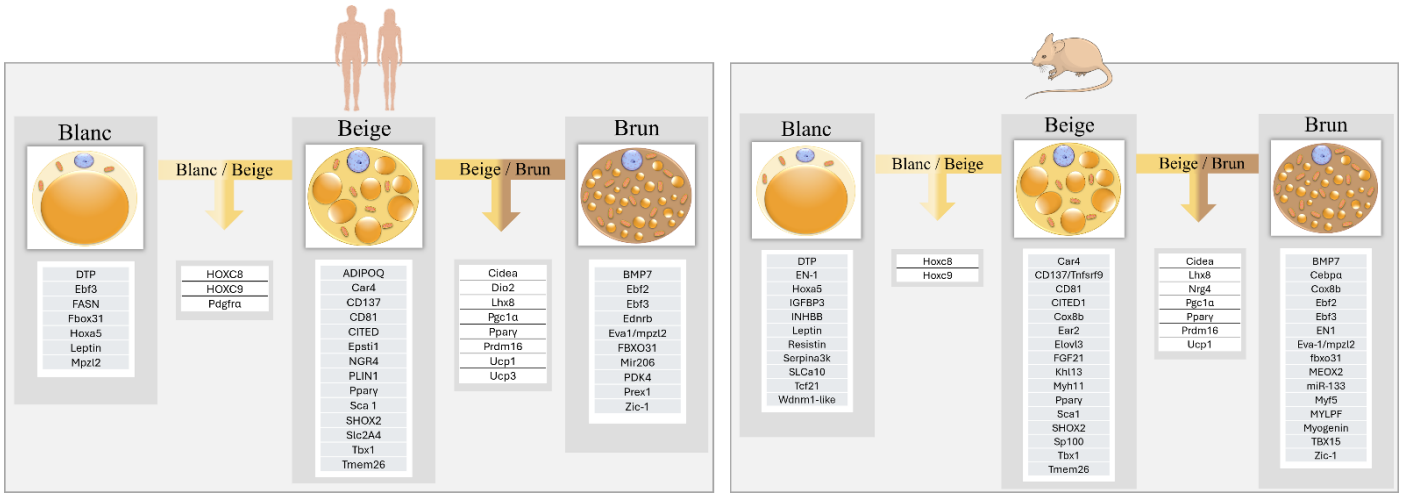


Figure 25 | Marqueurs adipocytaires blancs, beiges et bruns chez l'humain (gauche) et la souris (droite)

Nous avons résumé ici les gènes rapportés dans la littérature comme étant des marqueurs des TAs blancs (White), beiges et bruns (Brown), ainsi que ceux partagés entre les adipocytes beiges et blancs ou entre les adipocytes beiges et bruns, chez l'humain (a) et chez la souris (b).

a) Marqueurs des adipocytes blancs

« Parmi les marqueurs communément utilisés dans l'analyse des TAs blancs chez l'homme et la souris, on retrouve la **leptine** (Gesta *et al.*, 2007; Rodeheffer *et al.*, 2008). De plus, dans le TAsc murin, il a été démontré que les adipocytes blancs expriment spécifiquement **Asc-1** (également appelé SLC7a10) (Sharp *et al.*, 2012; Ussar *et al.*, 2014), ainsi que **Wndnm1-like** (Garcia *et al.*, 2016; Sharp *et al.*, 2012) et **Tcf21** (Waldén *et al.*, 2012). Chez l'homme, d'autres marqueurs génétiques spécifiques au TA blanc sont connus, parmi lesquels **Ebf3**, **Fbox31** et **Mpzl2** (Cypess *et al.*, 2013), ainsi que **FASN** (Comas *et al.*, 2019). De plus, certains marqueurs tels que **Pdfra** (Y.-H. Lee *et al.*, 2012; Pilkington *et al.*, 2021) et les gènes HoxC8 et HoxC9 (Pilkington *et al.*, 2021; Sharp *et al.*, 2012; Waldén *et al.*, 2012), initialement utilisés pour identifier les adipocytes blancs, ont également été mis en évidence dans les adipocytes beiges (**Figure 25**).»

b) Marqueurs des adipocytes bruns

« Puisque les adipocytes beiges et bruns présentent des caractéristiques communes, il est essentiel de les distinguer et d'identifier leurs marqueurs communs et spécifiques. À cette fin, De Jong *et al.* ont évalué l'expression de plusieurs marqueurs dans les TAs interscapulaires (brun), inguinaux (beiges) et épididymaires (blanc) chez la souris, et ont notamment constaté que seul l'ARNm de **Zic-1** était détectable dans le TA brun (de Jong *et al.*, 2015). D'autres études sont également parvenues à cette conclusion avec des études sur le profil d'expression génique du TA brun chez la souris, ainsi que chez l'humain (Cypess et al., 2013; Kajimura et al., 2015; Waldén et al., 2012; Wankhade et al., 2018a). Dans le TA brun humain et la région interscapulaire des souris, des études ont identifié **Eva1** (aussi connu sous le nom de Mpzl2) comme un autre marqueur spécifique du TA brun, avec une expression significativement plus élevée dans ce tissu par rapport aux TAs beiges et blancs (Seale *et al.*, 2007; J. Wu *et al.*, 2012). Ussar *et al.* ont démontré que l'expression de **P2RX5** est surexprimée dans les préadipocytes et adipocytes bruns, et que son expression augmente davantage pendant la différenciation cellulaire (Ussar *et al.*, 2014). Finalement, d'anciens marqueurs, couramment utilisés pour

identifier le TA brun, se sont révélés être également exprimés par les cellules beiges. On y retrouve notamment UCP-1, **CIDEA** (Garcia *et al.*, 2016; Sharp *et al.*, 2012), **Lhx8** (Sharp *et al.*, 2012), **PGC1a** (Puigserver *et al.*, 1998; Uldry *et al.*, 2006) ou encore **PRDM16** (Inagaki *et al.*, 2016; Pilkington *et al.*, 2021; Seale *et al.*, 2007), ainsi que plusieurs autres répertoriés dans la (**Figure 25**). »

c) Marqueurs des adipocytes beiges

« Afin d'évaluer les marqueurs des adipocytes beiges chez la souris, Garcia *et al.* ont étudié l'expression des transcrits de plusieurs gènes thermorégulateurs et ont proposé des marqueurs spécifiques des adipocytes beiges, tels que **Cox8b** (Garcia *et al.*, 2016) ou le facteur de croissance des fibroblastes 21 (**FGF21**) (Garcia *et al.*, 2016; Z. Huang *et al.*, 2017). Dans leur étude transcriptomique, De Jong *et al.* ont également identifié **CD137**, **Epsti1**, **Tbx1** et **Tmem26** comme étant assez spécifiques au TA beige (de Jong *et al.*, 2015). Cependant, des réserves ont été émises concernant Tbx1 et Tmem26, car une comparaison de leur expression dans des cultures d'adipocytes bruns et blancs n'a révélé aucune différence significative (Sharp *et al.*, 2012). CD137 et Tmem26 sont connus comme marqueurs de surface cellulaire des précurseurs beiges (Harms & Seale, 2013), ce qui constitue un avantage majeur pour l'isolement de ces cellules à partir du TA blanc. Récemment, Comas *et al.* ont découvert un nouveau marqueur des adipocytes beiges appelé neureguline 4 (**NRG4**) dans le TA humain (Comas *et al.*, 2019). Cette étude a par ailleurs montré une relation significative entre l'expression des gènes NRG4 et TMEM26 dans le TAV et le TAsc. D'autres marqueurs spécifiques au TA beige ont été rapportés chez l'humain et la souris, tels que **CITED1**, **Ear2**, **Elov3**, **Sca1** et **Dio2** (**Figure 25**). »

5. Beiging du tissu adipeux et facteurs beigisants

a) Stimuli thermogéniques

« De nombreux stimuli contribuent à l'apparition d'adipocytes beiges au sein d'un TA blanc. Des études utilisant notamment des méthodes de TEPscan ont mis en évidence que l'exposition au froid faisait partie des principales sources d'activation du TA brun et d'induction du phénomène de beiging (Huttunen *et al.*, 1981; Nedergaard *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2009; Sidossis & Kajimura, 2015; van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009). Ainsi, en réponse à un stress dû au froid, les terminaisons nerveuses sympathiques libèrent des catécholamines, telles que la norépinéphrine (NE), qui se lient à leurs récepteurs bêta-adrénergiques (β-AR). L'implication des récepteurs β3-AR dans le beiging a été démontrée à de nombreuses reprises, et il a été constaté qu'un traitement chronique avec des agonistes β3-adrénergiques induit le beiging du TA blanc (Cousin *et al.*, 1992; Ghorbani *et al.*, 1997; Ghorbani & Himms-Hagen, 1997; Himms-Hagen *et al.*, 2000; Jimenez *et al.*, 2003). Plus récemment, une étude a investigué les signaux physiologiques impliqués dans ce phénomène induit par le froid chez la souris, montrant que les adipocytes blancs peuvent recevoir des signaux adrénergiques via les récepteurs β3-AR et produire du FGF21, qui stimule les éosinophiles et les macrophages de type M2. La stimulation de ces cellules immunitaires de type 2 conduit au beiging du TAsc, mais pas du TA brun ou du TA épididymaire (Z. Huang *et al.*, 2017). De plus, les adipocytes beiges semblent être capables de se souvenir s'ils ont déjà été exposés au froid, une capacité thermogénique qu'ils peuvent ainsi réemployer plus rapidement (Roh *et al.*, 2018). »

b) Stimuli protéiques et lipidiques

« Un autre stimulus induisant la présence d'adipocytes beiges est l'inactivation de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) dans l'hypothalamus ventromédian. Cette protéine, activée lorsque l'énergie cellulaire est épuisée, peut promouvoir des processus de production d'ATP (Hardie *et al.*, 1998; Rutter *et al.*, 2003). Son inactivation entraîne une augmentation de la sortie sympathique vers le TA blanc, induisant ainsi l'activation du TA brun et le beiging du TA blanc (López *et al.*, 2016). L'inactivation de l'AMPK qui conduit au beiging peut être induite par des hormones thyroïdiennes (López *et al.*, 2010; Martínez-Sánchez *et al.*, 2016) ou des agonistes du récepteur du GLP-1 (Beiroa *et al.*, 2014).

Récemment, les lipides ont également été identifiés comme régulateurs de l'activation de la graisse thermogénique, notamment via un dialogue spécifique avec les neurones sympathiques (Park, He, & Lodhi, 2019). En effet, de plus en plus de preuves suggèrent que la synthèse lipidique *de novo* à travers la synthase des acides gras FASN (*fatty acid synthase*) induit l'expansion des adipocytes beiges au sein du TA blanc inguinal (Guilherme *et al.*, 2017). Une autre voie lipogénique liée aux lipides a été trouvée pour moduler l'activation de PPAR dans les adipocytes bruns au sein du TAsc chez la souris, la réductase peroxysomale activant PPAR (PexRAP) (Lodhi *et al.*, 2012). D'autres preuves de l'implication des lipides existent. On retrouve, par exemple, l'acide eicosapentaénoïque (EPA), un acide gras polyinsaturé, qui induit la capacité thermogénique du TA brun en augmentant le contenu en UCP-1, et en amplifiant la consommation d'oxygène stimulée par des catécholamines comme la NE (M. Kim *et al.*, 2015; Sadurskis *et al.*, 1995). Chez la souris, l'EPA aurait également un rôle dans l'augmentation de l'expression du gène *Ucp-1*, renforçant la réponse thermogénique du TA brun et du TA blanc inguinal à la stimulation β3-adrénergique (Ghandour *et al.*, 2018; M. Kim *et al.*, 2015). Park *et al.* ont en outre démontré que les lipides dérivés des peroxysomes, y compris les plasmalogènes, peuvent réguler la thermogenèse adipeuse en médiant la fission mitochondriale induite par le froid dans les adipocytes bruns et beiges (Park, He, Tan, et al., 2019). »

c) Peptides natriurétiques

« Le peptide natriurétique atrial (ANP : *atrial natriuretic peptide*) et le peptide natriurétique cérébral (BNP : *brain natriuretic peptide*) sont des hormones endocrines libérées par le cœur en réponse au stress de la paroi cardiaque et à d'autres facteurs locaux (Collins, 2014; Lafontan *et al.*, 2008; Volpe *et al.*, 2014; Zois *et al.*, 2014). Plusieurs études ont montré que les peptides natriurétiques cardiaques sont des inducteurs du beiging. Chez les adipocytes humains et murins, il a été démontré que ces peptides activent la voie de signalisation mTORC1 (Liu *et al.*, 2018). Ce complexe est nécessaire à l'induction du beiging via l'exposition au froid (Liu *et al.*, 2016; Tran *et al.*, 2016). De plus, des traitements à l'ANP ont significativement augmenté l'expression de UCP-1 dans le TA de souris soumises à un régime riche en graisse et amélioré leur résistance à l'insuline (Kimura *et al.*, 2021). Bordicchia *et al.* ont également démontré que, dans les adipocytes humains, l'ANP et le BNP activent l'expression du coactivateur 1 de PPAR (PGC-1) et de UCP-1, induisent une mitochondriogenèse, et augmentent la respiration découplée de manière dépendante de la MAPK p38. De plus, l'administration de BNP chez les souris a considérablement augmenté l'expression de *Ucp1* et *Pgc-1* dans les TAs blanc et brun, avec une élévation correspondante de la respiration mitochondriale et de la dépense énergétique (Bordicchia *et al.*, 2012). Cela confirme que les

peptides natriurétiques peuvent promouvoir le beiging du TA blanc pour augmenter la dépense énergétique, définissant ainsi le cœur comme un régulateur central de la biologie du TA. »

d) Muscle

« Il est également important de souligner l'interaction entre le TA et le muscle dans la promotion du beiging du TA. En effet, le muscle squelettique et le TA sécrètent tous deux METRNL (Meteorin-like), une myokine dépendante de PGC-1, en réponse à l'exercice physique et à l'exposition au froid (Zheng *et al.*, 2016). Rao *et al.* ont montré que METRNL peut améliorer le beiging sans action directe sur les adipocytes (R. R. Rao *et al.*, 2014). En effet, METRNL induit le recrutement d'éosinophiles dans le TA blanc, conduisant à une augmentation de l'expression d'IL-4 et d'IL-13, qui stimulent les macrophages de types M2 et activent des gènes thermogéniques. L'irisine, un produit de clivage du gène *Fndc5* (contenant le domaine de type III de la fibronectine), est une autre myokine dépendante de PGC-1, qui est stimulée en réponse à de l'exercice et impliquée dans le beiging du TA blanc (Boström *et al.*, 2012). Cependant, sa sécrétion par le muscle squelettique, sa régulation et sa fonction font l'objet de divergences dans la littérature (Raschke *et al.*, 2013). »

e) Cellules immunitaires

« En plus des facteurs beigisants précédemment mentionnés, de nombreux acteurs immunitaires ont été identifiés comme impliqués dans l'apparition des adipocytes beiges dans le TA blanc. Parmi ces acteurs, les cellules immunitaires de type 2 et leurs cytokines associées jouent un rôle majeur dans la biogenèse des adipocytes beiges. Lee *et al.* ont rapporté que l'activation des **cellules lymphoïdes innées de type 2** (ILC2) par l'IL-33 est suffisante pour promouvoir la croissance des précurseurs adipocytaires engagés dans la lignée du TA beige (M.-W. Lee *et al.*, 2015). Ils ont décrit un circuit thermogénique activant les ILC2, qui, en réponse, sécrètent de l'IL-13. Les auteurs ont ensuite montré que cette IL-13, en coopération avec l'IL-4 provenant des éosinophiles, favorise directement l'expansion et l'engagement des progéniteurs adipocytaires beiges dans le TAsc via le récepteur à l'IL-4 (**Figure 26**).

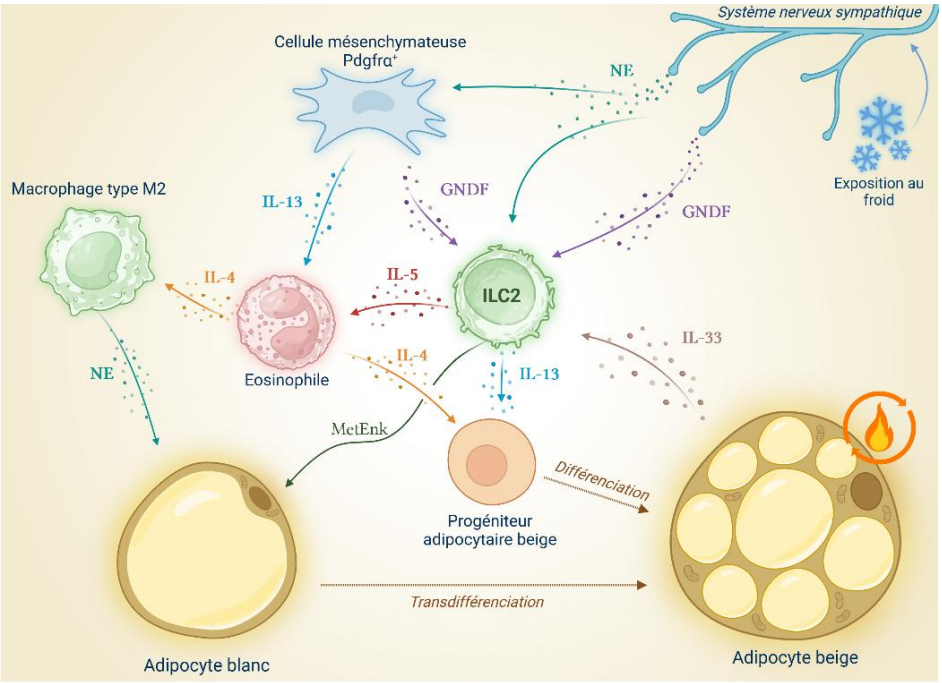


Figure 26 | ILC2 : acteurs cellulaires centraux dans le beiging du tissu adipeux.

Les ILC2 peuvent induire un beiging de différentes manières. Les ILC2 peuvent être activée par l'IL-33 ou encore grâce à des neurotransmetteurs tels que la NE et le GNDF. En réponse, les cellules vont produire des cytokines de type 2 : l'IL-5 et l'IL-13. L'IL-5 active les éosinophiles et déclenche leur production d'IL-4. En réponse à l'IL-4, les macrophages de type M2 (ou alternativement activés) produisent de la NE, entraînant le beiging du TA. L'IL-4 dérivée des éosinophiles en collaboration avec l'IL-13 dérivée des ILC2 agissent directement sur les progéniteurs adipocytaires afin de stimuler leur prolifération et favoriser leur différenciation en adipocytes beiges. Les ILC2 sont également capables de sécréter des MetEnk agissant sur la transdifférenciation des adipocytes blancs en beiges.

En 2014, les ILC2 ont également été identifiés dans le TA blanc humain par Brestoff *et al.* (Brestoff *et al.*, 2015) qui ont mis en évidence leur diminution dans l'obésité. De plus, l'IL-33 serait critique pour le maintien des ILC2 dans le TA blanc ainsi que pour l'induction du beiging. Pour approfondir la contribution des ILC2 dans ce phénomène, les auteurs se sont concentrés sur les gènes associés à l'obésité exprimés par les ILC2. Ils ont notamment observé que les ILC2 sont capables de produire des peptides méthionine-enképhalines (MetEnk), capables d'augmenter le nombre d'adipocytes beiges au sein d'un TA blanc. Dans cette étude, l'un des récepteurs de ces MetEnk, le récepteur opioïde κ1 (Oprd1), était fortement exprimé dans le TA blanc inguinal, suggérant des effets tissu-spécifiques des MetEnk. Une autre étude combinant systèmes nerveux et immunitaire a également établi que le système nerveux sympathique peut activer des cellules mésenchymateuses PDGFR^{+}, présentes dans la FVS, via le récepteur β2-adrénergique. En réponse aux signaux sympathiques, ces cellules secrètent le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GNDF), capable de moduler l'activité des ILC2 via le récepteur de la tyrosine kinase RET. Dans cette étude, Cardoso et collègues ont démontré que RET était essentiel dans l'activité des ILC2, notamment pour la sécrétion d'IL-5, d'IL-13 et de MetEnk, participant ainsi à la régulation de la dépense énergétique, du métabolisme de l'hôte et de l'obésité.

D'autres cellules lymphoïdes innées telles que les **éosinophiles**, pourraient également être impliquées dans le beiging. Une étude a montré que les éosinophiles sont impliqués dans l'activation des **macrophages alternativement activés** (AAM) en exprimant l'IL-4 dans le TA blanc périgonadal (D. Wu *et al.*, 2011). Ils ont ainsi démontré que ces éosinophiles étaient les principales cellules exprimant l'IL-4 dans le TA blanc périgonadal des souris. Ces éosinophiles migrent du sang vers le TA blanc par un processus dépendant des intégrines et maintiennent la présence des AAM par un processus dépendant de l'IL-4 et de l'IL-13. Une autre étude a révélé que les éosinophiles font partie de la branche efférente du circuit thermogénique qui régule le beiging induit par le froid dans le TAsc (Qiu *et al.*, 2014). En 2011, il a été montré qu'après leur activation par l'IL-4, les AAM pouvaient moduler la thermogenèse adaptative (K. D. Nguyen *et al.*, 2011). L'étude de Huang *et al.* a montré que l'exposition au froid peut induire une signalisation autocrine de FGF21 dans les adipocytes blancs matures (Z. Huang *et al.*, 2017). Cela entraîne l'expression de la chimiokine CCL11, activant les éosinophiles qui, à leur tour, sécrètent de l'IL-4 capable soit d'activer les macrophages M2 et d'induire le beiging des précurseurs adipocytaires PDGFR^{+}. Ces études suggèrent alors que les macrophages agissent sur le beiging via la sécrétion de noradrénaline (K. D. Nguyen et al., 2011; Qiu et al., 2014) (**Figure 26**), cependant cela reste controversé (Fischer et al., 2017). Plus récemment, d'autres études travaillant sur la régulation de l'adipogenèse par les macrophages via des effets sur le système nerveux sympathique, ont montré que ces cellules agissent via la surexpression des gènes *Irs2*, *Mecp2* et *Slit3* chez la souris (Rached et al., 2019; Y.-N. Wang et al., 2021; Wolf et al., 2017). Ces gènes augmentent alors l'activité sympathique locale du TA et affectent ainsi le processus d'adipogenèse thermogénique. D'autres études montrent tout de même une action des

macrophages adipeux sur le beiging, indépendamment du système nerveux sympathique, notamment par la sécrétion d'IL-10, IL-1β et TGF-β régulateurs de l'adipogenèse beige (Okla et al., 2018; Rajbhandari et al., 2018; Wankhade et al., 2018b). En 2024, une étude paru dans *Nature Communication* a mis en avant que les macrophages adipeux avaient une fonction de promotion du TA beige indépendante du système nerveux sympathique (S. Wu et al., 2024). Ces travaux ont montré que les macrophages anti-inflammatoires suppriment l'expression d'*Ets1* dans les adipocytes ce qui active transcriptionnellement la biogenèse mitochondriale, augmente le nombre de mitochondries favorisant le beiging chez la souris. Cependant le rôle des macrophages dans la thermogenèse semble dual. En effet, une étude récente de séquençage ARN en *single-cell* a mis en évidence le remodelage du TA brun par les LAM chez des souris obèses (Sciarretta et al., 2024). Ces LAMs seraient responsables de la perte de l'identité des adipocytes bruns via la libération du TGF-β1, qui réduit les taux d'Aldh1a1 (*aldehyde dehydrogenase 1 family member A1*). La perte d'expression de cette enzyme ayant été associée à une protection contre l'obésité et à une augmentation de la fonction thermogénique brune (Sun et al., 2020). Dans leur étude, Sciarretta *et al.* montrent que les LAM déficients en CD36 seraient à l'inverse capables d'augmenter l'expression des gènes du TA brun (Sciarretta et al., 2024).

Enfin, en 2018, une étude a souligné le rôle des **lymphocytes T γδ** dans la thermogenèse du TA blanc. Les auteurs ont démontré que les LT γδ produisant l'IL-17A interagissent avec les cellules stromales adipeuses et régulent ainsi les taux d'IL-33, ce qui affecte l'accumulation des Treg et la thermorégulation (Kohlgruber *et al.*, 2018). Ils ont également montré que les déficits en LT γδ et en IL-17A affectent significativement la capacité des souris à survivre après une exposition au froid et induisent des réponses thermogéniques dépendantes d'UCP-1. »

f) Les vésicules extracellulaires

« Comme mentionné précédemment, les VEs ont émergé comme un nouveau moyen de communication inter-organe et intercellulaire dans l'interaction entre le tissu adipeux épicardique et le système cardiovasculaire. Elles sont désormais également reconnues comme étant impliquées dans le beiging du TA blanc. En 2018, un transfert unidirectionnel d'exosomes d'ADSCs vers les macrophages a été observé (H. Zhao *et al.*, 2018). De plus, des études ont mis en évidence le rôle d'exosomes dans l'induction de la polarisation des macrophages anti-inflammatoires M2. Les auteurs ont démontré que les exosomes dérivés des ADSCs favorisent le beiging des TAs blancs inguinal et épididymaire chez la souris. En 2020, ces résultats ont été transposés aux exosomes dérivés des ADSCs humaines (Jung *et al.*, 2020). La sécrétion d'exosomes lors de la différenciation des cellules souches en adipocytes blancs ou beiges peut favoriser la reprogrammation cellulaire, impliquant que les exosomes dérivés des adipocytes beiges peuvent stimuler le développement d'autres cellules beiges dans le TA blanc. Bien que ces découvertes soient intéressantes, il est désormais nécessaire de découvrir quel(s) composant(s) des exosomes dérivés des ADSCs sont responsables de ce beiging. Certains miARN transportés par les VEs sont également connus pour jouer un rôle dans le beiging. Le miR-196a est par exemple connu pour induire le beiging lors d'une exposition au froid et de la stimulation β-adrénergique (Mori *et al.*, 2012). Le miR-155 quant à lui, augmente la fonction du TA brun et induit le beiging (Chen *et al.*, 2013).

Par conséquent, d'autres études sont nécessaires pour identifier l'implication précise des VEs et de leur contenu encore mal compris dans la biogenèse des adipocytes beiges et dans la différenciation du TA blanc au beige.

III. Le tissu adipeux épicardique (TAE)

1. Généralités

« Le tissu adipeux épicardique (TAE) est un dépôt de graisse ectopique situé entre le myocarde et le péricarde viscéral (**Figure 27**).

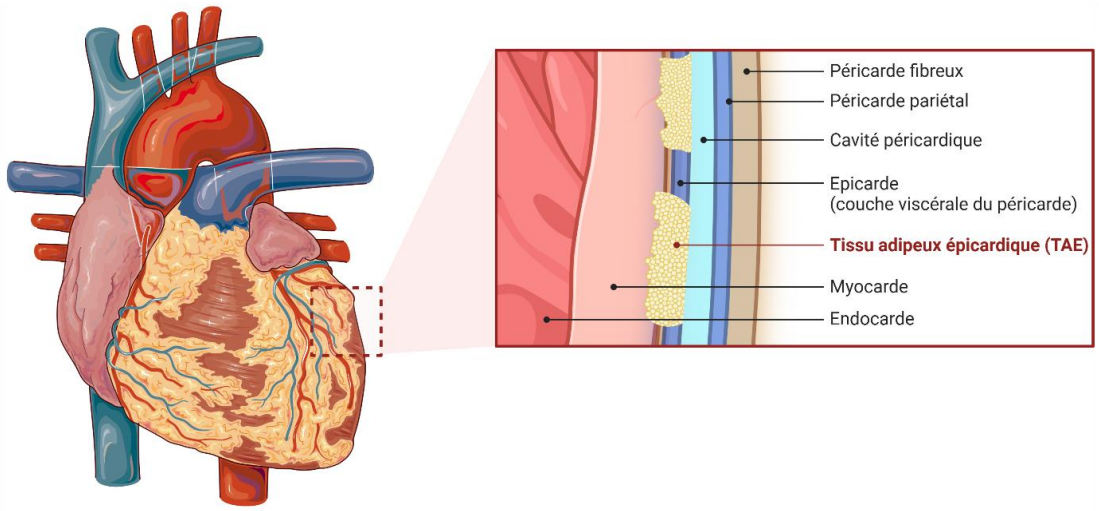


Figure 27 | Localisation anatomique du tissu adipeux épicardique.

La proximité entre ce TA et le tissu myocardique permet des relations fonctionnelles et anatomiques. En effet, ces deux tissus partagent la même microcirculation, sans qu'aucun fascia ne les sépare, permettant ainsi de nombreux échanges cellulaires (Iacobellis *et al.*, 2005). De plus, en conditions physiologiques, le TAE représente 20 % du poids du cœur (Corradi *et al.*, 2004; Rabkin, 2007). En revanche, en termes de masse adipeuse totale, il ne représente que 1 %, loin de la masse que représente en comparaison le TAV (Rabkin, 2007). Parmi les nombreuses fonctions de ce tissu, on retrouve notamment une fonction mécanique. En effet, le TAE est capable de protéger les artères coronaires contre la torsion induite par l'onde de pouls artérielle et la contraction cardiaque (Rabkin, 2007). Une autre fonction attribuée au TAE est son rôle de stockage local d'énergie pour le myocarde, mais aussi son rôle protecteur contre des niveaux élevés d'acides gras libres (AGL) dans la microcirculation (Marchington & Pond, 1990). Cette fonction est essentielle, car le myocarde métabolise les AGL du sang artériel coronaire et leur oxydation est responsable d'environ 50 à 70 % de la production d'énergie du cœur (Iacobellis *et al.*, 2005). Ainsi le TAE peut être perçu comme un tampon protégeant le cœur contre la lipotoxicité, ou le manque de substrat énergétique. De plus, le taux de libération des AG par le TAE est environ deux fois supérieur à celui des autres dépôts de graisse (Marchington *et al.*, 1989). Il est également possible de distinguer le TAE des autres dépôts de graisse ectopique par une plus grande capacité à absorber les AGL et un taux plus faible d'utilisation du glucose, suggérant une grande plasticité dans l'activité du métabolisme lipidique (Iacobellis & Bianco, 2011).

Les adipocytes épicardiques sont plus petits que les adipocytes sous-cutanés et viscéraux (Caprio *et al.*, 2011), et l'une des particularités de ces adipocytes est leur phénotype beige (Sacks *et al.*, 2013). En effet, les équipes de Sacks et Chechi ont émis l'hypothèse que les adipocytes du TAE génèrent de la chaleur en réponse à des températures froides, en activant notamment le système nerveux autonome (Chechi *et al.*, 2019; Sacks *et al.*, 2009). Cela a conduit à une autre fonction potentielle du TAE, qui serait la protection du cœur contre l'hypothermie. Ainsi, le caractère beige du TAE offrirait de nombreuses opportunités dans la compréhension de son rôle physiologique et permettrait de découvrir de nouvelles cibles moléculaires afin de prévenir les MCV. »

2. TAE et fonction endocrine

« Plus qu'un simple dépôt de graisse, le TAE est de plus en plus reconnu comme un organe endocrinien et la source de nombreuses molécules bioactives capables de moduler l'homéostasie du myocarde et des artères coronaires (Baker *et al.*, 2006; Fain *et al.*, 2010; O. Gruzdeva *et al.*, 2019; O. V. Gruzdeva *et al.*, 2017). Deux principales hypothèses existent pour expliquer l'impact de la sécrétion de certaines molécules par le TAE sur les artères coronaires (Iacobellis, 2014; Sacks & Fain, 2007). Dans un premier temps, la signalisation paracrine qui suppose que les adipokines dérivées du TAE diffusent directement à travers les couches (adventice, média et intima) de la paroi vasculaire afin d'interagir avec le muscle lisse (Butcovan *et al.*, 2020; Fain *et al.*, 2010; Zhuang *et al.*, 2017). Ensuite, l'hypothèse de la signalisation vasocrine, qui implique que les adipokines et les AGL entrent directement dans le vasa vasorum et sont transportés en aval dans la paroi artérielle (Gaborit *et al.*, 2017; Sacks & Fain, 2007). Mais plus récemment, un nouveau mode de communication a été mis en évidence, impliquant des VEs contenant diverses cytokines et microARN (Shaihov-Teper *et al.*, 2021). Dans un article, Shaihov-Teper *et al.* ont démontré que le TAE est capable d'envoyer des VEs transportant des molécules pro-inflammatoires, pro-fibrotiques et pro-arythmiques vers les oreillettes dans un contexte de fibrillation atriale (Shaihov-Teper *et al.*, 2021).

Parmi les molécules bioactives sécrétées par le TAE, notre équipe et d'autres ont identifié des interleukines (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10), de l'adiponectine, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1), l'adrenomedulline, la phospholipase A2 ($sPLA_2$-IIA), le facteur de nécrose tumorale β (TNF-β), la protéine chimiotactique des monocytes 1 (MCP-1), l'omentine, la leptine, la visfatine ou encore la résistine (**Figure 28**) (Cherian *et al.*, 2012; Dutour *et al.*, 2010; Sacks *et al.*, 2011; Silaghi *et al.*, 2007).

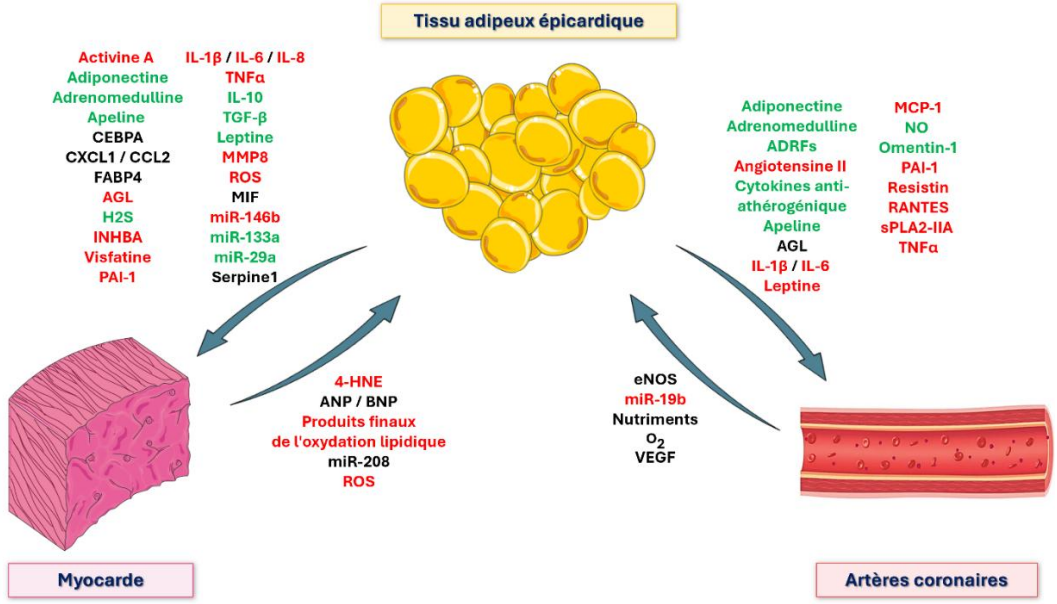


Figure 28 | Crosstalk entre le tissu adipeux épicardique (TAE) et le système cardiovasculaire

Une interaction locale se produit entre le TAE (adipocytes épicardiques et autres cellules composant le TAE) et le système cardiovasculaire (myocarde et artères coronaires). Des signaux physiologiques et pathophysiologiques, tels que des cytokines, des adipokines ou des fibrokines, peuvent être libérés du TAE vers les cardiomyocytes (et du myocarde vers le TAE) ou vers les cellules endothéliales des artères coronaires (**flèches**). Ces cytokines peuvent avoir des effets protecteurs et/ou bénéfiques (**vert**) ou des effets nocifs (**rouge**). Les effets d'autres molécules telles que celles en **noir** ne sont pas encore bien établis ou sont controversés. (*Abbréviations définies dans la table des abbréviations*)

Bien que certaines de ces molécules aient des effets physiologiquement positifs, comme l'adiponectine ou l'omentine, le déséquilibre entre les adipokines protectrices et délétères sécrétées par le TAE peut contribuer au phénotype pro-inflammatoire associé à la dysfonction endothéliale et à l'athérogenèse (Gaborit *et al.*, 2013). En effet, en conditions physiologiques, certaines adipokines sécrétées par la graisse épicardique, comme l'adiponectine, l'adrénomédulline et l'omentine, protègent le système vasculaire contre le stress oxydatif, régulent le tonus vasculaire artériel et améliorent la fonction endothéliale (Marchington *et al.*, 1989). L'adrénomédulline et ses récepteurs exprimés dans le TAE sont régulés par l'état coronarien, et cette hormone peut jouer un rôle cardioprotecteur en inhibant le stress oxydatif (Silaghi *et al.*, 2007). En revanche, des effets nocifs de cytokines pro-inflammatoires exprimées par le TAE, telles que l'IL-1β, l'IL-6, le TNF-β, le PAI-1, et la MCP-1, ont également été rapportés (Gaborit *et al.*, 2013) (**Figure 28**). En 2008, Cheng *et al.* ont montré que les niveaux tissulaires de leptine, de visfatine, d'IL-6 et de TNF-β étaient plus élevés dans le TAE de patients atteints de coronaropathie par rapport aux patients non atteints de CAD (Cheng *et al.*, 2008). Des niveaux accrus de TNF ou de ses récepteurs solubles ont été impliqués dans les lésions d'ischémie-reperfusion, de myocardite de greffe cardiaque, ainsi que dans la progression de l'insuffisance cardiaque congestive (Ferrari, 1999; Volpato *et al.*, 2001; Zhuang *et al.*, 2017). Des adipo-fibrokines telles que l'activine-A ou les métalloprotéinases matricielles participent également au remodelage de la matrice extracellulaire et pourraient être impliquées dans la fibrogenèse (Gaborit *et al.*, 2017). D'autre part, non seulement le TAE peut influencer le cœur et les artères coronaires, mais il peut aussi recevoir des signaux biologiques du cœur et ainsi modifier en retour son sécrétome, indiquant une interaction bidirectionnelle entre le TAE et le système cardiovasculaire (Akoumianakis & Antoniades, 2017). Des chercheurs ont notamment remarqué que dans le TAE, l'expression du gène codant pour l'adiponectine, *ADIPOQ*, était positivement associée au stress oxydatif myocardique (Akoumianakis & Antoniades, 2017;

Antonopoulos *et al.*, 2016), probablement via un mécanisme adaptatif. Habituellement, une expression accrue d'*ADIPOQ* est corrélée à une réduction de la production de la NADPH oxydase $O_2(-)$ dans le myocarde. Mais dans l'étude d'Antonopoulos et collègues, cette interaction entre le myocarde et le TAE se traduit par l'induction d'$O_2(-)$ dans les cardiomyocytes H9C2. Cela entraîne la production de facteurs transférables du cardiomyocyte qui augmentent l'expression de l'adiponectine dans le TAE via PPAR-γ (Antonopoulos *et al.*, 2016). Ce travail a montré que non seulement le TAE peut communiquer avec le myocarde, mais que l'inverse est également vrai. »

3. Implications du TAE dans les maladies cardiovasculaires

« Comme indiqué précédemment, la localisation particulière de ce TA lui permet de communiquer directement avec les cardiomyocytes, ainsi qu'avec la paroi vasculaire des artères coronaires. Des preuves récentes suggèrent que le TAE joue un rôle important dans le développement d'un profil de risque métabolique et cardiovasculaire défavorable (Clément *et al.*, 2009; Dutour *et al.*, 2010; Greif *et al.*, 2009; Silaghi *et al.*, 2008). En effet, l'accumulation de graisse autour du cœur est un facteur bien établi associé au développement de MCV, de CAD, de FA et d'insuffisance cardiaque. »

a) Maladie coronarienne

« De nombreuses études ont montré que le TAE est significativement corrélé à l'induction et à la sévérité de la CAD. Dans une vaste étude cas-témoin, la *MESA* (*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*), l'augmentation du volume du TAE a été associée à un risque accru de développer une CAD chez des adultes sans antécédents de MCV, suggérant qu'un volume élevé de TAE pourrait prédire des événements coronariens majeurs (Ding *et al.*, 2009). D'autres études cas-témoin ont identifié le volume de TAE comme un puissant prédicteur d'ischémie myocardique (Hell *et al.*, 2016). Dans un essai prospectif récent, Mahabadi *et al.* ont montré que le volume de TAE prédisait de manière significative les événements coronariens à 8 ans, indépendamment des facteurs de risque cardiovasculaire classiques et du CAC score (score de calcification des artères coronaires) (Mahabadi *et al.*, 2013).

Le TAE semble également être impliqué dans les premiers stades de l'athérogenèse. En effet, dans une étude utilisant le cold-pressor test (test au froid), notre équipe a montré, chez des volontaires minces en bonne santé, une corrélation négative entre la quantité de TAE et la vasodilatation coronaire microvasculaire, une anomalie détectable avant l'apparition de la CAD, suggérant que le TAE pourrait être impliqué dans la dysfonction endothéliale (Gaborit *et al.*, 2012). Chez les sujets asymptomatiques, le TAE a été associé à la présence et à la progression de l'athérosclérose des artères coronaires, notamment chez les jeunes sujets ayant un CAC score faible, suggérant que le TAE pourrait favoriser le développement précoce de l'athérosclérose (Bachar *et al.*, 2012; Yerramasu *et al.*, 2012). Toutes ces découvertes soutiennent l'hypothèse du rôle du TAE dans la promotion des premiers stades de la formation de plaques athéroscléreuses. Les mécanismes par lesquels le TAE peut provoquer l'athérosclérose restent cependant encore mal compris.

La graisse épicardique pourrait altérer les artères coronaires par plusieurs voies. En raison de la sécrétion de molécules inflammatoires bioactives, le TAE est désormais reconnu comme

étant impliqué dans la formation de plaques athéroscléreuses et le début de la CAD (Y. Hirata, Kurobe, *et al.*, 2011; Mazurek *et al.*, 2003). De plus, chez les patients atteints de CAD, le TAE a montré une expression accrue des gènes impliqués dans le stress oxydatif (Dozio *et al.*, 2014), et il est bien établi que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) altère la fonction myocardique et réduit le nombre de cardiomyocytes vitaux (Fioranelli *et al.*, 2018). De nombreuses équipes de recherche travaillent sur les molécules candidates du TAE susceptibles d'être impliquées dans la CAD. Notre équipe a par exemple démontré que la $sPLA_2$-IIA, identifiée comme un facteur de risque indépendant pour la CAD via l'augmentation de LDL oxydés, présentait une expression accrue dans le TAE des patients atteints de cette pathologie (Dutour *et al.*, 2010). D'autres candidats, tels que la catalase, l'anhydrase carbonique 1 (CAH1), la phosphoglycérate mutase 1 (PGAM1), la glutathion S-transférase P (GSTP1) et la protéine disulfure-isomérase (PDIA1), liés aux voies du stress oxydatif, ont montré des différences protéomiques dans le TAE par rapport au TAsc chez les patients atteints de CAD (Salgado-Somoza *et al.*, 2010). Toutes ces protéines, à l'exception de la catalase et de la CAH1, étaient augmentées dans le TAE par rapport au TAsc, et la production de ROS était plus élevée dans le TAE que dans le TAsc chez les patients atteints de CAD. Cependant, ces découvertes sont des études associatives, et la causalité des ROS dérivés du TAE dans la CAD reste à démontrer.

Le TAE pourrait entraîner une dysfonction endothéliale et un remodelage vasculaire en sécrétant des acides gras et des médiateurs pro-inflammatoires et en induisant l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales ainsi que l'activation des macrophages (Y. Hirata, Tabata, *et al.*, 2011; Karastergiou *et al.*, 2010). Des études *in vitro* ont montré une augmentation des mastocytes dans l'adventice des lésions coronariennes (Y. Hirata, Tabata, *et al.*, 2011). De plus, la présence de macrophages et de mastocytes dans le TAE pourrait contribuer à l'instabilité sous-jacente des vaisseaux, ce qui peut conduire à la rupture de plaques (Prati *et al.*, 2003). Des études récentes utilisant des approches d'apprentissage profond, d'intelligence artificielle (IA), ainsi que des méthodes d'imagerie associées à de la radio-transcriptomique ont amélioré la caractérisation fonctionnelle du TAE, avec la détection de l'inflammation du TA périvasculaire et du remodelage de la matrice extracellulaire, ce qui a conduit à une amélioration marquante de la prédiction du risque cardiaque chez les individus à haut risque (Oikonomou *et al.*, 2019, 2021). »

b) Fibrillation atriale (FA)

« Un nombre croissant de preuves suggère que le TAE peut avoir un impact dans la pathogenèse de la FA (Wong *et al.*, 2011; Nagashima *et al.*, 2011; Nakanishi *et al.*, 2012; K.-I. Cho *et al.*, 2015). De nombreuses études ont montré une association entre la quantité de TAE et le risque, la gravité et la récurrence de la FA après une ablation ou une cardioversion électrique.

L'augmentation du volume total de TAE a été associée à la prévalence de la FA. Thanassoulis *et al.* ont par exemple rapporté une corrélation significative entre le volume de TAE et le risque de FA, indépendamment des autres mesures d'adiposité et facteurs de risque de FA (Thanassoulis *et al.*, 2010). De la même manière, Nakanishi *et al.* ont mis en évidence que le volume de TAE péri-auriculaire prédisait le développement d'une FA *de novo* chez les patients atteints de CAD, indépendamment de la présence d'hypertension, de diabète ou d'une dilatation de l'oreillette gauche (Nakanishi *et al.*, 2012). De plus, de nombreuses études ont

montré que le TAE, entourant les oreillettes en particulier, était lié à la récurrence de la FA après une thérapie par ablation (Al Chekakie *et al.*, 2010; Nakanishi *et al.*, 2012).

L'absence de fascia séparant le TAE du myocarde favorise les infiltrats inflammatoires dans la paroi auriculaire, ce qui pourrait déclencher des arythmies (Frustaci *et al.*, 1997; Yamashita *et al.*, 2010). Les adipokines sécrétées par le TAE pourraient contribuer au remodelage structurel du myocarde auriculaire, favorisant ainsi la fibrose. Ce remodelage pourrait renforcer la perte de connexion des cellules, altérant la propagation de l'onde de dépolarisation et conduisant à des défauts de conduction : formation de microcircuits et réentrée des impulsions électriques (Hatem & Sanders, 2014; Poggi *et al.*, 2022). La quantité de TAE pourrait également avoir un effet mécanique sur le remplissage des ventricules gauche (VG) et droit (VD), entraînant progressivement une dilatation des oreillettes, qui est l'un des facteurs de risque de FA (Iacobellis *et al.*, 2007). »

c) Morphologie et fonction cardiaque

« Comme mentionné plus haut, le TAE est anatomiquement et cliniquement lié à la morphologie et à la fonction cardiaque. Une augmentation de la quantité de TAE a été associée à une augmentation de la masse du VG et à une géométrie anormale du VD (Gaborit *et al.*, 2017). Chez les patients sans MCV, la masse du VG est corrélée à l'épaisseur du TAE mesurée par échocardiographie (Iacobellis *et al.*, 2004). De plus, une augmentation de la masse myocardique lors de l'hypertrophie du VG est associée à une augmentation proportionnelle de la masse de TAE (Corradi *et al.*, 2004). L'augmentation de la masse du VG et l'hypertrophie du VG sont des facteurs de risque indépendants de mortalité cardiovasculaire et de la mortalité toutes causes confondues. Il est donc supposé que l'ajout du facteur TAE cause une masse supplémentaire sur les deux ventricules, ce qui peut accroître les exigences de travail cardiaque et entraîner une hypertrophie du VG. »

4. Composition cellulaire du TAE

« La FVS épicardique comprend de nombreuses cellules nerveuses, nodales et immunitaires, qu'elles soient inflammatoires ou non, en plus des cellules stromales (Iacobellis *et al.*, 2005; Mazurek *et al.*, 2003). Parmi les cellules du SI présentes dans le TAE, on trouve des cellules adaptatives, notamment des LT et LB, ainsi que des cellules innées telles que des macrophages, des mastocytes et des cellules dendritiques. Le **Tableau 3** fournit une comparaison de la présence ou de l'absence des sous-types de cellules immunitaires dans le TAE et le TAV par rapport au TAsc chez la souris et l'humain dans le contexte de l'obésité. »

Cellules immunitaires dans le tissu adipeux dans le contexte de l'obésité et complications associées

Cellules immunitaires			TAE		TAV	
			TAE	Références	TAV	Références
Cellules immunitaires innées	Macrophages	M1	↑	Hirata *et al.*, 2011 Vianello *et al.*, 2016 Gurses *et al.*, 2017	↑	Wisnewsky *et al.*, 2009 Aron-Wisnewsky *et al.*, 2009 Morris *et al.*, 2011
		M2	↓	Hirata *et al.*, 2011 Vianello *et al.*, 2016 Gurses *et al.*, 2017	↓	Wisnewsky *et al.*, 2009 Aron-Wisnewsky *et al.*, 2009 Morris *et al.*, 2011
	Eosinophiles		N/A	-	↑	Wu D *et al.*, 2011 Molofsky *et al.*, 2013
	Mastocytes		↑	Laine *et al.*,1999 Mazurek *et al.*, 2003 Rozsívalová *et al.*, 2020	↑	Divoux *et al.*, 2012 Shi and Shi 2012
	Neutrophiles		Présence	Vyas *et al.*, 2021	↑	Carmon *et al.*, 2008 Talukdar *et al.*, 2012
	Natural killers		↓	Mráz *et al.*, 2019	↑ ↑	O'Rourke *et al.*, 2013 Trim *et al.*, 2018 Lee *et al.*, 2016 Wensveen *et al.*, 2015
	Cellules dendritiques		↑	Mráz *et al.*, 2019 Horcksman *et al.*, 2017	↑ ↑	Berthola *et al.*, 2012 Bapat *et al.*, 2015
	Cellules lymphoïdes innées (ILC)	ILC1	N/A	-	↑	Everaere *et al.*, 2017
		ILC2	N/A	-	↓	Everaere *et al.*, 2017
		ILC3	N/A	-	N/A	-
Cellules immunitaires adaptatives	Lymphocytes T	LTreg	↑	Kologrivova *et al.*, 2025	↑	Feuerer *et al.*, 2009 Bapat *et al.*, 2015
		CD4+	↑	Vyas *et al.*, 2021	↓ / ↑	Nishimura *et al.*, 2009 Lee *et al.*, 2016
		CD8+	↑	Hirata *et al.*, 2011	↑ ↑	Duffaut *et al.*, 2009 Bapat *et al.*, 2015
	Lymphocytes B		↑	Mráz *et al.*, 2019	↑	Bapat *et al.*, 2015

Tableau 3 | Tableau récapitulatif de la présence ou de l'absence d'infiltration immunitaire dans le TAE vs TAV par rapport au TAsc dans le contexte de l'obésité et des MCV.

Les flèches représentent une augmentation (flèches vers le haut) ou une diminution (flèches vers le bas) des cellules dans le TAE ou le TAV par rapport au TAsc référencé chez la souris (**orange**) et chez l'homme (**bleu**). N/A : absence d'observation.

« Dans le TAE de patients CAD, des études ont montré l'existence d'une infiltration de **macrophages**, reliant la polarisation de ces derniers à l'état coronaire des patients (Gurses *et al.*, 2017; Y. Hirata, Tabata, *et al.*, 2011; Vianello *et al.*, 2016). De façon intéressante, Hirata *et al.* ont caractérisé le phénotype de ces macrophages et ont démontré que les macrophages M1 étaient augmentés, et les macrophages M2 réduits dans le TAE des patients CAD par rapport aux patients non-CAD (Y. Hirata, Tabata, *et al.*, 2011). Récemment, une étude a également suggéré qu'un nombre élevé de macrophages semblait être associé à une détérioration sévère de la fonction cardiaque chez les patients CAD (Butcovan *et al.*, 2020).

D'autres cellules innées sont présentes dans le TAE, parmi lesquelles on retrouve des **DC**. Mráz *et al.* ont rapporté pour la première fois en 2019 la présence des deux types de DC (conventionnelles et plasmacytoïdes) dans le TAE humain (Mráz, Cinkajzlová, Kloučková, Lacinová, Kratochvílová, Lipš, Pořízka, Kopecký, Lindner, *et al.*, 2019). Ils ont également démontré que les pDC étaient significativement augmentées dans le TAE des patients atteints de DT2 par rapport aux patients non diabétiques. Mazurek *et al.* ont également démontré par immunohistochimie la présence de **mastocytes** dans le TAE (Mazurek *et al.*, 2003).

De plus, une étude plus récente ayant quantifié les mastocytes dans le TAE, le TAsc et le myocarde auriculaire droit de patients opérés à cœur ouvert, a montré une augmentation du

nombre de cellules dans le TAE des patients atteints de CAD vs non-coronariens (Rozsívalová et al., 2020). Dans une autre étude, Mráz *et al.* ont rapporté un nombre réduit de cellules **NK** dans le TAE des patients CAD et non-CAD par rapport au TAsc (Mráz, Cinkajzlová, Kloučková, Lacinová, Kratochvílová, Lipš, Pořízka, Kopecký, Pierzynová, et al., 2019).

En 2019, la même équipe a également mis en évidence la présence de cellules du SI adaptatif dans le TAE (Mráz, Cinkajzlová, Kloučková, Lacinová, Kratochvílová, Lipš, Pořízka, Kopecký, Pierzynová, *et al.*, 2019). Ils ont ainsi comparé les proportions des sous-types de **lymphocytes** en utilisant la cytométrie et l'immunohistochimie entre le TAsc et le TAE de patients avec et sans CAD. Ils ont alors montré un contenu en LT plus élevé dans le TAE des sujets atteints de CAD par rapport aux patients non-CAD. De plus, les LB représentaient un pourcentage plus élevé des lymphocytes totaux dans le TAE par rapport au TAsc. Cependant, une évaluation plus complète des différentes sous-populations de LT dans le TAE, ainsi que leur relation avec la CAD, fait encore défaut.

L'exploration de certaines cellules immunitaires non conventionnelles reste encore à être étudié dans le TAE. Parmi elles, on retrouve par exemple les **iNKT** (Bendelac *et al.*, 2007) et les cellules lymphoïdes innées de type 2 (**ILC2**). Ces cellules sont connues pour maintenir la sensibilité à l'insuline chez les souris minces et ont un rôle dans le beiging notamment via le recrutement d'éosinophiles par l'IL-5 et le maintien des macrophages M2 par l'IL-13 (Molofsky *et al.*, 2013; Nussbaum *et al.*, 2013). D'autres cellules encore, telles que les LTγδ n'ont pas encore été étudiées dans le TAE. Dans le TA, elles représentent entre 5 et 15 % des LT totaux (Kohlgruber *et al.*, 2018). Kohlgruber *et al.* ont découvert que les LTγδ produisant de l'IL-17A étaient le facteur moteur de la production d'IL-33 par les cellules stromales, ce qui, à son tour, favorise le maintien de la population de Treg adipeux (Kohlgruber *et al.*, 2018). Les auteurs ont également montré que les souris dépourvues de LTγδ n'étaient pas capables de réguler leur température corporelle centrale après un défi au froid. En effet, leurs données suggèrent que l'axe LTγδ/IL-17A favorise la thermogenèse.

5. Phénotype beige du TAE

a) Preuves du phénotype beige du TAE

« Avant l'apparition du terme « adipocytes beiges » dans le TAE, les chercheurs avaient décrit ce tissu comme fonctionnant tel un TA brun (Iacobellis *et al.*, 2005; Sacks *et al.*, 2009). Sacks *et al.*, dans une analyse transcriptionnelle de marqueurs du TA brun au sein du TAE humain, ont conclu que, puisque *UCP-1*, *PRDM16* et *PGC-1α* étaient surexprimés dans ce tissu comparé à d'autres dépôts de graisse, le TAE pourrait fonctionner comme de la graisse brune (Sacks *et al.*, 2009). » Ils ont notamment montré que l'expression de l'UCP-1 était cinq fois plus élevée dans le TAE que dans la graisse sous-sternale et indétectable dans le TAsc. « Leur étude les a amenés à penser que le TAE pouvait être un moyen de défense du myocarde et des coronaires contre l'hypothermie et protéger le cœur de l'ischémie ou de l'hypoxie (Sacks *et al.*, 2009). En 2013, une autre étude du profil d'expression génique du TAE a révélé la présence de CD137, un marqueur spécifique des adipocytes beiges, et une analyse histologique a montré de petits adipocytes uniloculaires dans le tissu (Sacks *et al.*, 2013). Cette même étude a montré des niveaux significativement augmentés d'UCP-1 dans les mitochondries du TAE par rapport aux TAsc paracardial, abdominal et sternal. De plus, les auteurs ont ajouté que les concentrations

de la protéine dans le TAE étaient comparables à celles trouvées dans le TA brun péricardique prélevé chez des agneaux nouveau-nés. La même année, dans une cohorte de patients CAD, Chechi *et al.* observaient une expression élevée d'ARNm d'UCP-1 dans le TAE, ainsi qu'une corrélation avec les niveaux de lipides circulants (Chechi *et al.*, 2013). Suggérant par ailleurs que le beiging du TAE pourrait avoir des effets systémiques sur le métabolisme des lipides (Chechi *et al.*, 2013).

Étant donné que des preuves croissantes suggèrent que les lipides jouent un rôle dans le phénomène de beiging (Barchuk *et al.*, 2020), notre équipe a réalisé une étude lipidomique non ciblée sur le TAE et le TAsc de patients CAD vs non-CAD. Ce travail a montré pour la première fois que le TAE et le TAsc avaient des profils lipidomiques indépendants. Deuxièmement, nous avons mis en évidence que six espèces de plasmalogènes étaient significativement enrichies dans le TAE par rapport au TAsc. Cette augmentation spécifique des plasmalogènes pourrait refléter une activité thermogénique du TAE par rapport au sous-cutané (Barchuk *et al.*, 2020). En effet, Park *et al.* ont suggéré que la manipulation de la production de plasmalogènes par des approches diététiques ou pharmacologiques pourrait améliorer l'état thermogénique des adipocytes beiges (Park, He, Tan, *et al.*, 2019). L'invalidation spécifique dans les adipocytes du facteur de biogenèse peroxysomale Pex16 chez la souris (Pex16-AKO) a altéré la tolérance au froid, réduit la dépense énergétique et augmenté l'obésité induite par l'alimentation chez ces animaux. La déficience en Pex16 a bloqué la fission mitochondriale induite par le froid, diminué le nombre de copies mitochondriales et provoqué une dysfonction mitochondriale. Cela a mis en évidence que les lipides dérivés des peroxysomes régulent la thermogenèse adipeuse en médiant la fission mitochondriale induite par le froid. Par conséquent, la fonction des plasmalogènes dans le TAE mérite plus de recherches et le possible beiging du TAE induit par les plasmalogènes nécessite de plus amples investigations.

D'autres traitements diététiques ont été suggérés comme étant impliqués dans le beiging du TAE, tels que l'extrait d'ail vieilli. Ahmadi *et al.* ont montré que l'extrait d'ail vieilli était associé à une augmentation du TAE brun et empêchait la progression du CAC score (Ahmadi *et al.*, 2013).

En utilisant une approche pangénomique, notre groupe de recherche a apporté des preuves supplémentaires du profil beige du TAE humain (Gaborit *et al.*, 2015). En effet, dans l'étude EPICAR visant à déterminer le profil transcriptomique spécifique du TAE, notre équipe a montré que le TAE péri-ventriculaire pourrait être très sensible au beiging. En particulier, nous avons montré que le TAE exprimait certains gènes spécifiques des TAs thermogéniques tels que *UCP-1*, l'actine alpha 1 (*ACTC1*) ou le coactivateur gamma du récepteur PPAR (*PPARGC1A*). De plus, le gène commun aux TA blanc et beige, *HOXC9*, était significativement sous-exprimé dans le TAE par rapport au TAsc. Tout cela suggère que le TAE présente un phénotype beige.

Plus récemment, une autre étude utilisant du séquençage nouvelle génération a comparé les signatures génétiques du TAE, du TAsc et du TA médiastinal (mAT) (Chechi *et al.*, 2019). Dans ce travail, les auteurs ont identifié des voies liées au métabolisme des lipides associées à la thermogenèse dans le TAE mais pas dans le mAT ou le TAsc. De plus, une association entre des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras et dans la différenciation de la graisse blanche en graisse brune avec le GLP-1R du TAE a été décrite (Dozio *et al.*, 2019). En effet, le

TAE exprime le GLP-1R à la fois au niveau génique et protéique, et il a été démontré que les analogues du GLP-1 (GLP-1A) ont des effets cardiovasculaires bénéfiques importants allant au-delà de leurs actions antidiabétiques, avec une réduction substantielle du TAE chez les patients diabétiques et obèses traités avec des GLP-1A(Baldassano *et al.*, 2016; Dutour *et al.*, 2016). Dozio *et al.*, qui ont démontré l'association entre les gènes de l'oxydation des acides gras et le GLP-1R du TAE, ont montré que les GLP-1A, en ciblant le GLP-1R du TAE, pourraient réduire l'adipogenèse locale et induire la différenciation en graisse brune (Dozio *et al.*, 2019). Par conséquent, il est tentant de spéculer sur une stratégie ciblant le GLP-1R pour inverser le dérèglement métabolique du TAE. »

b) Proposition de facteurs beigisants dans le TAE

« Chechi *et al.* ont rapporté que le TAE est caractérisé par une surreprésentation des voies liées à l'immunité, le rapprochant ainsi plus du mAT que du TAsc (Chechi *et al.*, 2019). De plus, ils ont constaté que le TAE était enrichi en voies liées aux LT, telles que la signalisation ICOS-ICOSL, la différenciation des LT auxiliaires ou la voie Th2. Cette dernière voie de signalisation a été largement étudiée ces dernières années dans l'implication du beiging. Il est donc possible d'imaginer que ces voies liées à l'immunité puissent contribuer au beiging de la graisse épicardique (**Figure 29**). Malheureusement, peu d'études ont jusqu'à présent démontré l'implication directe de ces cellules dans le statut beige du TAE. Récemment, des chercheurs ont établi qu'un membre de la superfamille du TNF, le *death receptor 3* (DR3), était exprimé dans le TAV murin, et par les ILC2 du sang périphérique humain, et dont l'activation serait induite par l'IL-33 (Shafiei-Jahani *et al.*, 2020). Ils ont également révélé que les souris traitées avec un agoniste du DR3 présentaient une augmentation significative de l'expression d'*Ucp1*, *Cidea*, *Prdm16*, *Pgc1a* et *Dio2* au niveau transcriptomique dans le TAV. Il reste à déterminer si ces facteurs pourraient avoir un effet endocrine sur le TAE.

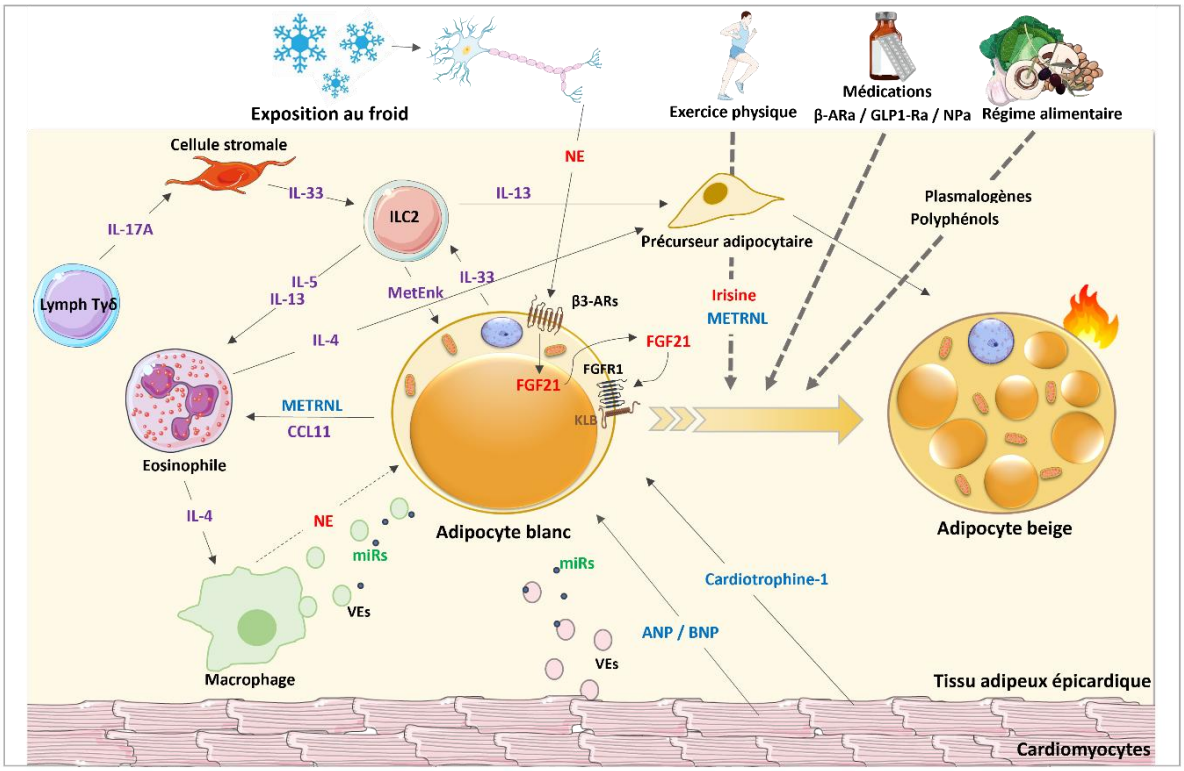


Figure 29 | Facteurs potentiels impliqués dans le beiging du TAE.

Mécanismes basés sur des travaux réalisés dans le tissu adipeux en général. Des facteurs environnementaux tels que l'exposition au froid, l'exercice physique, les traitements pharmacologiques et les régimes alimentaires sont impliqués dans le beiging des adipocytes blancs, mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore bien établis (flèches pointillées). Les facteurs de communication intercellulaire impliquant des cytokines/chimiokines (**violet**), des myokines (**bleu**), des hormones (**rouge**) et des miARN (**vert**) sont connus pour être impliqués dans le beiging du TA blanc.

En 2011, l'étude de Sacks *et al.* fournit la première preuve d'une implication directe de l'immunité de type 2 dans le TAE (Sacks *et al.*, 2011), complétée en 2012 par les travaux de Distel *et al.* (Distel *et al.*, 2012). La première étude a montré une augmentation de l'expression de l'IL-1Ra et de l'IL-10 dans le TAE de sujets atteints de troubles métaboliques ou de DT2, suggérant un rôle potentiellement bénéfique de ces adipokines dans un milieu pro-inflammatoire lié à la coronaropathie. Le traitement par la pioglitazone chez les patients DT2 avec CAD a été associé à une réduction des gènes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans le TAE et à une augmentation sélective de PPARγ dans le TAsc. La seconde étude a examiné l'effet à court terme de la rosiglitazone (un agoniste de PPARγ) sur l'expression des gènes et des protéines impliqués dans le métabolisme des acides gras dans le TAE du rat obèse (Zucker) et a comparé les niveaux d'expression avec ceux du TA rétropéritonéal. De façon intéressante, les auteurs ont noté que l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans les processus mitochondriaux, tels que *Pgc-1α*, la déshydrogénase *Nadh-1* et la cytochrome oxydase (*Cox4*), étaient augmentés par la rosiglitazone uniquement dans le TAE, avec une régulation à la hausse significative des protéines PGC-1α et COX4. Cela s'est accompagné d'une augmentation de l'expression de *Prdm-16* et *Ucp-1*, révélant que cet agoniste du PPARγ pouvait induire un beiging rapide du TAE, contribuant probablement à un renouvellement lipidique élevé dans ce tissu.

Enfin, il a été récemment démontré que les adipocytes du TAE peuvent libérer des VEs capables de pénétrer dans les cellules cardiaques par endocytose (Shaihov-Teper *et al.*, 2021) (**Figure 29**). Des données très récentes ont mis en évidence un transfert mitochondrial fonctionnel des adipocytes stressés énergétiquement vers le cœur, ce qui pourrait limiter les lésions dues à l'ischémie/reperfusion cardiaque chez la souris et prévenir la lipotoxicité (Crewe *et al.*, 2021; Loyer *et al.*, 2022). Les facteurs potentiellement impliqués dans le beiging du TAE sont résumés dans la **Figure 29**. »

c) TAE et perte du beiging ou *Whitening*

« De nombreuses preuves soutiennent les effets de l'activation du beiging dans l'amélioration de l'obésité et de ses complications cardiaques. Le phénomène inverse, la transdifférenciation du brun vers le blanc, également appelée « blanchiment du TA », a été bien moins exploré. Dans certaines circonstances physiologiques (telles que le vieillissement) et pathologiques, les adipocytes épicardiques peuvent perdre leurs fonctions cardioprotectrices et devenir pro-inflammatoires. En vieillissant, la proportion d'adipocytes bruns/beiges diminue au profit d'adipocytes blancs uniloculaires, induisant une réduction de l'activité et la fonction de la graisse beige dans le TAE, en commençant par la perte de ses propriétés thermogéniques (Iacobellis, 2021).

Ainsi, le vieillissement est capable d'influencer la fonction du TAE, notamment via la transition d'un TA brun à un TA blanc au cours de la vie adulte. D'un côté, ce phénomène peut aider à maintenir l'homéostasie thermogénique, tandis que de l'autre, il peut avoir des effets

moins bénéfiques. Dans les contexte physiopathologiques où le beiging pourrait avoir des conséquences bénéfiques, cette transdifférenciation du brun vers le blanc pourrait inverser ces effets positifs. Par exemple, dans le TAE, cette transdifférenciation a été associée à une augmentation de la production de ROS chez les patients CAD (Dozio *et al.*, 2014).

Les caractéristiques du beiging du TAE peuvent également être altérées dans les maladies chroniques avancées. Dozio *et al.* ont montré que le TAE des patients atteints de CAD était associé à une diminution des niveaux d'expression des gènes thermogéniques et à une augmentation de l'expression de gènes liés à l'adipogenèse blanche (Dozio *et al.*, 2014). En effet, ils ont démontré que les gènes liés à la graisse brune, comme *UCP-1, PGC-1α, PRDM16* et la protéine morphogénétique osseuse 7 (*BMP7*), étaient significativement plus faibles chez les patients atteints de CAD, tandis que les gènes spécifiques de la graisse blanche, comme *l'insulin like growth factor binding protein 3* (*IGFBP3*) ou encore *HOXC9* présent dans le TA blanc, étaient significativement plus élevés chez les CAD comparé aux patients non-CAD, ce qui suggère une modification de la composition du TAE chez les patients atteints de cette pathologie.

D'autres gènes potentiellement cardioprotecteurs, tels que *PGC-1α* et jouant un rôle dans le beiging des adipocytes et l'activation thermogénique, ont été suggérés. Les gènes *HO-1* (*heme Oxygenase 1)* et *PGC-1α* épicardiques pourraient moduler l'inflammation, l'activité mitochondriale et la fonction du VG. Une diminution de *HO-1, PGC-1α* et *PRDM16* dans le TAE de patients atteints de CAD comparé au TAV a été liée à un remodelage cardiaque (VG) significatif et à la dysfonction myocardique (Singh *et al.*, 2019). La même équipe a suggéré qu'au niveau du TAE des patients CAD, le génotype pourrait être plus proche de celui d'un TA blanc. Le TAE semble produire moins de ROS que le TAsc, mais lorsqu'on compare les patients CAD aux non-CAD, seuls ces derniers présentent un niveau significativement plus élevé de ROS dans le TAsc que dans le TAE. De plus, le niveau de ROS est significativement plus élevé dans le TAE des patients CAD vs non-CAD. Tous ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle la coronaropathie pourrait être associée au processus de transdifférenciation du brun vers le blanc. »

Objectif global de l'étude

Objectif global de l'étude

Au travers de l'introduction de cette thèse, nous avons pu voir que le TAE est un dépôt de graisse ectopique caractérisé par des activités lipogénique et lipolytique très importantes. Par ailleurs, nous avons pu constater que les contacts étroits qu'il entretient avec le myocarde et les artères coronaires facilitent grandement les échanges cellulaires. Bien que ce tissu singulier se caractérise par des fonctions cardioprotectrices en conditions physiologiques, nous savons maintenant que son phénotype devient plus inflammatoire avec l'obésité et l'insulinorésistance. Ainsi, les adipokines et molécules pro-inflammatoires qu'il sécrète peuvent progresser au travers de l'adventice des artères coronaires et favoriser le processus d'athérogenèse. D'autre part, il est désormais établi que la quantité de TAE prédit la survenue d'évènements cardiaques et de fibrillation atriale indépendamment des facteurs de risque cardiovasculaire classiques.

Les travaux récents de transcriptomique ont révélé un phénotype beige du TAE, via notamment la présence de certains marqueurs du beiging tels que CD137, PRDM16, PGC-1α ou encore UCP-1. En 2015, en utilisant une approche pangénomique, notre équipe a confirmé que le TAE présentait une signature adipocytaire beige.

Ce phénomène de beiging constitue aujourd'hui une stratégie thérapeutique prometteuse pour lutter contre l'obésité et les complications cardiométaboliques qui lui sont associées. Malheureusement, comme nous avons pu le décrire dans la revue publiée dans le journal *Cells* en 2022 (Doukbi *et al.*, 2022), des études de faible effectif ont mis en évidence que le beiging du TAE tendait à disparaitre avec l'âge, l'obésité ou encore les maladies coronariennes. Mieux comprendre les phénomènes impliqués dans l'acquisition des caractéristiques beiges de ce tissu, semble donc crucial.

Résultats

PARTIE 1 : Immunophénotypage du tissu adipeux épicardique

I. Objectif et contexte

La répartition régionale du tissu adipeux (TA) est l'une des principales variables expliquant l'hétérogénéité métabolique de l'obésité et des risques cardiovasculaires associés. D'après le concept d'ectopie, le TA sous-cutané (TAsc) incapable de stocker les triglycérides en excès entrainerait le développement de graisse dans des sites ectopiques, tels que le cœur. Le tissu adipeux épicardique (TAE) est un organe endocrine métaboliquement actif qui produit de nombreux facteurs capables de moduler la structure et la fonction cardiaque. La littérature récente suggère que le TAE aurait des propriétés thermogéniques et un phénotype de TA beige. Ce phénotype, caractérisé par des expressions géniques spécifiques, représente un domaine émergent de recherche. Mais en dépit de la présence de marqueurs du beiging dans ce tissu, les acteurs cellulaires et les cibles moléculaires responsables de ce phénotype restent encore à découvrir. De plus, le beiging du TAE semble décliner avec certains facteurs tels que l'âge, l'obésité ou encore la gravité de la maladie coronaire (CAD, *coronary artery disease*). En effet, en raison de la proximité du TAE avec le myocarde et les coronaires, les adipokines et les molécules pro-inflammatoires qu'il sécrète peuvent affecter directement le métabolisme du myocarde et des artères coronaires. Des études cliniques et translationnelles transversales corrélatives indiquent que l'expansion du TAE joue un rôle dans les maladies cardiovasculaires telles que la CAD, la fibrillation auriculaire (FA), ou encore l'insuffisance cardiaque (IC). Ainsi, les adipokines épicardiques basculent vers un profil pro-inflammatoire en cas d'obésité et de CAD. Cette inflammation pourrait alors être liée à un déséquilibre entre les cellules immunitaires pro- et anti-inflammatoires. C'est pourquoi, dans notre étude, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle la fraction vasculaire stromale (FVS) du TAE serait constituée entre autres de cellules immunitaires participant à la modification de son phénotype immunométabolique.

Ainsi la modulation de cibles moléculaires du TAE dans le but d'augmenter la proportion d'adipocytes beiges est une voie de recherche intéressante, car elle pourrait permettre d'améliorer le phénotype du TAE en faveur d'un phénotype plus orienté vers la thermogenèse et ainsi réduire l'environnement inflammatoire des artères coronaires enchâssées dans ce tissu, et par conséquent réduire le risque cardiovasculaire.

II. Matériels et méthodes

Dans cette partie nous proposons une section ‘matériels et méthodes’ complémentaire à celle retrouvée notre article (Doukbi *et al.*, 2024).

Cohortes

La première partie des résultats de cette thèse est basée sur deux cohortes distinctes.

- La première, **INTERFACE** pour *ImmuNiTy EpicaRdial Fat Adipose CElls*, est une cohorte prospective constituée de prélèvements multiorganes (PMO) provenant de patients en état de mort encéphalique. Le protocole INTERFACE a été approuvé par le Comité National d'Éthique de l'Agence de la Biomédecine française (numéro d'enregistrement PFS21-005). Les critères de sélection des donneurs PMO étaient sans limites d’âge, et le cœur devait avoir été préalablement récusé pour une transplantation. Dès lors, les coordinations hospitalières des prélèvements d’organes et de tissus devaient s’assurer de l’accord des familles pour des prélèvements à visée de recherche scientifique. Ceux-ci ont signé leur consentement éclairé par écrit. Les tissus ont ainsi été prélevés par les chirurgiens urologues du CHU de la Conception sur les sites de Marseille et Avignon et par les chirurgiens urologues du Centre hospitalier Toulon/La Seyne sur le site du Var.

  Pour ce travail, nous avons récupéré des biopsies de TAE, TAV, ThSAT et AbSAT pour 21 patients. La quantité de graisse initialement demandée et acceptée par l’agence de la biomédecine était d’un minimum de 50g. D’un point de vue pratique et en fonction des conditions anatomiques des patients, cette masse n’a jamais pu être prélevée. En moyenne, nous avons récolté 26,0 ± 19,2g de TAE, 37,1 ± 21,0 g de TAV, 15,4 ± 10,9g de ThSAT et 28 ,3 ±15,1g de AbSAT. Le critère d’inclusion principal pour le passage en cytométrie en flux était une masse supérieure à 15g. Pour 11 patients, les poids de TAs étaient insuffisants pour l’analyse des ILCs en cytométrie en flux et ont donc été exclus. Nous avons alors pu phénotyper les TAs de 18 patients (**Figure 30**), permettant l'identification des populations de cellules immunitaires lymphoïdes présentes au sein des différents dépôts de graisse.

  Des biopsies de chacun des 18 patients ont été conservées à -80°C dans le but de réaliser des RT-qPCR et d’avoir une signature transcriptomique complémentaire des 4 TAs.

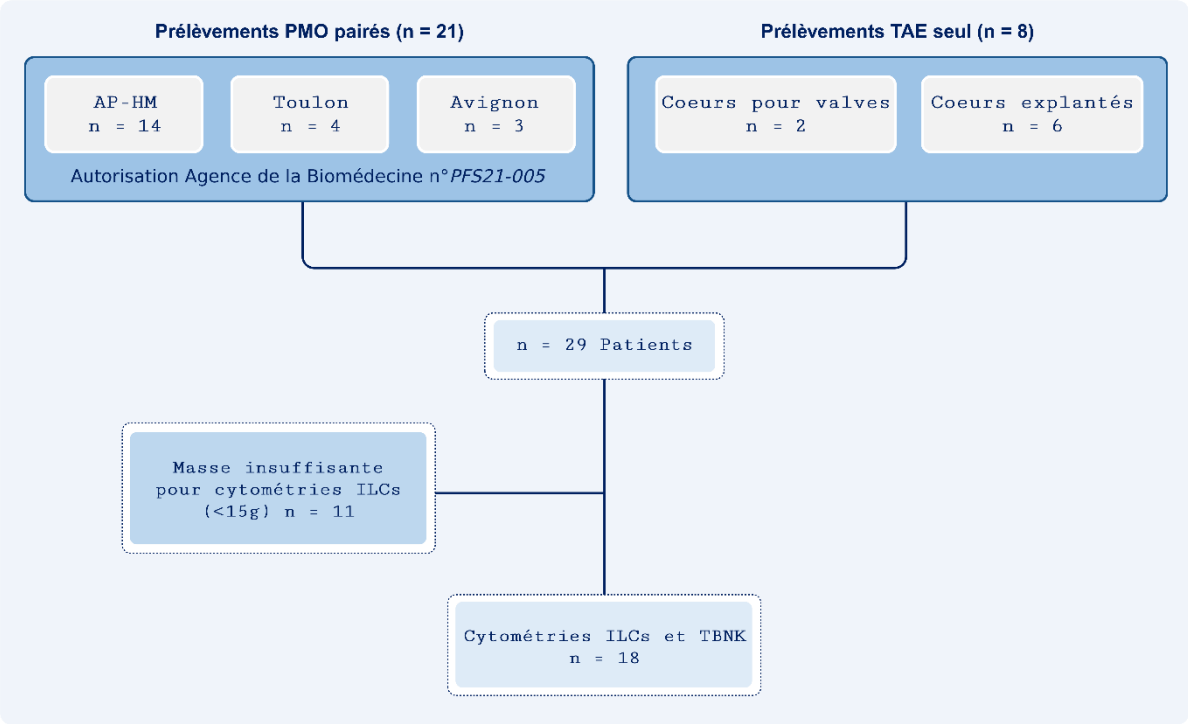


Figure 30 | Flow-chart de l'étude INTERFACE.

- La deuxième cohorte, nommée **EPICAR** : est une étude rétrospective sur des données pangénomiques précédemment récoltées par notre équipe et dont une partie des résultats a été publiée en 2015 dans le journal *Cardiovasular Research* (Gaborit *et al.*, 2015). Cette cohorte comprenait des échantillons appariés de seulement deux TAs : TAE et ThSAT pairés (n = 31) prélevés sur des patients ayant subi une intervention chirurgicale cardiaque pour un remplacement de valve ou un pontage coronarien. Cette étude transcriptomique bicentrique a été approuvée par le comité d'éthique local de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière (Paris) et de l'Hôpital de la Timone (Marseille). Tous les patients ont signé leur consentement éclairé par écrit. L'objectif de l'étude EPICAR était d'identifier les différentes signatures transcriptomiques du TAE en fonction de sa localisation anatomique (atriale, péricoronaire ou périventriculaire). Nous avons ainsi continué à exploiter ces données pangénomiques pour tenter de déterminer si le profil beige du TAE pouvait être lié à la réponse immunitaire Th2.

Méthodes | Cohorte INTERFACE

➢ Immunophénotypage

Extraction de la FVS des tissus adipeux. Après avoir récupéré les biopsies, la FVS de chaque TA est obtenue par dissociation mécanique et enzymatique. Pour cela, le tissu est coupé mécaniquement en petits morceaux de 2 à 3 mm^3 puis dissocié à la collagénase A (0,5 mg/mL, Roche) durant 30 à 45 minutes à 37°C sous agitation. Les produits de dissociation sont ensuite filtrés et centrifugés pendant 5 minutes à 550g à température ambiante. La FVS est ensuite incubée durant 10 minutes à température ambiante sous agitation douce avec un tampon de lyse des globules rouges (115 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$, 0,1 mM EDTA). Après lavage dans un tampon isotonique (PBS/ 0,1 mM EDTA), le culot est filtré sur un tamis en nylon de 100 µm.

Après centrifugation, le culot cellulaire est repris dans 1 mL de tampon FACS (PBS 1 % BSA EDTA 2mM) pour passage en cytométrie en flux.

Cytométrie en flux. Le protocole de marquage des ILCs a été adapté grâce à la collaboration et à l'expertise de l'équipe du Dr Vély qui m'a formée et mis à disposition la plateforme d'immuno-profiling de Marseille Immunopôle à l'Hôpital de la Timone. Deux séries d'analyses en cytométrie en flux ont été réalisées. Tout d'abord, les lymphocytes totaux, les LT $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ et les LB $CD19^+$ ainsi que les NK $CD3^+CD56^+$ ont été quantifiés grâce au marquage TBNK des technologies BD *Multitest* 6-couleurs et BD *Trucount* (BD Biosciences). Pour cela, 50 µL de FVS ont été incubés avec 20 µL de mix TBNK pendant 15 minutes à l'obscurité avant l'ajout d'un tampon de lyse (BD Biosciences). Les échantillons ont été analysés sur un cytomètre BD FACSCantoII (BD Biosciences) à l'aide du logiciel BD FACSCanto.

Deuxièmement, un panel précédemment utilisé pour le marquage d'ILCs à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) a été adapté et utilisé pour la première fois afin de caractériser les ILCs tissulaires (Carvelli *et al.*, 2019; Vély *et al.*, 2016). Pour cela, après centrifugation (5 min - 4°C - 645g), la totalité de la FVS est incubée avec 5 µL de Fc Block (BD Biosciences) à température ambiante pendant 10 minutes. Le panel d'anticorps comprenant le lignage (Lin) négatif composé des récepteurs des LT TCR γδ, TCR αβ, CD3, CD19, CD14, CD16, CD94, CD123, CD34, CD303, et FcεRI d'une part et la discrimination des marqueurs spécifiques d'autre part : CD45, CD127, CD7, CD56, CD161, CD117, CRTH2, CD5, CCR6, CD69, CD25, NKp44, et NKp46 ont été ajoutés aux cellules de la FVS pendant 30 minutes à température ambiante. La discrimination des 3 sous-types d'ILCs a été réalisée sur les critères suivants : les ILC1 sont définies comme $Lin^- CD127^+ CD117^- CRTH2^-$, les ILC2 comme $Lin^- CD127^+ CRTH2^+$ et les ILC3 $Lin^- CD127^+ CD117^+ CRTH2^-$. Ces données ont été acquises avec un cytomètre BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences) et analysées avec le logiciel FlowJo version 10.8.1.

➢ Analyse transcriptomique

Extraction d'ARN, RT et PCR quantitative. L'ARN a été extrait à partir du TA en utilisant le kit Pure Link RNA Mini (Life Technologies). La concentration totale d'ARN a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre BioDrop (Biochrom Ltd). La transcription inverse (RT) a été effectuée à partir de 100ng d'ARN selon les recommandations du fournisseur (Life Technologies). Les amorces de qPCR (ThermoFisher) (**Tableau 4**) ont été conçues via l'outil OligoArchitect (Sigma-Aldrich). La qPCR a été réalisée à l'aide d'Evagreen (Euromedex) sur un thermocycleur en temps réel LightCycler 480 (Roche). Comme suggéré par des études récentes sur le TA, RPLP0 gène de la grande sous-unité ribosomique, a été utilisé comme gène de référence pour normaliser les seuils de cycle (Ct) et obtenir une quantification relative (ΔΔCt) (Akamine *et al.*, 2007; Gabrielsson *et al.*, 2005).

Gène	Amorce sens	Amorce antisens
BMP7	GCATAATAGGAGGTCTGAT	CACTTGGTTAGGATGTCA
BUB1B	CATTATCACAGGCTTCAG	CTTCAAGGACATTATCTCAT
C/EBPa	GAAGCACGATCAGTCCAT	GCCAGATACAAGTGTTGATAT
CD81	GCACCTGTCCTTTCTAAC	ATGCCTGATGTTCCTTCT
CIDEA	AATAGCGAGAGTCACCTT	ACGGAGTACATCTCATACA
CPT1B	AGATGATGGCTATGGAGT	GAGAACTTGCTGGAGATG
CSF2	TCCTGAACCTGAGTAGAGA	CTGGAGGTCAAACATTTCTG
EBF2	TACCAGACATCTTGACCAT	CAATGACTAACGAGGACAG
EPSTI1	CTTCTCCTTGTCCTCATT	CCTACCAACATCACTCTAA
FABP4	AGCACCATAACCTTAGAT	CACCACCAGTTTATCATC
HMMR	AAGCAACAGGAGGAAGAC	ATAGAGGAGACGCCACTT
IL13	GCATGTCCGAGACACCAA	TTTCAGTTGAACCGTCCCT
IL25	GTAGGGCCAGTGAAGATG	TCAAGTCTCTGTCCAACTC
IL33	GGTGTTGATGGTAAGATGTTA	AGAGTGTTCCTTGTTGTTG
IL4	AACTAATTGCCTCACATTG	CTAGCAGGAAGAACAGAG
IL5	AACCAATTCCTAGACTACCT	AATGTCCTTCTCCTCCAA
IL9	ATCAACTTCCTCATCAACAA	ACAACTGGTCACATTAGC
KIF23	CAGTTGTCCTTGGTAGAT	GTTCTTAGCGTCATTAGTG
KLRG1	CAAGATAGCAGTCAATTCG	CTCTCCTTATGTATGTCCAA
MCM6	AATGGCTACAATGAAGAC	GCACAATAAGGTTAGAGAT
MELK	TATGATTGGTGTGAAGATG	TAAGGCTGGAGTTAATGA
NDUFB6	CAGTAAGCCGAGATAGTG	TGTCAGATCATAGTTGGAATA
NRF1	TCCAGCATAACAGAAGCA	TCAGAAGAGGAGACAAGAG
PPARg	GCATCTCCACCTTATTATTC	ACAGACACGACATTCAAT
PPARGC1A	GATGACAGCGAAGATGAA	GAAGAACAAGAAGGAGACA
PRDM16	CATGGTTCATTCCGACTT	GATGGTGAGACTCTACGA
SHOX2	GCTCAATCAGTATTAGTT	ATCAACATATCTTACACAA
SIRT5	GAAGTCTGTATTATATTGATGTCT	TCTGTAGTTCTAATGCTTGA
SLC2A4	TATGTTGCGGAGGCTATG	TTAAGAAGGTGAAGATGAAGAAG
TBX1	GCCACATTATTCTGAATT	ATATTTCTCGCTATCTTTG
TBX20	GGATGAGAGTCAGACAAC	AACTGGAAGAAGATGATACC
TCF21	AAGAACCAGGAGAACAAC	CAGACTCGCTTACTTGAA
TIMM23	GGCTAATACTCTAGGTTCT	ACTGTGTTAAGGTCATCT
TMEM26	TGTAATAAGATAACTGACT	CAACTATGGCAATAATAC
ALPL	TGCCTTACTAACTCCTTA	CATATTTCAGTGTCTCTTG
TNFRSF9	AAGAAGAAGAAGGAGGAT	GTATTATGTAGGATGGTGTT
UCP1	TACAGAATAATAGCAACAAC	CCTCCTTCATTAGATCATAT
UCP2	TCGTCTTGTTGCTGATTA	GATGCTGATTTCCTGCTA
UCP3	TGATGTTCGTAACCTATGAG	GCCTTCTTGTCTTGTTCA
UHRF1	TTGTTGTTAGCACTGAAT	CCTCTTGTAAGTTCTCAC

Tableau 4 | Amorces utilisées pour l'analyse transcriptomique de l'étude INTERFACE.

Méthodes | Cohorte EPICAR

➢ Analyse transcriptomique

Analyse rétrospective de TAE et ThSAT. Pour cette étude pangénomique EPICAR (Gaborit *et al.*, 2015) une nouvelle analyse bioinformatique a été réalisée à partir de données antérieures ARN de TAE et ThSAT issues de puces Illumina HumanHT-12 version 4, (47 231 sondes / 28 688 transcrits). Une analyse en composante principale a été réalisée afin de vérifier les données.

Après sélection des gènes des voies Th2 ou beige (Carpentier *et al.*, 2023; Doukbi *et al.*, 2022), une analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLS-DA) a permis de sélectionner les sondes étant les plus modulées dans les 2 voies (Variable Importance in Projection > 0,8). Une analyse multibloc a ensuite permis d'établir un score composite pour chaque échantillon et pour chaque voie étudiée (Th2 ou beige) à l'aide du logiciel SIMCA (Sartorius). Une analyse de corrélation a ensuite été effectuée à partir des résultats obtenus. Le **Tableau 5** ci-dessous

regroupe l'ensemble des gènes du beiging et de la réponse immunitaire Th2 ayant été sélectionnés pour l'analyse transcriptomique rétrospective.

	Gènes	Nom complet
Gène de la réponse Th2	AREG	Amphiregulin
	BIRC5	Baculo viral IAP repeat containing 5
	BUB1B	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B
	CCNB1	Cyclin B1
	CSF2	Colony stimulating factor 2
	DTL	Denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog
	GATA3	GATA binding protein 3
	HMMR	Hyaluronan-mediated motility receptor
	ICOS	Inducible T cell costimulator
	IL2	Interleukine
	IL4	
	IL5	
	IL9	
	IL13	
	IL25	
	IL33	
	KIF23	Kinesin family member 23
	KLRG	Killer cell lectin-like receptor G
	MCM6	Minichromosome maintenance com plex component 6
	MELK	Maternalembryonic leucine zipper kinase
	RAD51AP1	RAD51-associated pro tein 1
	RRM2	Ribonucleotide reductase regulatory subunit M2
	SHCBP1	SHC binding and spindle associated 1
	SPAG5	Sperm associated antigen 5
	TBX20	T-Box Transcription Factor 2
	TK1	Thymidine kinase 1
	TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
	TTK	TTK proteinkinase
	TCF21	Transcription Factor 21
	UHRF1	Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1
Gènes du Beiging	ADRB3	adrenoceptor β 3
	ALPL	Alkaline Phosphatase, Biomineralization Associated
	ATF2	Activating transcription fac tor 2
	BMP7	Bone morphogenetic protein 7
	CD81	CD81 molecule
	CIDEA	Cell death inducing DFFA like effector A
	CITED1	Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 1
	CPT1B	Carnitine palmitoyltransfer ase 1b
	EBF2	EBF transcription factor 2
	EPSTI1	Epithelial stromal interaction 1
	FABP4	Fatty acid binding protein 1
	UCP1	Uncoupling protein-1
	UCP2	Uncoupling protein-2
	UCP3	Uncoupling protein-3
	NDUFB6	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B6
	NRF1	Nuclear respiratory factor 1
	PPARg	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma
	PPARGC1a	PPARG Coactivator 1 Alpha
	PRDM16	PR/SET domain 16
	SHOX2	SHOX homeobox 2
	SIRT5	Sirtuin 5
	SLC2A4	Solute carrier family 2 member 4
	TBX1	T-box transcription factor 1
	TFAM	Transcription factor A, mitochondrial
	TIMM23	Translocase of inner mitochondrial membrane 23
	TMEM26	Transmembrane protein 26
	TNFRSF9	TNF receptor superfamily member 9
	ZC3H10	Zinc finger CCCH-type containing 10

Tableau 5 | Tableau récapitulatif des gènes de la réponse Th2 et du beiging utilisé dans l'étude EPICAR.

La différence d'expression génique entre ThSAT et TAE a été réalisée préalablement avec les données pangénomiques selon la méthode SAM (Significance Analysis of Microarrays). Ceci a permis d'établir une liste de sondes différentiellement exprimées significativement entre les tissus. Les résultats obtenus ont ensuite été traités à l'aide du logiciel *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA; QIAGEN) qui permet d'analyser les enrichissements des voies de signalisation cellulaires, de déduire les causes d'expression différentielle, prédire les effets en aval et de découvrir de nouvelles cibles moléculaires.

Statistiques

Initialement, pour l'étude INTERFACE, les données de cytométrie en flux des 4 dépôts adipeux pairés ont été analysées séparément. Par la suite, les TAs viscéraux (TAE et TAV) et les TAs sous-cutanés (ThSAT et AbSAT) ont dû être poolés en raison du faible effectif. Les données de cytométrie sont présentées sous forme de moyenne ± SEM, et les diagrammes [25-75e quartiles] + intervalle interquartile (IQR) représentés d'après la méthode de Tukey ($p < 0,05$). Les différences d'expression génique quantifiées par RT-qPCR ont été analysées en utilisant le test de Kruskal–Wallis et, le cas échéant, le test post-hoc de Dunn. Les corrélations entre les ILCs par gramme de TA et l'expression génique relative ont été analysées à l'aide d'un test non paramétrique de Spearman. Le niveau de significativité utilisé était $p < 0,05$. Dans EPICAR, les études de corrélation entre les scores d'expression des gènes de la réponse Th2 et du beiging ont été effectuées à l'aide d'un test de Spearman. Pour les analyses IPA, le niveau de significativité utilisé était FDR (*False Discovery Rate*) < 0,05. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant Prism version 10 (GraphPad Software).

ARTICLE

Human epicardial fat has a beige profile and contains higher type 2 innate lymphoid cells than subcutaneous fat

Doukbi Elisa, Ancel Patricia, Dutour Anne, Soghomonian Astrid, Ahmed Shaista, Castejon Victoria, Piperoglou Christelle, Gariboldi Vlad, Lenoir Marien, Lechevallier Eric, Gondran-Tellier Bastien, Boissier Romain, Ebbo Mikael, Vély Frédéric & Gaborit Bénédicte

Publié dans *Obesity*, 2024

Cet article a également fait l'objet d'un éditorial dans le journal *Obesity*. *cf. Annexe 2 :* Insights into beige phenotype and immune cell dynamics of human epicardial adipose tissue. Ramoni D, Scuricini A, Liberale L, Montecucco F, Carbone F**.** *Obesity*. 2024 Jul;32(7):1231-1232. doi: 10.1002/oby.24051.

Check for updates

Received: 19 October 2023 | Revised: 12 February 2024 | Accepted: 20 February 2024

DOI: 10.1002/oby.24023

ORIGINAL ARTICLE

Obesity Biology and Integrated Physiology

Obesity A Research Journal | THE OBESITY SOCIETY | WILEY

Human epicardial fat has a beige profile and contains higher type 2 innate lymphoid cells than subcutaneous fat

Elisa Doukbi[1] | Patricia Ancel[1] | Anne Dutour[1,2] | Astrid Soghomonian[1,2] | Shaista Ahmed[1,3] | Victoria Castejon[1] | Christelle Piperoglou[4] | Vlad Gariboldi[1,5] | Marien Lenoir[6] | Eric Lechevallier[7] | Bastien Gondran-Tellier[7] | Romain Boissier[7] | Mikael Ebbo[4,8] | Frédéric Vély[4] | Bénédicte Gaborit[1,2]

[1]Aix-Marseille University, National Institute for Health and Medical Research (INSERM), National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment (INRAE), Cardiovascular and Nutrition Research Center (C2VN), Marseille, France

[2]Department of Endocrinology, Metabolic Diseases and Nutrition, Pole Endocrinology-Nutrition-Diabetes-Obesity, Public Assistance Marseille Hospitals, Marseille, France

[3]Heart Repair and Regeneration Laboratory, Department of Endocrinology, Metabolism, and Cardiovascular System, Faculty of Sciences and Medicine, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland

[4]Aix-Marseille University, CNRS, National Institute for Health and Medical Research (INSERM), Marseille-Luminy Immunology Center (CIML), Marseille University Hospital Timone, Public Assistance Marseille Hospitals, Marseille Immunopole, Marseille, France

[5]Department of Cardiac Surgery, Marseille University Hospital Timone, Public Assistance Marseille Hospitals, Marseille, France

[6]Division of Paediatric Cardiac Surgery, Marseille University Hospital Timone, Public Assistance Marseille Hospitals, Marseille, France

[7]Department of Urology Surgery, Conception Hospital, Public Assistance Marseille Hospitals, Marseille, France

[8]Internal Medicine Department, Marseille University Hospital Timone, Public Assistance Marseille Hospitals, Marseille, France

Correspondence
Bénédicte Gaborit, Faculty of Medical and Paramedical Sciences, C2VN, 27 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France.
Email: benedicte.gaborit@univ-amu.fr

Abstract

Objective: Epicardial adipose tissue (EAT) is a visceral fat that has been associated with coronary artery disease and atrial fibrillation. Previous work has revealed that EAT exhibits beige features.

Methods: First, a new pan-genomic microarray analysis was performed on previously collected paired human EAT and thoracic subcutaneous AT (thSAT) from the EPICAR study ($n = 31$) to decipher a specific immune signature and its link with browning genes. Then, adaptive (T and B cells) and innate lymphoid cell (ILC1, ILC2, and ILC3) immunophenotyping assay panels, including CD127, CD117, and prostaglandin D2 receptor 2, were performed on prospectively collected paired human multiorgan donors ($n = 18$; INTERFACE study).

Results: In the EPICAR study, a positive correlation between the T helper cell subtype Th2 immune pathway and browning genes was found in EAT versus thSAT ($r = 0.82$; $p < 0.0001$). In the INTERFACE study, this correlation was also observed ($r = 0.31$; $p = 0.017$), and a preponderance of $CD4^+$T cells, $CD8^+$T cells, and a few B cells was observed in all ATs ($p < 0.0001$). An increase in ILCs was observed in visceral AT (VAT) (i.e., EAT + VAT; 30 ± 5 ILCs per gram of AT) compared with subcutaneous counterparts (i.e., thSAT + abdominal SAT; 8 ± 2 ILCs per gram of AT; $p = 0.001$), with ILC1 being the most frequent (ILC1 > ILC3 > ILC2). Numbers of ILCs per gram of AT correlated with several Th2 or browning genes (IL-13, TNF receptor superfamily member 9 [TNFRSF9], and alkaline phosphatase, biomineralization associated [ALPL]). Interestingly, a specific increase in EAT-ILC2 compared with other ATs was observed, including a significant proportion expressing CD69 and/or CD25 activation markers (97.9% ± 1.2%; $p < 0.0001$). Finally, more natural killer cells were observed in EAT + VAT than in thSAT + abdominal SAT ($p = 0.01$). Exclusion of patients with coronary artery disease in the EPICAR and INTERFACE studies did not modify the main findings. Gene

See Commentary, pg. X.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.
© 2024 The Authors. *Obesity* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of The Obesity Society.

Funding information
Aix-Marseille University Excellence Initiative—A*MIDEX, Grant/Award Number: AMX-21-PEP-026; Fondation de l'Avenir, Grant/Award Number: AP-RM-22-017

expression phenotyping confirmed specific upregulation of Th2 pathway and browning genes (IL-33 and uncoupling protein 1 [UCP-1]) in EAT.

Conclusions: This is the first study, to our knowledge, to provide a comparison between innate and adaptive lymphoid cells in human EAT. Further studies are ongoing to decipher whether these cells could be involved in EAT beiging.

INTRODUCTION

Epicardial adipose tissue (EAT) is, in the human heart, the unique visceral AT (VAT) that is in direct contact with the myocardium and coronary arteries. The emerging role of this ectopic AT in cardiovascular diseases has led to a growing interest. Nowadays, EAT is increasingly recognized as an endocrine organ capable of secreting adipokines that can have a direct impact on the metabolism of the heart and coronary arteries [1, 2]. Although EAT secretome can have physiologically positive effects (adiponectin), it can also represent a source of proinflammatory (C-C motif chemokine ligand 2 [CCL2], interleukin [IL]-6, tumor necrosis factor α [TNFα], chemerin, resistin, and serglycin) or profibrotic molecules (activin-A and transforming growth factor β) that could exert adverse effects on the heart and coronary arteries [3]. EAT is believed to be a direct source of heat for the myocardium and protects the heart from unfavorable hemodynamic conditions such as ischemia, hypothermia, or hypoxia. However, the imbalance between protective and deleterious EAT adipokines may also participate in the proinflammatory phenotype associated with endothelial dysfunction and atherogenesis [4, 5]. In the past few years, its secretome was shown to switch into a proinflammatory profile in obesity and coronary artery disease (CAD) inducing atherogenic changes in monocytes [6, 7]. Elucidating factors implicated in the balance between the pro- and anti-inflammatory immune cells seem to be a key element in atherogenesis and could represent a future therapeutic target. The innate lymphoid cell (ILC) family is composed of natural killer (NK) cytotoxic cells and helper cells, i.e., ILC1, ILC2, and ILC3, which are mostly tissue-resident and could participate in regulating AT inflammation or homeostasis. Using transcriptomic studies, we and others have shown that EAT exhibits a brown fat-like or beige phenotype [8, 9], with a high expression of thermogenic genes such as uncoupling protein (UCP)-1 or peroxisome proliferator activated receptor γ (PPARγ) coactivator 1 α (PPARGC1A) and a specific lipidomic plasmalogen enrichment that could reflect a specific thermogenic activity [9, 10]. Remarkably, recent studies have demonstrated that ILC2, the innate counterparts of T helper subtype Th2 cells, are critically involved in the browning of AT [11, 12]. Indeed, ILC2 have been shown to activate a thermogenic circuit that directly promotes the expansion and commitment of beige adipocyte progenitors in subcutaneous AT (SAT) [13]. ILC1 are another subclass of ILCs that can contribute to AT inflammation. In diet-induced obesity, ILC1-derived interferon (IFN)-γ was necessary and sufficient to drive proinflammatory macrophage polarization and to promote obesity-associated insulin resistance [14]. In this study, we aimed at prospectively analyzing the

Study Importance

What is already known?

- Epicardial adipose tissue (EAT) is a biologically active ectopic fat depot surrounding the myocardium and coronary arteries. Its abundance has been implicated in cardiovascular diseases such as atrial fibrillation and coronary artery disease.
- Our group has demonstrated that EAT exhibits a beige phenotype.
- Immune cells can be involved in the AT beiging/browning phenomenon. In rodents, innate lymphoid cells (ILCs), particularly type 2 (i.e., ILC2), have been found to induce beiging and type 1 (i.e., ILC1) inflammation, but their presence has never been studied in human EAT, to our knowledge.

What does this study add?

- This study is the first, to our knowledge, to describe individual immune cell populations and identify ILCs in human EAT using multiparametric flow cytometry methods.
- An increase in T cells compared with B cells was evidenced in all ATs, and an increase in ILCs (ILC1 > ILC3 > ILC2) and natural killer cells was observed in visceral versus subcutaneous AT.
- Remarkably, a specific enrichment of ILC2 in EAT was observed compared with other ATs, and these ILC2 were found to be highly activated.

How might these results change the direction of research or the focus of clinical practice?

- These new preliminary findings could suggest that ILC1/ILC2 might play a role in the inflammation/beiging profile of EAT.
- The cellular players and molecular targets responsible for this specific EAT phenotype have yet to be discovered and could represent future therapeutic targets to prevent coronary artery disease.

1930739x, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.24023 by Cochrane France, Wiley Online Library on [15/05/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

presence of adaptive lymphoid cells and ILCs in the human EAT stromal vascular fraction (SVF) compared with abdominal VAT and thoracic and abdominal SAT (thSAT and abSAT, respectively).

METHODS

Patients and collection of samples

First retrospective cohort: the EPICAR study

A new pan-genomic microarray analysis was performed on a previous transcriptomic dataset obtained from the EPICAR study, including 118 biopsies of 31 paired thSAT and EAT samples [9], to identify a specific immune signature and its link with browning genes. This transcriptomic study was approved by the local ethics committee of Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France) and North Hospital (Marseille, France). This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients signed their written informed consent. The aim of the EPICAR study was to identify the transcriptomic signature of EAT collected from different anatomical regions (atrial, pericoronary, and periventricular EAT). In this new study, we reused pan-genomic data from all of our EAT samples and tried to decipher whether the EAT browning profile was related to the Th2 cell pathway.

Second prospective cohort: the INTERFACE study

Prospective paired EAT, VAT, thSAT, and abSAT biopsies from brain dead multiorgan donors ($n = 18$) were then collected for flow cytometry (FC) analyses and identification of AT immune cell populations. A minimum of 20 mg of each AT was necessary to perform FC analyses. All of the donors' families gave their signed written informed consent for the scientific sampling protocol. This protocol was approved by the National Ethics Committee of the French Biomedicine Agency (registration number PFS21-005), and collection was declared to the Ministry of Higher Education, Research, and Innovation (CODECOH N° DC-2021-4518) and adhered to the Jardé Law on human investigation. Absence of objection from the deceased donors' families was systematically verified by the organ donation coordination team.

Transcriptomic study

RNA was extracted and analyzed through a pan-genomic approach using HumanHT-12 version 4 Illumina BeadChip containing 47,231 probes for 28,688 coded transcripts. A quantile normalization was used to eliminate bad quality signals. Principal components analysis, partial least-squares discriminant analysis, and gene score calculation were performed with SIMCA (Sartorius AG) and Prism (GraphPad Software). The score was obtained from contribution of separate orthogonal partial least-squares discriminant analyses calculated from Th2 cells or browning sets of genes (genes with variable importance in the projection [VIP] value > 0.8), allowing for each set to generate a composite score value. The following browning gene set was selected from peer literature review [12, 15]: UCP-1; UCP-2; UCP-3; TNF receptor superfamily member 9 (TNFRSF9); adrenoceptor β 3 (ADRB3); PPARGC1A; PR/SET domain 16 (PRDM16); activating transcription factor 2 (ATF2); zinc finger CCCH-type containing 10 (ZC3H10); nuclear respiratory factor 1 (NRF1); transcription factor A, mitochondrial (TFAM); CD81 molecule (CD81); Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 1 (CITED1); epithelial stromal interaction 1 (EPSTI1); fatty acid binding protein 1 (FABP4); SHOX homeobox 2 (SHOX2); solute carrier family 2 member 4 (SLC2A4); T-box transcription factor 1 (TBX1); bone morphogenetic protein 7 (BMP7); cell death inducing DFFA like effector A (CIDEA); carnitine palmitoyltransferase 1b (CPT1B); EBF transcription factor 2 (EBF2); NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B6 (NDUFB6); sirtuin 5 (SIRT5); translocase of inner mitochondrial membrane 23 (TIMM23); and transmembrane protein 26 (TMEM26). The following Th2 cell gene set was also selected from peer literature review [12, 15]: IL-2; IL-4; IL-5; IL-9; IL-13; IL-25; IL-33; thymic stromal lymphopoietin (TSLP); colony stimulating factor 2 (CSF2); amphiregulin (AREG); killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1); inducible T cell costimulator (ICOS); GATA binding protein 3 (GATA3); sperm-associated antigen 5 (SPAG5); cyclin B1 (CCNB1); RAD51-associated protein 1 (RAD51AP1); hyaluronan-mediated motility receptor (HMMR); denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog (DTL); SHC binding and spindle associated 1 (SHCBP1); thymidine kinase 1 (TK1); BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B (BUB1B); ribonucleotide reductase regulatory subunit M2 (RRM2); kinesin family member 23 (KIF23); baculoviral IAP repeat containing 5 (BIRC5); minichromosome maintenance complex component 6 (MCM6); TTK protein kinase (TTK); maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK); and ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1 (UHRF1). Th2 cell aggregation of the data into a gene score block enables an ease of data interpretation with a correlation analysis. The difference in gene expression between thSAT and EAT was performed with significant analysis of microarray (SAM) analysis, which provides a list of significant genes (VIP > 0.8) and false discovery rate (FDR). Pathway enrichment was analyzed with Ingenuity Pathway Analysis (IPA; QIAGEN) using canonical ingenuity pathway database.

Prospective AT SVF extraction

SVF from the collected AT was obtained by mechanical and enzymatic dissociation, as previously described [16, 17]. Briefly, AT was cut into small pieces and then dissociated with 0.5-mg/mL collagenase A (Roche) for 30 to 45 min at 37°C under agitation. The dissociation products were then filtered and centrifuged for 5 min at 550*g* at room temperature. SVF was then incubated with 1 mL of red blood cell lysis buffer (115mM ammonium chloride [NH_4Cl], 10mM potassium bicarbonate [$KHCO_3$], and 0.1mM EDTA) for 10 min at room temperature with gentle agitation and centrifuged for 5 min at 550*g* at room temperature. The pellet was then washed in 5 mL of buffer (0.1mM EDTA-phosphate-buffered saline [PBS], Gibco, Thermo Fisher Scientific) and filtered on 100-µm nylon filter (BD Falcon). Filtrate was then

1930739x, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.24023 by Cochrane France, Wiley Online Library on [15/05/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

centrifuged for 5 min at 300*g* at room temperature, and the pellet was suspended in fluorescence activated cell sorting (FACS) buffer (bovine serum albumin [BSA] 1%, EDTA 2mM-PBS) prior to FC.

Prospective FC

Two sets of FC analyses were performed, as previously described [18, 19]. First, lymphocyte populations were analyzed. To this end, total lymphocytes, $CD3^+$T cells, $CD4^+$T cells, $CD8^+$T cells, $CD19^+$B cells, and $CD3^+CD56^+$ NK cells were quantified using BD Multitest 6-color and BD Trucount technologies. Fifty microliters of samples was incubated for 15 min in the dark at room temperature before addition of BD lysis buffer. Cells were gated on CD45 (hematopoietic cells) and respectively stained with CD3 (T cells), CD4 ($CD4^+$T cells), CD8 ($CD8^+$T cells), CD19 (B cells), and CD16/CD56 (NK cells) antibodies. Samples were analyzed on a BD FACSCanto II cytometer using the BD FACSCanto software.

Secondly, a peripheral blood mononuclear cell panel was used to characterize ILCs by FC [18, 19]. SVF cells were centrifuged for 5 min at 4°C and 645*g*. Then, they were incubated with 5 µL of BD Fc Block at room temperature for 10 min. Samples were then mixed with a fluorescein isothiocyanate (FITC) exclusion lineage antibody panel (T cell receptor [TCR]γδ, TCRαβ, CD3, CD19, CD14, CD16, CD94, CD123, CD34, CD303, and FcεRI) and 50 µL of BD Horizon Brilliant Stain Buffer before adding specific antibodies (CD45, CD127, CD7, CD56, CD161, CD117, prostaglandin D2 receptor 2 [CRTH2], CD5, CCR6, CD69, CD25, NKp44, and NKp46). The mix was incubated for 30 min at room temperature and in obscurity. We thereby used cell-surface expression of CD127, CD117, and CRTH2 to identify ILC1, ILC2, and ILC3 subsets, respectively, defined as $Lin^-CD127^+CD117^-CRTH2^-$ cells, $Lin^-CD127^+CRTH2^+$ cells, and $Lin^-CD127^+CD117^+$ $CRTH2^-$ cells. These data were acquired with a BD LSRFortessa X-20 cytometer and were analyzed on FlowJo version 10.8.1 software.

RNA extraction/reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (INTERFACE study)

RNA was extracted using the PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies), and total RNA concentration was measured by the use of a BioDrop spectrophotometer (Biochrom Ltd). Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed with 100 ng of RNA, 20 U/µL of SuperScript II RT (Life Technologies), 200 ng/µL of random primers, 10mM nucleotides, and 40 U/µL of the ribonuclease inhibitor RNaseOUT (Life Technologies). Primers for qPCR (Table S1) were designed via OligoArchitect (Sigma-Aldrich). qPCR was performed using primers labeled with fluorescent EvaGreen (Euromedex) and a real-time thermocycler, i.e, LightCycler 480 (Roche). The ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (RPLP0) ribosomal gene was used as reference gene to normalize cycle thresholds (Ct) and to obtain relative quantification (ΔΔCt) [20].

Statistics

For transcriptomic analyses (EPICAR and INTERFACE studies), correlation between Th2 cells and browning gene expression scores was analyzed using Spearman rank correlation coefficient. For multiblock analyses, the level of significance used was FDR < 0.05. In the prospective INTERFACE study, FC data from paired EAT, VAT, thSAT, and abSAT were all first analyzed separately. Then, because EAT and VAT are both VAT when thSAT and abSAT are both SAT, their data were pooled to analyze paired VAT (EAT + VAT) and SAT (thSAT + abSAT). Data are shown as mean ± SEM and box plot data with the Tukey method ($p < 0.05$ considered as statistically significant). For the prospective analysis (INTERFACE study), the differences in gene expression quantified by RT-qPCR were analyzed using the Kruskal–Wallis test and, as appropriate, Dunn post hoc test. Correlation between ILCs per gram of AT and relative gene expression was analyzed using Spearman nonparametric test. The level of significance used was $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using Prism version 10 (GraphPad Software).

RESULTS

Patient characteristics

Retrospective transcriptomic study

Pan-genomic microarray analysis was performed on 31 patients who had an average age of 67.3 ± 10.4 years [9]. This population had an average body mass index (BMI) of 28.0 ± 4.5 kg/m^2; 54% of them had CAD; 63% had hypertension; 54% had dyslipidemia; 29% had type 2 diabetes (T2D); and 49% of them smoked, as previously described [9].

Prospective FC study

A total of 18 multiorgan donor patients were included in this study. These patients had an average age of 56 ± 16 years; average BMI of 27.2 ± 4.2 kg/m^2; 6% had CAD; 44% had hypertension; 17% had dyslipidemia; 2% had obesity; 6% had T2D; and 50% had a history of smoking (Table 1).

Epicardial fat is enriched in Th2 cell signaling pathway transcripts that also correlate with browning genes

Transcriptomic analysis revealed an average of 9700 ± 105 detected genes (Figure 1A). Principal components analysis on SIMCA showed that EAT depots clustered differently from thSAT (Figure 1B). Moreover, SAM analysis significantly identified 2123 upregulated genes and 1813 downregulated genes in EAT compared with thSAT (FDR < 0.05). The significant genes with VIP >0.8 were IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33, KLRG1, HMMR, BUB1B, KIF23, MCM6, UHRF1, and MELK for Th2 cell score and UCP-1, PPARGC1A, PRDM16, NRF1, CD81, EPSTI1, FABP4,

1930739x, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.24023 by Cochrane France, Wiley Online Library on [15/05/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

TABLE 1 Clinical characteristics of multiorgan donor patients ($n = 18$)

	Multiorgan donor population
Patients (F/M)	18 (6/12)
Age (y)	56 ± 16
BMI (kg/m^2)	27.2 ± 4.2
Obesity, BMI ≥ 30 kg/m^2	2 (11%)
Waist circumference (cm)	98 ± 14
F	97 ± 15
M	95 ± 12
T2D	1 (6%)
Hypertension	8 (44%)
Smoking history, ever	9 (50%)
Dyslipidemia	3 (17%)
CAD	1 (6%)

Note: Data shown as mean ± SD or *n* (%).
Abbreviations: CAD, coronary artery disease; F, female; M, male; T2D, type 2 diabetes.

SHOX2, SLC2A4, and TMEM26 for browning score. Interestingly, functional analysis of genes using IPA showed that EAT-enriched pathways were related to Th2 cell immune response (IL-4 and IL-13 signaling) and browning, including mitochondrial dysfunction, oxidative phosphorylation, and white AT browning ($r = 0.82$; $p < 0.0001$; Figure 1C,D). The exclusion of patients with CAD did not alter the relationship between Th2 cells and browning score in EAT (Figure S1). In the INTERFACE prospective study, we confirmed significant consistent correlation between Th2 cells and browning genes ($r = 0.31$; $p = 0.017$; data not shown).

All ATs have the same adaptive cell distribution tendency

FC analyses revealed a significantly higher proportion of T cells (18,886 ± 23,313 cells per gram of tissue) compared with B cells (447 ± 955 cells per gram of tissue; $p < 0.0001$) in all ATs (Figure 2A). In addition, CD4$^+$T cells were more represented than their cytotoxic counterpart CD8$^+$T cells (Figure 2A). No significant difference was found in the amount of adaptive lymphoid cells among ATs

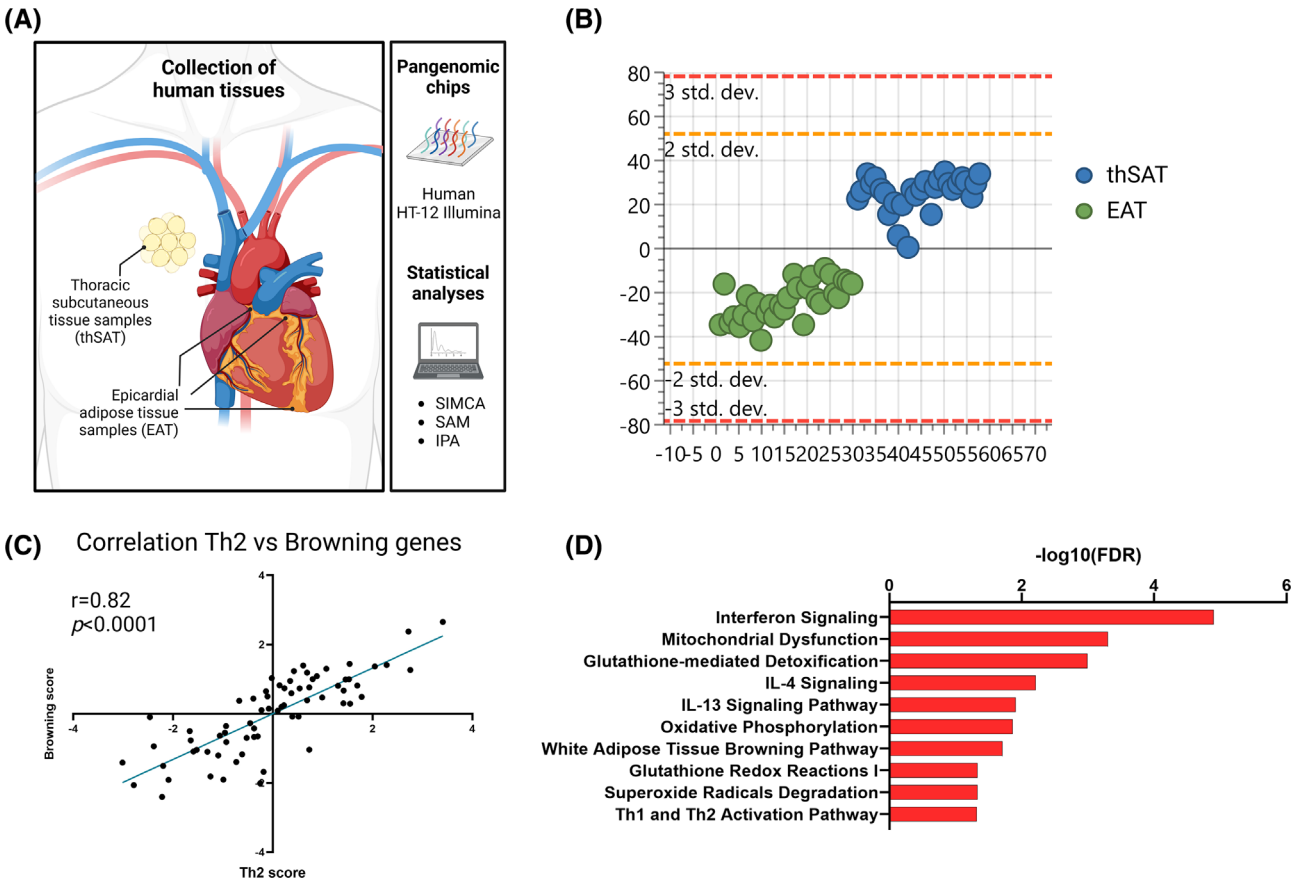


FIGURE 1 Relationship between Th2 cell pathway and browning genes in epicardial adipose tissue (EAT) compared with thoracic subcutaneous AT (thSAT) using significant analysis of microarray (SAM), SIMCA, and Ingenuity Pathway Analysis (IPA) in the EPICAR study. (A) Site collection of AT. (B) Principal components analysis including EAT and thSAT genes. (C) Correlation between Th2 and browning scores in EAT. (D) IPA showing the most important pathways associated with EAT compared with thSAT. The variable importance in the projection value (VIP) was selected as >0.8; Th2 gene set is as follows: IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33, KLRG1, HMMR, UHRF1, BUB1B, KIF23, MELK, MCM6; Browning gene set: UCP1, PPARGC1A, PRDM16, NRF1, CD81, EPSTI1, FABP4, SHOX2, SLC2A4, and TMEM26. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

1930739x, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.24023 by Cochrane France, Wiley Online Library on [15/05/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

(Figure S2A–D). On the other hand, VAT (EAT + VAT) contained significantly more $CD3^+$ cells ($p < 0.05$) as well as $CD4^+$T cells ($p < 0.05$) and $CD8^+$T cells ($p < 0.05$) than SAT (thSAT + abSAT), but there was no significant difference for B cell distribution ($p = 0.35$; Figure S2E–H). Together, these results show that EAT, VAT, thSAT, and abSAT have the same tendency of adaptive immune cell

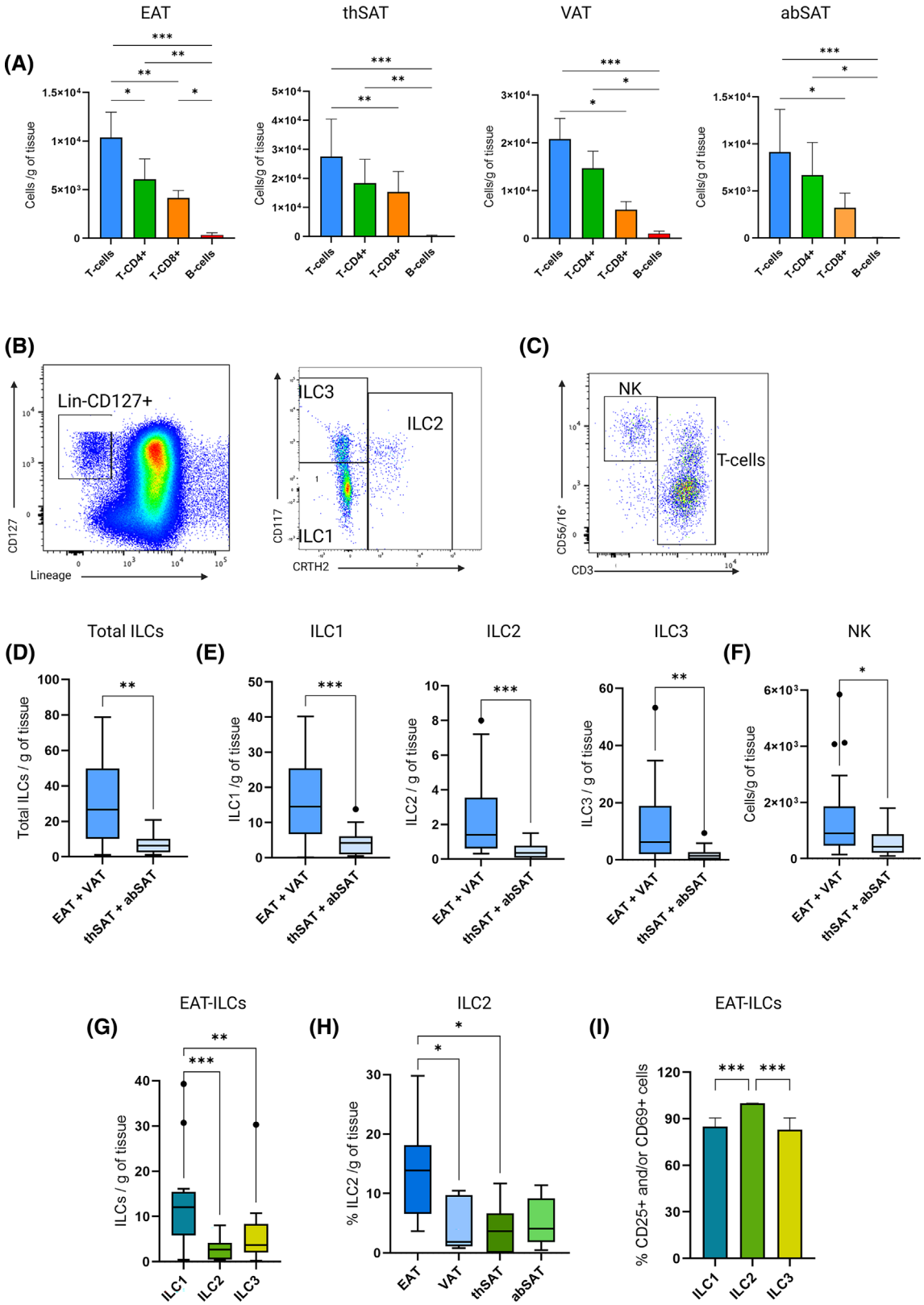


FIGURE 2 Legend on next page.

1930739x, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.24023 by Cochrane France, Wiley Online Library on [15/05/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

proportions and that VAT contains more adaptive immune cells than SAT. Exclusion of a patient with CAD did not significantly change the results (Figure S3).

VAT contains more ILCs than SAT

We next performed multiparametric FC assay to identify AT ILCs and NK cells (Figure 2B,C). VAT showed a significant increase in ILC1 and ILC3 compared with thSAT ($p < 0.05$; Figure S4). Interestingly, the total number and the number of ILCs per gram from AT were significantly increased in VAT (EAT + VAT) compared with SAT (EAT + VAT: 30 ± 5 ILCs per gram of AT; thSAT + abSAT: 8 ± 2 ILCs per gram of AT; $p = 0.001$), and this was also observed for each ILC subset (Figure 2D,E). We also observed more NK cells in EAT and VAT (2208 ± 843 cells per gram of AT) than in SAT (586 ± 127 cells per gram of AT; $p = 0.01$; Figure 2F). Interestingly, there was a difference in the proportion of the three subtypes of ILCs (62% ± 3% of ILC1 vs. 24% ± 3% of ILC3 vs. 15% ± 3% of ILC2; $p < 0.0001$) in all ATs, and this was also the case in EAT (Figure 2G). Exclusion of a patient with CAD did not significantly change the results (Figure S3).

Remarkably, a higher percentage of ILC2 (15% ± 2.7%) was observed in EAT than in thSAT (4% ± 1.7%) and VAT (4.4% ± 1.5%; $p = 0.0044$; Figure 2H). We also showed that almost 100% (97.9% ± 1.2%; $p < 0.0001$) of EAT-ILC2 expressed CD25 and/or CD69 activation markers compared with ILC1 (71.6% ± 1.2%; $p < 0.001$) and ILC3 (75% ± 7%; $p < 0.001$; Figure 2I). Taken together, these results showed that VAT contains more ILCs and NK cells than SAT and that the ILC1 subtype is the more represented in all fat depots. Moreover, EAT-ILC analysis showed that EAT contains more ILC2 compared with other ATs and that nearly all of the EAT-ILC2 expresses activation markers.

EAT gene phenotyping confirms upregulation of Th2 cells and browning genes compared with other ATs

BUB1B, IL-5, transcription factor 21 (TCF21), and IL-33 gene expression evaluated by qPCR was upregulated in EAT compared with SAT, with a high significance for the alarmin cytokine IL-33 ($p < 0.0001$ for ANOVA; Figure 3). Additionally, TBX20, MELK, and UHRF1 genes were found to be significantly upregulated in EAT compared with VAT (all $p < 0.05$; Figure 3). According to the pan-genomic study, we found upregulation of UCP-1 and alkaline phosphatase, biomineralization associated (ALPL) genes in EAT compared with VAT, abSAT, and thSAT ($p = 0.003$ and $p = 0.0062$ for ANOVA, respectively) and TNFRSF9 gene in EAT compared with thSAT ($p = 0.0075$ for ANOVA; Figure 4). FABP4 and CCAAT enhancer binding protein α (C/EBPα) genes were significantly downregulated in EAT versus abSAT and thSAT ($p < 0.0001$ and $p = 0.0003$ for ANOVA, respectively; Figure 4). Interestingly, we evidenced a positive correlation between the number of ILC1 per gram of AT and TNFRSF9 ($r = 0.55$; $p = 0.036$) and between the number of ILC2 per gram of AT and UCP-1 ($r = 0.64$; $p = 0.028$), TNFRSF9 ($r = 0.69$; $p = 0.006$), and ALPL ($r = 0.53$; $p = 0.017$). We also found a positive correlation between IL-13 gene expression and ILC1 and ILC2 per gram of AT ($r = 0.58$; $p = 0.008$ and $r = 0.55$; $p = 0.013$, respectively; Table 2).

DISCUSSION

This study is the first, to our knowledge, to describe individual immune cell populations and identify ILCs in human EAT using multiparametric FC methods.

We observed an increase in T cells compared with B cells in all ATs and an increase in ILCs (ILC1 > ILC3 > ILC2) and NK cells in VAT versus SAT. In addition, we observed a specific enrichment of ILC2 in EAT compared with other ATs, and these ILC2 were found to be highly activated.

Immunometabolism has been emerging in these last years as a key regulator of AT homeostasis. Components of the innate immune system such as AT macrophages (ATMs), dendritic cells, NK cells, and ILCs dominate the resident leukocyte population in AT. In 2003, Mazurek et al. provided the first evidence of this meta-inflammation in EAT and showed that $CD3^+$T cells, $CD68^+$ macrophages, and $tryptase^+$ mast cells infiltrate EAT compared with thSAT [21]. Recent studies with integrated bioinformatics analysis and immunohistochemistry have confirmed marked immune activation of IFN-γ^+ effector memory T cells in EAT of patients with heart failure and proinflammatory M1 polarization of ATMs with CAD [22]. However, the profile and microenvironment of ILCs within human EAT have never been studied before, to our knowledge, because of the difficulty in obtaining a sufficient amount of cardiac fat during open heart surgery [23]. Interestingly, recent developed drugs such as glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists can reduce EAT inflammation and

FIGURE 2 Distribution of adaptive and innate lymphoid cells (ILCs) in visceral adipose tissue (VAT) and subcutaneous AT (SAT). (A) Distribution of lymphocyte flow cytometry (FC) assay showing the number of T cells ($CD3^+$), $CD4^+$T cells ($CD3^+CD4^+$), $CD8^+$T cells ($CD3^+CD8^+$), and B cells ($CD19^+$) per gram of epicardial AT (EAT), thoracic subcutaneous AT (thSAT), VAT, and abdominal SAT (abSAT). (B) ILC gating. Helper ILCs are defined as $CD45^+Lin^-CD127^+$ cells. Among total ILCs, ILC1 are defined as $CD117^-CRTH2^-$ cells, ILC2 as $CD117^{+/-}CRTH2^+$, and ILC3 as $CD117^+CRTH2^-$. (C) Natural killer (NK) cells are defined as $CD3^-CD56/CD16^+$ cells among total lymphocytes. (D) Box plot representation of total ILC number in VAT (EAT and VAT) and SAT (thSAT and abSAT) per gram of tissue. (E) Distribution of ILC1, ILC2, and ILC3 subsets per gram of VAT or SAT. (F) Distribution of NK cells within EAT, thSAT, VAT, and abSAT. (G) Distribution of ILC subsets in EAT. (H) Quantification of ILC2 percentage per gram of tissue within all four ATs. (I) Percentage of $CD25^+$ and/or $CD69^+$ activated ILCs within EAT. Histogram data are represented as mean ± SEM and box plot data with the Tukey method. Comparison analyses between VAT and SAT were performed using *t* test or ANOVA; $n = 18$; $^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

1930739x, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.24023 by Cochrane France, Wiley Online Library on [15/05/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

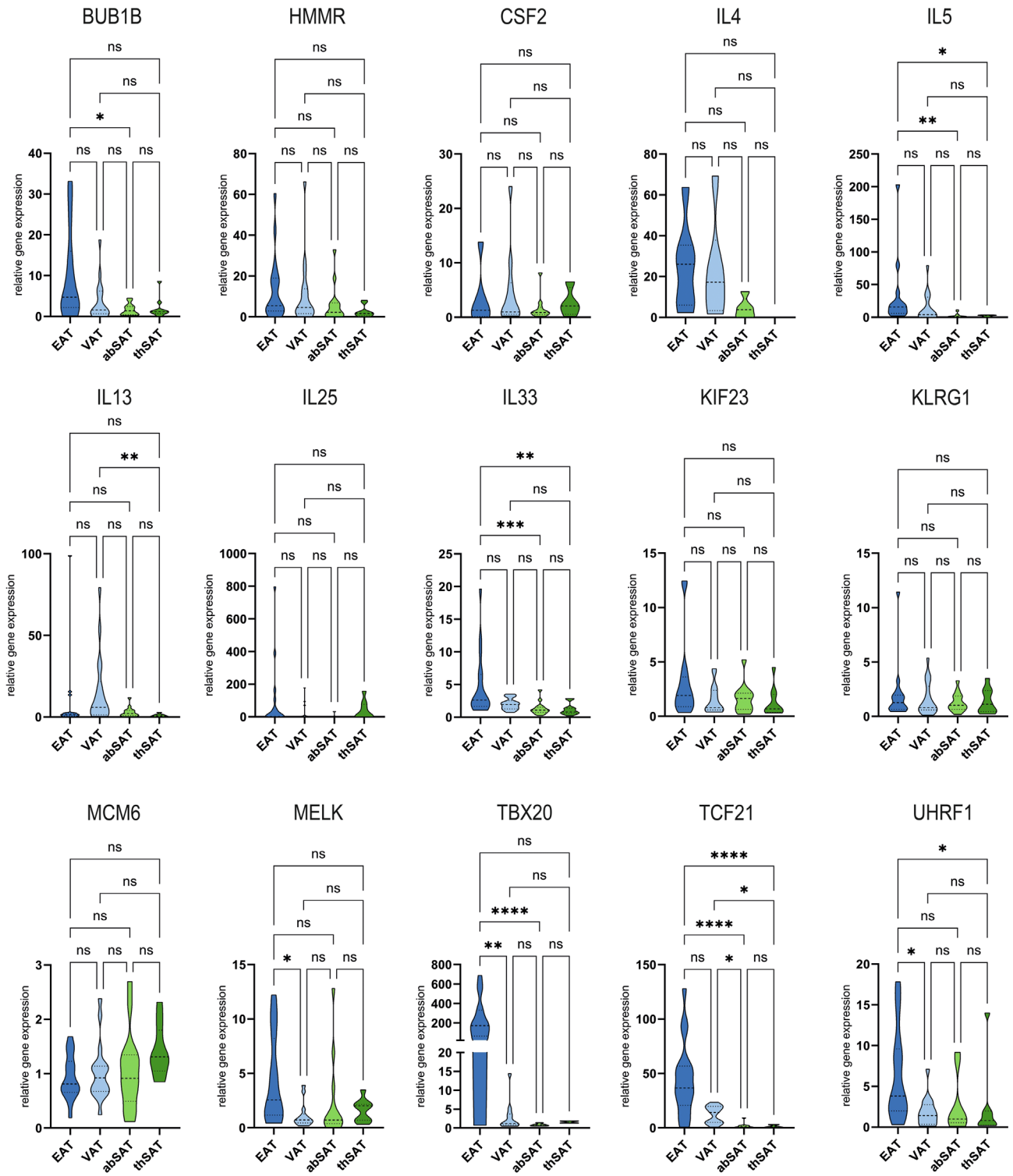


FIGURE 3 Comparative gene expression analysis of Th2 cell genes in the INTERFACE prospective study between epicardial adipose tissue (EAT), visceral AT (VAT), abdominal subcutaneous AT (abSAT), and thoracic SAT (thSAT). Violin plot data are represented as median ± IQR. Comparison analyses among ATs were performed using the Kruskall–Wallis test; $n = 18$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$; ****$p < 0.0001$. IL-9 and SHOX2 data are not presented because Ct were >45. ns, not significant. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

increase free fatty acid oxidation as fuel for the myocardium and induce fat browning; this GLP-1R-dependent browning effect on EAT could lead to improved myocardial insulin sensitivity and metabolism [24]. GLP-1, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and glucagon receptors are similarly present at mRNA and protein levels in human EAT, particularly in crown-like structures and,

1930739x, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.24023 by Cochrane France, Wiley Online Library on [15/05/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Obesity A Research Journal THE OBESITY SOCIETY WILEY

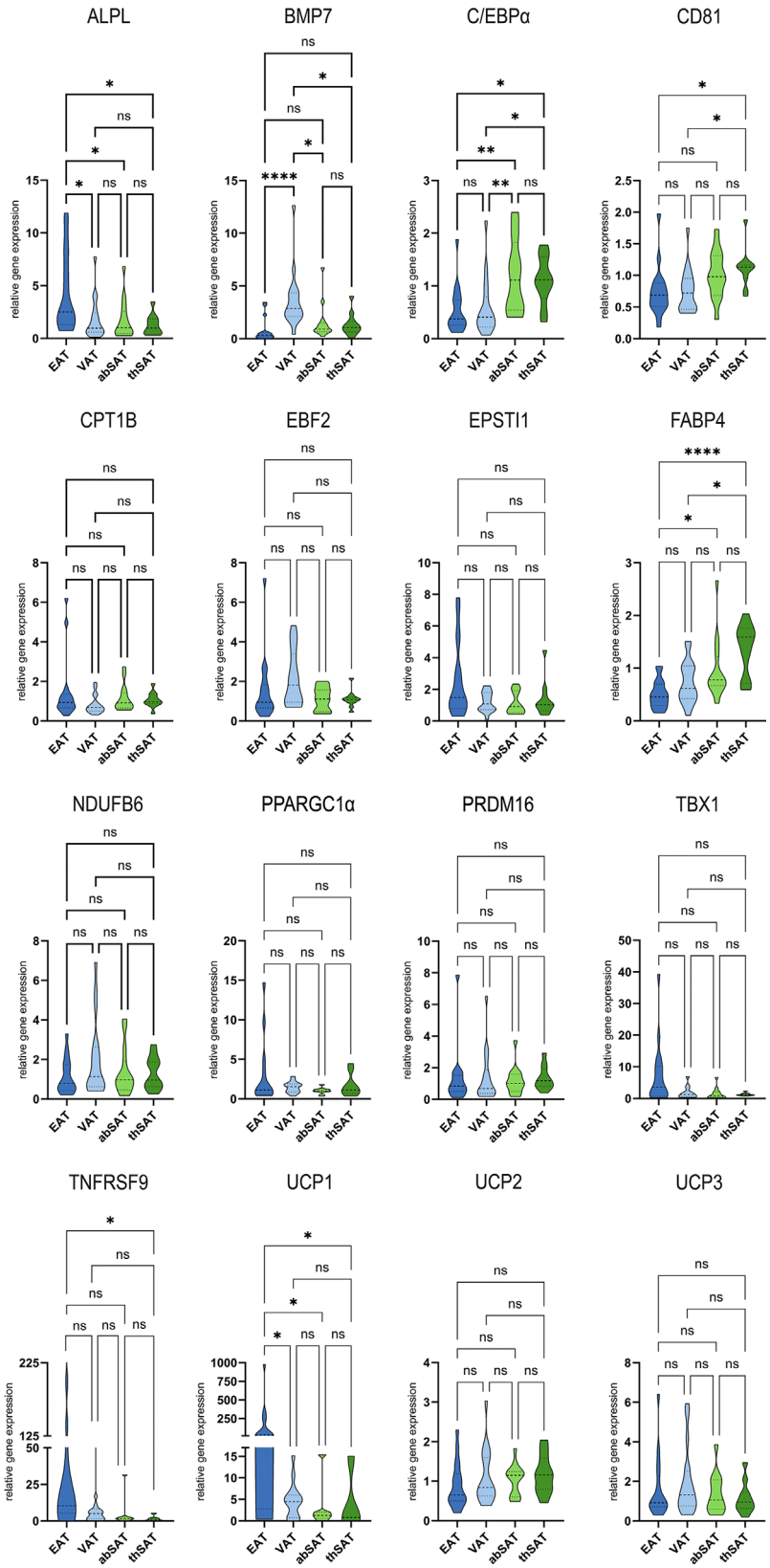


FIGURE 4 Comparative gene expression analysis of browning genes in the INTERFACE prospective study between epicardial adipose tissue (EAT), visceral AT (VAT), abdominal subcutaneous AT (abSAT), and thoracic SAT (thSAT). Violin plot data are represented as median ± IQR. Comparison analyses among ATs were performed using the Kruskall–Wallis test; $n = 18$; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ****$p < 0.0001$. TMEM26, NRF1, and SLC2A4 data are not presented because Ct were >45. ns, not significant. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

1930739x, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.24023 by Cochrane France, Wiley Online Library on [15/05/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

TABLE 2 Correlation between relative browning or Th2 cell gene expression and ILC1, ILC2, or ILC3 per gram of all ATs.

		ILC1		ILC2		ILC3	
Pathways	**Gene**	***r***	***p* value**	***r***	***p* value**	***r***	***p* value**
Browning	ALPL	0.35	0.128	**0.53**	**0.017**	0.03	0.890
	BMP7	0.34	0.165	0.06	0.799	0.04	0.879
	CD81	**−0.54**	**0.015**	−0.35	0.125	**−0.54**	**0.015**
	C/EBPα	**−0.55**	**0.011**	−0.31	0.181	−0.35	0.135
	CIDEA	−0.42	0.068	−0.32	0.173	−0.41	0.071
	CPT1B	**−0.52**	**0.020**	−0.34	0.147	−0.40	0.083
	EBF2	−0.16	0.490	−0.20	0.403	−0.33	0.151
	EPSTI1	0.37	0.104	0.35	0.134	0.00	0.987
	FABP4	**−0.59**	**0.006**	**−0.47**	**0.037**	**−0.67**	**0.001**
	NDUFB6	−0.25	0.289	−0.11	0.654	−0.44	0.053
	PPARGC1A	0.18	0.447	0.12	0.627	0.04	0.862
	PPARγ	**−0.48**	**0.032**	−0.28	0.239	−0.32	0.172
	PRDM16	−0.29	0.212	0.02	0.937	−0.25	0.286
	SIRT5	−0.43	0.058	−0.27	0.246	**−0.65**	**0.002**
	SLC2A4	−0.34	0.140	−0.18	0.455	−0.36	0.121
	TBX1	−0.16	0.519	0.11	0.668	−0.33	0.169
	TIMM23	0.03	0.915	0.23	0.332	**−0.45**	**0.048**
	TNFRSF9	**0.55**	**0.036**	**0.69**	**0.006**	0.21	0.452
	UCP-1	0.22	0.499	**0.64**	**0.028**	0.09	0.783
	UCP-2	−0.05	0.850	−0.02	0.935	−0.17	0.487
	UCP-3	0.07	0.772	0.03	0.895	−0.04	0.865
Th2 cell	BUB1B	0.21	0.406	0.25	0.315	0.28	0.265
	CSF2	0.17	0.678	0.35	0.350	0.25	0.521
	HMMR	**0.51**	**0.023**	**0.53**	**0.015**	**0.47**	**0.035**
	IL-4	0.31	0.564	0.20	0.714	−0.03	>0.999
	IL-5	0.21	0.430	0.32	0.220	0.23	0.388
	IL-13	**0.58**	**0.008**	**0.55**	**0.013**	0.29	0.215
	IL-25	−0.12	0.617	0.02	0.920	0.03	0.915
	IL-33	0.32	0.171	0.32	0.173	0.21	0.375
	KIF23	0.34	0.171	0.35	0.152	0.45	0.062
	KLRG1	−0.06	0.796	0.05	0.830	−0.14	0.548
	MCM6	0.06	0.796	−0.05	0.830	0.14	0.548
	MELK	0.00	0.987	0.08	0.760	−0.10	0.680
	TBX20	−0.20	0.543	0.16	0.619	−0.14	0.671
	TCF21	0.46	0.054	**0.63**	**0.006**	0.34	0.172
	UHRF1	0.45	0.094	0.51	0.053	0.38	0.161

Note: Correlation with Spearman nonparametric test; bold values denote statistical significance ($p < 0.05$).
Abbreviations: AT, adipose tissue; ILC, innate lymphoid cell.

partially, in adipocytes [25]. Whether other adipose resident immune cells express these receptors remains unknown.

Our transcriptomic study confirms that EAT was specifically enriched in transcripts from the Th2 cell signaling pathway and also provides evidence that these pathways are correlated with browning genes [23, 26]. This is interesting because recent research has indicated that ILC2 effector function is responsible for enhanced AT browning and an anti-inflammatory immune profile [11, 13]. Accordingly, EAT had more ILC2 than other ATs, and these cells displayed markers of activation (CD25 and CD69), highlighting their potential role in thermogenic activity, which we and others have previously evidenced [8, 9]. Moreover, gene expression phenotyping confirmed upregulation of specific ILC2 alarmin cytokines such as IL-33 in EAT and a positive correlation between IL-13 gene expression and ILC2

1930739x, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.24023 by Cochrane France, Wiley Online Library on [15/05/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

quantification in all ATs. However, further functional studies are warranted to identify which mediators trigger ILC2 activation and whether ILC2 may be causative in the regulation of EAT thermogenic activity [12]. Additionally, both EAT mitochondrial function and brown AT-like thermogenic activity decrease with advanced CAD and aging, and low mitochondrial respiration in EAT was associated with CAD severity [27].

On the other hand, ILC1 were the most abundant ILC subtype in all ATs. Co-culture and adoptive transfer studies have shown that ILC1 from human AT promote adipose fibrogenesis by activating transforming growth factor β 1 signaling and $CD11c^{+}$ macrophage activation in obesity [28].

In mice, removal of pericardial AT, which contained a high density of lymphoid clusters, prevented adaptive immune cell response triggered by coronary artery ligation and ischemic cardiac injury, limited fibrosis, and decreased ejection fraction [29]. Recent studies have shown that ILC1 and ILC2 play opposite roles in atherosclerosis pathogenesis. Increased circulating ILC1 have been found in patients with acute ST-segment elevation myocardial [30] or cerebral infarction [31] and correlated with higher oxidized low-density lipoprotein levels. By contrast, ILC2 are decreased in patients with myocardial [30] or cerebral [31] infarcts and in obese mice. Furthermore, genetic ablation of ILC2 favors atherosclerosis development [32], whereas their expansion through direct adoptive transfer or via administration of IL-2 [33] and IL-25 [34] is atheroprotective. Whether ILC1 are implicated in the proinflammatory profile of EAT in patients with CAD has not been elucidated.

Under homeostatic lean conditions, ILC2, eosinophils, or anti-inflammatory ATMs are present within AT [35]. In obesity, the composition of inflammatory cells switches to an accumulation of ILC1, proinflammatory ATMs, $CD8^{+}$T cells, or Th1 and Th17 cells within SAT [36, 37]. Adoptive transfer of adipose ILC1 from obese mice exaggerated their accumulation in recipient mice and amplified glucose intolerance [28]. ILC1-mediated IFN-γ production enhanced macrophages to promote a dysregulated proinflammatory microenvironment, favoring insulin resistance [14].

ILC2 have been shown to be resident in white AT and decreased in obesity [11, 35]. Indeed, when stimulated via administration of alarmin IL-25 or IL-33, ILC2 promote an anti-inflammatory type 2 environment via eosinophil recruitment and alternatively activated macrophage induction [11]. Mice treated with ILC2 adoptive transfer or via administration of IL-33 had an increased number of UCP-1 positive beige cells within white AT [11]. Furthermore, ILC2 can produce methionine-enkephalin peptides, which upregulate UCP-1 in adipocytes in vitro and promote the beiging of AT in vivo [11]. Consistent with this, qPCR analysis confirmed upregulation of UCP-1, ALPL, and TNFRSF9 gene expression in EAT versus other ATs, as well as a positive correlation among expression of these genes and ILC2 quantification in all ATs. Thus, better identifying the imbalance between ILCs in AT and in EAT could help to better target its immunometabolic profile.

Various methods to manipulate ILCs have been developed recently such as the inhibition of ILC migration and function [38–40], microbiome manipulation [41], glucocorticoid [42], or even β_2 adrenergic receptor agonists [43]. Others such as adoptive transfer, anticytokine antibodies, or even immune checkpoint modulation have been also used to fight against atherosclerosis, obesity, or T2D in humans and/or mice. Interestingly, glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR) engagement on activated ILC2 not only stimulates secretion of ILC2 effector cytokines but also prevents ILC2 apoptosis. A GITR agonist reversed established glucose intolerance by inducing adipocyte beiging via IL-13 secretion [44]. Thus, therapeutic activation of the IL-33/GITR/ILC2 beiging pathway could represent an interesting target to reduce the EAT inflammatory phenotype [44].

Given their recent identification, and apart from the numerous studies that aimed at understanding their role in obesity and browning, ILCs have never been studied in EAT, to our knowledge. Their role in the pathophysiology of epicardial fat and, extensively, in cardiovascular disease remains to be understood.

Our study has several limitations. This study provides correlative data, and no causal conclusions can be drawn regarding the presence of ILC2 and the beiging profile of EAT, which merit further investigation. The small sample size of patients did not allow us to analyze the impact of obesity, T2D, or CAD on the immune profile of EAT, and we probably lacked statistical power to clearly differentiate EAT from VAT immunophenotype; however, we faced many refusals of organ donation and sampling for experimental studies from deceased patients' families. However, a recent study has shown that obesity and T2D significantly increase the inflammatory profile and the expression of immune mediators in EAT [45]. Finally, due to the small sample size, we likely lack sufficient power to identify objective differences in the different ILC subtypes and had to pull data regarding VAT and SAT.

CONCLUSION

In this study, we compared individual immune cell populations of various ATs and reported that ILC2 are highly represented in EAT. This might suggest that these cells could have a role in its beiging profile.O

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, Bénédicte Gaborit, Anne Dutour, and Frédéric Vély; methodology, Frédéric Vély, Elisa Doukbi, Patricia Ancel, Shaista Ahmed, Victoria Castejon, Christelle Piperoglou, and Mikael Ebbo; analysis, Elisa Doukbi, Astrid Soghomonian, Shaista Ahmed, Victoria Castejon, Christelle Piperoglou, and Frédéric Vély; data interpretation, Elisa Doukbi, Bénédicte Gaborit, Anne Dutour, and Patricia Ancel; sampling collection, Vlad Gariboldi, Marien Lenoir, Eric Lechevallier, Bastien Gondran-Tellier, and Romain Boissier; literature search, Elisa Doukbi and Bénédicte Gaborit; writing (original draft preparation), Elisa Doukbi and Bénédicte Gaborit; writing (review and editing), Anne Dutour, Frédéric Vély, Romain Boissier, and Marien Lenoir; supervision, Bénédicte Gaborit, Anne Dutour, and Frédéric Vély; project administration, Patricia Ancel; and funding acquisition, Bénédicte Gaborit. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

1930739x, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.24023 by Cochrane France, Wiley Online Library on [15/05/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

ACKNOWLEDGMENTS

We want to thank all of the Immunopole team for their technical support in multiparametric FC, as well as Elise Dalmas from Immediab Team, Paris, for her help in Th2 cell pathway genes listing. We are also very grateful to all of the organ donation coordination teams from the Marseille and Toulon regions for their help in collecting samples and checking family agreement, as well as all of the patients' families for their help in scientific research advances.

FUNDING INFORMATION

This work received support from the French government under the France 2030 investment plan as part of the Aix-Marseille University Excellence Initiative—A*MIDEX (AMX-21-PEP-026). The project was also carried out with the support of the Fondation de l'Avenir (Paris, France, 2022, AP-RM-22-017).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declared no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

ORCID

Elisa Doukbi https://orcid.org/0009-0007-2634-0352
Anne Dutour https://orcid.org/0000-0002-5844-5884
Shaista Ahmed https://orcid.org/0000-0003-4695-4718
Marien Lenoir https://orcid.org/0000-0003-0272-5753
Bastien Gondran-Tellier https://orcid.org/0000-0002-7839-9504
Romain Boissier https://orcid.org/0000-0001-6428-0273
Mikael Ebbo https://orcid.org/0000-0002-1179-8113
Frédéric Vély https://orcid.org/0000-0002-1682-0949
Bénédicte Gaborit https://orcid.org/0000-0002-4180-158X

REFERENCES

1. Baker AR, da Silva NF, Quinn DW, et al. Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:1.
2. Gruzdeva O, Uchasova E, Dyleva Y, et al. Adipocytes directly affect coronary artery disease pathogenesis via induction of adipokine and cytokine imbalances. *Front Immunol*. 2019;10:2163.
3. Gaborit B, Sengenes C, Ancel P, Jacquier A, Dutour A. Role of epicardial adipose tissue in health and disease: a matter of fat? *Compr Physiol*. 2017;7:1051-1082.
4. Gaborit B, Abdesselam I, Dutour A. Epicardial fat: more than just an "epi" phenomenon? *Horm Metab Res*. 2013;45:991-1001.
5. Iacobellis G. Epicardial adipose tissue in contemporary cardiology. *Nat Rev Cardiol*. 2022;19:593-606.
6. Venteclef N, Guglielmi V, Balse E, et al. Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipo-fibrokines. *Eur Heart J*. 2015;36:795-805a.
7. Camarena V, Sant D, Mohseni M, et al. Novel atherogenic pathways from the differential transcriptome analysis of diabetic epicardial adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017;27:739-750.
8. Sacks HS, Fain JN, Bahouth SW, et al. Adult epicardial fat exhibits beige features. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:E1448-E1455.
9. Gaborit B, Venteclef N, Ancel P, et al. Human epicardial adipose tissue has a specific transcriptomic signature depending on its anatomical peri-atrial, peri-ventricular, or peri-coronary location. *Cardiovasc Res*. 2015;108:62-73.
10. Barchuk M, Dutour A, Ancel P, et al. Untargeted lipidomics reveals a specific enrichment in plasmalogens in epicardial adipose tissue and a specific signature in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40:986-1000.
11. Brestoff JR, Kim BS, Saenz SA, et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature*. 2015;519:242-246.
12. Doukbi E, Soghomonian A, Sengenès C, et al. Browning epicardial adipose tissue: friend or foe? *Cells*. 2022;11:991.
13. Lee M-W, Odegaard JI, Mukundan L, et al. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell*. 2015;160:74-87.
14. O'Sullivan TE, Rapp M, Fan X, et al. Adipose-resident group 1 innate lymphoid cells promote obesity-associated insulin resistance. *Immunity*. 2016;45:428-441.
15. Carpentier AC, Blondin DP, Haman F, Richard D. Brown adipose tissue—a translational perspective. *Endocr Rev*. 2023;44:143-192.
16. Deslex S, Negrel R, Vannier C, Etienne J, Ailhaud G. Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes (Lond)*. 1987;11:19-27.
17. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*. 1989;84:1663-1670.
18. Carvelli J, Piperoglou C, Bourenne J, et al. Imbalance of circulating innate lymphoid cell subpopulations in patients with septic shock. *Front Immunol*. 2019;10:2179.
19. Vély F, Barlogis V, Vallentin B, et al. Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. *Nat Immunol*. 2016;17:1291-1299.
20. Chechi K, Gelinas Y, Mathieu P, Deshaies Y, Richard D. Validation of reference genes for the relative quantification of gene expression in human epicardial adipose tissue. *PloS One*. 2012;7:e32265.
21. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 2003;108:2460-2466.
22. Hirata Y, Tabata M, Kurobe H, et al. Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:248-255.
23. Klein M, Varga I. Microenvironment of immune cells within the visceral adipose tissue sensu lato vs. epicardial adipose tissue: what do we know? *Inflammation*. 2018;41:1142-1156.
24. Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, et al. GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes*. 2014;63:3346-3358.
25. Malavazos AE, Iacobellis G, Dozio E, et al. Human epicardial adipose tissue expresses glucose-dependent insulinotropic polypeptide, glucagon, and glucagon-like peptide-1 receptors as potential targets of pleiotropic therapies. *Eur J Prev Cardiol*. 2023;30:680-693.
26. Chechi K, Vijay J, Voisine P, et al. UCP1 expression–associated gene signatures of human epicardial adipose tissue. *JCI Insight*. 2019;4:e123618.
27. Nakajima T, Yokota T, Shingu Y, et al. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in epicardial adipose tissue is associated with decreased concentration of adiponectin and severity of coronary atherosclerosis. *Sci Rep*. 2019;9:3535.
28. Wang H, Shen L, Sun X, et al. Adipose group 1 innate lymphoid cells promote adipose tissue fibrosis and diabetes in obesity. *Nat Commun*. 2019;10:3254.
29. Horckmans M, Bianchini M, Santovito D, et al. Pericardial adipose tissue regulates granulopoiesis, fibrosis, and cardiac function after myocardial infarction. *Circulation*. 2018;137:948-960.

1930739x, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.24023 by Cochrane France, Wiley Online Library on [15/05/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

30. Li J, Wu J, Zhang M, Zheng Y. Dynamic changes of innate lymphoid cells in acute ST-segment elevation myocardial infarction and its association with clinical outcomes. *Sci Rep*. 2020;10:5099.
31. Li Q, Liu M, Fu R, et al. Alteration of circulating innate lymphoid cells in patients with atherosclerotic cerebral infarction. *Am J Transl Res*. 2018;10:4322-4330.
32. Newland SA, Mohanta S, Clément M, et al. Type-2 innate lymphoid cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Commun*. 2017;8:15781.
33. Engelbertsen D, Foks AC, Alberts-Grill N, et al. Expansion of CD25+ innate lymphoid cells reduces atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:2526-2535.
34. Mantani PT, Dunér P, Bengtsson E, et al. IL-25 inhibits atherosclerosis development in apolipoprotein E deficient mice. *PloS One*. 2015;10:e0117255.
35. Molofsky AB, Nussbaum JC, Liang H-E, et al. Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J Exp Med*. 2013;210:535-549.
36. Yang H, Youm Y-H, Vandanmagsar B, et al. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol*. 2010;185:1836-1845.
37. Schwartz C, Schmidt V, Deinzer A, et al. Innate PD-L1 limits T cell–mediated adipose tissue inflammation and ameliorates diet-induced obesity. *Sci Transl Med*. 2022;14:eabj6879.
38. Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med*. 2015;21:698-708.
39. Eken A, Yetkin MF, Vural A, et al. Fingolimod alters tissue distribution and cytokine production of human and murine innate lymphoid cells. *Front Immunol*. 2019;10:217.
40. Filgotinib in the Induction and Maintenance of Remission in Subjects With Moderately to Severely Active Crohn's Disease (DIVERSITY1). ClinicalTrials.gov identifier NCT02914561. Published December 18, 2023. https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02914561
41. Enterome. https://www.enterome.com/
42. Walford HH, Lund SJ, Baum RE, et al. Increased ILC2s in the eosinophilic nasal polyp endotype are associated with corticosteroid responsiveness. *Clin Immunol*. 2014;155:126-135.
43. Moriyama S, Brestoff JR, Flamar A-L, et al. β2-adrenergic receptor-mediated negative regulation of group 2 innate lymphoid cell responses. *Science*. 2018;359:1056-1061.
44. Galle-Treger L, Sankaranarayanan I, Hurrell BP, et al. Costimulation of type-2 innate lymphoid cells by GITR promotes effector function and ameliorates type 2 diabetes. *Nat Commun*. 2019;10:713.
45. Vyas V, Blythe H, Wood EG, et al. Obesity and diabetes are major risk factors for epicardial adipose tissue inflammation. *JCI Insight*. 2021;6:e145495.

SUPPORTING INFORMATION

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

How to cite this article: Doukbi E, Ancel P, Dutour A, et al. Human epicardial fat has a beige profile and contains higher type 2 innate lymphoid cells than subcutaneous fat. *Obesity (Silver Spring)*. 2024;1-13. doi:10.1002/oby.24023

1930739x, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.24023 by Cochrane France, Wiley Online Library on [15/05/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

SUPPLEMENTARY DATA

Human epicardial fat has a beige profile and contains higher type 2 innate lymphoid cells than subcutaneous fat

Obesity, 2024, DOI: 10.1002/oby.24023

Supplementary FIGURE S1 Relationship between browning and Th2 score in EAT of CAD patients and in EAT of non-CAD patients (subgroup analysis)

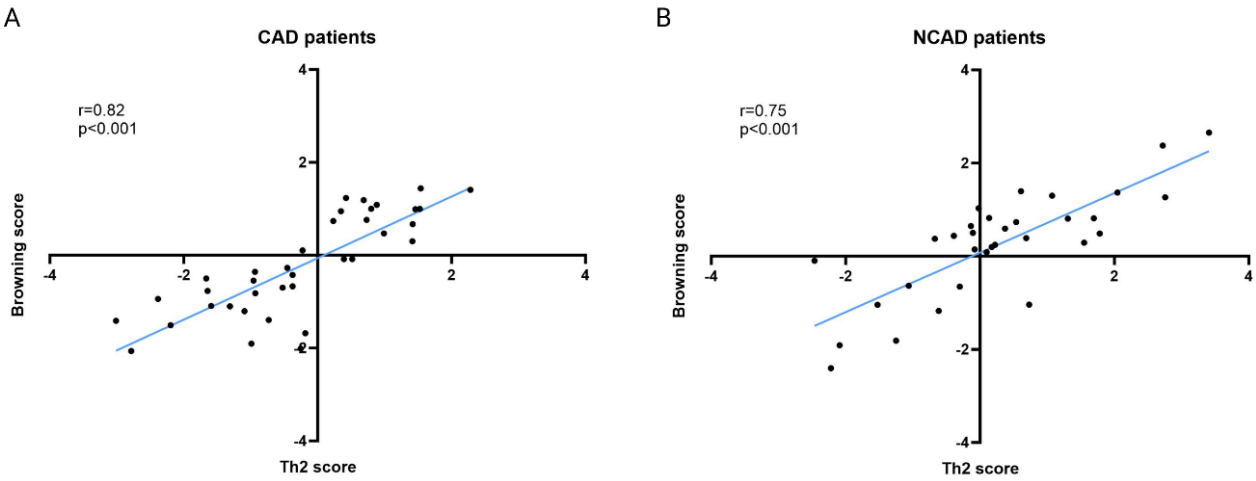


FIGURE S1 Relationship between browning and Th2 score in EAT of CAD patients and in EAT of non-CAD patients (subgroup analysis). A Correlation between Th2 and browning scores in EAT from CAD patients **B** and non-CAD patients. Based on Th2 VIP genes (*IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33, KLRG1, HMMR, UHRF1, BUB1B, KIF23, MELK, MCM6*) and browning VIP genes (*UCP1, PPARGC1A, PRDM16, NRF1, CD81, EPSTI1, FABP4, SHOX2, SLC2A4, TMEM26*).

SUPPLEMENTARY DATA

Human epicardial fat has a beige profile and contains higher type 2 innate lymphoid cells than subcutaneous fat

Obesity, 2024, DOI: 10.1002/oby.24023

Supplementary FIGURE S2 Distribution of adaptive immune cells within fat depots.

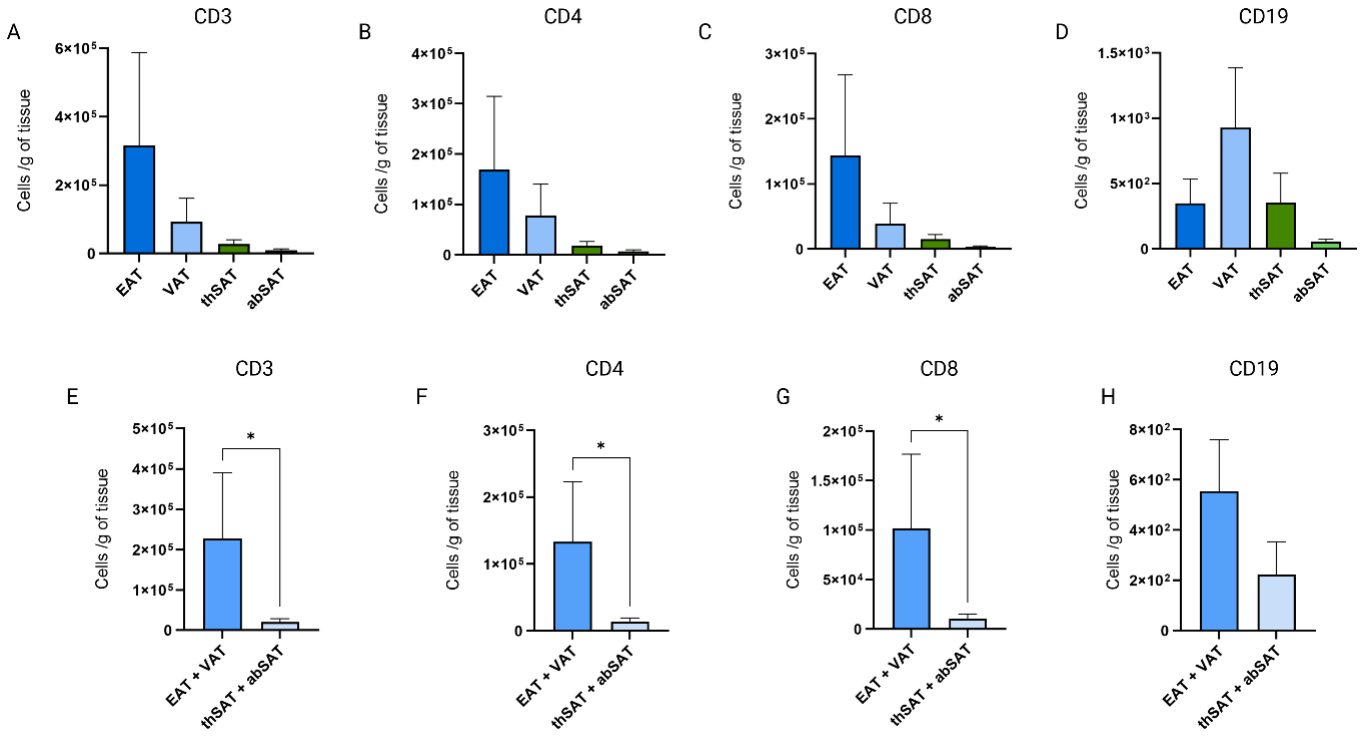


FIGURE S2 Distribution of adaptive immune cells in 4 adipose tissues. A Number of CD3+ T cells per gram of AT. **B** CD3/CD4+ T cells. **C** CD3+/CD8+ T cells. **D** CD19+ B cells. n=18, Anova, ns. **E** Comparison of CD3+ T cells per gram of AT between visceral ATs (EAT + VAT) and subcutaneous ATs (thSAT + abSAT). **F** CD3/CD4+ T cells. **G** CD3+/CD8+ T cells. **H** CD19+ B cells. n=18, t-test, *p<0.05.

SUPPLEMENTARY DATA

Human epicardial fat has a beige profile and contains higher type 2 innate lymphoid cells than subcutaneous fat

Obesity, 2024, DOI: 10.1002/oby.24023

Supplementary FIGURE S3 Distribution of adaptive and innate lymphoid immune cells in visceral and subcutaneous adipose tissues after excluding one CAD patient

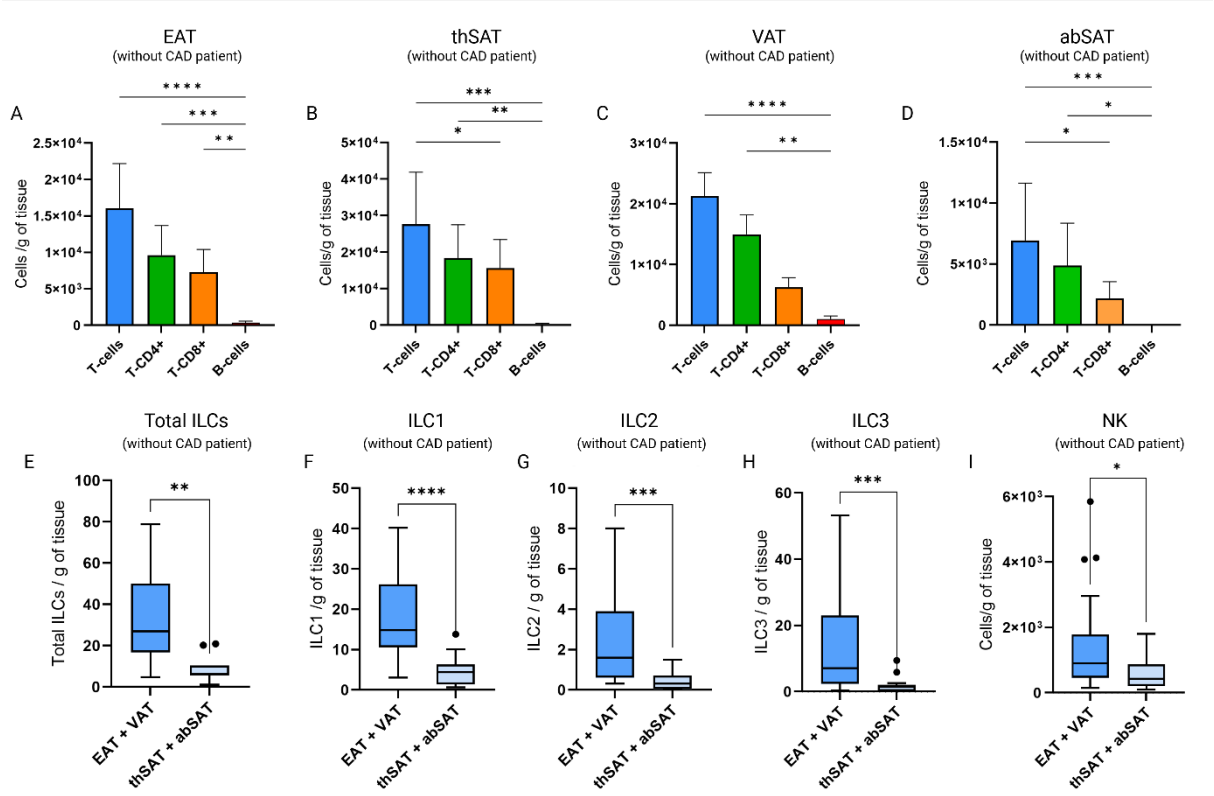


FIGURE S3 Distribution of adaptive and innate lymphoid immune cells in visceral and subcutaneous adipose tissues after excluding the CAD patient. A Distribution of lymphocyte flow cytometry assay showing the number of T cells ($CD3^+$), $CD4^+$ T cells ($CD3^+CD4^+$), $CD8^+$ T cells ($CD3^+CD8^+$) and B cells ($CD19^+$) per gram of EAT, **B** thSAT, **C** VAT and **D** abSAT. **E** Box plot representation of total ILCs number in visceral (EAT and VAT) and subcutaneous (thSAT and AbSAT) adipose tissues per gram of tissue after excluding the CAD patient. **F** Distribution of ILC1, **G** ILC2 and **H** ILC3 subsets per gram of visceral or subcutaneous adipose tissues. **I** Distribution of NK cells within VATs and SATs. Histogram data are represented as mean ± SEM and boxplot data with the Tukey method. Comparison analyses between visceral and subcutaneous adipose tissues were performed using t-test or Anova; n=18, **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001; **** *p*<0.0001.

SUPPLEMENTARY DATA

Human epicardial fat has a beige profile and contains higher type 2 innate lymphoid cells than subcutaneous fat

Obesity, 2024, DOI: 10.1002/oby.24023

Supplementary FIGURE S4 Distribution of Innate lymphoid and NK cells in the 4 adipose tissues

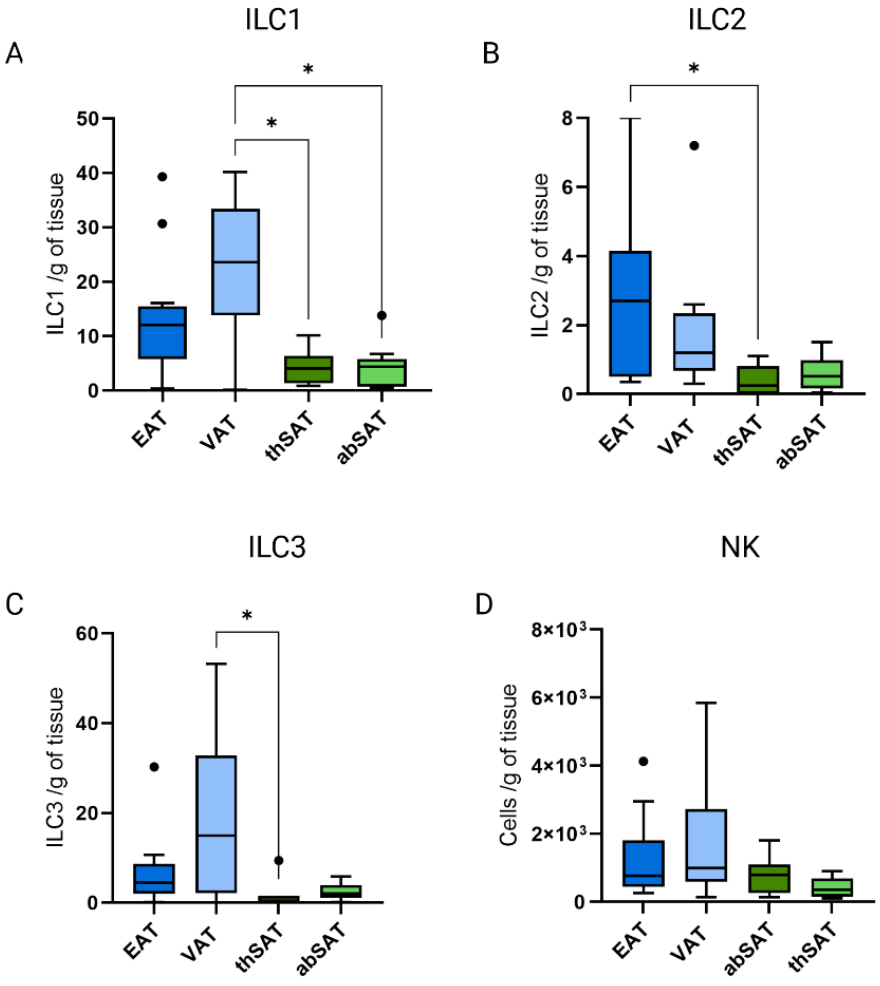


FIGURE S4 Distribution of Innate lymphoid and NK cells in 4 adipose tissues. A Box plot representation of ILC1 per gram of tissue in EAT, VAT, thSAT and abSAT. **B** Box plot representation of ILC2 per gram of tissue in EAT, VAT, thSAT and abSAT **C** Box plot representation of ILC3 per gram of tissue in EAT, VAT, thSAT and abSAT, **D** Box plot representation of NK per gram of tissue in EAT, VAT, thSAT and abSAT. Comparison analyses between the 4 adipose tissues were performed using Anova, n=18, *p<0.05.

IV. Discussion

Les travaux présentés dans cette première partie nous ont permis d'explorer la composition immunitaire du TAE, en particulier la présence d'ILCs en comparaison à trois autres TAs humains (**Figure 31**). Jusqu'à présent, la compréhension des propriétés pro ou anti-inflammatoires de la graisse épicardique se focalisait principalement sur les effets paracrines et endocriniens des adipokines et cytokines qu'il produit. Les profils des cellules immunitaires présentes dans le TAE ont plus rarement été étudiés et restent mal caractérisés (Y. Hirata, Kurobe, *et al.*, 2011; Mazurek *et al.*, 2003; Mráz, Cinkajzlová, Kloučková, Lacinová, Kratochvílová, Lipš, Pořízka, Kopecký, Lindner, *et al.*, 2019; Vianello *et al.*, 2016). Par exemple, la présence des ILCs n'avait, à notre connaissance, jamais encore été investiguée, sûrement en raison de la difficulté à obtenir une quantité suffisante de graisse cardiaque lors de chirurgies à cœur ouvert (Klein & Varga, 2018). Ainsi, cette étude visait à analyser les caractéristiques spécifiques du TAE chez l'humain, en particulier ses propriétés beiges et leur lien avec sa composition en ILC2. Lien que nous avons commencé par mettre en évidence avec une étude transcriptomique rétrospective qui a montré une corrélation significative entre des gènes du beiging et de la réponse immunitaire Th2 dans le TAE. Un immunophénotypage en cytométrie en flux multiparamétrique a ensuite révélé la présence d'ILCs dans sa FVS, largement représentées par le sous-type 1. Bien que les ILC1 soient majoritaires dans l'ensemble des TAs étudiés, nous avons mis en évidence que les ILC2 étaient significativement plus représentées dans le TAE comparé aux autres tissus. De plus, près de 100 % des ILC2 du TAE exprimaient des marqueurs d'activation. Une analyse transcriptomique ciblée nous a également permis de montrer des corrélations positives significatives entre certains gènes du beiging et les ILCs de nos patients, notamment un lien entre les ILC2 et les transcrits thermogéniques UCP1, TNFRSF9 (*receptor superfamily member 9*) ou encore ALPL (*alkaline phosphatase, biomineralization associated*).

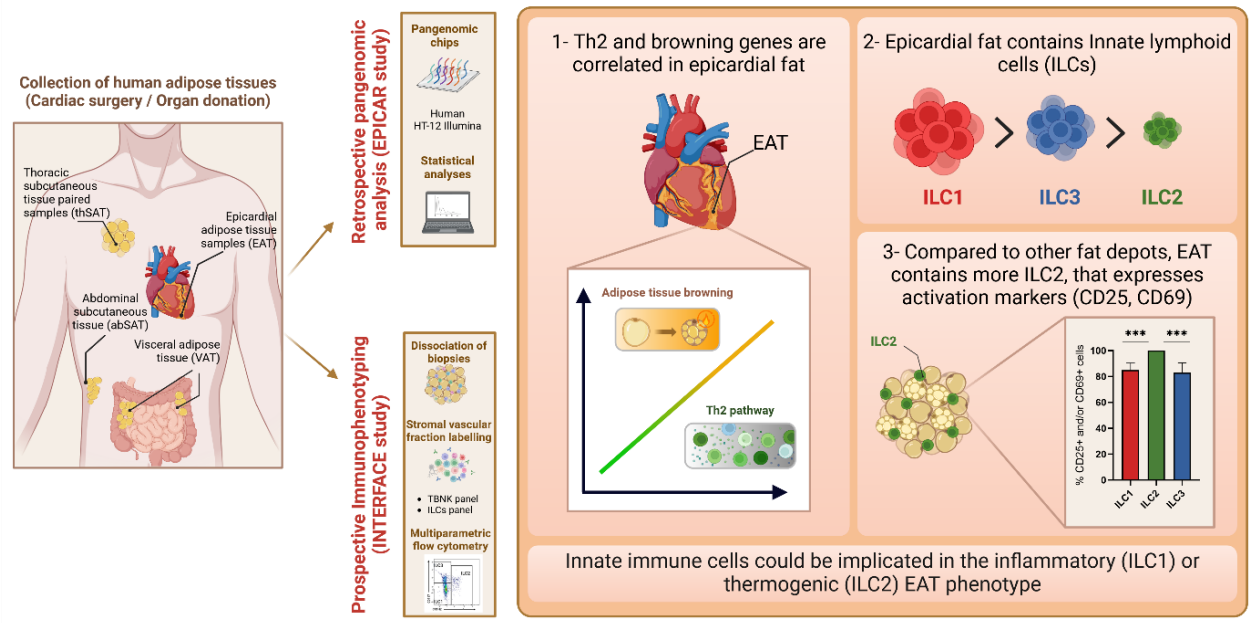


Figure 31 | Résumé graphique de l'étude des ILCs dans le TAE (d'après Doukbi *et al., Obesity*, 2024)

Pour aller plus loin, dans cette étude, nous avons utilisé deux cohortes de patients : EPICAR et INTERFACE. Dans notre nouvelle analyse de la cohorte EPICAR, nous avons détecté 9700 ± 105 gènes. Ces données ont révélé un clustering différent entre TAE et TA sous-

cutané thoracique (nommé ThSAT dans l'article) avec 2123 gènes significativement surexprimés et 1813 gènes sous-exprimés spécifiquement dans le TAE. Grâce à une étude des voies de signalisation cellulaire, nous avons mis en évidence un enrichissement des voies liées au beiging dans le TAE. Confirmant ainsi les résultats d'autres équipes. En 2015, notre équipe avait montré que le TAE présentait un phénotype similaire à celui de la graisse brune ou beige, avec une forte expression de gènes thermogéniques, tels que *UCP-1* ou le coactivateur 1α du récepteur activé par les prolifératurs de peroxysomes γ (*PPARGC1A*) et un enrichissement lipidique spécifique en plasmalogènes, reflétant une activité thermogénique (Gaborit *et al.*, 2015). L'analyse actuelle a également révélé un enrichissement de voies liées à la réponse immunitaire Th2 ainsi que des signalisations en lien, telles que la signalisation à l'IL-4 ou encore à l'IL-13. La réponse immunitaire Th2 est principalement médiée par les lymphocytes $CD4^+$ Th2 et les ILC2 qui produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, et l'IL-13 principalement dans le but d'activer d'autres cellules de la réponse comme les éosinophiles, les basophiles ou encore les mastocytes. Dans le TA, de nombreuses études ont mis en avant la contribution de la réponse Th2 à son statut sain (Hammad *et al.*, 2022). Dans une étude sur 10 patients, comparant le TAE aux TAs sous-cutané thoracique et médiastinal, Chechi et collègues ont montré que la voie Th2 était significativement enrichie dans le TAE comparée au ThSAT ($p < 0{,}0001$) (Chechi *et al.*, 2019). De plus, le TAE et le TA médiastinal semblaient partager plus de points communs par rapport au ThSAT, notamment concernant la surexpression des voies d'activation Th1 et Th2 ($p < 0{,}0001$) et le développement des lymphocytes B ($p < 0{,}001$) (Chechi *et al.*, 2019). Parmi les cellules impliquées dans cette réponse immune, un grand nombre sont également liées au beiging du TA blanc telles que les ILC2, les éosinophiles ou encore les macrophages alternativement activés (AAM, *alternatively activated macrophages*). Ainsi, à partir de nos résultats, nous nous sommes demandé si cette réponse pouvait avoir un lien avec le beiging du TAE. Avec les données d'EPICAR, nous avons effectué une étude de corrélation entre des gènes du beiging que nous avons sélectionnés (*UCP-1*, PPARGC1, PRDM16, NRF1, CD81, EPSTI1, SHOX2, SLC2A4 et TMEM26) et des gènes de la réponse Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33, KLRG1, HMMR, BUB1B, KIF23, MCM6, UHRF1, et MELK). Nos résultats ont montré une corrélation positive significative entre les gènes des deux voies dans le TAE, suggérant que le phénotype beige de la graisse épicardique pourrait être lié aux cellules de la réponse Th2. Cette découverte nous a alors mené à nous intéresser à cette voie immune.

Afin de poursuivre dans cette direction nous avons entrepris, à l'aide d'une deuxième cohorte, l'investigation de la présence de cellules immunitaires de la réponse Th2 dans le TAE comparé à trois autres TA. Aucune étude n'avait jusqu'à présent examiné la composition immune de TAs à la fois abdominaux et cardiaques chez l'humain. Cela s'explique par l'impossibilité d'ouvrir ces deux champs opératoires simultanément, l'abdominal étant considéré comme impropre par rapport à la chirurgie cardiaque, où aucun germe digestif ne doit être transloquer au cœur. D'où l'intérêt d'utiliser des PMO, puisque le décès de la personne permet de réaliser des biopsies de TAs multisites simultanées ce qui n'avait jamais été expérimenté jusqu'alors. En effet, dans la cohorte INTERFACE nous avons utilisé des biopsies de patients en état de mort encéphalique afin d'effectuer un immunophénotypage du TAE. Initialement, les premières analyses d'immunophénotypage effectuées l'ont été à partir de biopsies de TAE provenant de cœurs explantés. Ces cœurs provenaient de patients greffés présentant à l'origine des pathologies cardiovasculaires sévères (cardiomyopathie dilatée,

maladie valvulaire cardiaque en phase terminale, dysplasie arythmogène biventriculaire etc). Les différentes analyses des FVS chez ces patients se sont avérées peu significatifs, peut-être du fait des pathologies sévères que présentaient ces patients (données non présentées). Nous avons, après cela, obtenu une autorisation de l'Agence de la Biomédecine (n° PFS21-005) pour travailler sur des biopsies provenant de prélèvements multiorganes (PMO) sur patients décédés. Cette démarche a ainsi facilité l'obtention de plusieurs dépôts de graisse différents pour un même patient, nous permettant de pairer les données. À partir de ces biopsies, nous avons dans un premier temps phénotypé les lymphocytes, à l'aide d'une méthode de routine biologique utilisée au Marseille Immunopôle par l'équipe du Dr Vély. Nos résultats ont révélé une proportion significativement plus élevée de LT par rapport aux LB dans tous les TA. Avec notamment une proportion plus élevée de cellules T $CD4^+$ par rapport à leurs homologues cytotoxiques $CD8^+$ dans tous les TAs. L'immunométabolisme a émergé ces dernières années comme un régulateur clé de l'homéostasie du TA. Concernant le TAE, une étude de 2003 a fourni la première preuve d'une méta-inflammation du TAE en montrant entre-autres que les LT $CD3^+$ infiltrent plus le TAE que le TAsc (Mazurek *et al.*, 2003). En 2023, une étude combinant analyse bio-informatique intégrée et immunohistochimie a mis en évidence une activation marquée de LT mémoires effecteurs IFN-γ^+ dans le TAE de patients atteints d'insuffisance cardiaque (X.-Z. Zhang *et al.*, 2023). Une autre étude récente, sur plus de 150 patients opérés à cœur ouvert, a également montré que le TAE était enrichi en cellules immunitaires adaptatives par rapport au TAsc, notamment en LT $CD4^+$ (Vyas *et al.*, 2021). Dans notre étude, bien que le nombre de biopsies de TA ait été limité et qu'elles provenaient de PMO, nous avons également confirmé ces résultats. Les TAs viscéraux dont le TAE contenaient des niveaux plus élevés de LT par rapport au ThSAT et à l'AbSAT. En revanche, notre étude ne montre pas de différence significative dans la distribution des LB. Dans l'étude de Vyas *et al.,* les auteurs ont également souligné la prédominance des LT par rapport aux macrophages dans le TAE tandis que l'inverse était observé dans l'AbSAT (Vyas *et al.*, 2021). Cela suggère donc que le profil immunitaire du TA est site spécifique et varie en fonction de sa localisation anatomique. Dans la continuité de nos travaux sur le TAE et de la compréhension de sa physiopathologie, d'autres types lymphocytaires montrent des aspects intéressants. Une étude publiée cette année, a mis en lumière le rôle crucial des Treg $FoxP3^+$ et de la production de cytokines par les cellules de la FVS du TAE et du TA thymique (TAT) chez des patients atteints de CAD (Kologrivova *et al.*, 2025). Les résultats montrent que la sévérité de l'athérosclérose coronarienne est étroitement liée à des déséquilibres immunologiques spécifiques. Chez les patients présentant une athérosclérose sévère, une production accrue de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, TNF, IFNγ) dans le TAT, accompagnée d'une diminution de la translocation nucléaire du facteur de transcription FoxP3 dans les Treg, a été observée. Par ailleurs, des corrélations opposées ont été identifiées entre les cytokines produites par les cellules de FVS du TAE et celles du TAT, suggérant une interaction complexe entre ces deux dépôts adipeux dans le cadre de l'inflammation et de la progression de l'athérosclérose.

Parmi les cellules présentent dans la réponse immunitaire Th2, les ILC2 sont aujourd'hui bien connues pour leur implication dans la thermogenèse, notamment chez le rongeur (Brestoff *et al.*, 2015; M.-W. Lee *et al.*, 2015). Ces cellules à l'interface entre l'immunité adaptative et l'immunité innée sont reconnues comme des inducteurs cellulaires centraux du phénomène de beiging. En effet, il a été montré que les ILC2 activent un circuit thermogénique qui favorise directement l'expansion et l'engagement des progéniteurs

adipocytaires beiges dans le TAsc (M.-W. Lee *et al.*, 2015). De nombreux groupes s'intéressent aujourd'hui à leurs effets anti-inflammatoires et thermogéniques dans le TA, et tendent à essayer d'augmenter leur nombre chez le rongeur. La présence des ILC2, mais également des deux autres sous-types d'ILCs, n'avait à notre connaissance jamais été investiguée dans le TAE humain. Avec l'aide de l'équipe du Dr Vély, nous avons adapté un protocole de routine biologique d'immunophénotypage d'ILCs sanguines aux ILCs du TA. Ainsi, notre étude a effectivement mis en évidence la présence des trois sous-types d'ILCs dans les 4 dépôts adipeux étudiés. De plus, dans une analyse préliminaire (données non montrées), nous avons observé une proportion d'ILCs 20 fois plus importante dans le TA que dans le sang périphérique de sujets sains ou en choc septique observé par l'équipe du Dr Vély (Carvelli *et al.*, 2019). Lors de l'immunophénotypage de ces ILCs, nous avions dans un premier temps représenté leur proportion dans chaque tissu. Nos résultats montraient de plus grandes proportions d'ILCs dans les TAs ectopiques : le TAE et le TAV. Ces résultats ainsi que le nombre limité de patients phénotypés nous ont contraints à grouper ces TAs ectopiques ensemble ainsi que les deux sous-cutanés ensemble. Nous avons observé une augmentation significative des ILCs et des cellules NK dans les TAs ectopiques comparés aux sous-cutanés. Nous avons également montré que les ILCs sont présentes en proportion différente, avec notamment un plus grand nombre d'ILC1 dans tous les TAs, suivi des ILC3 et enfin une minorité d'ILC2. Fait remarquable, le TAE s'est distingué des autres tissus par un enrichissement spécifique en ILC2 par rapport aux autres tissus. De plus, la quasi-totalité (98 %) des ILC2 observées dans le TAE exprimaient des marqueurs d'activation (CD25 et CD69) classiques des ILCs. Cela est intéressant, car de nombreuses études ont indiqué que la fonction effectrice des ILC2 était responsable de l'induction du beiging du TA et d'un profil immunitaire anti-inflammatoire (Brestoff *et al.*, 2015; M.-W. Lee *et al.*, 2015). Brestoff *et al.* avaient par exemple montré chez la souris qu'un traitement par transfert adoptif d'ILC2 ou par administration d'IL-33 augmentait le nombre d'adipocytes beiges UCP-1^{+} dans le TA blanc (Brestoff *et al.*, 2015). Ces résultats tendent ainsi à expliquer le rôle potentiel des ILC2 dans l'activité thermogénique du TAE, que nous et d'autres avons déjà mis en évidence (Gaborit *et al.*, 2015; Sacks *et al.*, 2013). Pour cela, il serait intéressant d'effectuer des études fonctionnelles qui impliqueraient l'utilisation d'ILC2 sur du TAE. L'utilisation d'organoïdes pourrait alors être une piste afin d'étudier l'effet des cellules immunitaires de la FVS sur le TA ectopique. De plus, nos résultats pourraient également être confirmés par des analyses immuno-histologiques, ce que nous avons tenté de faire avec l'aide des chercheurs de l'équipe 5 du C2VN (I*mpact of the exposome in severe chronic respiratory disease*) et les chercheurs de Metadiad. Nous avons renoncé à effectuer ces tests en raison du faible nombre d'ILC2, difficiles à détecter dans le TA, ainsi qu'au grand nombre d'anticorps à utiliser pour leur détection. De plus, bien que dans notre étude nous avons montré une corrélation entre ILC2 et gènes du beiging, les mécanismes impliqués dans l'activation de la thermogenèse du TAE restent encore méconnus et les facteurs beigisants à découvrir

Pour aller plus loin, nous avons effectué un phénotypage par expression génique qui a confirmé la surexpression de l'IL-33, l'une des cytokines alarmines spécifiques des ILC2, dans le TAE. De plus, nous avons observé une corrélation positive entre l'expression du gène de l'IL-13 et la quantification des ILC2 dans tous les TAs. Cependant, des études fonctionnelles supplémentaires sont nécessaires pour identifier quels médiateurs déclenchent l'activation des ILC2 ainsi que des autres effecteurs de la réponse Th2 impliqués dans le beiging comme les éosinophiles, les macrophages ou les mastocytes. Dans le TAE, l'activité thermogénique et la

fonction mitochondriale diminuent avec l'âge ou encore l'avancée de la CAD (Nakajima *et al.*, 2019). Une faible respiration mitochondriale dans le TAE a été également associée à la gravité de la CAD (Nakajima *et al.*, 2019). Chez nos patients, nous avons constaté une surexpression des gènes thermogéniques UCP-1, ALPL et TNFRSF9 dans le TAE par rapport aux autres TAs, ainsi qu'une corrélation positive entre l'expression de ces gènes et la quantification des ILC2 dans tous les tissus. Bien que les données de nos patients INTERFACE n'aient pas été différenciées en fonction de leur état coronarien, nos données supplémentaires sur EPICAR montrent qu'il existe également une corrélation positive entre gènes du beiging et score Th2 des patients atteints de CAD. Il pourrait alors être intéressant d'approfondir nos connaissances sur l'état des ILC2 et leurs fonctions thermogéniques dans le TAE de patients CAD.

Concernant les ILC1 et les ILC3, près de 80 % de ces cellules exprimaient des marqueurs d'activation dans le TAE. Ajouté au fait que les ILC1 représentaient le sous-type le plus abondant dans les 4 dépôts adipeux, cela nous amène à nous intéresser à cette balance entre les cellules immunitaires pro *versus* anti-inflammatoires présentes dans le TAE. Chez la souris, les ILC1 sont largement résidentes dans les tissus, tandis que les NK sont recrutés à partir de précurseurs de la moelle osseuse et sont présents dans la circulation (Gasteiger *et al.*, 2015; Schleh *et al.*, 2023). L'activation des ILC1 et NK par les cytokines locales constitue une réaction en amont qui accroît l'environnement pro-inflammatoire nécessaire pour induire des réponses immunitaires à l'excès d'adiposité (Schleh *et al.*, 2023). Dans le TA humain, le nombre d'ILC1 augmente chez les patients en situation d'obésité présentant un DT2 et corrèlent avec les paramètres glycémiques et le nombre d'ILC1 dans le sang (H. Wang *et al.*, 2019). Les ILC1 adipeuses présentent des propriétés pro-inflammatoires et favorisent la fibrogenèse adipeuse ainsi que l'activation de macrophages pro-inflammatoires $CD11c^+$ (H. Wang *et al.*, 2019). De plus, de récentes études ont également montré que les ILC1 et ILC2 jouent des rôles opposés dans la pathogenèse de l'athérosclérose. On peut notamment observer une augmentation des taux d'ILC1 circulantes chez des patients présentant un infarctus du myocarde avec élévation du segment ST aigu ou un infarctus cérébral, corrélé à des niveaux plus élevés de LDL oxydés (J. Li *et al.*, 2020; Q. Li *et al.*, 2018). En revanche, les ILC2 sont réduites chez les patients atteints d'infarctus du myocarde ou cérébral, ainsi que chez les souris obèses (J. Li *et al.*, 2020; Q. Li *et al.*, 2018). De plus, l'ablation génétique des ILC2 favorise le développement de l'athérosclérose, tandis que leur expansion via un transfert adoptif direct ou l'administration d'IL-2 et d'IL-25 est protectrice contre l'athérosclérose (Engelbertsen *et al.*, 2015; Mantani *et al.*, 2015; Newland *et al.*, 2017). L'administration d'IL-33 entrainant également une augmentation du nombre d'ILC2 adipeuses, est associée à une augmentation des adipocytes beiges, à une meilleure tolérance au glucose et à une plus grande perte de poids (Schuijs & Halim, 2018). Ainsi, il aurait été intéressant, à partir de nos données, d'étudier le lien entre les taux d'ILC1 et d'ILC2 et l'état physiopathologique des patients. Malheureusement, le nombre de patients présentant une obésité, un DT2 ou encore une CAD n'étaient pas suffisants pour permettre la réalisation de tests statistiques. De plus, nous ignorons encore si les ILC1 pourraient être impliquées dans le profil pro-inflammatoire du TAE, notamment chez les patients atteints de CAD. Pour cela, d'autres tests fonctionnels sont encore nécessaires.

Les ILC3, beaucoup moins étudiées que les deux autres sous-types d'ILCs dans le TA, jouent tout de même un rôle dans l'obésité. En effet, des données suggèrent que bien que les ILC3 aient un rôle semblable aux ILC2 en conditions homéostasiques, ceux-ci peuvent devenir

des médiateurs de l'inflammation dans le TA obèse via l'expression de certains facteurs tels que LIF, TNFSF13B ou encore MIF. Ces effets pro-inflammatoires, au cours de l'obésité, pourraient alors provenir d'une signalisation à l'IL-17. Chez la souris, les ILC3 ne seraient pas présents dans les TAs aussi bien des souris minces que des souris obèses (O'Sullivan *et al.*, 2016). Ceci met en évidence les différences entre la composition immune des TAs murins et humains et suggère que certains aspects de l'inflammation médiée par les ILCs durant l'obésité pourraient ne pas être conservés au cours de l'évolution chez les mammifères (Hildreth et al., 2021b).

Ainsi, cette étude montre que mieux identifier le déséquilibre entre les ILCs dans le TAE pourrait permettre de mieux cibler son profil immunométabolique. Comme mentionné dans l'article, diverses méthodes permettant de manipuler les ILCs ont émergé ces dernières années telles que l'inhibition de leur migration et de leur fonction (Eken *et al.*, 2019; Sonnenberg & Artis, 2015), ou encore la manipulation du microbiote, les glucocorticoïdes ou les agonistes des récepteurs β2-adrénergiques (Moriyama *et al.*, 2018; Walford *et al.*, 2014). D'autres approches, comme le transfert adoptif, les anticorps anti-cytokines ou même la modulation des points de contrôle immunitaires, ont également été utilisées pour lutter contre l'athérosclérose, l'obésité et le DT2 chez l'humain et la souris. De manière intéressante, la présence du récepteur GITR sur les ILC2 activées stimule non seulement la sécrétion de leurs cytokines effectrices, mais prévient aussi leur apoptose. Un agoniste du GITR a permis d'inverser une intolérance au glucose établie en induisant le beiging des adipocytes via la sécrétion d'IL-13 (Galle-Treger *et al.*, 2019). Ainsi, l'activation thérapeutique de la voie IL-33/GITR/ILC2 du beiging pourrait représenter une cible intéressante pour réduire le phénotype inflammatoire du TAE. D'autres travaux encore soutiennent qu'en plus des activateurs classiques des ILC2, les médiateurs lipidiques comme les prostaglandines et les leucotriènes dérivés de l'acide arachidonique peuvent réguler la fonction de ces cellules en contrôlant positivement ou négativement leur activation (T. Hirata & Narumiya, 2012; Konya & Mjösberg, 2016; Olguín-Martínez *et al.*, 2021). Plusieurs rapports indiquent que les ILC2 ont une internalisation des acides gras plus importante que d'autres populations cellulaires telles que les Treg, les ILC1 et les ILC3 (Wilhelm *et al.*, 2016). À noter également que des médicaments tels que les agonistes du GLP-1, permettent de réduire l'inflammation du TAE, augmenter l'oxydation des acides gras libres comme source d'énergie pour le myocarde et induire le beiging (Beiroa *et al.*, 2014). L'utilisation de ces agonistes sur le TAE pourrait améliorer la sensibilité à l'insuline et le métabolisme myocardique (Beiroa *et al.*, 2014). En 2023, Malavazos *et al.* montraient la présence des récepteurs au GLP-1 aux niveaux des structures en couronne des macrophages et dans les adipocytes du TAE humain (Malavazos *et al.*, 2023a). On ignore encore si d'autres cellules immunitaires adipeuses telles que les ILCs expriment ces récepteurs. Le rôle des ILCs dans la physiopathologie de la graisse épicardique et, de manière plus large, dans les maladies cardiovasculaires reste à élucider.

PARTIE 2 : Les vésicules extracellulaires comme médiateurs de la communication intercellulaire

I. Objectif et contexte

L'obésité représente aujourd'hui un problème de santé publique majeur et est associée à une augmentation significative du risque de maladies cardiovasculaires (MCV) telles que l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque ou encore la fibrillation atriale (Poirier *et al.*, 2006). Ce risque est notamment lié à l'accumulation de graisses ectopiques, parmi lesquelles le TAE joue un rôle clé du fait de sa proximité anatomique avec le myocarde et les artères coronaires (Doukbi *et al.*, 2022; Dutour *et al.*, 2010; Thanassoulis *et al.*, 2010).

Le TAE, métaboliquement actif, exerce une influence directe sur le cœur, au travers de mécanismes paracrines et vasocrines (Gaborit *et al.*, 2017). En conditions pathologiques telles que dans l'obésité ou le syndrome métabolique, le TAE subit des altérations phénotypiques qui incluent alors une inflammation accrue, une dysfonction adipocytaire ou encore une sécrétion exacerbée de médiateurs bioactifs (Baker *et al.*, 2006; Fain *et al.*, 2010; O. Gruzdeva *et al.*, 2019; O. V. Gruzdeva *et al.*, 2017). Parmi ces médiateurs, on retrouve notamment les vésicules extracellulaires (VEs), impliquées dans la communication intercellulaire.

Les VEs sont capables de transporter un grand nombre de cargos différents, tels que des lipides, des protéines ou encore des acides nucléiques (Clement *et al.*, 2020; Hartwig *et al.*, 2019; Valadi *et al.*, 2007). Elles sont aujourd'hui largement étudiées pour leur capacité à moduler divers processus physiopathologiques comme l'inflammation, la fibrose ou la plasticité cellulaire. Dans le contexte des MCV, de nombreuses équipes accordent une attention croissante aux VEs issues du TAE, notamment en raison de leur implication dans la FA, où elles contribuent par exemple au remodelage structurel et électrique du myocarde (Shaihov-Teper *et al.*, 2021). Cependant, les fonctions des VEs du TAE ne se limitent pas qu'à leur implication dans cette pathologie. Elles pourraient également jouer un rôle important dans l'inflammation systémique et/ou locale, ainsi que dans la modulation du phénotype beige du TAE, comme cela a déjà pu être observé pour les VEs issues de macrophages (Jung *et al.*, 2020).

Ainsi, dans cette deuxième étude, nous avons cherché à caractériser les VEs du TAE et à évaluer leur effet sur son beiging et/ou son inflammation. Nous pensons que le sécrétome vésiculaire épicardique serait le siège d'une communication intercellulaire avec les adipocytes, ou les cellules de la FVS. En effet, le contenu des VEs, influencé par le profil métabolique du TAE sécréteur, pourrait moduler leurs fonctionnalités et contribuer au beiging ou à l'entretien de l'inflammation de ce dépôt de graisse ectopique. Plus largement, ce projet a été mené dans l'optique de comprendre les mécanismes par lesquels les VEs influencent ces processus et d'enrichir nos connaissances sur le rôle physiopathologique du TAE dans l'obésité et les MCV.

ARTICLE

Human epicardial adipose tissue derived extracellular vesicles modulate adipocyte secretome via a pro-inflammatory profile

Elisa Doukbi, Patricia Ancel*, Romaric Lacroix*, Anne Dutour, Pierre Morange, Françoise Dignat Geogea, Corinne Chareyre, Stéphane Robert, Marien Lenoir, Vlad Gariboldi, Eric Lechevallier, Bastien Gondran-Tellier, Romain Boissier, Camille Deprade, Christian Dani, Soazig Le Lay & Bénédicte Gaborit

Manuscrit soumis au journal *JACC : Basic to translationnal science.*

Comprehensive profiling of extracellular vesicles reveals the pro-inflammatory role of human epicardial adipose tissue EVs

Elisa Doukbi[a], Patricia Ancel[a*], Romaric Lacroix[a,b*], Anne Dutour[a,c], Pierre-Emmanuel Morange[a,d], Françoise Dignat George[a,b], Corinne Chareyre[a], Stéphane Robert[a], Marien Lenoir[e], Vlad Gariboldi[a,f], Eric Lechevallier[g], Bastien Gondran-Tellier[g], Romain Boissier[g], Camille Deprade[a,c], Christian Dani[h], Soazig Le Lay[i,j] and Bénédicte Gaborit[a,c]

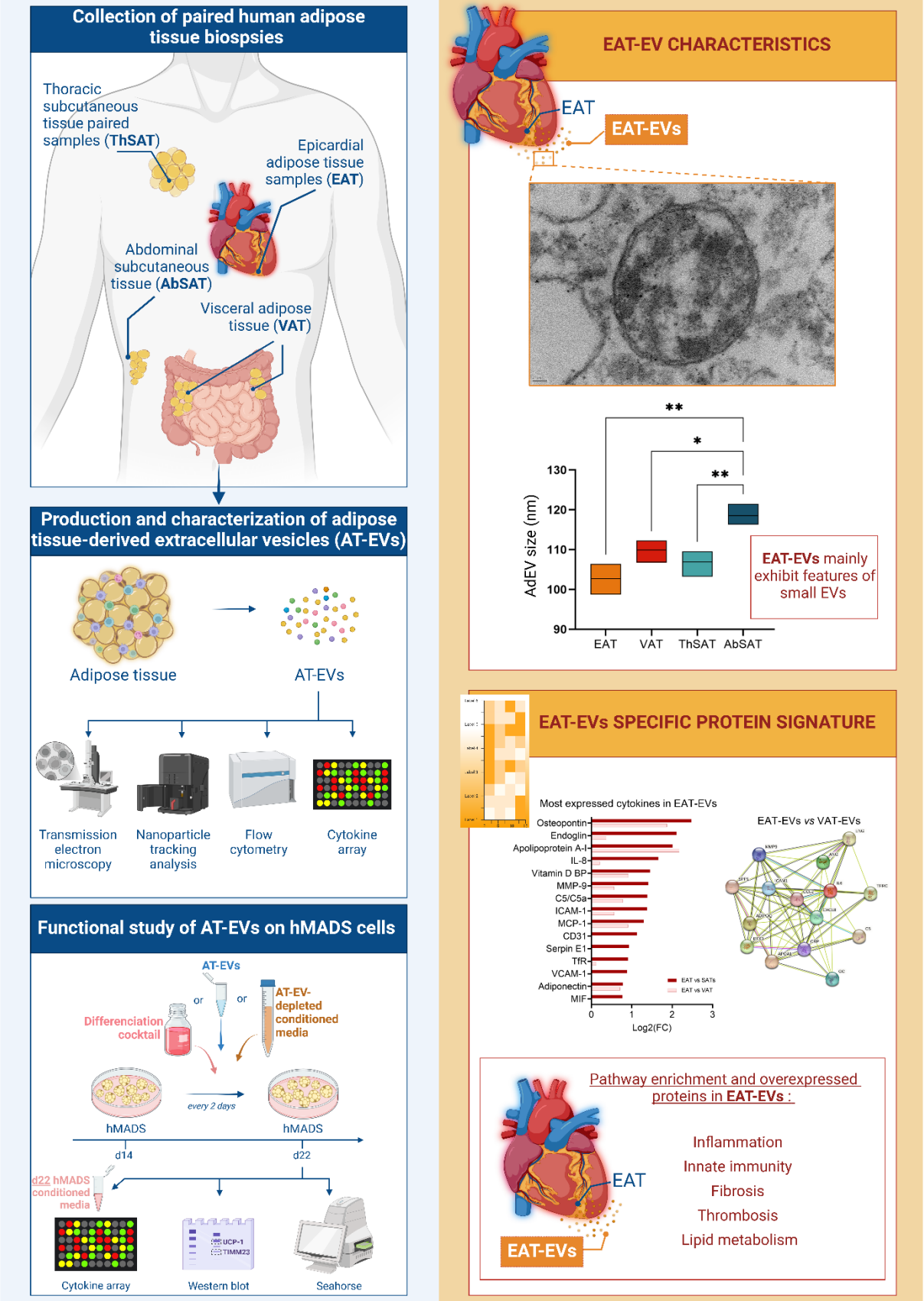
[a] Aix Marseille Univ, INSERM, INRAE, C2VN, Marseille, France
[b] Hematology and Vascular Biology Department, CHU La Conception, APHM, Marseille, France
[c] Endocrinology, Metabolic Diseases and Nutrition Department, Pôle ENDO, APHM, Marseille, France
[d] Hematology Laboratory, La Timone, APHM, Marseille, France
[e] Division of Paediatric Cardiac Surgery, Marseille University Hospital Timone, APHM, Marseille, France
[f] Cardiac Surgery Department, Timone hospital, APHM, Marseille, France
[g] Department of Urology, APHM, La Conception Hospital, Marseille, France.
[h] University of Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, Faculté de Médecine, Nice, France
[i] Nantes University, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France
[j] University of Angers, SFR ICAT, Angers, France
[*] The authors contributed equally

Corresponding author: benedicte.gaborit@univ-amu.fr ; Faculté de médecine, Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France ; +33(0)491324614

Funding support: For this work, Professor Benedicte Gaborit received support from Fondation de l'Avenir, Paris, France (2022, AP-RM-22-017) and Elisa Doukbi received a grant from Fondation pour la Recherche Médicale, Paris, France (FDT202404018254).

Running title: Epicardial adipose tissue extracellular vesicles and inflammation

VISUAL ABSTRACT



ABSTRACT

Background: Epicardial adipose tissue (EAT) is a key source of biologically active molecules that influence cardiovascular (CV) function. Extracellular vesicles (EVs) released from EAT have been implicated in some pathophysiological processes, such as atrial fibrillation but their specific role in cardiac physiology remains poorly understood.

Objective: The aim of this study was to perform comprehensive analysis of isolated EVs derived from four distinct adipose tissues (AT) to identify the specificity of EAT-derived EVs (EAT-EVs), their protein content, and their impact on adipocyte function (beiging and secretome) using human multipotent adipose derived stem (hMADS) cell line.

Methods: AT explants were collected from 31 human brain-dead multiorgan donors, with each individual providing four paired depots: EAT, visceral AT (VAT), thoracic subcutaneous AT (ThSAT) and abdominal subcutaneous AT (AbSAT). These explants were used to prepare AT-derived extracellular vesicles (AT-EVs). The AT-EVs from 19 donors were characterized using transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis, western blot, flow cytometry and 105-cytokine array profilers. The remaining AT-EVs (n=12) were used for functional testing on hMADS cells.

Results: The characterization of AT-EVs from different adipose depots highlighted a distinct and unique profile for EAT-EVs. Notably, EAT-EVs were smaller than other AT-EVs, particularly those derived from AbSAT ($P < 0.005$) and exhibited higher content of exosomal markers such as CD63 and CD81. Moreover, EAT-EVs were enriched in pro-inflammatory, (IL-8, IL-6, TNF-α, and MCP-1), prosenescent (osteopontin), and profibrotic (endoglin, MMP9), while also containing insulin-sensitizing and anti-inflammatory factors such as adiponectin and APOA1. Exposure of hMADS cells to EAT-EVs increased adhesion (ICAM-1, VCAM-1) and prothrombotic (serpin E1) molecule expression, suggesting an inflammatory response, but also enhanced protective factors linked to cardiac and lipid metabolism, hormonal activity, reduction of oxidative stress, and apoptosis such as relaxin 2 and SHBG. Given the metabolic characteristics of EAT and brown/beige AT, EAT-EVs were shown to promote beige-like inducing properties. However, no specific effect of EAT-EVs or conditioned media depleted of AT-EVs on hMADS beiging was observed.

Conclusions: Our findings reveal a distinct EAT-EV profile linked to inflammation, fibrosis, thrombosis, lipid metabolism and hormonal regulation that could interact with myocardium, coronary arteries and impact on individual CV risk.

UNSTRUCTURED ABSTRACT

Epicardial adipose tissue (EAT) releases extracellular vesicles (EVs) that may influence cardiovascular function. Our study analyzed adipose tissue-derived EVs from four human adipose depots (EAT, visceral (VAT), thoracic subcutaneous (ThSAT), and abdominal subcutaneous (AbSAT)) from 31 donors. EAT-EVs showed a distinct profile, being smaller and enriched in pro-inflammatory, profibrotic, and insulin-sensitizing proteins. When applied to hMADS cells, EAT-EVs triggered inflammatory and prothrombotic markers, while also enhancing protective metabolic and hormonal factors. Although EAT-EVs appeared to have beige-like potential, no clear beiging effect was observed. These findings suggest EAT-EVs may play a unique role in cardiovascular risk and tissue interaction.

Keywords: Epicardial adipose tissue, Extracellular vesicles, Inflammation, Beiging, Cardiovascular disease

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

AbSAT = abdominal subcutaneous adipose tissue

AT-EVs = adipose-tissue derived extracellular vesicles

CVD = cardiovascular disease

EAT = epicardial adipose tissue

EVs = extracellular vesicles

hMADS = human multipotent adipose derived stem

SAT = subcutaneous adipose tissue

T2D = type 2 diabetes

ThSAT = thoracic subcutaneous adipose tissue

VAT = visceral adipose tissue

INTRODUCTION

Obesity is now a major public health issue and is recognized as a major risk factor for numerous metabolic and cardiovascular diseases (CVDs). The cardiovascular (CV) system is particularly impacted, with a substantial increase in the risk of CVDs such as myocardial infarction, heart failure, and atrial fibrillation (AF) (1). While adipose tissue (AT) was long considered a passive energy reservoir, it is now recognized for its remarkable ability to expand and regulate energy homeostasis (2). AT is classified into three main types: white adipose tissue, which primarily stores energy; brown adipose tissue, specialized in thermogenesis; and beige adipose tissue, an inducible thermogenic subtype that shares properties with both white and brown adipose tissues. Additionally, AT functions as an endocrine organ, secreting bioactive molecules, including cytokines, adipokines, and fibrokines, which exert both local and systemic effects (3, 4). Moreover, thermogenic tissues such as brown and beige adipose depots play a key role in energy expenditure. Obesity is closely linked to chronic low-grade inflammation, which disrupt AT homeostasis (5). Traditionally, body mass index (BMI) has been used to assess obesity, however, AT distribution is now known as a crucial determinant of metabolic and inflammatory complications (6, 7). A recent expert consensus redefines clinical obesity as a chronic illness that results from alterations in the function of organs or the whole organism, directly induced by excess adiposity, independent of the presence of other adiposity-related diseases (8). Visceral adipose tissue (VAT) accumulation is strongly associated with insulin resistance, type 2 diabetes (T2D), and coronary artery disease (CAD), whereas subcutaneous adipose tissue (SAT) in the gluteofemoral region appears metabolically protective (9). The ability of SAT to expand helps prevent fat deposition in ectopic sites such as visceral fat, epicardial fat, and intramyocardial fat (cardiac steatosis) (10). Among ectopic fat depots, epicardial adipose tissue (EAT) is of particular interest due to its close anatomical and functional relationship with the heart. EAT is a metabolically active fat depot with high lipogenic and lipolytic activity, directly surrounding the myocardium and coronary arteries. Unlike other visceral adipose depots, EAT shares its microcirculation with the underlying myocardium, allowing direct biochemical interactions between adipocytes and cardiac cells. Under physiological conditions, EAT produces adipokines such as adiponectin, omentin, and adrenomedullin, which exert anti-inflammatory and cardioprotective effects. However, in pathological states such as obesity, EAT undergoes significant expansion and develops a more pro-inflammatory phenotype (11–14). Beyond its quantity, the secretory profile of EAT is increasingly recognized as a key factor in its influence on CV health. EAT secretes various bioactive molecules, including extracellular vesicles (EVs) (15). EVs are nanosized membrane-bound structures secreted by various cell types, including adipocytes (16–18). They play a crucial role in intercellular communication by transporting proteins, lipids, and microRNAs capable of influencing the metabolic and inflammatory activity of target cells (19–21). The secretome of EAT, and more specifically the

composition of EAT derived EVs (EAT-EVs), has been suggested to play a key role in the development of CVDs. This is due to their ability to modulate local inflammation, myocardial metabolism, and endothelial function in the coronary arteries.

Despite growing interest in ectopic fat deposition, comprehensive studies characterizing the secretome of EAT, particularly the composition of EAT-EVs, remain scarce (15). This is an important gap, as EAT's unique anatomical position allows it to directly influence the myocardium and coronary arteries, exerting paracrine and vasocrine effects without the intervening fascia that separates epicardial adipocytes from cardiomyocytes and vascular cells. By contrast, other visceral abdominal adipose depots like VAT, which is more abundant, can release bioactive molecules into the portal circulation, thereby having a broader, systemic effect (22). Emerging evidence supports that EAT exhibits characteristics of beige AT, with thermogenic actions notably through mitochondrial expression of uncoupling protein 1 (UCP-1) (23). Moreover, our previous work using a pan-genomic approach has demonstrated that human EAT exhibits a unique transcriptomic profile with a beige adipocyte signature, distinguishing it from SAT (24). However, functional studies that explore the role of EVs on EAT beiging have not been investigated yet.

In this study, we aimed to characterize the molecular profile of human EAT-EVs and compare them with EVs derived from other adipose depots, including abdominal VAT, abdominal subcutaneous AT (AbSAT), and thoracic subcutaneous AT (ThSAT). By analyzing the molecular signatures of pooled EAT-derived EVs, we sought to gain a better understanding of their potential role in CV physiology. We hypothesized that EAT-EVs could carry key mediators of heart-AT crosstalk, modulating the inflammatory or beige adipocyte profile of EAT and influencing local myocardial metabolism, inflammation, and endothelial function in the coronary arteries. This comparative analysis of EVs from different adipose depots is essential to unravel their distinct contributions to cardiovascular health and disease.

METHODS

PATIENTS. Prospective paired EAT, VAT, ThSAT, and AbSAT biopsies from brain dead multiorgan donors (n = 31) were collected for human AT explants. All of the donors' families gave their signed written informed consent for the scientific sampling protocol. This protocol was approved by the National Ethics Committee of the French Biomedicine Agency (registration number PFS21-005), and collection was declared to the Ministry of Higher Education, Research, and Innovation (CODECOH N_ DC-2021-4518) and respected the Jardé Law on human investigation. Absence of objection from the deceased donors' families was systematically verified by the local organ donation coordination team.

AT-EV PRODUCTION FROM ADIPOSE TISSUE EXPLANTS. AT explants were generated using each fat depot and manipulated directly after biopsy recovery from the operating room. AT biopsies were minced into 2-3 mm^3 pieces in prewarmed PBS. The tube containing the explant was gently shaken and then centrifuged at 100*g* for 1 min at room temperature (RT). Explants were then washed four times with 40 mL of KREBS 0.1% FFA-free BSA pH 7.4, followed by centrifugation at 100*g* for 1 min at RT after each wash. The final wash was performed with ECBM/HEPES 10mM/0.1% FFA-free BSA pH 7.4. The explants were then transferred into 6-well culture plates, with 1 gram of explant per well in 3 mL of ECBM/HEPES 10mM/0.1% FFA-free BSA pH 7.4. The plates were incubated at 37°C, 5% CO_2 for 48 hours. Serum-free conditioned medium (CM) after 48h of culture was collected, filtered through a 100µm cell strainer to remove any residual explant fragments and used for adipose-derived EV (AT-EV) isolation, as we previously implemented and described (25). Supernatants of each well were pooled according to the experimental condition and immediately used for AT-EV isolation.

AT-EV ISOLATION AND PURIFICATION. AT-EVs were purified by first centrifuging the pooled supernatants at 1,500*g* for 20 min at RT to remove cells and cell debris. Supernatant was then centrifuged a second time at 4,500*g* for 15 min at 4°C. The resulting pellet, containing apoptotic bodies, was discarded, while the supernatant containing other AT-EVs was kept at 4°C prior to ultracentrifugation. AT-EVs were then concentrated by ultracentrifugation at 100,000*g* for 1.5 hours at 4°C (rotor 70.1 Ti, Beckman Coulter Optima XE-90 ultracentrifuge). The pellet was resuspended in 2 mL of filtered PBS. AT-EVs were further purified from soluble proteins using size exclusion chromatography (SEC) (qEV2 35nm, IZON) according to manufacturer's instruction. Briefly, AT-EVs resuspended in 2mL of PBS were allowed to run into the column and the eluate was collected in 30 fractions of 2 mL. Fractions 9 to 12 were identified as AT-EVs carriers and were reconcentrate in 100kDa ultrafiltration at 1,000*g* for 15 min (Vivaspin Turbo 15, Sartorius) and stored at -20°C. Finally, AT-EVs from the same adipose depot were pooled into 2 distinct pools (pool 1; n=19 patients and pool 2; n=12 patients) (**Supplementary table 1**) and concentrate using 100kDa ultrafiltration at 1,000*g* for 15 min (Vivaspin Turbo 15, Sartorius) and stored at -20°C until use.

TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY (TEM). AT-EV preparations were first fixed for 45min at 4°C with 2.5% glutaraldehyde (Roth, Germany) in 0.1 M Phosphate buffer pH 7.4. After three washes in Phosphate Buffer 0.1M, AT-EV pellets were post-fixed with 2% reduced osmium tetroxide (Roth, Germany) in phosphate buffer 0.1M, pH 7.4, for 35 min at room temperature, rinsed in phosphate 0.1M and dehydrated through series of increasing ethanol concentration baths, and infiltrated with EMBed-812 (Electron Microscopy Sciences, USA) for 1h prior to 24h polymerization at 56 °C. Embedded AT-EV samples were then cut into 60-nm

thin sections using Leica UC7 ultramicrotome and post-stained with 3% uranyl acetate. EM imaging was done with Jeol JEM-1400 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) at 120 kV, equipped with Gatan Orius 832 bottom mounted CCD-camera (Gatan Inc., Pleasanton, CA).

NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA). AT-EV samples were diluted in sterile NaCl 0.9% before NTA analysis. Particle Metrix Zeta View PMX-120 NTA instrument (Excilone, France) was used for single-particle analyses in scatter mode. Instrument setup was done according to the manufacturer's guidelines (cell check and auto-alignment with 100 nm polystyrene beads standards upon each start-up). For analyses in scatter mode, camera sensitivity was set at 85, shutter speed at 100, with high video quality at 30 frames/s, minimal area 10, maximal area 1,000, minimum brightness 30, and minimum trace length 15. AT-EVs samples were diluted in 0.1µm filtered PBS for every NTA analysis.

WESTERN BLOTTING. AT-EVs and human multipotent adipose derived stem (hMADS) cells were lysed with RIPA buffer and protease inhibitor cocktail (Merck, France). Protein quantifications were measured by using the Micro BCA Protein Assay Kit (Merck, France) for AT-EVs or BCA Protein Assay Kit (Merck, France) for hMADS cells lysates according to the manufacturer's instructions. Total AT-EVs (from 1.10^8 particles) or hMADS (10µg) proteins were separated on 4%–12% NuPAGE gels with MES SDS running buffer (Thermo Fisher Scientific) and transferred onto a PVDF membrane (Thermo Fisher Scientific). For AT-EV markers, membranes were blocked and labeled overnight at 4°C with the following primary antibodies against the designated antigens: integrin β3 (1:1000, Cell Signaling Technology), albumin (1:1000, Thermo Fisher Scientific), CD63 (1:1000, Thermo Fisher Scientific) and glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1:1000, Cell Signaling Technology). Next, HRP-conjugated secondary antibody (1:5000, Thermo Fisher Scientific) was added for 1h at RT. Immunocomplexes were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. For hMADS lysates, membranes also were blocked and labeled overnight at 4°C with the following primary antibodies against the designated antigens: Ucp-1 (1:1000, Abcam), Timm23 (1:1000, Abcam), GAPDH (1:40000, Millipore). Chemiluminescence signals were obtained using Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific). Images were captured using Invitrogen iBright FL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific) and quantified using ImageJ software (v1.57, National Institutes of Health, Bethesda).

FLOW CYTOMETRY. A flow cytometric method was used to phenotype AT-EVs and was performed using a 4-laser (Violet–Blue–Yellow–Red) CytoFLEX S cytometer (Beckman Coulter). The stability of the large AT-EVs scatter gate was monitored by the use of Megamix-Plus Forward Scatter (FSC) and Side Scatter (SSC) purchased from BioCytex (Marseille, France). AT-EVs (30 µL) were double stained with 10 µL of Annexin V (AnnV) (Beckman

Coulter) (cf. as previously described (26)) and 10 µL of the antibodies of interest: CD18-PE, CD40-PE and CD49d-APC as immune/inflammatory markers, CD36-APC and CD44-PE as markers of lipid and adipocyte metabolism, CD31-PE for endothelial origin, CD24-PE and CD157-PE for progenitor origin and CD55-PE (complement) and CD59-PE as EV stability marker. The best antibody concentration was determined after titration. After 20 min of incubation at RT, samples were diluted in 400 µL of AnnV binding buffer and analyzed. To prevent carryover issues, a wash was performed between each sample. To analyze the content of functional mitochondria in AT-EVs, we labelled them using the Mitotracker Deep Red (Thermo Fisher Scientific). Data was analyzed using Cytexpert software

HMADS CULTURE. hMADS cells culture have previously been described (27). Briefly, cells were seeded at a density of 25,000 cells/cm^2 in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 15 mM HEPES, 2.5 ng/mL FGF2, 60 mg/mL penicillin, and 50 mg/mL streptomycin. FGF2 was removed when cells reached confluence. Differentiation was induced in cells in a serum-free medium at day 2 post-confluence (designated as day 0) in DMEM/Ham's F12 (1:1) media supplemented with 10 µg/mL transferrin, 5 nM insulin, 0.2 nM triiodothyronine, 1 µM rosiglitazone. 1 µM dexamethasone, and 100 µM isobutyl-methylxanthine were added during the first 3 days of differentiation. Media were changed every other day, and cells were used at the indicated days.

CELL VIABILITY AND EV CYTOTOXICITY. Cell viability was measured using the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay system (Promega) and cytotoxicity was measured by the lactate dehydrogenase activity (Promega). hMADS were cultured for a week in presence of various concentrations of AT-EVs (1, 5, 10, and 20 µg/mL) added each two days. Each concentration was tested in triplicate. Culture supernatant was used for cytotoxicity test according to the manufacturer's instructions, Cells were incubated for 1 hour at 37°C in humidified 5% CO2 atmosphere with CellTiter reagent for proliferation test. Proliferation and Cytotoxy assays were measured using an Ensight fluorometer (Perkin Elmer)

CALCEIN AM. The AT-EVs were first incubated with 4 µM Calcein-acetoxymethyl ester (AM) (Invitrogen) (a non-fluorescent and lipophilic form of the Calcein dye) on ice in the dark. After the addition of 2 mL of PBS, they were ultracentrifuged for 30 minutes at 20,000g at 4°C. The AT-EVs were then resuspended in 50 µL of PBS and are ready for use. The same preparation without AT-EVs was used as negative control (washed calcein AM). Incubation of Calcein AM with hMADS was used as a positive control. hMADS cells were incubated for 45min with Calcein AM AT-EV/washed calcein AM/ calcein AM. Images were obtained with a microfluorescence microscope (Zeiss).

CYTOKINE ARRAY. Cytokines in AT-EV preparations and hMADS supernatant were detected using Proteome Profiler Human XL Cytokine array kits (ARY022B, R&D Systems), according to the manufacturers' instructions. Fifty micrograms of total protein were used for AT-EV analyses. Arbitrary values of cytokine abundance were calculated as integrated densities of each dot plot normalized by the reference spots. Integrated densities were measured using the ImageJ software (v1.51w) and AnalyzeDotBlots macro script (28).

SEAHORSE XF REAL-TIME ATP RATE ASSAY. Agilent Seahorse XF Real-Time ATP rate assay kit was used to measure multiple parameters including oxygen consumption rate, total ATP production by quantifying ATP production rate from both glycolytic and mitochondrial pathways and ATP rate index. Briefly, hMADS were seeded into Seahorse XFp Microplates and then differentiated during 14 days before administration of AT-EVs from each AT every 2 days until day 22 of differentiation. Control hMADS were cultured without AT-EVs. Every microplate contained 3 control wells for 3 conditioned wells. Cells were cultured in appropriate conditioned as previously described. A day prior to the experiment seahorse sensor cartridges were hydrated with water and incubated at 37 °C in a non-CO_2 overnight. An hour before the experiment, the water was replaced with prewarmed XF Calibrant. On the day of the experiment, Seahorse XF DMEM (pH=7.4) was supplemented with 10mM of XF glucose, 1mM of XF pyruvate, 2mM of XF glutamine (Agilent, USA) and prewarmed at 37°C. hMADS mediums were then replaced with Seahorse XF base medium. The cells were then incubated at 37°C in a non-CO_2 incubator for 60min. During this incubation period, Oligomycin and Rotenone/antimycin (Agilent, USA) were prepared in the seahorse medium to achieve final concentrations of 1.5µM and 0.5µM respectively when injected. From these stock solutions, 20µl and 22µl of Oligomycin and rotenone/antimycin respectively were then loaded into the drug delivery ports A and B of the hydrated sensor cartridge and loaded into the Agilent Seahorse XF HS Mini analyzer to calibrate for 30 minutes. Then calibration plates were replaced with cell culture plates. Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were monitored following the sequential injection of Oligomycin and rotenone/antimycin with each cycle set as 3 min mix, 2 min delay and measure for 3 min.

STATISTICAL ANALYSES.

Data are presented as mean ± SEM unless otherwise specified (median ± interquartile range). Statistical analyses were performed using GraphPad software v10.4.1 (Prism). Overrepresentation pathways analysis was performed using ConsensusPathDB (Max Planck Institute) (29). Minimum overlap with input list used was 2 and *P*-value cutoff was 0.01. Interactions between cytokines (networks) and enrichment pathway were analyzed using the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) database and online software (30). Minimal protein count in pathways was 4.

RESULTS

CHARACTERIZATION OF EPICARDIAL ADIPOSE TISSUE-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES.

We collected fat specimens from 31 brain-dead multiorgan donors. To elucidate the role of EAT-EVs, we first aimed to characterize them compared to AT-derived EVs (AT-EVs) from three other paired fat depots: VAT, ThSAT and AbSAT (**Figure 1**). AT-EVs were then pooled according to their AT origin and analyzed according to the last MISEV guidelines (**Figure 1**). Most of the demographic, clinical characteristics, CV risk factors, and indications for multi-organ sampling were similar between patients from pool 1 and pool 2 (**Supplementary table 1**). Transmission electron microscopy (TEM) imaging of AT-EVs preparations allowed visualization of morphological characteristics of the EVs (**Figures 2A-D**). The images obtained revealed EVs with characteristic double membrane structure. Notably, some AT-EVs appear to contain electron-dense material (**Figures 2A-D**), while others showed no visible content (**Figure 2B**). Additionally, some AT-EVs seemed to exhibit the presence of organelles, also enclosed by a double membrane, within their structure, suggesting a potential compartmentalization of cellular material inside these vesicles (**Figure 2D**). AT-EV size distribution NTA analysis revealed that EAT, VAT and ThSAT secrete significantly smaller AT-EVs than AbSAT (AbSAT-EVs: 119 ± 3nm *vs* EAT-EVs: 103 ± 4nm, $P = 0.001$; VAT-EVs: 110 ± 3nm, $P = 0.04$; ThSAT: 107 ± 3nm, $P = 0.009$) (**Figure 2E**). These AT-EVs showed a peaked size between 50 and 100 nm (**Supplementary figure 1A**) corresponding to small EV characteristics. Western blot analysis confirmed the presence of β3-integrin and tetraspanins CD63 and CD81 in the AT-EV fraction produced from EAT explants, with no major contamination by soluble proteins such as albumin (**Figure 2F**). Using flow cytometry, we then analyzed the expression of membrane markers (CD18, CD24, CD31, CD36, CD40, CD44, CD55, CD59 and CD157) in association with Annexin V (AnnV), on AT-EVs isolated from the four adipose depots. Most AT-EVs were found to be $AnnV^+CD59^+$ (**Figure 2G**). Furthermore, as wished the number of $AnnV^+CD59^+$ AT-EVs per gram of AT did not significantly differ between EAT, VAT, ThSAT and AbSAT (**Figure 2H**). Together these results showed that all the four AT secrete EVs, EAT-EVs displaying smaller sizes compared to EVs secreted by other fat depots.

EAT-EV EXHIBIT A SPECIFIC PROTEIN SIGNATURE COMPARED TO EVS DERIVED FROM VAT AND SAT

While the specific molecular profile of EAT-EVs remains poorly understood, we compared the cytokine content of EAT-EVs to EVs derived from the other 3 adipose depots. To this aim, we used commercial cytokine arrays allowing the comparative screening of 105 secreted factors in AT-EVs prepared, respectively, from the epicardial fat, VAT, ThSAT and AbSAT for each

patient. As such arrays necessitate the blotting with sufficient protein quantities (minimum 50µg) to enables cytokine detection, a pool of EV preparations coming from the same 19 patients was used for each AT-EV subtype (EAT, VAT, ThSAT and AbSAT) (**Supplementary table 1**). As expected, cytokine array dot blotting revealed a high adiponectin (ADIPOQ) content in AT-EVs, regardless of the AT depot source (**Figure 3A**). Moreover, relative comparison of cytokine content between AT-EVs isolated revealed a specific enrichment of adiponectin within EAT-EVs compared to the other AT depots (**Figure 3B**). Interestingly, the top 15 most expressed cytokines in EAT-EVs, showed an enrichment in pro-inflammatory molecules such as IL-8 (CXCL8, GROα), osteopontin (OPN, secreted phosphoprotein 1, SPP1), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1, CCL2), macrophage migration inhibitor factor (MIF), complement C5/C5a and serpine E1 (or plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1), as well as anti-inflammatory factors such as apolipoprotein A1 (APOA1) and ADIPOQ (**Figure 3B**) compared to VAT-EVs, ThSAT-EVs and AbSAT-EVs,. Proteins from other pathways were also found overexpressed in EAT-EVs, including those involved in cellular adhesion, extracellular matrix (ECM) remodeling and angiogenesis. These cytokines include intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), endoglin (transforming growth factor β receptor 3, TGFβR3), CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1), metalloproteinase 9 (MMP9), and transferrin receptor (TfR) (**Figure 3B**). Using a heatmap normalized to ThSAT-EVs and AbSAT-EVs, we identified distinct protein signatures between EVs respectively derived from EAT and VAT (**Supplementary figure 2, Figure 3C**). Particularly, we found that ADIPOQ, APOAI, and MCP-1 were overexpressed in EAT-EVs compared to VAT-EVs, while dipeptidyl peptidase 4 (DPP-IV) and myeloperoxidase (MPO) were downregulated in EAT-EVs compared to VAT-EVs (**Supplementary figure 2, Figure 3C**). In addition, compared to other AT depots, VAT-EVs contain the largest number of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1β, IL-1Ra, IL-5, IL-11, IL-18Bpα, Il-17A, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, Il-34, IL-27, IL-13), c-reactive protein (CRP), complement factor D, chinitase 3-like 1 (CHI3L1), macrophage inflammatory protein 3α (MIP-3α), tumor necrosis factor α (TNFα), lipocalin-2 (**Supplementary figure 2, Figure 3C**). Furthermore, VAT-EVs contained higher levels of growth and angiogenic factors, such as fibroblast growth factor 19 (FGF-19), basic fibroblast growth factor (FGF-2), angiopoietin 1, growth differentiation factor 15 (GDF-15) and platelet-derived growth factor AA (PDGF-AA) compared to EAT and to both ThSAT-EVs and AbSAT-EVs (**Supplementary figure 2, Figure 3C**). Together, these results showed that EAT-EVs exhibit a distinct cytokine profile with an enrichment in pro-inflammatory molecules and proteins involved in adhesion, ECM remodeling, and angiogenesis, but also in cardioprotective adipokines such as adiponectin compared to VAT and SAT-EVs, without presuming their innate or compensatory role.

EAT-EVS ARE ENRICHED IN INFLAMMATORY AND METABOLIC SIGNALING PATHWAYS

We next analyzed protein networks within cytokines overexpressed in EVs derived from VAT compared to EVs derived from SAT depots (by considering both ThSAT-EVs and AbSAT-EVs together) (**Figure 4A**), EAT-EVs compared to pooled SAT-EVs (**Figure 4B**) and in EAT-EVs compared to VAT-EVs (**Figures 4C**). These analyses showed a complex protein network in VAT-EVs and EAT-EVs, and confirmed numerous overexpressed inflammatory cytokines compared to those retrieved in SAT-EVs (**Figure 4A-C**). While analyzing specific overexpressed cytokines in EAT-EVs compared to VAT-EVs we found specific enrichment in ADIPOQ, ICAM-1, MCP-1 (CCL2), IL8 (CXCL8), MMP9, APOA1, pentraxin 3 (PTX3), C5, angiogenin (ANG) and CRP (**Figure 4C**). Pathway enrichment analysis of overexpressed cytokines in EAT-EVs, compared to SATs-EVs, using the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING), identified significant enrichment in pathways related with the inflammasome (NFκB), innate immune response, and ECM remodeling (**Figure 4D**). Besides, EAT-EVs exhibited significant enrichment in pathways related with immune signaling, inflammatory responses and extracellular matrix organization including key mechanisms governing cytokine interactions, immune cell differentiation, and major inflammatory signaling cascades (**Figure 4D**). EAT-EVs also displayed activation of oxidative stress pathways such as AGE and RAGE, insulin signaling pathways (PI3K/Akt), fluid shear stress and atherosclerotic pathway (**Figure 4D**). Alternatively, analysis of overexpressed pathways in EAT-EVs compared to SATs-EVs also revealed a significant enrichment of inflammatory and metabolic signaling pathway, with the most overrepresented pathway being local acute inflammatory response (**Supplementary figure 3A**). Interestingly, EAT-EVs overexpressed a pathway entitled “EVs in the crosstalk of cardiac cells” identifying MMP9, IL-6 and SSP1 (**Supplementary figure 3A-B**). Together, these results show that EAT-EVs are enriched in pathways related to inflammation, immune response, and ECM remodeling, including key signaling cascades associated with metabolic diseases.

EFFECTS OF EAT-EVs ON hMADS CELLS SECRETOME

To investigate the functional impact of EAT-EVs, *in vitro*, we used hMADS cells, a well-established model of human adipocytes. These cells reliably reproduce key characteristics of mature adipocytes, including their metabolic activity and responsiveness to external stimuli. This model allowed us to assess the metabolic effects of AT-EVs on a relevant adipocyte population, which exhibits a high capacity of trans-differentiation from white to beige function that further allowed us to test the beiging effects of AT-EVs. To determine if EAT-EVs affect hMADs' secretome and respiration, we cultured hMADs for 14 days, exposed them to AT-EVs from different AT, and analyzed the culture supernatants via cytokine array and respiration via Seahorse on day 22. (**Figure 5A**). To assess the impact of EAT-EVs on the hMADS cell secretome, we performed a cytokine array on supernatants from cells cultured in standard differentiation medium (control) or incubated with AT-EVs (**Supplementary figure 4A**). The

heatmap representation of the 105 cytokines studied, normalized to the control, revealed distinct secretome profiles between AT-EV-treated cells and their respective AT-EV-depleted conditioned media (**Figure 5B**). In EAT-EV-treated hMADs cells, cytokine analysis revealed significant upregulation of RBP-4, SHBG, Relaxin-2, CD30, MIP-1α/MIP-1β, PDGF-AA, OPN, CD31, Serpin E1, Fas Ligand, and Complement Factor D (CFD), with RBP-4 being the most expressed (**Figure 5C**). While all AT-EVs increased RBP4, SHBG, Relaxin-2, Osteopontin, and SerpinE1 were specifically upregulated by EAT-EVs (**Figure 5C**). Given the beige phenotype of EAT, we hypothesized that EAT-EVs could be implicated hMADS cell beiging. Western blot analysis of mitochondrial markers TIMM23 and UCP-1 (**Figure 5D**) showed no significant differences between control and AT-EV-treated conditions (**Figure 5E, Supplemental figures 4B-J**). This suggests that while EAT-EVs modulate the hMADS secretome, they do not induce a metabolic shift toward a beige phenotype under the conditions tested.

INTERNALIZATION AND FUNCTIONAL IMPACT OF AT-EVS ON hMADS CELL RESPIRATION AND ATP PRODUCTION

To further evaluate mitochondrial function and hMADS energy metabolism in response to AT-EVs, we performed a Seahorse ATP Rate Assay to measure ATP production rate, oxygen consumption rate (OCR), and the balance between glycolysis and oxidative phosphorylation, key indicators of mitochondrial activity. We first assessed the internalization of Calcein-AM labeled AT-EVs in hMADS-differentiated adipocytes observing significant uptake within 45 minutes, suggesting potential intracellular signaling activation and/or EV-based material transfer (**Figure 6A**). Given hMADS cells' ability to transdifferentiate into beige adipocytes, we investigated whether AT-EVs could promote beiging through mitochondrial transfer. We used flow cytometry analysis of Mitotracker DeepRed-labeled AT-EVs, as this dye accumulates in mitochondria with intact membrane potential, allowing the identification of EV-enclosed functional mitochondria. While all AT-EVs showed positive labeling, ThSAT-EVs exhibited significantly higher labeling compared to AbSAT-EVs (**Figure 6B**). Incubation of the different AT-EV subsets on hMADS-differentiated adipocytes neither affected cellular respiration parameters, including OCR (**Figure 6C**) and overall ATP production rate (**Figures 6D),** nor mitochondrial ATP and glycolysis (glyco)ATP (**Figures 6E-F).** Similarly, the glycolysis-to-oxidative phosphorylation ratio remained unchanged following incubation with AT-EVs (**Figures 6G**) or with AT-EV-depleted conditioned media (**Supplementary figure 4)**. Overall, these findings suggest that while AT-EVs are efficiently internalized and likely contain mitochondria, they do not transfer enough functional mitochondria to boost oxidative activity or respiratory capacity of hMADS-differentiated adipocytes.

DISCUSSION

This study provides the first comprehensive characterization of EVs derived from human EAT and compares them with EVs from three other adipose depots (VAT, ThSAT, and AbSAT). Our results highlight the unique molecular signature of EAT-EVs, which exhibit small size EVs and specific enriched cargo associated with proinflammatory, prosenescent, profibrotic, as well as also insulin-sensitizing and lipoprotein signaling pathways, providing new insights in cardiovascular physiology.

EAT-EVs and cardiovascular inflammation

Senescence, fibrosis, hypertrophy, and inflammation are key mechanisms in metabolic diseases' related cardiomyopathy, heart failure and CAD (31). The balance between protective and deleterious adipokines secreted by EAT may contribute to the pro-inflammatory phenotype associated with endothelial dysfunction and atherogenesis, or even confer a higher risk of rhythmic disorders (32). While the precise crosstalk mechanisms linking EAT to the heart remain unclear, recent studies highlighted AT-EVs as potential metabolic vectors in both physiological and pathological processes. This prompted us to specifically characterize EV populations regarding their anatomical origin (abdominal/thoracic, epicardial or visceral/subcutaneous (33, 34). Despite the challenge of isolating EVs from solid tissues (35), we provide here a comprehensive analysis of AT-EVs and uniquely report the specific characteristics for EAT-EVs.

One interesting finding is the smaller size of EAT-EVs compared to other AT-EVs consistent with previous reports (15, 36). This suggests a specific enrichment of exosomes in EAT-EVs.

Our findings moreover reveal that, despite being a visceral depot, EAT-EVs exhibit a distinct cytokine profile compared to VAT-EVs, with increased content of ADIPOQ, APOAI, MCP-1 and reduced expression of DPP-IV or MPO. EAT-EVs were also enriched in both pro- and anti-inflammatory cytokines, differentiating them from VAT-EVs and SAT-EVs. Specifically, EAT-EVs exhibit an overexpression of IL-8, MCP-1, osteopontin, and MIF, all known to promote inflammatory cell recruitment, endothelial dysfunction, and vascular remodeling (11–14). Furthermore, we identified elevated levels of adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) and extracellular matrix proteins (MMP9) in EAT-EVs, reinforcing their potential role in vascular inflammation and CAD progression, through local paracrine and vasocrine effects (22).

EAT-EVs and cardiac remodeling

We also found that EAT-EVs expressed higher levels of ADIPOQ compared to VAT and SAT-EVs. Adiponectin is a key insulin-sensitizing adipokine which increases fatty acid oxidation

via AMPK activation, reduces myocardial lipid accumulation and maintains an anti-inflammatory microenvironment in the CV system (37). Notably, we previously demonstrated that adiponectin-associated EVs retain the functional properties of the native protein (38). However, in metabolic diseases conditions, EAT-derived adiponectin production decreases, leading to reduced adhesion molecule expression, cytokine secretion and foam cell formation. In CAD patients, ADIPOQ expression in EAT was shown to be reduced, yet oxidative products from the heart can upregulate its expression via PPAR-γ activation, suggesting a cardioprotective response (39). Additionally, ADIPOQ promotes APOA1 expression in hepatocytes through AMPK, PPARα and LXRs signaling (40). Thus, the enrichment of EAT-EVs in ADIPOQ and APOA1 may represent a compensatory mechanism against myocardial lipotoxicity and glucotoxicity warranting further investigation.

We previously reported that profibrotic factors (e.g, MMP, activin A) and proinflammatory factors (e.g, interleukins, TNFα) secreted by EAT can reach cardiomyocytes, contributing to atrial myocardial fibrosis and conduction abnormalities (24). Indeed, Greulich *et al.* demonstrated that activin A and angiopoietin-2 reduced cardiomyocyte contractility, suggesting that EAT-derived secretome was able to promote arrhythmogenesis (41). In high-fat diet mice, cardiac fat accumulation induces electrical remodeling of the atrial myocardium, increasing vulnerability to AF (42). EAT expansion impairs atrial myocardial mechanical function, while atrial natriuretic peptides like ANP, secreted by atrial myocytes, act as key adipogenic factors for EAT (43). Furthermore, EAT-EVs from AF patients displayed a unique proinflammatory, profibrotic, and proarrhythmic signature (15), and were shown to promote AF by shortening action potential duration and inducing sustained reentry (rotor) in cardiomyocytes, suggesting that EAT-EVs were sufficient to trigger atrial myopathy (15, 44).

Our pathway enrichment analysis further supports the role of EAT-EVs in inflammation and CV remodeling. Compared to SAT-EVs, EAT-EVs were enriched in inflammatory signaling pathways such as IL-17, TNF, and NF-κB pathways, ECM organization, innate immunity and angiogenesis. These findings highlight the potential role of EAT-derived EVs in linking obesity, inflammation, and CV dysfunction. Our previous pan-genomic analysis revealed that human EAT exhibits a unique beige adipocyte signature, distinct from ThSAT (24), linked to Th2 immune pathway and type-2 innate lymphoid cells (ILC2) (45). In this study, we aimed to assess whether EAT-EVs could induce AT beiging, particularly through functional mitochondria transfer. Accordingly, Crewe *et al.* recently reported that adipocytes release small EVs containing damaged mitochondria in response to energy stress, which protect the myocardium from ischemia/reperfusion injury in mice (46). Our study revealed that EAT-EVs likely contain functional mitochondria which, however, do not modulate mitochondrial respiration or ATP production in hMADS cells, suggesting that EAT-EV effects are more related to inflammation rather than direct metabolic reprogramming.

Epicardial and intra-abdominal fat evolve from brown adipose tissue during embryogenesis. Thus, one of the physiological function of EAT is to supply the myocardium with energy, via free fatty acids oxidation, and thermoregulation (47, 48). Epicardial fat cellularity is composed mainly by white adipocytes, dense macrophages infiltrates, stromal and neural cells (49). EAT can provide direct heating to the myocardium and protect the heart in neonatal life and during poor hemodynamic conditions, such ischemia or hypoxia. Nonetheless, we observed no differences in the expression of mitochondrial UCP-1 and TIMM23 between hMADS treated with EAT-EVs or EVs derived from the three other adipose depots, indicating that EAT-EVs do not influence mitochondrial beiging under the tested conditions. Nevertheless, it is now recognized that EAT brown fat-like activity drastically and rapidly declines with aging and pathological conditions, such as obesity (50). Consistent with this, aging induces cardiac structural and functional changes linked to the increased deposition of ECM proteins, including OPN, conducing to progressive interstitial fibrosis (51). In obesity, epicardial fat undergoes apoptotic and fibrotic changes that alter its transcriptomic and proteomic profiles, particularly in response to chronic ischemia and adverse hemodynamic conditions (thermoneutral vs cold exposure) (47, 48). As we could not select the age and metabolic conditions of the patients included (dead donors), one cannot exclude that the EAT samples had already lost their thermogenic properties.

EAT-EVs and secretome modulation

Cytokine array analysis of hMADS cell supernatants treated with AT-EVs revealed that EAT-EVs significantly reshape the secretome of these adipocytes, leading to upregulation of key molecules such as SHBG, Relaxin-2, OPN, and Serpin E1. These findings suggest that EAT-EVs may contribute to local inflammatory, hormonal, thrombotic and fibrotic processes in the heart and coronary vessels. Relaxin-2 plays a crucial role in both physiological and pathological CV processes, influencing cardiac metabolism by promoting vasodilation, reversing fibrosis and hypertrophy, reducing inflammation and oxidative stress, and stimulating angiogenesis (52). Recent preclinical and clinical studies have highlighted relaxin-2 (or its recombinant form, serelaxin), as a promising therapeutic molecule for treating cardiac injury or heart failure (52). These findings further support the dual role of EAT-EVs, which may have both beneficial and harmful effects on adipocytes.

Altogether, our study highlights the essential role of EAT-EVs as molecular carriers mediating intercellular crosstalk between cardiomyocytes, adipocytes and vascular wall cells.

STUDY LIMITATIONS

Our study has some limitations. EV research is inherently constrained by current isolation techniques (16, 53). Our AT-EVs were obtained from brain-dead patients, and to ensure sufficient EV quantities for functional assays, we pooled samples from multiple individuals, thereby precluding AT-EV analysis based on patient-specific characteristics such as T2D, obesity, or CAD status. Additionally, since EVs were derived from AT explants rather than isolated cell fractions, their precise cellular origin could not be determined. While we focused on the protein composition of EAT-EVs, additional studies are warranted to investigate other molecular components such as lipids or miRNAs. Moreover, storing AT-EVs at -20°C may have affected mitochondrial integrity, potentially influencing their functional effects on hMADS cells. Finally, as beiging is typically induced by cold exposure, incubating hMADS cells at 37°C may have limited our ability to accurately evaluate this process. Despite these limitations, our findings offer novel insights into the unique characteristics and functional properties of EAT-EVs.

CONCLUSION

Overall, our results demonstrate that EAT-EVs possess a distinct molecular and functional signature compared to VAT- and SATs- EVs, emphasizing their potential role in metabolic and cardiovascular diseases. Given the specific proximity of EAT to the myocardium and coronary arteries, EAT-EVs may represent key mediators of local inflammatory and remodeling processes, making them promising targets for therapeutic intervention. Future studies should further investigate the specific microRNA and lipid content of EAT-EVs to elucidate their contribution to CVDs.

FUNDING SUPPORT

For this work, Professor Benedicte Gaborit received support from Fondation de l'Avenir, Paris, France (2022, AP-RM-22-017) and Elisa Doukbi received a grant from Fondation pour la Recherche Médicale, Paris, France (FDT202404018254).

REFERENCES

1. Poirier P, Giles TD, Bray GA, *et al.* Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:968–976.

2. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:338–349.

3. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010;316:129–139.

4. M F, M B. Adipokines in health and disease. *Trends in pharmacological sciences* 2015;36.

5. Schleh MW, Caslin HL, Garcia JN, *et al.* Metaflammation in obesity and its therapeutic targeting. *Sci Transl Med* 2023;15:eadf9382.

6. Ohlson LO, Larsson B, Svärdsudd K, *et al.* The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes* 1985;34:1055–1058.

7. Després J-P, Lemieux I, Bergeron J, *et al.* Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1039–1049.

8. Rubino F, Cummings DE, Eckel RH, *et al.* Definition and diagnostic criteria of clinical obesity. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2025:S2213-8587(24)00316–4.

9. Vague J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr* 1956;4:20–34.

10. Tan CY, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochem Soc Trans* 2008;36:935–940.

11. Baker AR, da Silva NF, Quinn DW, *et al.* Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 2006;5:1.

12. Fain JN, Sacks HS, Bahouth SW, Tichansky DS, Madan AK, Cheema PS. Human epicardial adipokine messenger RNAs: comparisons of their expression in substernal, subcutaneous, and omental fat. *Metabolism* 2010;59:1379–1386.

13. Gruzdeva OV, Akbasheva OE, Dyleva YA, *et al.* Adipokine and Cytokine Profiles of Epicardial and Subcutaneous Adipose Tissue in Patients with Coronary Heart Disease. *Bull Exp Biol Med* 2017;163:608–611.

14. Gruzdeva O, Uchasova E, Dyleva Y, *et al.* Adipocytes Directly Affect Coronary Artery Disease Pathogenesis via Induction of Adipokine and Cytokine Imbalances. *Frontiers in Immunology* 2019;10:2163.

15. Shaihov-Teper O, Ram E, Ballan N, *et al.* Extracellular Vesicles From Epicardial Fat Facilitate Atrial Fibrillation. *Circulation* 2021;143:2475–2493.

16. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles* 2024;13:e12404.

17. Kranendonk MEG, Visseren FLJ, van Balkom BWM, *et al.* Human adipocyte extracellular vesicles in reciprocal signaling between adipocytes and macrophages. *Obesity (Silver Spring)* 2014;22:1296–1308.

18. Connolly KD, Wadey RM, Mathew D, Johnson E, Rees DA, James PE. Evidence for Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles in the Human Circulation. *Endocrinology* 2018;159:3259–3267.

19. Amosse J, Durcin M, Malloci M, *et al.* Phenotyping of circulating extracellular vesicles (EVs) in obesity identifies large EVs as functional conveyors of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Mol Metab* 2018;18:134–142.

20. Blandin A, Hilairet G, Ponnaiah M, *et al.* Lipidomic analysis of adipose-derived extracellular vesicles reveals their potential as lipid mediators of obesity-associated metabolic complications. *bioRxiv* 2021:2021.12.10.472057.

21. Camino T, Lago-Baameiro N, Bravo SB, *et al.* Human obese white adipose tissue sheds depot-specific extracellular vesicles and reveals candidate biomarkers for monitoring obesity and its comorbidities. *Transl Res* 2022;239:85–102.

22. Britton KA, Fox CS. Ectopic fat depots and cardiovascular disease. *Circulation* 2011;124:e837-841.

23. Doukbi E, Soghomonian A, Sengenès C, *et al.* Browning Epicardial Adipose Tissue: Friend or Foe? *Cells* 2022;11:991.

24. Gaborit B, Venteclef N, Ancel P, *et al.* Human epicardial adipose tissue has a specific transcriptomic signature depending on its anatomical peri-atrial, peri-ventricular, or peri-coronary location. *Cardiovasc Res* 2015;108:62–73.

25. Blandin A, Dugail I, Hilairet G, *et al.* Lipidomic analysis of adipose-derived extracellular vesicles reveals specific EV lipid sorting informative of the obesity metabolic state. *Cell Rep* 2023;42:112169.

26. Bonifay A, Robert S, Champagne B, *et al.* A new strategy to count and sort neutrophil-derived extracellular vesicles: Validation in infectious disorders. *J Extracell Vesicles* 2022;11:e12204.

27. Rodriguez A-M, Elabd C, Delteil F, *et al.* Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:255–263.

28. Anon. (2025). GitHub - ahklemm/AnalyzeDotBlots: ImageJ macro script to measure intensities in dot blots in e.g. protein arrays. [WWW document]. URL https://github.com/ahklemm/AnalyzeDotBlots

29. Anon. (2025). ConsensusPathDB: toward a more complete picture of cell biology | Nucleic Acids Research | Oxford Academic. [WWW document]. URL https://academic.oup.com/nar/article/39/suppl_1/D712/2507354?login=false

30. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, *et al.* The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res* 2023;51:D638–D646.

31. Schwinger RHG. Pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Diagn Ther* 2021;11:263–276.

32. Gaborit B, Abdesselam I, Dutour A. Epicardial fat: more than just an "epi" phenomenon? *Horm Metab Res* 2013;45:991–1001.

33. Shetty AK, Upadhya R. Extracellular Vesicles in Health and Disease. *Aging Dis* 2021;12:1358–1362.

34. Rizzuto AS, Gelpi G, Mangini A, Carugo S, Ruscica M, Macchi C. Exploring the role of epicardial adipose-tissue-derived extracellular vesicles in cardiovascular diseases. *iScience* 2024;27:109359.

35. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2013;2.

36. Yang W, Tu H, Tang K, Huang H, Ou S, Wu J. MiR-3064 in Epicardial Adipose-Derived Exosomes Targets Neuronatin to Regulate Adipogenic Differentiation of Epicardial Adipose Stem Cells. *Front Cardiovasc Med* 2021;8.

37. D'Marco L, Puchades MJ, Gorriz JL, *et al.* Epicardial Adipose Tissue, Adiponectin and Leptin: A Potential Source of Cardiovascular Risk in Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci* 2020;21:978.

38. Blandin A, Amosse J, Froger J, *et al.* Extracellular vesicles are carriers of adiponectin with insulin-sensitizing and anti-inflammatory properties. *Cell Rep* 2023;42:112866.

39. Antonopoulos AS, Margaritis M, Verheule S, *et al.* Mutual Regulation of Epicardial Adipose Tissue and Myocardial Redox State by PPAR-γ/Adiponectin Signalling. *Circ Res* 2016;118:842–855.

40. Tanyanskiy DA, Shavva VS, Dizhe EB, *et al.* Adiponectin Stimulates Apolipoprotein A-1 Gene Expression in HepG2 Cells via AMPK, PPARα, and LXRs Signaling Mechanisms. *Biochemistry (Mosc)* 2022;87:1252–1259.

41. Greulich S, Maxhera B, Vandenplas G, *et al.* Secretory products from epicardial adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus induce cardiomyocyte dysfunction. *Circulation* 2012;126:2324–2334.

42. Suffee N, Baptista E, Piquereau J, *et al.* Impacts of a high-fat diet on the metabolic profile and the phenotype of atrial myocardium in mice. *Cardiovasc Res* 2022;118:3126–3139.

43. Suffee N, Moore-Morris T, Farahmand P, *et al.* Atrial natriuretic peptide regulates adipose tissue accumulation in adult atria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E771–E780.

44. Poggi A, Gaborit B, Schindler T, Liberale L, Montecucco F, Carbone F. Epicardial fat and atrial fibrillation: the perils of atrial failure. *Europace* 2022;Accepted for publication.

45. Doukbi E, Ancel P, Dutour A, *et al.* Human epicardial fat has a beige profile and contains higher type 2 innate lymphoid cells than subcutaneous fat. *Obesity (Silver Spring)* 2024.

46. Crewe C, Funcke J-B, Li S, *et al.* Extracellular vesicle-based interorgan transport of mitochondria from energetically stressed adipocytes. *Cell Metab* 2021;33:1853-1868.e11.

47. Sacks HS, Fain JN, Holman B, *et al.* Uncoupling protein-1 and related messenger ribonucleic acids in human epicardial and other adipose tissues: epicardial fat functioning as brown fat. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3611–3615.

48. Chechi K, Vijay J, Voisine P, *et al.* UCP1 expression–associated gene signatures of human epicardial adipose tissue. *JCI Insight* 4:e123618.

49. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, *et al.* Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 2003;108:2460–2466.

50. Iacobellis G. Epicardial fat links obesity to cardiovascular diseases. *Prog Cardiovasc Dis* 2023;78:27–33.

51. Sawaki D, Czibik G, Pini M, *et al.* Visceral Adipose Tissue Drives Cardiac Aging Through Modulation of Fibroblast Senescence by Osteopontin Production. *Circulation* 2018;138:809–822.

52. Aragón-Herrera A, Feijóo-Bandín S, Anido-Varela L, *et al.* Relaxin-2 as a Potential Biomarker in Cardiovascular Diseases. *J Pers Med* 2022;12:1021.

53. Sluijter JPG, Davidson SM, Boulanger CM, *et al.* Extracellular vesicles in diagnostics and therapy of the ischaemic heart: Position Paper from the Working Group on Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 2018;114:19–34.

FIGURES

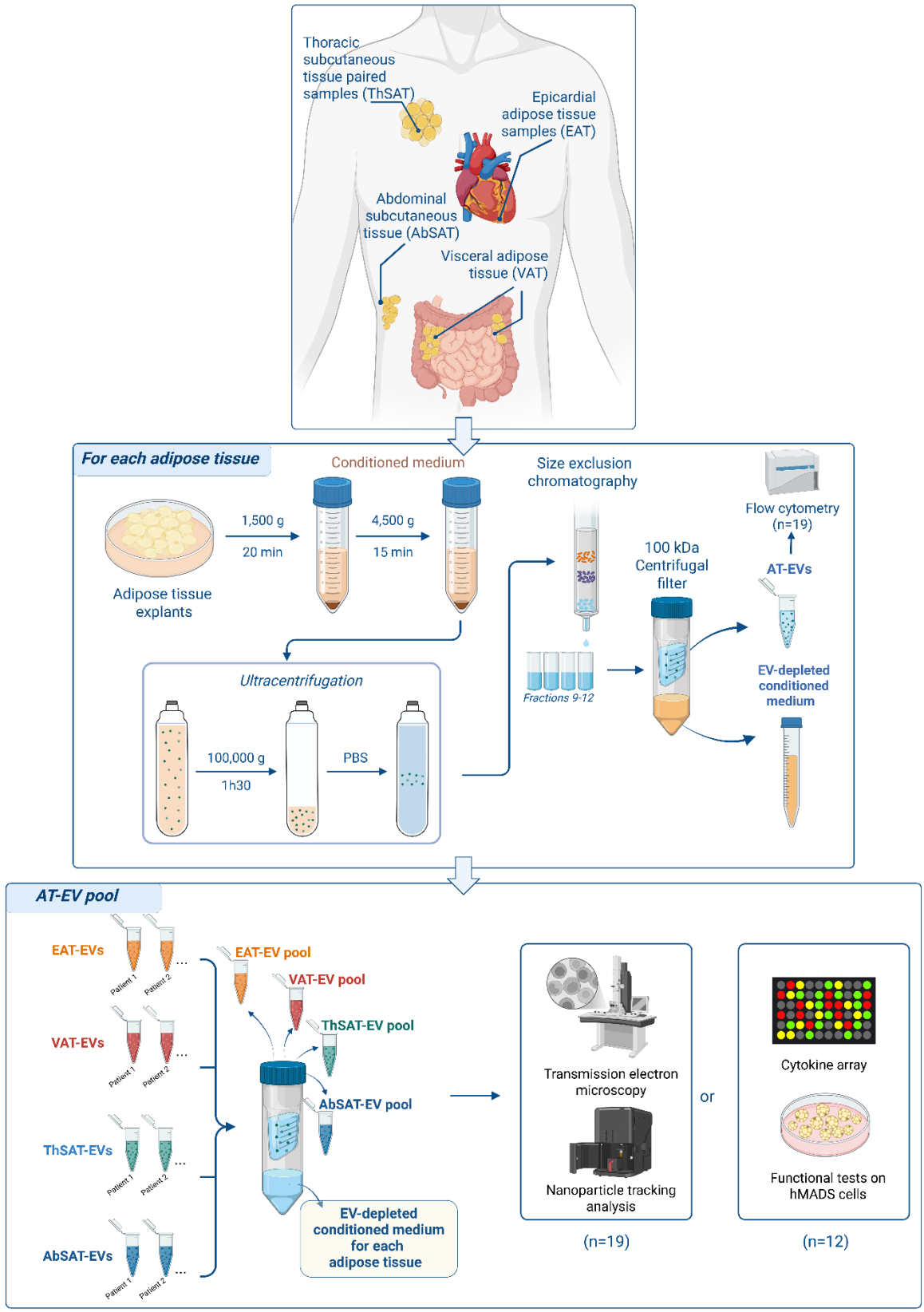


Figure 1. Schematic representation of the experimental workflow used in this study, illustrating the successive steps applied to isolate AT-EVs from 48-hour adipose explants (EAT, VAT, ThSAT, and AbSAT).

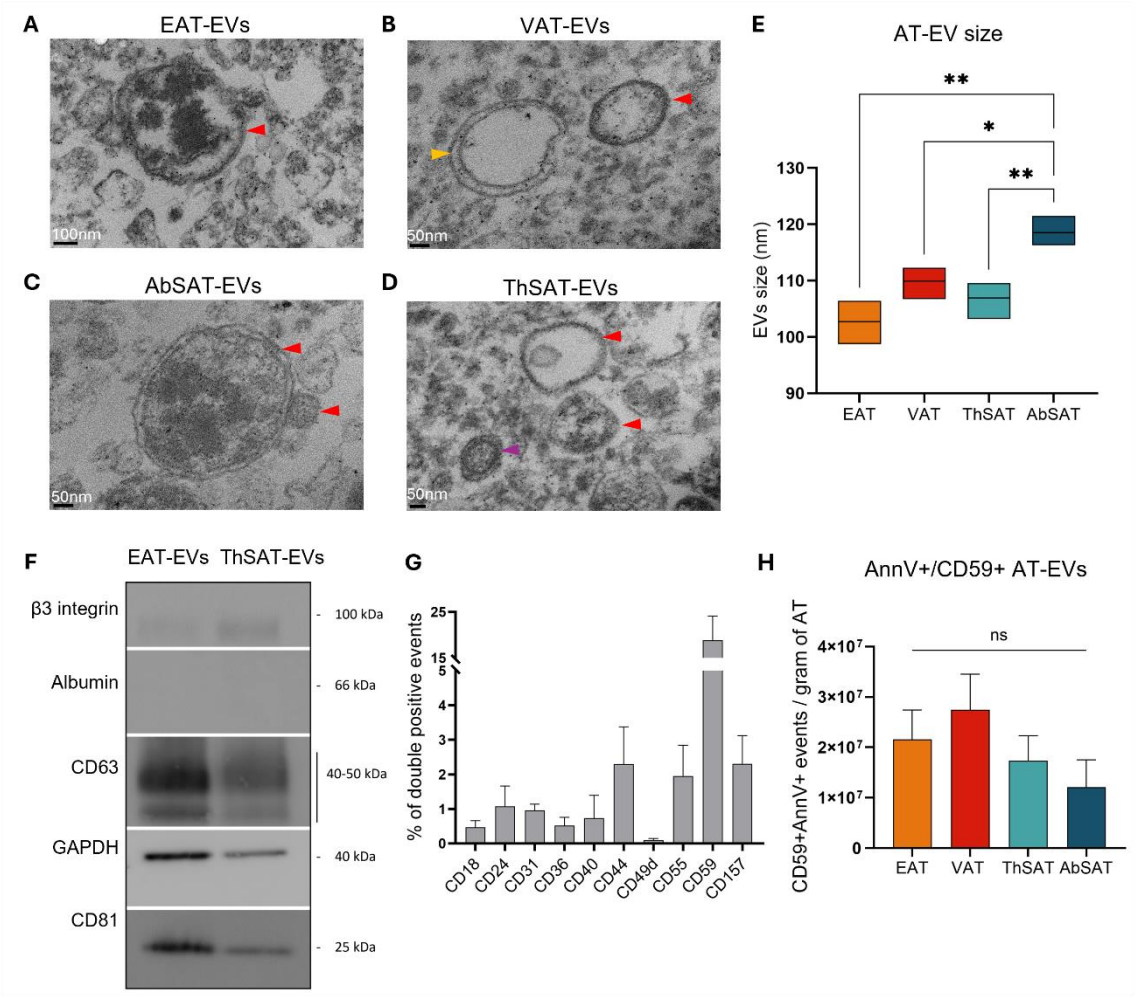


Figure 2. AT-EVs morphological characteristics, quantification and surface markers.

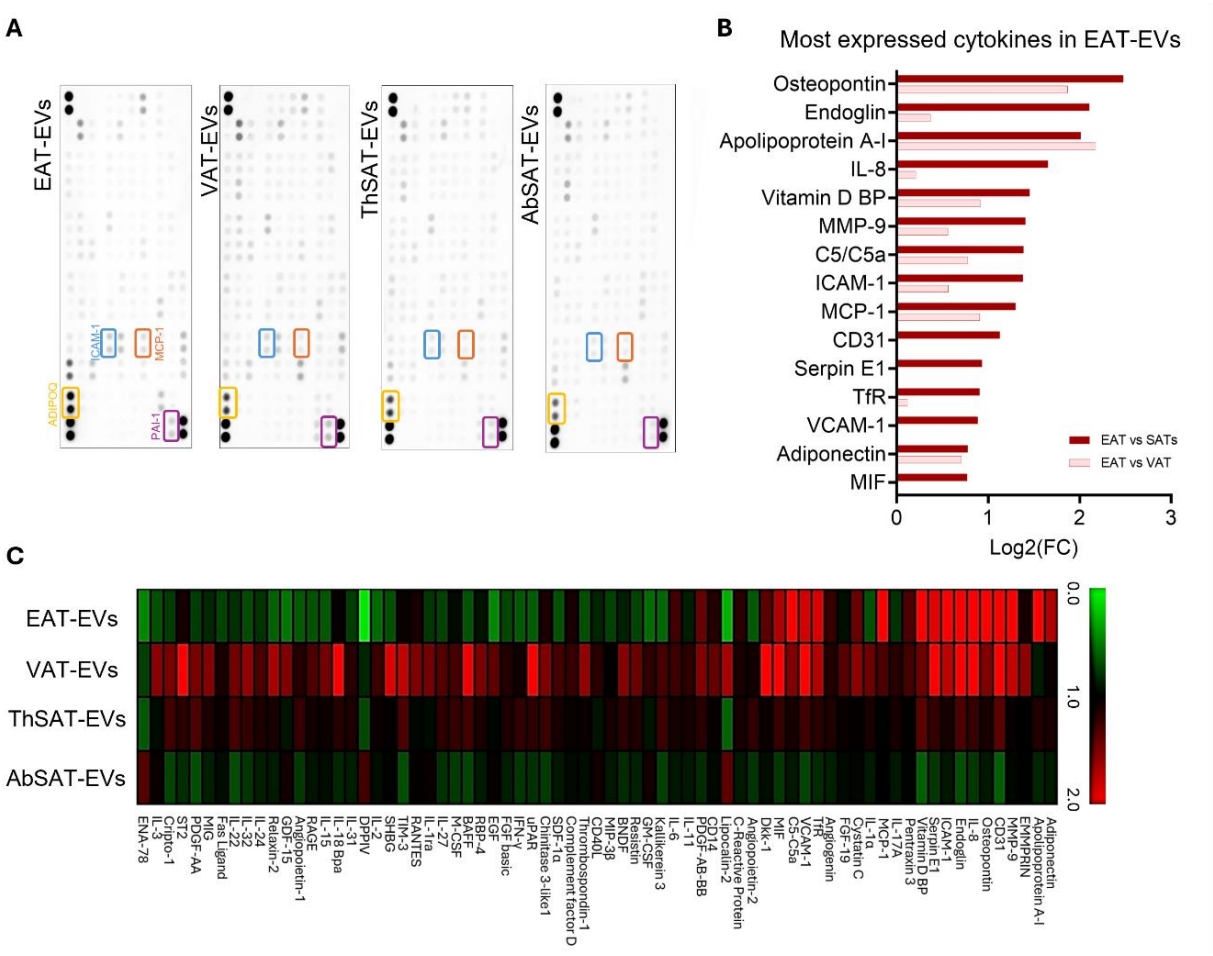


Figure 3. AT-EVs protein signature.

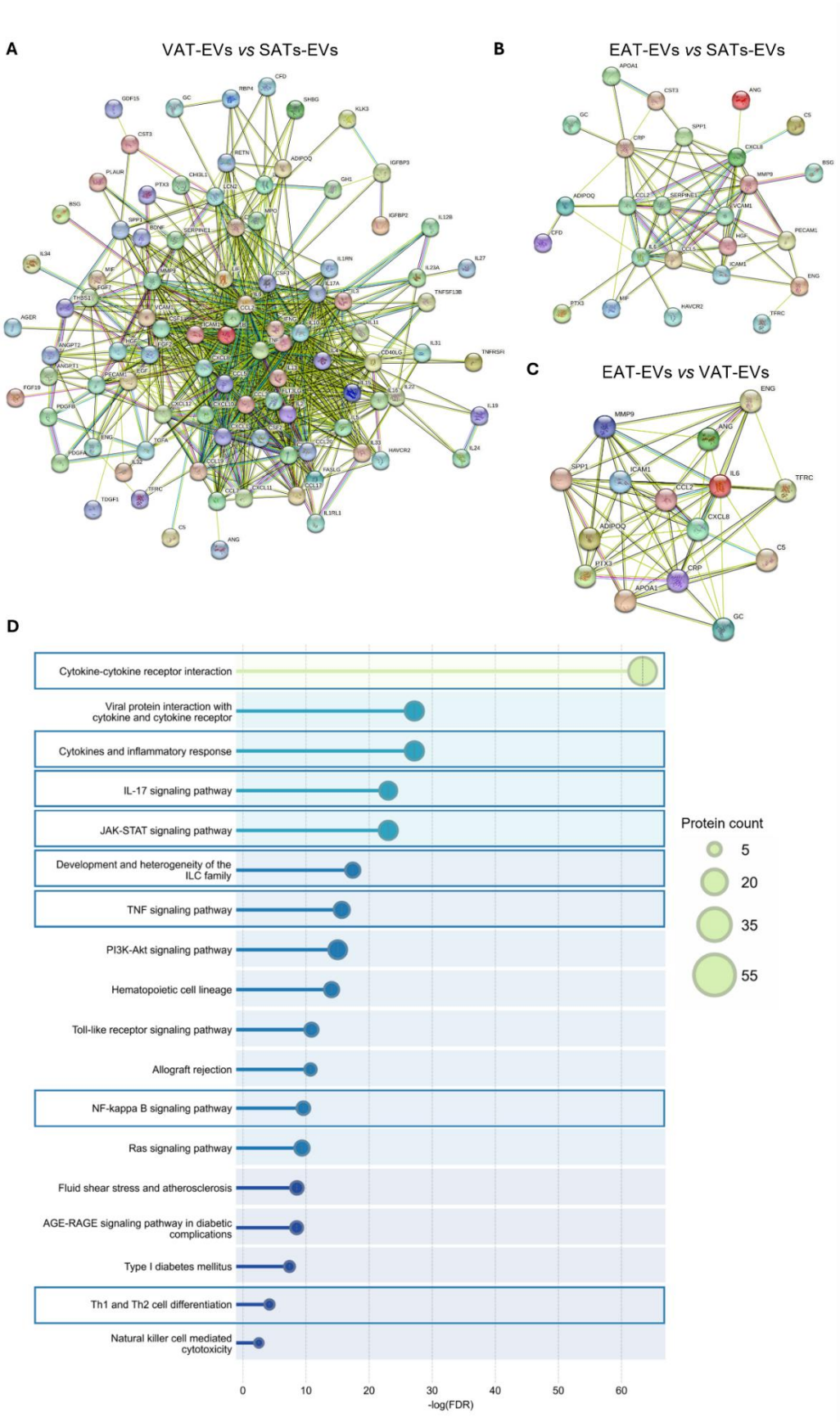


Figure 4. STRING analysis of network and pathways enrichment in AT-EVs.

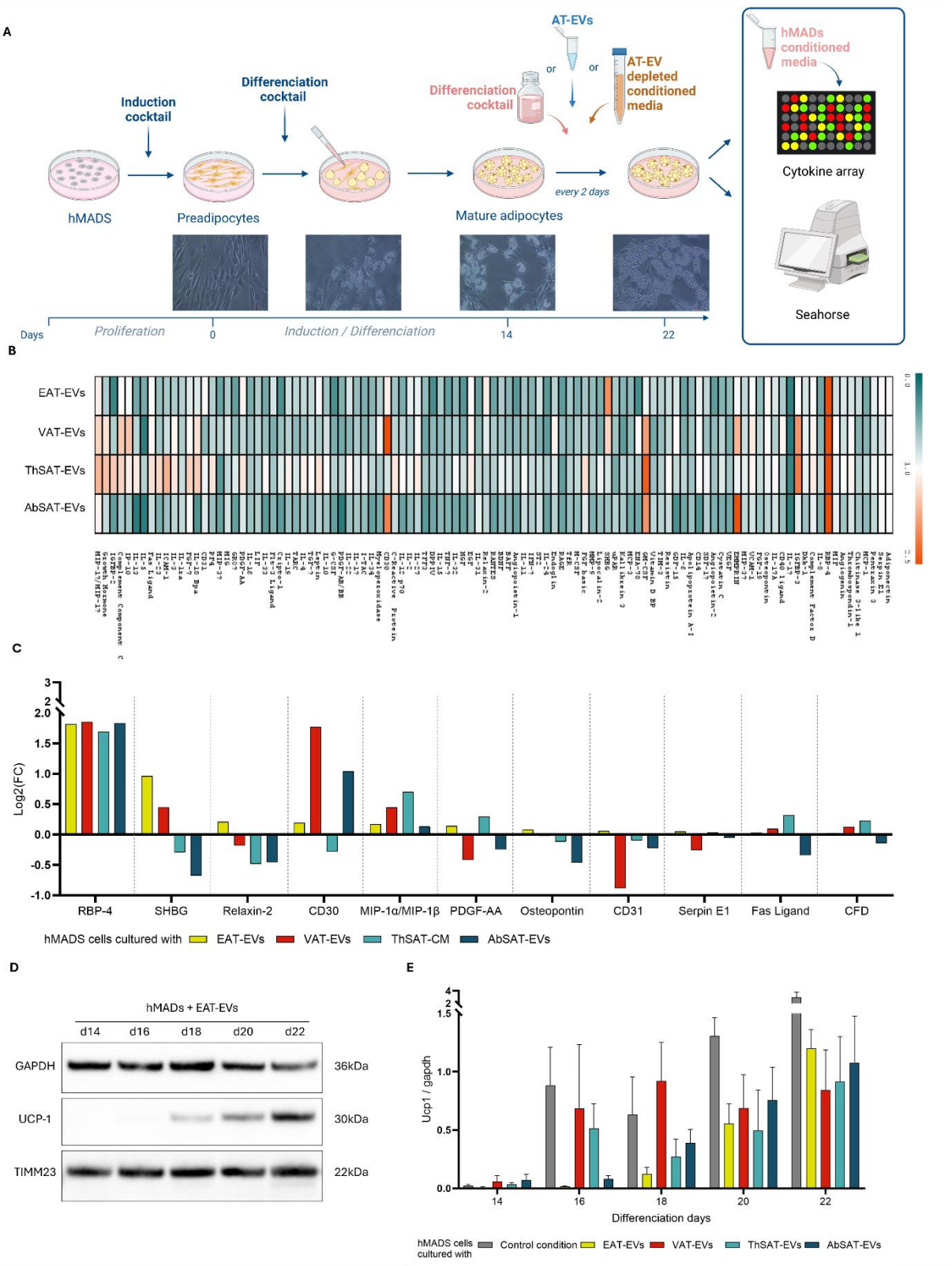


Figure 5. Results from the cytokine microarray profiling of supernatants collected from hMADS cultivated in presence of AT-EVs compared to control condition.

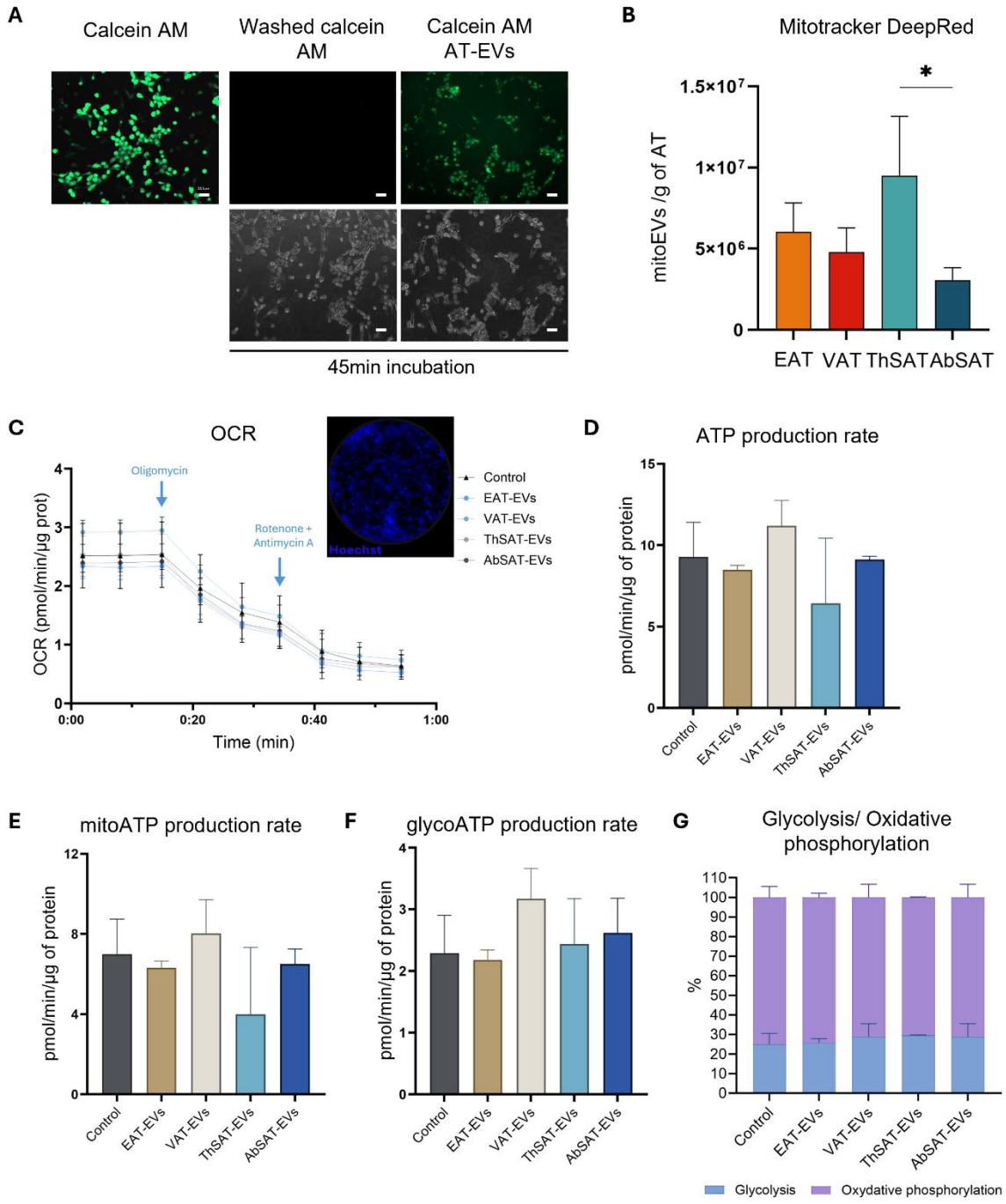


Figure 6. hMADS respiration in the presence of AT-EVs.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic representation of the experimental workflow used in this study, illustrating the successive steps applied to isolate AT-EVs from 48-hour adipose explants (EAT, VAT, ThSAT, and AbSAT). Successive steps of differential ultracentrifugation were first applied to isolate EV subpopulations. After size exclusion chromatography to purified AT-EVs from soluble proteins and final filtration, AT-EVs were analyzed by flow cytometry. Then AT-EVs were pooled (pool 1, n=19 and pool 2, n=12) and these pools were used to characterize AT-EVs and use them for functional tests. Conditioned medium depleted in AT-EVs from the last centrifugation were collected and used for functional tests.

Figure 2. AT-EVs morphological characteristics, quantification and surface markers. (A) Transmission electron microscopy images of EAT-EV pellet (scale bar = 100 nm) **(B)** VAT-EVs, **(C)** AbSAT-EVs and **(D)** ThSAT-EVs. (scale bars = 50 nm), red arrows show EVs with electron dense content while yellow arrows show EVs without content, purple arrow point out toward EVs that seem to contain an organelle. **(E)** Box plot representation of AT-EVs size measured by NTA, (line at mean). Comparison analyses between AT-EV size were performed using ANOVA; (Pool 1, n=19, in triplicate); $*p < 0.05$; $**p < 0.005$. **(F)** After isolation, 1.10^6 AT-EVs (from EAT and ThSAT) were analyzed by Western blot to detect the presence of EV protein markers (β3-integrin and tetraspanins CD81 and CD63). No albumin contamination was detected. GAPDH was used as a loading control. **(G)** Flow cytometry analysis showing the percentage of events expressing several membrane markers coupled with AnnV labeling, n=4. **(H)** Presence of CD59/AnnV-double positive AT-EVs per gram of adipose tissue (AT) analyzed by flow cytometry within the four AT-EV subpopulations, isolated from the four different adipose depots (pool 1, n=19).

Figure 3. AT-EVs protein signature. (A) Human cytokine microarray profiling of AT-EVs isolated from human paired EAT, VAT, ThSAT and AbSAT biopsies. Fifty µg of 19 pooled AT-EV preparations obtained from 19 patient biopsies were used. were used. **(B)** Most expressed cytokines in EAT-EVs compared to VAT-EVs and SAT-EVs. **(C)** Heatmap of the 30 most expressed cytokines (pixel intensity >2000). Intensity values were normalized to the mean pixel intensities of ThSAT and AbSAT.

Figure 4. STRING analysis of network and pathways enrichment in AT-EVs. (**A**) STRING Network based on most expressed protein in VAT-EVs compared to SATs EVs, (**B**) EAT-EVs

compared to SATs-EVs and (**C**) EAT-EVs compared to VAT-EVs. Blue lines = interactions known from curated databases, pink lines = interactions experimentally determined, green lines = interactions from textmining and black lines = co-expression interactions. Minimum required interaction score: 0.700. (**D**) STRING analysis of pathways enrichment in EAT-EVs compared to SATs-EVs. Main inflammatory pathways overexpressed in EAT-EVs are indicated by the blue boxes.

Figure 5. Results from the cytokine microarray profiling of supernatants collected from hMADS cultivated in presence of AT-EVs compared to control condition. (**A**) Schematic representation of hMADS culture. After a proliferation step, hMADS were differentiated for 14 days. At day 14, cells were either maintained in differentiation cocktail (control) or cultured in the presence of pooled AT-EV or conditioned medium depleted in AT-EVs from each adipose depots (EAT, VAT, ThSAT, AbSAT) (pool 2, n=12). hMADS were then cultured in these conditions until day 22. Every 2 days hMADS lysates were collected to perform western blot. At day 22, hMADS conditioned media were used to perform cytokine array or cells were analyzed by Seahorse. (**B**) Heatmap of 105 cytokines expressed by hMADS cultured with EAT, VAT, ThSAT or AbSAT-EVs. (**C**) Most expressed cytokines in supernatant from hMADS cultured with AT-EVs compared to control (grey). (**D**) Western blot analysis of UCP-1 and Timm23 in hMADs cultured with 2µg of purified EAT-EVs. (**E**) Western blot comparison of UCP-1 protein expression in control compared to AT-EVs (EAT, VAT, ThSAT and AbSAT). GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, UCP-1: uncoupling protein 1, TIMM23: translocase of inner mitochondrial membrane 23.

Figure 6. hMADS respiration in the presence of AT-EVs. (**A**) Fluorescence microscopy images showing Calcein-AM labeled AT-EVs uptake by hMADS cells. Scale bars : 200 µm. (**B**) Flow cytometry analysis of Mitotracker DeepRed stained AT-EVs from the four AT depots. n = 12, ANOVA *$p < 0.05$. (**C**) Agilent Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay was performed in hMADS cells (in presence or absence of AT-EVs) for quantification of oxygen consumption rate (OCR). (**D**) Global ATP production rate, (**E**) mitochondria ATP production rate, (**F**) glycolysis ATP production rate, data are represented as median ± interquartile range (**G**) percentage of glycolysis/oxidative phosphorylation. n=3.

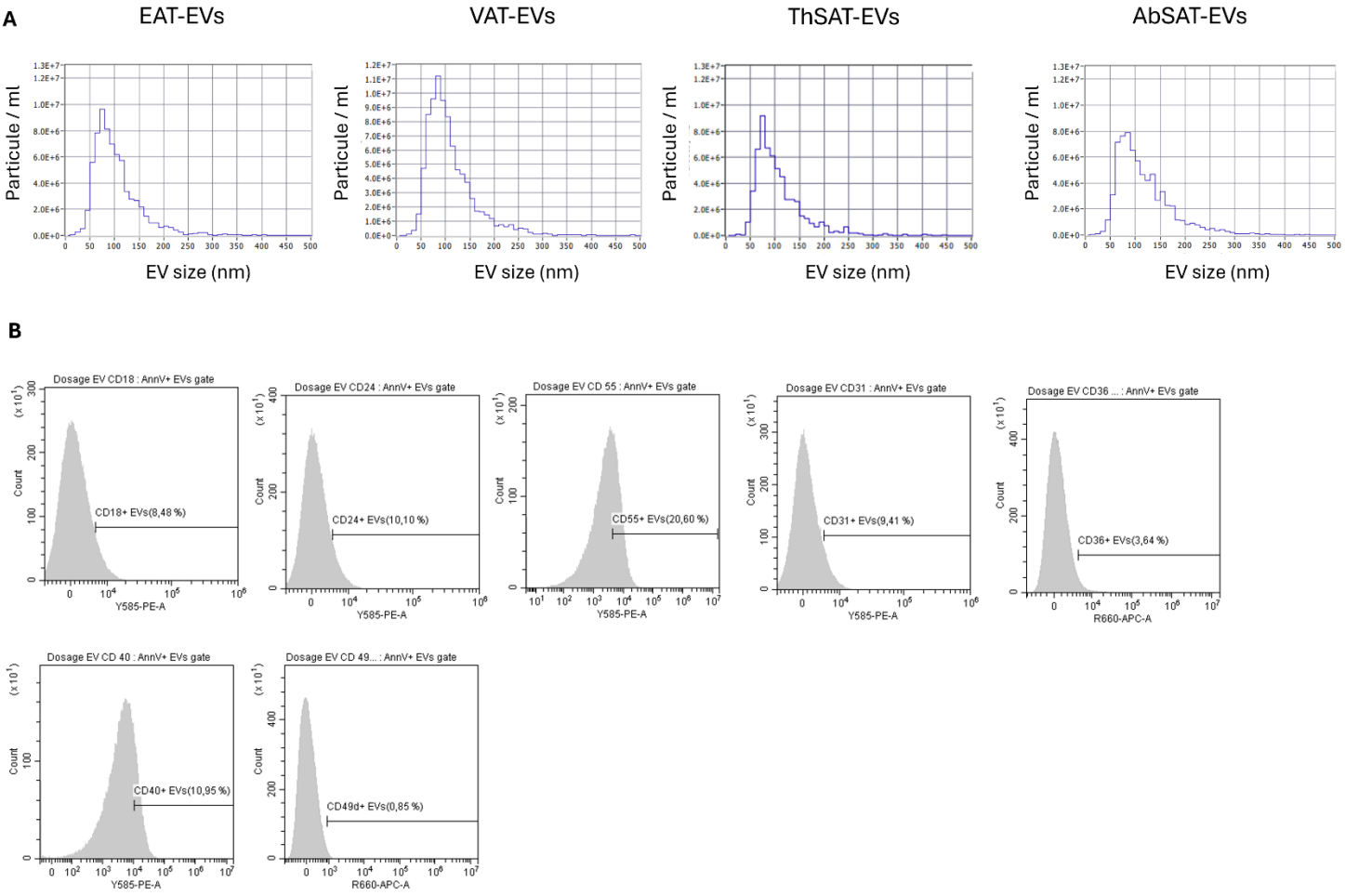
SUPPLEMENTARY FIGURES

Table 1. Clinical characteristics of multiorgan donor patients.

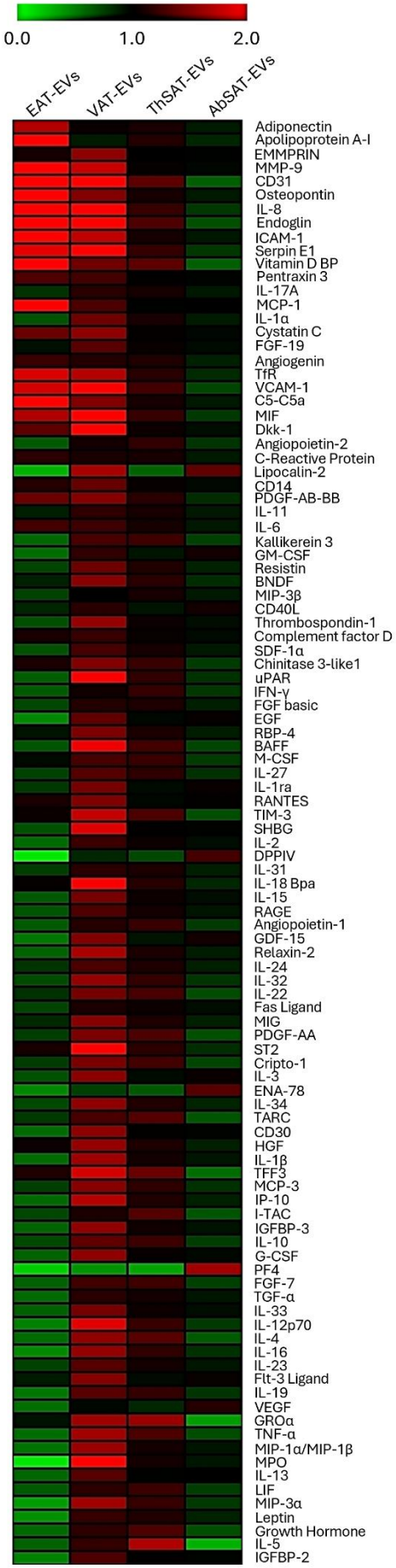
Clinical Data	Patients Pool 1	Patients Pool 2	*P-value*
Patients number (W/M)	19 (8/11)	12 (3/9)	0,452
Age (years) |mean ± SD|	53 ± 15	58 ± 12	0,515
BMI (kg/m2) |mean ± SD|	26,2 ± 5,6	29,0 ± 5,4	0,122
Obesity, BMI ≥30 kg/m^2	5 (26%)	5 (42%)	0,447
T2D	2 (11%)	2 (17%)	0,630
HTA	3 (16%)	5 (42%)	0,205
Smoking history, ever	12 (63%)	4 (33%)	0,149
Dyslipidemia	2 (11%)	2 (17%)	0,630
CAD	0 (0%)	2 (17%)	0,142
Myocardial disease	1 (5%)	1 (8%)	>0,999
Chronic kidney disease	1 (5%)	0 (0%)	>0,999

Note: Data shown as mean ± SD or n (%).

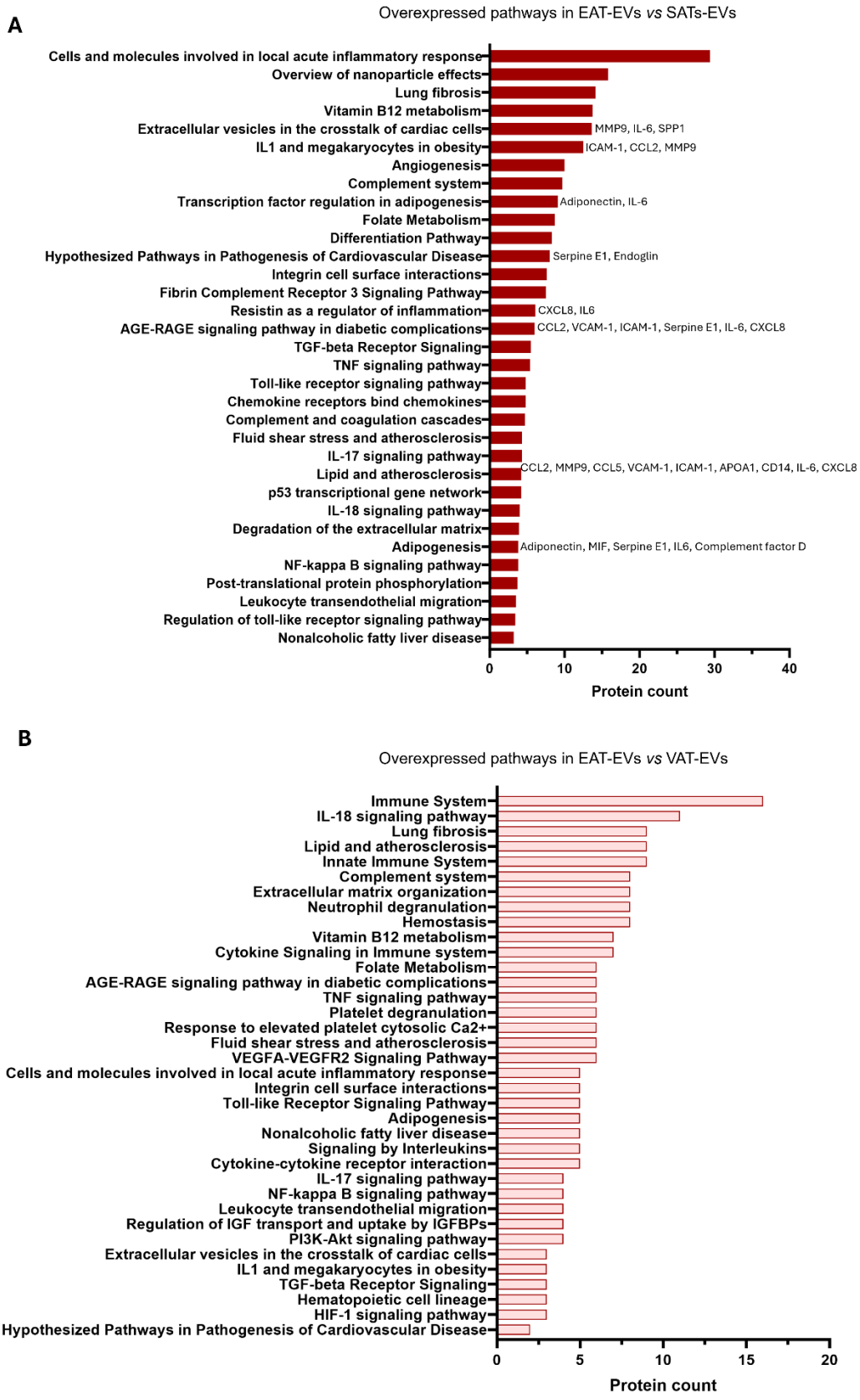
Abbreviations: W, Women; M, Men; T2D, Type 2 diabetes, HTA, Hypertension; CAD, coronary artery disease



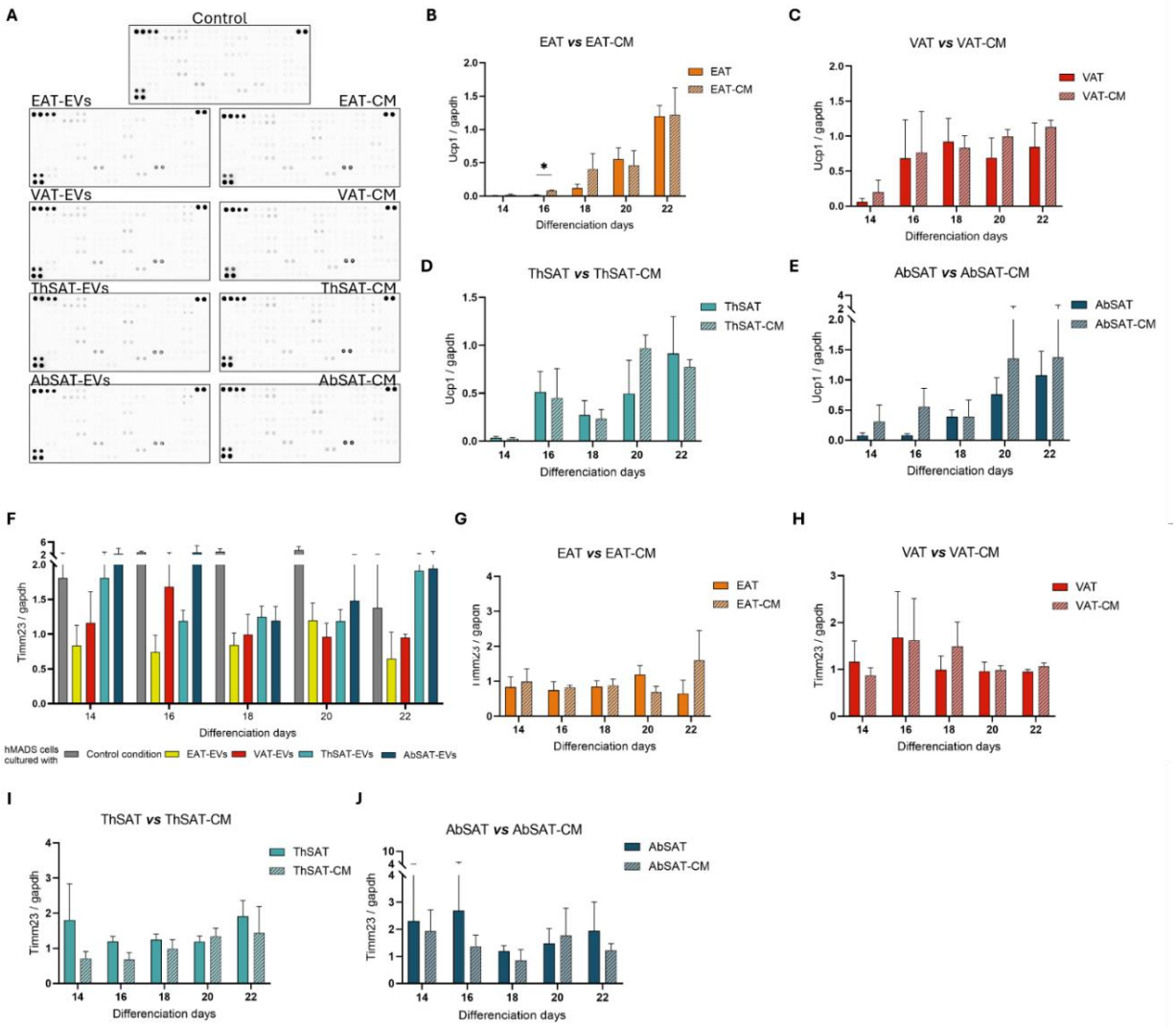
Supplementary figure 1. AT-EVs characterization in size and surface markers. (A) Nanoparticle tracking analysis (NTA) of EAT, VAT, ThSAT and AbSAT EV populations. **(B)** AT-EVs surface markers tested in flow cytometry analysis show fluorescence intensity of surface marker CD18, CD24, CD31, CD36, CD40, CD49d, CD55 on AnnV positive AT-EVs



Supplementary figure 2. Heatmap representation of the 105-cytokine array study.



Supplementary figure 3. Pathways overexpressed in EAT-EVs. (**A**) compared to SATs-EVs, (**B**) compared to VAT-EVs, using CPDB. Minimal protein count by pathway was two. IGF: Insulin-like Growth Factor, IGFBPs: Insulin-like Growth Factor Binding Proteins.



Supplementary figure 4. Results from the cytokine microarray profiling of hMADS supernatants and Western blot quantifications of UCP1 and TIMM23 mitochondrial markers. (**A**) Cytokine microarray profiling of hMADS culture supernatants collected from control condition, AT-EVs condition (2µg of EAT-EVs, VAT-EVs, ThSAT-EVs and AbSAT-EVs) and conditioned media depleted in AT-EVs. (**B**) Quantification of UCP-1 western blot on hMADS cells cultured with EAT-EVs (solid bars) vs EAT conditioned media depleted in EVs named EAT-CM (hatched bars). (**C**) VAT-EVs (solid bars) compared to VAT-CM depleted in EVs (hatched bars). (**D**) ThSAT-EVs (solid bars) compared to ThSAT-CM depleted in EVs (hatched bars). (**E**) AbSAT-EVs (solid bars) compared to AbSAT-CM depleted in EVs (hatched bars) * $P < 0.05$. (**F**) Comparison of TIMM23 protein expression in control compared to AT-EVs (EAT, VAT, That and AbSAT), n=3. (**G**) Quantification of TIMM23 western blot on hMADs cells cultured with EAT-EVs (solid bars) vs EAT-CM (hatched bars). (**H**) VAT-EVs (solid bars) compared to VAT-CM depleted in EVs (hatched bars). (**I**) ThSAT-EVs (solid bars) compared to ThSAT-CM depleted in EVs (hatched bars). (**J**) AbSAT-EVs (solid bars) compared to AbSAT-CM depleted in EVs (hatched bars); n=3 for all western blot analyses, all error bars are mean ± SEM.

III. Discussion

Dans cette deuxième partie de thèse, nos travaux ont porté sur la caractérisation des VEs du TAE humain, et l'évaluation de leur fonctionnalité sur les cellules hMADS *in vitro*, comparé aux VEs du TAV, du TAsc thoracique (nommé ThSAT) et du TAsc abdominal (nommé AbSAT) (**Figure 32**). Nous avons alors appelé cette étude FIRST pour *epicardial Fat Immunity extRa cellular vesicleS HearT.*

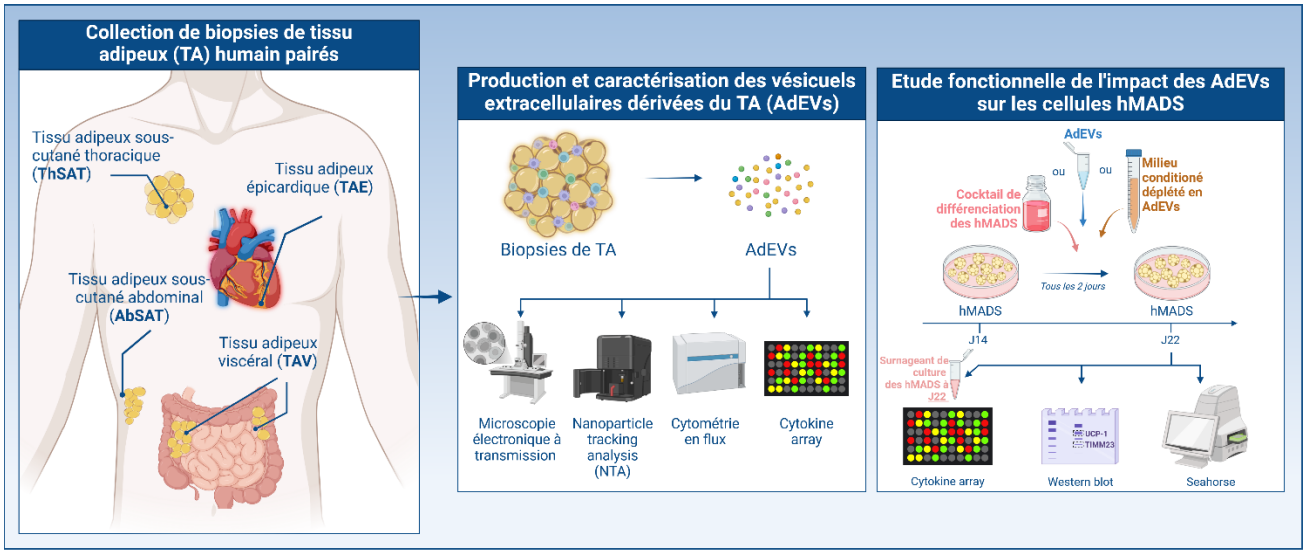


Figure 32 | Schéma récapitulatif de l'étude sur les VEs du TAE.

Ayant mis en évidence une composition immune spécifique du TAE dans notre première étude, nous avons envisagé que les VEs, médiateurs de la communication intercellulaire et inter-organe, pouvaient jouer un rôle dans son phénotype inflammatoire ou beige. En effet, les VEs dérivées du TA (AdEVs pour *adipose derived extracellular vesicles*), ont récemment émergé comme une nouvelle classe de messagers de signalisation, facilitant la communication intercellulaire et les interactions entre organes (Z. Huang & Xu, 2021). Ces AdEVs participeraient aux réponses métaboliques du TA afin de contrôler le flux énergétique et la réponse immunitaire (Rome *et al.*, 2021). Aujourd'hui, la littérature a établi une nouvelle nomenclature des VEs les distinguant selon leur taille : les petites et les grandes VEs (Rome *et al.*, 2021; Welsh *et al.*, 2024). Les grandes se réfèrent principalement aux microvésicules sécrétées suite au bourgeonnement de la membrane plasmique (Tricarico *et al.*, 2017; van der Pol *et al.*, 2012) (*cf. Généralités sur les VEs*) (**Figure 33**). Les petites VEs se réfèrent, quant à elles, aux exosomes et proviennent de vésicules intraluminales formées pendant la maturation des corps multivésiculaires dans la voie endolysosomale (Harding *et al.*, 1984; B. T. Pan *et al.*, 1985) (*cf. Généralités sur les VEs*) (**Figure 33**).

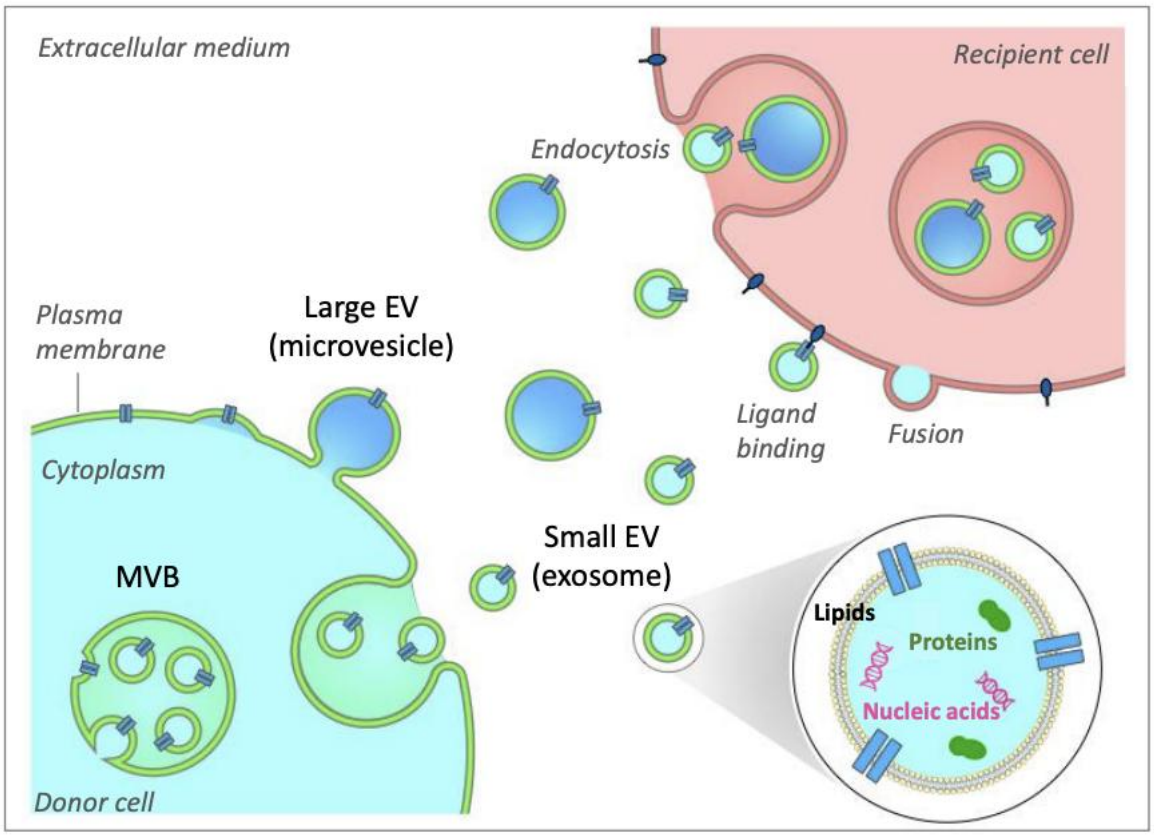


Figure 33 | Biogenèse des petites et grandes VEs d'après Rome *et al., Int J Mol Sci*, 2021.

Pour ce travail, nous avons mis en place un protocole de purification des VEs à partir d'explants incluant des étapes de centrifugations différentielles, d'ultracentrifugation, de chromatographie d'exclusion de taille et d'une concentration des particules à l'aide de filtres de 100kDa. La mise en place de ce protocole a été le résultat d'une collaboration avec les équipes du Dr. Soazig Le Lay, de l'Institut du Thorax à Nantes et de l'équipe du Pr. Romaric Lacroix au C2VN. Ceci nous a permis de réaliser des tests préliminaires sur des prélèvements d'AbSAT non précieux (provenant de dermolipectomies) grâce à la collaboration avec le Centre spécialisé d'obésité du Pr Dutour et les Dr Duconseil et Berthet (chirurgiens bariatriques) afin de trouver la meilleure méthode d'isolement des VEs du TA. Ces tests préliminaires ont montré une perte trop importante de VEs dans le protocole initial qui demandait deux ultracentrifugations. Nous nous sommes alors tournés vers une centrifugation plus douce des VEs à l'aide de filtres à centrifuger. *In fine*, les VEs récupérées provenaient du TA entier puisque nous n'avons pas effectué de tri entre VEs adipocytaires et VEs de la FVS, bien qu'il serait intéressant de le faire. En effet, la plupart des travaux avec isolement de VEs dérivées du TA (surnageant de culture ou biopsies) aboutissent à une population hétérogène de vésicules dont l'origine adipocytaire ou immunitaire ne peut être identifiée (Willms *et al.*, 2016; Witwer *et al.*, 2013). L'avantage de travailler sur des explants reste toutefois une conservation du microenvironnement basal du TA (Crewe, 2022).

Dans un premier temps, nos résultats ont montré que les VEs isolées à partir des explants de TAE présentaient une taille correspondant aux petites VEs ainsi qu'une expression protéique de marqueurs vésiculaires (CD81, CD63, β3 intégrine). Nous avons également mis en évidence que les VEs du TAE étaient significativement plus petites que celles de l'AbSAT. Ces dernières étant également significativement plus grandes que les VEs du TAV et du ThSAT. Bien

qu'aucune étude n'ait travaillé sur le sujet, cette différence de taille vésiculaire pourrait avoir un lien avec la taille adipocytaire. En effet, certaines études ont montré que les adipocytes épicardiques sont plus petits que ceux des dépôts de graisse sous-cutanés et d'autres dépôts ectopiques tels que le TA péricardique (Eiras *et al.*, 2010; Bambace *et al.*, 2011). Cette plus petite taille pourrait d'ailleurs s'expliquer par un plus grand nombre de préadipocytes que d'adipocytes matures dans le tissu (Caprio *et al.*, 2011; Iacobellis & Bianco, 2011). De plus, la présence d'adipocytes hypertrophiés dans l'AbSAT pourrait contribuer à une production de VEs plus grandes, comparées à celles d'autres dépôts. Il serait intéressant d'étudier cette différence de taille vésiculaire, car en effet, le contenu des VEs mais également leur taille peuvent influencer des processus tels que l'inflammation, la régulation du métabolisme et la réponse immunitaire (Connolly *et al.*, 2015; Lazar *et al.*, 2016; Lay *et al.*, 2018). Si la taille des VEs varie en fonction du type de TA, cela pourrait aussi mettre en évidence une différence dans l'activité de communication intercellulaire au sein de ces tissus.

Nous avons ensuite mis en évidence une forte expression du marqueur CD59 dans les populations de VEs dérivées des 4 TAs. Certaines études ont également mis en évidence l'expression de ce marqueur par des exosomes, notamment de cellules cancéreuses ou de cellules présentatrices de l'antigène (Clayton *et al.*, 2003; Dash *et al.*, 2022). Le CD59 est impliqué dans la protection des cellules par l'inhibition de la voie terminale du complément en empêchant la formation du complexe d'attaque membranaire. Tout comme le CD55, le CD59 serait exprimé par les exosomes afin de protéger les particules de la lyse médiée par le complément (Clayton *et al.*, 2003). Le CD55 étant aussi un inhibiteur de la voie du complément, dans notre analyse, celui-ci semblait être exprimé par moins de VEs adipeuses. Bien que nous ayons réalisé un phénotypage partiel des VEs, nous n'avons pas distingué VEs issues de la fraction adipocytaire et de la FVS. Par conséquent, l'expression des différents marqueurs analysés ne permet pas de conclure de leur origine cellulaire. De plus, bien que les VEs adipocytaires représentent une majorité de vésicules issues des explants de TA, celles provenant d'autres cellules telles que les VEs macrophagiques possèdent des capacités de signalisation, pouvant compliquer l'interprétation d'un effet fonctionnel (Crewe, 2022; Ying, Riopel, *et al.*, 2017).

La capacité des VEs à capturer, transporter et délivrer divers cargos biomoléculaires dans l'organisme a suscité un grand intérêt dans les milieux clinique et scientifique (Sandoval-Bórquez *et al.*, 2024). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux cargos protéiques de ces VEs via une analyse de cytokine arrays. À travers cette méthode, nous avions pour but d'étudier les différences de sécrétome entre le TAE et les 3 autres TAs. La dysfonction du TAE est associée à la libération d'adipokines pro-inflammatoires, à l'infiltration de cellules immunitaires, mais également à la diminution de la production d'adipokines anti-inflammatoires (González *et al.*, 2017). Dans notre étude, nous avons observé un enrichissement des VEs du TAE à la fois en cytokines pro-inflammatoires et en cytokines anti-inflammatoires, qui les distinguent des VEs viscérales, abdominales et sous-cutanées. En effet, nous avons rapporté que les VEs des 4 TAs présentaient une forte expression vésiculaire d'adiponectine (ADIPOQ), avec une surexpression dans les VEs du TAE comparé aux autres tissus. Comme mentionné dans l'article, l'ADIPOQ est une adipokine insulino-sensibilisatrice favorisant l'oxydation des acides gras et prévenant l'accumulation ectopique de lipides dans le myocarde (Berg *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 2016). La réduction des taux circulants de cette protéine, qui exerce également des effets anti-inflammatoires, est notamment associée à l'augmentation du risque cardiovasculaire (Feijóo-

Bandín *et al.*, 2020). Dans le TAE de patients coronariens, des réductions de l'expression et de la sécrétion de l'ADIPOQ sont notamment observées (Antonopoulos *et al.*, 2016). Chez des souris transgéniques sous régime HFD, la surexpression du récepteur de l'adiponectine (AdipoR1) réduit l'hypertrophie cardiaque et l'accumulation de lipides par un mécanisme impliquant le stress oxydatif et la réduction de l'autophagie (Chou *et al.*, 2014). Tandis que les cœurs de souris diabétiques dépourvues d'AdipoR1 présentent un dysfonctionnement mitochondrial myocardique (Koentges *et al.*, 2015). Ainsi, d'autres études sont nécessaires pour déterminer dans quelle mesure les VEs sont impliquées dans la protection des adipokines ou contribuent aux lésions cardiaques induites par l'obésité (Lauriane Y. M. Michel, 2023). Parmi les cytokines étudiées dans notre analyse des AdEVs du TAE, l'apolipoprotéine A1 (APOA1) ressortait dans le top 3 des cytokines surexprimées par rapport aux AdEVs du TAV et des sous-cutanés (nommés SATs dans l'article). L'APOA1, protéine essentielle au métabolisme du cholestérol et à la synthèse des HDL, est également une adipokine anti-inflammatoire (Ruiz-Ramie *et al.*, 2019). En 2022, une étude a montré que l'ADIPOQ favorisait l'expression d'APOA1 et le métabolisme des HDL, en stimulant les récepteurs nucléaires PPARα et LXR dans des hépatocytes *in vitro* (Tanyanskiy *et al.*, 2022). Chez les patients atteints de MCV, les niveaux d'ADIPOQ et d'APOA1 sont souvent réduits, contribuant à l'aggravation de l'athérosclérose et à l'augmentation du risque d'événement cardiovasculaire (Antonopoulos *et al.*, 2016; Faaborg-Andersen *et al.*, 2023). Ainsi un enrichissement de ces deux adipokines dans les AdEVs du TAE pourrait constituer un mécanisme compensatoire du myocarde surchargé par la captation de substrats énergétiques lipidiques (acides gras libres) et du glucose potentiellement lipotoxique et glucotoxique. Cela mérite d'être étudié plus en profondeur. L'une des principales limites de notre étude réside dans l'impossibilité d'étudier les VEs spécifiques aux patients diabétiques de type 2 ou vivant avec une obésité. En effet, la sélection préalable des patients en fonction de leurs données cliniques n'était pas possible, ceux-ci étant en état de mort cérébrale et les biopsies issues de ces prélèvements étant rares et réalisées à toute heure du jour et de la nuit. Une autre limite est la possibilité de dégradation des éléments mitochondriaux avec la congélation des VEs, que nous avons poolées afin d'en avoir suffisamment pour réaliser l'étude expérimentale. D'autre part, l'analyse des cytokines surexprimées par les VEs du TAE montre un enrichissement en facteurs connus pour favoriser le recrutement des cellules inflammatoires, la dysfonction endothéliale et le remodelage vasculaire tels que l'IL-8, MCP-1 (CCL2), l'ostéopontine (OPN) et le *macrophage migration inhibitory factor* (MIF). Ce dernier jouerait également un rôle dans la protection des cellules cardiaques, protègerait le cœur ischémique et faciliterait la cicatrisation en modulant l'activation de la voie AMPK cardioprotectrice durant l'ischémie (Miller *et al.*, 2008). D'autres études montrent à l'inverse que MIF joue un rôle pro-inflammatoire, qui contribue à l'exacerbation du développement et de la progression des MCV (L. Zhao *et al.*, 2024). Une étude a notamment observé chez des patients atteints d'infarctus du myocarde, des taux plasmatiques de MIF et d'IL-6 significativement élevés à l'admission et 72 heures après l'infarctus du myocarde. De plus, l'expression de MIF, MMP-9 et l'IL-6 par les PBMC de ces patients augmentait aussi de manière significative après 72 heures (White *et al.*, 2013).

Dans notre étude, des molécules d'adhésion et de remodelage de la matrice extracellulaire telles que ICAM-1, VCAM-1 et MMP9 semblaient également surexprimées dans ces VEs. La surexpression de l'IL-8 et MCP-1 pourrait indiquer un rôle dans le recrutement des cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophages) ainsi que dans la fibrose (Guo *et al.*, 2025; M. Rao

et al., 2021). C'est ce qui a été montré par l'équipe de Karastergiou et collaborateurs, qui ont montré que le sécrétome du TAE était capable d'induire la migration de cellules monocytaires THP-1^{+} (tryptophane hydroxylase 1) (Karastergiou *et al.*, 2010). Un effet qui était exacerbé chez les patients coronariens vs non coronariens. De plus, les milieux conditionnés provenant du TAE issus de patients atteints de CAD et ayant un IMC supérieur à 27 augmentaient l'adhésion des cellules THP-1 aux cellules endothéliales provenant d'artères coronaires humaines (HCAEC) et l'expression de VCAM-1 de 2,8 fois. Par ailleurs, cet effet était inhibé par l'ajout d'ADIPOQ recombinante (Karastergiou *et al.*, 2010). Les molécules d'adhésion endothéliales ICAM-1 et VCAM-1, facilitent l'adhérence des leucocytes à l'endothélium, favorisant la survenue de lésions vasculaires et la progression de pathologies inflammatoires chroniques. Dans les cellules endothéliales, la stimulation par des signaux pro-inflammatoires induit la formation de ces molécules d'adhésion, initiant ainsi la formation de lésions athérosclérotiques (Ruparelia & Choudhury, 2020). Ces résultats mettent en évidence le rôle potentiel des VEs du TAE dans l'amplification des processus inflammatoires et le remodelage vasculaire.

Notre analyse d'enrichissement des pathways soutient davantage un rôle pro-inflammatoire et pro-fibrosant des VEs du TAE. Comparées aux VEs des SATs, celles du TAE étaient enrichies en cascades de signalisation inflammatoires clés, telles que les voies de signalisation Th-17, au TNFα, IL-1β, NRLP3 et à NF-κB. Ces résultats apportent ainsi de nouvelles perspectives sur le rôle potentiel des VEs dérivées du TAE dans le lien entre obésité, inflammasome et dysfonction myocardique. De façon intéressante, parmi les voies surexprimées dans le TAE comparé aux autres TAs, nous avons observé la présence d'une voie impliquant les VEs dans le crosstalk avec les cellules cardiaques. Cette observation suggère alors que les VEs du TAE joueraient bel et bien un rôle dans la communication avec le myocarde et pourrait devenir une cible thérapeutique pour les molécules qui ont montré un effet pléiotrope anti-inflammatoire comme la chirurgie bariatrique, les statines ou les agonistes du récepteur au GLP-1 (Abdesselam *et al.*, 2016; Dutour *et al.*, 2016). En 2016, notre équipe a d'ailleurs montré, en utilisant des méthodes non invasives d'imagerie comme l'IRM, que la chirurgie de l'obésité et qu'un traitement par Exénatide étaient capables de réduire le volume du TAE chez des patients vivants avec une obésité ou un DT2 (Dutour *et al.*, 2016). Ces thérapeutiques ont par ailleurs montré une réduction des évènements cardiovasculaires majeurs et une diminution de la mortalité cardiovasculaire (Marso *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2018). Malavazos *et al.* ont montré récemment, par immunohistochimie, que les récepteurs au GIP, au glucagon et au GLP-1 étaient en particulier exprimés dans les macrophages isolés ou en couronne du TAE et dans certains adipocytes, ouvrant la voie à de possibles études d'intervention ciblées (Malavazos *et al.*, 2023b). Certaines études ont démontré que parmi les AdEVs, les VEs dérivées des ADSCs étaient pourvues d'effets cardioprotecteurs. Crewe *et al.,* de l'équipe de P. Scherer à Dallas ont récemment rapporté dans le journal *Cell metabolism* que les adipocytes étaient capables de libérer des petites VEs contenant des mitochondries endommagées en réponse à un stress énergétique, tel que celui observé dans l'obésité (Crewe *et al.*, 2021). Les mitochondries associées aux VEs étaient capables d'induire un stress oxydatif mitochondrial transitoire dans le tissu cardiaque, entraînant une réponse antioxydante qui protégeait le myocarde contre les lésions d'ischémie/reperfusion chez la souris (Crewe *et al.*, 2021). Dans un modèle murin d'insuffisance cardiaque, des chercheurs ont montré que l'injection d'ADSCs, via la sécrétion d'exosomes, possédait des effets cardioprotecteurs dépendant de l'adiponectine circulante (Nakamura *et al.*, 2020). Ces observations ont notamment été faites dans un contexte de prévention des altérations structurelles du cœur. Chez les souris soumises à un

stress hémodynamique, l'augmentation des niveaux plasmatiques d'adiponectine renforçait l'action protectrice des ADSCs en stimulant significativement la libération d'exosomes, améliorant la fraction d'éjection et limitant l'hypertrophie myocardique (Nakamura *et al.*, 2020). Bien qu'il soit difficile de présumer du véritable effet physiologique des VEs du TAE, ces données montrent tout de même que les AdVEs pourraient jouer un rôle modulateur dans la réponse cardiaque au stress et à l'ischémie. En effet, de plus en plus d'éléments montrent d'importantes implications des VEs dérivées du TAE dans la régulation de la fonction cardiaque, du métabolisme énergétique et de sa capacité d'adaptation ou de pré-conditionnement à l'ischémie reperfusion (Lauriane Y. M. Michel, 2023).

Dans notre analyse, nous avons également observé une surexpression de voies liées à l'immunité de type Th2 et au développement et l'hétérogénéité des ILCs dans les VEs du TAE comparé aux autres TAs. Dans notre première étude (EPICAR/ INTERFACE) sur le phénotypage des ILCs du TAE, nous avions mis en évidence une corrélation entre le beiging de la graisse épicardique et la réponse immunitaire Th2 ainsi que les ILC2 (Doukbi *et al.*, 2024). Les résultats de cette deuxième étude montrent que les VEs du TAE pourraient également avoir un lien avec le caractère beige du tissu. Dans cette optique, nous avons dans un premier temps envisagé d'effectuer des études fonctionnelles sur les cellules hMADS. En effet, notre hypothèse de départ était que les VEs du TAE pourraient avoir un impact sur le beiging du TAE notamment via la présence de mitochondries fonctionnelles dans les VEs, vésicules alors nommées mitoVEs. Dans l'obésité, les adipocytes subissent un stress énergétique intense, ce qui entraîne une perte de la masse et de la fonction mitochondriale (An *et al.*, 2019; Crewe *et al.*, 2021). Les observations de l'étude de Crewe *et al.* sur les mitoVEs et leur implication dans le crosstalk cœur-TA nous ont alors intéressés. Dans notre étude, nous avons démontré que les VEs adipeuses, y compris celles du TAE contiennent des mitochondries fonctionnelles. Nous avions alors pour but d'incuber les cellules hMADs en présence des VEs des différents dépôts de graisse et d'observer une cinétique d'expression protéique d'UCP-1 qui retranscrirait le caractère beige des cellules (**cadre rouge Figure 34**).

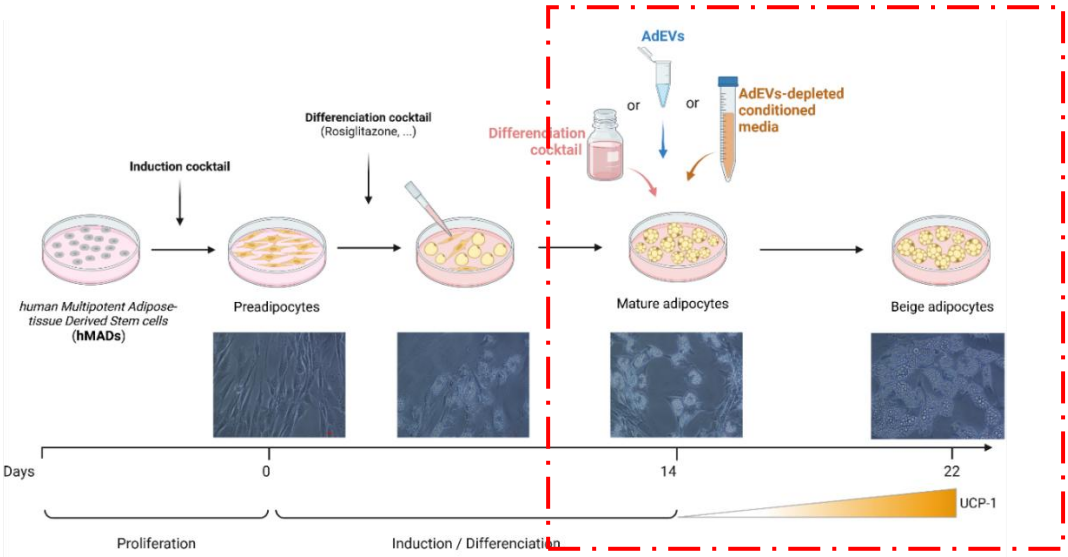


Figure 34 | Protocole initial du test de l'implication des VEs du TAE sur le beiging des hMADS.

Lorsque nous avons testé ces conditions, les résultats ont montré que la supplémentation en VEs des milieux de différenciation des hMADS ne modifiait pas l'expression protéique d'UCP-1. De plus, bien que nous ayons identifié la présence de mitoVEs dans le TAE, celles-ci n'ont pas

modifié la respiration mitochondriale ni la production d'ATP dans les cellules hMADS. En revanche, l'analyse du sécrétome des hMADS préconditionnées par les VEs du TAE montre une modification de celui-ci par rapport au contrôle (cocktail de différenciation classique des hMADS). En effet, le surnageant des hMADS, au contact des VEs du TAE surexprimait certaines cytokines telles que SHBG, Relaxine-2, OPN et Serpine E1 (PAI-1). Cela suggère que ces VEs pourraient contribuer aux processus inflammatoires, hormonaux, thrombotiques et fibrotiques locaux dans le cœur et les vaisseaux coronaires, plutôt que de favoriser un phénotype adipocytaire beige. En effet, la relaxine-2 joue un rôle dans la physiopathologie du système cardiovasculaire via une régulation du métabolisme cardiaque, l'induction d'une vasodilatation, ou encore la réduction de l'inflammation, du stress oxydatif et de l'apoptose. À l'inverse, l'OPN joue un rôle dans l'effet délétère du TAV sur le vieillissement cardiaque, conduisant à la stimulation de la fibrose myocardique par la modulation de la sénescence des fibroblastes (Sawaki *et al.,* 2018). De plus, le vieillissement et la coronaropathie ont été associés à une réduction du beiging du TAE (Dozio *et al.*, 2014; Iacobellis, 2021). Dans ce contexte, les VEs dérivées des ADSC pourraient jouer un rôle protecteur contre le dysfonctionnement cardiaque induit par le vieillissement. Dans une étude récente, les auteurs ont observé que le traitement de souris âgées par des ADSCs de jeunes animaux améliorait plusieurs paramètres classiquement altérés avec le vieillissement, tels que la résistance à la fatigue, la fonction rénale et la coordination motrice (Sanz-Ros *et al.*, 2022). Cela suggère que les ADSCs pourraient également exercer un effet bénéfique sur le vieillissement cardiaque, potentiellement par le biais de leurs VEs, en atténuant les altérations induites par l'âge.

Ces observations soutiennent ainsi un rôle double des VEs épicardiques à la fois bénéfique et/ou délétère sur les adipocytes et suggèrent que leurs effets seraient davantage liés à l'inflammation et son autoentretient (cercle vicieux) et à la modulation du sécrétome plutôt qu'à une reprogrammation métabolique directe des adipocytes.

Conclusion sur les travaux de thèse et perspectives

I. Synthèse

Le TAE possède en conditions physiologiques plusieurs effets cardioprotecteurs. Cependant, le phénotype de ce dépôt de graisse ectopique devient inflammatoire avec l'obésité et l'insulinorésistance, et favorise des processus tels que l'athérogenèse. Indépendamment des facteurs de risque cardiovasculaire classiques, la quantité de ce tissu est également un prédicteur d'événements cardiaques et de FA. Cependant, des études ont montré que le TAE humain pouvait exprimer une signature de TA beige. Les TAs beiges, rares chez l'adulte, se forment au travers du processus de beiging et sous l'effet de facteurs beigisants dont le plus connu est l'exposition au froid. De nombreux travaux ont démontré un rôle protecteur de ce phénomène chez la souris comme chez l'humain. Le beiging joue également un rôle clé dans la régulation métabolique via notamment l'augmentation de la dépense énergétique, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline ou encore la réduction de l'inflammation. Aujourd'hui, beaucoup de recherches se penchent sur des stratégies thérapeutiques impliquant l'activation de ce processus afin de lutter contre l'obésité, le syndrome métabolique ou le DT2. Dans ces conditions, le beiging pourrait permettre de limiter l'accumulation de graisse, de réduire l'état inflammatoire chronique ou de favoriser une meilleure utilisation du glucose. Dans le contexte du TAE, le beiging pourrait permettre d'atténuer les effets délétères de son expansion excessive, en limitant l'inflammation locale et en améliorant la sensibilité à l'insuline. Cependant, bien que l'on sache que ce tissu soit capable d'adopter un phénotype beige, peu d'études se sont intéressées aux mécanismes impliqués dans ce processus.

Ainsi, mes travaux de thèse se sont intéressés aux acteurs cellulaires et vésiculaires impliqués dans son beiging ou a contrario à son inflammation. Ceci afin de **comprendre dans quelles conditions et avec quelle composition cellulaire ou vésiculaire** ce tissu pouvait exprimer un **phénotype beige** et anti-inflammatoire **ou pro-inflammatoire**.

Plus difficile à étudier chez l'animal, nous nous sommes penchés sur la composition immune du TAE humain. À ce jour, les études chez l'humain ne le comparaient qu'au TAsc thoracique/médiastinal et les quantités prélevées étaient de l'ordre de quelques grammes. De plus, en chirurgie, son prélèvement nécessite une intervention à cœur ouvert (organe noble vital) avec thoracotomie qui implique une impossibilité de travailler sur la région abdominale dans le même temps opératoire. Ainsi, nos études se sont basées sur des prélèvements multiorganes qui nous ont permis d'obtenir des biopsies en plus grandes quantité et provenant des deux régions thoracique et abdominale.

Dans ces travaux, nos résultats suggèrent que le TAE possède un **phénotype immuno-métabolique unique**, avec **présence spécifique de cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2)** (**Figure 35**). L'analyse des VEs de ce tissu a montré une forte expression d'**adiponectine** dans les vésicules épicardiques comparée aux autres TAs, indiquant que ces VEs épicardiques pourraient jouer un rôle insulino-sensibilisateur et anti-inflammatoire. Parmi les cytokines vésiculaires étudiées, l'**apolipoprotéine A1**, constituant majeur des HDL, ressortait dans le top 3 des cytokines surexprimées. Enfin, les analyses de pathways ont montré un enrichissement des voies impliquées dans le dialogue VEs - cellules cardiaques.

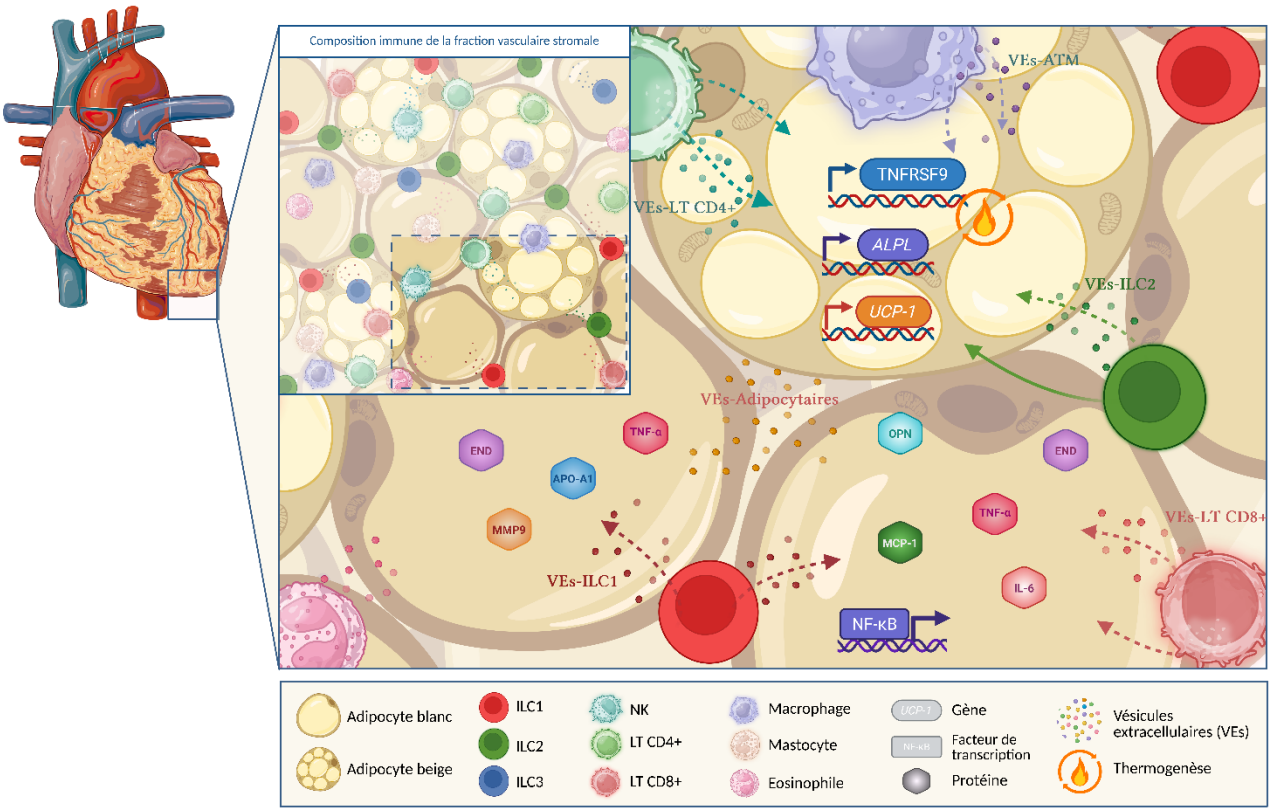


Figure 35 | Composition immune et vésiculaire du tissu adipeux épicardique.

Le TAE est un tissu adipeux beige dont la fraction vasculaire stromale (FVS) est composée de multiples cellules immunitaires : ILCs, NK, macrophages adipeux (ATM), LT, mastocytes, éosinophiles). Dans cette étude nous avons montré que le TAE contenait de nombreuses ILC2 et que celles-ci étaient corrélées avec l'expression (flèche pleine verte) de facteurs thermogéniques (UCP-1, ALPL et TNFRSF9). La FVS du TAE contient également des cellules pro-inflammatoires telles que des ILC1 (représentant la majorité des ILCs du tissu), des NK ou des LT CD8+. Toutes cellules pro- et anti-inflammatoires pourraient potentiellement agir sur les adipocytes épicardiques via la sécrétion de cytokines/vésicules extracellulaires (flèches en pointillées) afin de moduler son sécrétome.

Bien que notre but principal était de comprendre le phénotype beige de la graisse épicardique, nous avons également investigué son côté inflammatoire. En effet, parmi les ILCs, nous avons observé une **prédominance des ILC1** (pro-inflammatoires) dans les TAs viscéraux (**TAE** et TAV). Cela suggère une possible implication de ces cellules dans la régulation inflammatoire du TAE. Par ailleurs, nos analyses des **VEs du TAE** ont révélé une **signature** moléculaire spécifique, **enrichie en cytokines pro-inflammatoires** (IL-8, IL-6, TNF-α, MCP-1), **pro-sénescentes** (OPN) et **pro-fibrotiques** (END, MMP9). L'exposition des cellules **hMADS** aux VEs du TAE a également induit une **augmentation de l'expression de molécules d'adhésion et pro-thrombotiques**, suggérant un possible impact du sécrétome de ces VEs sur l'entretien de l'inflammation du TA, son remodelage ou sa sénescence.

Ainsi, nos travaux mettent en évidence une **interaction** entre les **cellules immunitaires,** les **VEs** et le **phénotype immunométabolique du TAE** ouvrant de nouvelles perspectives sur son rôle local dans l'inflammation myocardique et des vaisseaux coronaires.

II. Perspectives

La compréhension du phénotype immunométabolique du TAE ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes. Notamment des stratégies qui viseraient à promouvoir sa capacité thermogénique en TA beige dans le but de réduire les risques cardiovasculaires qui lui sont associés en cas d'obésité. L'exposition au froid, l'exercice physique ou encore l'utilisation de molécules antidiabétiques comme les doubles agonistes GLP-1/GIP font partie des pistes actuellement explorées. Toutefois, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre l'effet du beiging sur la fonction cardiaque et évaluer son potentiel en tant que cible thérapeutique. Une étude approfondie des interactions entre le TAE, le myocarde et le système immunitaire pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de cette plasticité métabolique dans la protection cardiovasculaire.

L'étude des VEs dérivées du TA, au cours de ces dernières années a permis d'approfondir nos connaissances sur le rôle du dialogue du TA avec le myocarde et les artères coronaires. Dans notre étude, nous nous sommes par exemple concentrés sur l'effet des VEs du TAE sur les adipocytes hMADS. Il serait pertinent d'effectuer ces mêmes tests sur des lignées de cardiomyocytes (HL-1, AC-16, iPSC) ou sur des modèles d'organoïdes ou de coculture. Cela permettrait d'évaluer directement l'impact du sécrétome vésiculaire du TAE sur la fonction des cardiomyocytes et leur capacité contractile ou de conduction de l'onde électrique. De plus, puisque nous avons observé une double signature de ces VEs, à la fois protectrice (anti-inflammatoire, insulino-sensibilité) et délétère (pro-inflammatoire, pro-fibrotique, pro-sénescente), comprendre les facteurs qui feraient pencher la balance en faveur d'un phénotype plus inflammatoire ou plus beigisant serait intéressant. Il serait aussi intéressant d'étudier l'effet des VEs issues du TAE sur d'autres types cellulaires du système cardiovasculaire (cellules endothéliales, fibroblastes cardiaques…) qui pourraient fournir des éléments supplémentaires dans la compréhension des mécanismes intégratifs de la fonction cardiaque et vasculaire.

Dans cet optique, nous avons d'ores et déjà entrepris d'effectuer des recherches sur l'effet des VEs du TAE sur le phénotype des macrophages. En effet, nous venons d'obtenir un financement APHM AAP Starter 2024. Ce projet permettrait de compléter l'étude FIRST. Ce projet a pour but d'observer l'effet des VEs du TAE sur un modèle de macrophages issus de la différenciation des monocytes circulants (MoDM, *monocyte-derived macrophages*). Nous prévoyons ainsi une collaboration avec l'établissement français du sang (EFS) de Marseille. Après exposition des MoDM aux VEs du TAE sur une période de 6 jours, nous analyserons le sécrétome des MoDM afin de déterminer s'il existe un impact du sécrétome de ces VEs sur le phénotype des macrophages (pro- ou anti-inflammatoires).

Dans nos études actuelles, les biopsies obtenues à partir de PMO ont posé plusieurs limites. En effet, l'état de mort encéphalique des patients peut induire des perturbations systémiques, telles qu'une inflammation exacerbée, des déséquilibres hormonaux ou des altérations hémodynamiques, pouvant influencer l'état des TAs. Afin de pallier ce problème, et pour pouvoir comparer les analyses d'ILCs et de VEs des 4 tissus, nous avons travaillé sur des prélèvements pairés, dont les 4 devaient provenir du même patient à la fois. Ainsi pour les prochaines études (AAP Starter), nous prévoyons de prélever des biopsies de patients vivants, bénéficiant d'une chirurgie cardiaque avec thoracotomie dans un contexte de cardiopathie ischémique ou valvulaire. Nous récupèrerons alors du TAE ainsi que du scTh pour chaque patient. L'écriture

d'un protocole de recherche clinique (CPP) est actuellement en cours. L'autre limite que nous avons rencontrée concerne la variabilité du phénotype beige du TAE. En effet, les biopsies obtenues auprès de patients « tout venant » sans critères stricts ne garantissent pas le profil beige de leur graisse épicardique. Par ailleurs, le beiging du TAE diminuant avec l'âge, l'obésité ou la coronaropathie, nous ne pouvions exclure l'éventualité d'une perte du caractère beige du TAE sur nos biopsies. Pour remédier à cela, dans le cadre de l'AAP Starter, nous avons décidé d'inclure des prélèvements provenant d'enfants, opérés de cardiopathie congénitale, afin de mieux étudier le caractère beige du TAE, qui est plus présent avant l'âge de 11 ans et chez les sujets de poids normal ou insuffisants pondéraux.

En revanche, avec ce type de prélèvements, l'analyse des ILCs semble complexe du fait de la quantité restreinte de graisse possiblement récupérable. Leur étude dans le sang en tant que biomarqueur du beiging épicardique semble également complexe puisque ce sont des cellules majoritairement tissulaires. En revanche, l'étude des VEs est plus accessible, notamment grâce à leur présence dans la circulation sanguine et leur capacité à transporter des cargos bioactifs de façon systémique, même si notre étude s'est focalisée sur leur effet local et autocrine. De plus, leur facilité d'accès, leur potentiel de bio-ingénierie et leur affinité pour certaines cibles cellulaires en font une option thérapeutique prometteuse.

Une caractérisation plus approfondie du contenu moléculaire des VEs du TAE serait intéressante, notamment en ce qui concerne le profil des microARN, des métabolites ou encore leur composition lipidique. Dans la suite de FIRST, nous prévoyons d'effectuer des analyses non ciblées, avec des approches couplées lipido/métabolomiques sur les VEs afin d'identifier si les vésicules des 4 TAs présentent des spécificités comme nous l'avions identifié dans le lipidome du TAE. En effet, notre équipe a précédemment montré un enrichissement spécifique du lipidome du TAE en plasmalogènes, ces derniers ayant été identifiés pour moduler la fission mitochondriale. Il serait également pertinent d'étudier l'impact de différents contextes physiopathologiques, tels que l'obésité massive ou le DT2, sur la production et les effets des VEs du TAE et des ILCs. Cela permettrait de mieux comprendre le rôle des VEs issues du TAE dans l'inflammation, l'athérogenèse et les MCV et d'affiner leur potentiel en tant que cibles thérapeutiques.

Cependant, bien que la mesure des AdEVs soit une approche peu invasive et prometteuse pour l'évaluation de la santé métabolique, il reste actuellement impossible de réaliser des biopsies de TAE chez des patients en bonne santé. Ainsi à plus long terme, notre objectif est d'identifier de nouveaux biomarqueurs permettant de caractériser le développement du TAE et son phénotype immuno-inflammatoire ou beige. Ces biomarqueurs pourraient être couplés à des techniques d'imagerie non invasive couplées à de l'intelligence artificielle, déjà utilisées pour l'évaluation locale périvasculaire du caractère inflammatoire du TAE (ex. CariHeart, Caristo UK), afin de prédire les événements coronariens chez les patients à haut risque cardiovasculaire.

Plusieurs questions restent en suspens :

- Comment la composition de la cargaison des VEs du TAE est-elle régulée ?
- Les contextes pathologiques tels que l'obésité entraînent-t-ils une dérégulation du sécrétome vésiculaire du TAE ? Quels en seraient les conséquences ? Comment y remédier ?
- Comment les différentes cargaisons de ces VEs influencent-elles les fonctions des cellules cibles ?

En poursuivant ces recherches, nous espérons apporter de nouvelles perspectives dans la compréhension des interactions entre le TAE, les VEs et les maladies cardiovasculaires, et ainsi contribuer au développement de nouvelles approches thérapeutiques innovantes.

Bibliographie

Abdesselam, I., Dutour, A., Kober, F., Ancel, P., Bege, T., Darmon, P., Lesavre, N., Bernard, M., & Gaborit, B. (2016). Time Course of Change in Ectopic Fat Stores After Bariatric Surgery. *Journal of the American College of Cardiology*, *67*(1), 117-119. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.10.052

Abraham, T. M., Pedley, A., Massaro, J. M., Hoffmann, U., & Fox, C. S. (2015). Association between visceral and subcutaneous adipose depots and incident cardiovascular disease risk factors. *Circulation*, *132*(17), 1639-1647. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.015000

Ahmadi, N., Nabavi, V., Hajsadeghi, F., Zeb, I., Flores, F., Ebrahimi, R., & Budoff, M. (2013). Aged garlic extract with supplement is associated with increase in brown adipose, decrease in white adipose tissue and predict lack of progression in coronary atherosclerosis. *International Journal of Cardiology*, *168*(3), 2310-2314. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.182

Akamine, R., Yamamoto, T., Watanabe, M., Yamazaki, N., Kataoka, M., Ishikawa, M., Ooie, T., Baba, Y., & Shinohara, Y. (2007). Usefulness of the 5' region of the cDNA encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0 conserved among rats, mice, and humans as a standard probe for gene expression analysis in different tissues and animal species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *70*(3), 481-486. https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.11.008

Akhmetshina, A., Palumbo, K., Dees, C., Bergmann, C., Venalis, P., Zerr, P., Horn, A., Kireva, T., Beyer, C., Zwerina, J., Schneider, H., Sadowski, A., Riener, M.-O., MacDougald, O. A., Distler, O., Schett, G., & Distler, J. H. W. (2012). Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-β-mediated fibrosis. *Nature Communications*, *3*, 735. https://doi.org/10.1038/ncomms1734

Akoumianakis, I., & Antoniades, C. (2017). The interplay between adipose tissue and the cardiovascular system : Is fat always bad? *Cardiovascular Research*, *113*(9), 999-1008. https://doi.org/10.1093/cvr/cvx111

Al Chekakie, M. O., Welles, C. C., Metoyer, R., Ibrahim, A., Shapira, A. R., Cytron, J., Santucci, P., Wilber, D. J., & Akar, J. G. (2010). Pericardial fat is independently associated with human atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, *56*(10), 784-788. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.03.071

Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., & Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biology*, *10*(5), 619-624. https://doi.org/10.1038/ncb1725

Alpert, M. A., Lavie, C. J., Agrawal, H., Kumar, A., & Kumar, S. A. (2016). Cardiac Effects of Obesity : PATHOPHYSIOLOGIC, CLINICAL, AND PROGNOSTIC CONSEQUENCES-A REVIEW. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention*, *36*(1), 1-11. https://doi.org/10.1097/HCR.0000000000000147

Amano, S. U., Cohen, J. L., Vangala, P., Tencerova, M., Nicoloro, S. M., Yawe, J. C., Shen, Y., Czech, M. P., & Aouadi, M. (2014). Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metabolism*, *19*(1), 162-171. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.017

Amati, F., Pennant, M., Azuma, K., Dubé, J. J., Toledo, F. G. S., Rossi, A. P., Kelley, D. E., & Goodpaster, B. H. (2012). Lower thigh subcutaneous and higher visceral abdominal adipose tissue content both contribute to insulin resistance. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *20*(5), 1115-1117. https://doi.org/10.1038/oby.2011.401

Amin, M. M., Parastar, S., Ebrahimpour, K., Shoshtari-Yeganeh, B., Hashemi, M., Mansourian, M., & Kelishadi, R. (2018). Association of urinary phthalate metabolites concentrations with body mass index and waist circumference. *Environmental Science and Pollution Research International*, *25*(11), 11143-11151. https://doi.org/10.1007/s11356-018-1413-8

An, Y. A., Crewe, C., Asterholm, I. W., Sun, K., Chen, S., Zhang, F., Shao, M., Funcke, J.-B., Zhang, Z., Straub, L., Yoshino, J., Klein, S., Kusminski, C. M., & Scherer, P. E. (2019). Dysregulation of Amyloid Precursor Protein Impairs Adipose Tissue Mitochondrial Function and Promotes Obesity. *Nature Metabolism*, *1*(12), 1243-1257. https://doi.org/10.1038/s42255-019-0149-1

Andersen, C. J., Murphy, K. E., & Fernandez, M. L. (2016). Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, *7*(1), 66-75. https://doi.org/10.3945/an.115.010207

Antonopoulos, A. S., Margaritis, M., Verheule, S., Recalde, A., Sanna, F., Herdman, L., Psarros, C., Nasrallah, H., Coutinho, P., Akoumianakis, I., Brewer, A. C., Sayeed, R., Krasopoulos, G., Petrou, M., Tarun, A., Tousoulis, D., Shah, A. M., Casadei, B., Channon, K. M., & Antoniades, C. (2016). Mutual Regulation of Epicardial Adipose Tissue and Myocardial Redox State by PPAR-γ/Adiponectin Signalling. *Circulation Research*, *118*(5), 842-855. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307856

Antoun, E., Kitaba, N. T., Titcombe, P., Dalrymple, K. V., Garratt, E. S., Barton, S. J., Murray, R., Seed, P. T., Holbrook, J. D., Kobor, M. S., Lin, D. T., MacIsaac, J. L., Burdge, G. C., White, S. L., Poston, L., Godfrey, K. M., Lillycrop, K. A., & UPBEAT Consortium. (2020). Maternal dysglycaemia, changes in the infant's epigenome modified with a diet and physical activity intervention in pregnancy : Secondary analysis of a randomised control trial. *PLoS Medicine*, *17*(11), e1003229. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003229

Araki, E., Lipes, M. A., Patti, M. E., Brüning, J. C., Haag, B., Johnson, R. S., & Kahn, C. R. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, *372*(6502), 186-190. https://doi.org/10.1038/372186a0

Aronne, L. J., Nelinson, D. S., & Lillo, J. L. (2009). Obesity as a disease state : A new paradigm for diagnosis and treatment. *Clinical Cornerstone*, *9*(4), 9-25; discussion 26-29. https://doi.org/10.1016/s1098-3597(09)80002-1

Aron-Wisnewsky, J., & Clément, K. (2016). The gut microbiome, diet, and links to cardiometabolic and chronic disorders. *Nature Reviews. Nephrology*, *12*(3), 169-181. https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.191

Aron-Wisnewsky, J., Tordjman, J., Poitou, C., Darakhshan, F., Hugol, D., Basdevant, A., Aissat, A., Guerre-Millo, M., & Clément, K. (2009). Human adipose tissue macrophages : M1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *94*(11), 4619-4623. https://doi.org/10.1210/jc.2009-0925

Arsenescu, V., Arsenescu, R. I., King, V., Swanson, H., & Cassis, L. A. (2008). Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environmental Health Perspectives*, *116*(6), 761-768. https://doi.org/10.1289/ehp.10554

Baba, S., Jacene, H. A., Engles, J. M., Honda, H., & Wahl, R. L. (2010). CT Hounsfield units of brown adipose tissue increase with activation : Preclinical and clinical studies. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, *51*(2), 246-250. https://doi.org/10.2967/jnumed.109.068775

Bachar, G. N., Dicker, D., Kornowski, R., & Atar, E. (2012). Epicardial adipose tissue as a predictor of coronary artery disease in asymptomatic subjects. *The American Journal of Cardiology*, *110*(4), 534-538. https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.04.024

Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *101*(44), 15718-15723. https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101

Bajaj, N. S., Osborne, M. T., Gupta, A., Tavakkoli, A., Bravo, P. E., Vita, T., Bibbo, C. F., Hainer, J., Dorbala, S., Blankstein, R., Bhatt, D. L., Di Carli, M. F., & Taqueti, V. R. (2018). Coronary Microvascular Dysfunction and Cardiovascular Risk in Obese Patients. *Journal of the American College of Cardiology*, *72*(7), 707-717. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.049

Baker, A. R., da Silva, N. F., Quinn, D. W., Harte, A. L., Pagano, D., Bonser, R. S., Kumar, S., & McTernan, P. G. (2006). Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology*, *5*, 1. https://doi.org/10.1186/1475-2840-5-1

Bal, S. M., Bernink, J. H., Nagasawa, M., Groot, J., Shikhagaie, M. M., Golebski, K., van Drunen, C. M., Lutter, R., Jonkers, R. E., Hombrink, P., Bruchard, M., Villaudy, J., Munneke, J. M., Fokkens, W., Erjefält, J. S., Spits, H., & Ros, X. R. (2016). IL-1β, IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. *Nature Immunology*, *17*(6), 636-645. https://doi.org/10.1038/ni.3444

Baldassano, S., Amato, A., Rappa, F., Cappello, F., & Mulè, F. (2016). Influence of endogenous glucagon-like peptide-2 on lipid disorders in mice fed a high-fat diet. *Endocrine Research*, *41*(4), 317-324. https://doi.org/10.3109/07435800.2016.1141950

Ballinger, M. A., & Andrews, M. T. (2018). Nature's fat-burning machine : Brown adipose tissue in a hibernating mammal. *The Journal of Experimental Biology*, *221*(Suppl 1), jeb162586. https://doi.org/10.1242/jeb.162586

Balsaver, A. M., Morales, A. R., & Whitehouse, F. W. (1967). Fat infiltration of myocardium as a cause of cardiac conduction defect. *The American Journal of Cardiology*, *19*(2), 261-265. https://doi.org/10.1016/0002-9149(67)90543-7

Bambace, C., Telesca, M., Zoico, E., Sepe, A., Olioso, D., Rossi, A., Corzato, F., Di Francesco, V., Mazzucco, A., Santini, F., & Zamboni, M. (2011). Adiponectin gene expression and adipocyte diameter : A comparison between epicardial and subcutaneous adipose tissue in men. *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, *20*(5), e153-156. https://doi.org/10.1016/j.carpath.2010.07.005

Banegas, J. R., López-García, E., Gutiérrez-Fisac, J. L., Guallar-Castillón, P., & Rodríguez-Artalejo, F. (2003). A simple estimate of mortality attributable to excess weight in the European Union. *European Journal of Clinical Nutrition*, *57*(2), 201-208. https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601538

Baranek, T., de Amat Herbozo, C., Mallevaey, T., & Paget, C. (2022). Deconstructing iNKT cell development at single-cell resolution. *Trends in Immunology*, *43*(7), 503-512. https://doi.org/10.1016/j.it.2022.04.012

Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J. P., De Matteis, R., & 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*(6), E1244-1253. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00600.2009

Barchuk, M., Dutour, A., Ancel, P., Svilar, L., Miksztowicz, V., Lopez, G., Rubio, M., Schreier, L., Nogueira, J. P., Valéro, R., Béliard, S., Martin, J. C., Berg, G., & Gaborit, B. (2020). Untargeted Lipidomics Reveals a Specific Enrichment in Plasmalogens in Epicardial Adipose Tissue and a Specific Signature in Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *40*(4), 986-1000. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.313955

Barger, J. L., Barnes, B. M., & Boyer, B. B. (2006). Regulation of UCP1 and UCP3 in arctic ground squirrels and relation with mitochondrial proton leak. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *101*(1), 339-347. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01260.2005

Bartelt, A., & Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews. Endocrinology*, *10*(1), 24-36. https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.204

Bastin, M., & Andreelli, F. (2021). *Insulinorésistance* (p. 203-207). https://doi.org/10.1016/B978-2-294-76753-1.00038-2

Bays, H. E. (2011). Adiposopathy is « sick fat » a cardiovascular disease? *Journal of the American College of Cardiology*, *57*(25), 2461-2473. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.02.038

Becher, T., Palanisamy, S., Kramer, D. J., Eljalby, M., Marx, S. J., Wibmer, A. G., Butler, S. D., Jiang, C. S., Vaughan, R., Schöder, H., Mark, A., & Cohen, P. (2021). Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health. *Nature Medicine*, *27*(1), 58-65. https://doi.org/10.1038/s41591-020-1126-7

Beiroa, D., Imbernon, M., Gallego, R., Senra, A., Herranz, D., Villarroya, F., Serrano, M., Fernø, J., Salvador, J., Escalada, J., Dieguez, C., Lopez, M., Frühbeck, G., & Nogueiras, R. (2014). GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes*, *63*(10), 3346-3358. https://doi.org/10.2337/db14-0302

Bell, E. A., Castellanos, V. H., Pelkman, C. L., Thorwart, M. L., & Rolls, B. J. (1998). Energy density of foods affects energy intake in normal-weight women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *67*(3), 412-420. https://doi.org/10.1093/ajcn/67.3.412

Bendelac, A., Savage, P. B., & Teyton, L. (2007). The biology of NKT cells. *Annual Review of Immunology*, *25*, 297-336. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711

Berg, A. H., Combs, T. P., Du, X., Brownlee, M., & Scherer, P. E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature Medicine*, *7*(8), 947-953. https://doi.org/10.1038/90992

Bergman, R. N., Kim, S. P., Catalano, K. J., Hsu, I. R., Chiu, J. D., Kabir, M., Hucking, K., & Ader, M. (2006). Why visceral fat is bad : Mechanisms of the metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *14 Suppl 1*, 16S-19S. https://doi.org/10.1038/oby.2006.277

Bergouignan, A., & Simon, C. (2021). *Rôle de la sédentarité et de l'inactivité physique dans la régulation du poids* (p. 47-51). https://doi.org/10.1016/B978-2-294-76753-1.00010-2

Bernink, J. H., Krabbendam, L., Germar, K., de Jong, E., Gronke, K., Kofoed-Nielsen, M., Munneke, J. M., Hazenberg, M. D., Villaudy, J., Buskens, C. J., Bemelman, W. A., Diefenbach, A., Blom, B., & Spits, H. (2015). Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127(+) Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. *Immunity*, *43*(1), 146-160. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.019

Berrington de Gonzalez, A., Hartge, P., Cerhan, J. R., Flint, A. J., Hannan, L., MacInnis, R. J., Moore, S. C., Tobias, G. S., Anton-Culver, H., Freeman, L. B., Beeson, W. L., Clipp, S. L., English, D. R., Folsom, A. R., Freedman, D. M., Giles, G., Hakansson, N., Henderson, K. D., Hoffman-Bolton, J., … Thun, M. J. (2010). Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *The New England Journal of Medicine*, *363*(23), 2211-2219. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1000367

Bertola, A., Ciucci, T., Rousseau, D., Bourlier, V., Duffaut, C., Bonnafous, S., Blin-Wakkach, C., Anty, R., Iannelli, A., Gugenheim, J., Tran, A., Bouloumié, A., Gual, P., & Wakkach, A. (2012). Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes*, *61*(9), 2238-2247. https://doi.org/10.2337/db11-1274

Bischoff, S. C., Boirie, Y., Cederholm, T., Chourdakis, M., Cuerda, C., Delzenne, N. M., Deutz, N. E., Fouque, D., Genton, L., Gil, C., Koletzko, B., Leon-Sanz, M., Shamir, R., Singer, J., Singer, P., Stroebele-Benschop, N., Thorell, A., Weimann, A., & Barazzoni, R. (2017). Towards a multidisciplinary approach to understand and manage obesity and related diseases. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *36*(4), 917-938. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.11.007

Blondin, D. P., Nielsen, S., Kuipers, E. N., Severinsen, M. C., Jensen, V. H., Miard, S., Jespersen, N. Z., Kooijman, S., Boon, M. R., Fortin, M., Phoenix, S., Frisch, F., Guérin, B., Turcotte, É. E., Haman, F., Richard, D., Picard, F., Rensen, P. C. N., Scheele, C., & Carpentier, A. C. (2020). Human Brown Adipocyte Thermogenesis Is Driven by β2-AR Stimulation. *Cell Metabolism*, *32*(2), 287-300.e7. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.005

Blüher, M. (2020). Metabolically Healthy Obesity. *Endocrine Reviews*, *41*(3), bnaa004. https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa004

Blüher, S., & Schwarz, P. (2014). Metabolically healthy obesity from childhood to adulthood—Does weight status alone matter? *Metabolism: Clinical and Experimental*, *63*(9), 1084-1092. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.06.009

Boden, G., & Shulman, G. I. (2002). Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes : Defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation*, *32 Suppl 3*, 14-23. https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.32.s3.3.x

Bogers, R. P., Bemelmans, W. J. E., Hoogenveen, R. T., Boshuizen, H. C., Woodward, M., Knekt, P., van Dam, R. M., Hu, F. B., Visscher, T. L. S., Menotti, A., Thorpe, R. J., Jamrozik, K., Calling, S., Strand, B. H., Shipley, M. J., & BMI-CHD Collaboration Investigators. (2007). Association of overweight with increased risk of coronary heart disease partly independent of blood pressure and cholesterol levels : A meta-analysis of 21 cohort studies including more than 300 000 persons. *Archives of Internal Medicine*, *167*(16), 1720-1728. https://doi.org/10.1001/archinte.167.16.1720

Bonamichi, B. D. S. F., & Lee, J. (2017). Unusual Suspects in the Development of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance : NK cells, iNKT cells, and ILCs. *Diabetes & Metabolism Journal*, *41*(4), 229-250. https://doi.org/10.4093/dmj.2017.41.4.229

Booth, A., Magnuson, A., & Foster, M. (2014). Detrimental and protective fat : Body fat distribution and its relation to metabolic disease. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, *17*(1), 13-27. https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0009

Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., Dessì-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N., Sarzani, R., & Collins, S. (2012). Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(3), 1022-1036. https://doi.org/10.1172/JCI59701

Borghi, C., & Cicero, A. F. G. (2017). Serum Uric Acid and Cardiometabolic Disease. *Hypertension*, *69*(6), 1011-1013. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09081

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., Kajimura, S., Zingaretti, M. C., Vind, B. F., Tu, H., Cinti, S., Højlund, K., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2012). A PGC1-α-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, *481*(7382), 463-468. https://doi.org/10.1038/nature10777

Bouchard, L., Thibault, S., Guay, S.-P., Santure, M., Monpetit, A., St-Pierre, J., Perron, P., & Brisson, D. (2010). Leptin gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy. *Diabetes Care*, *33*(11), 2436-2441. https://doi.org/10.2337/dc10-1024

Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., & Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells : A

joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, *15*(6), 641-648. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006

Brandstadter, J. D., & Yang, Y. (2011). Natural killer cell responses to viral infection. *Journal of Innate Immunity*, *3*(3), 274-279. https://doi.org/10.1159/000324176

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., & Artis, D. (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature*, *519*(7542), 242-246. https://doi.org/10.1038/nature14115

Brochu, M., Tchernof, A., Dionne, I. J., Sites, C. K., Eltabbakh, G. H., Sims, E. A., & Poehlman, E. T. (2001). What are the physical characteristics associated with a normal metabolic profile despite a high level of obesity in postmenopausal women? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *86*(3), 1020-1025. https://doi.org/10.1210/jcem.86.3.7365

Browning, L. M., Mugridge, O., Dixon, A. K., Aitken, S. W., Prentice, A. M., & Jebb, S. A. (2011). Measuring abdominal adipose tissue : Comparison of simpler methods with MRI. *Obesity Facts*, *4*(1), 9-15. https://doi.org/10.1159/000324546

Brownstein, A. J., Veliova, M., Acin-Perez, R., Liesa, M., & Shirihai, O. S. (2022). ATP-consuming futile cycles as energy dissipating mechanisms to counteract obesity. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, *23*(1), 121-131. https://doi.org/10.1007/s11154-021-09690-w

Bruno, M. E. C., Mukherjee, S., Powell, W. L., Mori, S. F., Wallace, F. K., Balasuriya, B. K., Su, L. C., Stromberg, A. J., Cohen, D. A., & Starr, M. E. (2022). Accumulation of γδ T cells in visceral fat with aging promotes chronic inflammation. *GeroScience*, *44*(3), 1761-1778. https://doi.org/10.1007/s11357-022-00572-w

Buemann, B., Toubro, S., & Astrup, A. (2000). Effects of the two β3-agonists, ZD7114 and ZD2079 on 24 hour energy expenditure and respiratory quotient in obese subjects. *International Journal of Obesity*. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801452

Burlington, R. F., Therriault, D. G., & Hubbard, R. W. (1969). Lipid changes in isolated brown fat cells from hibernating and aroused thirteen-lined ground squirrels (Citellus tridecemlineatus). *Comparative Biochemistry and Physiology*, *29*(1), 431-437. https://doi.org/10.1016/0010-406x(69)91762-9

Buschow, S. I., Nolte-'t Hoen, E. N. M., van Niel, G., Pols, M. S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C. J. M., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M. H. M., & Stoorvogel, W. (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *10*(10), 1528-1542. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x

Butcovan, D., Mocanu, V., Timofte, D. V., Costan, V. V., Danila, R., Veselin, A. P., Ciuntu, B. M., Haliga, R. E., Sascau, R. A., Ghiga, G., & Statescu, C. (2020). Macrophage Accumulation and Angiogenesis in Epicardial Adipose Tissue in Cardiac Patients with or without Chronic Heart Failure. *Applied Sciences*, *10*(17), Article 17. https://doi.org/10.3390/app10175871

Camino, T., Lago-Baameiro, N., Bravo, S. B., Molares-Vila, A., Sueiro, A., Couto, I., Baltar, J., Casanueva, E. F., & Pardo, M. (2022). Human obese white adipose tissue sheds depot-specific extracellular vesicles and reveals candidate biomarkers for monitoring obesity and its comorbidities. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *239*, 85-102. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.01.006

Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue : Function and physiological significance. *Physiological Reviews*, *84*(1), 277-359. https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003

Cano-Sancho, G., Salmon, A. G., & La Merrill, M. A. (2017). Association between Exposure to p,p'-DDT and Its Metabolite p,p'-DDE with Obesity : Integrated Systematic Review and Meta-Analysis. *Environmental Health Perspectives*, *125*(9), 096002. https://doi.org/10.1289/EHP527

Cappuccio, F. P., Taggart, F. M., Kandala, N.-B., Currie, A., Peile, E., Stranges, S., & Miller, M. A. (2008). Meta-analysis of short sleep duration and obesity in children and adults. *Sleep*, *31*(5), 619-626. https://doi.org/10.1093/sleep/31.5.619

Caprio, M., Antelmi, A., Chetrite, G., Muscat, A., Mammi, C., Marzolla, V., Fabbri, A., Zennaro, M.-C., & Fève, B. (2011). Antiadipogenic Effects of the Mineralocorticoid Receptor Antagonist Drospirenone : Potential Implications for the Treatment of Metabolic Syndrome. *Endocrinology*, *152*(1), 113-125. https://doi.org/10.1210/en.2010-0674

Carnell, S., Haworth, C. M. A., Plomin, R., & Wardle, J. (2008). Genetic influence on appetite in children. *International Journal of Obesity (2005)*, *32*(10), 1468-1473. https://doi.org/10.1038/ijo.2008.127

Carobbio, S., Pellegrinelli, V., & Vidal-Puig, A. (2017). Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *960*, 161-196. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_7

Carolan, E., Tobin, L. M., Mangan, B. A., Corrigan, M., Gaoatswe, G., Byrne, G., Geoghegan, J., Cody, D., O'Connell, J., Winter, D. C., Doherty, D. G., Lynch, L., O'Shea, D., & Hogan, A. E. (2015). Altered distribution and increased IL-17 production by mucosal-associated invariant T cells in adult and childhood obesity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *194*(12), 5775-5780. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402945

Carpentier, A. C., Blondin, D. P., Haman, F., & Richard, D. (2023). Brown Adipose Tissue—A Translational Perspective. *Endocrine Reviews*, *44*(2), 143-192. https://doi.org/10.1210/endrev/bnac015

Carvelli, J., Piperoglou, C., Bourenne, J., Farnarier, C., Banzet, N., Demerlé, C., Gainnier, M., & Vély, F. (2019). Imbalance of Circulating Innate Lymphoid Cell Subpopulations in Patients With Septic Shock. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2179. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02179

Castoldi, A., Naffah de Souza, C., Câmara, N. O. S., & Moraes-Vieira, P. M. (2015). The Macrophage Switch in Obesity Development. *Frontiers in Immunology*, *6*, 637. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00637

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2007). Prevalence of regular physical activity among adults—United States, 2001 and 2005. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *56*(46), 1209-1212.

Chairoungdua, A., Smith, D. L., Pochard, P., Hull, M., & Caplan, M. J. (2010). Exosome release of β-catenin : A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *The Journal of Cell Biology*, *190*(6), 1079-1091. https://doi.org/10.1083/jcb.201002049

Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). The components of the immune system. In *Immunobiology : The Immune System in Health and Disease. 5th edition*. Garland Science. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27092/

Charrin, S., Jouannet, S., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2014). Tetraspanins at a glance. *Journal of Cell Science*, *127*(Pt 17), 3641-3648. https://doi.org/10.1242/jcs.154906

Chechi, K., Blanchard, P.-G., Mathieu, P., Deshaies, Y., & Richard, D. (2013). Brown fat like gene expression in the epicardial fat depot correlates with circulating HDL-cholesterol and triglycerides in patients with coronary artery disease. *International Journal of Cardiology*, *167*(5), 2264-2270. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.06.008

Chechi, K., Vijay, J., Voisine, P., Mathieu, P., Bossé, Y., Tchernof, A., Grundberg, E., & Richard, D. (2019). UCP1 expression-associated gene signatures of human epicardial adipose tissue. *JCI Insight*, *4*(8), e123618, 123618. https://doi.org/10.1172/jci.insight.123618

Chen, Y., Buyel, J. J., Hanssen, M. J. W., Siegel, F., Pan, R., Naumann, J., Schell, M., van der Lans, A., Schlein, C., Froehlich, H., Heeren, J., Virtanen, K. A., van Marken Lichtenbelt, W., & Pfeifer, A. (2016). Exosomal microRNA miR-92a concentration in serum reflects human brown fat activity. *Nature Communications*, *7*, 11420. https://doi.org/10.1038/ncomms11420

Chen, Y., Siegel, F., Kipschull, S., Haas, B., Fröhlich, H., Meister, G., & Pfeifer, A. (2013). miR-155 regulates differentiation of brown and beige adipocytes via a bistable circuit. *Nature Communications*, *4*, 1769. https://doi.org/10.1038/ncomms2742

Cheng, K.-H., Chu, C.-S., Lee, K.-T., Lin, T.-H., Hsieh, C.-C., Chiu, C.-C., Voon, W.-C., Sheu, S.-H., & Lai, W.-T. (2008). Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease. *International Journal of Obesity (2005)*, *32*(2), 268-274. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803726

Cherian, S., Lopaschuk, G. D., & Carvalho, E. (2012). Cellular cross-talk between epicardial adipose tissue and myocardium in relation to the pathogenesis of cardiovascular disease. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *303*(8), E937-E949. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00061.2012

Chmelar, J., Chung, K.-J., & Chavakis, T. (2013). The role of innate immune cells in obese adipose tissue inflammation and development of insulin resistance. *Thrombosis and Haemostasis*, *109*(3), 399-406. https://doi.org/10.1160/TH12-09-0703

Cho, K. W., Zamarron, B. F., Muir, L. A., Singer, K., Porsche, C. E., DelProposto, J. B., Geletka, L., Meyer, K. A., O'Rourke, R. W., & Lumeng, C. N. (2016). Adipose Tissue Dendritic Cells Are Independent Contributors to Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *197*(9), 3650-3661. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600820

Cho, K.-I., Kim, B.-J., Cha, T.-J., Heo, J.-H., Kim, H.-S., & Lee, J.-W. (2015). Impact of duration and dosage of statin treatment and epicardial fat thickness on the recurrence of atrial fibrillation after electrical cardioversion. *Heart and Vessels*, *30*(4), 490-497. https://doi.org/10.1007/s00380-014-0505-8

Chou, I.-P., Chiu, Y.-P., Ding, S.-T., Liu, B.-H., Lin, Y. Y., & Chen, C.-Y. (2014). Adiponectin receptor 1 overexpression reduces lipid accumulation and hypertrophy in the heart of diet-induced obese mice—Possible involvement of oxidative stress and autophagy. *Endocrine Research*, *39*(4), 173-179. https://doi.org/10.3109/07435800.2013.879165

Cinti, S. (2012). The adipose organ at a glance. *Disease Models & Mechanisms*, *5*(5), 588-594. https://doi.org/10.1242/dmm.009662

Clayton, A., Harris, C. L., Court, J., Mason, M. D., & Morgan, B. P. (2003). Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. *European Journal of Immunology*, *33*(2), 522-531. https://doi.org/10.1002/immu.200310028

Cleeman, J. (s. d.). *ATP III Guidelines At-A-Glance Quick Desk Reference*.

Clement, E., Lazar, I., Attané, C., Carrié, L., Dauvillier, S., Ducoux-Petit, M., Esteve, D., Menneteau, T., Moutahir, M., Le Gonidec, S., Dalle, S., Valet, P., Burlet-Schiltz, O., Muller, C., & Nieto, L. (2020). Adipocyte extracellular vesicles carry enzymes and fatty acids that stimulate mitochondrial metabolism and remodeling in tumor cells. *The EMBO Journal*, *39*(3), e102525. https://doi.org/10.15252/embj.2019102525

Clément, K., Basdevant, A., & Dutour, A. (2009). Weight of pericardial fat on coronaropathy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(5), 615-616. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.182907

Coats, B. R., Schoenfelt, K. Q., Barbosa-Lorenzi, V. C., Peris, E., Cui, C., Hoffman, A., Zhou, G., Fernandez, S., Zhai, L., Hall, B. A., Haka, A. S., Shah, A. M., Reardon, C. A., Brady, M. J., Rhodes, C. J., Maxfield, F. R., & Becker, L. (2017). Metabolically Activated Adipose Tissue Macrophages Perform Detrimental and Beneficial Functions during Diet-Induced Obesity. *Cell Reports*, *20*(13), 3149-3161. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.096

Collins, S. (2014). A heart-adipose tissue connection in the regulation of energy metabolism. *Nature Reviews. Endocrinology*, *10*(3), 157-163. https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.234

Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *30*, 255-289. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326

Comas, F., Martínez, C., Sabater, M., Ortega, F., Latorre, J., Díaz-Sáez, F., Aragonés, J., Camps, M., Gumà, A., Ricart, W., Fernández-Real, J. M., & Moreno-Navarrete, J. M. (2019). Neuregulin 4 Is a Novel Marker of Beige Adipocyte Precursor Cells in Human Adipose Tissue. *Frontiers in Physiology*, *10*, 39. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00039

Connolly, K. D., Guschina, I. A., Yeung, V., Clayton, A., Draman, M. S., Von Ruhland, C., Ludgate, M., James, P. E., & Rees, D. A. (2015). Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicles released pre- and post-adipogenesis. *Journal of Extracellular Vesicles*, *4*(1), 29159. https://doi.org/10.3402/jev.v4.29159

Connolly, K. D., Wadey, R. M., Mathew, D., Johnson, E., Rees, D. A., & James, P. E. (2018). Evidence for Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles in the Human Circulation. *Endocrinology*, *159*(9), 3259-3267. https://doi.org/10.1210/en.2018-00266

Corradi, D., Maestri, R., Callegari, S., Pastori, P., Goldoni, M., Luong, T. V., & Bordi, C. (2004). The ventricular epicardial fat is related to the myocardial mass in normal, ischemic and hypertrophic hearts. *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, *13*(6), 313-316. https://doi.org/10.1016/j.carpath.2004.08.005

Cousin, B., Cinti, S., Morroni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Pénicaud, L., & Casteilla, L. (1992). Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue : Molecular and morphological characterization. *Journal of Cell Science*, *103 (Pt 4)*, 931-942.

Crewe, C. (2022). The challenges of interrogating adipose tissue extracellular vesicle functions in physiology. *Communications Biology*, *5*(1), 581. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03511-9

Crewe, C., An, Y. A., & Scherer, P. E. (2017). The ominous triad of adipose tissue dysfunction : Inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, *127*(1), 74-82. https://doi.org/10.1172/JCI88883

Crewe, C., Funcke, J.-B., Li, S., Joffin, N., Gliniak, C. M., Ghaben, A. L., An, Y. A., Sadek, H. A., Gordillo, R., Akgul, Y., Chen, S., Samovski, D., Fischer-Posovszky, P., Kusminski, C. M., Klein, S., & Scherer, P. E. (2021). Extracellular vesicle-based interorgan transport of mitochondria from energetically stressed adipocytes. *Cell Metabolism*, *33*(9), 1853-1868.e11. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.08.002

Crewe, C., Joffin, N., Rutkowski, J. M., Kim, M., Zhang, F., Towler, D. A., Gordillo, R., & Scherer, P. E. (2018). An Endothelial-to-Adipocyte Extracellular Vesicle Axis Governed by Metabolic State. *Cell*, *175*(3), 695-708.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.005

Crichton, P. G., Lee, Y., & Kunji, E. R. S. (2017). The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism. *Biochimie*, *134*, 35-50. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.12.016

Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y.-H., Doria, A., Kolodny, G. M., & Kahn, C. R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England Journal of Medicine*, *360*(15), 1509-1517. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810780

Cypess, A. M., White, A. P., Vernochet, C., Schulz, T. J., Xue, R., Sass, C. A., Huang, T. L., Roberts-Toler, C., Weiner, L. S., Sze, C., Chacko, A. T., Deschamps, L. N., Herder, L. M., Truchan, N., Glasgow, A. L., Holman, A. R., Gavrila, A., Hasselgren, P.-O., Mori, M. A., … Tseng, Y.-H. (2013). Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nature Medicine*, *19*(5), 635-639. https://doi.org/10.1038/nm.3112

Czernichow, S., Renuy, A., Rives-Lange, C., Carette, C., Airagnes, G., Wiernik, E., Ozguler, A., Kab, S., Goldberg, M., Zins, M., & Matta, J. (2021). Evolution of the prevalence of obesity in the adult population in France, 2013–2016 : The Constances study. *Scientific Reports*, *11*, 14152. https://doi.org/10.1038/s41598-021-93432-0

Darbre, P. D. (2017). Endocrine Disruptors and Obesity. *Current Obesity Reports*, *6*(1), 18-27. https://doi.org/10.1007/s13679-017-0240-4

Dash, S., Wu, C.-C., Wu, C.-C., Chiang, S.-F., Lu, Y.-T., Yeh, C.-Y., You, J.-F., Chu, L. J., Yeh, T.-S., & Yu, J.-S. (2022). Extracellular Vesicle Membrane Protein Profiling and Targeted Mass Spectrometry Unveil CD59 and Tetraspanin 9 as Novel Plasma Biomarkers for Detection of Colorectal Cancer. *Cancers*, *15*(1), 177. https://doi.org/10.3390/cancers15010177

Davis, D. J., Kang, B.-H., Heringer, A. S., Wilkop, T. E., & Drakakaki, G. (2016). Unconventional Protein Secretion in Plants. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1459*, 47-63. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3804-9_3

De Silva, N., Samblas, M., Martínez, J. A., & Milagro, F. I. (2018). Effects of exosomes from LPS-activated macrophages on adipocyte gene expression, differentiation, and insulin-dependent glucose uptake. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *74*(4), 559-568. https://doi.org/10.1007/s13105-018-0622-4

Deatherage, B. L., & Cookson, B. T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea : A conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infection and Immunity*, *80*(6), 1948-1957. https://doi.org/10.1128/IAI.06014-11

DeFuria, J., Belkina, A. C., Jagannathan-Bogdan, M., Snyder-Cappione, J., Carr, J. D., Nersesova, Y. R., Markham, D., Strissel, K. J., Watkins, A. A., Zhu, M., Allen, J., Bouchard, J., Toraldo, G., Jasuja, R., Obin, M. S., McDonnell, M. E., Apovian, C., Denis, G. V., & Nikolajczyk, B. S. (2013). B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(13), 5133-5138. https://doi.org/10.1073/pnas.1215840110

de Jong, J. M. A., Larsson, O., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2015). A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *308*(12), E1085-E1105. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00023.2015

DeMarco, V. G., Aroor, A. R., & Sowers, J. R. (2014). The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. *Nature reviews. Endocrinology*, *10*(6), 364-376. https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.44

de Mutsert, R., & Després, J.-P. (2023). Chapter 1 - Overall, abdominal, and visceral obesity in men and women : An introduction. In H. J. Lamb (Éd.), *Visceral and Ectopic Fat* (p. 3-18). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822186-0.00017-1

de Mutsert, R., Gast, K., Widya, R., de Koning, E., Jazet, I., Lamb, H., le Cessie, S., de Roos, A., Smit, J., Rosendaal, F., & den Heijer, M. (2018). Associations of Abdominal Subcutaneous and Visceral Fat with Insulin Resistance and Secretion Differ Between Men and Women : The

Netherlands Epidemiology of Obesity Study. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, *16*(1), 54-63. https://doi.org/10.1089/met.2017.0128

Deng, Z., Poliakov, A., Hardy, R. W., Clements, R., Liu, C., Liu, Y., Wang, J., Xiang, X., Zhang, S., Zhuang, X., Shah, S. V., Sun, D., Michalek, S., Grizzle, W. E., Garvey, T., Mobley, J., & Zhang, H.-G. (2009). Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. *Diabetes*, *58*(11), 2498-2505. https://doi.org/10.2337/db09-0216

Després, J. P., Moorjani, S., Lupien, P. J., Tremblay, A., Nadeau, A., & Bouchard, C. (1990). Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, *10*(4), 497-511. https://doi.org/10.1161/01.atv.10.4.497

Després, J. P., Nadeau, A., Tremblay, A., Ferland, M., Moorjani, S., Lupien, P. J., Thériault, G., Pinault, S., & Bouchard, C. (1989). Role of deep abdominal fat in the association between regional adipose tissue distribution and glucose tolerance in obese women. *Diabetes*, *38*(3), 304-309. https://doi.org/10.2337/diab.38.3.304

Després, J.-P. (2006). Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Annals of Medicine*, *38*(1), 52-63. https://doi.org/10.1080/07853890500383895

Després, J.-P., Lemieux, I., Bergeron, J., Pibarot, P., Mathieu, P., Larose, E., Rodés-Cabau, J., Bertrand, O. F., & Poirier, P. (2008). Abdominal obesity and the metabolic syndrome : Contribution to global cardiometabolic risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *28*(6), 1039-1049. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.159228

Deurenberg, P., Yap, M., & van Staveren, W. A. (1998). Body mass index and percent body fat : A meta analysis among different ethnic groups. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *22*(12), 1164-1171. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800741

Di Vizio, D., Kim, J., Hager, M. H., Morello, M., Yang, W., Lafargue, C. J., True, L. D., Rubin, M. A., Adam, R. M., Beroukhim, R., Demichelis, F., & Freeman, M. R. (2009). Oncosome formation in prostate cancer : Association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. *Cancer Research*, *69*(13), 5601-5609. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3860

Din-Dzietham, R., Liu, Y., Bielo, M.-V., & Shamsa, F. (2007). High blood pressure trends in children and adolescents in national surveys, 1963 to 2002. *Circulation*, *116*(13), 1488-1496. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.683243

Ding, J., Hsu, F.-C., Harris, T. B., Liu, Y., Kritchevsky, S. B., Szklo, M., Ouyang, P., Espeland, M. A., Lohman, K. K., Criqui, M. H., Allison, M., Bluemke, D. A., & Carr, J. J. (2009). The association of pericardial fat with incident coronary heart disease : The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *The American Journal of Clinical Nutrition*, *90*(3), 499-504. https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27358

Distel, E., Penot, G., Cadoudal, T., Balguy, I., Durant, S., & Benelli, C. (2012). Early induction of a brown-like phenotype by rosiglitazone in the epicardial adipose tissue of fatty Zucker rats. *Biochimie*, *94*(8), 1660-1667. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.04.014

Divoux, A., Moutel, S., Poitou, C., Lacasa, D., Veyrie, N., Aissat, A., Arock, M., Guerre-Millo, M., & Clément, K. (2012). Mast cells in human adipose tissue : Link with morbid obesity, inflammatory status, and diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *97*(9), E1677-1685. https://doi.org/10.1210/jc.2012-1532

Donath, M. Y. (2014). Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes : Time to start. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *13*(6), 465-476. https://doi.org/10.1038/nrd4275

Doubki, E., Lasbleiz, A., Dutour, A., & Gaborit, B. (2023). Le tissu adipeux dans tous ses états : Dernières avancées: The different colours and functions of adipose tissue: what's new? *Nutrition*

Clinique et Métabolisme, *37*(2, Supplement 1), 2S2-2S7. https://doi.org/10.1016/S0985-0562(24)00005-0

Doukbi, E., Ancel, P., Dutour, A., Soghomonian, A., Ahmed, S., Castejon, V., Piperoglou, C., Gariboldi, V., Lenoir, M., Lechevallier, E., Gondran-Tellier, B., Boissier, R., Ebbo, M., Vély, F., & Gaborit, B. (2024). Human epicardial fat has a beige profile and contains higher type 2 innate lymphoid cells than subcutaneous fat. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. https://doi.org/10.1002/oby.24023

Doukbi, E., Soghomonian, A., Sengenès, C., Ahmed, S., Ancel, P., Dutour, A., & Gaborit, B. (2022). Browning Epicardial Adipose Tissue : Friend or Foe? *Cells*, *11*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/cells11060991

Dozio, E., Vianello, E., Briganti, S., Fink, B., Malavazos, A. E., Scognamiglio, E. T., Dogliotti, G., Sigrüener, A., Schmitz, G., & Romanelli, M. M. C. (2014). Increased reactive oxygen species production in epicardial adipose tissues from coronary artery disease patients is associated with brown-to-white adipocyte trans-differentiation. *International Journal of Cardiology*, *174*(2), 413-414. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.04.045

Dozio, E., Vianello, E., Malavazos, A. E., Tacchini, L., Schmitz, G., Iacobellis, G., & Corsi Romanelli, M. M. (2019). Epicardial adipose tissue GLP-1 receptor is associated with genes involved in fatty acid oxidation and white-to-brown fat differentiation : A target to modulate cardiovascular risk? *International Journal of Cardiology*, *292*, 218-224. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.04.039

Drewnowski, A. (2009). Obesity, diets, and social inequalities. *Nutrition Reviews*, *67 Suppl 1*, S36-39. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00157.x

Drewnowski, A., & Specter, S. E. (2004). Poverty and obesity : The role of energy density and energy costs. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(1), 6-16. https://doi.org/10.1093/ajcn/79.1.6

Dutour, A., Abdesselam, I., Ancel, P., Kober, F., Mrad, G., Darmon, P., Ronsin, O., Pradel, V., Lesavre, N., Martin, J. C., Jacquier, A., Lefur, Y., Bernard, M., & Gaborit, B. (2016). Exenatide decreases liver fat content and epicardial adipose tissue in patients with obesity and type 2 diabetes : A prospective randomized clinical trial using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, *18*(9), 882-891. https://doi.org/10.1111/dom.12680

Dutour, A., Achard, V., Sell, H., Naour, N., Collart, F., Gaborit, B., Silaghi, A., Eckel, J., Alessi, M.-C., Henegar, C., & Clément, K. (2010). Secretory type II phospholipase A2 is produced and secreted by epicardial adipose tissue and overexpressed in patients with coronary artery disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *95*(2), 963-967. https://doi.org/10.1210/jc.2009-1222

Eberl, G., Colonna, M., Di Santo, J. P., & McKenzie, A. N. J. (2015). Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells : A new paradigm in immunology. *Science (New York, N.Y.)*, *348*(6237), aaa6566. https://doi.org/10.1126/science.aaa6566

Eguchi, A., Lazic, M., Armando, A. M., Phillips, S. A., Katebian, R., Maraka, S., Quehenberger, O., Sears, D. D., & Feldstein, A. E. (2016). Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *94*(11), 1241-1253. https://doi.org/10.1007/s00109-016-1446-8

Eiras, S., Teijeira-Fernández, E., Salgado-Somoza, A., Couso, E., García-Caballero, T., Sierra, J., & Juanatey, J. R. G. (2010). Relationship between epicardial adipose tissue adipocyte size and MCP-1 expression. *Cytokine*, *51*(2), 207-212. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.05.009

Eisenbarth, S. C. (2019). Dendritic cell subsets in T cell programming : Location dictates function. *Nature Reviews. Immunology*, *19*(2), 89-103. https://doi.org/10.1038/s41577-018-0088-1

Eisenberg, S., Gavish, D., Oschry, Y., Fainaru, M., & Deckelbaum, R. J. (1984). Abnormalities in very low, low and high density lipoproteins in hypertriglyceridemia. Reversal toward normal with bezafibrate treatment. *The Journal of Clinical Investigation*, *74*(2), 470-482. https://doi.org/10.1172/JCI111444

Eken, A., Yetkin, M. F., Vural, A., Okus, F. Z., Erdem, S., Azizoglu, Z. B., Haliloglu, Y., Cakir, M., Turkoglu, E. M., Kilic, O., Kara, I., Dönmez Altuntaş, H., Oukka, M., Kutuk, M. S., Mirza, M., & Canatan, H. (2019). Fingolimod Alters Tissue Distribution and Cytokine Production of Human and Murine Innate Lymphoid Cells. *Frontiers in Immunology*, *10*, 217. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00217

Emerging Risk Factors Collaboration, Wormser, D., Kaptoge, S., Di Angelantonio, E., Wood, A. M., Pennells, L., Thompson, A., Sarwar, N., Kizer, J. R., Lawlor, D. A., Nordestgaard, B. G., Ridker, P., Salomaa, V., Stevens, J., Woodward, M., Sattar, N., Collins, R., Thompson, S. G., Whitlock, G., & Danesh, J. (2011). Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease : Collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet (London, England)*, *377*(9771), 1085-1095. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60105-0

Emorine, L. J., Marullo, S., Briend-Sutren, M. M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C., & Strosberg, A. D. (1989). Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science (New York, N.Y.)*, *245*(4922), 1118-1121. https://doi.org/10.1126/science.2570461

Engelbertsen, D., Foks, A. C., Alberts-Grill, N., Kuperwaser, F., Chen, T., Lederer, J. A., Jarolim, P., Grabie, N., & Lichtman, A. H. (2015). Expansion of CD25+ Innate Lymphoid Cells Reduces Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *35*(12), 2526-2535. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306048

Enterome—Microbiome decoded · Healthcare transformed. (s. d.). Enterome. Consulté 19 septembre 2023, à l'adresse https://www.enterome.com/

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. (2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, *285*(19), 2486-2497. https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486

Faaborg-Andersen, C. C., Liu, C., Subramaniyam, V., Desai, S. R., Sun, Y. V., Wilson, P. W. F., Sperling, L. S., & Quyyumi, A. A. (2023). U-shaped relationship between apolipoprotein A1 levels and mortality risk in men and women. *European Journal of Preventive Cardiology*, *30*(4), 293-304. https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwac263

Fahed, G., Aoun, L., Bou Zerdan, M., Allam, S., Bou Zerdan, M., Bouferraa, Y., & Assi, H. I. (2022). Metabolic Syndrome : Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(2), 786. https://doi.org/10.3390/ijms23020786

Fain, J. N., Sacks, H. S., Bahouth, S. W., Tichansky, D. S., Madan, A. K., & Cheema, P. S. (2010). Human epicardial adipokine messenger RNAs : Comparisons of their expression in substernal, subcutaneous, and omental fat. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *59*(9), 1379-1386. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.12.027

Feijóo-Bandín, S., Aragón-Herrera, A., Moraña-Fernández, S., Anido-Varela, L., Tarazón, E., Roselló-Lletí, E., Portolés, M., Moscoso, I., Gualillo, O., González-Juanatey, J. R., & Lago, F. (2020). Adipokines and Inflammation : Focus on Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(20), 7711. https://doi.org/10.3390/ijms21207711

Ferrante, S. C., Nadler, E. P., Pillai, D. K., Hubal, M. J., Wang, Z., Wang, J. M., Gordish-Dressman, H., Koeck, E., Sevilla, S., Wiles, A. A., & Freishtat, R. J. (2015). Adipocyte-derived exosomal

miRNAs : A novel mechanism for obesity-related disease. *Pediatric Research*, *77*(3), 447-454. https://doi.org/10.1038/pr.2014.202

Ferrari, R. (1999). The role of TNF in cardiovascular disease. *Pharmacological Research*, *40*(2), 97-105. https://doi.org/10.1006/phrs.1998.0463

Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A. B., Benoist, C., Shoelson, S., & Mathis, D. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature Medicine*, *15*(8), 930-939. https://doi.org/10.1038/nm.2002

Fève, B., Cinti, S., Beaupère, C., Vatier, C., Vigouroux, C., Vali, A., Capeau, J., Grosfeld, A., & Moldes, M. (2024). Pink adipose tissue : A paradigm of adipose tissue plasticity. *Annales D'endocrinologie*, *85*(3), 248-251. https://doi.org/10.1016/j.ando.2024.05.004

Finlin, B. S., Memetimin, H., Zhu, B., Confides, A. L., Vekaria, H. J., El Khouli, R. H., Johnson, Z. R., Westgate, P. M., Chen, J., Morris, A. J., Sullivan, P. G., Dupont-Versteegden, E. E., & Kern, P. A. (2020). The β3-adrenergic receptor agonist mirabegron improves glucose homeostasis in obese humans. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(5), 2319-2331. https://doi.org/10.1172/JCI134892

Fioranelli, M., Bottaccioli, A. G., Bottaccioli, F., Bianchi, M., Rovesti, M., & Roccia, M. G. (2018). Stress and Inflammation in Coronary Artery Disease : A Review Psychoneuroendocrineimmunology-Based. *Frontiers in Immunology*, *9*, 2031. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02031

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., Shin, A. C., Divanovic, S., Brombacher, F., Glasmacher, E., Keipert, S., Jastroch, M., Nagler, J., Schramm, K.-W., Medrikova, D., … Buettner, C. (2017). Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nature Medicine*, *23*(5), 623-630. https://doi.org/10.1038/nm.4316

Flaherty, S. E., Grijalva, A., Xu, X., Ables, E., Nomani, A., & Ferrante, A. W. (2019). A lipase-independent pathway of lipid release and immune modulation by adipocytes. *Science (New York, N.Y.)*, *363*(6430), 989-993. https://doi.org/10.1126/science.aaw2586

Floris, I., Kraft, J. D., & Altosaar, I. (2016). Roles of MicroRNA across Prenatal and Postnatal Periods. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(12), 1994. https://doi.org/10.3390/ijms17121994

Fontbonne, A., Currie, A., Tounian, P., Picot, M.-C., Foulatier, O., Nedelcu, M., & Nocca, D. (2023). Prevalence of Overweight and Obesity in France : The 2020 Obepi-Roche Study by the « Ligue Contre l'Obésité ». *Journal of Clinical Medicine*, *12*(3), 925. https://doi.org/10.3390/jcm12030925

Forbes, G. B., & Halloran, E. (1976). The adult decline in lean body mass. *Human Biology*, *48*(1), 161-173.

Freeman, A. M., Acevedo, L. A., & Pennings, N. (2024). Insulin Resistance. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507839/

Frontini, A., Vitali, A., Perugini, J., Murano, I., Romiti, C., Ricquier, D., Guerrieri, M., & Cinti, S. (2013). White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1831*(5), 950-959. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.02.005

Frustaci, A., Chimenti, C., Bellocci, F., Morgante, E., Russo, M. A., & Maseri, A. (1997). Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation*, *96*(4), 1180-1184. https://doi.org/10.1161/01.cir.96.4.1180

Fujimoto, W. Y., Bergstrom, R. W., Boyko, E. J., Chen, K. W., Leonetti, D. L., Newell-Morris, L., Shofer, J. B., & Wahl, P. W. (1999). Visceral adiposity and incident coronary heart disease in Japanese-American men. The 10-year follow-up results of the Seattle Japanese-American Community Diabetes Study. *Diabetes Care*, *22*(11), 1808-1812. https://doi.org/10.2337/diacare.22.11.1808

Fujioka, S., Matsuzawa, Y., Tokunaga, K., & Tarui, S. (1987). Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *36*(1), 54-59. https://doi.org/10.1016/0026-0495(87)90063-1

Fuster, J. J., Ouchi, N., Gokce, N., & Walsh, K. (2016). Obesity-induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circulation research*, *118*(11), 1786-1807. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306885

Gaborit, B. (2021). *Obésité et maladies cardiovasculaires* (p. 263-267). https://doi.org/10.1016/B978-2-294-76753-1.00049-7

Gaborit, B., Abdesselam, I., & Dutour, A. (2013). Epicardial fat : More than just an « epi » phenomenon? *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, *45*(13), 991-1001. https://doi.org/10.1055/s-0033-1358669

Gaborit, B., Kober, F., Jacquier, A., Moro, P. J., Flavian, A., Quilici, J., Cuisset, T., Simeoni, U., Cozzone, P., Alessi, M.-C., Clément, K., Bernard, M., & Dutour, A. (2012). Epicardial fat volume is associated with coronary microvascular response in healthy subjects : A pilot study. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *20*(6), 1200-1205. https://doi.org/10.1038/oby.2011.283

Gaborit, B., Sengenes, C., Ancel, P., Jacquier, A., & Dutour, A. (2017). Role of Epicardial Adipose Tissue in Health and Disease : A Matter of Fat? *Comprehensive Physiology*, *7*(3), 1051-1082. https://doi.org/10.1002/cphy.c160034

Gaborit, B., Venteclef, N., Ancel, P., Pelloux, V., Gariboldi, V., Leprince, P., Amour, J., Hatem, S. N., Jouve, E., Dutour, A., & Clément, K. (2015). Human epicardial adipose tissue has a specific transcriptomic signature depending on its anatomical peri-atrial, peri-ventricular, or peri-coronary location. *Cardiovascular Research*, *108*(1), 62-73. https://doi.org/10.1093/cvr/cvv208

Gabrielsson, B. G., Olofsson, L. E., Sjögren, A., Jernås, M., Elander, A., Lönn, M., Rudemo, M., & Carlsson, L. M. S. (2005). Evaluation of reference genes for studies of gene expression in human adipose tissue. *Obesity Research*, *13*(4), 649-652. https://doi.org/10.1038/oby.2005.72

Galassi, A., Reynolds, K., & He, J. (2006). Metabolic Syndrome and Risk of Cardiovascular Disease : A Meta-Analysis. *The American Journal of Medicine*, *119*(10), 812-819. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.02.031

Galle-Treger, L., Sankaranarayanan, I., Hurrell, B. P., Howard, E., Lo, R., Maazi, H., Lewis, G., Banie, H., Epstein, A. L., Hu, P., Rehan, V. K., Gilliland, F. D., Allayee, H., Soroosh, P., Sharpe, A. H., & Akbari, O. (2019). Costimulation of type-2 innate lymphoid cells by GITR promotes effector function and ameliorates type 2 diabetes. *Nature Communications*, *10*(1), 713. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08449-x

Garcia, R. A., Roemmich, J. N., & Claycombe, K. J. (2016). Evaluation of markers of beige adipocytes in white adipose tissue of the mouse. *Nutrition & Metabolism*, *13*(1), 24. https://doi.org/10.1186/s12986-016-0081-2

Gasteiger, G., Fan, X., Dikiy, S., Lee, S. Y., & Rudensky, A. Y. (2015). Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science (New York, N.Y.)*, *350*(6263), 981-985. https://doi.org/10.1126/science.aac9593

GBD 2015 Obesity Collaborators, Afshin, A., Forouzanfar, M. H., Reitsma, M. B., Sur, P., Estep, K., Lee, A., Marczak, L., Mokdad, A. H., Moradi-Lakeh, M., Naghavi, M., Salama, J. S., Vos, T., Abate, K. H., Abbafati, C., Ahmed, M. B., Al-Aly, Z., Alkerwi, A., Al-Raddadi, R., …

Murray, C. J. L. (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *The New England Journal of Medicine*, *377*(1), 13-27. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614362

GBD 2021 Diabetes Collaborators. (2023). Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050 : A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet (London, England)*, *402*(10397), 203-234. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01301-6

Géminard, C., De Gassart, A., Blanc, L., & Vidal, M. (2004). Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *5*(3), 181-193. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.0167.x

Gesta, S., Tseng, Y.-H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental origin of fat : Tracking obesity to its source. *Cell*, *131*(2), 242-256. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.004

Ghandour, R. A., Colson, C., Giroud, M., Maurer, S., Rekima, S., Ailhaud, G., Klingenspor, M., Amri, E.-Z., & Pisani, D. F. (2018). Impact of dietary ω3 polyunsaturated fatty acid supplementation on brown and brite adipocyte function. *Journal of Lipid Research*, *59*(3), 452-461. https://doi.org/10.1194/jlr.M081091

Ghorbani, M., Claus, T. H., & Himms-Hagen, J. (1997). Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist. *Biochemical Pharmacology*, *54*(1), 121-131. https://doi.org/10.1016/s0006-2952(97)00162-7

Ghorbani, M., & Himms-Hagen, J. (1997). Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL 316,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker fa/fa rats. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *21*(6), 465-475. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800432

Gierach, M., Gierach, J., Ewertowska, M., Arndt, A., & Junik, R. (2014). Correlation between Body Mass Index and Waist Circumference in Patients with Metabolic Syndrome. *ISRN Endocrinology*, *2014*, 514589. https://doi.org/10.1155/2014/514589

Global BMI Mortality Collaboration, null, Di Angelantonio, E., Bhupathiraju, S., Wormser, D., Gao, P., Kaptoge, S., Berrington de Gonzalez, A., Cairns, B., Huxley, R., Jackson, C., Joshy, G., Lewington, S., Manson, J., Murphy, N., Patel, A., Samet, J., Woodward, M., Zheng, W., Zhou, M., … Hu, F. (2016). Body-mass index and all-cause mortality : Individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet (London, England)*, *388*(10046), 776-786. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30175-1

González, N., Moreno-Villegas, Z., González-Bris, A., Egido, J., & Lorenzo, Ó. (2017). Regulation of visceral and epicardial adipose tissue for preventing cardiovascular injuries associated to obesity and diabetes. *Cardiovascular Diabetology*, *16*(1), 44. https://doi.org/10.1186/s12933-017-0528-4

González-Muniesa, P., Mártinez-González, M.-A., Hu, F. B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., Moreno, L. A., Bray, G. A., & Martinez, J. A. (2017). Obesity. *Nature Reviews. Disease Primers*, *3*, 17034. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34

Goodpaster, B. H., Thaete, F. L., Simoneau, J. A., & Kelley, D. E. (1997). Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes*, *46*(10), 1579-1585. https://doi.org/10.2337/diacare.46.10.1579

Goossens, G. H. (2017). The Metabolic Phenotype in Obesity : Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obesity Facts*, *10*(3), 207-215. https://doi.org/10.1159/000471488

Greif, M., Becker, A., von Ziegler, F., Lebherz, C., Lehrke, M., Broedl, U. C., Tittus, J., Parhofer, K., Becker, C., Reiser, M., Knez, A., & Leber, A. W. (2009). Pericardial adipose tissue determined by dual source CT is a risk factor for coronary atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(5), 781-786. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.180653

Grün, F., Watanabe, H., Zamanian, Z., Maeda, L., Arima, K., Cubacha, R., Gardiner, D. M., Kanno, J., Iguchi, T., & Blumberg, B. (2006). Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *20*(9), 2141-2155. https://doi.org/10.1210/me.2005-0367

Gruzdeva, O., Uchasova, E., Dyleva, Y., Borodkina, D., Akbasheva, O., Antonova, L., Matveeva, V., Belik, E., Ivanov, S., Sotnikov, A., Kozyrin, K., Brel, N., Sinitsky, M., Karetnikova, V., Kokov, A., Bychkova, E., Pecherina, T., & Barbarash, O. (2019). Adipocytes Directly Affect Coronary Artery Disease Pathogenesis via Induction of Adipokine and Cytokine Imbalances. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2163. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02163

Gruzdeva, O. V., Akbasheva, O. E., Dyleva, Y. A., Antonova, L. V., Matveeva, V. G., Uchasova, E. G., Fanaskova, E. V., Karetnikova, V. N., Ivanov, S. V., & Barbarash, O. L. (2017). Adipokine and Cytokine Profiles of Epicardial and Subcutaneous Adipose Tissue in Patients with Coronary Heart Disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *163*(5), 608-611. https://doi.org/10.1007/s10517-017-3860-5

Guh, D. P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C. L., & Anis, A. H. (2009). The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight : A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, *9*, 88. https://doi.org/10.1186/1471-2458-9-88

Guilherme, A., Pedersen, D. J., Henchey, E., Henriques, F. S., Danai, L. V., Shen, Y., Yenilmez, B., Jung, D., Kim, J. K., Lodhi, I. J., Semenkovich, C. F., & Czech, M. P. (2017). Adipocyte lipid synthesis coupled to neuronal control of thermogenic programming. *Molecular Metabolism*, *6*(8), 781-796. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.05.012

Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V., & Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(5), 367-377. https://doi.org/10.1038/nrm2391

Guo, S., Zhang, Q., Guo, Y., Yin, X., Zhang, P., Mao, T., Tian, Z., & Li, X. (2025). The role and therapeutic targeting of the CCL2/CCR2 signaling axis in inflammatory and fibrotic diseases. *Frontiers in Immunology*, *15*, 1497026. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1497026

Gupta, M. K., Gouda, G., & Vadde, R. (2024). Relation Between Obesity and Type 2 Diabetes : Evolutionary Insights, Perspectives and Controversies. *Current Obesity Reports*, *13*(3), 475-495. https://doi.org/10.1007/s13679-024-00572-1

Gurses, K. M., Ozmen, F., Kocyigit, D., Yersal, N., Bilgic, E., Kaya, E., Kopru, C. Z., Soyal, T., Doganci, S., Tokgozoglu, L., & Korkusuz, P. (2017). Netrin-1 is associated with macrophage infiltration and polarization in human epicardial adipose tissue in coronary artery disease. *Journal of Cardiology*, *69*(6), 851-858. https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2016.08.016

Gustafson, B., & Smith, U. (2015). Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, *241*(1), 27-35. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.812

Guzik, T. J., Skiba, D. S., Touyz, R. M., & Harrison, D. G. (2017). The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovascular Research*, *113*(9), 1009-1023. https://doi.org/10.1093/cvr/cvx108

Halberg, N., Khan, T., Trujillo, M. E., Wernstedt-Asterholm, I., Attie, A. D., Sherwani, S., Wang, Z. V., Landskroner-Eiger, S., Dineen, S., Magalang, U. J., Brekken, R. A., & Scherer, P. E. (2009). Hypoxia-Inducible Factor 1α Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose

Tissue. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(16), 4467-4483. https://doi.org/10.1128/MCB.00192-09

Hall, J. E., do Carmo, J. M., da Silva, A. A., Wang, Z., & Hall, M. E. (2015). Obesity-induced hypertension : Interaction of neurohumoral and renal mechanisms. *Circulation Research*, *116*(6), 991-1006. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305697

Hammad, H., Debeuf, N., Aegerter, H., Brown, A. S., & Lambrecht, B. N. (2022). Emerging Paradigms in Type 2 Immunity. *Annual Review of Immunology*, *40*, 443-467. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101320-030339

Hardie, D. G., Carling, D., & Carlson, M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily : Metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annual Review of Biochemistry*, *67*, 821-855. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.821

Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1984). Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes : Demonstration of a pathway for receptor shedding. *European Journal of Cell Biology*, *35*(2), 256-263.

Hardy, O. T., Perugini, R. A., Nicoloro, S. M., Gallagher-Dorval, K., Puri, V., Straubhaar, J., & Czech, M. P. (2011). Body mass index-independent inflammation in omental adipose tissue associated with insulin resistance in morbid obesity. *Surgery for Obesity and Related Diseases: Official Journal of the American Society for Bariatric Surgery*, *7*(1), 60-67. https://doi.org/10.1016/j.soard.2010.05.013

Harms, M., & Seale, P. (2013). Brown and beige fat : Development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*, *19*(10), 1252-1263. https://doi.org/10.1038/nm.3361

Hartwig, S., De Filippo, E., Göddeke, S., Knebel, B., Kotzka, J., Al-Hasani, H., Roden, M., Lehr, S., & Sell, H. (2019). Exosomal proteins constitute an essential part of the human adipose tissue secretome. *Biochimica Et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*, *1867*(12), 140172. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.11.009

Hatch, E. E., Nelson, J. W., Qureshi, M. M., Weinberg, J., Moore, L. L., Singer, M., & Webster, T. F. (2008). Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference : A cross-sectional study of NHANES data, 1999-2002. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, *7*, 27. https://doi.org/10.1186/1476-069X-7-27

Hatem, S. N., Redheuil, A., & Gandjbakhch, E. (2016). Cardiac adipose tissue and atrial fibrillation : The perils of adiposity. *Cardiovascular Research*, *109*(4), 502-509. https://doi.org/10.1093/cvr/cvw001

Hatem, S. N., & Sanders, P. (2014). Epicardial adipose tissue and atrial fibrillation. *Cardiovascular Research*, *102*(2), 205-213. https://doi.org/10.1093/cvr/cvu045

Hawari, F. I., Rouhani, F. N., Cui, X., Yu, Z.-X., Buckley, C., Kaler, M., & Levine, S. J. (2004). Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles : A mechanism for generation of soluble cytokine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(5), 1297-1302. https://doi.org/10.1073/pnas.0307981100

Heid, I. M., Jackson, A. U., Randall, J. C., Winkler, T. W., Qi, L., Steinthorsdottir, V., Thorleifsson, G., Zillikens, M. C., Speliotes, E. K., Mägi, R., Workalemahu, T., White, C. C., Bouatia-Naji, N., Harris, T. B., Berndt, S. I., Ingelsson, E., Willer, C. J., Weedon, M. N., Luan, J., … Lindgren, C. M. (2010). Meta-analysis identifies 13 new loci associated with waist-hip ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution. *Nature Genetics*, *42*(11), 949-960. https://doi.org/10.1038/ng.685

Heindel, J. J., Vom Saal, F. S., Blumberg, B., Bovolin, P., Calamandrei, G., Ceresini, G., Cohn, B. A., Fabbri, E., Gioiosa, L., Kassotis, C., Legler, J., La Merrill, M., Rizzir, L., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M. A., Montanini, L., Molteni, L., Nagel, S. C., … Palanza, P. (2015).

Parma consensus statement on metabolic disruptors. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, *14*, 54. https://doi.org/10.1186/s12940-015-0042-7

Hell, M. M., Ding, X., Rubeaux, M., Slomka, P., Gransar, H., Terzopoulos, D., Hayes, S., Marwan, M., Achenbach, S., Berman, D. S., & Dey, D. (2016). Epicardial adipose tissue volume but not density is an independent predictor for myocardial ischemia. *Journal of Cardiovascular Computed Tomography*, *10*(2), 141-149. https://doi.org/10.1016/j.jcct.2016.01.009

Herrera, B. M., Keildson, S., & Lindgren, C. M. (2011). Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas*, *69*(1), 41-49. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.02.018

Higgins, M., Kannel, W., Garrison, R., Pinsky, J., & Stokes, J. (1988). Hazards of obesity—The Framingham experience. *Acta Medica Scandinavica. Supplementum*, *723*, 23-36. https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1987.tb05925.x

Hildreth, A. D., Ma, F., Wong, Y. Y., Sun, R., Pellegrini, M., & O'Sullivan, T. E. (2021a). Single-cell sequencing of human white adipose tissue identifies new cell states in health and obesity. *Nature Immunology*, *22*(5), 639-653. https://doi.org/10.1038/s41590-021-00922-4

Hildreth, A. D., Ma, F., Wong, Y. Y., Sun, R., Pellegrini, M., & O'Sullivan, T. E. (2021b). Single-cell sequencing of human white adipose tissue identifies new cell states in health and obesity. *Nature Immunology*, *22*(5), 639-653. https://doi.org/10.1038/s41590-021-00922-4

Hill, D. A., Lim, H.-W., Kim, Y. H., Ho, W. Y., Foong, Y. H., Nelson, V. L., Nguyen, H. C. B., Chegireddy, K., Kim, J., Habertheuer, A., Vallabhajosyula, P., Kambayashi, T., Won, K.-J., & Lazar, M. A. (2018). Distinct macrophage populations direct inflammatory versus physiological changes in adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(22), E5096-E5105. https://doi.org/10.1073/pnas.1802611115

Hills, A. P., Andersen, L. B., & Byrne, N. M. (2011). Physical activity and obesity in children. *British Journal of Sports Medicine*, *45*(11), 866-870. https://doi.org/10.1136/bjsports-2011-090199

Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *279*(3), C670-681. https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.3.C670

Hirata, T., & Narumiya, S. (2012). Prostanoids as regulators of innate and adaptive immunity. *Advances in Immunology*, *116*, 143-174. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394300-2.00005-3

Hirata, Y., Kurobe, H., Akaike, M., Chikugo, F., Hori, T., Bando, Y., Nishio, C., Higashida, M., Nakaya, Y., Kitagawa, T., & Sata, M. (2011). Enhanced inflammation in epicardial fat in patients with coronary artery disease. *International Heart Journal*, *52*(3), 139-142. https://doi.org/10.1536/ihj.52.139

Hirata, Y., Tabata, M., Kurobe, H., Motoki, T., Akaike, M., Nishio, C., Higashida, M., Mikasa, H., Nakaya, Y., Takanashi, S., Igarashi, T., Kitagawa, T., & Sata, M. (2011). Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. *Journal of the American College of Cardiology*, *58*(3), 248-255. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.01.048

Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (New York, N.Y.)*, *259*(5091), 87-91. https://doi.org/10.1126/science.7678183

Hu, F. B., Li, T. Y., Colditz, G. A., Willett, W. C., & Manson, J. E. (2003). Television watching and other sedentary behaviors in relation to risk of obesity and type 2 diabetes mellitus in women. *JAMA*, *289*(14), 1785-1791. https://doi.org/10.1001/jama.289.14.1785

Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C. G., & Willett, W. C. (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *The New England Journal of Medicine*, *345*(11), 790-797. https://doi.org/10.1056/NEJMoa010492

Hu, G., Jousilahti, P., Antikainen, R., Katzmarzyk, P. T., & Tuomilehto, J. (2010). Joint effects of physical activity, body mass index, waist circumference, and waist-to-hip ratio on the risk of heart failure. *Circulation*, *121*(2), 237-244. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.887893

Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, *2*(5-6), 231-237. https://doi.org/10.1242/dmm.001180

Huang, Z., & Xu, A. (2021). Adipose Extracellular Vesicles in Intercellular and Inter-Organ Crosstalk in Metabolic Health and Diseases. *Frontiers in Immunology*, *12*, 608680. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.608680

Huang, Z., Zhong, L., Lee, J. T. H., Zhang, J., Wu, D., Geng, L., Wang, Y., Wong, C.-M., & 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*(3), 493-508.e4. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.003

Hurley, J. H. (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Current Opinion in Cell Biology*, *20*(1), 4-11. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.12.002

Huttunen, P., Hirvonen, J., & Kinnula, V. (1981). The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, *46*(4), 339-345. https://doi.org/10.1007/BF00422121

Iacobellis, G. (2014). Epicardial adipose tissue in endocrine and metabolic diseases. *Endocrine*, *46*(1), 8-15. https://doi.org/10.1007/s12020-013-0099-4

Iacobellis, G. (2021). Aging Effects on Epicardial Adipose Tissue. *Frontiers in Aging*, *2*, 12. https://doi.org/10.3389/fragi.2021.666260

Iacobellis, G., & Bianco, A. C. (2011). Epicardial adipose tissue : Emerging physiological, pathophysiological and clinical features. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *22*(11), 450-457. https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.07.003

Iacobellis, G., Corradi, D., & Sharma, A. M. (2005). Epicardial adipose tissue : Anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine*, *2*(10), 536-543. https://doi.org/10.1038/ncpcardio0319

Iacobellis, G., Leonetti, F., Singh, N., & M Sharma, A. (2007). Relationship of epicardial adipose tissue with atrial dimensions and diastolic function in morbidly obese subjects. *International Journal of Cardiology*, *115*(2), 272-273. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.04.016

Iacobellis, G., Ribaudo, M. C., Zappaterreno, A., Iannucci, C. V., & Leonetti, F. (2004). Relation between epicardial adipose tissue and left ventricular mass. *The American Journal of Cardiology*, *94*(8), 1084-1087. https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.06.075

Iacobini, C., Pugliese, G., Blasetti Fantauzzi, C., Federici, M., & Menini, S. (2019). Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *92*, 51-60. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.009

Ikeda, K., Kang, Q., Yoneshiro, T., Camporez, J. P., Maki, H., Homma, M., Shinoda, K., Chen, Y., Lu, X., Maretich, P., Tajima, K., Ajuwon, K. M., Soga, T., & Kajimura, S. (2017). UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nature Medicine*, *23*(12), 1454-1465. https://doi.org/10.1038/nm.4429

Inagaki, T., Sakai, J., & Kajimura, S. (2016). Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *17*(8), 480-495. https://doi.org/10.1038/nrm.2016.62

Ishibashi, J., & Seale, P. (2010). Medicine. Beige can be slimming. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5982), 1113-1114. https://doi.org/10.1126/science.1190816

Ivanov, S., Merlin, J., Lee, M. K. S., Murphy, A. J., & Guinamard, R. R. (2018). Biology and function of adipose tissue macrophages, dendritic cells and B cells. *Atherosclerosis*, *271*, 102-110. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.01.018

Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression : How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, *33 Suppl*, 245-254. https://doi.org/10.1038/ng1089

Jaitin, D. A., Adlung, L., Thaiss, C. A., Weiner, A., Li, B., Descamps, H., Lundgren, P., Bleriot, C., Liu, Z., Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., David, E., Zmora, N., Shibolet, O., Hill, D. A., Colonna, M., Lazar, M. A., Ginhoux, F., Shapiro, H., … Amit, I. (2019). Lipid-associated macrophages control metabolic homeostasis in a Trem2-dependent manner. *Cell*, *178*(3), 686-698.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.054

Jimenez, M., Barbatelli, G., Allevi, R., Cinti, S., Seydoux, J., Giacobino, J.-P., Muzzin, P., & Preitner, F. (2003). Beta 3-adrenoceptor knockout in C57BL/6J mice depresses the occurrence of brown adipocytes in white fat. *European Journal of Biochemistry*, *270*(4), 699-705. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03422.x

Johnson, R. J., Sánchez-Lozada, L. G., Nakagawa, T., Rodriguez-Iturbe, B., Tolan, D., Gaucher, E. A., Andrews, P., & Lanaspa, M. A. (2022). Do Thrifty Genes Exist? Revisiting Uricase. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *30*(10), 1917-1926. https://doi.org/10.1002/oby.23540

Jung, Y. J., Kim, H. K., Cho, Y., Choi, J. S., Woo, C. H., Lee, K. S., Sul, J. H., Lee, C. M., Han, J., Park, J. H., Jo, D.-G., & Cho, Y. W. (2020). Cell reprogramming using extracellular vesicles from differentiating stem cells into white/beige adipocytes. *Science Advances*, *6*(13), eaay6721. https://doi.org/10.1126/sciadv.aay6721

Kajimura, S., Spiegelman, B. M., & Seale, P. (2015). Brown and Beige Fat : Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metabolism*, *22*(4), 546-559. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.007

Kalra, H., Drummen, G. P. C., & Mathivanan, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles : Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2), 170. https://doi.org/10.3390/ijms17020170

Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., & Kasuga, M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*(6), 1494-1505. https://doi.org/10.1172/JCI26498

Karastergiou, K., Evans, I., Ogston, N., Miheisi, N., Nair, D., Kaski, J.-C., Jahangiri, M., & Mohamed-Ali, V. (2010). Epicardial adipokines in obesity and coronary artery disease induce atherogenic changes in monocytes and endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *30*(7), 1340-1346. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.204719

Karelis, A. D., Brochu, M., & Rabasa-Lhoret, R. (2004). Can we identify metabolically healthy but obese individuals (MHO)? *Diabetes & Metabolism*, *30*(6), 569-572. https://doi.org/10.1016/s1262-3636(07)70156-8

Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *320*(3), C375-C391. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020

Kazemi, T., Sharifzadeh, G., Zarban, A., & Fesharakinia, A. (2013). Comparison of components of metabolic syndrome in premature myocardial infarction in an Iranian population : A case -control study. *International Journal of Preventive Medicine*, *4*(1), 110-114.

Kenchaiah, S., Evans, J. C., Levy, D., Wilson, P. W. F., Benjamin, E. J., Larson, M. G., Kannel, W. B., & Vasan, R. S. (2002). Obesity and the risk of heart failure. *The New England Journal of Medicine*, *347*(5), 305-313. https://doi.org/10.1056/NEJMoa020245

Kennedy, N. A., Walker, A. W., Berry, S. H., Duncan, S. H., Farquarson, F. M., Louis, P., Thomson, J. M., UK IBD Genetics Consortium, Satsangi, J., Flint, H. J., Parkhill, J., Lees, C. W., & Hold, G. L. (2014). The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing. *PloS One*, *9*(2), e88982. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088982

Kilpeläinen, T. O., Zillikens, M. C., Stančákova, A., Finucane, F. M., Ried, J. S., Langenberg, C., Zhang, W., Beckmann, J. S., Luan, J., Vandenput, L., Styrkarsdottir, U., Zhou, Y., Smith, A. V., Zhao, J.-H., Amin, N., Vedantam, S., Shin, S.-Y., Haritunians, T., Fu, M., … Loos, R. J. F. (2011). Genetic variation near IRS1 associates with reduced adiposity and an impaired metabolic profile. *Nature Genetics*, *43*(8), 753-760. https://doi.org/10.1038/ng.866

Kim, J.-Y., van de Wall, E., Laplante, M., Azzara, A., Trujillo, M. E., Hofmann, S. M., Schraw, T., Durand, J. L., Li, H., Li, G., Jelicks, L. A., Mehler, M. F., Hui, D. Y., Deshaies, Y., Shulman, G. I., Schwartz, G. J., & Scherer, P. E. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(9), 2621-2637. https://doi.org/10.1172/JCI31021

Kim, M., Goto, T., Yu, R., Uchida, K., Tominaga, M., Kano, Y., Takahashi, N., & Kawada, T. (2015). Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Scientific Reports*, *5*(1), 18013. https://doi.org/10.1038/srep18013

Kim, M. J., Barouki, R., & Chevalier, N. (2021). Chapitre 21—Polluants, perturbateurs endocriniens et obésité. In J.-M. Lecerf, K. Clément, S. Czernichow, M. Laville, J.-M. Oppert, F. Pattou, & O. Ziegler (Éds.), *Les Obésités* (p. 109-114). Elsevier Masson. https://doi.org/10.1016/B978-2-294-76753-1.00021-7

Kim, Y. D., Kim, Y. H., Cho, Y. M., Kim, D. K., Ahn, S. W., Lee, J. M., Chanda, D., Shong, M., Lee, C. H., & Choi, H. S. (2012). Metformin ameliorates IL-6-induced hepatic insulin resistance via induction of orphan nuclear receptor small heterodimer partner (SHP) in mouse models. *Diabetologia*, *55*(5), 1482-1494. https://doi.org/10.1007/s00125-012-2494-4

Kimura, H., Nagoshi, T., Oi, Y., Yoshii, A., Tanaka, Y., Takahashi, H., Kashiwagi, Y., Tanaka, T. D., & Yoshimura, M. (2021). Treatment with atrial natriuretic peptide induces adipose tissue browning and exerts thermogenic actions in vivo. *Scientific Reports*, *11*(1), 17466. https://doi.org/10.1038/s41598-021-96970-9

Klein, M., & Varga, I. (2018). Microenvironment of Immune Cells Within the Visceral Adipose Tissue Sensu Lato vs. Epicardial Adipose Tissue : What Do We Know? *Inflammation*, *41*(4), 1142-1156. https://doi.org/10.1007/s10753-018-0798-3

Klingenspor, M., Herzig, S., & Pfeifer, A. (2012). Brown fat develops a brite future. *Obesity Facts*, *5*(6), 890-896. https://doi.org/10.1159/000346337

Klose, C. S. N., Flach, M., Möhle, L., Rogell, L., Hoyler, T., Ebert, K., Fabiunke, C., Pfeifer, D., Sexl, V., Fonseca-Pereira, D., Domingues, R. G., Veiga-Fernandes, H., Arnold, S. J., Busslinger, M., Dunay, I. R., Tanriver, Y., & Diefenbach, A. (2014). Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell*, *157*(2), 340-356. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.030

Knutson, K. L. (2010). Sleep duration and cardiometabolic risk : A review of the epidemiologic evidence. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, *24*(5), 731-743. https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.07.001

Knutson, K. L., & Van Cauter, E. (2008). Associations between sleep loss and increased risk of obesity and diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1129*, 287-304. https://doi.org/10.1196/annals.1417.033

Koentges, C., König, A., Pfeil, K., Hölscher, M. E., Schnick, T., Wende, A. R., Schrepper, A., Cimolai, M. C., Kersting, S., Hoffmann, M. M., Asal, J., Osterholt, M., Odening, K. E., Doenst, T., Hein, L., Abel, E. D., Bode, C., & Bugger, H. (2015). Myocardial mitochondrial dysfunction in mice lacking adiponectin receptor 1. *Basic Research in Cardiology*, *110*(4), 37. https://doi.org/10.1007/s00395-015-0495-4

Kohlgruber, A. C., Gal-Oz, S. T., LaMarche, N. M., Shimazaki, M., Duquette, D., Koay, H.-F., Nguyen, H. N., Mina, A. I., Paras, T., Tavakkoli, A., von Andrian, U., Uldrich, A. P., Godfrey, D. I., Banks, A. S., Shay, T., Brenner, M. B., & Lynch, L. (2018). Γδ T cells producing interleukin-17A regulate adipose regulatory T cell homeostasis and thermogenesis. *Nature Immunology*, *19*(5), 464-474. https://doi.org/10.1038/s41590-018-0094-2

Kologrivova, I. V., Dmitriukov, A. A., Naryzhnaya, N. V., Kravchenko, E. S., Kharitonova, O. A., Vyrostkova, A. I., Krapivina, A. S., Andreev, S. L., Koshelskaya, O. A., & Suslova, T. E. (2025). Production of the Key Immunoregulatory Cytokines and the Content of FoxP3+ T-Regulatory Lymphocytes in the Epicardial and Thymus Adipose Tissue in Patients with Coronary Heart Disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. https://doi.org/10.1007/s10517-025-06304-2

Komi, D. E. A., Shafaghat, F., & Christian, M. (2020). Crosstalk Between Mast Cells and Adipocytes in Physiologic and Pathologic Conditions. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *58*(3), 388. https://doi.org/10.1007/s12016-020-08785-7

Konya, V., & Mjösberg, J. (2016). Lipid mediators as regulators of human ILC2 function in allergic diseases. *Immunology Letters*, *179*, 36-42. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.07.006

Kooijman, S., Wang, Y., Parlevliet, E. T., Boon, M. R., Edelschaap, D., Snaterse, G., Pijl, H., Romijn, J. A., & Rensen, P. C. N. (2015). Central GLP-1 receptor signalling accelerates plasma clearance of triacylglycerol and glucose by activating brown adipose tissue in mice. *Diabetologia*, *58*(11), 2637-2646. https://doi.org/10.1007/s00125-015-3727-0

Kranendonk, M. E. G., Visseren, F. L. J., van Balkom, B. W. M., Nolte-'t Hoen, E. N. M., van Herwaarden, J. A., de Jager, W., Schipper, H. S., Brenkman, A. B., Verhaar, M. C., Wauben, M. H. M., & Kalkhoven, E. (2014). Human adipocyte extracellular vesicles in reciprocal signaling between adipocytes and macrophages. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *22*(5), 1296-1308. https://doi.org/10.1002/oby.20679

Kratz, M., Coats, B. R., Hisert, K. B., Hagman, D., Mutskov, V., Peris, E., Schoenfelt, K. Q., Kuzma, J. N., Larson, I., Billing, P. S., Landerholm, R. W., Crouthamel, M., Gozal, D., Hwang, S., Singh, P. K., & Becker, L. (2014). Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metabolism*, *20*(4), 614-625. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.08.010

Krotkiewski, M., Björntorp, P., Sjöström, L., & Smith, U. (1983). Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *The Journal of Clinical Investigation*, *72*(3), 1150-1162. https://doi.org/10.1172/JCI111040

Ks, C., Hy, M., D, J., Rj, C., Js, F., Cr, H., & Bm, S. (1987). Adipsin : A circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science (New York, N.Y.)*, *237*(4813). https://doi.org/10.1126/science.3299705

Kurukulasuriya, L. R., Stas, S., Lastra, G., Manrique, C., & Sowers, J. R. (2011). Hypertension in obesity. *The Medical Clinics of North America*, *95*(5), 903-917. https://doi.org/10.1016/j.mcna.2011.06.004

Lafontan, M., Moro, C., Berlan, M., Crampes, F., Sengenes, C., & Galitzky, J. (2008). Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *19*(4), 130-137. https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.11.006

Landsberg, L., Aronne, L. J., Beilin, L. J., Burke, V., Igel, L. I., Lloyd-Jones, D., & Sowers, J. (2013). Obesity-related hypertension : Pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)*, *15*(1), 14-33. https://doi.org/10.1111/jch.12049

Larsen, T. M., Toubro, S., van Baak, M. A., Gottesdiener, K. M., Larson, P., Saris, W. H. M., & Astrup, A. (2002). Effect of a 28-d treatment with L-796568, a novel beta(3)-adrenergic receptor agonist, on energy expenditure and body composition in obese men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *76*(4), 780-788. https://doi.org/10.1093/ajcn/76.4.780

Lasbleiz, A., Gaborit, B., Soghomonian, A., Bartoli, A., Ancel, P., Jacquier, A., & Dutour, A. (2021). COVID-19 and Obesity : Role of Ectopic Visceral and Epicardial Adipose Tissues in Myocardial Injury. *Frontiers in Endocrinology*, *12*, 726967. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.726967

Lauriane Y. M. Michel. (2023). *Extracellular Vesicles in Adipose Tissue Communication with the Healthy and Pathological Heart*. *24(9)*. https://doi.org/10.3390/ijms24097745

Lavie, C. J., Pandey, A., Lau, D. H., Alpert, M. A., & Sanders, P. (2017). Obesity and Atrial Fibrillation Prevalence, Pathogenesis, and Prognosis : Effects of Weight Loss and Exercise. *Journal of the American College of Cardiology*, *70*(16), 2022-2035. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.09.002

Lavin, D. P., White, M. F., & Brazil, D. P. (2016). IRS proteins and diabetic complications. *Diabetologia*, *59*(11), 2280-2291. https://doi.org/10.1007/s00125-016-4072-7

Lay, S. L., Martinez, M. C., & Andriantsitohaina, R. (2018). Vésicules extracellulaires, biomarqueurs et bioeffecteurs du syndrome métabolique. *médecine/sciences*, *34*(11), Article 11. https://doi.org/10.1051/medsci/2018239

Lazar, I., Clement, E., Dauvillier, S., Milhas, D., Ducoux-Petit, M., LeGonidec, S., Moro, C., Soldan, V., Dalle, S., Balor, S., Golzio, M., Burlet-Schiltz, O., Valet, P., Muller, C., & Nieto, L. (2016). Adipocyte Exosomes Promote Melanoma Aggressiveness through Fatty Acid Oxidation : A Novel Mechanism Linking Obesity and Cancer. *Cancer Research*, *76*(14), 4051-4057. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0651

Le Bourhis, L., Guerri, L., Dusseaux, M., Martin, E., Soudais, C., & Lantz, O. (2011). Mucosal-associated invariant T cells : Unconventional development and function. *Trends in Immunology*, *32*(5), 212-218. https://doi.org/10.1016/j.it.2011.02.005

Le Bourhis, L., Martin, E., Péguillet, I., Guihot, A., Froux, N., Coré, M., Lévy, E., Dusseaux, M., Meyssonnier, V., Premel, V., Ngo, C., Riteau, B., Duban, L., Robert, D., Huang, S., Rottman, M., Soudais, C., & Lantz, O. (2010). Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nature Immunology*, *11*(8), 701-708. https://doi.org/10.1038/ni.1890

Le Lay, S., Rome, S., Loyer, X., & Nieto, L. (2021). Adipocyte-derived extracellular vesicles in health and diseases : Nano-packages with vast biological properties. *FASEB bioAdvances*, *3*(6), 407-419. https://doi.org/10.1096/fba.2020-00147

Lecerf, J.-M. (2021). *Styles alimentaires et obésité* (p. 43-46). https://doi.org/10.1016/B978-2-294-76753-1.00009-6

Lee, J.-E., Moon, P.-G., Lee, I.-K., & Baek, M.-C. (2015). Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles Released by Adipocytes of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats. *The Protein Journal*, *34*(3), 220-235. https://doi.org/10.1007/s10930-015-9616-z

Lee, M.-W., Odegaard, J. I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A. B., Nussbaum, J. C., Yun, K., Locksley, R. M., & Chawla, A. (2015). Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell*, *160*(1-2), 74-87. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.011

Lee, Y.-H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2012). In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metabolism*, *15*(4), 480-491. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.009

Leiss, M., Beckmann, K., Girós, A., Costell, M., & Fässler, R. (2008). The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Current Opinion in Cell Biology*, *20*(5), 502-507. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.06.001

Lemieux, I., & Després, J.-P. (2020). Metabolic Syndrome : Past, Present and Future. *Nutrients*, *12*(11), 3501. https://doi.org/10.3390/nu12113501

Lesseur, C., Armstrong, D. A., Paquette, A. G., Koestler, D. C., Padbury, J. F., & Marsit, C. J. (2013). Tissue-specific Leptin promoter DNA methylation is associated with maternal and infant perinatal factors. *Molecular and cellular endocrinology*, *381*(0), 160-167. https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.07.024

Leung, A., Parks, B. W., Du, J., Trac, C., Setten, R., Chen, Y., Brown, K., Lusis, A. J., Natarajan, R., & Schones, D. E. (2014). Open chromatin profiling in mice livers reveals unique chromatin variations induced by high fat diet. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(34), 23557-23567. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581439

Li, D., Song, H., Shuo, L., Wang, L., Xie, P., Li, W., Liu, J., Tong, Y., Zhang, C.-Y., Jiang, X., Li, J., & Zhang, Y. (2020). Gonadal white adipose tissue-derived exosomal MiR-222 promotes obesity-associated insulin resistance. *Aging*, *12*(22), 22719-22743. https://doi.org/10.18632/aging.103891

Li, J., Wu, J., Zhang, M., & Zheng, Y. (2020). Dynamic changes of innate lymphoid cells in acute ST-segment elevation myocardial infarction and its association with clinical outcomes. *Scientific Reports*, *10*(1), 5099. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61903-5

Li, L., Li, B., Li, M., Niu, C., Wang, G., Li, T., Król, E., Jin, W., & Speakman, J. R. (2017). Brown adipocytes can display a mammary basal myoepithelial cell phenotype in vivo. *Molecular Metabolism*, *6*(10), 1198-1211. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.07.015

Li, Q., Liu, M., Fu, R., Cao, Q., Wang, Y., Han, S., Hu, W., Li, H., Hu, C., Wu, L., Zhang, L., Deng, J., & Wang, Y. (2018). Alteration of circulating innate lymphoid cells in patients with atherosclerotic cerebral infarction. *American Journal of Translational Research*, *10*(12), 4322-4330.

Li, Y., Huang, B., Jiang, X., Chen, W., Zhang, J., Wei, Y., Chen, Y., Lian, M., Bian, Z., Miao, Q., Peng, Y., Fang, J., Wang, Q., Tang, R., Gershwin, M. E., & Ma, X. (2018). Mucosal-Associated Invariant T Cells Improve Nonalcoholic Fatty Liver Disease Through Regulating Macrophage Polarization. *Frontiers in Immunology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01994

Lin, H., Zhang, L., Zheng, R., & Zheng, Y. (2017). The prevalence, metabolic risk and effects of lifestyle intervention for metabolically healthy obesity : A systematic review and meta-analysis: A PRISMA-compliant article. *Medicine*, *96*(47), e8838. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000008838

Lin, Q., Kuypers, M., Philpott, D. J., & Mallevaey, T. (2020). The dialogue between unconventional T cells and the microbiota. *Mucosal Immunology*, *13*(6), 867-876. https://doi.org/10.1038/s41385-020-0326-2

Litwin, M., & Kułaga, Z. (2021). Obesity, metabolic syndrome, and primary hypertension. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, *36*(4), 825-837. https://doi.org/10.1007/s00467-020-04579-3

Liu, D., Bordicchia, M., Zhang, C., Fang, H., Wei, W., Li, J.-L., Guilherme, A., Guntur, K., Czech, M. P., & Collins, S. (2016). Activation of mTORC1 is essential for β-adrenergic stimulation of adipose browning. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(5), 1704-1716. https://doi.org/10.1172/JCI83532

Liu, D., Ceddia, R. P., & Collins, S. (2018). Cardiac natriuretic peptides promote adipose « browning » through mTOR complex-1. *Molecular Metabolism*, *9*, 192-198. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.12.017

Lockie, S. H., Heppner, K. M., Chaudhary, N., Chabenne, J. R., Morgan, D. A., Veyrat-Durebex, C., Ananthakrishnan, G., Rohner-Jeanrenaud, F., Drucker, D. J., DiMarchi, R., Rahmouni, K., Oldfield, B. J., Tschöp, M. H., & Perez-Tilve, D. (2012). Direct Control of Brown Adipose Tissue Thermogenesis by Central Nervous System Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Signaling. *Diabetes*, *61*(11), 2753-2762. https://doi.org/10.2337/db11-1556

Lodhi, I. J., Yin, L., Jensen-Urstad, A. P. L., Funai, K., Coleman, T., Baird, J. H., El Ramahi, M. K., Razani, B., Song, H., Fu-Hsu, F., Turk, J., & Semenkovich, C. F. (2012). Inhibiting Adipose Tissue Lipogenesis Reprograms Thermogenesis and PPARγ Activation to Decrease Diet-induced Obesity. *Cell metabolism*, *16*(2), 189-201. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.013

Loehr, L. R., Rosamond, W. D., Poole, C., Marie McNeill, A., Chang, P. P., Folsom, A. R., Chambless, L. E., & Heiss, G. (2009). Association of Multiple Anthropometrics of Overweight and Obesity With Incident Heart Failure. *Circulation: Heart Failure*, *2*(1), 18-24. https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.813782

Loh, L., Wang, Z., Sant, S., Koutsakos, M., Jegaskanda, S., Corbett, A. J., Liu, L., Fairlie, D. P., Crowe, J., Rossjohn, J., Xu, J., Doherty, P. C., McCluskey, J., & Kedzierska, K. (2016). Human mucosal-associated invariant T cells contribute to antiviral influenza immunity via IL-18-dependent activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(36), 10133-10138. https://doi.org/10.1073/pnas.1610750113

Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., Beguinot, F., & Miele, C. (2019). Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(9), 2358. https://doi.org/10.3390/ijms20092358

López, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & Diéguez, C. (2016). Hypothalamic AMPK : A canonical regulator of whole-body energy balance. *Nature Reviews Endocrinology*, *12*(7), 421-432. https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.67

López, M., Varela, L., Vázquez, M. J., Rodríguez-Cuenca, S., González, C. R., Velagapudi, V. R., Morgan, D. A., Schoenmakers, E., Agassandian, K., Lage, R., de Morentin, P. B. M., Tovar, S., Nogueiras, R., Carling, D., Lelliott, C., Gallego, R., Orešič, M., Chatterjee, K., Saha, A. K., … Vidal-Puig, A. (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nature medicine*, *16*(9), 1001-1008. https://doi.org/10.1038/nm.2207

Lopez-Perez, D., Redruello-Romero, A., Garcia-Rubio, J., Arana, C., Garcia-Escudero, L. A., Tamayo, F., Puentes-Pardo, J. D., Moreno-SanJuan, S., Salmeron, J., Blanco, A., Galvez, J., Leon, J., & Carazo, Á. (2021). In Patients With Obesity, the Number of Adipose Tissue Mast Cells Is Significantly Lower in Subjects With Type 2 Diabetes. *Frontiers in Immunology*, *12*, 664576. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664576

Lowell, B. B., & Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, *404*(6778), 652-660. https://doi.org/10.1038/35007527

Loyer, X., Boulanger, C. M., & Le Lay, S. (2022). Adipocyte extracellular vesicles : Rescuers of cardiac mitochondrial stress. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *33*(1), 1-3. https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.11.001

Lumeng, C. N., DelProposto, J. B., Westcott, D. J., & Saltiel, A. R. (2008). Phenotypic Switching of Adipose Tissue Macrophages With Obesity Is Generated by Spatiotemporal Differences in Macrophage Subtypes. *Diabetes*, *57*(12), 3239-3246. https://doi.org/10.2337/db08-0872

Lynch, L. (2014). Adipose invariant natural killer T cells. *Immunology*, *142*(3), 337-346. https://doi.org/10.1111/imm.12269

Lynch, L., Nowak, M., Varghese, B., Clark, J., Hogan, A. E., Toxavidis, V., Balk, S. P., O'Shea, D., O'Farrelly, C., & Exley, M. A. (2012). Adipose Tissue Invariant NKT Cells Protect Against Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorder Through Regulatory Cytokine Production. *Immunity*, *37*(3), 574-587. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.016

M, F., & M, B. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, *36*(7). https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.014

Magalhaes, I., Kiaf, B., & Lehuen, A. (2015). iNKT and MAIT Cell Alterations in Diabetes. *Frontiers in Immunology*, *6*, 341. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00341

Magkos, F. (2019). Metabolically healthy obesity : What's in a name? *The American Journal of Clinical Nutrition*, *110*(3), 533-539. https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz133

Mahabadi, A. A., Berg, M. H., Lehmann, N., Kälsch, H., Bauer, M., Kara, K., Dragano, N., Moebus, S., Jöckel, K.-H., Erbel, R., & Möhlenkamp, S. (2013). Association of epicardial fat with cardiovascular risk factors and incident myocardial infarction in the general population : The Heinz Nixdorf Recall Study. *Journal of the American College of Cardiology*, *61*(13), 1388-1395. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.11.062

Malatesta, M., Battistelli, S., Rocchi, M. B., Zancanaro, C., Fakan, S., & Gazzanelli, G. (2001). Fine structural modifications of liver, pancreas and brown adipose tissue mitochondria from hibernating, arousing and euthermic dormice. *Cell Biology International*, *25*(2), 131-138. https://doi.org/10.1006/cbir.2000.0575

Malavazos, A. E., Iacobellis, G., Dozio, E., Basilico, S., Di Vincenzo, A., Dubini, C., Menicanti, L., Vianello, E., Meregalli, C., Ruocco, C., Ragni, M., Secchi, F., Spagnolo, P., Castelvecchio, S., Morricone, L., Buscemi, S., Giordano, A., Goldberger, J. J., Carruba, M., … Nisoli, E. (2023a). Human epicardial adipose tissue expresses glucose-dependent insulinotropic polypeptide, glucagon, and glucagon-like peptide-1 receptors as potential targets of pleiotropic therapies. *European Journal of Preventive Cardiology*, *30*(8), 680-693. https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwad050

Malavazos, A. E., Iacobellis, G., Dozio, E., Basilico, S., Di Vincenzo, A., Dubini, C., Menicanti, L., Vianello, E., Meregalli, C., Ruocco, C., Ragni, M., Secchi, F., Spagnolo, P., Castelvecchio, S., Morricone, L., Buscemi, S., Giordano, A., Goldberger, J. J., Carruba, M., … Nisoli, E. (2023b). Human epicardial adipose tissue expresses glucose-dependent insulinotropic polypeptide, glucagon, and glucagon-like peptide-1 receptors as potential targets of pleiotropic therapies. *European Journal of Preventive Cardiology*, *30*(8), 680-693. https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwad050

Mallegol, J., Van Niel, G., Lebreton, C., Lepelletier, Y., Candalh, C., Dugave, C., Heath, J. K., Raposo, G., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2007). T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology*, *132*(5), 1866-1876. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.043

Manolopoulos, K. N., Karpe, F., & Frayn, K. N. (2010). Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *International Journal of Obesity (2005)*, *34*(6), 949-959. https://doi.org/10.1038/ijo.2009.286

Mantani, P. T., Dunér, P., Bengtsson, E., Alm, R., Ljungcrantz, I., Söderberg, I., Sundius, L., To, F., Nilsson, J., Björkbacka, H., & Fredrikson, G. N. (2015). IL-25 Inhibits Atherosclerosis Development in Apolipoprotein E Deficient Mice. *PLOS ONE*, *10*(1), e0117255. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117255

Marcelin, G., Silveira, A. L. M., Martins, L. B., Ferreira, A. V., & Clément, K. (2019). Deciphering the cellular interplays underlying obesity-induced adipose tissue fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, *129*(10), 4032-4040. https://doi.org/10.1172/JCI129192

Marchington, J. M., Mattacks, C. A., & Pond, C. M. (1989). Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium : Structure, foetal development and biochemical properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, *94*(2), 225-232. https://doi.org/10.1016/0305-0491(89)90337-4

Marchington, J. M., & Pond, C. M. (1990). Site-specific properties of pericardial and epicardial adipose tissue : The effects of insulin and high-fat feeding on lipogenesis and the incorporation of fatty acids in vitro. *International Journal of Obesity*, *14*(12), 1013-1022.

Marso, S. P., Bain, S. C., Consoli, A., Eliaschewitz, F. G., Jódar, E., Leiter, L. A., Lingvay, I., Rosenstock, J., Seufert, J., Warren, M. L., Woo, V., Hansen, O., Holst, A. G., Pettersson, J., Vilsbøll, T., & SUSTAIN-6 Investigators. (2016). Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *The New England Journal of Medicine*, *375*(19), 1834-1844. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607141

Martínez-González, M. A., Martínez, J. A., Hu, F. B., Gibney, M. J., & Kearney, J. (1999). Physical inactivity, sedentary lifestyle and obesity in the European Union. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *23*(11), 1192-1201. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801049

Martínez-Sánchez, N., Moreno-Navarrete, J. M., Contreras, C., Rial-Pensado, E., Fernø, J., Nogueiras, R., Diéguez, C., Fernández-Real, J.-M., & López, M. (2016). Thyroid hormones induce browning of white fat. *The Journal of Endocrinology*, *232*(2), 351-362. https://doi.org/10.1530/JOE-16-0425

Mateescu, B., Kowal, E. J. K., van Balkom, B. W. M., Bartel, S., Bhattacharyya, S. N., Buzás, E. I., Buck, A. H., de Candia, P., Chow, F. W. N., Das, S., Driedonks, T. A. P., Fernández-Messina, L., Haderk, F., Hill, A. F., Jones, J. C., Van Keuren-Jensen, K. R., Lai, C. P., Lässer, C., Liegro, I. di, … Nolte-'t Hoen, E. N. M. (2017). Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *Journal of Extracellular Vesicles*, *6*(1), 1286095. https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1286095

Mathew, H., Farr, O. M., & Mantzoros, C. S. (2016). Metabolic health and weight : Understanding metabolically unhealthy normal weight or metabolically healthy obese patients. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *65*(1), 73-80. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.019

Matsumoto, A., Takahashi, Y., Nishikawa, M., Sano, K., Morishita, M., Charoenviriyakul, C., Saji, H., & Takakura, Y. (2017). Accelerated growth of B16BL6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16BL6 cells. *Cancer Science*, *108*(9), 1803-1810. https://doi.org/10.1111/cas.13310

Matsuzawa, Y. (2008). The role of fat topology in the risk of disease. *International Journal of Obesity (2005)*, *32 Suppl 7*, S83-92. https://doi.org/10.1038/ijo.2008.243

Matsuzawa, Y., Funahashi, T., & Nakamura, T. (2011). The concept of metabolic syndrome : Contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, *18*(8), 629-639. https://doi.org/10.5551/jat.7922

Matthews, C. E., Chen, K. Y., Freedson, P. S., Buchowski, M. S., Beech, B. M., Pate, R. R., & Troiano, R. P. (2008). Amount of Time Spent in Sedentary Behaviors in the United States, 2003–2004. *American journal of epidemiology*, *167*(7), 875-881. https://doi.org/10.1093/aje/kwm390

Maurice F, , Vincentelli C, Ancel P, Dutour A, Thuny F, Cuisset T, & Gaborit B. (2019). *Cœur et obésité*. EM-Consulte. 10.1016/S1166-4568(19)66544-7

Mazurek, T., Zhang, L., Zalewski, A., Mannion, J. D., Diehl, J. T., Arafat, H., Sarov-Blat, L., O'Brien, S., Keiper, E. A., Johnson, A. G., Martin, J., Goldstein, B. J., & Shi, Y. (2003). Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*, *108*(20), 2460-2466. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000099542.57313.C5

Medvedev, A. V., Snedden, S. K., Raimbault, S., Ricquier, D., & Collins, S. (2001). Transcriptional regulation of the mouse uncoupling protein-2 gene. Double E-box motif is required for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(14), 10817-10823. https://doi.org/10.1074/jbc.M010587200

Mehta, P., Nuotio-Antar, A. M., & Smith, C. W. (2015). Γδ T cells promote inflammation and insulin resistance during high fat diet-induced obesity in mice. *Journal of Leukocyte Biology*, *97*(1), 121-134. https://doi.org/10.1189/jlb.3A0414-211RR

Miller, E. J., Li, J., Leng, L., McDonald, C., Atsumi, T., Bucala, R., & Young, L. H. (2008). Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. *Nature*, *451*(7178), 578-582. https://doi.org/10.1038/nature06504

Minciacchi, V. R., Freeman, M. R., & Di Vizio, D. (2015). Extracellular vesicles in cancer : Exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *40*, 41-51. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.010

Molofsky, A. B., Nussbaum, J. C., Liang, H.-E., Van Dyken, S. J., Cheng, L. E., Mohapatra, A., Chawla, A., & Locksley, R. M. (2013). Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, *210*(3), 535-549. https://doi.org/10.1084/jem.20121964

Mongraw-Chaffin, M., Foster, M. C., Anderson, C. A. M., Burke, G. L., Haq, N., Kalyani, R. R., Ouyang, P., Sibley, C. T., Tracy, R., Woodward, M., & Vaidya, D. (2018). Metabolically Healthy Obesity, Transition to Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Risk. *Journal of the American College of Cardiology*, *71*(17), 1857-1865. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.02.055

Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L. G., Stolz, D. B., Papworth, G. D., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D., & Thomson, A. W. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, *104*(10), 3257-3266. https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0824

Mori, M., Nakagami, H., Rodriguez-Araujo, G., Nimura, K., & Kaneda, Y. (2012). Essential Role for miR-196a in Brown Adipogenesis of White Fat Progenitor Cells. *PLoS Biology*, *10*(4), e1001314. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001314

Moriyama, S., Brestoff, J. R., Flamar, A.-L., Moeller, J. B., Klose, C. S. N., Rankin, L. C., Yudanin, N. A., Monticelli, L. A., Putzel, G. G., Rodewald, H.-R., & Artis, D. (2018). β2-adrenergic receptor-mediated negative regulation of group 2 innate lymphoid cell responses. *Science (New York, N.Y.)*, *359*(6379), 1056-1061. https://doi.org/10.1126/science.aan4829

Morroni, M., Giordano, A., Zingaretti, M. C., Boiani, R., De Matteis, R., Kahn, B. B., Nisoli, E., Tonello, C., Pisoschi, C., Luchetti, M. M., Marelli, M., & Cinti, S. (2004). Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(48), 16801-16806. https://doi.org/10.1073/pnas.0407647101

Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews. Immunology*, *8*(12), 958-969. https://doi.org/10.1038/nri2448

Mráz, M., Cinkajzlová, A., Kloučková, J., Lacinová, Z., Kratochvílová, H., Lipš, M., Pořízka, M., Kopecký, P., Lindner, J., Kotulák, T., Netuka, I., & Haluzík, M. (2019). Dendritic Cells in

Subcutaneous and Epicardial Adipose Tissue of Subjects with Type 2 Diabetes, Obesity, and Coronary Artery Disease. *Mediators of Inflammation*, *2019*, 5481725. https://doi.org/10.1155/2019/5481725

Mráz, M., Cinkajzlová, A., Kloučková, J., Lacinová, Z., Kratochvílová, H., Lipš, M., Pořízka, M., Kopecký, P., Pierzynová, A., Kučera, T., Melenovský, V., Stříž, I., Lindner, J., & Haluzík, M. (2019). Coronary Artery Disease Is Associated with an Increased Amount of T Lymphocytes in Human Epicardial Adipose Tissue. *Mediators of Inflammation*, *2019*, 4075086. https://doi.org/10.1155/2019/4075086

Mueller, S. N., & Mackay, L. K. (2016). Tissue-resident memory T cells : Local specialists in immune defence. *Nature Reviews. Immunology*, *16*(2), 79-89. https://doi.org/10.1038/nri.2015.3

Muir, L. A., Cho, K. W., Geletka, L. M., Baker, N. A., Flesher, C. G., Ehlers, A. P., Kaciroti, N., Lindsly, S., Ronquist, S., Rajapakse, I., O'Rourke, R. W., & Lumeng, C. N. (2022). Human CD206+ macrophages associate with diabetes and adipose tissue lymphoid clusters. *JCI Insight*, *7*(3), e146563. https://doi.org/10.1172/jci.insight.146563

Muñoz-Garach, A., Cornejo-Pareja, I., & Tinahones, F. J. (2016). Does Metabolically Healthy Obesity Exist? *Nutrients*, *8*(6), 320. https://doi.org/10.3390/nu8060320

Murakami, T., Michelagnoli, S., Longhi, R., Gianfranceschi, G., Pazzucconi, F., Calabresi, L., Sirtori, C. R., & Franceschini, G. (1995). Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *15*(11), 1819-1828. https://doi.org/10.1161/01.atv.15.11.1819

Nagashima, K., Okumura, Y., Watanabe, I., Nakai, T., Ohkubo, K., Kofune, T., Kofune, M., Mano, H., Sonoda, K., & Hirayama, A. (2011). Association between epicardial adipose tissue volumes on 3-dimensional reconstructed CT images and recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, *75*(11), 2559-2565. https://doi.org/10.1253/circj.cj-11-0554

Nakajima, T., Yokota, T., Shingu, Y., Yamada, A., Iba, Y., Ujihira, K., Wakasa, S., Ooka, T., Takada, S., Shirakawa, R., Katayama, T., Furihata, T., Fukushima, A., Matsuoka, R., Nishihara, H., Dela, F., Nakanishi, K., Matsui, Y., & Kinugawa, S. (2019). Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in epicardial adipose tissue is associated with decreased concentration of adiponectin and severity of coronary atherosclerosis. *Scientific Reports*, *9*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40419-7

Nakamura, Y., Kita, S., Tanaka, Y., Fukuda, S., Obata, Y., Okita, T., Nishida, H., Takahashi, Y., Kawachi, Y., Tsugawa-Shimizu, Y., Fujishima, Y., Nishizawa, H., Takakura, Y., Miyagawa, S., Sawa, Y., Maeda, N., & Shimomura, I. (2020). Adiponectin Stimulates Exosome Release to Enhance Mesenchymal Stem-Cell-Driven Therapy of Heart Failure in Mice. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *28*(10), 2203-2219. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.06.026

Nakanishi, K., Fukuda, S., Tanaka, A., Otsuka, K., Sakamoto, M., Taguchi, H., Yoshikawa, J., Shimada, K., & Yoshiyama, M. (2012). Peri-atrial epicardial adipose tissue is associated with new-onset nonvalvular atrial fibrillation. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, *76*(12), 2748-2754. https://doi.org/10.1253/circj.cj-12-0637

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016 : A pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet (London, England)*, *390*(10113), 2627-2642. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3

Nedergaard, J., Bengtsson, T., & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *293*(2), E444-452. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00691.2006

Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., & Cannon, B. (2001). UCP1 : The only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1504*(1), 82-106. https://doi.org/10.1016/s0005-2728(00)00247-4

Neel, J. V. (1962). Diabetes mellitus : A « thrifty » genotype rendered detrimental by « progress »? *American Journal of Human Genetics*, *14*(4), 353-362.

Neeland, I. J., Ross, R., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Yamashita, S., Shai, I., Seidell, J., Magni, P., Santos, R. D., Arsenault, B., Cuevas, A., Hu, F. B., Griffin, B., Zambon, A., Barter, P., Fruchart, J.-C., & Eckel, R. H. (2019). Visceral and ectopic fat, atherosclerosis, and cardiometabolic disease : A position statement. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, *7*(9), 715-725. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30084-1

Neeland, I. J., Turer, A. T., Ayers, C. R., Berry, J. D., Rohatgi, A., Das, S. R., Khera, A., Vega, G. L., McGuire, D. K., Grundy, S. M., & de Lemos, J. A. (2015). Body fat distribution and incident cardiovascular disease in obese adults. *Journal of the American College of Cardiology*, *65*(19), 2150-2151. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.01.061

Newland, S. A., Mohanta, S., Clément, M., Taleb, S., Walker, J. A., Nus, M., Sage, A. P., Yin, C., Hu, D., Kitt, L. L., Finigan, A. J., Rodewald, H.-R., Binder, C. J., McKenzie, A. N. J., Habenicht, A. J., & Mallat, Z. (2017). Type-2 innate lymphoid cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nature Communications*, *8*, 15781. https://doi.org/10.1038/ncomms15781

Newsholme, E. A. (1978). Substrate cycles : Their metabolic, energetic and thermic consequences in man. *Biochemical Society Symposium*, *43*, 183-205.

Nguyen, K. D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y. P. S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R. M., & Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*, *480*(7375), 104-108. https://doi.org/10.1038/nature10653

Nguyen, M. T. A., Favelyukis, S., Nguyen, A.-K., Reichart, D., Scott, P. A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C. K., Neels, J. G., & Olefsky, J. M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(48), 35279-35292. https://doi.org/10.1074/jbc.M706762200

Nicholls, D. G., & Locke, R. M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiological Reviews*, *64*(1), 1-64. https://doi.org/10.1152/physrev.1984.64.1.1

Nicklas, B. J., Penninx, B. W. J. H., Cesari, M., Kritchevsky, S. B., Newman, A. B., Kanaya, A. M., Pahor, M., Jingzhong, D., Harris, T. B., & Health, Aging and Body Composition Study. (2004). Association of visceral adipose tissue with incident myocardial infarction in older men and women : The Health, Aging and Body Composition Study. *American Journal of Epidemiology*, *160*(8), 741-749. https://doi.org/10.1093/aje/kwh281

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., & Nagai, R. (2009). CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine*, *15*(8). https://doi.org/10.1038/nm.1964

Nussbaum, J. C., Van Dyken, S. J., von Moltke, J., Cheng, L. E., Mohapatra, A., Molofsky, A. B., Thornton, E. E., Krummel, M. F., Chawla, A., Liang, H.-E., & Locksley, R. M. (2013). Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature*, *502*(7470), 245-248. https://doi.org/10.1038/nature12526

Oberhammer, F. A., Hochegger, K., Fröschl, G., Tiefenbacher, R., & Pavelka, M. (1994). Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced

activation of cdc2 kinase. *The Journal of Cell Biology*, *126*(4), 827-837. https://doi.org/10.1083/jcb.126.4.827

O'Connell, J., Lynch, L., Cawood, T. J., Kwasnik, A., Nolan, N., Geoghegan, J., McCormick, A., O'Farrelly, C., & O'Shea, D. (2010). The relationship of omental and subcutaneous adipocyte size to metabolic disease in severe obesity. *PloS One*, *5*(4), e9997. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009997

Oeckl, J., Janovska, P., Adamcova, K., Bardova, K., Brunner, S., Dieckmann, S., Ecker, J., Fromme, T., Funda, J., Gantert, T., Giansanti, P., Hidrobo, M. S., Kuda, O., Kuster, B., Li, Y., Pohl, R., Schmitt, S., Schweizer, S., Zischka, H., … Klingenspor, M. (2022). Loss of UCP1 function augments recruitment of futile lipid cycling for thermogenesis in murine brown fat. *Molecular Metabolism*, *61*, 101499. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101499

Ohlson, L. O., Larsson, B., Svärdsudd, K., Welin, L., Eriksson, H., Wilhelmsen, L., Björntorp, P., & Tibblin, G. (1985). The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes*, *34*(10), 1055-1058. https://doi.org/10.2337/diab.34.10.1055

Ohne, Y., Silver, J. S., Thompson-Snipes, L., Collet, M. A., Blanck, J. P., Cantarel, B. L., Copenhaver, A. M., Humbles, A. A., & Liu, Y.-J. (2016). IL-1 is a critical regulator of group 2 innate lymphoid cell function and plasticity. *Nature Immunology*, *17*(6), 646-655. https://doi.org/10.1038/ni.3447

Oikonomou, E. K., Antonopoulos, A. S., Schottlander, D., Marwan, M., Mathers, C., Tomlins, P., Siddique, M., Klüner, L. V., Shirodaria, C., Mavrogiannis, M. C., Thomas, S., Fava, A., Deanfield, J., Channon, K. M., Neubauer, S., Desai, M. Y., Achenbach, S., & Antoniades, C. (2021). Standardized measurement of coronary inflammation using cardiovascular computed tomography : Integration in clinical care as a prognostic medical device. *Cardiovascular Research*, *117*(13), 2677-2690. https://doi.org/10.1093/cvr/cvab286

Oikonomou, E. K., Williams, M. C., Kotanidis, C. P., Desai, M. Y., Marwan, M., Antonopoulos, A. S., Thomas, K. E., Thomas, S., Akoumianakis, I., Fan, L. M., Kesavan, S., Herdman, L., Alashi, A., Centeno, E. H., Lyasheva, M., Griffin, B. P., Flamm, S. D., Shirodaria, C., Sabharwal, N., … Antoniades, C. (2019). A novel machine learning-derived radiotranscriptomic signature of perivascular fat improves cardiac risk prediction using coronary CT angiography. *European Heart Journal*, *40*(43), 3529-3543. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz592

Okla, M., Zaher, W., Alfayez, M., & Chung, S. (2018). Inhibitory Effects of Toll-Like Receptor 4, NLRP3 Inflammasome, and Interleukin-1β on White Adipocyte Browning. *Inflammation*, *41*(2), 626-642. https://doi.org/10.1007/s10753-017-0718-y

Olguín-Martínez, E., Ruiz-Medina, B. E., & Licona-Limón, P. (2021). Tissue-Specific Molecular Markers and Heterogeneity in Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Frontiers in Immunology*, *12*, 757967. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.757967

O'Sullivan, T. E., Rapp, M., Fan, X., Weizman, O.-E., Bhardwaj, P., Adams, N. M., Walzer, T., Dannenberg, A. J., & Sun, J. C. (2016). Adipose-resident group 1 innate lymphoid cells promote obesity-associated insulin resistance. *Immunity*, *45*(2), 428-441. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.016

Palmisano, G. L., Innamorati, M., & Vanderlinden, J. (2016). Life adverse experiences in relation with obesity and binge eating disorder : A systematic review. *Journal of Behavioral Addictions*, *5*(1), 11-31. https://doi.org/10.1556/2006.5.2016.018

Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., & Johnstone, R. M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, *101*(3), 942-948. https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.942

Pan, Y., Hui, X., Hoo, R. L. C., Ye, D., Chan, C. Y. C., Feng, T., Wang, Y., Lam, K. S. L., & Xu, A. (2019). Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, *129*(2), 834-849. https://doi.org/10.1172/JCI123069

Pandey, A., LaMonte, M., Klein, L., Ayers, C., Psaty, B. M., Eaton, C. B., Allen, N. B., de Lemos, J. A., Carnethon, M., Greenland, P., & Berry, J. D. (2017). Relationship Between Physical Activity, Body Mass Index, and Risk of Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, *69*(9), 1129-1142. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.11.081

Park, H., He, A., & Lodhi, I. J. (2019). Lipid Regulators of Thermogenic Fat Activation. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *30*(10), 710-723. https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.07.020

Park, H., He, A., Tan, M., Johnson, J. M., Dean, J. M., Pietka, T. A., Chen, Y., Zhang, X., Hsu, F.-F., Razani, B., Funai, K., & Lodhi, I. J. (2019). Peroxisome-derived lipids regulate adipose thermogenesis by mediating cold-induced mitochondrial fission. *The Journal of Clinical Investigation*, *129*(2), 694-711. https://doi.org/10.1172/JCI120606

Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, *357*(9270), 1777-1789. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7

Pate, R. R., Pratt, M., Blair, S. N., Haskell, W. L., Macera, C. A., Bouchard, C., Buchner, D., Ettinger, W., Heath, G. W., & King, A. C. (1995). Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA*, *273*(5), 402-407. https://doi.org/10.1001/jama.273.5.402

Patsouris, D., Li, P.-P., Thapar, D., Chapman, J., Olefsky, J. M., & Neels, J. G. (2008). Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metabolism*, *8*(4), 301-309. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.08.015

Patti, M.-E., & Kahn, B. B. (2004). Nutrient sensor links obesity with diabetes risk. *Nature Medicine*, *10*(10), 1049-1050. https://doi.org/10.1038/nm1004-1049

Perlstein, T. S., Gumieniak, O., Williams, G. H., Sparrow, D., Vokonas, P. S., Gaziano, M., Weiss, S. T., & Litonjua, A. A. (2006). Uric acid and the development of hypertension : The normative aging study. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *48*(6), 1031-1036. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000248752.08807.4c

Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(10), 7153-7164. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.053942

Phillips, C. M. (2013). Metabolically healthy obesity : Definitions, determinants and clinical implications. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, *14*(3), 219-227. https://doi.org/10.1007/s11154-013-9252-x

Piccin, A., Murphy, W. G., & Smith, O. P. (2007). Circulating microparticles : Pathophysiology and clinical implications. *Blood Reviews*, *21*(3), 157-171. https://doi.org/10.1016/j.blre.2006.09.001

Piché, M.-E., Tchernof, A., & Després, J.-P. (2020). Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circulation Research*, *126*(11), 1477-1500. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316101

Pilkington, A.-C., Paz, H. A., & Wankhade, U. D. (2021). Beige Adipose Tissue Identification and Marker Specificity-Overview. *Frontiers in Endocrinology*, *12*, 599134. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.599134

Poggi, A., Gaborit, B., Schindler, T., Liberale, L., Montecucco, F., & Carbone, F. (2022). Epicardial fat and atrial fibrillation : The perils of atrial failure. *Europace*, *Accepted for publication*.

Poirier, P., Giles, T. D., Bray, G. A., Hong, Y., Stern, J. S., Pi-Sunyer, F. X., Eckel, R. H., American Heart Association, & Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. (2006). Obesity and cardiovascular disease : Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*, *113*(6), 898-918. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.171016

Powell-Wiley, T. M., Poirier, P., Burke, L. E., Després, J.-P., Gordon-Larsen, P., Lavie, C. J., Lear, S. A., Ndumele, C. E., Neeland, I. J., Sanders, P., St-Onge, M.-P., & American Heart Association Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Council on Epidemiology and Prevention; and Stroke Council. (2021). Obesity and Cardiovascular Disease : A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, *143*(21), e984-e1010. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000973

Prati, F., Arbustini, E., Labellarte, A., Sommariva, L., Pawlowski, T., Manzoli, A., Pagano, A., Motolese, M., & Boccanelli, A. (2003). Eccentric atherosclerotic plaques with positive remodelling have a pericardial distribution : A permissive role of epicardial fat? A three-dimensional intravascular ultrasound study of left anterior descending artery lesions. *European Heart Journal*, *24*(4), 329-336. https://doi.org/10.1016/s0195-668x(02)00426-8

Prats-Puig, A., Ortega, F. J., Mercader, J. M., Moreno-Navarrete, J. M., Moreno, M., Bonet, N., Ricart, W., López-Bermejo, A., & Fernández-Real, J. M. (2013). Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *98*(10), E1655-1660. https://doi.org/10.1210/jc.2013-1496

Primeau, V., Coderre, L., Karelis, A. D., Brochu, M., Lavoie, M.-E., Messier, V., Sladek, R., & Rabasa-Lhoret, R. (2011). Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *International Journal of Obesity (2005)*, *35*(7), 971-981. https://doi.org/10.1038/ijo.2010.216

Prins, J. B., & O'Rahilly, S. (1997). Regulation of adipose cell number in man. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *92*(1), 3-11. https://doi.org/10.1042/cs0920003

Prospective Studies Collaboration. (2009). Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults : Collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*, *373*(9669), 1083-1096. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60318-4

Pucci, G., Alcidi, R., Tap, L., Battista, F., Mattace-Raso, F., & Schillaci, G. (2017). Sex- and gender-related prevalence, cardiovascular risk and therapeutic approach in metabolic syndrome : A review of the literature. *Pharmacological Research*, *120*, 34-42. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.03.008

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, *92*(6), 829-839. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81410-5

Pulit, S. L., Stoneman, C., Morris, A. P., Wood, A. R., Glastonbury, C. A., Tyrrell, J., Yengo, L., Ferreira, T., Marouli, E., Ji, Y., Yang, J., Jones, S., Beaumont, R., Croteau-Chonka, D. C., Winkler, T. W., GIANT Consortium, Hattersley, A. T., Loos, R. J. F., Hirschhorn, J. N., … Lindgren, C. M. (2019). Meta-analysis of genome-wide association studies for body fat distribution in 694 649 individuals of European ancestry. *Human Molecular Genetics*, *28*(1), 166-174. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy327

Purushothaman, A., Shyam Kumar Bandari, Jian Liu, James A. Mobley, Elizabeth E. Brown, & Ralph D. Sanderson. (1652). *Fibronectin on the Surface of Myeloma Cell-derived Exosomes Mediates Exosome-Cell Interactions*. *291*. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.686295

Qiu, Y., Nguyen, K. D., Odegaard, J. I., Cui, X., Tian, X., Locksley, R. M., Palmiter, R. D., & Chawla, A. (2014). Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell*, *157*(6), 1292-1308. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.066

Rabkin, S. W. (2007). Epicardial fat : Properties, function and relationship to obesity. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *8*(3), 253-261. https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2006.00293.x

Rached, M.-T., Millership, S. J., Pedroni, S. M. A., Choudhury, A. I., Costa, A. S. H., Hardy, D. G., Glegola, J. A., Irvine, E. E., Selman, C., Woodberry, M. C., Yadav, V. K., Khadayate, S., Vidal-Puig, A., Virtue, S., Frezza, C., & Withers, D. J. (2019). Deletion of myeloid IRS2 enhances adipose tissue sympathetic nerve function and limits obesity. *Molecular Metabolism*, *20*, 38-50. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.11.010

Rajbhandari, P., Thomas, B. J., Feng, A.-C., Hong, C., Wang, J., Vergnes, L., Sallam, T., Wang, B., Sandhu, J., Seldin, M. M., Lusis, A. J., Fong, L. G., Katz, M., Lee, R., Young, S. G., Reue, K., Smale, S. T., & Tontonoz, P. (2018). IL-10 Signaling Remodels Adipose Chromatin Architecture to Limit Thermogenesis and Energy Expenditure. *Cell*, *172*(1-2), 218-233.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.019

Rao, M., Wang, X., Guo, G., Wang, L., Chen, S., Yin, P., Chen, K., Chen, L., Zhang, Z., Chen, X., Hu, X., Hu, S., & Song, J. (2021). Resolving the intertwining of inflammation and fibrosis in human heart failure at single-cell level. *Basic Research in Cardiology*, *116*(1), 55. https://doi.org/10.1007/s00395-021-00897-1

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., Camera, D. M., Lachey, J., Gygi, S., Seehra, J., Hawley, J. A., & Spiegelman, B. M. (2014). Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell*, *157*(6), 1279-1291. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.065

Raschke, S., Elsen, M., Gassenhuber, H., Sommerfeld, M., Schwahn, U., Brockmann, B., Jung, R., Wisløff, U., Tjønna, A. E., Raastad, T., Hallén, J., Norheim, F., Drevon, C. A., Romacho, T., Eckardt, K., & Eckel, J. (2013). Evidence against a beneficial effect of irisin in humans. *PloS One*, *8*(9), e73680. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073680

Reaven, G. M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, *37*(12), 1595-1607. https://doi.org/10.2337/diab.37.12.1595

Rey-López, J. P., de Rezende, L. F., Pastor-Valero, M., & Tess, B. H. (2014). The prevalence of metabolically healthy obesity : A systematic review and critical evaluation of the definitions used. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *15*(10), 781-790. https://doi.org/10.1111/obr.12198

Rh, E., Sm, G., & Pz, Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet (London, England)*, *365*(9468). https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66378-7

Richard, A. J., White, U., Elks, C. M., & Stephens, J. M. (2000). Adipose Tissue : Physiology to Metabolic Dysfunction. In K. R. Feingold, B. Anawalt, M. R. Blackman, A. Boyce, G. Chrousos, E. Corpas, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, N. Kapoor, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, … D. P. Wilson (Éds.), *Endotext*. MDText.com, Inc. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555602/

Richard, A. J., White, U., Elks, C. M., & Stephens, J. M. (2020). Adipose Tissue : Physiology to Metabolic Dysfunction. In *Endotext [Internet]*. MDText.com, Inc. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555602/

Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., Griffin, N. W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C. F., Funai, K., Hayashi, D. K., Lyle, B. J., Martini, M. C., Ursell, L. K., Clemente, J. C., … Gordon, J. I. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6150), 1241214. https://doi.org/10.1126/science.1241214

Riis-Vestergaard, M. J., Richelsen, B., Bruun, J. M., Li, W., Hansen, J. B., & Pedersen, S. B. (2020). Beta-1 and Not Beta-3 Adrenergic Receptors May Be the Primary Regulator of Human Brown Adipocyte Metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *105*(4), dgz298. https://doi.org/10.1210/clinem/dgz298

Roda, J. M., Parihar, R., Magro, C., Nuovo, G. J., Tridandapani, S., & Carson, W. E. (2006). Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Research*, *66*(1), 517-526. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2429

Rodbell, M. (1964). METABOLISM OF ISOLATED FAT CELLS. I. EFFECTS OF HORMONES ON GLUCOSE METABOLISM AND LIPOLYSIS. *The Journal of Biological Chemistry*, *239*, 375-380.

Rodbell, M. (1966a). Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase C (Clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, *241*(1), 130-139.

Rodbell, M. (1966b). The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin. *The Journal of Biological Chemistry*, *241*(17), 3909-3917.

Rodbell, M., & Jones, A. B. (1966). Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase C (Clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *The Journal of Biological Chemistry*, *241*(1), 140-142.

Rodeheffer, M. S., Birsoy, K., & Friedman, J. M. (2008). Identification of White Adipocyte Progenitor Cells In Vivo. *Cell*, *135*(2), 240-249. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.036

Roh, H. C., Tsai, L. T. Y., Shao, M., Tenen, D., Shen, Y., Kumari, M., Lyubetskaya, A., Jacobs, C., Dawes, B., Gupta, R. K., & Rosen, E. D. (2018). Warming Induces Significant Reprogramming of Beige, but Not Brown, Adipocyte Cellular Identity. *Cell Metabolism*, *27*(5), 1121-1137.e5. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.005

Rolland-Cachera, M. F., Cole, T. J., Sempé, M., Tichet, J., Rossignol, C., & Charraud, A. (1991). Body Mass Index variations : Centiles from birth to 87 years. *European Journal of Clinical Nutrition*, *45*(1), 13-21.

Rome, S., Blandin, A., & Le Lay, S. (2021). Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles : State of the Art. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 1788. https://doi.org/10.3390/ijms22041788

Rönn, M., Lind, L., van Bavel, B., Salihovic, S., Michaëlsson, K., & Lind, P. M. (2011). Circulating levels of persistent organic pollutants associate in divergent ways to fat mass measured by DXA in humans. *Chemosphere*, *85*(3), 335-343. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.095

Rosenquist, K. J., Massaro, J. M., Pedley, A., Long, M. T., Kreger, B. E., Vasan, R. S., Murabito, J. M., Hoffmann, U., & Fox, C. S. (2015). Fat quality and incident cardiovascular disease, all-cause mortality, and cancer mortality. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *100*(1), 227-234. https://doi.org/10.1210/jc.2013-4296

Rosenquist, K. J., Pedley, A., Massaro, J. M., Therkelsen, K. E., Murabito, J. M., Hoffmann, U., & Fox, C. S. (2013). Visceral and subcutaneous fat quality and cardiometabolic risk. *JACC. Cardiovascular Imaging*, *6*(7), 762-771. https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2012.11.021

Ross, R., Neeland, I. J., Yamashita, S., Shai, I., Seidell, J., Magni, P., Santos, R. D., Arsenault, B., Cuevas, A., Hu, F. B., Griffin, B. A., Zambon, A., Barter, P., Fruchart, J.-C., Eckel, R. H., Matsuzawa, Y., & Després, J.-P. (2020). Waist circumference as a vital sign in clinical practice : A Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. *Nature Reviews. Endocrinology*, *16*(3), 177-189. https://doi.org/10.1038/s41574-019-0310-7

Ross, R., Shaw, K. D., Martel, Y., de Guise, J., & Avruch, L. (1993). Adipose tissue distribution measured by magnetic resonance imaging in obese women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *57*(4), 470-475. https://doi.org/10.1093/ajcn/57.4.470

Ross, R., Shaw, K. D., Rissanen, J., Martel, Y., de Guise, J., & Avruch, L. (1994). Sex differences in lean and adipose tissue distribution by magnetic resonance imaging : Anthropometric relationships. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *59*(6), 1277-1285. https://doi.org/10.1093/ajcn/59.6.1277

Rouault, C., Pellegrinelli, V., Schilch, R., Cotillard, A., Poitou, C., Tordjman, J., Sell, H., Clément, K., & Lacasa, D. (2013). Roles of chemokine ligand-2 (CXCL2) and neutrophils in influencing endothelial cell function and inflammation of human adipose tissue. *Endocrinology*, *154*(3), 1069-1079. https://doi.org/10.1210/en.2012-1415

Rozsívalová, K., Pierzynová, A., Kratochvílová, H., Lindner, J., Lipš, M., Kotulák, T., Ivák, P., Netuka, I., Haluzík, M., & Kučera, T. (2020). Increased Number of Mast Cells in Epicardial Adipose Tissue of Cardiac Surgery Patients With Coronary Artery Disease. *Physiological Research*, *69*(4), 621-631. https://doi.org/10.33549/physiolres.934344

Rubino, F., Cummings, D. E., Eckel, R. H., Cohen, R. V., Wilding, J. P. H., Brown, W. A., Stanford, F. C., Batterham, R. L., Farooqi, I. S., Farpour-Lambert, N. J., le Roux, C. W., Sattar, N., Baur, L. A., Morrison, K. M., Misra, A., Kadowaki, T., Tham, K. W., Sumithran, P., Garvey, W. T., … Mingrone, G. (2025). Definition and diagnostic criteria of clinical obesity. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, S2213-8587(24)00316-4. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(24)00316-4

Ruiz-Ramie, J. J., Barber, J. L., & Sarzynski, M. A. (2019). Effects of exercise on HDL functionality. *Current Opinion in Lipidology*, *30*(1), 16-23. https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000568

Ruparelia, N., & Choudhury, R. (2020). Inflammation and atherosclerosis : What is on the horizon? *Heart (British Cardiac Society)*, *106*(1), 80-85. https://doi.org/10.1136/heartjnl-2018-314230

Russo, L., & Lumeng, C. N. (2018). Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology*, *155*(4), 407-417. https://doi.org/10.1111/imm.13002

Rutter, G. A., Da Silva Xavier, G., & Leclerc, I. (2003). Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homoeostasis. *The Biochemical Journal*, *375*(Pt 1), 1-16. https://doi.org/10.1042/BJ20030048

Sacco, E., Bientinesi, R., Tienforti, D., Racioppi, M., Gulino, G., D'Agostino, D., Vittori, M., & Bassi, P. (2014). Discovery history and clinical development of mirabegron for the treatment of overactive bladder and urinary incontinence. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *9*(4), 433-448. https://doi.org/10.1517/17460441.2014.892923

Sacks, H. S., & Fain, J. N. (2007). Human epicardial adipose tissue : A review. *American Heart Journal*, *153*(6), 907-917. https://doi.org/10.1016/j.ahj.2007.03.019

Sacks, H. S., Fain, J. N., Bahouth, S. W., Ojha, S., Frontini, A., Budge, H., Cinti, S., & Symonds, M. E. (2013). Adult Epicardial Fat Exhibits Beige Features. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *98*(9), E1448-E1455. https://doi.org/10.1210/jc.2013-1265

Sacks, H. S., Fain, J. N., Cheema, P., Bahouth, S. W., Garrett, E., Wolf, R. Y., Wolford, D., & Samaha, J. (2011). Inflammatory genes in epicardial fat contiguous with coronary atherosclerosis in the metabolic syndrome and type 2 diabetes : Changes associated with pioglitazone. *Diabetes Care*, *34*(3), 730-733. https://doi.org/10.2337/dc10-2083

Sacks, H. S., Fain, J. N., Holman, B., Cheema, P., Chary, A., Parks, F., Karas, J., Optican, R., Bahouth, S. W., Garrett, E., Wolf, R. Y., Carter, R. A., Robbins, T., Wolford, D., & Samaha, J. (2009). Uncoupling protein-1 and related messenger ribonucleic acids in human epicardial and other adipose tissues : Epicardial fat functioning as brown fat. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *94*(9), 3611-3615. https://doi.org/10.1210/jc.2009-0571

Sadurskis, A., Dicker, A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (1995). Polyunsaturated fatty acids recruit brown adipose tissue : Increased UCP content and NST capacity. *The American Journal of Physiology*, *269*(2 Pt 1), E351-360. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.269.2.E351

Safaei, M., Sundararajan, E. A., Driss, M., Boulila, W., & Shapi'i, A. (2021). A systematic literature review on obesity : Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity. *Computers in Biology and Medicine*, *136*, 104754. https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104754

Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., & Tsujisaki, M. (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans : Effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*, *58*(7), 1526-1531. https://doi.org/10.2337/db09-0530

Sakers, A., Siqueira, M. K. D., Seale, P., & Villanueva, C. J. (2022). Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell*, *185*(3), 419-446. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.016

Salgado-Somoza, A., Teijeira-Fernández, E., Fernández, A. L., González-Juanatey, J. R., & Eiras, S. (2010). Proteomic analysis of epicardial and subcutaneous adipose tissue reveals differences in proteins involved in oxidative stress. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *299*(1), H202-209. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00120.2010

Samocha-Bonet, D., Dixit, V. D., Kahn, C. R., Leibel, R. L., Lin, X., Nieuwdorp, M., Pietiläinen, K. H., Rabasa-Lhoret, R., Roden, M., Scherer, P. E., Klein, S., & Ravussin, E. (2014). Metabolically healthy and unhealthy obese—The 2013 Stock Conference report. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *15*(9), 697-708. https://doi.org/10.1111/obr.12199

Samson, S. L., & Garber, A. J. (2014). Metabolic syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *43*(1), 1-23. https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.09.009

Sandoval-Bórquez, A., Carrión, P., Hernández, M. P., Pérez, J. A., Tapia-Castillo, A., Vecchiola, A., Fardella, C. E., & Carvajal, C. A. (2024). Adipose Tissue Dysfunction and the Role of Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles in Obesity and Metabolic Syndrome. *Journal of the Endocrine Society*, *8*(8), bvae126. https://doi.org/10.1210/jendso/bvae126

Sanz-Ros, J., Romero-García, N., Mas-Bargues, C., Monleón, D., Gordevicius, J., Brooke, R. T., Dromant, M., Díaz, A., Derevyanko, A., Guío-Carrión, A., Román-Domínguez, A., Inglés, M., Blasco, M. A., Horvath, S., Viña, J., & Borrás, C. (2022). Small extracellular vesicles from young adipose-derived stem cells prevent frailty, improve health span, and decrease epigenetic age in old mice. *Science Advances*, *8*(42), eabq2226. https://doi.org/10.1126/sciadv.abq2226

Sardinha, L. B., Lohman, T. G., Teixeira, P. J., Guedes, D. P., & Going, S. B. (1998). Comparison of air displacement plethysmography with dual-energy X-ray absorptiometry and 3 field methods

for estimating body composition in middle-aged men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *68*(4), 786-793. https://doi.org/10.1093/ajcn/68.4.786

Sawaki, D., Czibik, G., Pini, M., Ternacle, J., Suffee, N., Mercedes, R., Marcelin, G., Surenaud, M., Marcos, E., Gual, P., Clément, K., Hue, S., Adnot, S., Hatem, S. N., Tsuchimochi, I., Yoshimitsu, T., Hénégar, C., & Derumeaux, G. (2018). Visceral Adipose Tissue Drives Cardiac Aging Through Modulation of Fibroblast Senescence by Osteopontin Production. *Circulation*, *138*(8), 809-822. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031358

Scheen, A. J. (2021). Chapitre 18—Médicaments et prise de poids. In J.-M. Lecerf, K. Clément, S. Czernichow, M. Laville, J.-M. Oppert, F. Pattou, & O. Ziegler (Éds.), *Les Obésités* (p. 91-95). Elsevier Masson. https://doi.org/10.1016/B978-2-294-76753-1.00018-7

Schipper, H. S., Prakken, B., Kalkhoven, E., & Boes, M. (2012). Adipose tissue-resident immune cells : Key players in immunometabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *23*(8), 407-415. https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.011

Schleh, M. W., Caslin, H. L., Garcia, J. N., Mashayekhi, M., Srivastava, G., Bradley, A. B., & Hasty, A. H. (2023). Metaflammation in obesity and its therapeutic targeting. *Science Translational Medicine*, *15*(723), eadf9382. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adf9382

Schleinitz, D., Böttcher, Y., Blüher, M., & Kovacs, P. (2014). The genetics of fat distribution. *Diabetologia*, *57*(7), 1276-1286. https://doi.org/10.1007/s00125-014-3214-z

Schmid, S. M., Hallschmid, M., & Schultes, B. (2015). The metabolic burden of sleep loss. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, *3*(1), 52-62. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70012-9

Schuijs, M. J., & Halim, T. Y. F. (2018). Group 2 innate lymphocytes at the interface between innate and adaptive immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1417*(1), 87-103. https://doi.org/10.1111/nyas.13604

Sciarretta, F., Ninni, A., Zaccaria, F., Chiurchiù, V., Bertola, A., Karlinsey, K., Jia, W., Ceci, V., Di Biagio, C., Xu, Z., Gaudioso, F., Tortolici, F., Tiberi, M., Zhang, J., Carotti, S., Boudina, S., Grumati, P., Zhou, B., Brestoff, J. R., … Lettieri-Barbato, D. (2024). Lipid-associated macrophages reshape BAT cell identity in obesity. *Cell Reports*, *43*(7), 114447. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114447

Scott, R. A., Fall, T., Pasko, D., Barker, A., Sharp, S. J., Arriola, L., Balkau, B., Barricarte, A., Barroso, I., Boeing, H., Clavel-Chapelon, F., Crowe, F. L., Dekker, J. M., Fagherazzi, G., Ferrannini, E., Forouhi, N. G., Franks, P. W., Gavrila, D., Giedraitis, V., … Wareham, N. J. (2014). Common genetic variants highlight the role of insulin resistance and body fat distribution in type 2 diabetes, independent of obesity. *Diabetes*, *63*(12), 4378-4387. https://doi.org/10.2337/db14-0319

Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., & Spiegelman, B. M. (2007). Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16. *Cell metabolism*, *6*(1), 38-54. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.06.001

Seravalle, G., & Grassi, G. (2017). Obesity and hypertension. *Pharmacological Research*, *122*, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.013

Shafiei-Jahani, P., Hurrell, B. P., Galle-Treger, L., Helou, D. G., Howard, E., Painter, J., Lo, R., Lewis, G., Soroosh, P., & Akbari, O. (2020). DR3 stimulation of adipose resident ILC2s ameliorates type 2 diabetes mellitus. *Nature Communications*, *11*(1), 4718. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18601-7

Shaihov-Teper, O., Ram, E., Ballan, N., Brzezinski, R. Y., Naftali-Shani, N., Masoud, R., Ziv, T., Lewis, N., Schary, Y., Levin-Kotler, L.-P., Volvovitch, D., Zuroff, E. M., Amunts, S., Regev-Rudzki, N., Sternik, L., Raanani, E., Gepstein, L., & Leor, J. (2021). Extracellular Vesicles From

Epicardial Fat Facilitate Atrial Fibrillation. *Circulation*, *143*(25), 2475-2493. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052009

Sharp, L. Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D. W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., & Kajimura, S. (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PloS One*, *7*(11), e49452. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049452

Shen, B., Fang, Y., Wu, N., & Gould, S. J. (2011). Biogenesis of the posterior pole is mediated by the exosome/microvesicle protein-sorting pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(51), 44162-44176. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274803

Shimada, Y. J., Tsugawa, Y., Brown, D. F. M., & Hasegawa, K. (2016). Bariatric Surgery and Emergency Department Visits and Hospitalizations for Heart Failure Exacerbation : Population-Based, Self-Controlled Series. *Journal of the American College of Cardiology*, *67*(8), 895-903. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.12.016

Shu, H., Cheng, J., Li, N., Zhang, Z., Nie, J., Peng, Y., Wang, Y., Wang, D. W., & Zhou, N. (2023). Obesity and atrial fibrillation : A narrative review from arrhythmogenic mechanisms to clinical significance. *Cardiovascular Diabetology*, *22*(1), 192. https://doi.org/10.1186/s12933-023-01913-5

Sidossis, L., & Kajimura, S. (2015). Brown and beige fat in humans : Thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(2), 478-486. https://doi.org/10.1172/JCI78362

Silaghi, A., Achard, V., Paulmyer-Lacroix, O., Scridon, T., Tassistro, V., Duncea, I., Clément, K., Dutour, A., & Grino, M. (2007). Expression of adrenomedullin in human epicardial adipose tissue : Role of coronary status. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *293*(5), E1443-1450. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00273.2007

Silaghi, A., Piercecchi-Marti, M.-D., Grino, M., Leonetti, G., Alessi, M. C., Clement, K., Dadoun, F., & Dutour, A. (2008). Epicardial adipose tissue extent : Relationship with age, body fat distribution, and coronaropathy. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *16*(11), 2424-2430. https://doi.org/10.1038/oby.2008.379

Singh, S. P., McClung, J. A., Thompson, E., Glick, Y., Greenberg, M., Acosta-Baez, G., Edris, B., Shapiro, J. I., & Abraham, N. G. (2019). Cardioprotective Heme Oxygenase-1-PGC1α Signaling in Epicardial Fat Attenuates Cardiovascular Risk in Humans as in Obese Mice. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *27*(10), 1634-1643. https://doi.org/10.1002/oby.22608

Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., & Hauner, H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *92*(3), 1023-1033. https://doi.org/10.1210/jc.2006-1055

Snijder, M. B., Dekker, J. M., Visser, M., Bouter, L. M., Stehouwer, C. D. A., Kostense, P. J., Yudkin, J. S., Heine, R. J., Nijpels, G., & Seidell, J. C. (2003). Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes : The Hoorn Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *77*(5), 1192-1197. https://doi.org/10.1093/ajcn/77.5.1192

Sonnenberg, G. F., & Artis, D. (2015). Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nature Medicine*, *21*(7), 698-708. https://doi.org/10.1038/nm.3892

Sørensen, T. I. A. (2009). Conference on « Multidisciplinary approaches to nutritional problems ». Symposium on « Diabetes and health ». Challenges in the study of causation of obesity. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *68*(1), 43-54. https://doi.org/10.1017/S0029665108008847

Speakman, J. R. (2018). The evolution of body fatness : Trading off disease and predation risk. *The Journal of Experimental Biology*, *221*(Pt Suppl 1), jeb167254. https://doi.org/10.1242/jeb.167254

Spiegel, K., Leproult, R., & Van Cauter, E. (1999). Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet (London, England)*, *354*(9188), 1435-1439. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01376-8

Spiegel, K., Tasali, E., Penev, P., & Van Cauter, E. (2004). Brief communication : Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Annals of Internal Medicine*, *141*(11), 846-850. https://doi.org/10.7326/0003-4819-141-11-200412070-00008

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. J., Mebius, R. E., Powrie, F., & Vivier, E. (2013). Innate lymphoid cells—A proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews. Immunology*, *13*(2), 145-149. https://doi.org/10.1038/nri3365

Stansbury, C. M., Dotson, G. A., Pugh, H., Rehemtulla, A., Rajapakse, I., & Muir, L. A. (2023). A lipid-associated macrophage lineage rewires the spatial landscape of adipose tissue in early obesity. *JCI Insight*, *8*(19), e171701. https://doi.org/10.1172/jci.insight.171701

Stefan, N., Häring, H.-U., Hu, F. B., & Schulze, M. B. (2013). Metabolically healthy obesity : Epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, *1*(2), 152-162. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70062-7

Stefanovic-Racic, M., Yang, X., Turner, M. S., Mantell, B. S., Stolz, D. B., Sumpter, T. L., Sipula, I. J., Dedousis, N., Scott, D. K., Morel, P. A., Thomson, A. W., & O'Doherty, R. M. (2012). Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c+ cells in adipose tissue and liver. *Diabetes*, *61*(9), 2330-2339. https://doi.org/10.2337/db11-1523

Stern, J. H., Rutkowski, J. M., & Scherer, P. E. (2016). Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis Through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell metabolism*, *23*(5), 770-784. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.011

Strissel, K. J., DeFuria, J., Shaul, M. E., Bennett, G., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2010). T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *18*(10), 1918-1925. https://doi.org/10.1038/oby.2010.1

Strissel, K. J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J. W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*, *56*(12), 2910-2918. https://doi.org/10.2337/db07-0767

Sun, W., Dong, H., Balaz, M., Slyper, M., Drokhlyansky, E., Colleluori, G., Giordano, A., Kovanicova, Z., Stefanicka, P., Balazova, L., Ding, L., Husted, A. S., Rudofsky, G., Ukropec, J., Cinti, S., Schwartz, T. W., Regev, A., & Wolfrum, C. (2020). snRNA-seq reveals a subpopulation of adipocytes that regulates thermogenesis. *Nature*, *587*(7832), 98-102. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2856-x

Sundara Rajan, S., & Longhi, M. P. (2016). Dendritic cells and adipose tissue. *Immunology*, *149*(4), 353-361. https://doi.org/10.1111/imm.12653

Sung, B. H., Ketova, T., Hoshino, D., Zijlstra, A., & Weaver, A. M. (2015). Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nature Communications*, *6*, 7164. https://doi.org/10.1038/ncomms8164

Swarup, S., Ahmed, I., Grigorova, Y., & Zeltser, R. (2024). Metabolic Syndrome. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459248/

Swinburn, B. A., Craig, P. L., Daniel, R., Dent, D. P., & Strauss, B. J. (1996). Body composition differences between Polynesians and Caucasians assessed by bioelectrical impedance. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *20*(10), 889-894.

Talukdar, S., Oh, D. Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Lu, M., Li, P., Yan, Q., Zhu, Y., Ofrecio, J., Lin, M., Brenner, M. B., & Olefsky, J. M. (2012). Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nature Medicine*, *18*(9), 1407-1412. https://doi.org/10.1038/nm.2885

Tanyanskiy, D. A., Shavva, V. S., Dizhe, E. B., Oleinikova, G. N., Lizunov, A. V., Nekrasova, E. V., Mogilenko, D. A., Larionova, E. E., Orlov, S. V., & Denisenko, A. D. (2022). Adiponectin Stimulates Apolipoprotein A-1 Gene Expression in HepG2 Cells via AMPK, PPARα, and LXRs Signaling Mechanisms. *Biochemistry. Biokhimiia*, *87*(11), 1252-1259. https://doi.org/10.1134/S0006297922110049

Tchernof, A., & Després, J.-P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity : An update. *Physiological Reviews*, *93*(1), 359-404. https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2011

Testa, R., Olivieri, F., Bonfigli, A. R., Sirolla, C., Boemi, M., Marchegiani, F., Marra, M., Cenerelli, S., Antonicelli, R., Dolci, A., Paolisso, G., & Franceschi, C. (2006). Interleukin-6-174 G > C polymorphism affects the association between IL-6 plasma levels and insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *71*(3), 299-305. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2005.07.007

Thanassoulis, G., Massaro, J. M., O'Donnell, C. J., Hoffmann, U., Levy, D., Ellinor, P. T., Wang, T. J., Schnabel, R. B., Vasan, R. S., Fox, C. S., & Benjamin, E. J. (2010). Pericardial fat is associated with prevalent atrial fibrillation : The Framingham Heart Study. *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology*, *3*(4), 345-350. https://doi.org/10.1161/CIRCEP.109.912055

Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes : A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *166*(12), 7309-7318. https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7309

Thomas, D., & Apovian, C. (2017). Macrophage functions in lean and obese adipose tissue. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *72*, 120-143. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.04.005

Thomas, V., Clark, J., & Doré, J. (2015). Fecal microbiota analysis : An overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future Microbiology*, *10*(9), 1485-1504. https://doi.org/10.2217/fmb.15.87

Thomou, T., Mori, M. A., Dreyfuss, J. M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., Rao, T. N., Winnay, J. N., Garcia-Martin, R., Grinspoon, S. K., Gorden, P., & Kahn, C. R. (2017). Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*, *542*(7642), 450-455. https://doi.org/10.1038/nature21365

Tona, F., Serra, R., Di Ascenzo, L., Osto, E., Scarda, A., Fabris, R., Montisci, R., Famoso, G., Tellatin, S., Foletto, M., Giovagnoni, A., Iliceto, S., & Vettor, R. (2014). Systemic inflammation is related to coronary microvascular dysfunction in obese patients without obstructive coronary disease. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, *24*(4), 447-453. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2013.09.021

Torres, S. V., Man, K., Elmzzahi, T., Malko, D., Chisanga, D., Liao, Y., Prout, M., Abbott, C. A., Tang, A., Wu, J., Becker, M., Mason, T., Haynes, V., Tsui, C., Shakiba, M. H., Hamada, D., Britt, K., Groom, J. R., McColl, S. R., … Kallies, A. (2024). Two regulatory T cell populations in the visceral adipose tissue shape systemic metabolism. *Nature Immunology*, *25*(3), 496-511. https://doi.org/10.1038/s41590-024-01753-9

Toubal, A., Kiaf, B., Beaudoin, L., Cagninacci, L., Rhimi, M., Fruchet, B., da Silva, J., Corbett, A. J., Simoni, Y., Lantz, O., Rossjohn, J., McCluskey, J., Lesnik, P., Maguin, E., & Lehuen, A. (2020). Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and intestinal dysbiosis leading to metabolic dysfunction during obesity. *Nature Communications*, *11*(1), 3755. https://doi.org/10.1038/s41467-020-17307-0

Toubal, A., & Lehuen, A. (2021). Role of MAIT cells in metabolic diseases. *Molecular Immunology*, *130*, 142-147. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.12.014

Tran, C. M., Mukherjee, S., Ye, L., Frederick, D. W., Kissig, M., Davis, J. G., Lamming, D. W., Seale, P., & Baur, J. A. (2016). Rapamycin Blocks Induction of the Thermogenic Program in White Adipose Tissue. *Diabetes*, *65*(4), 927-941. https://doi.org/10.2337/db15-0502

Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P., Gilfillan, S., & Lantz, O. (2003). Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature*, *422*(6928), 164-169. https://doi.org/10.1038/nature01433

Trevor, L. V., Riches-Suman, K., Mahajan, A. L., & Thornton, M. J. (2020). Adipose Tissue : A Source of Stem Cells with Potential for Regenerative Therapies for Wound Healing. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(7), 2161. https://doi.org/10.3390/jcm9072161

Tricarico, C., Clancy, J., & D'Souza-Schorey, C. (2017). Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*, *8*(4), 220-232. https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1215283

Tune, J. D., Goodwill, A. G., Sassoon, D. J., & Mather, K. J. (2017). Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *183*, 57-70. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.01.001

Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host & Microbe*, *3*(4), 213-223. https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, *444*(7122), 1027-1031. https://doi.org/10.1038/nature05414

Uldry, M., Yang, W., St-Pierre, J., Lin, J., Seale, P., & Spiegelman, B. M. (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metabolism*, *3*(5), 333-341. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.04.002

Ussar, S., Lee, K. Y., Dankel, S. N., Boucher, J., Haering, M.-F., Kleinridders, A., Thomou, T., Xue, R., Macotela, Y., Cypess, A. M., Tseng, Y.-H., Mellgren, G., & Kahn, C. R. (2014). Asc-1, PAT2 and P2RX5 are novel cell surface markers for white, beige and brown adipocytes. *Science translational medicine*, *6*(247), 247ra103. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008490

Vague, J. (1956). The degree of masculine differentiation of obesities : A factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *4*(1), 20-34. https://doi.org/10.1093/ajcn/4.1.20

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, *9*(6), 654-659. https://doi.org/10.1038/ncb1596

van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews*, *64*(3), 676-705. https://doi.org/10.1124/pr.112.005983

van Baak, M. A., Hul, G. B. J., Toubro, S., Astrup, A., Gottesdiener, K. M., DeSmet, M., & Saris, W. H. M. (2002). Acute effect of L-796568, a novel beta 3-adrenergic receptor agonist, on energy expenditure in obese men. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *71*(4), 272-279. https://doi.org/10.1067/mcp.2002.122527

van Beek, L., Lips, M. A., Visser, A., Pijl, H., Ioan-Facsinay, A., Toes, R., Berends, F. J., Willems van Dijk, K., Koning, F., & van Harmelen, V. (2014). Increased systemic and adipose tissue inflammation differentiates obese women with T2DM from obese women with normal glucose tolerance. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *63*(4), 492-501. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.12.002

van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M. A. F. L., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., & Teule, G. J. J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England Journal of Medicine*, *360*(15), 1500-1508. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808718

van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M. S., Rubinstein, E., & Raposo, G. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Developmental Cell*, *21*(4), 708-721. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019

van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *19*(4), 213-228. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125

van Vliet-Ostaptchouk, J. V., Nuotio, M.-L., Slagter, S. N., Doiron, D., Fischer, K., Foco, L., Gaye, A., Gögele, M., Heier, M., Hiekkalinna, T., Joensuu, A., Newby, C., Pang, C., Partinen, E., Reischl, E., Schwienbacher, C., Tammesoo, M.-L., Swertz, M. A., Burton, P., … Wolffenbuttel, B. H. (2014). The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe : A collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocrine Disorders*, *14*, 9. https://doi.org/10.1186/1472-6823-14-9

Velho, S., Paccaud, F., Waeber, G., Vollenweider, P., & Marques-Vidal, P. (2010). Metabolically healthy obesity : Different prevalences using different criteria. *European Journal of Clinical Nutrition*, *64*(10), 1043-1051. https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.114

Vély, F., Barlogis, V., Vallentin, B., Neven, B., Piperoglou, C., Perchet, T., Petit, M., Yessaad, N., Touzot, F., Bruneau, J., Mahlaoui, N., Zucchini, N., Farnarier, C., Michel, G., Moshous, D., Blanche, S., Dujardin, A., Spits, H., Distler, J. H. W., … Vivier, E. (2016). Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. *Nature immunology*, *17*(11), 1291-1299. https://doi.org/10.1038/ni.3553

Verdot, C., Salanave, B., Aubert, S., Varela, A. R., & Deschamps, V. (2022). Prevalence of Physical Activity and Sedentary Behaviors in the French Population : Results and Evolution between Two Cross-Sectional Population-Based Studies, 2006 and 2016. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(4). https://doi.org/10.3390/ijerph19042164

Verma, S., Bhatt, D. L., Bain, S. C., Buse, J. B., Mann, J. F. E., Marso, S. P., Nauck, M. A., Poulter, N. R., Pratley, R. E., Zinman, B., Michelsen, M. M., Monk Fries, T., Rasmussen, S., Leiter, L. A., & LEADER Publication Committee on behalf of the LEADER Trial Investigators. (2018). Effect of Liraglutide on Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Polyvascular Disease : Results of the LEADER Trial. *Circulation*, *137*(20), 2179-2183. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033898

Vianello, E., Dozio, E., Arnaboldi, F., Marazzi, M. G., Martinelli, C., Lamont, J., Tacchini, L., Sigrüner, A., Schmitz, G., & Corsi Romanelli, M. M. (2016). Epicardial adipocyte hypertrophy : Association with M1-polarization and toll-like receptor pathways in coronary artery disease patients. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, *26*(3), 246-253. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2015.12.005

Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martin-Cofreces, N., Martinez-Herrera, D. J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes

through binding to specific motifs. *Nature Communications*, *4*, 2980. https://doi.org/10.1038/ncomms3980

Virtue, S., & Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome—An allostatic perspective. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1801*(3), 338-349. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.12.006

Vishvanath, L., & Gupta, R. K. (2019). Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, *129*(10), 4022-4031. https://doi.org/10.1172/JCI129191

Visiedo, F., Bugatto, F., Sánchez, V., Cózar-Castellano, I., Bartha, J. L., & Perdomo, G. (2013). High glucose levels reduce fatty acid oxidation and increase triglyceride accumulation in human placenta. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *305*(2), E205-212. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00032.2013

Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. J., Mebius, R. E., Powrie, F., & Spits, H. (2018). Innate Lymphoid Cells : 10 Years On. *Cell*, *174*(5), 1054-1066. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017

Volpato, S., Guralnik, J. M., Ferrucci, L., Balfour, J., Chaves, P., Fried, L. P., & Harris, T. B. (2001). Cardiovascular disease, interleukin-6, and risk of mortality in older women : The women's health and aging study. *Circulation*, *103*(7), 947-953. https://doi.org/10.1161/01.cir.103.7.947

Volpe, M., Rubattu, S., & Burnett, J. (2014). Natriuretic peptides in cardiovascular diseases : Current use and perspectives. *European Heart Journal*, *35*(7), 419-425. https://doi.org/10.1093/eurheartj/eht466

Vyas, V., Blythe, H., Wood, E. G., Sandhar, B., Sarker, S.-J., Balmforth, D., Ambekar, S. G., Yap, J., Edmondson, S. J., Di Salvo, C., Wong, K., Roberts, N., Uppal, R., Adams, B., Shipolini, A., Oo, A. Y., Lawrence, D., Kolvekar, S., Lall, K. S., … Longhi, M. P. (2021). Obesity and diabetes are major risk factors for epicardial adipose tissue inflammation. *JCI Insight*, *6*(16), e145495. https://doi.org/10.1172/jci.insight.145495

Waldén, T. B., Hansen, I. R., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2012). Recruited vs. Nonrecruited molecular signatures of brown, « brite, » and white adipose tissues. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *302*(1), E19-31. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00249.2011

Walford, H. H., Lund, S. J., Baum, R. E., White, A. A., Bergeron, C. M., Husseman, J., Bethel, K. J., Scott, D. R., Khorram, N., Miller, M., Broide, D. H., & Doherty, T. A. (2014). Increased ILC2s in the eosinophilic nasal polyp endotype are associated with corticosteroid responsiveness. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, *155*(1), 126-135. https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.09.007

Wang, G., Muñoz-Rojas, A. R., Spallanzani, R. G., Franklin, R. A., Benoist, C., & Mathis, D. (2024). Adipose-tissue Treg cells restrain differentiation of stromal adipocyte precursors to promote insulin sensitivity and metabolic homeostasis. *Immunity*, *57*(6), 1345-1359.e5. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.04.002

Wang, H., Shen, L., Sun, X., Liu, F., Feng, W., Jiang, C., Chu, X., Ye, X., Jiang, C., Wang, Y., Zhang, P., Zang, M., Zhu, D., & Bi, Y. (2019). Adipose group 1 innate lymphoid cells promote adipose tissue fibrosis and diabetes in obesity. *Nature Communications*, *10*(1), 3254. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11270-1

Wang, L., Liu, Y., Li, K., Zhang, W., Yuan, Y., Ma, K., Zhou, F., Cheng, Z., Geng, J., Su, Y., Guo, Z., Blake, G. M., Cheng, X., Liu, Y., Engelke, K., & Vlug, A. G. (2024). Age and BMI have different effects on subcutaneous, visceral, liver, bone marrow, and muscle adiposity, as measured by CT and MRI. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *32*(7), 1339-1348. https://doi.org/10.1002/oby.24040

Wang, T., Sharma, A. K., & Wolfrum, C. (2022). Novel insights into adipose tissue heterogeneity. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, *23*(1), 5-12. https://doi.org/10.1007/s11154-021-09703-8

Wang, Y.-N., Tang, Y., He, Z., Ma, H., Wang, L., Liu, Y., Yang, Q., Pan, D., Zhu, C., Qian, S., & Tang, Q.-Q. (2021). Slit3 secreted from M2-like macrophages increases sympathetic activity and thermogenesis in adipose tissue. *Nature Metabolism*, *3*(11), 1536-1551. https://doi.org/10.1038/s42255-021-00482-9

Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., Dugar, B., Feldstein, A. E., Britt, E. B., Fu, X., Chung, Y.-M., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J. D., Allayee, H., Tang, W. H. W., DiDonato, J. A., Lusis, A. J., & Hazen, S. L. (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, *472*(7341), 57-63. https://doi.org/10.1038/nature09922

Wankhade, U. D., Lee, J.-H., Dagur, P. K., Yadav, H., Shen, M., Chen, W., Kulkarni, A. B., McCoy, J. P., Finkel, T., Cypess, A. M., & Rane, S. G. (2018a). TGF-β receptor 1 regulates progenitors that promote browning of white fat. *Molecular Metabolism*, *16*, 160-171. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.07.008

Wankhade, U. D., Lee, J.-H., Dagur, P. K., Yadav, H., Shen, M., Chen, W., Kulkarni, A. B., McCoy, J. P., Finkel, T., Cypess, A. M., & Rane, S. G. (2018b). TGF-β receptor 1 regulates progenitors that promote browning of white fat. *Molecular Metabolism*, *16*, 160-171. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.07.008

Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*(1), 115-124. https://doi.org/10.1172/JCI24335

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1796-1808. https://doi.org/10.1172/JCI19246

Wells, J. C. K. (2013). Obesity as malnutrition : The dimensions beyond energy balance. *European Journal of Clinical Nutrition*, *67*(5), 507-512. https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.31

Welsh, J. A., Goberdhan, D. C. I., O'Driscoll, L., Buzas, E. I., Blenkiron, C., Bussolati, B., Cai, H., Di Vizio, D., Driedonks, T. A. P., Erdbrügger, U., Falcon-Perez, J. M., Fu, Q.-L., Hill, A. F., Lenassi, M., Lim, S. K., Mahoney, M. G., Mohanty, S., Möller, A., Nieuwland, R., … Witwer, K. W. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023) : From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*, *13*(2), e12404. https://doi.org/10.1002/jev2.12404

Wensveen, F. M., Valentić, S., Šestan, M., Turk Wensveen, T., & Polić, B. (2015). The "Big Bang" in obese fat : Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. *European Journal of Immunology*, *45*(9), 2446-2456. https://doi.org/10.1002/eji.201545502

Wentworth, J. M., Naselli, G., Brown, W. A., Doyle, L., Phipson, B., Smyth, G. K., Wabitsch, M., O'Brien, P. E., & Harrison, L. C. (2010). Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes*, *59*(7), 1648-1656. https://doi.org/10.2337/db09-0287

Weyer, C., Tataranni, P. A., Snitker, S., Danforth, E., & Ravussin, E. (1998). Increase in insulin action and fat oxidation after treatment with CL 316,243, a highly selective beta3-adrenoceptor agonist in humans. *Diabetes*, *47*(10), 1555-1561. https://doi.org/10.2337/diabetes.47.10.1555

White, D. A., Fang, L., Chan, W., Morand, E. F., Kiriazis, H., Duffy, S. J., Taylor, A. J., Dart, A. M., Du, X.-J., & Gao, X.-M. (2013). Pro-inflammatory action of MIF in acute myocardial infarction via activation of peripheral blood mononuclear cells. *PloS One*, *8*(10), e76206. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076206

WHO European Regional Obesity Report 2022. (s. d.). Consulté 21 mai 2024, à l'adresse https://www.who.int/europe/publications/i/item/9789289057738

Wilhelm, C., Harrison, O. J., Schmitt, V., Pelletier, M., Spencer, S. P., Urban, J. F., Ploch, M., Ramalingam, T. R., Siegel, R. M., & Belkaid, Y. (2016). Critical role of fatty acid metabolism in ILC2-mediated barrier protection during malnutrition and helminth infection. *The Journal of Experimental Medicine*, *213*(8), 1409-1418. https://doi.org/10.1084/jem.20151448

Wilkins, K., Campbell, N. R. C., Joffres, M. R., McAlister, F. A., Nichol, M., Quach, S., Johansen, H. L., & Tremblay, M. S. (2010). Blood pressure in Canadian adults. *Health Reports*, *21*(1), 37-46.

Willms, E., Johansson, H. J., Mäger, I., Lee, Y., Blomberg, K. E. M., Sadik, M., Alaarg, A., Smith, C. I. E., Lehtiö, J., El Andaloussi, S., Wood, M. J. A., & Vader, P. (2016). Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific Reports*, *6*, 22519. https://doi.org/10.1038/srep22519

Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., Nolte-'t Hoen, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M. H., & Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*, *2*. https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360

Wolf, Y., Boura-Halfon, S., Cortese, N., Haimon, Z., Sar Shalom, H., Kuperman, Y., Kalchenko, V., Brandis, A., David, E., Segal-Hayoun, Y., Chappell-Maor, L., Yaron, A., & Jung, S. (2017). Brown-adipose-tissue macrophages control tissue innervation and homeostatic energy expenditure. *Nature Immunology*, *18*(6), 665-674. https://doi.org/10.1038/ni.3746

Wong, C. X., Abed, H. S., Molaee, P., Nelson, A. J., Brooks, A. G., Sharma, G., Leong, D. P., Lau, D. H., Middeldorp, M. E., Roberts-Thomson, K. C., Wittert, G. A., Abhayaratna, W. P., Worthley, S. G., & Sanders, P. (2011). Pericardial fat is associated with atrial fibrillation severity and ablation outcome. *Journal of the American College of Cardiology*, *57*(17), 1745-1751. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.11.045

Wong, C. X., Sullivan, T., Sun, M. T., Mahajan, R., Pathak, R. K., Middeldorp, M., Twomey, D., Ganesan, A. N., Rangnekar, G., Roberts-Thomson, K. C., Lau, D. H., & Sanders, P. (2015). Obesity and the Risk of Incident, Post-Operative, and Post-Ablation Atrial Fibrillation : A Meta-Analysis of 626,603 Individuals in 51 Studies. *JACC. Clinical Electrophysiology*, *1*(3), 139-152. https://doi.org/10.1016/j.jacep.2015.04.004

Wright, S. M., & Aronne, L. J. (2012). Causes of obesity. *Abdominal Imaging*, *37*(5), 730-732. https://doi.org/10.1007/s00261-012-9862-x

Wu, D., Molofsky, A. B., Liang, H.-E., Ricardo-Gonzalez, R. R., Jouihan, H. A., Bando, J. K., Chawla, A., & Locksley, R. M. (2011). Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, *332*(6026), 243-247. https://doi.org/10.1126/science.1201475

Wu, H., Ghosh, S., Perrard, X. D., Feng, L., Garcia, G. E., Perrard, J. L., Sweeney, J. F., Peterson, L. E., Chan, L., Smith, C. W., & Ballantyne, C. M. (2007). T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation*, *115*(8), 1029-1038. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.638379

Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., & Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, *150*(2), 366-376. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016

Wu, S., Qiu, C., Ni, J., Guo, W., Song, J., Yang, X., Sun, Y., Chen, Y., Zhu, Y., Chang, X., Sun, P., Wang, C., Li, K., & Han, X. (2024). M2 macrophages independently promote beige adipogenesis

via blocking adipocyte Ets1. *Nature Communications*, *15*(1), 1646. https://doi.org/10.1038/s41467-024-45899-4

Xu, F., Lin, B., Zheng, X., Chen, Z., Cao, H., Xu, H., Liang, H., & Weng, J. (2016). GLP-1 receptor agonist promotes brown remodelling in mouse white adipose tissue through SIRT1. *Diabetologia*, *59*(5), 1059-1069. https://doi.org/10.1007/s00125-016-3896-5

Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., & Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1821-1830. https://doi.org/10.1172/JCI19451

Xu, L., Kitade, H., Ni, Y., & Ota, T. (2015). Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomolecules*, *5*(3), 1563-1579. https://doi.org/10.3390/biom5031563

Yaghootkar, H., Lotta, L. A., Tyrrell, J., Smit, R. A. J., Jones, S. E., Donnelly, L., Beaumont, R., Campbell, A., Tuke, M. A., Hayward, C., Ruth, K. S., Padmanabhan, S., Jukema, J. W., Palmer, C. C., Hattersley, A., Freathy, R. M., Langenberg, C., Wareham, N. J., Wood, A. R., … Frayling, T. M. (2016). Genetic Evidence for a Link Between Favorable Adiposity and Lower Risk of Type 2 Diabetes, Hypertension, and Heart Disease. *Diabetes*, *65*(8), 2448-2460. https://doi.org/10.2337/db15-1671

Yamashita, T., Sekiguchi, A., Iwasaki, Y., Date, T., Sagara, K., Tanabe, H., Suma, H., Sawada, H., & Aizawa, T. (2010). Recruitment of immune cells across atrial endocardium in human atrial fibrillation. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, *74*(2), 262-270. https://doi.org/10.1253/circj.cj-09-0644

Yan, J., Burman, A., Nichols, C., Alila, L., Showe, L. C., Showe, M. K., Boyer, B. B., Barnes, B. M., & Marr, T. G. (2006). Detection of differential gene expression in brown adipose tissue of hibernating arctic ground squirrels with mouse microarrays. *Physiological Genomics*, *25*(2), 346-353. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00260.2005

Yang, J.-M., & Gould, S. J. (2013). The cis-acting signals that target proteins to exosomes and microvesicles. *Biochemical Society Transactions*, *41*(1), 277-282. https://doi.org/10.1042/BST20120275

Yang, M., Zhang, Y., Zhao, W., Ge, M., Sun, X., Zhang, G., & Dong, B. (2023). Individual and combined associations of body mass index and waist circumference with components of metabolic syndrome among multiethnic middle-aged and older adults : A cross-sectional study. *Frontiers in Endocrinology*, *14*, 1078331. https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1078331

Yao, J., Wu, D., & Qiu, Y. (2022). Adipose tissue macrophage in obesity-associated metabolic diseases. *Frontiers in Immunology*, *13*, 977485. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.977485

Yengo, L., Sidorenko, J., Kemper, K. E., Zheng, Z., Wood, A. R., Weedon, M. N., Frayling, T. M., Hirschhorn, J., Yang, J., Visscher, P. M., & GIANT Consortium. (2018). Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ∼700000 individuals of European ancestry. *Human Molecular Genetics*, *27*(20), 3641-3649. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy271

Yerramasu, A., Dey, D., Venuraju, S., Anand, D. V., Atwal, S., Corder, R., Berman, D. S., & Lahiri, A. (2012). Increased volume of epicardial fat is an independent risk factor for accelerated progression of sub-clinical coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *220*(1), 223-230. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.041

Ying, W., Riopel, M., Bandyopadhyay, G., Dong, Y., Birmingham, A., Seo, J. B., Ofrecio, J. M., Wollam, J., Hernandez-Carretero, A., Fu, W., Li, P., & Olefsky, J. M. (2017). Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity. *Cell*, *171*(2), 372-384.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.035

Ying, W., Wollam, J., Ofrecio, J. M., Bandyopadhyay, G., El Ouarrat, D., Lee, Y. S., Oh, D. Y., Li, P., Osborn, O., & Olefsky, J. M. (2017). Adipose tissue B2 cells promote insulin resistance through leukotriene LTB4/LTB4R1 signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, *127*(3), 1019-1030. https://doi.org/10.1172/JCI90350

Young, P., Arch, J. R., & Ashwell, M. (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Letters*, *167*(1), 10-14. https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80822-4

Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., Kohlwein, S. D., Haemmerle, G., Lass, A., & Madeo, F. (2012). FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metabolism*, *15*(3), 279-291. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.018

Zhang, X., Wang, X., Yin, H., Zhang, L., Feng, A., Zhang, Q.-X., Lin, Y., Bao, B., Hernandez, L. L., Shi, G.-P., & Liu, J. (2019). Functional Inactivation of Mast Cells Enhances Subcutaneous Adipose Tissue Browning in Mice. *Cell Reports*, *28*(3), 792-803.e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.044

Zhang, X.-Z., Chen, X.-L., Tang, T.-T., Zhang, S., Li, Q.-L., Xia, N., Nie, S.-F., Zhang, M., Zhu, Z.-F., Zhou, Z.-H., Dong, N.-G., & Cheng, X. (2023). T lymphocyte characteristics and immune repertoires in the epicardial adipose tissue of heart failure patients. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1126997

Zhang, Y., Mei, H., Chang, X., Chen, F., Zhu, Y., & Han, X. (2016). Adipocyte-derived microvesicles from obese mice induce M1 macrophage phenotype through secreted miR-155. *Journal of Molecular Cell Biology*, *8*(6), 505-517. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjw040

Zhang, Y., Shi, L., Mei, H., Zhang, J., Zhu, Y., Han, X., & Zhu, D. (2015). Inflamed macrophage microvesicles induce insulin resistance in human adipocytes. *Nutrition & Metabolism*, *12*, 21. https://doi.org/10.1186/s12986-015-0016-3

Zhao, H., Shang, Q., Pan, Z., Bai, Y., Li, Z., Zhang, H., Zhang, Q., Guo, C., Zhang, L., & Wang, Q. (2018). Exosomes From Adipose-Derived Stem Cells Attenuate Adipose Inflammation and Obesity Through Polarizing M2 Macrophages and Beiging in White Adipose Tissue. *Diabetes*, *67*(2), 235-247. https://doi.org/10.2337/db17-0356

Zhao, L., Zhao, B.-H., Ruze, A., Li, Q.-L., Deng, A.-X., & Gao, X.-M. (2024). Distinct roles of MIF in the pathogenesis of ischemic heart disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *80*, 121-137. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2024.10.005

Zhao, S., Zhu, Y., Schultz, R. D., Li, N., He, Z., Zhang, Z., Caron, A., Zhu, Q., Sun, K., Xiong, W., Deng, H., Sun, J., Deng, Y., Kim, M., Lee, C. E., Gordillo, R., Liu, T., Odle, A. K., Childs, G. V., … Scherer, P. E. (2019). Partial Leptin Reduction as an Insulin Sensitization and Weight Loss Strategy. *Cell metabolism*, *30*(4), 706-719.e6. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.005

Zheng, S., Li, Z., Song, J., Liu, J., & Miao, C. (2016). Metrnl : A secreted protein with new emerging functions. *Acta Pharmacologica Sinica*, *37*(5), 571-579. https://doi.org/10.1038/aps.2016.9

Zhou, Y., & Tan, C. (2020). miRNAs in Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles : Multiple Roles in Development of Obesity-Associated Disease. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*, 171. https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00171

Zhuang, X., Wu, B., Li, J., Shi, H., Jin, B., & Luo, X. (2017). The emerging role of interleukin-37 in cardiovascular diseases. *Immunity, Inflammation and Disease*, *5*(3), 373-379. https://doi.org/10.1002/iid3.159

Zimmerman, B., Kelly, B., McMillan, B. J., Seegar, T. C. M., Dror, R. O., Kruse, A. C., & Blacklow, S. C. (2016). Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell*, *167*(4), 1041-1051.e11. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.056

Zink, J., Booker, R., Wolff-Hughes, D. L., Allen, N. B., Carnethon, M. R., Alexandria, S. J., & Berrigan, D. (2024). Longitudinal associations of screen time, physical activity, and sleep

duration with body mass index in U.S. youth. *The International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, *21*(1), 35. https://doi.org/10.1186/s12966-024-01587-6

Zinser, M. E., Highton, A. J., Kurioka, A., Kronsteiner, B., Hagel, J., Leng, T., Marchi, E., Phetsouphanh, C., Willberg, C. B., Dunachie, S. J., & Klenerman, P. (2018). Human MAIT cells show metabolic quiescence with rapid glucose-dependent upregulation of granzyme B upon stimulation. *Immunology and Cell Biology*, *96*(6), 666-674. https://doi.org/10.1111/imcb.12020

Zois, N. E., Bartels, E. D., Hunter, I., Kousholt, B. S., Olsen, L. H., & Goetze, J. P. (2014). Natriuretic peptides in cardiometabolic regulation and disease. *Nature Reviews. Cardiology*, *11*(7), 403-412. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.64

Zúñiga, L. A., Shen, W.-J., Joyce-Shaikh, B., Pyatnova, E. A., Richards, A. G., Thom, C., Andrade, S. M., Cua, D. J., Kraemer, F. B., & Butcher, E. C. (2010). IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *185*(11), 6947-6959. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001269

Annexes

Annexe 1 | Revue de la littérature : Beiging du tissu adipeux épicardique, Doukbi *et al.*

REVUE

Browning Epicardial Adipose Tissue: Friend or Foe?

Doukbi Elisa, Soghomonian Astrid, Sengenès Coralie, Ahmed Shaista, Ancel Patricia, Dutour Anne & Gaborit Bénédicte

Publiée dans *Cells,* 2022

cells

MDPI

Review

Browning Epicardial Adipose Tissue: Friend or Foe?

Elisa Doukbi [1,†], Astrid Soghomonian [1,2,†], Coralie Sengenès [3,4], Shaista Ahmed [1], Patricia Ancel [1], Anne Dutour [1,2,‡] and Bénédicte Gaborit [1,2,*,‡]

1 INSERM, INRAE, C2VN, Aix-Marseille University, F-13005 Marseille, France; elisa.doukbi@univ-amu.fr (E.D.); astrid.soghomonian@gmail.com (A.S.); shaistaahmed.sh@gmail.com (S.A.); patricia.ancel@univ-amu.fr (P.A.); anne.dutour@ap-hm.fr (A.D.)
2 Department of Endocrinology, Metabolic Diseases and Nutrition, Pôle ENDO, APHM, F-13005 Marseille, France
3 Stromalab, CNRS ERL5311, EFS, INP-ENVT, INSERM U1031, University of Toulouse, F-31100 Toulouse, France; coralie.sengenes@inserm.fr
4 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, University Paul Sabatier, F-31100 Toulouse, France
* Correspondence: benedicte.gaborit@ap-hm.fr
† These authors contributed equally to this work.
‡ These authors contributed equally to this work.

Abstract: The epicardial adipose tissue (EAT) is the visceral fat depot of the heart which is highly plastic and in direct contact with myocardium and coronary arteries. Because of its singular proximity with the myocardium, the adipokines and pro-inflammatory molecules secreted by this tissue may directly affect the metabolism of the heart and coronary arteries. Its accumulation, measured by recent new non-invasive imaging modalities, has been prospectively associated with the onset and progression of coronary artery disease (CAD) and atrial fibrillation in humans. Recent studies have shown that EAT exhibits beige fat-like features, and express uncoupling protein 1 (UCP-1) at both mRNA and protein levels. However, this thermogenic potential could be lost with age, obesity and CAD. Here we provide an overview of the physiological and pathophysiological relevance of EAT and further discuss whether its thermogenic properties may serve as a target for obesity therapeutic management with a specific focus on the role of immune cells in this beiging phenomenon.

Keywords: epicardial adipose tissue; ectopic fat; immune cells; beiging; browning; adipose tissue; heart; coronary artery disease; innate lymphoid cells

check for updates

Citation: Doukbi, E.; Soghomonian, A.; Sengenès, C.; Ahmed, S.; Ancel, P.; Dutour, A.; Gaborit, B. Browning Epicardial Adipose Tissue: Friend or Foe? *Cells* **2022**, *11*, 991. https://doi.org/10.3390/cells11060991

Academic Editor: Alexander E. Kalyuzhny

Received: 27 January 2022
Accepted: 9 March 2022
Published: 14 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Epicardial adipose tissue (EAT) is a visceral adipose tissue located between the myocardium and the inner layer of the pericardium. EAT is characterized by its cardioprotective functions in physiological conditions and its increased expression of thermogenic genes giving its adipocytes a beige/brite phenotype. This metabolically active tissue has endocrine properties, and a special location that makes it able to modulate the structure and function of the myocardium. In many clinical studies, EAT has been associated with the appearance of cardiovascular diseases such as atrial fibrillation (AF) and coronary artery disease (CAD), but also with their severity [1]. In recent years, non-invasive imaging studies revealed that addition of artificial intelligence (AI) deep learning approaches EAT quantification to current risk assessment tools resulted in a significant net reclassification improvement for major adverse cardiovascular events (MACE). Transcriptional studies revealed that EAT exhibits high expression of the beige adipocyte-specific marker CD137, and also thermogenic genes such as UCP-1, PRDM16, PGC-1α, PPARγ and BAT-specific genes such as actin alpha 1 (ACTA1), PPARγ co-activator 1 alpha (PPARGC1A), troponin C type 1, and troponin I type 1 compared to the subcutaneous adipose tissue (SAT) [2,3]. On the other hand, EAT beiging or browning phenomenon could have a benefit effect

on cardiovascular diseases. Beiging process is the appearance of beige cells with thermogenic function in the white adipose tissue (WAT), that contributes to energy expenditure through nonshivering thermogenesis [4–6]. Many cellular and molecular actors have been shown to participate in the browning of WAT such as mastocytes, eosinophils, alternatively activated macrophages, innate lymphoid cells; IL-13, IL-5, IL-4, amphiregulins, methionine/enkephalin, atrial natriuretic peptides (ANP), and could represent future anti-obese therapeutic targets. However, far less is known about the loss of EAT browning with age, obesity, or CAD.

In this review, we will focus on the beiging or browning of EAT in cardiovascular and metabolic diseases and its link with immune cells.

2. The Epicardial Adipose Tissue

2.1. Physiological Features

The EAT is an ectopic fat depot located between the myocardium and the visceral pericardium. The close proximity between the adipose and the cardiac tissue allows functional and anatomical relationships. Both share the same microcirculation, with no fascia separating the two layers, allowing cellular exchanges [7]. Moreover, the EAT represents 20% of the heart weight under physiological conditions [8,9]. On the other hand, in terms of total fat mass it represents only 1%, which is far from the mass of the abdominal visceral adipose tissue (VAT) [9]. Among the several functions of this tissue, there is a mechanical function. Indeed, it can protect coronary arteries against torsion induced by the arterial pulse wave and cardiac contraction [9]. Another putative function related to the EAT is its local energy storage for the heart, but also its protective role against elevated levels of free fatty acids (FFAs) in the microcirculation [10]. This function is very important since the myocardium metabolizes FFAs from the coronary arterial blood, and their oxidation is responsible for about 50–70% of the energy production of the heart, so EAT can be seen as a buffer to protect the heart against lipotoxicity or lack of energetic substrate [7]. Besides, the rate of fatty acids (FA) release by EAT is approximately twice that of other fat depots [11]. It is also possible to distinguish EAT from other visceral fat depots by its higher capacity to uptake FFAs and its lower rate of glucose utilization, suggesting a high plasticity in lipid metabolism activity for this ectopic fat depot [12].

Epicardial adipocytes are smaller than subcutaneous and visceral adipocytes [13] and one of the particularities of these adipocytes is their beige phenotype [3]. It has been hypothesized to function like brown adipose tissue and generate heat in response to cold temperatures and activate the autonomic nervous system [14,15]. This leads to another putative function of the EAT which is the protection of the heart against hypothermia. We will discover next in this review that the beige character of EAT provides many opportunities to better understand its physiological role and to discover new molecular targets to prevent CVD.

2.2. EAT as an Endocrine Organ

More than a fat depot, EAT is increasingly recognized as an endocrine organ being a source of many bioactive molecules that can modulate the myocardium's and coronary arteries' homeostasis [16–19]. Two main hypotheses exist to explain how EAT-derived secreted molecules can interact with coronary arteries [20,21]. First, the paracrine signaling which assumes that EAT-derived adipokines diffuse directly through the layers (adventitia, media and intima) of the vascular wall via the interstitial fluid to interact with smooth muscle [17,22,23]. Then, the vasocrine signaling hypothesis, which implies that adipokines and FFAs directly enter into the vasa vasorum and are transported downstream into the arterial wall [20,24]. But more recently, a new communication mode has been evidenced implicating extracellular vesicles (EVs) containing various cytokines and microRNAs [25]. In this article, Shaihov-Teper et al. demonstrated that EAT is able to address EVs carrying proinflammatory, profibrotic and proarrhythmic molecules to the atria.

Among these bioactive molecules interleukins (IL) (IL-1β, IL-6, IL-8, IL10), adiponectin, plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), adrenomedullin, phospholipase A2, tumor necrosis factor α (TNF-α), monocyte chemoattractive protein 1 (MCP-1), omentin, leptin, visfatin, resistin have been identified (Figure 1) [26–29]. Although some of these molecules have physiologically positive effects, such as adiponectin, or omentin, the imbalance between protective and deleterious adipokines secreted by EAT may participate in the proinflammatory phenotype associated with endothelial dysfunction and atherogenesis [30]. Indeed, under physiological conditions some adipokines secreted by the epicardial fat such as adiponectin, adrenomedullin and omentin are supposed to protect the vasculature from oxidative stress or regulate the arterial vascular tone and improve endothelial function [9]. Adrenomedullin and its receptors expressed in EAT are regulated by coronary status and this hormone can play a cardioprotective role by inhibiting oxidative stress [27]. By contrast, harmful effects of pro-inflammatory cytokines expressed by EAT such as IL-1β, IL-6, TNFα, PAI-1, MCP-1 have also been reported [30]. In 2008, Cheng et al. showed that tissue levels of leptin, visfatin, IL-6 and TNFα were higher in EAT from CAD patients compared to non-CAD patients [31]. Increased levels of TNF or its soluble receptors have been implicated in ischemia-reperfusion injury, myocarditis, cardiac allograft and also in the progression of congestive heart failure [22,32,33]. Adipo-fibrokines such as activin-A or matrix metalloproteinases (MMPs) also participate in extracellular matrix remodeling and could be involved in fibrogenesis [24]. On the other hand, not only can the EAT influence the heart and coronary arteries, EAT is also able to receive biological signals from the heart and thus in return will be able to modify its secretome, indicating a crosstalk between EAT and the cardiovascular system [34]. In particular, researchers noticed in EAT that the expression of the gene encoding for adiponectin *ADIPOQ* was positively associated with myocardial oxidative stress [34,35] probably through an adaptive mechanism. Usually, an increased expression of *ADIPOQ* is correlated to a reduced myocardial nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-derived O_2 (−) production. But in the study of Antonopoulos and colleagues, the crosstalk between myocardium and EAT translates into the induction of O_2 (−) in H9C2 cardiomyocytes. This results in the production of transferable factors that up-regulate adiponectin expression in EAT via peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR-γ) [35]. This work showed that not only can EAT communicate with the myocardium, but the opposite also exists.

2.3. Immune Cellular Composition of EAT

Because of the singular proximity between the myocardium and the EAT, the adipokines and pro-inflammatory molecules secreted by the EAT may directly affect the metabolism of the heart and coronary arteries. Its particular secretome (epicardial adipokines) switches to a proinflammatory profile in obesity and CAD and can induce atherogenic changes in monocytes and endothelial cells [36–40]. Thus, inflammation could be linked to an unbalance in immune cells. In this part we will develop what is known about immune cells in EAT and how immune cells may also induce EAT extracellular matrix remodeling and could also have a role in EAT browning.

The epicardial stroma vascular fraction includes numerous nervous, nodal, and inflammatory or non-inflammatory immune cells in addition to stromal cells [7,41]. Among cells of the immune system present in the EAT, adaptive cells can be found, notably T and B lymphocytes, as well as innate cells such as macrophages, mast cells, and dendritic cells. Table 1 provides a unique comparison of the presence or absence of immune cell subtypes infiltration in the EAT and VAT compared to SAT in mice and humans in the context of obesity.

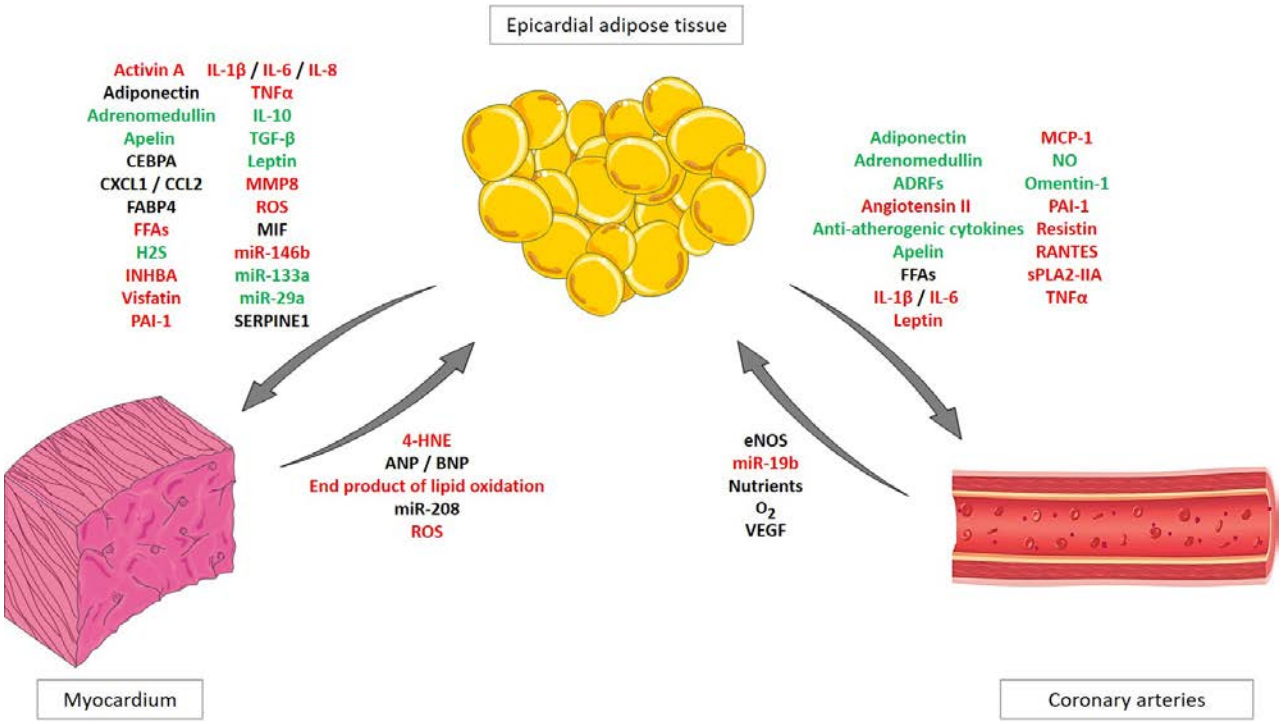


Figure 1. The crosstalk between epicardial adipose tissue and the cardiovascular system. A local crosstalk takes place between EAT (epicardial adipocytes and other EAT composing cells) and the cardiovascular system (e.g., myocardium and coronary arteries). Physiological and pathophysiological signals such as cytokines, adipokines or fibrokines can be released from EAT to cardiomyocytes (and from myocardium to EAT) or coronary artery endothelial cells (grey arrows). Theses cytokines can have protective and/or beneficial effects (green) or harmful effects (red). Other molecules' effects are still not well established or are controversial (black).

First, among phagocytic cells, macrophages are the most abundant immune cells found in the adipose tissue of mice and humans [42]. It is reported that macrophage can be present in adipose tissue in two different states i.e., pro-inflammatory classically activated known as M1; or anti-inflammatory alternatively known as M2 [43]. Aron-Wisnewsky et al. showed increased CD40 (M1) and reduced CD206 (M2) macrophages in VAT compared to SAT [44]. In EAT, studies have shown the existence of macrophage infiltration in the tissue, linking their polarization with the coronary status of patients [45–47]. Remarkably, Hirata et al. characterized the phenotype of macrophages and demonstrated that M1 macrophages are increased and M2 macrophages are decreased in EAT of CAD compared to non-CAD patients [45]. Recently, a study has also suggested that an elevated number of macrophages appeared to be associated with severe deterioration of heart function in CAD patients [23].

Other innate cells are present in EAT, among them, dendritic cells, (DCs) which can be subdivided into two categories: conventional DCs (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs). cDCs initiate primary T-cell responses, thereby orchestrating adaptive immunity. In contrast, pDCs do not stimulate naive T cells, but can be converted into cDC-like cells upon activation and function as antigen presenting cells (APCs) [48]. DCs are significantly increased in obesity, and promote macrophage infiltration in adipose tissue and liver [49]. In EAT, Mráz et al., reported for the first time in 2019 the presence of both types of DCs in human EAT [50]. They also demonstrated that pDCs were significantly increased in EAT of type 2 diabetic (T2D) compared to non-T2D patients.

Mast cells are commonly known for their role in several inflammatory and fibrotic diseases. Upon staining mast cells with tryptase and chymase, high levels of these cells were detected in obese omental adipose tissue [51]. Mazurek et al. by immunohistochemistry demonstrated the presence of mast cells in EAT [41].

Table 1. Summary of the presence or absence of immune cell subtypes infiltration within adipose tissues in the context of obesity and related complications. Arrows represent an increase (up arrows) or decrease (down arrows) of cells in EAT or VAT compared to SAT referenced in mice (red) and human (blue). N/A: not applicable; ND: not detectable.

	Immune Cells		EAT		VAT	
			EAT	References	VAT	References
Innate immune cells	Macrophages	M1	↑	Hirata et al., 2011; Vianello et al., 2016; Gurses et al., 2017	↑	Wisnewsky et al., 2009; Aron-Wisnewsky et al., 2009; Morris et al., 2011
		M2	↓	Hirata et al., 2011; Vianello et al., 2016; Gurses et al., 2017	↓	Wisnewsky et al., 2009; Aron-Wisnewsky et al., 2009; Morris et al., 2011
	Eosinophils		N/A	-	↑	Wu D et al., 2011; Molofsky et al., 2013
	Mast cells		Presence	Laine et al. 1999; Mazurek et al., 2003	↑	Divoux et al., 2012; Shi and Shi 2012
	Neutrophils		N/A	-	↑	Carmon et al., 2008; Talukdar et al., 2012
	Natural killers		↓	Mráz et al., 2019	↑↑	O'Rourke et al., 2013; Trim et al., 2018; Lee et al., 2016; Wensveen et al., 2015
	Dendritic cells		↑	Mráz et al., 2019; Horcksman et al., 2017	↑↑	Berthola et al., 2012; Bapat et al., 2015
	Innate lymphoid Cells (ILCs)	ILC1	N/A	-	↑	Everaere et al., 2017
		ILC2	N/A	-	↓	Everaere et al., 2017
		ILC3	N/A	-	N/A	-
Adaptative immune cells	T Lymphocytes	LTreg	N/A	-	↑	Feuerer et al., 2009; Bapat et al., 2015
		CD4+	ND	Hirata et al., 2011	↑/↓	Nishimura et al., 2009; Lee et al., 2016
		CD8+	↑	Hirata et al., 2011	↑↑	Duffaut et al., 2009; Bapat et al., 2015
	B Lymphocytes		↑	Mráz et al., 2019	↑	Bapat et al., 2015

Natural killer cells (NK) are well-known for killing virus-infected cells and controlling cancers [52]. In adipose tissue, it is suggested that NK cells recruitment, proliferation, and activation is stimulated by adipose tissue-resident macrophage derived secretory products [53]. These recruited NK cells within the adipose tissue might stimulate MCP-1 expression, which in turn causes macrophage infiltration [54]. In their 2009 study, Mráz et al. also reported a reduced number of NK cells in EAT of both CAD and non-CAD patients. In contrast, natural killer T cells (NKT cells) represent a subset of T lymphocytes along with NK cell surface markers [55]. A subset of NKT cells termed invariant NKT cells (iNKT) in adipose tissue maintains inflammation in quiescent state and regulates homeostasis of other anti-inflammatory immune cells, including M2 macrophages and Treg cells [56]. Their possible presence in EAT remains to be determined.

Other unconventional cells are interesting and should be given attention in the EAT: the first ones are type 2 innate lymphoid cells (ILC2s). ILC2s can be identified in adipose tissue [57], where they secrete IL-5 and IL-13 known to maintain insulin sensitivity in lean mice through the recruitment of eosinophils by IL5, and maintenance of M2 macrophages by IL-13 [58,59]. ILC2s may also control certain features of energy balance in mice, as IL-33-deficient mice (which have reduced functional ILC2s) develop spontaneous weight gain and fat mass on a low fat diet [57].

The other unconventional T cells that should be studied in EAT, but which have not been studied yet are gamma delta T cells (γδ T cells). In adipose tissue, they form between 5–15% of the total T cell compartment [60]. Kohlgruber et al. found that IL-17A-producing γδ T cells were the driving factor in promoting stromal-cell production of IL-33, which in turn promotes the maintenance of the adipose T-reg population. The authors further showed that mice lacking γδ T cells lacked the ability to regulate core body

temperature after a cold challenge. Indeed, their data would suggest that γδ T cells/IL17A axis promotes thermogenesis.

Cells from the adaptive immune system are also present in adipose tissue; Nishimura et al. demonstrated an infiltration of CD8+ T Lymphocytes (LT) early in the development of obesity [61]. They also showed that transfer of CD8+ T cells into CD8-deficient obese mice induces M1 macrophage infiltration leading to adipose tissue inflammation. With regard to B lymphocytes (LB), they promote adipose tissue macrophage recruitment and TNF-α production in mice fed a high-fat diet (HFD). LB have also been linked with the accumulation and differentiation of IFN-γ-producing CD4+ and CD8+ T-cells in murine adipose tissue [62]. In EAT, Mráz et al. analyzed lymphocyte subtypes using cytometry and immunohistochemistry in SAT and EAT of patients with and without CAD [63]. They showed higher T cell content in EAT of subjects with CAD compared to non-CAD patients. Notably, they also demonstrated that LB even represent a higher percentage of total lymphocytes in EAT compared to SAT. However, a more comprehensive assessment of different T lymphocyte subpopulations in EAT, as well as their relation with CAD, is still lacking.

2.4. EAT in Heart Diseases

The special location of this adipose tissue allows it to communicate directly with the cardiomyocytes but also with the vascular wall of the coronary arteries. Recent evidence suggests2 that EAT plays an important part in the development of an unfavorable metabolic and cardiovascular risk profile [26,37,64,65]. Indeed, accumulation of fat around the heart is a well-established factor associated with the development of CVD, CAD, AF and heart failure.

2.4.1. Coronary Artery Disease

Many studies have shown that EAT is significantly correlated with the extent and severity of CAD. In a large case-control study, the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis), increased EAT was associated with a higher risk of developing incident CAD in adult subjects with no history of CVD, which suggests a role of increased EAT volume to predict major coronary clinical events [66]. Some other case-control studies identified EAT volume as a strong predictor of myocardial ischemia [67] or flow-limit ischemia detected by fractional flow reserve [68]. In a recent prospective trial, Mahabadi et al. showed that EAT volume significantly predicted fatal and nonfatal coronary events independently of cardiovascular risk factors and CAC score (Coronary Artery Calcification score) [69]. EAT seems to be involved in early stages of atherogenesis. In a study using cold-pressor test, we previously showed, in healthy lean volunteers, a negative correlation between EAT amount and microvascular coronary vasodilation, an abnormality that can be detectable before the apparition of CAD, suggesting that EAT could be involved in endothelial dysfunction [70]. In asymptomatic subjects, EAT was associated with the presence and progression of coronary artery atherosclerosis especially in young subjects with low CAC score, suggesting that EAT may promote early atherosclerosis development [71,72].

All these findings support the hypothesis of the role of EAT in promoting the early stages of atherosclerotic plaque formation. The mechanisms by which EAT can cause atherosclerosis are complex and not completely understood.

Epicardial fat might alter the coronary arteries through multiple pathways. Due to its secretion of bioactive inflammatory molecules, EAT is now recognized as involved in the formation of atherosclerotic plaques, and the onset of CAD [41,73]. Moreover, EAT in CAD patients showed increased expression of genes implicated in oxidative stress [74], and it is well established that the production of reactive oxygen species (ROS) impairs myocardial function and reduces the number of vital cardiomyocytes [75]. Numerous research teams have been working on EAT candidate molecules that could be involved in CAD. We previously demonstrated that the secretory type II phospholipase A2 (sPLA2-IIA), which has been shown to be an independent risk factor for CAD, showed an increased expression

in EAT of CAD patients [26]. Other candidates such as catalase, carbonic anhydrase 1 (CAH1), phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1), glutathione S-transferase P (GSTP1), and protein disulfide isomerase (PDIA1), that are related to oxidative stress pathways, were found to have proteomic differences in EAT compared to SAT from CAD patients [76]. All these proteins, except catalase and CAH1, were increased in EAT compared to SAT and ROS production was higher in EAT than SAT. But these findings are associative studies and the causality of EAT-derived ROS in CAD remains to be demonstrated.

Furthermore, EAT could lead to endothelial dysfunction and vascular remodeling by secreting fatty acids and pro-inflammatory mediators and via inducing the adhesion of monocytes to endothelial cells and macrophage activation [38,45]. In vitro studies showed an increase of mast cells in the adventitia of coronary lesions [45]. Also, it should be noted that the presence of macrophages and mast cells in EAT could contribute to underlying vessel instability, which can lead to plaque rupture [77]. Very recent studies using machine learning approaches, artificial intelligence (AI), imaging and radiomic methods, have improved EAT functional characterization with the detection of perivascular adipose tissue inflammation and structural remodeling, that led to a striking improvement of cardiac risk prediction in high-risk individuals [78,79].

By all these mechanisms and as shown in clinical studies EAT volume is a strong independent predictor of CAD. However, a beneficial impact of the reduction of EAT quantity or immune cells infiltration in CAD remains to be proven.

2.4.2. Atrial Fibrillation

A growing body of evidence suggests that EAT can have a biological impact on cardiovascular tissues and could be implicated in the pathogenesis of AF [80–83]. Many studies have shown an association between EAT amount and the AF risk, severity and post ablation or electrical cardioversion recurrence.

The increase of total EAT volume was found to be associated with the prevalence of AF. In a large study Thanassoulis et al. reported a significant correlation between EAT volume and AF risk, independently of other measures of adiposity, and this association was maintained after adjusting on other AF risk factors [84]. In the same way, Nakanishi et al. demonstrated that peri-atrial EAT volume predicted the development of new-onset AF in patients with CAD, independently of the presence of hypertension, diabetes or left atrial enlargement [82]. Moreover, numerous studies have shown that EAT, surrounding the atria in particular, was linked to AF recurrence after ablation therapy [82,85]. These studies suggest that EAT is an important determinant of the AF substrate and the presence of other cardiovascular risk factors does not weaken this link.

The lack of fascia separating EAT from myocardium favors inflammatory infiltrates in the atrial wall, which could trigger arrhythmias [86,87]. EAT-secreted adipokines could contribute to structural remodeling of the atrial myocardium that promotes fibrosis. This remodeling could enhance the loss of cells connection, altering the propagation of the depolarizing wave and leading to conduction defects: formation of microcircuits and breakthrough of electrical impulses [88,89]. The amount of EAT could also exercise a mechanical effect on left ventricle (LV) and right ventricle (RV) filling and lead to an atria enlargement, which is one of the risk factors for AF [90].

Thus, EAT is an important determinant of AF which might predict the outcomes of rhythm control strategies and peri-atrial EAT volume assessment could contribute to the prevention and the management of AF, and especially in patients with CAD.

2.4.3. Cardiac Morphology and Function

EAT is anatomically and clinically related to cardiac morphology and function. An increased amount of EAT has been associated with increased LV mass and abnormal right ventricle geometry or subclinical dysfunction [24]. In patients without CVD, LV mass is correlated with the EAT thickness measured by echocardiography [91]. This is in accordance with autopsy findings which suggests that an increase in myocardial mass during

both LV and RV hypertrophy is associated with a proportional increase in EAT mass [8]. Increased LV mass and LV hypertrophy are independent risk factors for cardiovascular and all-cause mortality, so it can be supposed that the increment of EAT causes additional mass on both ventricles, which can enhance the cardiac work demands and lead to LV hypertrophy. Recently, innovative methods such as speckle tracking echocardiography (STE) or cardiovascular magnetic resonance (CMR) have allowed to study cardiac mechanics like strain, torsion, and synchrony of contraction, and thus highlight association of EAT volume and subtle abnormalities in cardiac structure and contractile function. In a study using STE, EAT was associated with longitudinal STE LV-dys-synchrony, longitudinal strain, circumferential LV-dys-synchrony, and LV twist [92] and in another study using CMR, in obese children, LV mass index, thickness, ejection fraction and peak longitudinal and circumferential strains were all correlated with EAT [93].

2.4.4. EAT and COVID-19

Given that obesity has been identified as an independent risk factor for complications and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19), great interest has been shown in the involvement of EAT in this disease. EAT would appear to express higher levels of ACE2 than subcutaneous adipose tissue, which could make it a preferred viral reservoir [94]. Several studies have shown that EAT is a major driver of COVID-19 severity [94]. Using computed tomography (CT) scans and semi-automatic software, Cosson et al. demonstrated that volume was associated with the severity of COVID-19 and with transfer to intensive care unit (ICU) or death [95]. Iacobellis et al. showed that the density of EAT, reflecting inflammatory status, increased with rising COVID-19 severity [96]. Furthermore, the authors observed that EAT density was significantly reduced after treatment by dexamethasone, suggesting that EAT could be targeted by anti-inflammatory treatment [97]. Moreover, numerous studies have highlighted the possible implication of EAT in myocardial inflammation through its anatomical and functional relationship with the myocardium [94,98,99]. The EAT inflammatory secretome, such as interleukin-6 (IL-6), cytokine found in excess in severe COVID-19 patients, may be a key element in cardiac complications [98].

2.5. Effect of Exercise, Weight Loss, Pharmacological Intervention on EAT

Multiple studies have revealed that exercise, bariatric surgery and pharmacological intervention can reduce EAT volume [100–103]. Our team demonstrated a significant reduction of EAT amount after bariatric surgery [100]. We should underline that the EAT decrease was less important than the decrease in VAT. We also evaluated the EAT volume by MRI after pharmacological intervention. In a randomized type 2 diabetes (T2D) patient study, comparing exenatide (a glucagon-like peptide-1 agonist) versus reference treatment of T2D, according to French guidelines, we found a significant reduction of EAT volume after 26 weeks of treatment in the exenatide group in comparison to reference treatment [101]. Other treatments like statins [104] or SGLT-2 inhibitors [105–107] showed also a significant depletion of EAT. Some studies have found a benefit of physical exercise on EAT reduction in overweight subjects [102,103]. In a meta-analysis, it was demonstrated that supervised endurance training in particular decrease EAT amount with no involvement of total duration of the training [102]. However, Jonker et al. [108], found no difference after 6 months of preparation for a 12-day trekking expedition, which raises questions about the exercise effect. In total, all of these interventional studies focus on the changes of EAT volume without assessing changes in EAT characteristics such as its inflammation profile and its browning. What is still unknown is whether this reduction of EAT is associated with a modification in its composition or not. The diminution of EAT thickness might be related to the reduction of its inflammatory status, which has been suggested by a recent study performing a secretome analysis on EAT biopsies of patients under statins, but the results are too scarce and more investigations are needed [109]. Recently, using perivascular Fat Attenuation Index (FAI), an AI intelligence tool in CT scan that

captures attenuation gradients of EAT surrounding coronary arteries (perivascular adipose tissue PVAT), Antoniades et al. analyzed the impact of pharmacological interventions on PVAT inflammation [110]. The treatment of psoriasis with anti-inflammatory antibodies (anti-TNFa, anti-IL17, anti-IL12/23) showed a reduction in FAIpvat values, which means a reduction in EAT inflammation [111]. Hence, this tool could be used to assess the inflammatory status of the diminished EAT. However, if this index reflects also the change in browning is not known and needs complementary studies.

3. The Browning of Adipose Tissue

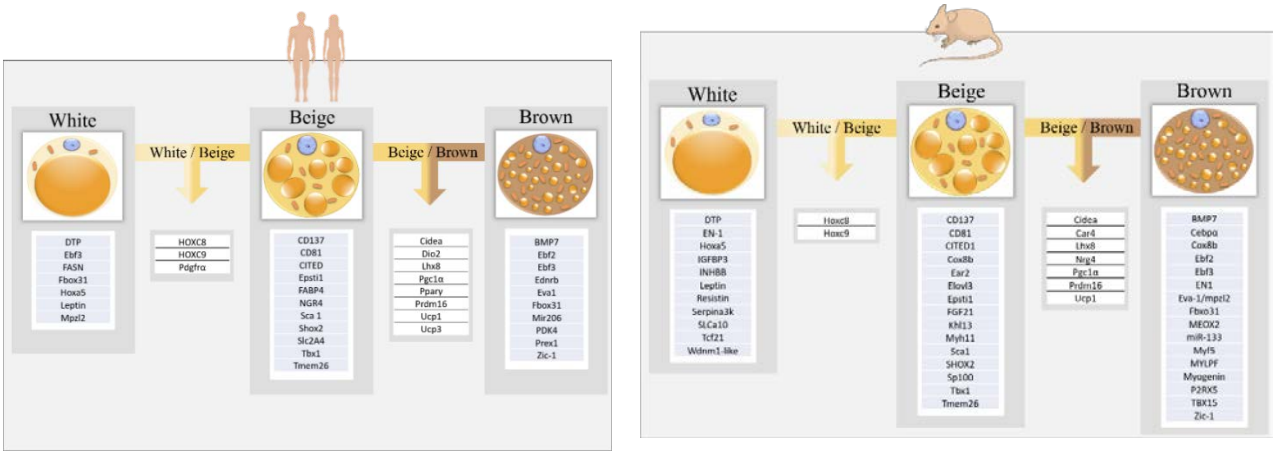
Until a few years ago, white and brown adipocyte tissues were the main adipose tissues found and studied in mammals. One of the principal functions of the WAT is to store a large number of nutrients, particularly lipids in the form of triglycerides that can be released as fatty acids when food becomes scarce [112]. This is probably why these cells contain a large vacuole capable of storing lipids. The BAT which is a natural defense system against hypothermia in mammals [113–117], is composed of smaller multilocular lipid droplets and numerous mitochondria. Indeed, WAT and BAT are dynamic tissues capable of a form of adaptation. In fact, they can respond to different forms of stress such as cold exposure for the BAT, or even starvation or overfeeding for the WAT [118–120]. The BAT is mainly defined as a heat producer [120]. The particularity of the BAT is that it can dissipate the energy in the form of heat, this process is called non-shivering thermogenesis and is the mean difference between WAT and BAT [120]. This thermogenic function comes from UCP-1 [121]. This protein inserted in the inner membrane of the mitochondria can be activated by cold exposure or food intake and acts as a proton channel that dissipates the electrochemical gradient produced by the oxidative phosphorylation without allowing the synthesis of ATP, the energy is then released as heat [122,123]. Recent studies using positron emission tomography (PET) reported the presence of metabolically active BAT within the neck and upper chest regions of human adults [124,125]. Thus, BAT has been shown to be an important regulator of energy expenditure, and a potential therapeutic target in obesity. But there are other adaptive changes that can be found in WAT and which are related to the thermogenic function of BAT. It is indeed possible in certain conditions to observe the appearance of 'brown-like' adipocytes in WAT [4–6].

A common definition of browning is the induction of a thermogenic function by WAT. These cells are then named beige or brite (brown-in-white) adipocytes and were first found in cold-acclimated mice [126], suggesting that WAT can acquire thermogenic properties. Beige adipocytes are characterized by multiple lipid droplets containing triglycerides and numerous mitochondria. These changes can occur when the cells are activated by thermogenic stimuli such as cold exposure [127,128] or stimulated by browning factors such as β3-adrenergic agonists [129–134], or glucagon like peptide 1 (GLP-1) agonists [135–138].

Beige adipocytes are mostly characterized by their expression of UCP-1 just like brown adipocytes but display distinct molecular signature from brown adipocytes in mouse and humans [127]. It has been evidenced that BAT comes from Myf5+ lineage precursors while beige adipocytes precursors are Myf5− and PDGFRα+ [127,139]. Moreover, to prove that beige and brown adipocytes are quite distinct, Wu et al. have studied beige cells from murine white fat depots [127]. They observed a gene expression profile distinct from white or brown fat in these beige adipocytes. But although a beige cell lineage exists, evidence of trans-differentiation from white to beige adipocytes in vivo has also been evidenced [140].

3.1. White, Brown, and Beige Adipocytes Markers

In order to better understand the mechanisms of browning, it is essential to be able to distinguish the different subtypes of adipocytes. For this purpose, there are many markers for white, brown and beige adipocytes in mice and humans. In this review, we tried to sum up the majority of these markers in Figure 2.



(**a**) (**b**)

Figure 2. White, Beige and Brown adipocyte markers in Human and Mouse. We summed up here genes reported in the literature as markers of white (WAT), beige and brown adipose tissues (BAT) and shared by beige and WAT or beige and BAT in humans (**a**) and mice (**b**).

3.1.1. White Adipocyte Markers

To begin, a common marker used in human and mice for white adipose tissue analyses is Leptin [141,142]. In mice subcutaneous WAT, it has been shown that white adipocytes expressed Asc-1 (also called solute carrier family 7 member 10 (SLC7a10)) specifically [143,144], but also the serine protease inhibitor A3K (Serpina3K), *Wndnm1-like* [144,145] and *Tcf21* [146]. In humans, others specific WAT genetic markers are known, among them are *Ebf3*, *Fbox31* and *Mpzl2* [147], and *FASN* [148]. Although WAT and BAT do not currently share markers, white and beige adipocytes from mice and humans have in common *Pdfrα* [149,150] and the homeobox *(Hox)C8* and *Hoxc9* genes normally used to identify white adipocytes [144,146,150].

3.1.2. Brown Adipocyte Markers

Since it was known that both beige and brown adipocytes have common characteristics, it was necessary to distinguish them and discover which markers they had in common and which were really specific to brown adipocytes. For this purpose, De Jong et al. evaluated the expression of several markers in interscapular (BAT), inguinal (beige), and epididymal (WAT) mice adipose tissues and found that only Zic-1 mRNA was detectable in BAT [151]. Others studies have also come to this conclusion with BAT gene expression profile studies in mice but also in humans [146,147,152,153]. In human BAT and mice interscapular region, studies identified Eva1 (also known as Mpzl2) as another specific BAT marker, with significantly higher expression in this tissue compared to beige and white adipose tissues [127,154]. Ussar et al. demonstrated that the expression of *P2RX5* is up-regulated in brown preadipocytes and adipocytes and that its expression is further increased during cell differentiation [143]. Ancient markers that were commonly used to identify BAT, have been shown to be expressed by beige cells as well. It is now well-known that UCP-1 can also be expressed by beige adipocytes, but other markers shared by both cell types such as *CIDEA* [144,145], *Lhx8* [144], *PGC1α* [155,156], *PRDM16* [150,154,157] have been evidenced and many others as listed in Figure 2.

3.1.3. Beige Adipocyte Markers

In order to evaluate markers of mice beige adipocytes, Garcia et al. studied transcript expression of several thermoregulatory genes and proposed specific beige markers such as *Cox8b* [145] or the fibroblast growth factor 21 (*FGF21*) [145,158]. In their transcriptomic study, De Jond et al. also analyzed potential beige markers and identified *CD137*, *Epsti1*, *Tbx1* and *Tmem26* as being quite specific of beige adipose tissue [151]. Although reservations

have been made on *Tbx1* and *Tmem26* because a comparison of their expression in brown and white adipocyte cell cultures revealed no qualitative difference [144]. In addition, CD137 and Tmem26 are known to be cell surface markers, notably for beige precursors [159], which constitute a major advantage in the isolation of these cells from WAT. Recently, Comas et al. discovered a novel marker of beige adipocytes called neuregulin 4 (NRG4) in human adipose tissue [148]. This study also showed a significant relationship between NRG4 and TMEM26 gene expression in both VAT and SAT. Other markers reported to be specific to beige adipose tissues have been reported, in both humans and mice, such as *CITED1*, *Ear2*, *Elov3*, *Sca1*, *Dio2* (Figure 2).

3.2. Browning Factors

3.2.1. Thermogenic Stimuli

Many stimuli contribute to the apparition of beige adipocytes in WAT. Using positron emission tomography (PET) scan studies showed that cold exposure is one of the main sources of BAT activation and browning induction [124,160–163]. In response to a cold stress, sympathetic nerve terminals will release catecholamines, such as norepinephrine (NE), that will be addressed to their β-adrenergic receptors (β-AR). The involvement of the β3-AR in the browning has been demonstrated many times, and it has been found that chronic treatment with β3-adrenergic agonists induces the browning of WAT [130,164–167]. More recently, a study investigated the physiological signals involved in cold-induced browning in mice showed that white adipocytes can receive adrenergic signals via β3-AR and produce FGF21 which stimulates eosinophils and M2 macrophages. The stimulation of these type 2 immune cells leads to the browning of SAT but not BAT or epididymal adipose tissue [158]. Moreover, beige adipocytes seem to be able to remember if they have already been exposed to cold, a thermogenic capacity that they can thus re-employ more quickly [168].

3.2.2. Proteins Stimuli

Another stimulus inducing the presence of beige adipocytes is the inactivation of the AMP-activated protein kinase (AMPK) in the ventromedial hypothalamus. This protein activated when cellular energy is depleted, can promote ATP-producing processes [169,170]. Its inactivation results in an increase sympathetic output to WAT thus inducing BAT activation and WAT browning [171]. The AMPK inactivation that leads to browning can be induced by thyroid hormones [172,173] or glucagon like peptide 1 receptor (GLP-1R) agonists [137].

3.2.3. Lipids Stimuli

Recently, lipids have also been identified as regulators of thermogenic fat activation notably via a specific crosstalk with sympathetic neurons [174]. Indeed, growing evidence suggests that de novo lipid synthesis through the fatty acid synthase (FASN) mediates the expansion of beige adipocytes within inguinal white adipose tissue [175]. Another lipogenic pathway related to lipids was found to modulate PPARγ activation of brown-like adipocytes in mice SAT, the peroxisomal reductase activating PPARγ (PexRAP) [176]. Other evidences of lipid involvement exist, for example the polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic acid (EPA), has been shown to promote BAT thermogenic capacity by increasing the UCP1 content amplifying catecholamines such as NE-stimulated oxygen consumption [177,178]. In mice, EPA has also been shown to increase UCP-1 gene expression, enhancing the thermogenic response of BAT and inguinal WAT to β3-adrenergic stimulation [178,179]. Park et al. further demonstrated that peroxisome-derived lipids, including plasmalogens, are able to regulate adipose thermogenesis by mediating cold-induced mitochondrial fission in brown and beige adipocytes [180].

3.2.4. Natriuretic Peptides

Atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) are endocrine hormones released from the heart in response to cardiac wall stress and other local factors [181–184]. Several studies have showed that cardiac natriuretic peptides are browning inducers. In both humans and mice adipocytes, it has been demonstrated that natriuretic peptides activate the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling [185]. This last complex has been shown to be necessary for cold-induced browning [186,187]. In addition, ANP treatments significantly increased UCP-1 expression, ameliorated high fat diet-induced insulin resistance in mice by inducing adipose tissue browning [188]. Bordicchia et al. also demonstrated that in human adipocytes, ANP and BNP activated PPARγ coactivator-1α (PGC-1α) and UCP-1 expression, induced mitochondriogenesis, and increased uncoupled and total respiration in a p38 MAPK-dependent manner. Further infusion of BNP into mice robustly increased Ucp1 and Pgc-1α expression in WAT and BAT, with corresponding elevation of respiration and energy expenditure confirming that natriuretic peptides can promote browning of WAT to increase energy expenditure, defining the heart as a central regulator of adipose tissue biology [189].

3.2.5. Extracellular Vesicles (EVs) and miRNA

Several adipose tissue cell subtypes including adipocytes, adipose tissue-derived stem cells (ADSCs), endothelial cells and macrophages have been reported to secrete extracellular vesicles (EVs) [190]. Adipose-derived EVs include exosomes, microvesicles and apoptotic bodies [191]. As mentioned earlier, EVs have emerged as a new way of inter-organ and intercellular communication in the EAT/cardiovascular system crosstalk. They are now also known to be involved in WAT browning. In 2018, a unidirectional transfer of exosomes from adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) to macrophages has been observed [192]. Moreover, these exosomes have been shown to induce the polarization of macrophages into the anti-inflammatory M2 subtype. The authors also demonstrated that these ADSCs-derived exosomes promote inguinal and epididymal WAT-browning in mice. In 2020, these findings have been transposed to human ADSCs-derived exosomes [193]. Secretion of exosomes during stem cell differentiation into white or beige adipocytes can promote cell reprogramming implying that beige adipocytes-derived exosomes can stimulate the development of other beige cells in WAT. Although these findings remain interesting, it is now necessary to discover which component(s) of ADSCs-derived exosomes is/are responsible for browning. Indeed, in addition to containing nanovesicles, proteins, bioactive lipids or non-coding RNAs, they also enclose microRNAs (miRs) [190,194]. Some of them have been shown to have a role in WAT browning. miR-196a has been shown to induce WAT-browning during cold exposure and β-adrenergic stimulation [195]. miR-155 increased brown adipose tissue function and leaded to a brown adipocyte-like phenotype in white adipocytes [196]. Therefore, further studies are required to identify the precise involvement of EVs and their still poorly understood content in the biogenesis of beige adipocytes and in the white-to-beige differentiation.

3.2.6. Muscle

We have to highlight the crosstalk between adipose tissue and muscle in promoting the browning of adipose tissue. Indeed, skeletal muscle and adipose tissue secrete METRNL (Meteorin-like), a PGC-1α-dependent myokine, in response to physical exercise and cold exposure [197]. Rao et al. showed that METRNL can enhance browning without acting directly on adipocytes [198]. In fact, METRNL was found to induce the recruitment of eosinophils in WAT leading to an increased expression of IL4 and IL13, which results in stimulation of M2 macrophages and activation of thermogenic genes. Irisin, a cleavage product of Fndc5 gene (fibronectin type III domain containing 5), is another exercise-stimulated PGC-1α-dependent myokine implicated in the browning of WAT [199] but its secretion by the skeletal muscle, its regulation and function are a source of discrepancy in the literature [200].

3.2.7. Immune Cells

In addition to the previous browning factors, many immune actors have been found to be involved in the appearance of beige adipocytes in WAT. Among these actors, type 2 immune cells and their related type 2 cytokines could play a major role in the biogenesis of beige adipocytes. Lee et al. reported in their work on thermoneutral mice, that activation of type 2 innate lymphoid cells (ILC2s) by interleukin (IL)-33 is sufficient to promote the growth of adipocyte precursors committed to the beige fat lineage [201]. In fact, they reported that a thermogenic circuit exists activating ILC2s which in response secrete IL-13. The authors then showed that this ILC2-derived cytokine in cooperation with the eosinophil-derived IL-4 will directly promote the expansion and commitment of beige adipocyte progenitors in the SAT through the IL-4 receptor α (IL-4Rα) signaling. In 2014, ILC2 were also identified in human WAT by Brestoff et al. [57] and shown to be decreased in obesity. Moreover, IL-33 was found to be critical for the maintenance of ILC2s in WAT and for the induction of browning. To go further into the contribution of ILC2 in browning, they focused on obesity-associated genes they expressed. They particularly observed that ILC2 could product methionine-enkephalin peptide (MetEnk), the latter having the ability to increase beige adipocytes in WAT. Moreover, one of the receptors for MetEnk, δ1 opioid receptor (Oprd1), was highly expressed in inguinal WAT suggesting that there may be tissue-specific effects of MetEnk in WAT. A recent study combining neural and immune systems also established that the sympathetic nervous system can activate PDGFRα positive mesenchymal cells, present in the stromal vascular fraction, through the β2-adrenergic receptor. In response to sympathetic signals, these cells secreted the glial-derived neurotrophic factor (GNDF) that was able to modulate the activity of ILC2s via the tyrosine kinase receptor RET. In this study, Cardoso and colleagues further demonstrated that RET was essential in ILC2s activities especially in the secretion of IL-5, IL-13 and MetEnk that will participate to the shaping of energy expenditure, host metabolism and obesity.

Recent literature also suggest that other innate lymphoid cells could be implicated in the browning. Among them are eosinophils. First, a study demonstrated the implication of eosinophils in the activation of alternative activated macrophages (AMMs) by expressing IL-4 in perigonadal WAT [202]. Moreover, they showed that these eosinophils were the major IL-4-expressing cells in mice perigonadal WAT. They further demonstrated that eosinophils migrate from blood into WAT by an integrin-dependent process and reconstitute AAMs through an IL-4/IL-13-dependent process. Then, another study showed that eosinophils is a part of the efferent branch from the thermogenic circuit that regulates cold-induced browning of SAT [203]. In 2011, it has been shown that after their activation by IL-4, AMMs are able to modulate adaptive thermogenesis [204]. The Huang et al. study cited above showed that cold exposure can induce an autocrine signaling of FGF21 in mature white adipocytes [158]. This leads to the expression of the chemokine CCL11 activating eosinophils which in turn secrete IL-4 that can either activate M2 macrophages or induce the browning of PDGFRα positive adipocyte precursors. Moreover, the formation of beige adipocytes can also result from the existence of a genetic or environmental background or from fat depot specific differences [205].

Finally, in 2018 a study highlighted the role of γδ T cells in adipose tissue thermogenesis. The authors demonstrated that IL-17A-producing γδ T cells interact with adipose stromal cells and consequently regulate IL-33 abundance, which affects Treg cell accumulation and thermoregulation [60]. They also showed that γδ T cells and IL-17A deficiencies significantly affect the ability of mice to survive after a cold challenge and strongly induce UCP-1-dependent thermogenic responses. This advance in the dynamic crosstalk between innate lymphoid cells and adipose tissue dictates the local immune composition responsible for adipose tissue wiggling and thermogenesis.

4. Browning EAT: Friend or Foe?

4.1. Evidences of EAT Beige Phenotype

Before the appearance of the term of beige adipocytes in the EAT, researchers had described EAT as functioning like a brown adipose tissue [7,14]. Sacks et al., in a transcriptional analysis of BAT markers in human EAT, concluded that, since UCP-1, PRDM16, and PGC-1α were expressed more strongly in this tissue than in other fat depots, EAT could function as brown fat. This could serve to defend the myocardium and coronary vessels against hypothermia and protect the heart from ischemia or hypoxia [14]. In 2013, another study of the EAT gene expression profile revealed the presence of the beige adipocyte-specific marker CD137, and histological analysis showed small unilocular adipocytes in the tissue [3]. This same study showed significantly increased levels of UCP-1 in mitochondria from EAT compared to paracardial, abdominal, and sternal SAT. Moreover, the authors found that those EAT UCP-1 concentrations were comparable to those found in pericardial BAT sampled from newborn sheep in which the protein is maximally expressed and activated. The same year, in a cohort of CAD patients, elevated mRNA expression of UCP-1 in EAT was shown and a correlation with circulating lipid levels was made [206]. Since growing evidence suggests that lipids play a role in the browning phenomenon [207], we performed an untargeted lipidomic study on EAT and SAT from CAD and non-CAD patients and compared them with paired plasma lipidomic analysis of isolated VLDL (very low-density lipoprotein). This work showed for the first time that EAT and SAT had independent lipidomic profile. Secondly, we found that six plasmalogen species were significantly enriched in EAT compared with SAT. These specific plasmalogens increase could reflect a thermogenic activity of the EAT compared to SAT [207]. Indeed, Park et al. suggested that manipulation of plasmalogen production by dietary or pharmacological approaches could enhance the thermogenic status of beige adipocytes [180]. Adipose-specific KO of the peroxisomal biogenesis factor Pex16 (Pex16-AKO) in mice impaired cold tolerance, decreased energy expenditure, and increased diet-induced obesity. Pex16 deficiency blocked cold-induced mitochondrial fission, decreased mitochondrial copy number, and caused mitochondrial dysfunction. This highlighted that peroxisome-derived lipids regulate adipose thermogenesis by mediating cold-induced mitochondrial fission. Therefore, function of plasmalogens in EAT deserves more research and the possible plasmalogens-induced browning of the EAT further investigations. Other dietary treatments have been suggested to be implicated in EAT browning such as aged garlic extract. Ahmadi et al. showed that aged garlic extract was associated with increased brown EAT, and prevented the progression of CAC score [208].

Using a pangenomic approach, our research group has added further evidence of the human EAT beige profile [2]. Indeed, an EPICAR study aimed at determining the specific transcriptomic profile of EAT. We showed that the peri-ventricular EAT could be very sensitive to browning. In particular, we showed that EAT expressed some BAT specific genes such as UCP-1 actin alpha 1 (ACTC1) or PPAR gamma co-activator 1 alpha (PPARGC1A). Moreover, WAT specific gene *HOXC9* was significantly downregulated in EAT compared with SAT. All this suggests that EAT exhibits a beige phenotype. More recently, another study using next-generation deep sequencing compared gene signatures from EAT, SAT and mediastinal adipose tissue (mAT) [15]. In this work, the authors identified lipid metabolism-related pathways associated with thermogenesis in EAT but not in mAT or SAT. These include fatty acid activation, mitochondrial L-carnitine shuttle pathway, fatty acid β-oxidation I and γ-linolenate biosynthesis. Association of genes involved in fatty acid oxidation and in white-to-brown fat differentiation with EAT glucagon like peptide 1 receptor (GLP-1R), has been depicted [209]. EAT expresses GLP-1R at both gene and protein levels and it has been shown that GLP-1 analogs (GLP-1A) has important cardiovascular beneficial effects that go beyond their antidiabetic actions, with a substantial reduction of EAT in diabetic and obese patients in patients treated with GLP-1A [101,210]. Dozio et al. who demonstrated the association between fatty acid oxidation genes and EAT GLP-1R showed that GLP-1A, by targeting EAT GLP-1R, may reduce local adipogenesis,

improve fat utilization and induce brown fat differentiation [209]. Therefore, it is tempting to speculate on an intriguing strategy targeting GLP1-R to reverse metabolic derangement of EAT and future studies are warranted in this direction.

4.2. Proposed Browning Factors within the EAT

Interestingly, Chechi et al. also reported that EAT displays an overrepresentation of immune-related pathways that brings it closer to mAT than to SAT [15]. Moreover, they found that EAT was enriched in T-cell related pathways such as ICOS-ICOSL signaling, T helper cell differentiation, or Th2 pathway. This last signaling pathway has been since few years widely studied in the implication of browning. Therefore, it is possible to imagine that these immune related pathways can contribute to the epicardial fat browning (Figure 3). Unfortunately, not many studies have yet demonstrated the involvement of these cells in the EAT beige status. Recently, researchers have established that a TNF superfamily member, the death receptor 3 (DR3), was expressed in murine VAT and human peripheral blood-ILC2s and inducible by IL-33 [211]. They also revealed that mice treated with DR3 agonist exhibited significantly enhanced expression of Ucp1, Cidea, Prdm16, Pgc1a and Dio2 at the transcriptomic level. Whether these factors could have a direct paracrine effect on EAT remains to be determined.

One evidence of the direct type 2 immunity involvement in the EAT is the Sacks et al. study from 2011 [28], complemented by the study of Distel et al. from 2012 [212]. The first study showed increased expression of anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-10, in EAT from metabolic or T2D subjects suggesting a potentially beneficial role for these adipokines in a proinflammatory milieu contiguous with CAD. Treatment with pioglitazone in T2D patients with CAD was associated with a reduction of proinflammatory and anti-inflammatory genes in EAT and a selective increase in PPARγ in SAT. The second study investigated the short-term effect of rosiglitazone on the expression of the genes and proteins (by RT-PCR and Western blot) involved in fatty acid metabolism in EAT of the obese fatty Zucker rat and compared the levels of expression with those in retroperitoneal adipose tissue. Interestingly, the expression of the genes encoding proteins involved in mitochondrial processing and density PPARγ coactivator 1 alpha (PGC-1α), NADH dehydrogenase 1 and cytochrome oxidase (COX4) were increased by rosiglitazone only in EAT, with a resulting significant up-regulation of PGC1-α and COX4 protein. This was accompanied by a rise in the expression of PRDM-16 and UCP-1, revealing that this PPAR-γ agonist could induce a rapid browning of the EAT that probably contributes to high lipid turnover in this tissue.

Finally, it has recently been demonstrated that EAT adipocytes can release EVs that can penetrate cardiac cells by endocytosis [25] (Figure 3). Very recent data have evidenced functional mitochondrial transfer from energetically stressed adipocytes to the heart that could limit cardiac ischemia/reperfusion injury in mice and prevent lipotoxicity [213,214]. Potential factors implicated in the EAT browning are summarized in Figure 3.

It may hence be supposed that re-browning of EAT in obese and/or CAD patients, using a diversity of dietary, environmental and pharmacological approaches, may improve the hypoxic, inflammatory microenvironment disturbing the vasculature and contributing to coronary atherosclerosis [215]. However, the factors specifically involved in EAT browning and regulating this phenomenon remain to be clearly identified, and other experimental studies are needed to better understand which pathway could be targeted to improve the phenotype of EAT and hence reduce the cardiovascular outcomes associated with its imbalanced inflammatory phenotype.

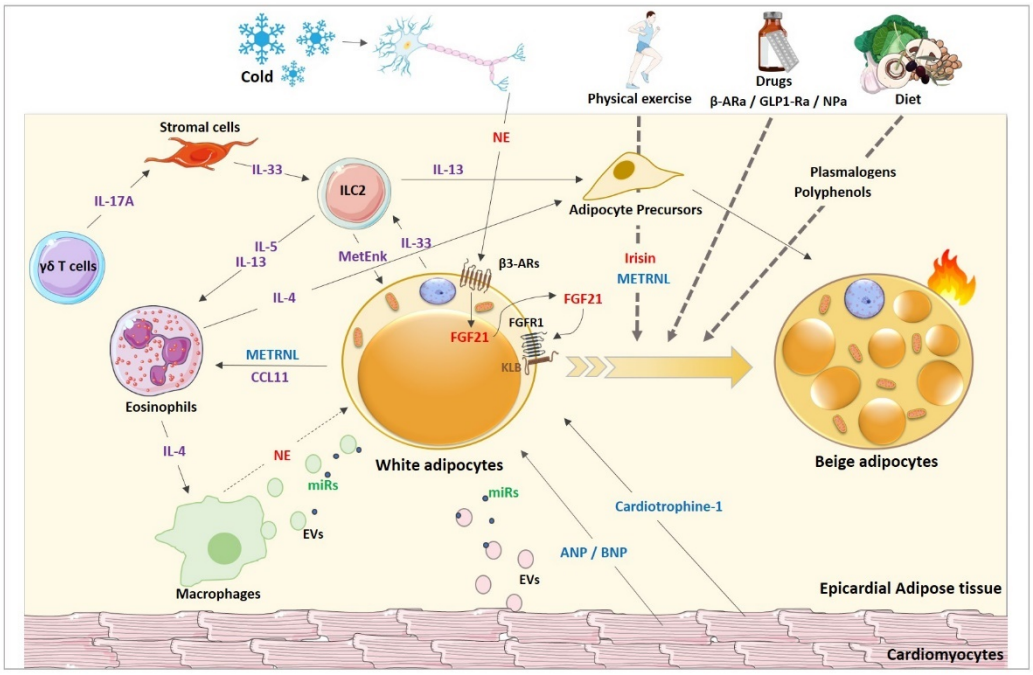


Figure 3. Potential factors involved in the EAT browning. Putative mechanisms based on work realized in adipose tissue in general. Environmental factors such as cold exposure, physical exercise, pharmacological treatments and dietary are implicated in browning of white adipocytes but the mechanisms underlying are not yet well established (dotted arrows). Inter-cellular communication factors involving cytokines/chemokines (purple), myokines (blue), hormones (red) and miRs (green) are known to be involved in WAT browning. EVs: extracellular vesicles; β-Ara: β-adrenergic receptor agonists; GLP1-Ra: GLP1- receptor agonists; NPa natriuretic peptide agonists; METRNL: Meteorin Like; MetEnk: methionine enkephalin, NE: norepinephrine, FGF21: fibroblast growth factor 21; FGFR1: FGF receptor 1; KLB: coreceptor Beta-klotho.

4.3. EAT Whitening as Foe

There is a large body of evidence supporting the effects of browning activation in improving obesity and its cardiac complications. The opposite phenomenon brown-to-white trans-differentiation, also referred as 'whitening', has been far less explored. Under physiological (as aging) and pathological circumstances, epicardial adipocytes may lose those cardioprotective functions and turn into pro-inflammatory cells. As people get older, the proportion of brown adipocytes decreases in favor of more unilocular white adipocytes and so EAT brown fat-like activity and function could decrease with first the loss of its thermogenic properties [216]. This is the brown-to-white trans-differentiation. Hence, aging can influence the function of EAT partly because of transition from brown to beige fat of EAT in adult life. But if in one hand, this phenomenon can help thermogenic homeostasis, in the other hand in some cases it can have less beneficial effects. In patho-physiological cases where browning can have beneficial consequences, this brown-to-white trans-differentiation could reverse these positive influences. For instance, in EAT this brown-to-white trans-differentiation has been associated with an increased reactive oxygen species (ROS) production in CAD patients [74].

EAT browning characteristics can also be impaired in advanced chronic diseases. Dozio et al. showed that EAT of patients with CAD was associated with decreased expression levels of thermogenic genes and upregulation of white adipogenesis [74]. Indeed, they demonstrated that the BAT-specific genes UCP-1, PGC-1α, PRDM16 and bone morphogenetic protein 7 (BMP7) were statistically significant lower in CAD patients and WAT-specific gene insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) and HOXC9 were significantly higher compared to non-CAD patients, which suggests a change in the composition of the EAT in CAD patients.

Other possible cardioprotective pathway genes, involving PGC-1α, involved in adipocyte browning and thermogenic activation, have been suggested. Epicardial fat heme oxygenase-1 (HO-1) PGC-1α may modulate inflammation, mitochondrial activity and left ventricle function. A decrease of HO-1, PGC-1α and PRDM16 in EAT compared to VAT was linked to significant cardiac remodeling and was observed in cardiomyopathies [217]. It has been suggested a more WAT-like genotype at EAT level in CAD patients [74]. EAT seems to produce less ROS than SAT, but when comparing CAD patients with non-CAD patients, only non-CAD patients have a significantly higher ROS level in SAT than in EAT. In addition, there is a significant higher ROS level in EAT of CAD patients compared to non-CAD patients. All these results support the hypothesis that CAD may be associated with brown-to-white trans-differentiation process.

4.4. Perspectives: Non-Invasive Imaging Techniques

One of the major limitations in studying the EAT is that rodents have no EAT. In Humans, the EAT study from fresh tissue is also limited due to the difficulty of obtaining samples because this needs thoracotomy. Thus, imaging techniques have become valuable tools in the understanding of EAT pathophysiology either in terms of volume quantification or functional characterization, two parameters that might improve the individual cardiovascular risk stratification.

Artificial intelligence (AI) tools using deep learning approach, applied to CT scans, allow to speed up the first stages of image pre-processing and allow the improvement of quantification and volume segmentation of EAT [218]. The length of execution does not exceed 26 seconds and there is a high correlation between automated and manual measures [219].

Vascular inflammation is a key component of the atherosclerotic process, and has been shown to induce molecular, transcriptional and structural changes to perivascular fat. Regarding the functional aspect of EAT, detection of pericoronary EAT inflammation, is now possible with non-invasive imaging tools, such as CT scan [110,218]. The perivascular Fat Attenuation Index (FAI), an imaging tool that measures weighted 3D attenuation gradients of AT in the perivascular space, involves the use of AI-enhanced algorithms that provide accurate and reproducible weighted measures of attenuation in 1mm 3D layers of EAT around the human arterial wall. This FAI has the potential to yield informative results on local coronary inflammation and plaque vulnerability. [110,220]. Detecting these changes of composition could have great clinical implications. In the CRISP-CT study [221,222], patients with the highest FAI values of coronary vessels had a significantly higher risk of all-cause mortality and cardiac mortality [221].

Unfortunately, to date there are still no specific tools to evaluate the browning of the EAT. In animals, new techniques have emerged to quantify the browning by using, for instance, Magnetic Resonance Imaging (MRI) [223] or Positron Emission Tomography (PET) [224], but all these experiments were realized on mice. Regarding humans, the BAT can be studied by several imaging techniques. The [18F]fluorodeoxyglucose ([18F]FDG)-PET /CT imaging with a cold exposition during 2 hours is the best established method for visualizing activated BAT in humans [225]. However, this technique exposes subjects to ionizing radiation and requires a lot of equipment with a high cost. Furthermore, the BAT detection cannot be done without stimulations (cold temperature or drug induction) and FDG uptake by the myocardium prevents from EAT browning detection [226,227]. Moreover, it should be noted that glucose tracer does not provide information on total BAT oxidative metabolism, but the addition of fatty acid tracers and labeled oxygen tracers could provide missing information [228]. Compared to PET and SPECT, MR imaging is a more attractive modality to investigate BAT. It does not expose to ionizing radiation and both volume and function can be studied. Chemical shift MRI such as fat fraction mapping and T2*-weighted mapping were able to measure BAT volume while Blood Oxygen Level Dependent (BOLD) MRI, hyperpolarized Xenon MRI, and contrast-enhanced MRI have been employed to assess BAT function [226,227]. Moreover, new imaging techniques, such

as Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) techniques and Infrared Thermography (IRT) are being developed for BAT imaging. These two techniques are relatively inexpensive and no cold exposure is required with NIRS techniques, though both of them, and especially IRT, cannot assess total BAT volume [226,227]. One important issue is that complete determination of the thermogenic potential of human BAT requires not only assessment of BAT following acute stimulation, but also BAT in its basal state. A single imaging method could have limitations to accurately report BAT mass and BAT activation at the same time, and a combination of different methods or modalities could be the trend for monitoring both the BAT mass and metabolic state change in future research. Despite limitations, all these techniques are promising ways for a future non-invasive evaluation of human EAT browning.

5. Conclusions

EAT is a unique depot in direct contact with coronary arteries and myocardium that can probably drive heart diseases. The beige adipocytes factors and immune systems cross-talks are fascinating topics to explore in order to better understand the beiging mechanism in EAT and its impact on cardiac diseases. Furthermore, the anatomic proximity of the cardiac muscle which can secrete browning cardiokines makes this cross-talk particularly appealing. New non-invasive techniques are needed to better follow EAT browning in humans after nutritional, or therapeutical interventions.

Author Contributions: Conceptualization, A.D.; methodology, E.D., A.S., S.A.; validation, B.G., P.A.; writing—original draft preparation, E.D., A.S., S.A.; writing—review and editing, A.D., B.G., C.S., P.A.; visualization, P.A.; supervision, B.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: E.D. is supported by a PhD fellowship from French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (MESRI).

Institutional Review Board Statement: Not Applicable.

Acknowledgments: We would like to thank Elise Dalmas, Soazig Lelay, and Frederic Vely for their help in improving this review.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kannel, W.B.; Abbott, R.D.; Savage, D.D.; McNamara, P.M. Epidemiologic Features of Chronic Atrial Fibrillation: The Framingham Study. *N. Engl. J. Med.* **1982**, *306*, 1018–1022. [CrossRef] [PubMed]
2. Gaborit, B.; Venteclef, N.; Ancel, P.; Pelloux, V.; Gariboldi, V.; Leprince, P.; Amour, J.; Hatem, S.N.; Jouve, E.; Dutour, A.; et al. Human Epicardial Adipose Tissue Has a Specific Transcriptomic Signature Depending on Its Anatomical Peri-Atrial, Peri-Ventricular, or Peri-Coronary Location. *Cardiovasc. Res.* **2015**, *108*, 62–73. [CrossRef] [PubMed]
3. Sacks, H.S.; Fain, J.N.; Bahouth, S.W.; Ojha, S.; Frontini, A.; Budge, H.; Cinti, S.; Symonds, M.E. Adult Epicardial Fat Exhibits Beige Features. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E1448–E1455. [CrossRef] [PubMed]
4. Petrovic, N.; Walden, T.B.; Shabalina, I.G.; Timmons, J.A.; Cannon, B.; Nedergaard, J. Chronic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARgamma) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-Containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7153–7164. [CrossRef] [PubMed]
5. Ishibashi, J.; Seale, P. Medicine. Beige Can Be Slimming. *Science* **2010**, *328*, 1113–1114. [CrossRef]
6. Klingenspor, M.; Herzig, S.; Pfeifer, A. Brown Fat Develops a Brite Future. *Obes. Facts* **2012**, *5*, 890–896. [CrossRef]
7. Iacobellis, G.; Corradi, D.; Sharma, A.M. Epicardial Adipose Tissue: Anatomic, Biomolecular and Clinical Relationships with the Heart. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **2005**, *2*, 536–543. [CrossRef]
8. Corradi, D.; Maestri, R.; Callegari, S.; Pastori, P.; Goldoni, M.; Luong, T.V.; Bordi, C. The Ventricular Epicardial Fat Is Related to the Myocardial Mass in Normal, Ischemic and Hypertrophic Hearts. *Cardiovasc. Pathol.* **2004**, *13*, 313–316. [CrossRef]
9. Rabkin, S.W. Epicardial Fat: Properties, Function and Relationship to Obesity. *Obes. Rev.* **2007**, *8*, 253–261. [CrossRef]
10. Marchington, J.M.; Pond, C.M. Site-Specific Properties of Pericardial and Epicardial Adipose Tissue: The Effects of Insulin and High-Fat Feeding on Lipogenesis and the Incorporation of Fatty Acids In Vitro. *Int. J. Obes.* **1990**, *14*, 1013–1022.
11. Marchington, J.M.; Mattacks, C.A.; Pond, C.M. Adipose Tissue in the Mammalian Heart and Pericardium: Structure, Foetal Development and Biochemical Properties. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1989**, *94*, 225–232. [CrossRef]

12. Iacobellis, G.; Bianco, A.C. Epicardial Adipose Tissue: Emerging Physiological, Pathophysiological and Clinical Features. *Trends Endocrinol. Metab.* **2011**, *22*, 450–457. [CrossRef] [PubMed]
13. Caprio, M.; Antelmi, A.; Chetrite, G.; Muscat, A.; Mammi, C.; Marzolla, V.; Fabbri, A.; Zennaro, M.-C.; Fève, B. Antiadipogenic Effects of the Mineralocorticoid Receptor Antagonist Drospirenone: Potential Implications for the Treatment of Metabolic Syndrome. *Endocrinology* **2011**, *152*, 113–125. [CrossRef] [PubMed]
14. Sacks, H.S.; Fain, J.N.; Holman, B.; Cheema, P.; Chary, A.; Parks, F.; Karas, J.; Optican, R.; Bahouth, S.W.; Garrett, E.; et al. Uncoupling Protein-1 and Related Messenger Ribonucleic Acids in Human Epicardial and Other Adipose Tissues: Epicardial Fat Functioning as Brown Fat. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *94*, 3611–3615. [CrossRef] [PubMed]
15. Chechi, K.; Vijay, J.; Voisine, P.; Mathieu, P.; Bossé, Y.; Tchernof, A.; Grundberg, E.; Richard, D. UCP1 Expression-Associated Gene Signatures of Human Epicardial Adipose Tissue. *JCI Insight* **2019**, *4*, e123618. [CrossRef]
16. Baker, A.R.; da Silva, N.F.; Quinn, D.W.; Harte, A.L.; Pagano, D.; Bonser, R.S.; Kumar, S.; McTernan, P.G. Human Epicardial Adipose Tissue Expresses a Pathogenic Profile of Adipocytokines in Patients with Cardiovascular Disease. *Cardiovasc. Diabetol.* **2006**, *5*, 1. [CrossRef] [PubMed]
17. Fain, J.N.; Sacks, H.S.; Bahouth, S.W.; Tichansky, D.S.; Madan, A.K.; Cheema, P.S. Human Epicardial Adipokine Messenger RNAs: Comparisons of Their Expression in Substernal, Subcutaneous, and Omental Fat. *Metabolism* **2010**, *59*, 1379–1386. [CrossRef]
18. Gruzdeva, O.V.; Akbasheva, O.E.; Dyleva, Y.A.; Antonova, L.V.; Matveeva, V.G.; Uchasova, E.G.; Fanaskova, E.V.; Karetnikova, V.N.; Ivanov, S.V.; Barbarash, O.L. Adipokine and Cytokine Profiles of Epicardial and Subcutaneous Adipose Tissue in Patients with Coronary Heart Disease. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2017**, *163*, 608–611. [CrossRef]
19. Gruzdeva, O.; Uchasova, E.; Dyleva, Y.; Borodkina, D.; Akbasheva, O.; Antonova, L.; Matveeva, V.; Belik, E.; Ivanov, S.; Sotnikov, A.; et al. Adipocytes Directly Affect Coronary Artery Disease Pathogenesis via Induction of Adipokine and Cytokine Imbalances. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2163. [CrossRef]
20. Sacks, H.S.; Fain, J.N. Human Epicardial Adipose Tissue: A Review. *Am. Heart J.* **2007**, *153*, 907–917. [CrossRef]
21. Iacobellis, G. Epicardial Adipose Tissue in Endocrine and Metabolic Diseases. *Endocrine* **2014**, *46*, 8–15. [CrossRef]
22. Zhuang, X.; Wu, B.; Li, J.; Shi, H.; Jin, B.; Luo, X. The Emerging Role of Interleukin-37 in Cardiovascular Diseases. *Immun. Inflamm. Dis.* **2017**, *5*, 373–379. [CrossRef]
23. Butcovan, D.; Mocanu, V.; Timofte, D.V.; Costan, V.V.; Danila, R.; Veselin, A.P.; Ciuntu, B.M.; Haliga, R.E.; Sascau, R.A.; Ghiga, G.; et al. Macrophage Accumulation and Angiogenesis in Epicardial Adipose Tissue in Cardiac Patients with or without Chronic Heart Failure. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 5871. [CrossRef]
24. Gaborit, B.; Sengenes, C.; Ancel, P.; Jacquier, A.; Dutour, A. Role of Epicardial Adipose Tissue in Health and Disease: A Matter of Fat? *Compr. Physiol.* **2017**, *7*, 1051–1082. [CrossRef] [PubMed]
25. Shaihov-Teper, O.; Ram, E.; Ballan, N.; Brzezinski, R.Y.; Naftali-Shani, N.; Masoud, R.; Ziv, T.; Lewis, N.; Schary, Y.; Levin-Kotler, L.-P.; et al. Extracellular Vesicles from Epicardial Fat Facilitate Atrial Fibrillation. *Circulation* **2021**, *143*, 2475–2493. [CrossRef] [PubMed]
26. Dutour, A.; Achard, V.; Sell, H.; Naour, N.; Collart, F.; Gaborit, B.; Silaghi, A.; Eckel, J.; Alessi, M.-C.; Henegar, C.; et al. Secretory Type II Phospholipase A2 Is Produced and Secreted by Epicardial Adipose Tissue and Overexpressed in Patients with Coronary Artery Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, 963–967. [CrossRef]
27. Silaghi, A.; Achard, V.; Paulmyer-Lacroix, O.; Scridon, T.; Tassistro, V.; Duncea, I.; Clément, K.; Dutour, A.; Grino, M. Expression of Adrenomedullin in Human Epicardial Adipose Tissue: Role of Coronary Status. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **2007**, *293*, E1443–E1450. [CrossRef] [PubMed]
28. Sacks, H.S.; Fain, J.N.; Cheema, P.; Bahouth, S.W.; Garrett, E.; Wolf, R.Y.; Wolford, D.; Samaha, J. Inflammatory Genes in Epicardial Fat Contiguous with Coronary Atherosclerosis in the Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes: Changes Associated with Pioglitazone. *Diabetes Care* **2011**, *34*, 730–733. [CrossRef]
29. Cherian, S.; Lopaschuk, G.D.; Carvalho, E. Cellular Cross-Talk between Epicardial Adipose Tissue and Myocardium in Relation to the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **2012**, *303*, E937–E949. [CrossRef]
30. Gaborit, B.; Abdesselam, I.; Dutour, A. Epicardial Fat: More than Just an "Epi" Phenomenon? *Horm. Metab. Res.* **2013**, *45*, 991–1001. [CrossRef]
31. Cheng, K.-H.; Chu, C.-S.; Lee, K.-T.; Lin, T.-H.; Hsieh, C.-C.; Chiu, C.-C.; Voon, W.-C.; Sheu, S.-H.; Lai, W.-T. Adipocytokines and Proinflammatory Mediators from Abdominal and Epicardial Adipose Tissue in Patients with Coronary Artery Disease. *Int. J. Obes.* **2008**, *32*, 268–274. [CrossRef] [PubMed]
32. Volpato, S.; Guralnik, J.M.; Ferrucci, L.; Balfour, J.; Chaves, P.; Fried, L.P.; Harris, T.B. Cardiovascular Disease, Interleukin-6, and Risk of Mortality in Older Women: The Women's Health and Aging Study. *Circulation* **2001**, *103*, 947–953. [CrossRef] [PubMed]
33. Ferrari, R. The Role of TNF in Cardiovascular Disease. *Pharmacol. Res.* **1999**, *40*, 97–105. [CrossRef]
34. Akoumianakis, I.; Antoniades, C. The Interplay between Adipose Tissue and the Cardiovascular System: Is Fat Always Bad? *Cardiovasc. Res.* **2017**, *113*, 999–1008. [CrossRef] [PubMed]
35. Antonopoulos, A.S.; Margaritis, M.; Verheule, S.; Recalde, A.; Sanna, F.; Herdman, L.; Psarros, C.; Nasrallah, H.; Coutinho, P.; Akoumianakis, I.; et al. Mutual Regulation of Epicardial Adipose Tissue and Myocardial Redox State by PPAR-γ/Adiponectin Signalling. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 842–855. [CrossRef]

36. Camarena, V.; Sant, D.; Mohseni, M.; Salerno, T.; Zaleski, M.L.; Wang, G.; Iacobellis, G. Novel Atherogenic Pathways from the Differential Transcriptome Analysis of Diabetic Epicardial Adipose Tissue. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2017**, *27*, 739–750. [CrossRef]
37. Clément, K.; Basdevant, A.; Dutour, A. Weight of Pericardial Fat on Coronaropathy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, *29*, 615–616. [CrossRef] [PubMed]
38. Karastergiou, K.; Evans, I.; Ogston, N.; Miheisi, N.; Nair, D.; Kaski, J.-C.; Jahangiri, M.; Mohamed-Ali, V. Epicardial Adipokines in Obesity and Coronary Artery Disease Induce Atherogenic Changes in Monocytes and Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 1340–1346. [CrossRef] [PubMed]
39. McKenney, M.L.; Schultz, K.A.; Boyd, J.H.; Byrd, J.P.; Alloosh, M.; Teague, S.D.; Arce-Esquivel, A.A.; Fain, J.N.; Laughlin, M.H.; Sacks, H.S.; et al. Epicardial Adipose Excision Slows the Progression of Porcine Coronary Atherosclerosis. *J. Cardiothorac. Surg.* **2014**, *9*, 2. [CrossRef] [PubMed]
40. Venteclef, N.; Guglielmi, V.; Balse, E.; Gaborit, B.; Cotillard, A.; Atassi, F.; Amour, J.; Leprince, P.; Dutour, A.; Clément, K.; et al. Human Epicardial Adipose Tissue Induces Fibrosis of the Atrial Myocardium through the Secretion of Adipo-Fibrokines. *Eur. Heart J.* **2015**, *36*, 795–805. [CrossRef] [PubMed]
41. Mazurek, T.; Zhang, L.; Zalewski, A.; Mannion, J.D.; Diehl, J.T.; Arafat, H.; Sarov-Blat, L.; O'Brien, S.; Keiper, E.A.; Johnson, A.G.; et al. Human Epicardial Adipose Tissue Is a Source of Inflammatory Mediators. *Circulation* **2003**, *108*, 2460–2466. [CrossRef] [PubMed]
42. Ivanov, S.; Merlin, J.; Lee, M.K.S.; Murphy, A.J.; Guinamard, R.R. Biology and Function of Adipose Tissue Macrophages, Dendritic Cells and B Cells. *Atherosclerosis* **2018**, *271*, 102–110. [CrossRef] [PubMed]
43. Mosser, D.M.; Edwards, J.P. Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 958–969. [CrossRef] [PubMed]
44. Aron-Wisnewsky, J.; Tordjman, J.; Poitou, C.; Darakhshan, F.; Hugol, D.; Basdevant, A.; Aissat, A.; Guerre-Millo, M.; Clément, K. Human Adipose Tissue Macrophages: M1 and M2 Cell Surface Markers in Subcutaneous and Omental Depots and after Weight Loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *94*, 4619–4623. [CrossRef]
45. Hirata, Y.; Tabata, M.; Kurobe, H.; Motoki, T.; Akaike, M.; Nishio, C.; Higashida, M.; Mikasa, H.; Nakaya, Y.; Takanashi, S.; et al. Coronary Atherosclerosis Is Associated with Macrophage Polarization in Epicardial Adipose Tissue. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, *58*, 248–255. [CrossRef]
46. Vianello, E.; Dozio, E.; Arnaboldi, F.; Marazzi, M.G.; Martinelli, C.; Lamont, J.; Tacchini, L.; Sigrüner, A.; Schmitz, G.; Corsi Romanelli, M.M. Epicardial Adipocyte Hypertrophy: Association with M1-Polarization and Toll-like Receptor Pathways in Coronary Artery Disease Patients. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2016**, *26*, 246–253. [CrossRef] [PubMed]
47. Gurses, K.M.; Ozmen, F.; Kocyigit, D.; Yersal, N.; Bilgic, E.; Kaya, E.; Kopru, C.Z.; Soyal, T.; Doganci, S.; Tokgozoglu, L.; et al. Netrin-1 Is Associated with Macrophage Infiltration and Polarization in Human Epicardial Adipose Tissue in Coronary Artery Disease. *J. Cardiol.* **2017**, *69*, 851–858. [CrossRef] [PubMed]
48. Ishikawa, F.; Niiro, H.; Iino, T.; Yoshida, S.; Saito, N.; Onohara, S.; Miyamoto, T.; Minagawa, H.; Fujii, S.-I.; Shultz, L.D.; et al. The Developmental Program of Human Dendritic Cells Is Operated Independently of Conventional Myeloid and Lymphoid Pathways. *Blood* **2007**, *110*, 3591–3660. [CrossRef] [PubMed]
49. Stefanovic-Racic, M.; Yang, X.; Turner, M.S.; Mantell, B.S.; Stolz, D.B.; Sumpter, T.L.; Sipula, I.J.; Dedousis, N.; Scott, D.K.; Morel, P.A.; et al. Dendritic Cells Promote Macrophage Infiltration and Comprise a Substantial Proportion of Obesity-Associated Increases in CD11c+ Cells in Adipose Tissue and Liver. *Diabetes* **2012**, *61*, 2330–2339. [CrossRef]
50. Mráz, M.; Cinkajzlová, A.; Kloučková, J.; Lacinová, Z.; Kratochvílová, H.; Lipš, M.; Pořízka, M.; Kopecký, P.; Lindner, J.; Kotulák, T.; et al. Dendritic Cells in Subcutaneous and Epicardial Adipose Tissue of Subjects with Type 2 Diabetes, Obesity, and Coronary Artery Disease. *Mediat. Inflamm.* **2019**, *2019*, 5481725. [CrossRef]
51. Divoux, A.; Moutel, S.; Poitou, C.; Lacasa, D.; Veyrie, N.; Aissat, A.; Arock, M.; Guerre-Millo, M.; Clément, K. Mast Cells in Human Adipose Tissue: Link with Morbid Obesity, Inflammatory Status, and Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, E1677–E1685. [CrossRef] [PubMed]
52. Brandstadter, J.D.; Yang, Y. Natural Killer Cell Responses to Viral Infection. *J. Innate Immun.* **2011**, *3*, 274–279. [CrossRef] [PubMed]
53. Bonamichi, B.D.S.F.; Lee, J. Unusual Suspects in the Development of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance: NK Cells, INKT Cells, and ILCs. *Diabetes Metab. J.* **2017**, *41*, 229–250. [CrossRef]
54. Roda, J.M.; Parihar, R.; Magro, C.; Nuovo, G.J.; Tridandapani, S.; Carson, W.E. Natural Killer Cells Produce T Cell-Recruiting Chemokines in Response to Antibody-Coated Tumor Cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 517–526. [CrossRef] [PubMed]
55. Bendelac, A.; Savage, P.B.; Teyton, L. The Biology of NKT Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, *25*, 297–336. [CrossRef] [PubMed]
56. Lynch, L.; Michelet, X.; Zhang, S.; Brennan, P.J.; Moseman, A.; Lester, C.; Besra, G.; Vomhof-Dekrey, E.E.; Tighe, M.; Koay, H.-F.; et al. Regulatory INKT Cells Lack Expression of the Transcription Factor PLZF and Control the Homeostasis of T(Reg) Cells and Macrophages in Adipose Tissue. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 85–95. [CrossRef] [PubMed]
57. 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. Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote Beiging of Adipose and Limit Obesity. *Nature* **2015**, *519*, 242–246. [CrossRef] [PubMed]

58. Molofsky, A.B.; Nussbaum, J.C.; Liang, H.-E.; Van Dyken, S.J.; Cheng, L.E.; Mohapatra, A.; Chawla, A.; Locksley, R.M. Innate Lymphoid Type 2 Cells Sustain Visceral Adipose Tissue Eosinophils and Alternatively Activated Macrophages. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 535–549. [CrossRef] [PubMed]
59. Nussbaum, J.C.; Van Dyken, S.J.; von Moltke, J.; Cheng, L.E.; Mohapatra, A.; Molofsky, A.B.; Thornton, E.E.; Krummel, M.F.; Chawla, A.; Liang, H.-E.; et al. Type 2 Innate Lymphoid Cells Control Eosinophil Homeostasis. *Nature* **2013**, *502*, 245–248. [CrossRef] [PubMed]
60. Kohlgruber, A.C.; Gal-Oz, S.T.; LaMarche, N.M.; Shimazaki, M.; Duquette, D.; Koay, H.-F.; Nguyen, H.N.; Mina, A.I.; Paras, T.; Tavakkoli, A.; et al. Γδ T Cells Producing Interleukin-17A Regulate Adipose Regulatory T Cell Homeostasis and Thermogenesis. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 464–474. [CrossRef] [PubMed]
61. Nishimura, S.; Manabe, I.; Nagasaki, M.; Eto, K.; Yamashita, H.; Ohsugi, M.; Otsu, M.; Hara, K.; Ueki, K.; Sugiura, S.; et al. $CD8^+$ Effector T Cells Contribute to Macrophage Recruitment and Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 914–920. [CrossRef] [PubMed]
62. Ying, W.; Wollam, J.; Ofrecio, J.M.; Bandyopadhyay, G.; El Ouarrat, D.; Lee, Y.S.; Oh, D.Y.; Li, P.; Osborn, O.; Olefsky, J.M. Adipose Tissue B2 Cells Promote Insulin Resistance through Leukotriene LTB4/LTB4R1 Signaling. *J. Clin. Invest.* **2017**, *127*, 1019–1030. [CrossRef] [PubMed]
63. Mráz, M.; Cinkajzlová, A.; Kloučková, J.; Lacinová, Z.; Kratochvílová, H.; Lipš, M.; Pořízka, M.; Kopecký, P.; Pierzynová, A.; Kučera, T.; et al. Coronary Artery Disease Is Associated with an Increased Amount of T Lymphocytes in Human Epicardial Adipose Tissue. *Mediat. Inflamm.* **2019**, *2019*, 4075086. [CrossRef]
64. Silaghi, A.; Piercecchi-Marti, M.-D.; Grino, M.; Leonetti, G.; Alessi, M.C.; Clement, K.; Dadoun, F.; Dutour, A. Epicardial Adipose Tissue Extent: Relationship with Age, Body Fat Distribution, and Coronaropathy. *Obesity* **2008**, *16*, 2424–2430. [CrossRef]
65. Greif, M.; Becker, A.; von Ziegler, F.; Lebherz, C.; Lehrke, M.; Broedl, U.C.; Tittus, J.; Parhofer, K.; Becker, C.; Reiser, M.; et al. Pericardial Adipose Tissue Determined by Dual Source CT Is a Risk Factor for Coronary Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, *29*, 781–786. [CrossRef] [PubMed]
66. Ding, J.; Hsu, F.-C.; Harris, T.B.; Liu, Y.; Kritchevsky, S.B.; Szklo, M.; Ouyang, P.; Espeland, M.A.; Lohman, K.K.; Criqui, M.H.; et al. The Association of Pericardial Fat with Incident Coronary Heart Disease: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *90*, 499–504. [CrossRef] [PubMed]
67. Hell, M.M.; Ding, X.; Rubeaux, M.; Slomka, P.; Gransar, H.; Terzopoulos, D.; Hayes, S.; Marwan, M.; Achenbach, S.; Berman, D.S.; et al. Epicardial Adipose Tissue Volume but Not Density Is an Independent Predictor for Myocardial Ischemia. *J. Cardiovasc. Comput. Tomogr.* **2016**, *10*, 141–149. [CrossRef] [PubMed]
68. Shan, D.; Wang, X.; Dou, G.; Zhang, W.; Jing, J.; He, B.; Li, Y.; Chen, Y.; Yang, J. Vascular-Specific Epicardial Adipose Tissue in Predicting Functional Myocardial Ischemia for Patients with Stable Chest Pain. *J. Thromb. Thrombolysis* **2021**, *51*, 915–923. [CrossRef] [PubMed]
69. Mahabadi, A.A.; Berg, M.H.; Lehmann, N.; Kälsch, H.; Bauer, M.; Kara, K.; Dragano, N.; Moebus, S.; Jöckel, K.-H.; Erbel, R.; et al. Association of Epicardial Fat with Cardiovascular Risk Factors and Incident Myocardial Infarction in the General Population: The Heinz Nixdorf Recall Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2013**, *61*, 1388–1395. [CrossRef] [PubMed]
70. Gaborit, B.; Kober, F.; Jacquier, A.; Moro, P.J.; Flavian, A.; Quilici, J.; Cuisset, T.; Simeoni, U.; Cozzone, P.; Alessi, M.-C.; et al. Epicardial Fat Volume Is Associated with Coronary Microvascular Response in Healthy Subjects: A Pilot Study. *Obesity* **2012**, *20*, 1200–1205. [CrossRef] [PubMed]
71. Bachar, G.N.; Dicker, D.; Kornowski, R.; Atar, E. Epicardial Adipose Tissue as a Predictor of Coronary Artery Disease in Asymptomatic Subjects. *Am. J. Cardiol.* **2012**, *110*, 534–538. [CrossRef] [PubMed]
72. Yerramasu, A.; Dey, D.; Venuraju, S.; Anand, D.V.; Atwal, S.; Corder, R.; Berman, D.S.; Lahiri, A. Increased Volume of Epicardial Fat Is an Independent Risk Factor for Accelerated Progression of Sub-Clinical Coronary Atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2012**, *220*, 223–230. [CrossRef] [PubMed]
73. Hirata, Y.; Kurobe, H.; Akaike, M.; Chikugo, F.; Hori, T.; Bando, Y.; Nishio, C.; Higashida, M.; Nakaya, Y.; Kitagawa, T.; et al. Enhanced Inflammation in Epicardial Fat in Patients with Coronary Artery Disease. *Int. Heart J.* **2011**, *52*, 139–142. [CrossRef] [PubMed]
74. Dozio, E.; Vianello, E.; Briganti, S.; Fink, B.; Malavazos, A.E.; Scognamiglio, E.T.; Dogliotti, G.; Sigrüener, A.; Schmitz, G.; Romanelli, M.M.C. Increased Reactive Oxygen Species Production in Epicardial Adipose Tissues from Coronary Artery Disease Patients Is Associated with Brown-to-White Adipocyte Trans-Differentiation. *Int. J. Cardiol.* **2014**, *174*, 413–414. [CrossRef]
75. Fioranelli, M.; Bottaccioli, A.G.; Bottaccioli, F.; Bianchi, M.; Rovesti, M.; Roccia, M.G. Stress and Inflammation in Coronary Artery Disease: A Review Psychoneuroendocrineimmunology-Based. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2031. [CrossRef] [PubMed]
76. Salgado-Somoza, A.; Teijeira-Fernández, E.; Fernández, A.L.; González-Juanatey, J.R.; Eiras, S. Proteomic Analysis of Epicardial and Subcutaneous Adipose Tissue Reveals Differences in Proteins Involved in Oxidative Stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2010**, *299*, H202–H209. [CrossRef] [PubMed]
77. Prati, F.; Arbustini, E.; Labellarte, A.; Sommariva, L.; Pawlowski, T.; Manzoli, A.; Pagano, A.; Motolese, M.; Boccanelli, A. Eccentric Atherosclerotic Plaques with Positive Remodelling Have a Pericardial Distribution: A Permissive Role of Epicardial Fat? A Three-Dimensional Intravascular Ultrasound Study of Left Anterior Descending Artery Lesions. *Eur. Heart J.* **2003**, *24*, 329–336. [CrossRef]

78. Oikonomou, E.K.; Williams, M.C.; Kotanidis, C.P.; Desai, M.Y.; Marwan, M.; Antonopoulos, A.S.; Thomas, K.E.; Thomas, S.; Akoumianakis, I.; Fan, L.M.; et al. A Novel Machine Learning-Derived Radiotranscriptomic Signature of Perivascular Fat Improves Cardiac Risk Prediction Using Coronary CT Angiography. *Eur. Heart J.* **2019**, *40*, 3529–3543. [CrossRef]
79. Oikonomou, E.K.; Antonopoulos, A.S.; Schottlander, D.; Marwan, M.; Mathers, C.; Tomlins, P.; Siddique, M.; Klüner, L.V.; Shirodaria, C.; Mavrogiannis, M.C.; et al. Standardized Measurement of Coronary Inflammation Using Cardiovascular Computed Tomography: Integration in Clinical Care as a Prognostic Medical Device. *Cardiovasc. Res.* **2021**, *117*, 2677–2690. [CrossRef] [PubMed]
80. Wong, C.X.; Abed, H.S.; Molaee, P.; Nelson, A.J.; Brooks, A.G.; Sharma, G.; Leong, D.P.; Lau, D.H.; Middeldorp, M.E.; Roberts-Thomson, K.C.; et al. Pericardial Fat Is Associated with Atrial Fibrillation Severity and Ablation Outcome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, *57*, 1745–1751. [CrossRef]
81. Nagashima, K.; Okumura, Y.; Watanabe, I.; Nakai, T.; Ohkubo, K.; Kofune, T.; Kofune, M.; Mano, H.; Sonoda, K.; Hirayama, A. Association between Epicardial Adipose Tissue Volumes on 3-Dimensional Reconstructed CT Images and Recurrence of Atrial Fibrillation after Catheter Ablation. *Circ. J.* **2011**, *75*, 2559–2565. [CrossRef] [PubMed]
82. Nakanishi, K.; Fukuda, S.; Tanaka, A.; Otsuka, K.; Sakamoto, M.; Taguchi, H.; Yoshikawa, J.; Shimada, K.; Yoshiyama, M. Peri-Atrial Epicardial Adipose Tissue Is Associated with New-Onset Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Circ. J.* **2012**, *76*, 2748–2754. [CrossRef] [PubMed]
83. Cho, K.-I.; Kim, B.-J.; Cha, T.-J.; Heo, J.-H.; Kim, H.-S.; Lee, J.-W. Impact of Duration and Dosage of Statin Treatment and Epicardial Fat Thickness on the Recurrence of Atrial Fibrillation after Electrical Cardioversion. *Heart Vessel.* **2015**, *30*, 490–497. [CrossRef] [PubMed]
84. Thanassoulis, G.; Massaro, J.M.; O'Donnell, C.J.; Hoffmann, U.; Levy, D.; Ellinor, P.T.; Wang, T.J.; Schnabel, R.B.; Vasan, R.S.; Fox, C.S.; et al. Pericardial Fat Is Associated with Prevalent Atrial Fibrillation: The Framingham Heart Study. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **2010**, *3*, 345–350. [CrossRef] [PubMed]
85. Al Chekakie, M.O.; Welles, C.C.; Metoyer, R.; Ibrahim, A.; Shapira, A.R.; Cytron, J.; Santucci, P.; Wilber, D.J.; Akar, J.G. Pericardial Fat Is Independently Associated with Human Atrial Fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, *56*, 784–788. [CrossRef] [PubMed]
86. Frustaci, A.; Chimenti, C.; Bellocci, F.; Morgante, E.; Russo, M.A.; Maseri, A. Histological Substrate of Atrial Biopsies in Patients with Lone Atrial Fibrillation. *Circulation* **1997**, *96*, 1180–1184. [CrossRef] [PubMed]
87. Yamashita, T.; Sekiguchi, A.; Iwasaki, Y.; Date, T.; Sagara, K.; Tanabe, H.; Suma, H.; Sawada, H.; Aizawa, T. Recruitment of Immune Cells across Atrial Endocardium in Human Atrial Fibrillation. *Circ. J.* **2010**, *74*, 262–270. [CrossRef] [PubMed]
88. Hatem, S.N.; Sanders, P. Epicardial Adipose Tissue and Atrial Fibrillation. *Cardiovasc. Res.* **2014**, *102*, 205–213. [CrossRef]
89. Poggi, A.; Gaborit, B.; Schindler, T.; Liberale, L.; Montecucco, F.; Carbone, F. Epicardial Fat and Atrial Fibrillation: The Perils of Atrial Failure. *Europace*, 2022; *Accepted for Publication*.
90. Iacobellis, G.; Leonetti, F.; Singh, N.; Sharma, A.M. Relationship of Epicardial Adipose Tissue with Atrial Dimensions and Diastolic Function in Morbidly Obese Subjects. *Int. J. Cardiol.* **2007**, *115*, 272–273. [CrossRef] [PubMed]
91. Iacobellis, G.; Ribaudo, M.C.; Zappaterreno, A.; Iannucci, C.V.; Leonetti, F. Relation between Epicardial Adipose Tissue and Left Ventricular Mass. *Am. J. Cardiol.* **2004**, *94*, 1084–1087. [CrossRef] [PubMed]
92. Crendal, E.; Dutheil, F.; Naughton, G.; McDonald, T.; Obert, P. Increased Myocardial Dysfunction, Dyssynchrony, and Epicardial Fat across the Lifespan in Healthy Males. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2014**, *14*, 95. [CrossRef] [PubMed]
93. Jing, L.; Binkley, C.M.; Suever, J.D.; Umasankar, N.; Haggerty, C.M.; Rich, J.; Wehner, G.J.; Hamlet, S.M.; Powell, D.K.; Radulescu, A.; et al. Cardiac Remodeling and Dysfunction in Childhood Obesity: A Cardiovascular Magnetic Resonance Study. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* **2016**, *18*, 28. [CrossRef] [PubMed]
94. Lasbleiz, A.; Gaborit, B.; Soghomonian, A.; Bartoli, A.; Ancel, P.; Jacquier, A.; Dutour, A. COVID-19 and Obesity: Role of Ectopic Visceral and Epicardial Adipose Tissues in Myocardial Injury. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 726967. [CrossRef] [PubMed]
95. Bihan, H.; Heidar, R.; Beloeuvre, A.; Allard, L.; Ouedraogo, E.; Tatulashvili, S.; Tandjaoui, Y.; Gaudry, S.; Brillet, P.-Y.; Cosson, E. Epicardial Adipose Tissue and Severe Coronavirus Disease 19. *Cardiovasc. Diabetol.* **2021**, *20*, 147. [CrossRef] [PubMed]
96. Iacobellis, G.; Secchi, F.; Capitanio, G.; Basilico, S.; Schiaffino, S.; Boveri, S.; Sardanelli, F.; Corsi Romanelli, M.M.; Malavazos, A.E. Epicardial Fat Inflammation in Severe COVID-19. *Obesity* **2020**, *28*, 2260–2262. [CrossRef] [PubMed]
97. Iacobellis, G.; Malavazos, A.E.; Basilico, S.; Tresoldi, S.; Rinaldo, R.F.; Dubini, C.; Capitanio, G.; Serpi, F.; Schiaffino, S.; Oliva, O.A.; et al. Epicardial Fat Inflammation Response to COVID-19 Therapies. *Obesity* **2021**, *29*, 1427–1433. [CrossRef] [PubMed]
98. Malavazos, A.E.; Goldberger, J.J.; Iacobellis, G. Does Epicardial Fat Contribute to COVID-19 Myocardial Inflammation? *Eur. Heart J.* **2020**, *41*, 2333. [CrossRef] [PubMed]
99. Shi, S.; Qin, M.; Cai, Y.; Liu, T.; Shen, B.; Yang, F.; Cao, S.; Liu, X.; Xiang, Y.; Zhao, Q.; et al. Characteristics and Clinical Significance of Myocardial Injury in Patients with Severe Coronavirus Disease 2019. *Eur. Heart J.* **2020**, *41*, 2070–2079. [CrossRef] [PubMed]
100. Gaborit, B.; Jacquier, A.; Kober, F.; Abdesselam, I.; Cuisset, T.; Boullu-Ciocca, S.; Emungania, O.; Alessi, M.-C.; Clément, K.; Bernard, M.; et al. Effects of Bariatric Surgery on Cardiac Ectopic Fat: Lesser Decrease in Epicardial Fat Compared to Visceral Fat Loss and No Change in Myocardial Triglyceride Content. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2012**, *60*, 1381–1389. [CrossRef] [PubMed]
101. Dutour, A.; Abdesselam, I.; Ancel, P.; Kober, F.; Mrad, G.; Darmon, P.; Ronsin, O.; Pradel, V.; Lesavre, N.; Martin, J.C.; et al. Exenatide Decreases Liver Fat Content and Epicardial Adipose Tissue in Patients with Obesity and Type 2 Diabetes: A Prospective Randomized Clinical Trial Using Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. *Diabetes Obes. Metab.* **2016**, *18*, 882–891. [CrossRef] [PubMed]

102. Saco-Ledo, G.; Valenzuela, P.L.; Castillo-García, A.; Arenas, J.; León-Sanz, M.; Ruilope, L.M.; Lucia, A. Physical Exercise and Epicardial Adipose Tissue: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Obes. Rev.* **2021**, *22*, e13103. [CrossRef] [PubMed]
103. Launbo, N.; Zobel, E.H.; von Scholten, B.J.; Faerch, K.; Jørgensen, P.G.; Christensen, R.H. Targeting Epicardial Adipose Tissue with Exercise, Diet, Bariatric Surgery or Pharmaceutical Interventions: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes. Rev.* **2021**, *22*, e13136. [CrossRef] [PubMed]
104. Park, J.-H.; Park, Y.S.; Kim, Y.J.; Lee, I.S.; Kim, J.H.; Lee, J.-H.; Choi, S.W.; Jeong, J.-O.; Seong, I.-W. Effects of Statins on the Epicardial Fat Thickness in Patients with Coronary Artery Stenosis Underwent Percutaneous Coronary Intervention: Comparison of Atorvastatin with Simvastatin/Ezetimibe. *J. Cardiovasc. Ultrasound* **2010**, *18*, 121–126. [CrossRef] [PubMed]
105. Sato, T.; Aizawa, Y.; Yuasa, S.; Kishi, S.; Fuse, K.; Fujita, S.; Ikeda, Y.; Kitazawa, H.; Takahashi, M.; Sato, M.; et al. The Effect of Dapagliflozin Treatment on Epicardial Adipose Tissue Volume. *Cardiovasc. Diabetol.* **2018**, *17*, 6. [CrossRef] [PubMed]
106. Sato, T.; Aizawa, Y.; Yuasa, S.; Fujita, S.; Ikeda, Y.; Okabe, M. The Effect of Dapagliflozin Treatment on Epicardial Adipose Tissue Volume and P-Wave Indices: An Ad-Hoc Analysis of The Previous Randomized Clinical Trial. *J. Atheroscler. Thromb.* **2020**, *27*, 1348–1358. [CrossRef] [PubMed]
107. Gaborit, B.; Ancel, P.; Abdullah, A.E.; Maurice, F.; Abdesselam, I.; Calen, A.; Soghomonian, A.; Houssays, M.; Varlet, I.; Eisinger, M.; et al. Effect of Empagliflozin on Ectopic Fat Stores and Myocardial Energetics in Type 2 Diabetes: The EMPACEF Study. *Cardiovasc. Diabetol.* **2021**, *20*, 57. [CrossRef] [PubMed]
108. Jonker, J.T.; de Mol, P.; de Vries, S.T.; Widya, R.L.; Hammer, S.; van Schinkel, L.D.; van der Meer, R.W.; Gans, R.O.B.; Webb, A.G.; Kan, H.E.; et al. Exercise and Type 2 Diabetes Mellitus: Changes in Tissue-Specific Fat Distribution and Cardiac Function. *Radiology* **2013**, *269*, 434–442. [CrossRef] [PubMed]
109. Parisi, V.; Petraglia, L.; D'Esposito, V.; Cabaro, S.; Rengo, G.; Caruso, A.; Grimaldi, M.G.; Baldascino, F.; De Bellis, A.; Vitale, D.; et al. Statin Therapy Modulates Thickness and Inflammatory Profile of Human Epicardial Adipose Tissue. *Int. J. Cardiol.* **2019**, *274*, 326–330. [CrossRef]
110. Kotanidis, C.P.; Antoniades, C. Perivascular Fat Imaging by Computed Tomography (CT): A Virtual Guide. *Br. J. Pharmacol.* **2021**, *178*, 4270–4290. [CrossRef]
111. Elnabawi, Y.A.; Oikonomou, E.K.; Dey, A.K.; Mancio, J.; Rodante, J.A.; Aksentijevich, M.; Choi, H.; Keel, A.; Erb-Alvarez, J.; Teague, H.L.; et al. Association of Biologic Therapy with Coronary Inflammation in Patients with Psoriasis as Assessed by Perivascular Fat Attenuation Index. *JAMA Cardiol.* **2019**, *4*, 885–891. [CrossRef] [PubMed]
112. Zechner, R.; Zimmermann, R.; Eichmann, T.O.; Kohlwein, S.D.; Haemmerle, G.; Lass, A.; Madeo, F. FAT SIGNALS—Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling. *Cell. Metab.* **2012**, *15*, 279–291. [CrossRef] [PubMed]
113. Ballinger, M.A.; Andrews, M.T. Nature's Fat-Burning Machine: Brown Adipose Tissue in a Hibernating Mammal. *J. Exp. Biol.* **2018**, *221*, jeb162586. [CrossRef]
114. Burlington, R.F.; Therriault, D.G.; Hubbard, R.W. Lipid Changes in Isolated Brown Fat Cells from Hibernating and Aroused Thirteen-Lined Ground Squirrels (Citellus Tridecemlineatus). *Comp. Biochem. Physiol.* **1969**, *29*, 431–437. [CrossRef]
115. Barger, J.L.; Barnes, B.M.; Boyer, B.B. Regulation of UCP1 and UCP3 in Arctic Ground Squirrels and Relation with Mitochondrial Proton Leak. *J. Appl. Physiol.* **2006**, *101*, 339–347. [CrossRef]
116. Yan, J.; Burman, A.; Nichols, C.; Alila, L.; Showe, L.C.; Showe, M.K.; Boyer, B.B.; Barnes, B.M.; Marr, T.G. Detection of Differential Gene Expression in Brown Adipose Tissue of Hibernating Arctic Ground Squirrels with Mouse Microarrays. *Physiol. Genom.* **2006**, *25*, 346–353. [CrossRef] [PubMed]
117. Malatesta, M.; Battistelli, S.; Rocchi, M.B.; Zancanaro, C.; Fakan, S.; Gazzanelli, G. Fine Structural Modifications of Liver, Pancreas and Brown Adipose Tissue Mitochondria from Hibernating, Arousing and Euthermic Dormice. *Cell Biol. Int.* **2001**, *25*, 131–138. [CrossRef]
118. Bartelt, A.; Heeren, J. Adipose Tissue Browning and Metabolic Health. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2014**, *10*, 24–36. [CrossRef]
119. Cinti, S. The Adipose Organ at a Glance. *Dis. Model Mech.* **2012**, *5*, 588–594. [CrossRef]
120. Cannon, B.; Nedergaard, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 277–359. [CrossRef]
121. Lowell, B.B.; Spiegelman, B.M. Towards a Molecular Understanding of Adaptive Thermogenesis. *Nature* **2000**, *404*, 652–660. [CrossRef]
122. Nicholls, D.G.; Locke, R.M. Thermogenic Mechanisms in Brown Fat. *Physiol. Rev.* **1984**, *64*, 1–64. [CrossRef] [PubMed]
123. Nedergaard, J.; Golozoubova, V.; Matthias, A.; Asadi, A.; Jacobsson, A.; Cannon, B. UCP1: The Only Protein Able to Mediate Adaptive Non-Shivering Thermogenesis and Metabolic Inefficiency. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1504*, 82–106. [CrossRef]
124. Nedergaard, J.; Bengtsson, T.; Cannon, B. Unexpected Evidence for Active Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2007**, *293*, E444–E452. [CrossRef] [PubMed]
125. Cypess, A.M.; Lehman, S.; Williams, G.; Tal, I.; Rodman, D.; Goldfine, A.B.; Kuo, F.C.; Palmer, E.L.; Tseng, Y.-H.; Doria, A.; et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 1509–1517. [CrossRef]
126. Young, P.; Arch, J.R.; Ashwell, M. Brown Adipose Tissue in the Parametrial Fat Pad of the Mouse. *FEBS Lett.* **1984**, *167*, 10–14. [CrossRef]
127. Wu, J.; Boström, P.; Sparks, L.M.; Ye, L.; Choi, J.H.; Giang, A.-H.; Khandekar, M.; Nuutila, P.; Schaart, G.; Huang, K.; et al. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell* **2012**, *150*, 366–376. [CrossRef]

128. Barbatelli, G.; Murano, I.; Madsen, L.; Hao, Q.; Jimenez, M.; Kristiansen, K.; Giacobino, J.P.; De Matteis, R.; Cinti, S. The Emergence of Cold-Induced Brown Adipocytes in Mouse White Fat Depots Is Determined Predominantly by White to Brown Adipocyte Transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2010**, *298*, E1244–E1253. [CrossRef]
129. Sacco, E.; Bientinesi, R.; Tienforti, D.; Racioppi, M.; Gulino, G.; D'Agostino, D.; Vittori, M.; Bassi, P. Discovery History and Clinical Development of Mirabegron for the Treatment of Overactive Bladder and Urinary Incontinence. *Expert Opin. Drug Discov.* **2014**, *9*, 433–448. [CrossRef]
130. Himms-Hagen, J.; Melnyk, A.; Zingaretti, M.C.; Ceresi, E.; Barbatelli, G.; Cinti, S. Multilocular Fat Cells in WAT of CL-316243-Treated Rats Derive Directly from White Adipocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2000**, *279*, C670–C681. [CrossRef]
131. Weyer, C.; Tataranni, P.A.; Snitker, S.; Danforth, E.; Ravussin, E. Increase in Insulin Action and Fat Oxidation after Treatment with CL 316,243, a Highly Selective Beta3-Adrenoceptor Agonist in Humans. *Diabetes* **1998**, *47*, 1555–1561. [CrossRef]
132. van Baak, M.A.; Hul, G.B.J.; Toubro, S.; Astrup, A.; Gottesdiener, K.M.; DeSmet, M.; Saris, W.H.M. Acute Effect of L-796568, a Novel Beta 3-Adrenergic Receptor Agonist, on Energy Expenditure in Obese Men. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2002**, *71*, 272–279. [CrossRef] [PubMed]
133. Larsen, T.M.; Toubro, S.; van Baak, M.A.; Gottesdiener, K.M.; Larson, P.; Saris, W.H.M.; Astrup, A. Effect of a 28-d Treatment with L-796568, a Novel Beta(3)-Adrenergic Receptor Agonist, on Energy Expenditure and Body Composition in Obese Men. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 780–788. [CrossRef] [PubMed]
134. Buemann, B.; Toubro, S.; Astrup, A. Effects of the Two β_3-Agonists, ZD7114 and ZD2079 on 24 Hour Energy Expenditure and Respiratory Quotient in Obese Subjects. *Int. J. Obes.* **2000**, *24*, 1553–1560. [CrossRef]
135. Lockie, S.H.; Heppner, K.M.; Chaudhary, N.; Chabenne, J.R.; Morgan, D.A.; Veyrat-Durebex, C.; Ananthakrishnan, G.; Rohner-Jeanrenaud, F.; Drucker, D.J.; DiMarchi, R.; et al. Direct Control of Brown Adipose Tissue Thermogenesis by Central Nervous System Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Signaling. *Diabetes* **2012**, *61*, 2753–2762. [CrossRef] [PubMed]
136. Kooijman, S.; Wang, Y.; Parlevliet, E.T.; Boon, M.R.; Edelschaap, D.; Snaterse, G.; Pijl, H.; Romijn, J.A.; Rensen, P.C.N. Central GLP-1 Receptor Signalling Accelerates Plasma Clearance of Triacylglycerol and Glucose by Activating Brown Adipose Tissue in Mice. *Diabetologia* **2015**, *58*, 2637–2646. [CrossRef] [PubMed]
137. Beiroa, D.; Imbernon, M.; Gallego, R.; Senra, A.; Herranz, D.; Villarroya, F.; Serrano, M.; Fernø, J.; Salvador, J.; Escalada, J.; et al. GLP-1 Agonism Stimulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Browning through Hypothalamic AMPK. *Diabetes* **2014**, *63*, 3346–3358. [CrossRef] [PubMed]
138. Xu, F.; Lin, B.; Zheng, X.; Chen, Z.; Cao, H.; Xu, H.; Liang, H.; Weng, J. GLP-1 Receptor Agonist Promotes Brown Remodelling in Mouse White Adipose Tissue through SIRT1. *Diabetologia* **2016**, *59*, 1059–1069. [CrossRef]
139. 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. Functional Inactivation of Mast Cells Enhances Subcutaneous Adipose Tissue Browning in Mice. *Cell Rep.* **2019**, *28*, 792–803.e4. [CrossRef]
140. Frontini, A.; Vitali, A.; Perugini, J.; Murano, I.; Romiti, C.; Ricquier, D.; Guerrieri, M.; Cinti, S. White-to-Brown Transdifferentiation of Omental Adipocytes in Patients Affected by Pheochromocytoma. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2013**, *1831*, 950–959. [CrossRef]
141. Gesta, S.; Tseng, Y.-H.; Kahn, C.R. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* **2007**, *131*, 242–256. [CrossRef]
142. Rodeheffer, M.S.; Birsoy, K.; Friedman, J.M. Identification of White Adipocyte Progenitor Cells In Vivo. *Cell* **2008**, *135*, 240–249. [CrossRef] [PubMed]
143. Ussar, S.; Lee, K.Y.; Dankel, S.N.; Boucher, J.; Haering, M.-F.; Kleinridders, A.; Thomou, T.; Xue, R.; Macotela, Y.; Cypess, A.M.; et al. ASC-1, PAT2, and P2RX5 Are Cell Surface Markers for White, Beige, and Brown Adipocytes. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 247ra103. [CrossRef] [PubMed]
144. Sharp, L.Z.; Shinoda, K.; Ohno, H.; Scheel, D.W.; Tomoda, E.; Ruiz, L.; Hu, H.; Wang, L.; Pavlova, Z.; Gilsanz, V.; et al. Human BAT Possesses Molecular Signatures That Resemble Beige/Brite Cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49452. [CrossRef]
145. Garcia, R.A.; Roemmich, J.N.; Claycombe, K.J. Evaluation of Markers of Beige Adipocytes in White Adipose Tissue of the Mouse. *Nutr. Metab.* **2016**, *13*, 24. [CrossRef]
146. Waldén, T.B.; Hansen, I.R.; Timmons, J.A.; Cannon, B.; Nedergaard, J. Recruited vs. Nonrecruited Molecular Signatures of Brown, "Brite," and White Adipose Tissues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2012**, *302*, E19–E31. [CrossRef]
147. Cypess, A.M.; White, A.P.; Vernochet, C.; Schulz, T.J.; Xue, R.; Sass, C.A.; Huang, T.L.; Roberts-Toler, C.; Weiner, L.S.; Sze, C.; et al. Anatomical Localization, Gene Expression Profiling and Functional Characterization of Adult Human Neck Brown Fat. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 635–639. [CrossRef] [PubMed]
148. Comas, F.; Martínez, C.; Sabater, M.; Ortega, F.; Latorre, J.; Díaz-Sáez, F.; Aragonés, J.; Camps, M.; Gumà, A.; Ricart, W.; et al. Neuregulin 4 Is a Novel Marker of Beige Adipocyte Precursor Cells in Human Adipose Tissue. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 39. [CrossRef] [PubMed]
149. Lee, Y.-H.; Petkova, A.P.; Mottillo, E.P.; Granneman, J.G. In Vivo Identification of Bipotential Adipocyte Progenitors Recruited by B3-Adrenoceptor Activation and High-Fat Feeding. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 480–491. [CrossRef]
150. Pilkington, A.-C.; Paz, H.A.; Wankhade, U.D. Beige Adipose Tissue Identification and Marker Specificity-Overview. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 599134. [CrossRef]
151. de Jong, J.M.A.; Larsson, O.; Cannon, B.; Nedergaard, J. A Stringent Validation of Mouse Adipose Tissue Identity Markers. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **2015**, *308*, E1085–E1105. [CrossRef]

152. Kajimura, S.; Spiegelman, B.M.; Seale, P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 546–559. [CrossRef] [PubMed]
153. Wankhade, U.D.; Lee, J.-H.; Dagur, P.K.; Yadav, H.; Shen, M.; Chen, W.; Kulkarni, A.B.; McCoy, J.P.; Finkel, T.; Cypess, A.M.; et al. TGF-β Receptor 1 Regulates Progenitors That Promote Browning of White Fat. *Mol. Metab.* **2018**, *16*, 160–171. [CrossRef] [PubMed]
154. Seale, P.; Kajimura, S.; Yang, W.; Chin, S.; Rohas, L.; Uldry, M.; Tavernier, G.; Langin, D.; Spiegelman, B.M. Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16. *Cell Metab.* **2007**, *6*, 38–54. [CrossRef] [PubMed]
155. Puigserver, P.; Wu, Z.; Park, C.W.; Graves, R.; Wright, M.; Spiegelman, B.M. A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* **1998**, *92*, 829–839. [CrossRef]
156. Uldry, M.; Yang, W.; St-Pierre, J.; Lin, J.; Seale, P.; Spiegelman, B.M. Complementary Action of the PGC-1 Coactivators in Mitochondrial Biogenesis and Brown Fat Differentiation. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 333–341. [CrossRef]
157. Inagaki, T.; Sakai, J.; Kajimura, S. Transcriptional and Epigenetic Control of Brown and Beige Adipose Cell Fate and Function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 480–495. [CrossRef]
158. Huang, Z.; Zhong, L.; Lee, J.T.H.; Zhang, J.; Wu, D.; Geng, L.; Wang, Y.; Wong, C.-M.; Xu, A. The FGF21-CCL11 Axis Mediates Beiging of White Adipose Tissues by Coupling Sympathetic Nervous System to Type 2 Immunity. *Cell Metab.* **2017**, *26*, 493–508.e4. [CrossRef]
159. Harms, M.; Seale, P. Brown and Beige Fat: Development, Function and Therapeutic Potential. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1252–1263. [CrossRef]
160. van Marken Lichtenbelt, W.D.; Vanhommerig, J.W.; Smulders, N.M.; Drossaerts, J.M.A.F.L.; Kemerink, G.J.; Bouvy, N.D.; Schrauwen, P.; Teule, G.J.J. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 1500–1508. [CrossRef]
161. Huttunen, P.; Hirvonen, J.; Kinnula, V. The Occurrence of Brown Adipose Tissue in Outdoor Workers. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **1981**, *46*, 339–345. [CrossRef]
162. Saito, M.; Okamatsu-Ogura, Y.; Matsushita, M.; Watanabe, K.; Yoneshiro, T.; Nio-Kobayashi, J.; Iwanaga, T.; Miyagawa, M.; Kameya, T.; Nakada, K.; et al. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans: Effects of Cold Exposure and Adiposity. *Diabetes* **2009**, *58*, 1526–1531. [CrossRef]
163. Sidossis, L.; Kajimura, S. Brown and Beige Fat in Humans: Thermogenic Adipocytes That Control Energy and Glucose Homeostasis. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 478–486. [CrossRef]
164. Ghorbani, M.; Claus, T.H.; Himms-Hagen, J. Hypertrophy of Brown Adipocytes in Brown and White Adipose Tissues and Reversal of Diet-Induced Obesity in Rats Treated with a Beta3-Adrenoceptor Agonist. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *54*, 121–131. [CrossRef]
165. Ghorbani, M.; Himms-Hagen, J. Appearance of Brown Adipocytes in White Adipose Tissue during CL 316,243-Induced Reversal of Obesity and Diabetes in Zucker Fa/Fa Rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **1997**, *21*, 465–475. [CrossRef]
166. Cousin, B.; Cinti, S.; Morroni, M.; Raimbault, S.; Ricquier, D.; Pénicaud, L.; Casteilla, L. Occurrence of Brown Adipocytes in Rat White Adipose Tissue: Molecular and Morphological Characterization. *J. Cell Sci.* **1992**, *103 Pt 4*, 931–942. [CrossRef]
167. Jimenez, M.; Barbatelli, G.; Allevi, R.; Cinti, S.; Seydoux, J.; Giacobino, J.-P.; Muzzin, P.; Preitner, F. Beta 3-Adrenoceptor Knockout in C57BL/6J Mice Depresses the Occurrence of Brown Adipocytes in White Fat. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 699–705. [CrossRef] [PubMed]
168. 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. Warming Induces Significant Reprogramming of Beige, but Not Brown, Adipocyte Cellular Identity. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 1121–1137.e5. [CrossRef]
169. Hardie, D.G.; Carling, D.; Carlson, M. The AMP-Activated/SNF1 Protein Kinase Subfamily: Metabolic Sensors of the Eukaryotic Cell? *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 821–855. [CrossRef] [PubMed]
170. Rutter, G.A.; Da Silva Xavier, G.; Leclerc, I. Roles of 5′-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) in Mammalian Glucose Homoeostasis. *Biochem. J.* **2003**, *375*, 1–16. [CrossRef]
171. López, M.; Nogueiras, R.; Tena-Sempere, M.; Diéguez, C. Hypothalamic AMPK: A Canonical Regulator of Whole-Body Energy Balance. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 421–432. [CrossRef] [PubMed]
172. López, M.; Varela, L.; Vázquez, M.J.; Rodríguez-Cuenca, S.; González, C.R.; Velagapudi, V.R.; Morgan, D.A.; Schoenmakers, E.; Agassandian, K.; Lage, R.; et al. Hypothalamic AMPK and Fatty Acid Metabolism Mediate Thyroid Regulation of Energy Balance. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 1001–1008. [CrossRef]
173. Martínez-Sánchez, N.; Moreno-Navarrete, J.M.; Contreras, C.; Rial-Pensado, E.; Fernø, J.; Nogueiras, R.; Diéguez, C.; Fernández-Real, J.-M.; López, M. Thyroid Hormones Induce Browning of White Fat. *J. Endocrinol.* **2016**, *232*, 351–362. [CrossRef] [PubMed]
174. Park, H.; He, A.; Lodhi, I.J. Lipid Regulators of Thermogenic Fat Activation. *Trends Endocrinol. Metab.* **2019**, *30*, 710–723. [CrossRef] [PubMed]
175. Guilherme, A.; Pedersen, D.J.; Henchey, E.; Henriques, F.S.; Danai, L.V.; Shen, Y.; Yenilmez, B.; Jung, D.; Kim, J.K.; Lodhi, I.J.; et al. Adipocyte Lipid Synthesis Coupled to Neuronal Control of Thermogenic Programming. *Mol. Metab.* **2017**, *6*, 781–796. [CrossRef] [PubMed]

176. Lodhi, I.J.; Yin, L.; Jensen-Urstad, A.P.L.; Funai, K.; Coleman, T.; Baird, J.H.; El Ramahi, M.K.; Razani, B.; Song, H.; Fu-Hsu, F.; et al. Inhibiting Adipose Tissue Lipogenesis Reprograms Thermogenesis and PPARγ Activation to Decrease Diet-Induced Obesity. *Cell Metab.* **2012**, *16*, 189–201. [CrossRef]
177. Sadurskis, A.; Dicker, A.; Cannon, B.; Nedergaard, J. Polyunsaturated Fatty Acids Recruit Brown Adipose Tissue: Increased UCP Content and NST Capacity. *Am. J. Physiol.* **1995**, *269*, E351–E360. [CrossRef]
178. Kim, M.; Goto, T.; Yu, R.; Uchida, K.; Tominaga, M.; Kano, Y.; Takahashi, N.; Kawada, T. Fish Oil Intake Induces UCP1 Upregulation in Brown and White Adipose Tissue via the Sympathetic Nervous System. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18013. [CrossRef]
179. Ghandour, R.A.; Colson, C.; Giroud, M.; Maurer, S.; Rekima, S.; Ailhaud, G.; Klingenspor, M.; Amri, E.-Z.; Pisani, D.F. Impact of Dietary Ω3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Brown and Brite Adipocyte Function. *J. Lipid Res.* **2018**, *59*, 452–461. [CrossRef]
180. Park, H.; He, A.; Tan, M.; Johnson, J.M.; Dean, J.M.; Pietka, T.A.; Chen, Y.; Zhang, X.; Hsu, F.-F.; Razani, B.; et al. Peroxisome-Derived Lipids Regulate Adipose Thermogenesis by Mediating Cold-Induced Mitochondrial Fission. *J. Clin. Invest.* **2019**, *129*, 694–711. [CrossRef] [PubMed]
181. Lafontan, M.; Moro, C.; Berlan, M.; Crampes, F.; Sengenes, C.; Galitzky, J. Control of Lipolysis by Natriuretic Peptides and Cyclic GMP. *Trends Endocrinol. Metab.* **2008**, *19*, 130–137. [CrossRef] [PubMed]
182. Zois, N.E.; Bartels, E.D.; Hunter, I.; Kousholt, B.S.; Olsen, L.H.; Goetze, J.P. Natriuretic Peptides in Cardiometabolic Regulation and Disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **2014**, *11*, 403–412. [CrossRef] [PubMed]
183. Collins, S. A Heart-Adipose Tissue Connection in the Regulation of Energy Metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2014**, *10*, 157–163. [CrossRef] [PubMed]
184. Volpe, M.; Rubattu, S.; Burnett, J. Natriuretic Peptides in Cardiovascular Diseases: Current Use and Perspectives. *Eur. Heart J.* **2014**, *35*, 419–425. [CrossRef] [PubMed]
185. Liu, D.; Ceddia, R.P.; Collins, S. Cardiac Natriuretic Peptides Promote Adipose "browning" through MTOR Complex-1. *Mol. Metab.* **2018**, *9*, 192–198. [CrossRef] [PubMed]
186. Tran, C.M.; Mukherjee, S.; Ye, L.; Frederick, D.W.; Kissig, M.; Davis, J.G.; Lamming, D.W.; Seale, P.; Baur, J.A. Rapamycin Blocks Induction of the Thermogenic Program in White Adipose Tissue. *Diabetes* **2016**, *65*, 927–941. [CrossRef] [PubMed]
187. Liu, D.; Bordicchia, M.; Zhang, C.; Fang, H.; Wei, W.; Li, J.-L.; Guilherme, A.; Guntur, K.; Czech, M.P.; Collins, S. Activation of MTORC1 Is Essential for β-Adrenergic Stimulation of Adipose Browning. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 1704–1716. [CrossRef] [PubMed]
188. Kimura, H.; Nagoshi, T.; Oi, Y.; Yoshii, A.; Tanaka, Y.; Takahashi, H.; Kashiwagi, Y.; Tanaka, T.D.; Yoshimura, M. Treatment with Atrial Natriuretic Peptide Induces Adipose Tissue Browning and Exerts Thermogenic Actions In Vivo. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 17466. [CrossRef] [PubMed]
189. Bordicchia, M.; Liu, D.; Amri, E.-Z.; Ailhaud, G.; Dessì-Fulgheri, P.; Zhang, C.; Takahashi, N.; Sarzani, R.; Collins, S. Cardiac Natriuretic Peptides Act via P38 MAPK to Induce the Brown Fat Thermogenic Program in Mouse and Human Adipocytes. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 1022–1036. [CrossRef]
190. Huang, Z.; Xu, A. Adipose Extracellular Vesicles in Intercellular and Inter-Organ Crosstalk in Metabolic Health and Diseases. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 608680. [CrossRef] [PubMed]
191. van der Pol, E.; Böing, A.N.; Harrison, P.; Sturk, A.; Nieuwland, R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 676–705. [CrossRef]
192. Zhao, H.; Shang, Q.; Pan, Z.; Bai, Y.; Li, Z.; Zhang, H.; Zhang, Q.; Guo, C.; Zhang, L.; Wang, Q. Exosomes from Adipose-Derived Stem Cells Attenuate Adipose Inflammation and Obesity Through Polarizing M2 Macrophages and Beiging in White Adipose Tissue. *Diabetes* **2018**, *67*, 235–247. [CrossRef] [PubMed]
193. Jung, Y.J.; Kim, H.K.; Cho, Y.; Choi, J.S.; Woo, C.H.; Lee, K.S.; Sul, J.H.; Lee, C.M.; Han, J.; Park, J.H.; et al. Cell Reprogramming Using Extracellular Vesicles from Differentiating Stem Cells into White/Beige Adipocytes. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaay6721. [CrossRef] [PubMed]
194. Thomou, T.; Mori, M.A.; Dreyfuss, J.M.; Konishi, M.; Sakaguchi, M.; Wolfrum, C.; Rao, T.N.; Winnay, J.N.; Garcia-Martin, R.; Grinspoon, S.K.; et al. Adipose-Derived Circulating MiRNAs Regulate Gene Expression in Other Tissues. *Nature* **2017**, *542*, 450–455. [CrossRef] [PubMed]
195. Mori, M.; Nakagami, H.; Rodriguez-Araujo, G.; Nimura, K.; Kaneda, Y. Essential Role for MiR-196a in Brown Adipogenesis of White Fat Progenitor Cells. *PLoS Biol.* **2012**, *10*, e1001314. [CrossRef] [PubMed]
196. Chen, Y.; Siegel, F.; Kipschull, S.; Haas, B.; Fröhlich, H.; Meister, G.; Pfeifer, A. MiR-155 Regulates Differentiation of Brown and Beige Adipocytes via a Bistable Circuit. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1769. [CrossRef]
197. Zheng, S.-L.; Li, Z.-Y.; Song, J.; Liu, J.-M.; Miao, C.-Y. Metrnl: A Secreted Protein with New Emerging Functions. *Acta Pharmacol. Sin.* **2016**, *37*, 571–579. [CrossRef]
198. 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. Meteorin-like Is a Hormone That Regulates Immune-Adipose Interactions to Increase Beige Fat Thermogenesis. *Cell* **2014**, *157*, 1279–1291. [CrossRef]
199. 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. A PGC1-α-Dependent Myokine That Drives Brown-Fat-like Development of White Fat and Thermogenesis. *Nature* **2012**, *481*, 463–468. [CrossRef] [PubMed]

200. Raschke, S.; Elsen, M.; Gassenhuber, H.; Sommerfeld, M.; Schwahn, U.; Brockmann, B.; Jung, R.; Wisløff, U.; Tjønna, A.E.; Raastad, T.; et al. Evidence against a Beneficial Effect of Irisin in Humans. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73680. [CrossRef]
201. Lee, M.-W.; Odegaard, J.I.; Mukundan, L.; Qiu, Y.; Molofsky, A.B.; Nussbaum, J.C.; Yun, K.; Locksley, R.M.; Chawla, A. Activated Type 2 Innate Lymphoid Cells Regulate Beige Fat Biogenesis. *Cell* **2015**, *160*, 74–87. [CrossRef] [PubMed]
202. Wu, D.; Molofsky, A.B.; Liang, H.-E.; Ricardo-Gonzalez, R.R.; Jouihan, H.A.; Bando, J.K.; Chawla, A.; Locksley, R.M. Eosinophils Sustain Adipose Alternatively Activated Macrophages Associated with Glucose Homeostasis. *Science* **2011**, *332*, 243–247. [CrossRef]
203. Qiu, Y.; Nguyen, K.D.; Odegaard, J.I.; Cui, X.; Tian, X.; Locksley, R.M.; Palmiter, R.D.; Chawla, A. Eosinophils and Type 2 Cytokine Signaling in Macrophages Orchestrate Development of Functional Beige Fat. *Cell* **2014**, *157*, 1292–1308. [CrossRef] [PubMed]
204. Nguyen, K.D.; Qiu, Y.; Cui, X.; Goh, Y.P.S.; Mwangi, J.; David, T.; Mukundan, L.; Brombacher, F.; Locksley, R.M.; Chawla, A. Alternatively Activated Macrophages Produce Catecholamines to Sustain Adaptive Thermogenesis. *Nature* **2011**, *480*, 104–108. [CrossRef]
205. Herz, C.T.; Kiefer, F.W. Adipose Tissue Browning in Mice and Humans. *J. Endocrinol.* **2019**, *241*, R97–R109. [CrossRef]
206. Chechi, K.; Blanchard, P.-G.; Mathieu, P.; Deshaies, Y.; Richard, D. Brown Fat like Gene Expression in the Epicardial Fat Depot Correlates with Circulating HDL-Cholesterol and Triglycerides in Patients with Coronary Artery Disease. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *167*, 2264–2270. [CrossRef]
207. Barchuk, M.; Dutour, A.; Ancel, P.; Svilar, L.; Miksztowicz, V.; Lopez, G.; Rubio, M.; Schreier, L.; Nogueira, J.P.; Valéro, R.; et al. Untargeted Lipidomics Reveals a Specific Enrichment in Plasmalogens in Epicardial Adipose Tissue and a Specific Signature in Coronary Artery Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2020**, *40*, 986–1000. [CrossRef]
208. Ahmadi, N.; Nabavi, V.; Hajsadeghi, F.; Zeb, I.; Flores, F.; Ebrahimi, R.; Budoff, M. Aged Garlic Extract with Supplement Is Associated with Increase in Brown Adipose, Decrease in White Adipose Tissue and Predict Lack of Progression in Coronary Atherosclerosis. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *168*, 2310–2314. [CrossRef] [PubMed]
209. Dozio, E.; Vianello, E.; Malavazos, A.E.; Tacchini, L.; Schmitz, G.; Iacobellis, G.; Corsi Romanelli, M.M. Epicardial Adipose Tissue GLP-1 Receptor Is Associated with Genes Involved in Fatty Acid Oxidation and White-to-Brown Fat Differentiation: A Target to Modulate Cardiovascular Risk? *Int. J. Cardiol.* **2019**, *292*, 218–224. [CrossRef] [PubMed]
210. Baldassano, S.; Amato, A.; Rappa, F.; Cappello, F.; Mulè, F. Influence of Endogenous Glucagon-like Peptide-2 on Lipid Disorders in Mice Fed a High-Fat Diet. *Endocr. Res.* **2016**, *41*, 317–324. [CrossRef]
211. Shafiei-Jahani, P.; Hurrell, B.P.; Galle-Treger, L.; Helou, D.G.; Howard, E.; Painter, J.; Lo, R.; Lewis, G.; Soroosh, P.; Akbari, O. DR3 Stimulation of Adipose Resident ILC2s Ameliorates Type 2 Diabetes Mellitus. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4718. [CrossRef]
212. Distel, E.; Penot, G.; Cadoudal, T.; Balguy, I.; Durant, S.; Benelli, C. Early Induction of a Brown-like Phenotype by Rosiglitazone in the Epicardial Adipose Tissue of Fatty Zucker Rats. *Biochimie* **2012**, *94*, 1660–1667. [CrossRef] [PubMed]
213. Crewe, C.; Funcke, J.-B.; Li, S.; Joffin, N.; Gliniak, C.M.; Ghaben, A.L.; An, Y.A.; Sadek, H.A.; Gordillo, R.; Akgul, Y.; et al. Extracellular Vesicle-Based Interorgan Transport of Mitochondria from Energetically Stressed Adipocytes. *Cell Metab.* **2021**, *33*, 1853–1868.e11. [CrossRef] [PubMed]
214. Loyer, X.; Boulanger, C.M.; Le Lay, S. Adipocyte Extracellular Vesicles: Rescuers of Cardiac Mitochondrial Stress. *Trends Endocrinol. Metab.* **2022**, *33*, 1–3. [CrossRef] [PubMed]
215. Ku, H.-C.; Cheng, C.-F. Browning the Epicardial Adipose Tissues in Cardiovascular Regulation. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* **2019**, *12*, 9332–9334. [CrossRef]
216. Iacobellis, G. Aging Effects on Epicardial Adipose Tissue. *Front. Aging* **2021**, *2*, 12. [CrossRef]
217. Singh, S.P.; McClung, J.A.; Thompson, E.; Glick, Y.; Greenberg, M.; Acosta-Baez, G.; Edris, B.; Shapiro, J.I.; Abraham, N.G. Cardioprotective Heme Oxygenase-1-PGC1α Signaling in Epicardial Fat Attenuates Cardiovascular Risk in Humans as in Obese Mice. *Obesity* **2019**, *27*, 1634–1643. [CrossRef]
218. Oikonomou, E.K.; Siddique, M.; Antoniades, C. Artificial Intelligence in Medical Imaging: A Radiomic Guide to Precision Phenotyping of Cardiovascular Disease. *Cardiovasc. Res.* **2020**, *116*, 2040–2054. [CrossRef]
219. Commandeur, F.; Goeller, M.; Betancur, J.; Cadet, S.; Doris, M.; Chen, X.; Berman, D.S.; Slomka, P.J.; Tamarappoo, B.K.; Dey, D. Deep Learning for Quantification of Epicardial and Thoracic Adipose Tissue from Non-Contrast CT. *IEEE Trans Med. Imaging* **2018**, *37*, 1835–1846. [CrossRef]
220. Antonopoulos, A.S.; Sanna, F.; Sabharwal, N.; Thomas, S.; Oikonomou, E.K.; Herdman, L.; Margaritis, M.; Shirodaria, C.; Kampoli, A.-M.; Akoumianakis, I.; et al. Detecting Human Coronary Inflammation by Imaging Perivascular Fat. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, eaal2658. [CrossRef]
221. Oikonomou, E.K.; Marwan, M.; Desai, M.Y.; Mancio, J.; Alashi, A.; Hutt Centeno, E.; Thomas, S.; Herdman, L.; Kotanidis, C.P.; Thomas, K.E.; et al. Non-Invasive Detection of Coronary Inflammation Using Computed Tomography and Prediction of Residual Cardiovascular Risk (the CRISP CT Study): A Post-Hoc Analysis of Prospective Outcome Data. *Lancet* **2018**, *392*, 929–939. [CrossRef]
222. Oikonomou, E.K.; Desai, M.Y.; Marwan, M.; Kotanidis, C.P.; Antonopoulos, A.S.; Schottlander, D.; Channon, K.M.; Neubauer, S.; Achenbach, S.; Antoniades, C. Perivascular Fat Attenuation Index Stratifies Cardiac Risk Associated with High-Risk Plaques in the CRISP-CT Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2020**, *76*, 755–757. [CrossRef] [PubMed]
223. Chen, Y.; Ding, J.; Zhao, Y.; Ju, S.; Mao, H.; Peng, X.-G. Irisin Induces White Adipose Tissue Browning in Mice as Assessed by Magnetic Resonance Imaging. *Exp. Biol. Med.* **2021**, *246*, 1597–1606. [CrossRef]

224. Hartimath, S.V.; Khanapur, S.; Boominathan, R.; Jiang, L.; Cheng, P.; Yong, F.F.; Tan, P.W.; Robins, E.G.; Goggi, J.L. Imaging Adipose Tissue Browning Using the TSPO-18kDa Tracer [18F]FEPPA. *Mol. Metab.* **2019**, *25*, 154–158. [CrossRef] [PubMed]
225. Chen, K.Y.; Cypess, A.M.; Laughlin, M.R.; Haft, C.R.; Hu, H.H.; Bredella, M.A.; Enerbäck, S.; Kinahan, P.E.; van Marken Lichtenbelt, W.; Lin, F.I.; et al. Brown Adipose Reporting Criteria in Imaging STudies (BARCIST 1.0): Recommendations for Standardized FDG-PET/CT Experiments in Humans. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 210–222. [CrossRef] [PubMed]
226. Yang, J.; Zhang, H.; Parhat, K.; Xu, H.; Li, M.; Wang, X.; Ran, C. Molecular Imaging of Brown Adipose Tissue Mass. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9436. [CrossRef]
227. Chondronikola, M.; Beeman, S.C.; Wahl, R.L. Non-Invasive Methods for the Assessment of Brown Adipose Tissue in Humans: BAT Assessment Methods. *J. Physiol.* **2018**, *596*, 363–378. [CrossRef]
228. van der Lans, A.A.J.J.; Wierts, R.; Vosselman, M.J.; Schrauwen, P.; Brans, B.; van Marken Lichtenbelt, W.D. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Human Adults: Methodological Issues. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2014**, *307*, R103–R113. [CrossRef]

Annexe 2 | Commentaire de l'article Doukbi *et al,. Obesity*, 2024 d'après Ramoni *et al.*

Commentaire

Insights into beige phenotype and immune cell dynamics of human epicardial adipose tissue

Davide Ramoni, Alessandro Scuricini, Luca Liberale, Fabrizio Montecucco, & Federico Carbone

Publiée dans *Obesity,* 2024

Check for updates

Received: 5 April 2024 | Accepted: 9 April 2024

DOI: 10.1002/oby.24051

COMMENTARY

Obesity A Research Journal | THE OBESITY SOCIETY | WILEY

Insights into beige phenotype and immune cell dynamics of human epicardial adipose tissue

Davide Ramoni[1] | Alessandro Scuricini[1] | Luca Liberale[1,2] | Fabrizio Montecucco[1,2] | Federico Carbone[1,2]

[1]Department of Internal Medicine, University of Genoa, Genoa, Italy

[2]IRCCS Ospedale Policlinico San Martino Genoa, Italian Cardiovascular Network, Genoa, Italy

Correspondence

Federico Carbone, First Clinic of Internal Medicine, Department of Internal Medicine, University of Genoa, 6 viale Benedetto XV, 16132 Genoa, Italy.
Email: federico.carbone@unige.it

Both quantitative and qualitative assessments of epicardial adipose tissue (EAT) have gained relevance in contemporary cardiology due to their contributions to the cardiovascular (CV) risk burden, which encompasses conditions ranging from coronary artery disease to atrial fibrillation [1, 2]. The browning phenotype of EAT represents instead an emerging field of research, characterized by specific gene expressions driving thermogenic properties through an enhanced mitochondrial respiration. Given the physiological and pathophysiological role of EAT on coronary arteries and myocardial tissue [1], the integration of radiomics with artificial intelligence deep-learning approaches has recently uncovered a variable shift toward the browning phenotype within EAT [3]. Clinically, this finding is relevant because it substantially improves the prediction of adverse CV events. However, this beige phenotype appears to decline as a result of aging, obesity, and the severity of coronary artery disease.

Our attention is drawn here to the recent study by Doukbi et al. published in the current issue of *Obesity* [4]. It marks the first attempt to differentiate immune cell populations across different EAT phenotypes. Although a higher innate lymphoid cell (ILC) content in the visceral than subcutaneous depot was described, the authors identified a prevalent type 1 phenotype in both visceral adipose tissue and EAT but a large amount of the type 2 phenotype in EAT. Furthermore, type 2 ILCs (ILC2) within EAT expressed activation markers such as CD25 and CD69 and were enriched with T helper cell subtype Th2 activation signals associated with browning genes. This pioneering study strengths our knowledge in the field of immunometabolism by deepening the role of ILC2s within EAT as a promoter of thermogenic activity in brown adipocytes. Despite a distinct role for ILC1 and ILC2 within EAT that emerges from this insightful study, uncertainty remains on the exact mechanism of activation, whether cells other than ILC2 are engaged in the browning of EAT, and how the reduction of ILC2 would enhance atherosclerosis and CV risk in humans.

Likely engaged in a deadly tango, obesity seems to critically entangle with EAT, finely tuning the balance between proinflammatory ILC1 and thermogenic ILC2 within EAT [5]. Unfortunately, sampling EAT from living donors is challenging when outside of cardiac surgery. Although ultrasound, tomography, and magnetic resonance are viable alternative approaches for the quantitative assessment of EAT, the advance in radiomics with an artificial intelligence deep-learning approach is poised to streamline this process and implement it with a qualitative discrimination between white and brown adipose tissue [6]. Besides radiomics, efforts are still needed to explore further how the balance of different adipocyte phenotypes influences inflammatory homeostasis and the effect on CV risk. The study by Doukbi et al. fits this research need and is in agreement with other preliminary evidence suggesting a potential therapeutic role for ILC1 inhibition and ILC2 expansion.O

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Davide Ramoni and Alessandro Scuricini wrote the full paper; Federico Carbone, Luca Liberale, and Fabrizio Montecucco supervised the work. All authors have read and approved the final manuscript.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

Luca Liberale discloses payments from Daiichi Sankyo and funding from the Novartis Foundation for Medical-biological Research. He is

As first authors, Davide Ramoni and Alessandro Scuricini equally contributed to this manuscript.

See accompanying article, pg. X.

 © 2024 The Obesity Society.

also coinventor on the international patent WO/2020/226993. The other authors declared no conflict of interest.

REFERENCES

1. Iacobellis G. Epicardial adipose tissue in contemporary cardiology. *Nat Rev Cardiol*. 2022;19:593-606.
2. Poggi AL, Gaborit B, Schindler TH, Liberale L, Montecucco F, Carbone F. Epicardial fat and atrial fibrillation: the perils of atrial failure. *Europace*. 2022;24:1201-1212.
3. Doukbi E, Soghomonian A, Sengenes C, et al. Browning epicardial adipose tissue: friend or foe? *Cells*. 2022;11:991. doi:10.3390/cells11060991
4. Doukbi E, Ancel P, Dutour A, et al. Human epicardial fat has a beige profile and contains higher type 2 innate lymphoid cells than subcutaneous fat. Obesity. In press.
5. O'Sullivan TE, Rapp M, Fan X, et al. Adipose-resident group 1 innate lymphoid cells promote obesity-associated insulin resistance. *Immunity*. 2016;45:428-441.
6. Li J, Zuo R, Schoepf UJ, et al. Development and validation of a none-nhanced CT based radiomics model to detect brown adipose tissue. *Theranostics*. 2023;13:1584-1593.

How to cite this article: Ramoni D, Scuricini A, Liberale L, Montecucco F, Carbone F. Insights into beige phenotype and immune cell dynamics of human epicardial adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*. 2024;1-2. doi:10.1002/oby.24051

1930739x, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.24051 by INSERM, Wiley Online Library on [04/06/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

REVUE

COVID-19 et obésité : quel rôle du tissu adipeux ?

Lasbleiz Adèle, Doukbi Elisa, Dutour Anne & Gaborit Bénédicte

Publiée dans *Nutrition Clinique et Métabolisme,* 2023

Nutrition clinique et métabolisme 37 (2023) 2S40-2S45

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

Physiopathologie

COVID-19 et obésité : quel rôle du tissu adipeux ?

COVID-19 and obesity: is there a role for adipose tissue?

Adèle Lasbleiz [a], Elisa Doukbi [b], Anne Dutour [a,b], Bénédicte Gaborit [a,b,*]

[a] *Department of Endocrinology, Metabolic Diseases and Nutrition, Pôle ENDO, APHM, F-13005 Marseille, France*
[b] *INSERM, INRAE, C2VN, Aix-Marseille University, F-13005 Marseille, France*

Mots clés :
COVID-19
Immunité
Inflammation
Obésité
Reponse vaccinale
Thrombose
Tissu adipeux viscéral

RÉSUMÉ

En mars 2020, la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) causée par le SARS-CoV-2 a été déclarée par l'OMS comme pandémie mondiale. L'obésité a rapidement été identifiée comme un facteur de risque indépendant de mauvais pronostic avec plus de risques de survenue de syndrome de détresse respiratoire aigüe, d'évènements cardio-vasculaires et thrombo-emboliques, de passage en réanimation et de mortalité. Le rôle du tissu adipeux viscéral blanc, qui augmente chez les personnes souffrant d'obésité, semble important dans cette pathogenèse, car il constitue un réservoir viral pour le SARS-CoV-2, par l'intermédiaire des récepteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2. Après l'infection des cellules hôtes, l'activation des cytokines pro-inflammatoires crée un environnement propice à « l'orage cytokinique », et au syndrome d'activation macrophagique, associés à la progression vers le syndrome de détresse respiratoire aiguë. Dans l'obésité, la propagation systémique du virus, son entrée et son excrétion prolongée dans le tissu adipeux déjà inflammé peuvent stimuler les réponses immunitaires et l'amplification subséquente d'une cascade de cytokines, ce qui aggrave l'évolution de la maladie. L'hyperactivation endothéliale induite par le SARS-CoV-2 combinée à l'état d'hypofibrinolyse et de dysfonction endothéliale présents dans l'obésité augmente le risque d'événements thrombo-emboliques. Le volume de tissu adipeux viscéral et épicardique mesuré par scanner semble être un bon marqueur pronostique de ces évolutions défavorables. De plus, les réponses vaccinales semblent être moindres chez ces patients par une réponse humorale précoce plus faible nécessitant de continuer de diffuser des messages de prévention, et d'encourager les rappels vaccinaux dans cette population. L'objectif de cette revue est de déterminer le rôle du tissu adipeux dans le pronostic défavorable des patients infectés par le SARS-CoV-2 atteints d'obésité.

© 2023 Société francophone nutrition clinique et métabolisme (SFNCM). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Keywords:
COVID-19
Immunity
Inflammation
Obesity
Vaccine response
Thrombosis
Visceral adipose tissue

ABSTRACT

In March 2020, coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by SARS-CoV-2 was declared a global pandemic by the WHO. Obesity was rapidly identified as an independent risk factor for poor prognosis, with an increased risk of acute respiratory distress syndrome, cardiovascular and thrombo-embolic events, admission to intensive care and mortality. The white visceral adipose tissue, which increases in people suffering from obesity, appears to have a key role in this pathogenesis, as it constitutes a viral reservoir for SARS-CoV-2 through angiotensin 2-converting enzyme receptors. Following infection of host cells, activation of pro-inflammatory cytokines creates an environment suitable to the 'cytokine storm' and macrophage activation syndrome, associated with a risk of progression to acute respiratory distress syndrome. In obesity, the systemic spread of the virus, its entry and prolonged excretion into already inflamed adipose tissue can stimulate immune responses and the subsequent amplification of a cytokine cascade, worsening the course of the disease. The endothelial hyperactivation induced by SARS-CoV-2 combined with the state of hypofibrinolysis and endothelial dysfunction present in obesity increases the risk of thrombo-embolic events. The volume of visceral and epicardial adipose tissue measured by CT scan appears to be a good prognostic marker for these unfavorable outcomes. In addition, vaccine responses appear to be lower in these patients due to a weaker early humoral response, which means that prevention

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : benedicte.gaborit@ap-hm.fr (B. Gaborit).

0985-0562/© 2023 Société francophone nutrition clinique et métabolisme (SFNCM). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

messages need to continue to be disseminated and booster vaccinations encouraged in this population. The aim of this review is to determine the role of adipose tissue in the poor prognosis of obese patients infected with SARS-CoV-2.

© 2023 Société francophone nutrition clinique et métabolisme (SFNCM). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

L'obésité est un facteur de risque de mauvais pronostic dans les infections virales, connue notamment depuis l'épidémie de grippe H1N1 de 2009 où les patients atteints d'obésité morbide étaient deux fois plus à risque de passage en réanimation ou de décès [1]. Plus récemment, lors de la pandémie de COVID-19 (Maladie à coronavirus causée par le SARS-CoV-2) qui a débuté en décembre 2019 et qui a marqué le monde entier, par son expansion rapide et sa gravité, engorgeant l'ensemble des systèmes de santé, l'obésité, comme d'autres pathologies chroniques, a rapidement été pointée du doigt comme à risque d'évolution vers les formes graves. En effet, dès mars 2020, un rapport de l'ICNARC (Centre national d'audit et de recherche en soins intensifs) au Royaume-Uni rapportait que 2/3 des patients développant des formes sévères ou compliquées d'infection à SARS-CoV-2 étaient en surpoids ou atteintes d'obésité. L'obésité est associée à un plus fort risque d'hospitalisation, de survenue de syndrome de détresse respiratoire avec intubation orotrachéale, de passage en réanimation et de mortalité chez les patients atteints de la COVID-19 [2].

Grâce au développement des vaccins et de thérapeutiques spécifiques, le nombre de décès dû à l'infection a remarquablement chuté. Cependant, le virus continue à circuler et à muter rapidement et la décroissance de l'efficacité vaccinale avec le temps, les hésitations de la population face à la vaccination et des réponses immunitaires parfois altérées chez certains groupes de patients, font qu'il demeure important de comprendre la susceptibilité à l'infection de ces populations à haut risque.

Dans l'obésité plusieurs hypothèses mécanistiques existent et s'intriquent expliquant un risque augmenté de formes sévères centré sur l'existence d'un tissu adipeux dysfonctionnel.

2. Le tissu adipeux : un facteur de risque indépendant de gravité de l'infection

Il existe différents types d'obésité en fonction de la répartition du tissu adipeux. L'obésité dite « androïde » avec un excès de tissu adipeux prédominant au niveau viscéral étant plus à risque de développement de complications métaboliques comme le diabète de type 2, l'hypertension artérielle, les maladies cardiovasculaires ou la stéato-hépatite non alcoolique. Cela est également vrai dans le développement des formes graves d'infections virales dont celle à SARS-CoV-2.

En effet, deux études récentes démontraient qu'au-delà du seul indice de masse corporelle (IMC) utilisé dans la plupart des études, la sévérité des infections à SARS-CoV-2 était indépendamment associée au degré d'adiposité et à la masse grasse notamment viscérale des sujets [3,4]. Le volume de tissu adipeux viscéral (TAV) mesuré par scanner a en effet été démontré comme associé aux formes graves de COVID-19, au passage en réanimation et au décès avec un seuil de 128,5 cm^2 d'après Favre et al. [5].

C'est le cas également du tissu adipeux épicardique (TAE), tissu ectopique très actif métaboliquement, localisé entre le myocarde et le péricarde, sécrétant des molécules proathérogènes et pro-inflammatoires comme l'activine A, connu pour être associé à la survenue d'évènements cardiovasculaires comme la coronaropathie ou la fibrillation atriale [6].

En effet, dans une méta-analyse sur 2 482 patients atteints de la COVID-19, le volume du TAE était plus important chez les patients nécessitant une hospitalisation, voire une intubation orotrachéale par rapport à d'autres patients infectés [7]. De plus, sa densité, mesurée en unité Hounsfield, liée à la saturation périphérique en oxygène et à la température corporelle, témoin des modifications inflammatoires du tissu, augmentait significativement avec la gravité de l'infection [8]. En dehors du syndrome de détresse respiratoire aiguë, les patients atteints de la COVID-19 sont également à fort risque de survenue d'évènements cardiovasculaires, entre 8 et 62 % selon les études, avec des cas d'insuffisance cardiaque, d'infarctus du myocarde, de myocardite, d'arythmie ou d'évènements thromboemboliques. Deng et al. ont montré que sur 400 patients infectés, le volume du TAE était lié à la survenue d'atteinte myocardique [9]. D'autres études montraient que ce volume était plus important chez les patients qui développaient une fibrillation atriale *de novo* pendant leur COVID-19 ou une embolie pulmonaire [10,11]. Ainsi, la mesure par scanner du TAV et du TAE semble être un bon marqueur pronostique de la morbimortalité des infections à SARS-CoV-2.

Plusieurs mécanismes physiopathologiques ont été soulevés pour expliquer que l'obésité puisse être un facteur de risque de mauvais pronostic et de formes sévères de l'infection à SARS-CoV-2.

3. Pathogenèse de l'infection à SARS-CoV-2

Pour essayer de comprendre, il faut revenir au mécanisme d'entrée et de propagation du SARS-CoV-2 dans l'organisme. Schématiquement, le SARS-CoV-2 infecte les cellules hôtes par l'intermédiaire de sa protéine S membranaire qui se lie aux récepteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ACE2), constituant essentiel du système rénine-angiotensine, présent sur de nombreuses cellules : alvéolaires, nasales, myocardiques, hépatiques, pancréatiques mais également sur les adipocytes. Par la suite, une protéase membranaire nommée TMPRSS2 clive la protéine S du virus permettant son endocytose puis sa fusion membranaire et donc l'entrée du génome viral dans la cellule hôte suivi de sa réplication [12]. Pour se défendre, l'organisme va produire des cytokines pro-inflammatoires mais une réponse excessive peut entraîner un « orage cytokinique », expliquant une progression rapide de l'infection et sa mauvaise évolution avec la survenue d'un syndrome de détresse respiratoire notamment. En effet, des taux plus importants d'interleukine 6 (IL-6), d'interleukine 1-β (IL1-β), de *Tumor-Necrosis Factor* (TNF-α), pro-inflammatoires, étaient retrouvés chez les patients atteints de formes graves par rapport aux patients présentant des formes moins sévères [13].

4. Effet réservoir du tissu adipeux

Il existe un effet réservoir du tissu adipeux pour le SARS-CoV-2 (Fig. 1).

Comme expliqué précédemment, le récepteur ACE2 permet l'entrée du virus dans les cellules. Son expression serait plus

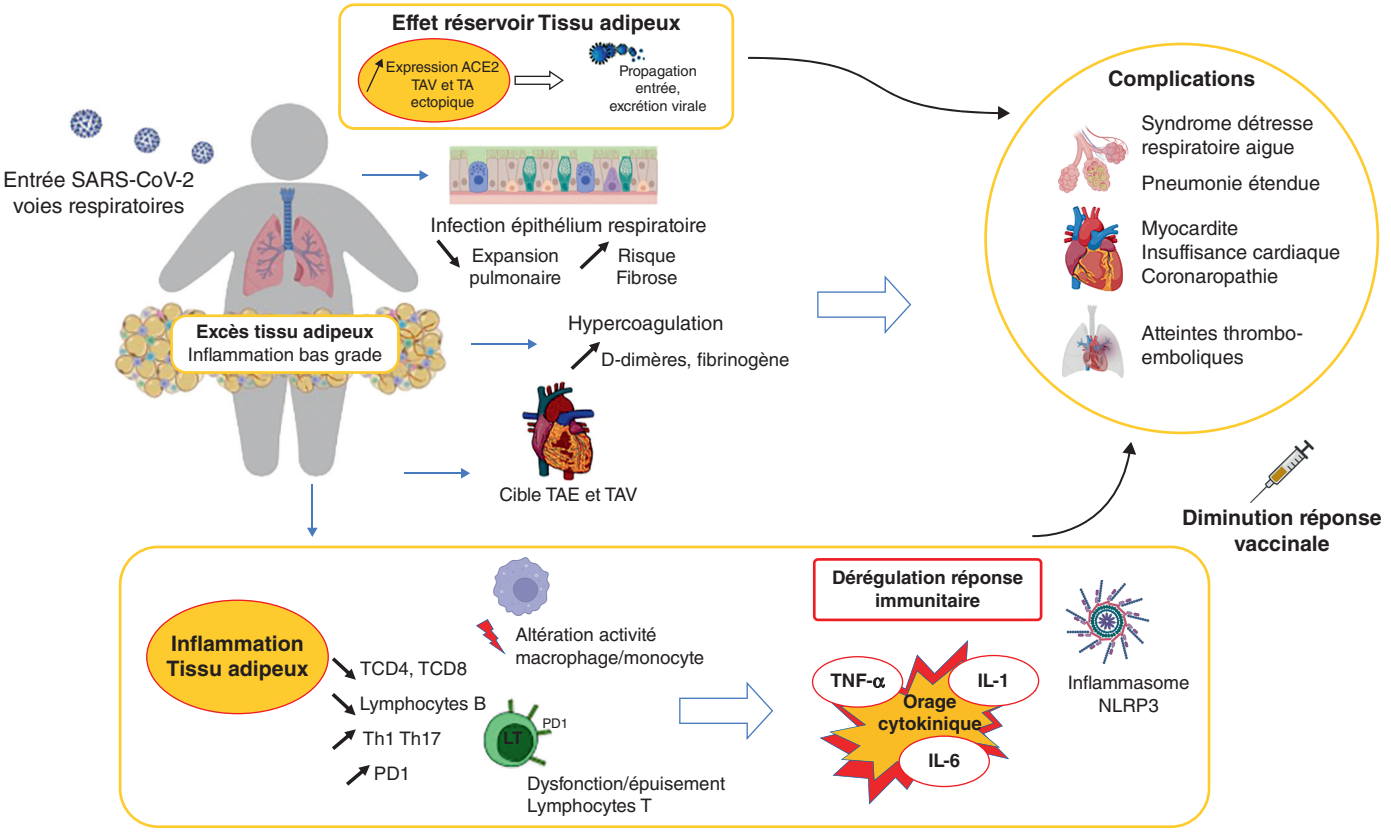


Fig. 1. Impact de l'obésité et du tissu adipeux dans la survenue d'atteintes sévères de la COVID-19.
TAE : tissu adipeux épicardiaque ; TAV : tissu adipeux viscéral.

importante dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané (TASC) que dans les poumons agissant ainsi comme un important réservoir viral et entraînant une augmentation de la propagation, de l'entrée et de l'excrétion du virus chez ces patients. D'autres composants de l'entrée dans la cellule hôte du SARS-CoV-2 sont surexprimés dans le TAV (CD147, DPP4, NRP1) renforçant la susceptibilité à l'infection [14].

C'est également le cas du tissu adipeux ectopique épicardique. Une étude sur 43 patients ayant eu des biopsies à cœur ouvert montrait que l'ACE2 était présent en plus grande quantité dans le TAE que dans le TASC [15]. De plus, Les patients obèses atteints de stéato-hépatite non alcoolique semblent avoir une augmentation de l'expression génique de ACE2 et de TMPRSS2 et donc des points d'entrée du SARS-CoV-2 dans leurs cellules hépatiques [16].

L'excès de tissu adipeux, et donc l'abondance d'ACE2, jouerait un double rôle dans la COVID-19 qui reste mal expliqué. D'un côté, la liaison du virus à l'ACE2 entraîne une diminution de l'activité résiduelle d'ACE2, faisant pencher la balance vers une activation de l'angiotensine II. Cela entraîne une vasoconstriction pulmonaire et la survenue de lésions organiques inflammatoires et oxydatives, qui augmente le risque de lésions pulmonaires aiguës. En effet, les taux sériques d'angiotensine II chez les patients atteints de pneumonie à COVID-19 étaient significativement plus élevés que chez les individus sains, et ils étaient linéairement associés à la charge virale et aux lésions pulmonaires [17]. D'un autre côté, l'augmentation de l'ACE2 dans le tissu adipeux des sujets en situation d'obésité entraîne une augmentation du niveau d'angiotensine connu pour avoir une action anti-inflammatoire et antioxydante [1-7].

Une étude plus récente montrait de manière intéressante que l'ARN du SARS-CoV-2 pouvait être détecté dans des dépôts variés de tissu adipeux provenant d'autopsie de patients atteints de COVID-19 et infectait à la fois les adipocytes et à la fois un sous-ensemble de macrophages du tissu adipeux. Cependant, les cellules infectées n'exprimaient pas forcément l'ACE2 suggérant un mécanisme d'entrée autre du virus, à prendre en considération pour de futures études. Cela induirait l'activation des voies inflammatoires même dans les cellules non infectées [18].

5. Effet du tissu adipeux sur le système respiratoire

L'obésité est connue pour être associée à la survenue de complications impliquant le système respiratoire, à la fois par des mécanismes obstructifs et restrictifs.

Les fonctions pulmonaires des personnes en situation d'obésité sont altérées du fait de dépôts de tissu adipeux blanc au niveau de l'abdomen et des voies respiratoires. Cela mène à une plus faible expansion pulmonaire, une moindre compliance diaphragmatique et à un épaississement des voies respiratoires jouant un rôle délétère sur la mécanique ventilatoire. De plus, l'infiltration pulmonaire par des cellules immunitaires pro-inflammatoires peut à terme entraîner une fibrose pulmonaire [19] (Fig. 1). Tout comme la transdifférenciation des lipofibroblastes, cellules proches des cellules adipeuses composées de gouttelettes lipidiques, localisées dans les cellules interstitielles alvéolaires, qui peuvent se transformer en myofibroblastes [20]. Tout cela pourrait jouer un rôle dans la survenue du syndrome de détresse respiratoire décrit dans l'infection à SARS-CoV-2.

6. Inflammation de bas-grade et orage cytokinique

L'obésité est associée à un état inflammatoire de bas grade du fait de l'activation de plusieurs voies du stress comme celles du réticulum endoplasmique, du stress oxydatif, de l'inflammasome et également du fait de l'hypoxie. Les adipocytes hypertrophiques, hyperplasiques et hypoxiques sécrètent des acides gras libres et produisent des cytokines pro-inflammatoires en excès. Les taux sériques de base de CRP, IL-6 et TNF-α, marqueurs de l'inflammation, sont en effet plus élevés chez les patients en situation d'obésité. Il existe également une polarisation des macrophages vers un phénotype inflammatoire M1, une augmentation des polynucléaires neutrophiles, des lymphocytes T (LT) LTC8 cytotoxiques et une diminution des LTCD4 régulateurs (Fig. 1).

La leptine, adipokine régulant l'appétit et la balance énergétique, joue également un rôle important dans cette inflammation chronique. Elle stimule la migration des macrophages dans le tissu adipeux et promeut leur transition vers un profil pro-inflammatoire et joue un rôle dans la production de TNF-α et d'IL-6. Un taux plus élevé de leptine est associé à une infiltration pulmonaire en polynucléaires neutrophiles plus importante, à un taux de cellules T régulatrices diminué et à une polarisation Th17 pro-inflammatoire plus élevée [21]. Au contraire, l'adiponectine, adipokine anti-inflammatoire, est diminuée dans le tissu adipeux viscéral des patients en situation d'obésité.

Cet état d'inflammation chronique s'explique donc principalement par un déséquilibre des cellules immunitaires pro- et anti-inflammatoires dans un tissu adipeux dysfonctionnel.

Il existe une réponse immunitaire innée exacerbée et une dysfonction du système adaptatif qui entraîne des modifications métaboliques et immunitaires pouvant conduire plus facilement à la survenue de l'« orage cytokinique » associé aux formes sévères d'infection à SARS-CoV-2.

En effet, la sécrétion inappropriée d'adipokines et de cytokines, comme l'IL-6 dont la source principale est le tissu adipeux, a été démontrée comme un facteur indépendant de forme grave de COVID-19 [22].

Un taux également plus élevé d'IL1-β a été rapporté dans le plasma des patients atteints de la COVID-19, suggérant un rôle de l'inflammasome NLPR3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3), complexe multiprotéique présent notamment dans les macrophages, dans le développement de l'infection et des lésions pulmonaires. C'est un composant essentiel du système de défense de l'hôte mais il peut être surexprimé dans les maladies métaboliques ou inflammatoires. Lors de l'infection à SARS-CoV-2, la stimulation rapide et intense du système immunitaire peut déclencher l'activation de NLPR3 inflammasome et la libération de cytokines pro-inflammatoires, maintenant un état inflammatoire important [23] (Fig. 1). Un rapport adiponectine/leptine élevé chez les patients atteints de COVID-19 semble associé à une meilleure évolution de l'infection et sa diminution en cas d'inflammation semble donc délétère [24].

Cette stimulation immunitaire exacerbée peut entraîner un dysfonctionnement du système immunitaire adaptatif. Le nombre de lymphocytes TCD4, TCD8 cytotoxiques et de monocytes ont été démontrés comme particulièrement bas dans les formes sévères de COVID-19 chez des patients atteints de diabète de type 2 nécessitant un passage en réanimation. Dans l'étude de Alzaid et al., la perte des monocytes s'accompagnait d'une altération morphologique et d'un profil d'expression hyperinflammatoire compatible avec la voie de l'interféron de type 1 (IL-6, IL-8, CCL2 et IFNB-1) par l'exacerbation d'un de ses facteurs de transcription, le Facteur de régulation 5 de l'interferon (IRF5) [25]. Diao et al., montraient que chez des patients atteints de COVID-19 qui n'étaient pas en réanimation, un nombre de lymphocytes T inférieur à 800/µl était à risque élevé de détérioration clinique [26].

Il existerait en revanche une augmentation des cellules Th17 pro-inflammatoires et des points de contrôle immunitaire PD1/PDL-1. PD1 est exprimé par les cellules T et interagit avec le récepteur PDL-1 pour inhiber les cellules T cytotoxiques. Sa surexpression à la fois dans le tissu adipeux viscéral du patient en situation d'obésité et dans les formes graves de COVID-19 conduit au dysfonctionnement et à l'épuisement des cellules T.

L'obésité induit aussi une diminution des cellules B régulatrices lors des infections.

Cette réponse immune altérée joue également un rôle dans l'existence d'une excrétion virale prolongée chez ces patients, notamment du fait d'une activation macrophagique réduite et de la réponse altérée des cellules B et T [22].

Ainsi, l'infection virale potentialise l'effet inflammatoire de bas grade présent dans l'obésité et pourrait expliquer le surrisque de formes sévères dans cette population particulière.

7. Tissu adipeux et surrisque d'évènements thromboemboliques

La COVID-19 est associée à un plus grand nombre d'évènements thromboemboliques, tout comme l'obésité qui est un facteur de risque de développer des thromboses veineuses ou des embolies pulmonaires (Fig. 1). Doser les D-dimères, les plaquettes et le taux de prothrombine se fait fréquemment chez les patients hospitalisés infectés par le SARS-CoV-2 pour évaluer ce risque. Des taux anormaux sont associés à plus d'évènements thromboemboliques mais également à l'hypoxie et à la congestion pulmonaire pouvant mener au développement du syndrome de détresse respiratoire aiguë.

Une valeur de D-dimères supérieure à 2 µg/mL à l'admission ou son augmentation pendant le séjour avait été démontrée comme associée à une mortalité hospitalière plus élevée [27].

Des microthrombi au niveau artériel pulmonaire mais également dans d'autres organes comme le rein ou le foie ont été retrouvés lors d'autopsies chez des patients décédés de leur infection à SARS-CoV-2. Ils avaient le plus souvent des comorbidités dont le surpoids ou l'obésité font partie. Gammone et D'Orazio développent dans leur papier les mécanismes pouvant expliquer cette hypercoagulabilité [28] (Fig. 1). L'hyperactivation endothéliale présente dans la COVID-19 entraîne des dépôts intra-alvéolaires de fibrine et de leucocytes activés. Par la suite, l'activation de voies de signalisations intracellulaires conduit à la génération de molécules d'adhésion cellulaire, d'adipokines et de cytokines pro-inflammatoires, qui sont plus nombreuses également chez les adultes en situation d'obésité. De plus, l'adhésion accrue des monocytes à l'endothélium et la diapédèse des macrophages à travers les jonctions des cellules endothéliales dans le tissu adipeux peuvent être directement impliquées dans la thrombose. L'endothélium et le tissu adipeux génèrent l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1), dont les niveaux accrus dans l'obésité peuvent déterminer une hypofibrinolyse, configurant ainsi un état prothrombotique et contribuant au mauvais pronostic de ces patients [28].

Une anticoagulation préventive est donc indiquée chez les patients atteints de COVID-19 hospitalisés, à plus forte dose chez les patients atteints d'obésité, ce qui a été établi dans la plupart des protocoles de soins en France.

8. Obésité et vaccination contre le SARS-CoV-2

Ainsi, l'obésité est associée à un risque élevé de formes graves de COVID-19 du fait de différents facteurs. Rapidement, pour essayer d'enrayer la pandémie, plusieurs vaccins ont été développés et sont actuellement les outils les plus puissants à notre disposition pour atténuer la gravité de la maladie.

Cependant, les personnes atteintes d'obésité semblent montrer des réponses immunitaires diminuées à la suite de l'injection de différents vaccins (Fig. 1). Cela avait déjà été démontré lors de campagnes vaccinales contre la grippe notamment mais également dans le tétanos et l'hépatite B [29].

Lors de la pandémie de COVID-19, des vaccins ont rapidement été développés pour tenter de combattre l'incidence des formes graves. Les données des phases III concernant les vaccins Pfizer, Moderna ou Johnson & Johnson montraient des efficacités similaires chez les patients atteints ou non d'obésité. Cependant, les études cliniques de vie réelle ont reporté des titres d'anticorps diminués et une réponse immunitaire qui semble plus faible chez ces sujets, même si les études récentes sont discordantes, certaines ne retrouvant pas de lien entre l'IMC et la réponse vaccinale. Une étude montrait que les taux d'anticorps anti-spike 1 et 2 et anti-RBD entre 2 et 6 mois après vaccination par vaccin ARNm étaient inversement associés au pourcentage de masse grasse [30]. Une étude récente française basée sur la cohorte COV-POPART, appelée COVPOP OBEDIAB a montré que chez 357 patients atteints d'obésité et 390 patients diabétiques, la réponse humorale précoce, représentée par les anticorps anti-spike et anti-RBD, était plus faible que chez les patients contrôles (n = 573) [31] (Fig. 2). De plus, parmi les facteurs associés à une moins bonne réponse humorale définie par un BAU < 264 U/mL (unité standard OMS), l'ancienneté, la sévérité de l'obésité et l'adiposité viscérale ne sortaient pas significativement en analyse multivariée. En revanche, dans la sous-population de patients diabétiques, le déséquilibre glycémique, l'insuffisance rénale chronique et le diabète de type 2 (comparé au diabète de type 1) étaient des facteurs significativement associés à une moins bonne réponse (Fig. 2). Ceci confirme les travaux de Marfella et al. qui ont montré qu'un mauvais contrôle glycémique était associé à un plus faible nombre d'anticorps neutralisants dirigés contre le SARS-CoV-2 mais également à une plus faible réponse cellulaire TCD4 exprimant IFN-γ, IL-2 et TNF-α par rapport à des sujets diabétiques mais ayant un diabète équilibré [32].

Un calendrier vaccinal incluant des rappels de dose semble donc justifié dans ces populations et des contrôles sérologiques postvaccinaux pourraient être utiles dans cette population à risque.

9. Conclusion

L'obésité a constamment été démontrée comme un facteur de risque de mauvaise évolution des infections à SARS-CoV-2, ce qui est concordant avec ce qui avait déjà été mis en évidence pour l'infection grippale.

Le tissu adipeux, notamment viscéral et ectopique, comme le tissu adipeux épicardique, semble jouer un rôle central dans les mécanismes expliquant ce mauvais pronostic. Il agit à la fois comme réservoir du virus et comme médiateur de l'orage cytokinique et du syndrome de détresse respiratoire aiguë ainsi que de la coagulopathie expliquée par l'état inflammatoire de bas grade et la dysfonction endothéliale préexistante. Même vaccinés, les sujets en situation d'obésité sont plus à risque de développer des formes sévères car leur réponse vaccinale semble altérée.

Il convient donc de rester prudent chez cette population et de continuer à véhiculer des messages de prévention et promouvoir la vaccination chez nos patients à risque, que ce soit vis-à-vis de la COVID-19 mais probablement aussi de toutes les autres infections virales respiratoires.

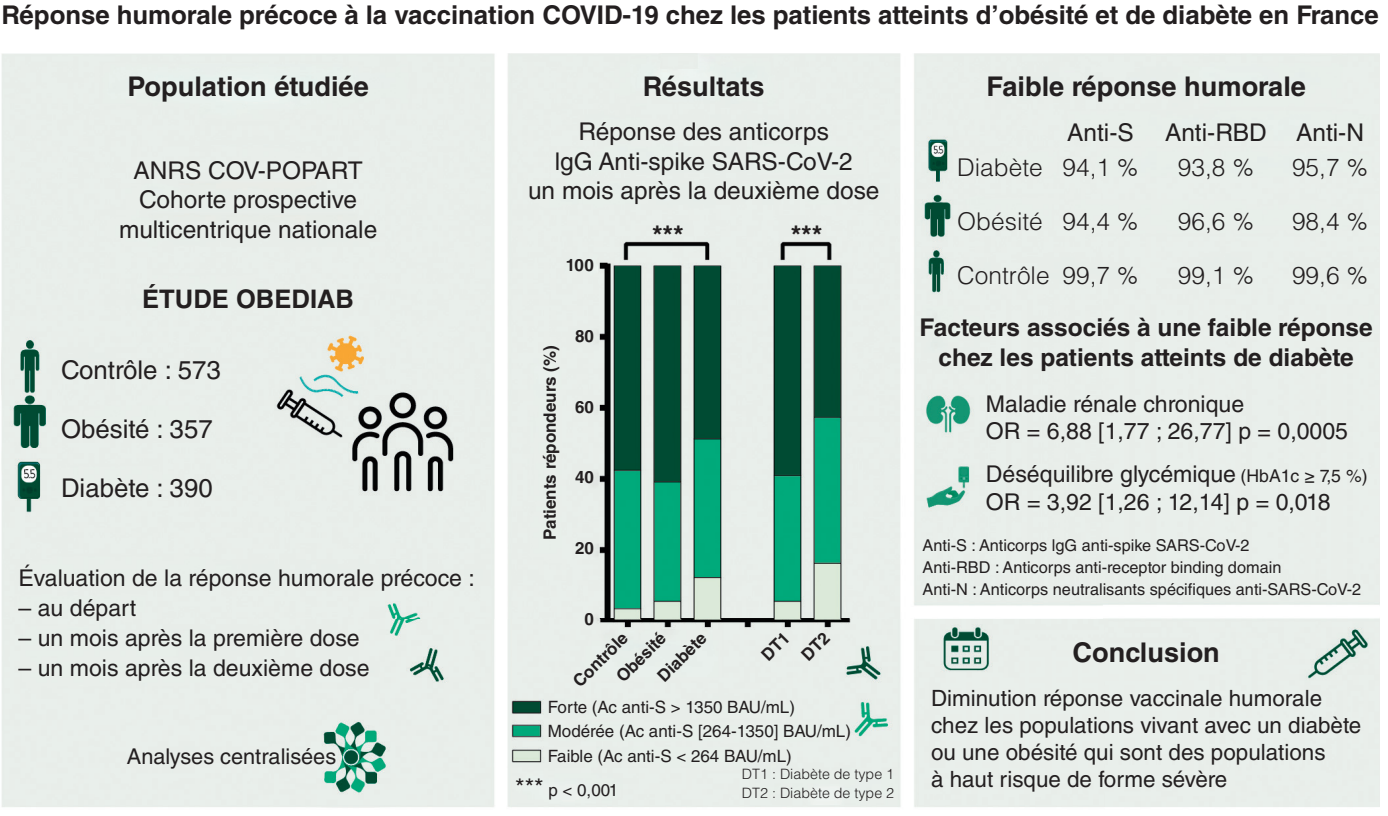


Fig. 2. Étude de la réponse vaccinale humorale précoce au SARS-CoV-2 chez les patients atteints d'obésité et/ou de diabète en France, issue de l'étude nationale multicentrique COVPOP OBEDIAB [31].
Anti-S : anticorps IgG anti-spike ; anti-RBD : anticorps dirigés contre le domaine de liaison du récepteur ; anti-N : anticorps neutralisants spécifiques anti-SAES-CoV2 (capables de neutraliser le virus *in vitro*).

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Cet article fait partie du supplément *Les obésités : état des lieux en 2023* réalisé avec le soutien institutionnel de Novo Nordisk.

Références

[1] Fezeu L, Julia C, Henegar A, Bitu J, Hu FB, Grobbee DE, et² Obesity is associated with higher risk of intensive care unit admission and death in influenza A (H1N1) patients: a systematic review and meta-analysis. Obes Rev 2011;12(8):653-9.
[2] Popkin BM, Du S, Green WD, Beck MA, Algaith T, Herbst CH, et al. Individuals with obesity and COVID-19: a global perspective on the epidemiology and biological relationships. Obes Rev 2020;21(11):e13128.
[3] Yoshiji S, Tanaka D, Minamino H, Lu T, Butler-Laporte G, Murakami T, et al. Causal associations between body fat accumulation and COVID-19 severity: a Mendelian randomization study. Front Endocrinol 2022;13:899625.
[4] Graziano E, Peghin M, De Martino M, De Carlo C, Da Porto A, Bulfone L, et al. The impact of body composition on mortality of COVID-19 hospitalized patients: a prospective study on abdominal fat, obesity paradox and sarcopenia. Clin Nutr ESPEN 2022;51:437-44.
[5] Favre G, Legueult K, Pradier C, Raffaelli C, Ichai C, Iannelli A, et al. Visceral fat is associated to the severity of COVID-19. Metabolism 2021;115:154440.
[6] Gaborit B, Sengenes C, Ancel P, Jacquier A, Dutour A. Role of epicardial adipose tissue in health and disease: a matter of fat? Compr Physiol 2017;7(3):1051-82.
[7] Liu K, Wang X, Song G. Association of epicardial adipose tissue with the severity and adverse clinical outcomes of COVID-19: a meta-analysis. Int J Infect Dis 2022;120:33-40.
[8] Iacobellis G, Secchi F, Capitanio G, Basilico S, Schiaffino S, Boveri S, et al. Epicardial fat inflammation in severe COVID-19. Obesity 2020;28(12):2260-2.
[9] Deng M, Qi Y, Deng L, Wang H, Xu Y, Li Z, et al. Obesity as a potential predictor of disease severity in young COVID-19 patients: a retrospective study. Obesity 2020;28(10):1815-25.
[10] Slipczuk L, Castagna F, Schonberger A, Novogrodsky E, Dey D, Jorde UP, et al. Incidence of new-onset atrial fibrillation in COVID-19 is associated with increased epicardial adipose tissue. J Interv Card Electrophysiol 2022;64(2):383-91.
[11] Rossi AP, Donadello K, Schweiger V, Zamboni GA, Dalla Valle Z, Zamboni M, et al. Epicardial adipose tissue volume and CT-attenuation as prognostic factors for pulmonary embolism and mortality in critically ill patients affected by COVID-19. Eur J Clin Nutr 2023;77(1):105-11.
[12] Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. Nat Rev Mol Cell Biol 2022;23(1):3-20.
[13] Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine storm. N Engl J Med 2020;383(23):2255-73.
[14] Cinti F, Cinti S. The endocrine adipose organ: a system playing a central role in COVID-19. Cells 2022;11(13):2109.
[15] Couselo-Seijas M, Almengló C, Agra-Bermejo RM, Luis Fernandez Á, Alvarez E, González-Juanatey JR, et al. Higher ACE2 expression levels in epicardial cells than subcutaneous stromal cells from patients with cardiovascular disease: diabetes and obesity as possible enhancer. Eur J Clin Invest 2021;51(5):e13463.
[16] Fondevila MF, Mercado-Gómez M, Rodríguez A, Gonzalez-Rellan MJ, Iruzubieta P, Valentí V, et al. Obese patients with NASH have increased hepatic expression of SARS-CoV-2 critical entry points. J Hepatol 2021;74(2):469-71.
[17] Bavishi C, Maddox TM, Messerli FH. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection and renin angiotensin system blockers. JAMA Cardiol 2020;5(7):745-7.
[18] Martínez-Colón GJ, Ratnasiri K, Chen H, Jiang S, Zanley E, Rustagi A, et al. SARS-CoV-2 infection drives an inflammatory response in human adipose tissue through infection of adipocytes and macrophages. Sci Transl Med 2022;14(674):eabm9151.
[19] Elliot JG, Donovan GM, Wang KCW, Green FHY, James AL, Noble PB. Fatty airways: implications for obstructive disease. Eur Respir J 2019;54(6):1900857.
[20] Kruglikov IL, Scherer PE. The role of adipocytes and adipocyte-like cells in the severity of COVID-19 infections. Obesity 2020;28(7):1187-90.
[21] Abella V, Scotece M, Conde J, Pino J, Gonzalez-Gay MA, Gómez-Reino JJ, et al. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. Nat Rev Rheumatol 2017;13(2):100-9.
[22] Aghili SMM, Ebrahimpur M, Arjmand B, Shadman Z, Pejman Sani M, Qorbani M, et al. Obesity in COVID-19 era, implications for mechanisms, comorbidities, and prognosis: a review and meta-analysis. Int J Obes 2021;45(5):998-1016.
[23] Lasbleiz A, Gaborit B, Soghomonian A, Bartoli A, Ancel P, Jacquier A, et al. COVID-19 and obesity: role of ectopic visceral and epicardial adipose tissues in myocardial injury. Front Endocrinol 2021;12:726967.
[24] Tonon F, Di Bella S, Giudici F, Zerbato V, Segat L, Koncan R, et al. Discriminatory value of adiponectin to leptin ratio for COVID-19 pneumonia. Int J Endocrinol 2022;2022:9908450.
[25] Alzaid F, Julla JB, Diedisheim M, Potier C, Potier L, Velho G, et al. Monocytopenia, monocyte morphological anomalies and hyperinflammation characterise severe COVID-19 in type 2 diabetes. EMBO Mol Med 2020;12(10):e13038.
[26] Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). Front Immunol 2020;11:827.
[27] Zhang L, Yan X, Fan Q, Liu H, Liu X, Liu Z, et al. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. J Thromb Haemost 2020;18(6):1324-9.
[28] Gammone MA, D'Orazio N. COVID-19 and obesity: overlapping of two pandemics. Obes Facts 2021;14(6):579-85.
[29] Andersen CJ, Murphy KE, Fernandez ML. Impact of obesity and metabolic syndrome on immunity. Adv Nutr 2016;7(1):66-75.
[30] Ducharme JB, McKenna ZJ, Fennel ZJ, Nava RC, Mermier CM, Deyhle MR. Body fat percentage is independently and inversely associated with serum antibody responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccines. Sci Rep 2022;12(1):19224.
[31] Gaborit B, Fernandes S, Loubet P, Ninove L, Dutour A, Cariou B, et al. Early humoral response to COVID-19 vaccination in patients living with obesity and diabetes in France. The COVPOP OBEDIAB study with results from the ANRS0001S COV-POPART cohort. Metabolism 2023;142:155412.
[32] Marfella R, Sardu C, D'Onofrio N, Prattichizzo F, Scisciola L, Messina V, et al. Glycaemic control is associated with SARS-CoV-2 breakthrough infections in vaccinated patients with type 2 diabetes. Nat Commun 2022;13(1):2318.

Annexe 4 | Article scientifique : Approche multi-omique dans la rétinopathie diabétique, Ancel *et al.*

ARTICLE

Untargeted Multiomics Approach Coupling Lipidomics and Metabolomics Profiling Reveals New Insights in Diabetic Retinopathy

Ancel Patricia, Martin Jean-Charles, Doukbi Elisa, Houssays M, Gascon P, Righini M, Matonti F, Svilar L, Valmori M, Tardivel C, Venteclef Nicolas, Julla JB, Gautier JF, Resseguier N, Dutour Anne & Gaborit Bénédicte

Publié dans *International Journal of Molecular Sciences,* 2023

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Untargeted Multiomics Approach Coupling Lipidomics and Metabolomics Profiling Reveals New Insights in Diabetic Retinopathy

Patricia Ancel [1], Jean Charles Martin [2], Elisa Doukbi [1], Marie Houssays [3], Pierre Gascon [4,5,6], Maud Righini [4], Frédéric Matonti [4], Ljubica Svilar [7], Marie Valmori [2], Catherine Tardivel [2], Nicolas Venteclef [8], Jean Baptiste Julla [9], Jean François Gautier [9], Noémie Resseguier [10], Anne Dutour [11] and Bénédicte Gaborit [11,*]

1 Aix-Marseille University, INSERM, INRAE, C2VN, 13005 Marseille, France; patricia.ancel@univ-amu.fr (P.A.); elisa.doukbi@univ-amu.fr (E.D.)
2 Aix-Marseille University, INSERM, INRAE, C2VN, BIOMET Aix-Marseille Technology Platform, 13005 Marseille, France; jean-charles.martin@univ-amu.fr (J.C.M.); marie.valmori@univ-amu.fr (M.V.); catherine.tardivel@univ-amu.fr (C.T.)
3 Medical Evaluation Department, Assistance-Publique Hôpitaux de Marseille, CIC-CPCET, 13005 Marseille, France; marie.houssays@ap-hm.fr
4 Department of Ophthalmology, Assistance-Publique Hôpitaux de Marseille, 13005 Marseille, France; pierre.gascon3@gmail.com (P.G.); mrighini@hopital-saint-joseph.fr (M.R.); frederic.matonti@free.fr (F.M.)
5 Centre Monticelli Paradis, 433 bis rue Paradis, 13008 Marseille, France
6 Groupe Almaviva Santé, Clinique Juge, 116 rue Jean Mermoz, 13008 Marseille, France
7 CRIBIOM Aix-Marseille Technology Platform, 13005 Marseille, France; ljubica.svilar@univ-amu.fr
8 IMMEDIAB Laboratory, Institut Necker Enfants Malades (INEM), INSERM U1151, CNRS UMR 8253, Université Paris Cité, 75015 Paris, France; nicolas.venteclef@inserm.fr
9 IMMEDIAB Laboratory, Diabetology and Endocrinology Department, Institut Necker Enfants Malades (INEM), INSERM U1151, CNRS UMR 8253, Université Paris Cité, Lariboisière Hospital, Féderation de Diabétologie, APHP, 75015 Paris, France; jeanbaptiste.julla@aphp.fr (J.B.J.); jean-francois.gautier@aphp.fr (J.F.G.)
10 Aix-Marseille University, Support Unit for Clinical Research and Economic Evaluation, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, EA 3279 CEReSS-Health Service Research and Quality of Life Center, 13005 Marseille, France; noemie.resseguier@univ-amu.fr
11 Aix-Marseille University, INSERM, INRAE, C2VN, Endocrinology, Metabolic Diseases and Nutrition Department, AP-HM, 13005 Marseille, France; anne.dutour@ap-hm.fr
* Correspondence: benedicte.gaborit@ap-hm.fr

Abstract: Diabetic retinopathy (DR) is a microvascular complication of diabetes mellitus (DM) which is the main cause of vision loss in the working-age population. Currently known risk factors such as age, disease duration, and hemoglobin A1c lack sufficient efficiency to distinguish patients with early stages of DR. A total of 194 plasma samples were collected from patients with type 2 DM and DR (moderate to proliferative (PDR) or control (no or mild DR) matched for age, gender, diabetes duration, HbA1c, and hypertension. Untargeted lipidomic and metabolomic approaches were performed. Partial-least square methods were used to analyze the datasets. Levels of 69 metabolites and 85 lipid species were found to be significantly different in the plasma of DR patients versus controls. Metabolite set enrichment analysis indicated that pathways such as metabolism of branched-chain amino acids (methylglutaryl carnitine $p = 0.004$), the kynurenine pathway (tryptophan $p < 0.001$), and microbiota metabolism (p-Cresol sulfate $p = 0.004$) were among the most enriched deregulated pathways in the DR group. Moreover, Glucose-6-phosphate ($p = 0.001$) and N-methyl-glutamate ($p < 0.001$) were upregulated in DR. Subgroup analyses identified a specific signature associated with PDR, macular oedema, and DR associated with chronic kidney disease. Phosphatidylcholines (PCs) were dysregulated, with an increase of alkyl-PCs (PC O-42:5 $p < 0.001$) in DR, while non-ether PCs (PC 14:0–16:1, $p < 0.001$; PC 18:2–14:0, $p < 0.001$) were decreased in the DR group. Through an unbiased multiomics approach, we identified metabolites and lipid species that interestingly discriminate patients with or without DR. These features could be a research basis to identify new potential plasma biomarkers to promote 3P medicine.

check for updates

Citation: Ancel, P.; Martin, J.C.; Doukbi, E.; Houssays, M.; Gascon, P.; Righini, M.; Matonti, F.; Svilar, L.; Valmori, M.; Tardivel, C.; et al. Untargeted Multiomics Approach Coupling Lipidomics and Metabolomics Profiling Reveals New Insights in Diabetic Retinopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12053. https://doi.org/10.3390/ijms241512053

Academic Editor: Rafael Simó

Received: 3 July 2023
Revised: 20 July 2023
Accepted: 21 July 2023
Published: 27 July 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Keywords: diabetic retinopathy; metabolomics; lipidomics

1. Introduction

Type 2 Diabetes mellitus (T2D) is a chronic disease that is increasing worldwide with the diabesity pandemic, leading to poor health outcomes and high health care costs. Diabetic retinopathy (DR) remains a common complication of DM which affects 22.3% of people living with diabetes [1,2]. It is estimated that in 2030, the number of adults worldwide with DR will be 129.84 million, and this number is projected to increase to 160.50 million in 2045 [1]. Despite prevention, DR remains a leading cause of blindness in the adult working population [1]. Currently known risk factors such as age, disease duration, and hemoglobin A1c lack the efficiency to distinguish patients with early stages of DR [2,3]. Furthermore, HbA1c accounts for only 6.6% of the variation in DR risk [4]. A recent systematic review pointed to 6.6% (interquartile range 1.9–9.8%) DR prevalence in patients with prediabetes, suggesting that DR diagnosis is often preceded by a long and false silent phase [5]. Frequent retinal screening for all people living with diabetes is an effective method of preventing DR complications. However, many patients have ocular comorbidities such as cataracts, which impedes clinical diagnosis [6]. This differentiation relies on of ophthalmologists; however, due to shortages of human resources for eye health, there is an important challenge in the coming years to better predict patients at risk for developing vision-threatening stages of DR [7]. The Angiosafe T2D cohort is a French national prospective cohort aiming to include 7200 patients who will be followed up at three years to evaluate DR presence, incidence, and progression as well as new biomarkers (angiogenic, epigenomic, and proinflammatory) of DR progression [8]. Lipidomics and metabolomics, or the comprehensive profiling of lipid species and metabolites, respectively, in biological systems, has undergone a rapid technological evolution within the past decade. These advances have led to the application of multiomics approaches to defining trajectories associated with T2D by integrating the impact of silent microvascular damage through cohorts of patients using high-throughput longitudinal phenotyping [9]. Metabolomics is a novel high-throughput profiling technique that can comprehensively reveal the levels of small-molecule metabolites of size <1500 Da [10]. Because the metabolome is downstream from the genome, transcriptome, and proteome, it represents a more sensitive level of organization for understanding complex biological systems, and can provide a highly integrated profile of biological status [9,11]. Lipidomics focuses on non-polar metabolites on a large scale based on analytical chemistry principles and technological tools, particularly mass spectrometry (MS) [12]. Recently, an increasing number of studies have used both metabolomics and lipidomics to investigate potential biomarkers and mechanisms, expanding understanding of the pathogenesis of microvascular complications of diabetes [13].

In the current study, plasma samples were collected from 200 T2DM patients from the Angiosafe T2D cohort aged 42–80 years, including 100 patients with moderate to proliferative (PDR) and 100 with mild or no DR. Untargeted metabolomics and lipidomics were comprehensively analyzed using these plasma samples. Bioinformatics analysis was then performed to decipher possible relevant pathways.

2. Results

2.1. Study Population

In total, 194 patients were analyzed (97 control and 97 DR) after exclusion of six patients due to poor analytical data. Table 1 shows the main characteristics of patients matched by age (±5 years), sex, duration of diabetes (±2 years), HbA1c (±0.5%), and hypertension. As expected, patients in the DR group were more likely to have nephropathy than patients in the control group. There was no significant difference in the number of patients treated with GLP-1 analogs in the two groups ($p = 0.99$).

Table 1. Clinical and biological characteristics of the study population.

	Control (n = 97)	DR (n = 97)	p Value
Age (years)	64.3 ± 8.7	64.4 ± 8.9	0.778
Sex (M/F, %M)	66/31 (68)	66/31 (68)	>0.999
Body mass index (kg/m^2)	29.8 [26.6;32.8]	29.1 [26.3;34.1]	0.553
Diabetes duration (years)	16.9 ± 9.3	16.9 ± 9.4	>0.999
Hypertension (n, %)	80 (82)	80 (82)	>0.999
Dyslipidemia (n, %)	67 (69)	68 (70)	>0.999
Nephropathy (n, %)	36 (37)	53 (55)	0.021
GFR (mL/min/1.73 m^2)	90 [73;103]	82 [62;97]	<0.001
HbA1c (%)	7.8 [7.0;8.5]	7.8 [7.0;8.6]	0.824
Cholesterol (g/L)	1.61 [1.37;1.86]	1.47 [1.23;1.76]	0.051
HDL-Chol (g/L)	0.40 [0.34;0.48]	0.43 [0.36;0.53]	0.279
LDL-Chol (g/L)	0.87 [0.63;1.09]	0.74 [0.57;1.01]	0.172
Triglycerides (g/L)	1.40 [1.02;2.04]	1.29 [0.79;1.77]	0.099
ASAT (UI/L)	21 [18;28]	23 [18;29]	0.230
ALAT (UI/L)	24 [16;35]	23 [17;31]	0.240
GGT (UI/L)	29 [21;43]	32 [21;64]	0.109

Nephropathy: Urine albumin/creatinine ratio ≥ 30 mg/g or urine protein/creatinine ratio ≥ 300 mg/g or GFR ≤ 60 mL/min/1.73 m^2; GFR: glomerular filtration rate; Chol: Cholesterol.

2.2. Feature Detection in Metabolomics and Lipidomics Analyses

After removing blank peaks, performing normalization and coefficient of variation filtering, and removing overlapping identification from both ionization modes, a total of 228 metabolites were annotated from our in-house libraries. The lipid datasets contained 335 annotated lipid species. Thus, a total of 563 annotated variables were obtained and retained for each patient and used for further statistical analyses (Figure 1). A summary of the identified metabolites detected with assigned metabolic functional groupings for multiblock analysis and annotated lipid species are provided in the Supplementary Data.

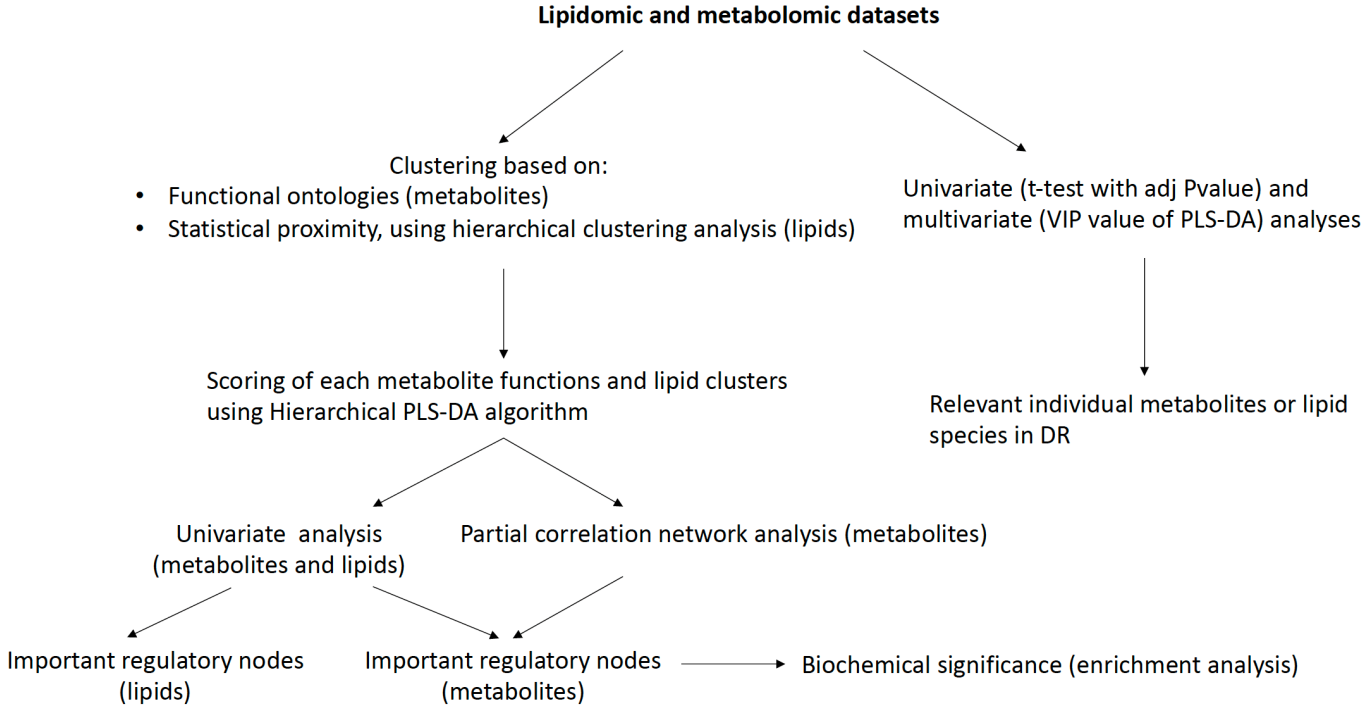


Figure 1. Statistical workflow.

2.3. Multiblock Analysis

The 228 annotated metabolites were clustered into 54 functional biological blocks, as described in the methods section. Lipids were blocked according to their statistical proximity using hierarchical clustering analysis (335 lipid species clustered into eleven different blocks; see Supplementary Data). Grouping metabolites or lipid species sharing the same biological functions or statistical proximity allows the complexity of the dataset to be simplified and facilitates data interpretation.

2.3.1. Multiomics Analysis

A set of 26 biological functions and seven lipid clusters were found to be differentially regulated between the DR and Control groups using a statistical multi-test procedure (Variable of Importance in Projection of a partial-least square discriminant analysis (PLS-DA) followed by a *t*-test. The R2 and Q2 of the final PLS-DA model comprising all the individuals and based on these 33 clusters were 0.39 and 0.25 ($p < 9 \times 10^{-10}$), respectively (Figure 2). In particular, phospholipids, tryptophan, amino acids, and energy metabolism were found to be the main metabolic functions dysregulated in DR patients compared to control group patients (FDR < 0.0001), along with vascular health, mitochondrial function, uremic toxins, and antioxidant function (Figure 3).

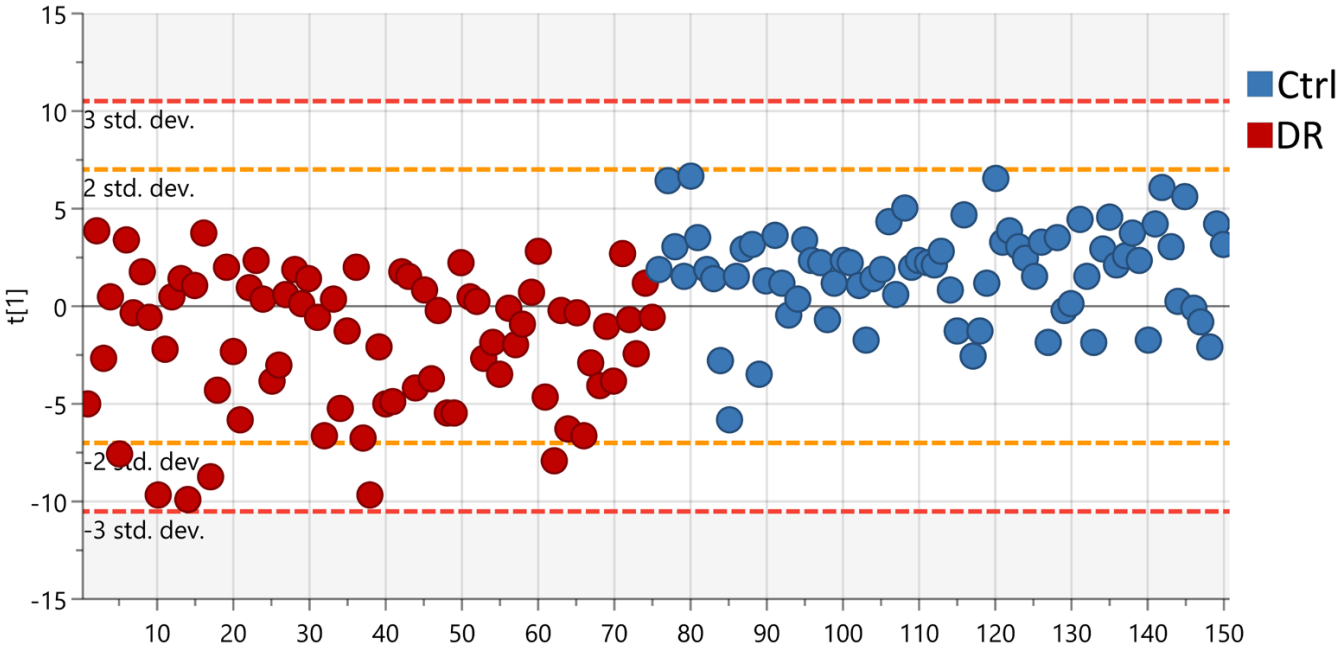


Figure 2. Partial least-squares discriminant analysis (PLS−DA) score plot based on multiomics clustering analysis. The red spots represent samples from the DR group and the blue spots represent samples from the Control group.

2.3.2. Metabolic Functions

Because metabolic regulations rarely occur independently [14], we calculated a partial correlation network integrating all the biological functions (Figure 4). Correlation network analysis of these data revealed that protein (FDR = 7.3×10^{-5}), vitamin metabolism (FDR = 2.5×10^{-5}), and metabolic disorder (FDR = 4.1×10^{-7}) had a higher degree of connection or betweenness centrality score than others. To decipher the extent to which molecular regulations of the metabolites of the metabolic disorder function correspond, we performed a KEGG enrichment analysis on the metabolites forming this function. It showed that branched-chain amino acid (valine, leucine, isoleucine) biosynthesis and degradation ($p = 3 \times 10^{-5}$ and $p = 0.005$, respectively) and fructose and mannose metabolism ($p = 0.013$) ranked highest in terms of frequency in the DR group (Figure 4).

2.3.3. Lipid Clusters

Seven out of eleven lipid clusters were significantly highlighted in the DR group. The top four (Clusters 2, 3, 7, and 8) are represented in Figure 5. They include triglycerides (TG), diglycerides (DG), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), sphingomyelin (SM), ceramide (Cer), and phosphatidylinositol (PI). Cluster 2 is composed mainly of PC (50%) and TG. Cluster 3 is composed mainly of PC (27% and LPC (13%). Clusters 7 and 8 are composed mainly of PC (26% and 48%, respectively) and SM (22% and 16%, respectively).

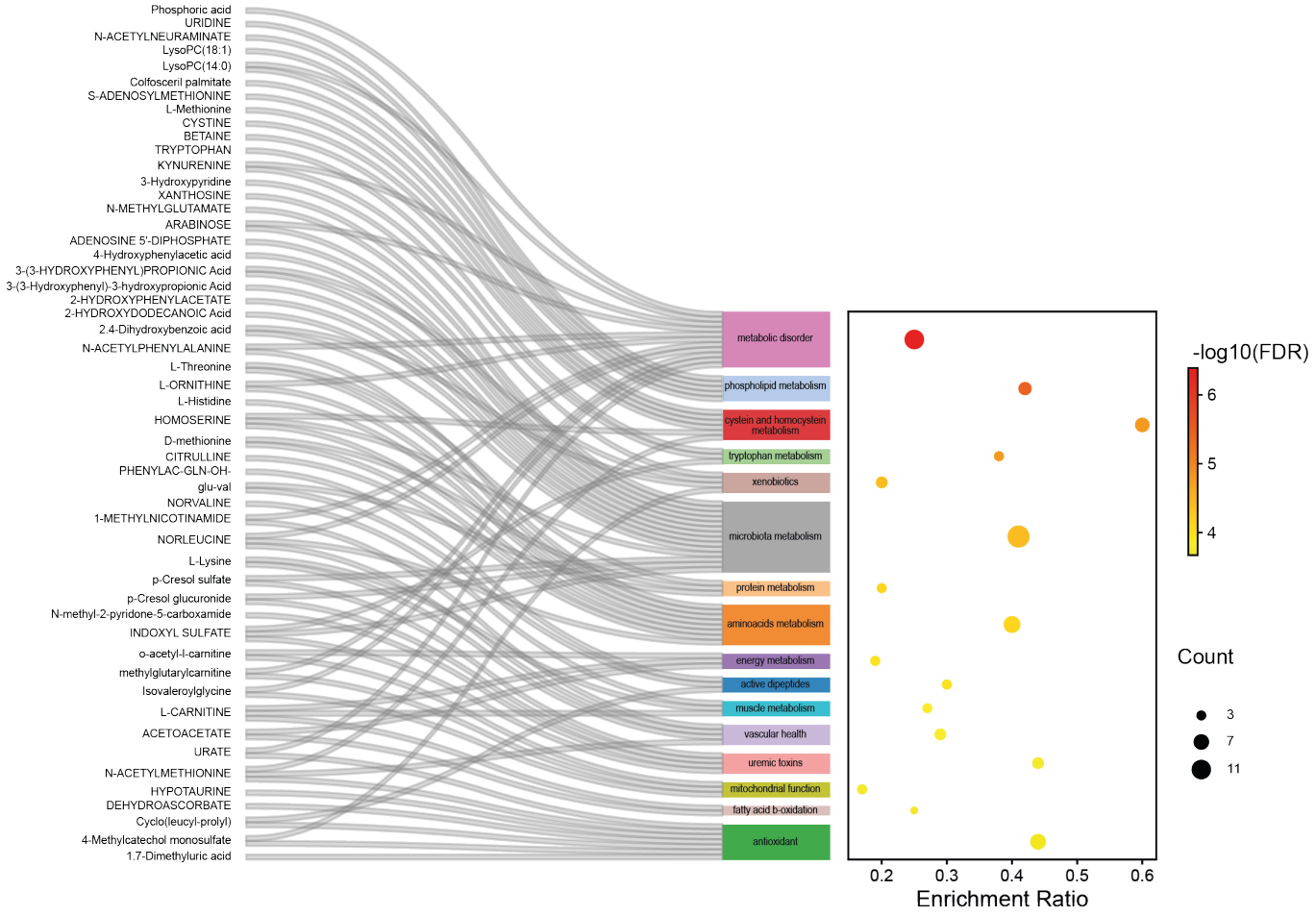


Figure 3. Top sixteen metabolic functions differentially regulated between the DR and Control groups.

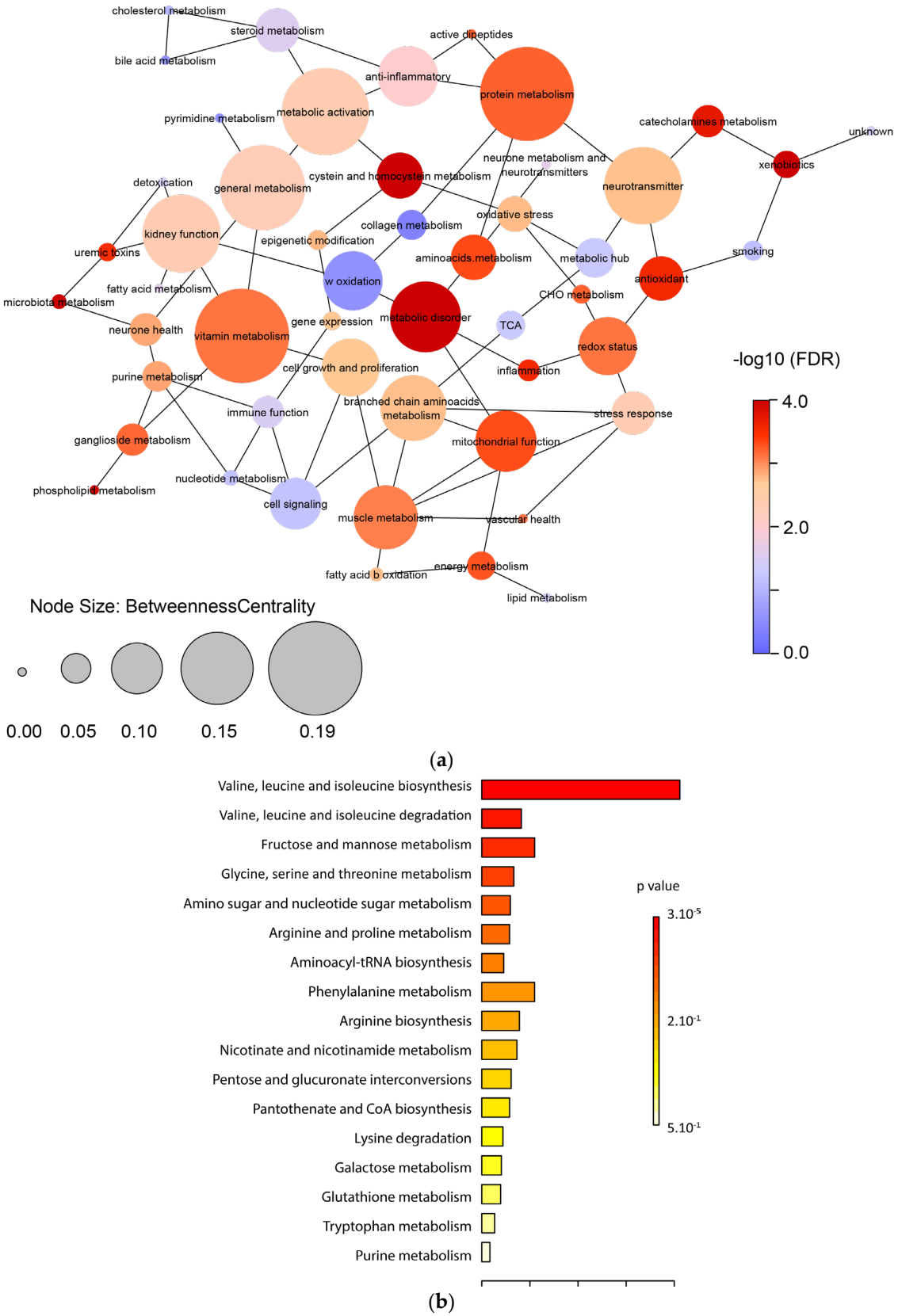


Figure 4. (**a**) Partial correlation network integrating all the metabolic functions, displaying interactions and betweenness centrality. The node color corresponds to the statistical significance between the DR and Control groups. The node size relates to the value of the betweenness centrality coefficients calculated in Cytoscape. Initial partial correlations were defined as $p \leq 0.25$. A node with higher

betweenness centrality has more weight in the network. Thus, in addition to the statistical significance, this element of network topology permits an appreciation of the importance of specific metabolic regulations in biological systems. (**b**) KEGG enrichment analysis of the central node "metabolic disorder".

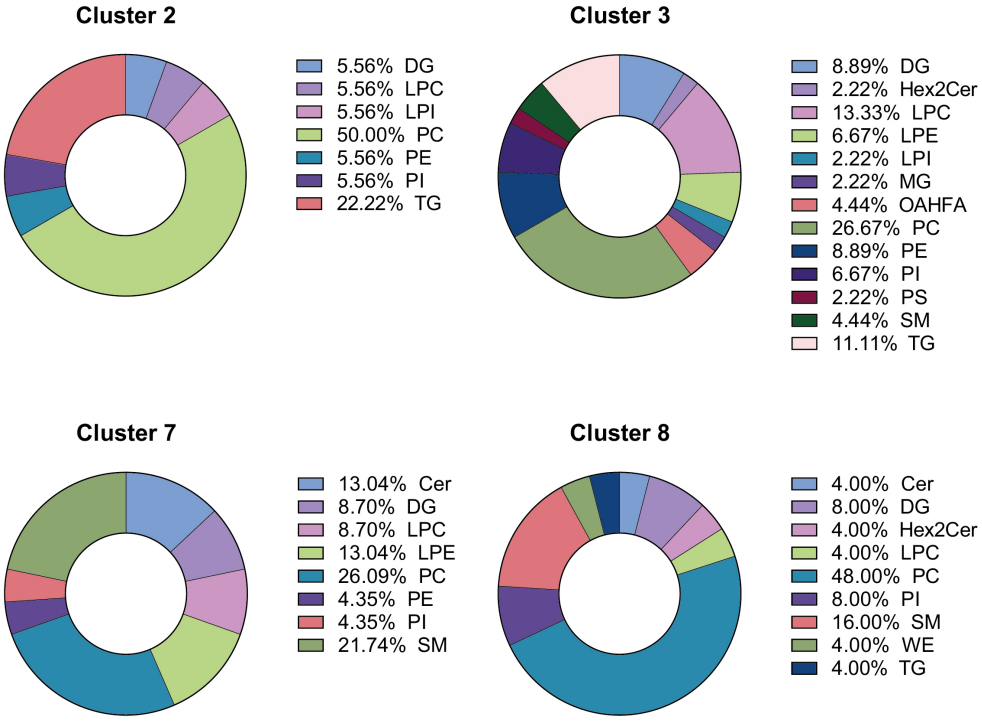


Figure 5. Lipid composition of the top four lipid clusters differentially regulated between the DR and Control groups. Cer: ceramides, DG: diglycerides, Hex2Cer: dihexosylceramide, LPC: lisophophatidylcholine, LPE: lisophophatidylethanolamine, LPI: lisophophatidylinositol, MG: monoglycerides, OAHFA: (O-Acyl)-ω-hydroxy fatty acids, PC: phosphatidylcholine, PE: phophatidylethanolamine, PI: phophatidylinositol, PS: phophatidylserine, SM: sphingomyelin, TG: triglycerides, WE: wax ester.

2.4. Specific Metabolites and Lipids

We then focused on the most specific individual polar and apolar metabolites as potent biomarkers of DR. For this, we used the metabolites selected by both the variable of importance in projection (VIP) of the PLS algorithm and a *t*-test to determine the Top 4 significant metabolites and lipid species in our previous multiomics signature of DR (Figure 6). Tryptophan (fold change −1.12, VIP = 2.59, $p < 0.001$) was significantly reduced in the plasma of the DR group, whereas methylglutarylcarnitine (fold change 1.59, VIP = 2.13, $p = 0.004$), Glucose-6-Phosphate (fold change 1.13, VIP = 2.07, $p = 0.001$), and the uremic toxin p-Cresol sulfate (fold change 1.47, VIP = 1.98, $p = 0.008$) were significantly upregulated in the plasma of the DR group in comparison to the control group.

Regarding lipid species, PCs were the most dysregulated in DR. PC(O-42:5) (fold change 1.23, VIP = 2.60, $p < 0.001$) was found to be significantly increased in DR vs. the control group. By contrast, three PCs containing a myristic acid (14:0), i.e., PC(14:0–16:1) (fold change −1.43, VIP = 2.49, $p < 0.001$), PC(14:0–14:0) (fold change −1.47, VIP = 2.44, $p < 0.001$), and PC(18:2–14:0) (fold change −1.23, VIP = 2.52, $p < 0.001$) were found to be significantly decreased in the DR group compared to the control group. Lastly, ether PCs were upregulated ($p = 0.009$), while non-ether PCs were found to be lower ($p = 0.022$) in the DR group compared to control. Regarding sphingolipids, Cer(d18:2_24:1) (fold change = 1.20 VIP = 2.16 $p = 0.007$), SM(d33:1) (fold change = 1.06 VIP = 1.46 $p = 0.026$), SM(d34:2) (fold change = 1.09 VIP = 1.80 $p = 0.014$), and SM(d36:5) (fold change = 1.11 VIP = 2.06 $p = 0.005$) were found to be significantly elevated in the DR group compared to the control group.

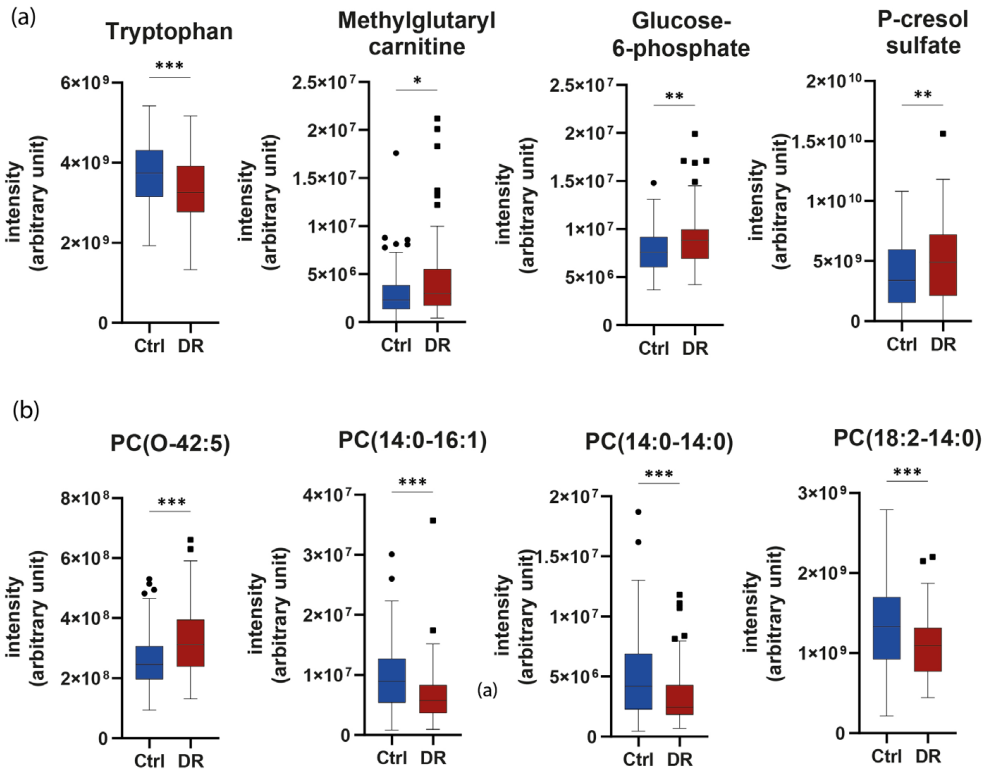


Figure 6. Top four metabolites (**a**) and lipid species (**b**) between the DR and Control groups. PC: phosphatidylcholine. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.5. Impact of Diabetic Kidney Disease

To determine whether nephropathy could affect the association with DR, subgroup analyses of the control ($n = 61$ patients without DR and without DKD), DR only (i.e., DR without DKD) ($n = 44$), diabetic kidney disease (DKD) only (i.e., DKD without DR) ($n = 36$), and DR + DKD ($n = 53$) subgroups were performed using metabolomic data. Twenty-five common metabolites, including N-methylglutamate, glucose-6-phosphate, tryptophan, and kynurenic acid, were found both in the DR and the nephropathy group. Interestingly, in the DR-only subgroup (i.e., DR without nephropathy), methylglutarylcarnitine (fold change 1.86, VIP = 2.12, $p = 0.037$) was found to be significantly increased compared to control, as previously found in the multiomics signature (Table 2).

Table 2. Top four metabolites implicated in diabetic complications.

Specific to Diabetic Retinopathy Only (DR)			
Metabolites	**Fold Change**	**VIP**	***p* Value**
P-octopamine	−1.18	2.83	0.014
Pantothenate	1.25	2.51	0.034
Deoxyguanosine-monophophate	1.48	2.37	0.019
Methylglutarylcarnitine	1.86	2.12	0.037
Specific to Diabetic Kidney Disease Only (DKD)			
Metabolites	**Fold Change**	**VIP**	***p* Value**
N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide	1.52	2.59	<0.001
D-Erythrose	1.21	2.26	0.002
DL-3-Indolelactic Acid	1.26	2.17	<0.001
Adipate	−1.18	2.09	0.007

Table 2. *Cont.*

Specific to Diabetic Retinopathy Associated to Diabetic Kidney Disease (DR + DKD)			
Metabolites	**Fold Change**	**VIP**	***p* Value**
Methylguanidine	1.89	2.42	<0.001
N-acetylneuraminate	1.73	2.37	<0.001
Arabinose	1.70	2.37	<0.001
Mevalolactone	1.30	2.32	<0.001

In addition, we identified a specific metabolomic signature for the DR + DKD subgroup involving a significant increase in methylguanidine ($p < 0.001$, fold change 1.89), N-acetylneuraminate ($p < 0.001$, fold change 1.73), arabinose ($p < 0.001$, fold change 1.70), and mevalolactone ($p < 0.001$, fold change 1.30) compared to the control group (Table 2).

2.6. Specific Signatures of Diabetic Eye Disease

As patients with diabetes may have different stages of DR and these may or may not be associated with macular oedema, we performed a new subgroup analysis with the metabolomics data to determine the specificity of each eye disease compared to patients with no DR ($n = 80$). Four eye diseases were determined: diabetic retinopathy (DR), including mild, moderate, severe, proliferative, and macular oedema (MO) ($n = 114$); and severe diabetic retinopathy (SDR) comprising either moderate to proliferative DR diagnosis and macular oedema ($n = 97$), proliferative diabetic retinopathy (PDR) ($n = 24$), or macular oedema (MO) ($n = 30$). In all, 69, 71, 72, and 76 metabolites with a VIP > 1.0 were respectively selected in each group. Twenty-eight metabolites were found in common, including those from our multiomics signature, namely, tryptophan, glucose-6-phosphate, and P-Cresol-sulfate (Figure 7). Regarding PDR, the 2-methoxyresorcinol (fold change −1.33, VIP = 1.75) metabolite had the highest VIP, though it remained borderline with respect to significance in the *t*-test ($p = 0.068$). In the MO group, 10-Hydroxydecanoate (fold change = −1.28, VIP = 2.05, $p = 0.009$) and carnosine (fold change = −1.09, VIP = 1.78, $p = 0.042$) were found to be significantly downregulated compared to the control group (Table 3).

Table 3. Top three VIP metabolites in diabetic eye disease.

Specific to Proliferative Diabetic Retinopathy			
Metabolites	**Fold Change**	**VIP**	***p* Value**
2-Methoxyresorcinol	−1.28	1.75	ns
α-Hydroxyisobutyrate	1.07	1.75	ns
2-Hydroxycaproic acid	1.10	1.60	ns
Specific to Macular Oedema			
Metabolites	**Fold Change**	**VIP**	***p* Value**
10-Hydroxydecanoate		2.05	0.009
Carnosine		1.78	0.042
Methylguanidine		1.63	ns

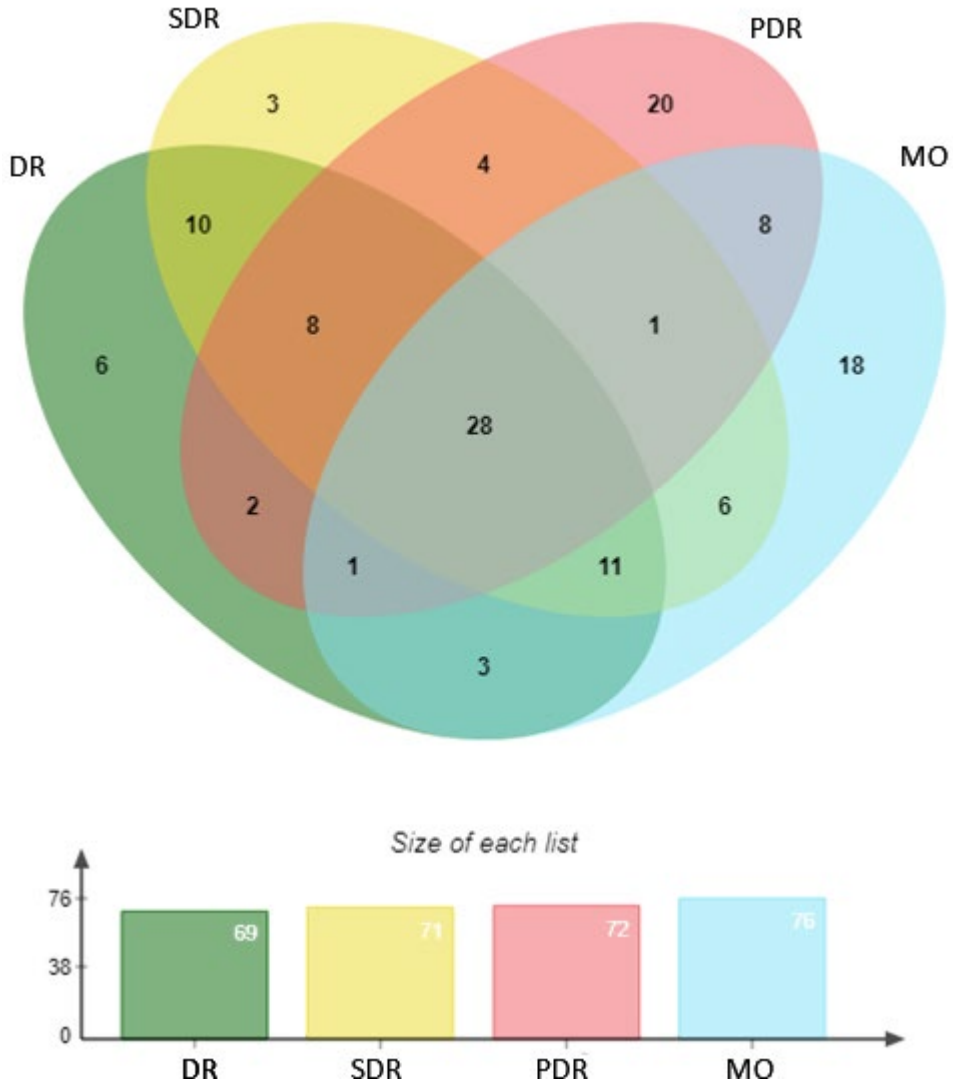


Figure 7. Venn diagram representing each metabolic signature of diabetic eye disease in different subgroup populations vs. patients with no diabetic retinopathy (DR). DR included mild, moderate, severe, proliferative, and macular oedema, while SDR (severe diabetic retinopathy) comprised moderate to proliferative DR diagnosis and macular oedema (MO), PDR (proliferative diabetic retinopathy), or MO (macular oedema).

3. Discussion

Our aim was to identify metabolite markers that are complementary to known risk factors, such as glycemic control to improve existing risk stratification in DR-free patients with diabetes and those with the early stages of DR. Through a comprehensive untargeted multiomic approach coupling lipidomics and metabolomics profiling, we provide new insights in plasma metabolites and lipid species that differentiate patients with and without DR. In particular, phosphatidylcholines (PCs) were found to be dysregulated in the DR group, with an increase in alkyl-PCs (PC O-42:5) and a decrease in non-ether PCs (PC 14:0–16:1; PC 18:2–14:0). Interestingly, the metabolism of branched-chain amino acids (BCAAs) (methylglutaryl carnitine), the kynurenine pathway (tryptophan), and the and microbiota metabolism (p-Cresol sulfate) were found to have the ability to discriminate between patients with early stages of DR versus those with no or mild DR.

A wide selection of biofluids is already in use for multiomics analysis in human studies, including circulating blood (serum and plasma), eye fluids, and other samples [15]. Due to its easier availability and lower invasiveness, circulating blood is the most commonly used sample. It has the benefit of providing a global metabolomic signature which can be used

in 3P (preventive, personalized, precision) medicine. In addition, plasma appear to have better reproducibility for detection of metabolite than serum [16]. As vitreous humor can directly reflect intraocular metabolic variations, tears can reflect the conditions of the oculi posterior segment; moreover, stool samples can reflect alterations in the fecal metabolome though the gut–retina axis [15]. However, the vitreous humor is a highly aqueous eye fluid interfacing with the retina, and can only be obtained from subjects with PDR during surgeries such as vitrectomy. Consequently, the volumes available for analysis are often small, making it difficult to establish a control group. In addition, vitreous hemorrhage can produce a massive influx of plasma metabolites into the vitreous fluid and can modify transcriptional activity in the retina. Barba et al. have evidenced the metabolic fingerprints (increase in glucose and lactate and decrease in galactitol and ascorbic acid) of the vitreous humor of PDR in patients living with type 1 diabetes (T1D), for which they used a ^{1}H-NMR metabonomic approach [17]. The authors used non-diabetic patients with macular hole as a control group [17].

Biomarkers can offer an integrated understanding of a disease, such as from the pre-clinical to the most advanced stages. Excellent biomarkers should be specific and sensitive, be easily quantified in easy to take biological samples, and exhibit good linearity with the development of disease. Considering the complexity of the pathogenesis of DR, multiple biomarkers are seemingly more suitable than a single optimal one [18]. Regarding the metabolomics analysis, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS) have both been developed. A significant advantage of NMR is the small number of samples required [19]. MS is often used in tandem with liquid chromatography (LC) or gas chromatography (GC), which are techniques applied to separate metabolites, thereby improving the resolution of isobaric compounds. In addition, LC-MS has become widely used in recent years, as MS has better sensitivity than NMR, allowing a wider spectrum of metabolites to be measured [18].

To date, a substantial amount of research has reported potential novel biomarkers for DR in human plasma in samples from patients with T1D or T2D with different disease durations and DR stages, including citrulline, indoleacetic acid, 1-methylhistidine, chenodeoxycholic acid, eicosapentaenoic acid, glutamine and glutamic acid, 1,5-gluconolactone, 2-deoxyribonic acid, gluconic acid, fumaric acid, uridine, acetic acid, and cytidine [13,18,20–29]. Several of these, such as 3,4-dihydroxybutyric acid (3,4-DHBA), were validated as independent risk markers for DR progression in a study of 648 individuals with T1D [27]. Most studies have included patients of South Asian ethnicity, and very few have adjusted their findings for potential confounders such as age, duration of diabetes, HbA1c, hypertension, diabetic kidney disease (DKD), and dyslipidemia.

Recently 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) and 2-piperidone in serum exhibited better diagnostic performance than hemoglobin A1c (HbA1c) for differentiating DR from no DR in T2D, and showed high sensitivity towards early-stage DR [30]. Likewise, serum lipidomics and metabolomics profiling of hard exudates from 167 Chinese early-stage DR patients identified a lipid cluster enriched in triglycerides (29%), ceramides (17%), and N-acylethanolamines (15%) along with nineteen metabolites and thirteen pathways (taurine and hypotaurine metabolism, cysteine and methionine metabolism) [31]. In the present study, we have reported for the first time four new lipid clusters in Caucasian DR patients; we uniquely observed a specific upregulation of ether phosphatidylcholine, and in particular PC(O-42:5), in DR patients compared to controls. Clinical studies have provided limited and sometimes conflicting evidence on the relationships between circulating lipid levels and the development and progression of DR in people living with diabetes [32]. Moreover, certain lipid-lowering therapies implicating fibrates have shown protection against DR, although the effect was independent of changes in traditional blood lipid classes [33,34]. The retina is a highly specialised organ in which lipid levels are tightly regulated independently of their systemic levels. Lipid dysregulation can contribute to low-grade chronic inflammation and VEGF receptor 2 (VEGFR2) activation, resulting in increased retinal endothelial permeability and cell injury [35].

Purine metabolism, pyrimidine metabolism, arginine and proline metabolism, and glutamate metabolism are the most frequently reported differential pathways in DR metabolomics studies, with purine metabolism at the top (reported four times) in plasma samples [15,36]. We observed an increase in methylglutarylcarnitine, a key molecule in oxidation and metabolism of fatty acids, in the plasma of DR patients. Carnitine is essential for the transport of long-chain fatty acids into mitochondria via acylcarnitine intermediates prior to beta-oxidation. Our findings are consistent with previous studies [37,38].

Our study found increased levels of N-methyl-glutamate in the plasma of patients with DR. Previous studies have reported that the glutamine-to-glutamate ratio is the best distinctive metabolite for the presence of DR [13,23]. Glutamate is a key signal in the incretin-induced insulin secretion pathway, and is the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system and retina [39,40]. It is necessary for the synthesis of key molecules such as glutathione as well as for polyglutamated folate cofactors, and plays a major role in signaling [40]. In the retina, glutamate is required for the transmission of visual signals from the photoreceptors to the ganglion cells. An increased level of glutamate in the retina may induce neurotoxic effects through the activation of its ionotropic receptors, as was found in a study of the rat retina, leading to uncontrolled intracellular calcium influx and cellular damage [41–43]. Meanwhile, in our study we observed that branched-chain amino acid (BCAAs) metabolism (valine, leucine, and isoleucine) was a remarkably KEGG-enriched pathway in DR. This is consistent with previous observations [36,44]. This could be linked to the neurotoxic effects of glutamate, as increased levels of BCAAs have been demonstrated to increase glutamate excitotoxicity by transamination of citric acid cycle intermediates [45]. Indeed, gabapentin, a leucine analogue and an inhibitor of branched-chain amino transferase (BCATc), has been shown to lower the retinal level of BCAAs, stimulate glutamate disposal, and ameliorate apoptosis and oxidative stress in diabetic rat retinas [45]. Therefore, more attention to this abnormal glutamate metabolism and BCAA metabolism is warranted in order to better understand the pathogenesis of DR.

In addition, we found that the plasma level of tryptophan was decreased in DR patients compared with controls. Ding et al. previously showed a decrease in tryptophan levels in 27 patients with PDR compared to 18 patients with non-proliferative DR. However, T2D disease duration was significantly higher in the PDR group, which could have impacted the results. In vitro studies using confluent cultures of a human retinal pigmented epithelial cell line (ARPE-19) have provided evidence that inducers of endoplasmic reticulum stress or nutrient deprivation in amino acids such as tryptophan or glutamine can directly lead to a marked increase in VEGF expression, suggesting that amino acid metabolism is critical in the response to hypoxia [46].

As DR is often associated with other microvascular diabetic complications, such as diabetic kidney disease (DKD) or macular oedema, we performed a subgroup analysis and identified specific plasma metabolomic signature of these conditions, with P-octopamine, pantothenate, deoxyguanosine-monophophate, and methylglutarylcarnitine being specific to DR only, N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, D-erythrose, DL-3-indolelactic acid, and adipate specific to DKD only, and methylguanidine, N-acetylneuraminate, arabinose, and mevalolactone specific to patients with both complications. Few metabolomic studies have accounted for DKD [15,36]. Tomofuji et al. revealed the serum metabolite signatures of patients with T2D and with both DR and DKD through a comprehensive nontargeted metabolomics approach combining capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS) and liquid chromatography TOFMS (LC-TOFMS). They compared the abundance of 364 serum metabolites between patients with T2D and with both DR and DKD (N = 141) and those without one of DR or DKD (N = 159). Interestingly, they evidenced N-acetylneuraminic acid, which is a major form of sialic acid in humans, as a relevant biomarker in T2D patients with both retinal and renal complications [47], which is consistent with our results.

Furthermore, we were able to evidence 10-hydroxydecanoate, carnosine, and methylguanidine as being specific to patients with macular oedema (MO), which is the most

direct and important cause of visual impairment or blindness in people with DM. MO can occur at any stage of DR, and the severity of DR does not exactly match the severity of MO. Recently, Rhee et al. revealed that five plasma amino acids (asparagine, aspartic acid, glutamic acid, cysteine, and lysine), two organic compounds (citric acid and uric acid), and four oxylipins (12-oxoETE, 15-oxo-ETE, 9-oxoODE, and 20-carboxy leukotriene B4) can function as indicators for establishing a means of long-term prognosis associated with DME in long-standing T2DM patients (>15 years) of Korean origin [48].

These findings, together with aforementioned trends in amino acid levels, suggest that the plasma metabotype of DR is unique, and not a mere extension of the plasma metabotype of diabetic patients with microvascular complication. Furthermore, while not being exhaustive, these findings highlight once more some of the tissue specificity of the impact of diabetes and emphasize the need for global analysis to assess the tissue- or region-specific mechanisms at play in order to develop targeted interventions.

4. Limits

The large cohort of DR patients and diabetic controls were enrolled from the same institution with standardized sample collection and processing, which are strengths of the present study. However, most patients were Caucasian, meaning that the generalizability of these results has to be confirmed and the utility of the identified biomarkers has to be certified through cross-validation in different populations and ethnic groups. As cross-sectional sampling only captures a snapshot of plasma metabotypes, some of the identified markers may represent short-term metabolic perturbations instead of chronic risk factors associated with the development of DR. Moreover, the sensitivity and specificity of the diagnostic model should be validated in a prospective cohort. This study was a preliminary one and took a very discovery-oriented approach as part of the multicentric Angiosafe T2D study (NCT02671864), which aims to include 7200 patients, who will be followed up at three years to evaluate DR presence, incidence, and progression. At present, not all of the patients have been reevaluated three years after their inclusion. Hence, the confirmation study plan is to validate the potential biomarkers identified in this proof-of-concept study in the patients who have DR progression between inclusion and the three-year follow-up visit. Therefore, these findings provide the foundation for longitudinal metabonomic studies to establish the correlation and predictive value of metabolite and lipid profiles identified with the rate of DR progression in patients with T2D. Future studies should consider using other biological matrices (e.g., urine, cerebrospinal fluid) to expand and confirm these findings.

5. Materials and Methods

A total of 200 T2D subjects, including 100 who had DR (moderate, severe, or proliferative, with or without macular oedema) and 100 patients without DR or with mild DR, were randomly selected from among the Angiosafe T2D cohort and matched in terms of age (±5 years), sex, duration of diabetes (±2 years), HbA1c (±0.5%), and hypertension. The Angiosafe T2D cohort (NCT02671864) is extensively described elsewhere [8] and aims to include 7200 patients who will be followed up at 3 years to evaluate DR presence, incidence, or progression according to the international classification of Diabetic Retinopathy [49]. For this study, we included and analyzed patients were enrolled at the Endocrinology, Metabolic Diseases, and Nutrition Department, Pole ENDO, APHM, Marseille.

5.1. Retinal Imaging

Photographs (45°, 2-field or 9-field) were taken of both eyes by a trained nurse using a CANON CR-2 fundus camera [8]. Two grading teams of independent observers, each consisting of a primary recently qualified ophthalmologist and a second more experienced ophthalmologist, were assigned to each patient. Graders assessed all photographs for DR according to the international classification of Diabetic Retinopathy [49]. Macular oedema was diagnosed on optical coherence tomography as retinal thickening of one or more disc

area/s (with any part lying less than a disc diameter from the fovea) or hard exudates less than 500 µ from the fovea.

5.2. Sample Collection

Blood samples were collected using EDTA collection tubes and the plasma was separated and stored at −80 °C until extraction. Plasma was extracted using two separate extraction protocols to perform untargeted metabolomics and lipidomics analyses.

5.3. Solvents

Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system (Millipore, MA, USA). Methanol, isopropanol, chloroform, methyl-terbutyl ether, and acetonitrile were of LC–MS or HPLC grade (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France).

5.4. Extraction

For metabolomics analysis, plasma samples (50 µL) were homogenized with 200 µL of cold methanol (−20 °C), thoroughly shaken for 60 s, and incubated for 30 min at −20 °C to precipitate proteins. Samples were then centrifuged at 11,000 rpm and 4 °C for 15 min and the supernatants were collected and centrifuged through a 10 kDa microcentrifuge filter (VWR, Rosny sous Bois, France) for 45 min under the same conditions, dried under nitrogen flow, and stored at −80 °C until analysis. Dried extracts were dissolved in 125 µL water:acetonitrile (1:1 v/v) For lipidomics analysis, tertbutyl-methyl ether was used as the extraction solvent [50]. Briefly, 750 µL of methanol and 2.5 mL of tertbutyl-methyl ether were added to 100 µL of plasma and vortexed for 1 h, then 625 µL of deionized water was added to each sample and the tubes were incubated for 10 min after homogenization at room temperature. The tubes were centrifuged for 10 min at 1000 rpm 10 °C and the upper organic phase was placed in another tube; 2 mL of a tertbutyl-methyl ether/methanol/water mixture (20:6:5, $v/v/v$) was added to the lower phase and centrifuged as previously described for a second extraction. The upper organic phase was pooled with the one obtained in the first extraction. Samples were evaporated under a stream of nitrogen and the dried lipid extracts were stored at −80 °C until processing. Lipid extracts were then resuspended in 200 µL of mobile phase mixture (A: 65%, D: 35%, v/v). For both analyses, 25 µL of each sample was combined to obtain quality control (QC) samples.

Samples were randomly assigned to the injection table and interspaced (1 of 5) with QC samples or solvent for blank. All samples were analyzed in a single series for metabolomics or lipidomics analysis.

5.5. Metabolomics LC-MS

LC-MS analyses were performed with a Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) ultra-performance liquid chromatography (UPLC) system coupled with a Thermo Q Exactive Plus mass spectrometer (MS). A reverse-phase (RP) Hypersil Gold (100 mm × 2.1 mm × 1.9 µm) (Thermo Scientific, France) column and a hydrophilic SeQuant® ZIC-HILIC Peek Coated (150 × 2.1 mm × 5 µm) (Merck Millipore, MA, USA) column were used for compound separation to ensure broad coverage of the metabolome. The detailed LC/MS conditions are described in [51].

5.6. Lipidomics LC-MS

UHPLC separation was performed on a Vanquish Horizon device (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) using an Accucore C18 column (150 × 2.1 mm, 2.6 µm). The column temperature was kept at 45 °C. Mobile phase A contained 10 mmol/L ammonium formate in 60% acetonitrile and 0.1% formic acid, while mobile phase D contained a 10 mmol/L ammonium formate in acetonitrile:propan-2-ol (1:9, v/v) mixture with 0.1% formic acid. The flow rate was 0.4 mL/min. The elution gradient was as follows: 35% D at the beginning, 35% to 60% D for 4 min, 60% to 85% B for 8 min, 85% to 100% B for 9 min,

100% B for 3 min, and 35% B for 4 min. The injection volume was 4 µL for both ionization modes. Samples were randomly assigned to the injection table and interspaced (1 of 5) with quality control samples made up of a pool of each sample or solvent for blank.

Full scan mass spectra were acquired using an Orbitrap Exploris 240 (Thermo Fisher) mass spectrometer in positive and negative ionization modes, acquiring data within the 150 to 1500 m/z range. Briefly, the drying temperature was set to 200 °C and the ion transfer tube temperature to 320 °C. The capillary voltage was set to 3000 V for the positive ionization mode and 3100 V for the negative ionization mode, while the RF lens was set to 70%. The sheath, auxiliary, and sweep gases were set tot 60, 20, and 1 L/min, respectively. The resolving power of the orbitrap mass analyzer was set to 120,000 FWHM for m/z 200 with a 3 Hz scan rate, and the maximum injection time was set to 200 ms. Full scan mass spectra were acquired for each sample.

MS/MS spectra were acquired using the AcquireX Intelligent Data Acquisition Workflow based on data-dependent analysis for the acquisition of MS/MS spectra. This workflow was applied on a pooled sample, one control and one randomly selected DR paired sample. The Deep Scan AcquireX workflow creates an exclusion list of ions presents in a blank sample and an inclusion list of ions presents in a sample of interest, then exhaustively fragments all ions from the inclusion list together with ions detected under the applied conditions in four consecutive sample injections. Ions fragmented in the first MS/MS analysis are systematically added to the exclusion list and non-fragmented low abundance ions are fragmented. This allows for exhaustive fragmentation and identification of the lipidome. Full scan and DDA MS/MS spectra were acquired using a resolving power of 60,000 FWHM and 15,000 FWHM, respectively. Ions under 10,000 absolute intensity were considered as noise. Ions with higher intensity were fragmented in decreasing order of intensity in a 3 s cycle, with up to 50 ms used for the fragmentation of one ion.

5.7. Data Treatment

Raw LC–MS data were converted to the mzXML file format, and peak detection and alignment were performed using the XCMS script in R (R version 3.6.3). Four main steps were applied: peak picking, peak grouping (alignment), retention time correction, and a second peak grouping step. The centWave method was used to extract peaks and a nonlinear LOESS normalization method [52] was used to correct the analytical drift with Workflow4Metabolomics [53]. After normalization, further filtering was performed by calculating the coefficient of variation of variable intensity in the QC samples, with the cutoff set at <30%.

5.8. Annotations

Feature annotation for metabolomics analysis (HILIC and RP) was performed using in-house libraries of approximately 800 standards under the same conditions [51], while lipid annotation was performed by MS/MS spectral matching using LipidSearch software (Thermo Scientific, France). Each annotated metabolite was assigned a biological role based on the Human Metabolome Database (www.hmdb.ca), PubChem description, and KEGG pathways. Complementary information in PubMed publications was used whenever available. The annotated metabolites reported in the Supplementary Data were then grouped according to their functional role.

5.9. Statistical Analyses

Anthropometric and biochemical parameters were expressed as mean ± SD or median and as 25th to 75th percentile if not parametric. The normal distribution of datasets was assessed using the Shapiro–Wilk normality test. Significant differences between groups were determined using the paired Student's *t*-test or Mann–Whitney test where appropriate. The Chi-2 McNemar test was used to compare categorical variables between groups. Statistical analyses were performed with Prism 9 (Graphpad, MA, USA).

For metabolomic data, features from both ionization modes for the HILIC and RP columns were combined into a single dataset, while for lipidomic data both ionization modes were combined and analyzed separately. Principal component analysis (PCA) was performed after each preprocessing step to view the data and detect outliers. All data were normalized using Probability Quotient Normalization prior to statistical analysis. PCA, partial least square discriminant analyses (PLS-DA), the variable of importance in Projection (VIP) method, and hierarchical PLS-DA were performed using SIMCA 17 software (Sartorius, Aubagne, France). Models were validated by cross-validation using ANOVA and a permutation procedure to check for overfitting through permutation tests (200 permutations). Univariate statistical analysis, hierarchical clustering, heatmapping, and pathway enrichment were performed using the online tool MetaboAnalyst 5.0 [54], while partial correlations were calculated with the R package GeneNet and network visualization was performed using Cytoscape.

Hierarchical PLS-DA was performed based on the contributions of separate orthogonal PLS-DAs calculated from every functional set of metabolites, allowing a composite score value to be generated for each functional dataset [55]. Multiblock PLS and hierarchical PLS enabled aggregation of the data into metabolic function blocks to ease data interpretation and biological understanding of the role of DR. The functional metabolic blocks were weighted to consider the number of metabolites per block [56]. For lipid blocking, lipid species were grouped according to clusters calculated by hierarchical clustering analysis (Ward method). The score values of lipid blocks were generated by hierarchical-PLS-DA as described previously [57]. Scores from the hierarchical PLS-DA multiblock analysis were analysed to determine the most significant biological functions related to the clinical outcome. For metabolomics and lipidomics analyses, the Benjamini–Yekutieli procedure for controlling the false discovery rate was applied. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

6. Conclusions

In conclusion, significant variation in plasma metabolites and lipids was found in T2D patients with DR compared to T2D patients without DR. Panels of molecules identified by metabolomics and lipidomics profiling could potentially be relevant biomarkers for the diagnosis of DR, although there is a need for validation studies in order to confirm their role in identifying patients at risk of DR progression. Further investigation is required in order to quantitatively detect candidate metabolites in an expanded cohort. Nevertheless, our work demonstrates that this multiomic approach should in the near future enable monitoring of the appearance of disease and disease progression at an early stage. This could help clinicians and ophthalmologists to adapt the frequency of retinal screening in this period of lack of human resources for eye health. The most prominent advances in diagnosis and treatment have been made for later stages of the disease. Robust and specific risk markers for onset and early progression of DR remain lacking, however, and need further research. The identification of specific signatures associated with PDR, macular oedema, and DR associated with chronic kidney disease can provide valuable insights into the pathophysiology of these conditions, and could potentially guide the development of targeted therapies. Future studies should consider ways to confirm these findings in other biological matrices as well.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241512053/s1.

Author Contributions: Conceptualization, P.A., B.G. and A.D.; methodology, J.C.M., N.R., L.S., M.V. and C.T.; software, J.C.M.; validation, J.F.G., J.B.J., M.R. and F.M.; formal analysis, P.A., J.C.M. and E.D.; investigation, B.G., F.M., P.G., M.H. and M.R.; writing—original draft preparation, P.A. and B.G.; writing—review and editing, P.A., B.G., A.D., J.C.M., J.F.G., J.B.J., N.V., N.R., M.R. and P.G.; supervision, B.G; project administration, N.R.; funding acquisition, J.F.G., A.D. and B.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Société Francophone du Diabète (SFD) and GIRCI Mediterranée.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by local institutions and ethics committees (CPP Méditerranée II number 002930-35 and Ile de France V number 15070).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on reasonable request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Teo, Z.L.; Tham, Y.-C.; Yu, M.; Chee, M.L.; Rim, T.H.; Cheung, N.; Bikbov, M.M.; Wang, Y.X.; Tang, Y.; Lu, Y.; et al. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-Analysis. *Ophthalmology* **2021**, *128*, 1580–1591. [CrossRef] [PubMed]
2. Yau, J.W.Y.; Rogers, S.L.; Kawasaki, R.; Lamoureux, E.L.; Kowalski, J.W.; Bek, T.; Chen, S.-J.; Dekker, J.M.; Fletcher, A.; Grauslund, J.; et al. Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* **2012**, *35*, 556–564. [CrossRef]
3. Perais, J.; Agarwal, R.; Evans, J.R.; Loveman, E.; Colquitt, J.L.; Owens, D.; Hogg, R.E.; Lawrenson, J.G.; Takwoingi, Y.; Lois, N. Prognostic Factors for the Development and Progression of Proliferative Diabetic Retinopathy in People with Diabetic Retinopathy. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2023**, *2*, CD013775. [CrossRef]
4. Hirsch, I.B.; Brownlee, M. Beyond Hemoglobin A1c--Need for Additional Markers of Risk for Diabetic Microvascular Complications. *JAMA* **2010**, *303*, 2291–2292. [CrossRef]
5. Kirthi, V.; Nderitu, P.; Alam, U.; Evans, J.R.; Nevitt, S.; Malik, R.A.; Hopkins, D.; Jackson, T.L. The Prevalence of Retinopathy in Prediabetes: A Systematic Review. *Surv. Ophthalmol.* **2022**, *67*, 1332–1345. [CrossRef] [PubMed]
6. Kiziltoprak, H.; Tekin, K.; Inanc, M.; Goker, Y.S. Cataract in Diabetes Mellitus. *World J. Diabetes* **2019**, *10*, 140–153. [CrossRef] [PubMed]
7. Zikhali, T.; Kalinda, C.; Xulu-Kasaba, Z.N. Screening of Diabetic Retinopathy Using Teleophthalmology to Complement Human Resources for Eye Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Pract.* **2022**, *12*, 457–467. [CrossRef] [PubMed]
8. Gaborit, B.; Julla, J.-B.; Besbes, S.; Proust, M.; Vincentelli, C.; Alos, B.; Ancel, P.; Alzaid, F.; Garcia, R.; Mailly, P.; et al. Glucagon-like Peptide 1 Receptor Agonists, Diabetic Retinopathy and Angiogenesis: The AngioSafe Type 2 Diabetes Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2020**, *105*, e1549–e1560. [CrossRef]
9. Newgard, C.B. Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand? *Cell Metab.* **2017**, *25*, 43–56. [CrossRef]
10. Jeppesen, M.J.; Powers, R. Multiplatform Untargeted Metabolomics. *Magn. Reson. Chem.* **2023**. [CrossRef]
11. Chu, S.H.; Huang, M.; Kelly, R.S.; Benedetti, E.; Siddiqui, J.K.; Zeleznik, O.A.; Pereira, A.; Herrington, D.; Wheelock, C.E.; Krumsiek, J.; et al. Integration of Metabolomic and Other Omics Data in Population-Based Study Designs: An Epidemiological Perspective. *Metabolites* **2019**, *9*, 117. [CrossRef] [PubMed]
12. Yang, K.; Han, X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 954–969. [CrossRef]
13. Ding, C.; Wang, N.; Wang, Z.; Yue, W.; Li, B.; Zeng, J.; Yoshida, S.; Yang, Y.; Zhou, Y. Integrated Analysis of Metabolomics and Lipidomics in Plasma of T2DM Patients with Diabetic Retinopathy. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2751. [CrossRef] [PubMed]
14. Oltvai, Z.N.; Barabási, A.-L. Systems Biology. Life's Complexity Pyramid. *Science* **2002**, *298*, 763–764. [CrossRef]
15. Jian, Q.; Wu, Y.; Zhang, F. Metabolomics in Diabetic Retinopathy: From Potential Biomarkers to Molecular Basis of Oxidative Stress. *Cells* **2022**, *11*, 3005. [CrossRef]
16. Yu, Z.; Kastenmüller, G.; He, Y.; Belcredi, P.; Möller, G.; Prehn, C.; Mendes, J.; Wahl, S.; Roemisch-Margl, W.; Ceglarek, U.; et al. Differences between Human Plasma and Serum Metabolite Profiles. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21230. [CrossRef] [PubMed]
17. Barba, I.; Garcia-Ramírez, M.; Hernández, C.; Alonso, M.A.; Masmiquel, L.; García-Dorado, D.; Simó, R. Metabolic Fingerprints of Proliferative Diabetic Retinopathy: An 1H-NMR-Based Metabonomic Approach Using Vitreous Humor. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, *51*, 4416–4421. [CrossRef]
18. Du, X.; Yang, L.; Kong, L.; Sun, Y.; Shen, K.; Cai, Y.; Sun, H.; Zhang, B.; Guo, S.; Zhang, A.; et al. Metabolomics of Various Samples Advancing Biomarker Discovery and Pathogenesis Elucidation for Diabetic Retinopathy. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 1037164. [CrossRef]
19. Laíns, I.; Gantner, M.; Murinello, S.; Lasky-Su, J.A.; Miller, J.W.; Friedlander, M.; Husain, D. Metabolomics in the Study of Retinal Health and Disease. *Prog. Retin. Eye Res.* **2019**, *69*, 57–79. [CrossRef]
20. Xia, J.-F.; Wang, Z.; Liang, Q.-L.; Wang, Y.-M.; Li, P.; Luo, G.-A. Correlations of Six Related Pyrimidine Metabolites and Diabetic Retinopathy in Chinese Type 2 Diabetic Patients. *Clin. Chim. Acta* **2011**, *412*, 940–945. [CrossRef]
21. Xia, J.; Wang, Z.; Zhang, F. Association between Related Purine Metabolites and Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetic Patients. *Int. J. Endocrinol.* **2014**, *2014*, 651050. [CrossRef] [PubMed]

22. Chen, L.; Cheng, C.-Y.; Choi, H.; Ikram, M.K.; Sabanayagam, C.; Tan, G.S.W.; Tian, D.; Zhang, L.; Venkatesan, G.; Tai, E.S.; et al. Plasma Metabonomic Profiling of Diabetic Retinopathy. *Diabetes* **2016**, *65*, 1099–1108. [CrossRef] [PubMed]
23. Rhee, S.Y.; Jung, E.S.; Park, H.M.; Jeong, S.J.; Kim, K.; Chon, S.; Yu, S.-Y.; Woo, J.-T.; Lee, C.H. Plasma Glutamine and Glutamic Acid Are Potential Biomarkers for Predicting Diabetic Retinopathy. *Metabolomics* **2018**, *14*, 89. [CrossRef] [PubMed]
24. Zhu, X.-R.; Yang, F.-Y.; Lu, J.; Zhang, H.-R.; Sun, R.; Zhou, J.-B.; Yang, J.-K. Plasma Metabolomic Profiling of Proliferative Diabetic Retinopathy. *Nutr. Metab.* **2019**, *16*, 37. [CrossRef]
25. Sun, Y.; Zou, H.; Li, X.; Xu, S.; Liu, C. Plasma Metabolomics Reveals Metabolic Profiling for Diabetic Retinopathy and Disease Progression. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 757088. [CrossRef]
26. Lin, H.-T.; Cheng, M.-L.; Lo, C.-J.; Lin, G.; Lin, S.-F.; Yeh, J.-T.; Ho, H.-Y.; Lin, J.-R.; Liu, F.-C. 1H Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Based Cerebrospinal Fluid and Plasma Metabolomic Analysis in Type 2 Diabetic Patients and Risk Prediction for Diabetic Microangiopathy. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 874. [CrossRef]
27. Curovic, V.R.; Suvitaival, T.; Mattila, I.; Ahonen, L.; Trošt, K.; Theilade, S.; Hansen, T.W.; Legido-Quigley, C.; Rossing, P. Circulating Metabolites and Lipids Are Associated to Diabetic Retinopathy in Individuals with Type 1 Diabetes. *Diabetes* **2020**, *69*, 2217–2226. [CrossRef]
28. Wang, Z.; Tang, J.; Jin, E.; Ren, C.; Li, S.; Zhang, L.; Zhong, Y.; Cao, Y.; Wang, J.; Zhou, W.; et al. Metabolomic Comparison Followed by Cross-Validation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Reveal Potential Biomarkers of Diabetic Retinopathy in Chinese with Type 2 Diabetes. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 986303. [CrossRef]
29. Peters, K.S.; Rivera, E.; Warden, C.; Harlow, P.A.; Mitchell, S.L.; Calcutt, M.W.; Samuels, D.C.; Brantley, M.A. Plasma Arginine and Citrulline Are Elevated in Diabetic Retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* **2022**, *235*, 154–162. [CrossRef]
30. Xuan, Q.; Ouyang, Y.; Wang, Y.; Wu, L.; Li, H.; Luo, Y.; Zhao, X.; Feng, D.; Qin, W.; Hu, C.; et al. Multiplatform Metabolomics Reveals Novel Serum Metabolite Biomarkers in Diabetic Retinopathy Subjects. *Adv. Sci.* **2020**, *7*, 2001714. [CrossRef]
31. Shen, Y.; Wang, H.; Fang, J.; Liu, K.; Xu, X. Novel Insights into the Mechanisms of Hard Exudate in Diabetic Retinopathy: Findings of Serum Lipidomic and Metabolomics Profiling. *Heliyon* **2023**, *9*, e15123. [CrossRef]
32. Jenkins, A.J.; Grant, M.B.; Busik, J.V. Lipids, Hyperreflective Crystalline Deposits and Diabetic Retinopathy: Potential Systemic and Retinal-Specific Effect of Lipid-Lowering Therapies. *Diabetologia* **2022**, *65*, 587–603. [CrossRef] [PubMed]
33. Keech, A.C.; Mitchell, P.; Summanen, P.A.; O'Day, J.; Davis, T.M.E.; Moffitt, M.S.; Taskinen, M.-R.; Simes, R.J.; Tse, D.; Williamson, E.; et al. Effect of Fenofibrate on the Need for Laser Treatment for Diabetic Retinopathy (FIELD Study): A Randomised Controlled Trial. *Lancet* **2007**, *370*, 1687–1697. [CrossRef] [PubMed]
34. ACCORD Study Group; ACCORD Eye Study Group; Chew, E.Y.; Ambrosius, W.T.; Davis, M.D.; Danis, R.P.; Gangaputra, S.; Greven, C.M.; Hubbard, L.; Esser, B.A.; et al. Effects of Medical Therapies on Retinopathy Progression in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 233–244. [CrossRef]
35. Eid, S.; Sas, K.M.; Abcouwer, S.F.; Feldman, E.L.; Gardner, T.W.; Pennathur, S.; Fort, P.E. New Insights into the Mechanisms of Diabetic Complications: Role of Lipids and Lipid Metabolism. *Diabetologia* **2019**, *62*, 1539–1549. [CrossRef] [PubMed]
36. Arneth, B.; Arneth, R.; Shams, M. Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2467. [CrossRef] [PubMed]
37. Sumarriva, K.; Uppal, K.; Ma, C.; Herren, D.J.; Wang, Y.; Chocron, I.M.; Warden, C.; Mitchell, S.L.; Burgess, L.G.; Goodale, M.P.; et al. Arginine and Carnitine Metabolites Are Altered in Diabetic Retinopathy. *Investig. Opthalmol. Vis. Sci.* **2019**, *60*, 3119–3126. [CrossRef]
38. Paris, L.P.; Johnson, C.H.; Aguilar, E.; Usui, Y.; Cho, K.; Hoang, L.T.; Feitelberg, D.; Benton, H.P.; Westenskow, P.D.; Kurihara, T.; et al. Global Metabolomics Reveals Metabolic Dysregulation in Ischemic Retinopathy. *Metabolomics* **2016**, *12*, 15. [CrossRef]
39. Gheni, G.; Ogura, M.; Iwasaki, M.; Yokoi, N.; Minami, K.; Nakayama, Y.; Harada, K.; Hastoy, B.; Wu, X.; Takahashi, H.; et al. Glutamate Acts as a Key Signal Linking Glucose Metabolism to Incretin/CAMP Action to Amplify Insulin Secretion. *Cell Rep.* **2014**, *9*, 661–673. [CrossRef]
40. Brosnan, J.T.; Brosnan, M.E. Glutamate: A Truly Functional Amino Acid. *Amino Acids* **2013**, *45*, 413–418. [CrossRef]
41. Bogdanov, P.; Corraliza, L.; Villena, J.A.; Carvalho, A.R.; Garcia-Arumí, J.; Ramos, D.; Ruberte, J.; Simó, R.; Hernández, C. The Db/Db Mouse: A Useful Model for the Study of Diabetic Retinal Neurodegeneration. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e97302. [CrossRef] [PubMed]
42. Ng, Y.-K.; Zeng, X.-X.; Ling, E.-A. Expression of Glutamate Receptors and Calcium-Binding Proteins in the Retina of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Brain Res.* **2004**, *1018*, 66–72. [CrossRef] [PubMed]
43. Santiago, A.R.; Gaspar, J.M.; Baptista, F.I.; Cristóvão, A.J.; Santos, P.F.; Kamphuis, W.; Ambrósio, A.F. Diabetes Changes the Levels of Ionotropic Glutamate Receptors in the Rat Retina. *Mol. Vis.* **2009**, *15*, 1620–1630.
44. Bloomgarden, Z. Diabetes and Branched-Chain Amino Acids: What Is the Link? *J. Diabetes* **2018**, *10*, 350–352. [CrossRef]
45. Ola, M.S.; Alhomida, A.S.; LaNoue, K.F. Gabapentin Attenuates Oxidative Stress and Apoptosis in the Diabetic Rat Retina. *Neurotox. Res.* **2019**, *36*, 81–90. [CrossRef] [PubMed]
46. Abcouwer, S.F.; Marjon, P.L.; Loper, R.K.; Vander Jagt, D.L. Response of VEGF Expression to Amino Acid Deprivation and Inducers of Endoplasmic Reticulum Stress. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2002**, *43*, 2791–2798.
47. Tomofuji, Y.; Suzuki, K.; Kishikawa, T.; Shojima, N.; Hosoe, J.; Inagaki, K.; Matsubayashi, S.; Ishihara, H.; Watada, H.; Ishigaki, Y.; et al. Identification of Serum Metabolome Signatures Associated with Retinal and Renal Complications of Type 2 Diabetes. *Commun. Med.* **2023**, *3*, 5. [CrossRef]

48. Rhee, S.Y.; Jung, E.S.; Suh, D.H.; Jeong, S.J.; Kim, K.; Chon, S.; Yu, S.-Y.; Woo, J.-T.; Lee, C.H. Plasma Amino Acids and Oxylipins as Potential Multi-Biomarkers for Predicting Diabetic Macular Edema. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 9727. [CrossRef]
49. Wilkinson, C.P.; Ferris, F.L.; Klein, R.E.; Lee, P.P.; Agardh, C.D.; Davis, M.; Dills, D.; Kampik, A.; Pararajasegaram, R.; Verdaguer, J.T.; et al. Proposed International Clinical Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema Disease Severity Scales. *Ophthalmology* **2003**, *110*, 1677–1682. [CrossRef]
50. Matyash, V.; Liebisch, G.; Kurzchalia, T.V.; Shevchenko, A.; Schwudke, D. Lipid Extraction by Methyl-Tert-Butyl Ether for High-Throughput Lipidomics. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 1137–1146. [CrossRef]
51. Grison, S.; Habchi, B.; Gloaguen, C.; Kereselidze, D.; Elie, C.; Martin, J.-C.; Souidi, M. Early Metabolomic Markers of Acute Low-Dose Exposure to Uranium in Rats. *Metabolites* **2022**, *12*, 421. [CrossRef]
52. Van der Kloet, F.M.; Bobeldijk, I.; Verheij, E.R.; Jellema, R.H. Analytical Error Reduction Using Single Point Calibration for Accurate and Precise Metabolomic Phenotyping. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5132–5141. [CrossRef]
53. Giacomoni, F.; Le Corguillé, G.; Monsoor, M.; Landi, M.; Pericard, P.; Pétéra, M.; Duperier, C.; Tremblay-Franco, M.; Martin, J.-F.; Jacob, D.; et al. Workflow4Metabolomics: A Collaborative Research Infrastructure for Computational Metabolomics. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 1493–1495. [CrossRef] [PubMed]
54. Pang, Z.; Zhou, G.; Ewald, J.; Chang, L.; Hacariz, O.; Basu, N.; Xia, J. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC-HRMS Spectra Processing, Multi-Omics Integration and Covariate Adjustment of Global Metabolomics Data. *Nat. Protoc.* **2022**, *17*, 1735–1761. [CrossRef] [PubMed]
55. Martin, J.-C.; Berton, A.; Ginies, C.; Bott, R.; Scheercousse, P.; Saddi, A.; Gripois, D.; Landrier, J.-F.; Dalemans, D.; Alessi, M.-C.; et al. Multilevel Systems Biology Modeling Characterized the Atheroprotective Efficiencies of Modified Dairy Fats in a Hamster Model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2015**, *309*, H935–H945. [CrossRef] [PubMed]
56. Wold, S.; Kettaneh, N.; Tjessem, K. Hierarchical Multiblock PLS and PC Models for Easier Model Interpretation and as an Alternative to Variable Selection. *J. Chemom.* **1996**, *10*, 463–482. [CrossRef]
57. Fraser, K.; Roy, N.C.; Goumidi, L.; Verdu, A.; Suchon, P.; Leal-Valentim, F.; Trégouët, D.-A.; Morange, P.-E.; Martin, J.-C. Plasma Biomarkers and Identification of Resilient Metabolic Disruptions in Patients with Venous Thromboembolism Using a Metabolic Systems Approach. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2020**, *40*, 2527–2538. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Annexe 5 |Article scientifique : Lien entre céramides du TAE et activité de la lipoprotéine lipase dans la maladie coronarienne, Barchuk *et al.*

ARTICLE

Epicardial Adipose Tissue Ceramides Are Related to Lipoprotein Lipase Activity in Coronary Artery Disease

Barchuk M, Ancel Patricia, Miksztowicz V, Doukbi Elisa, Svilar L, Yñón D, Nogueira Juan Patricio, Rubio M, Schreier L, Dutour Anne, Martin Jean-Charles, Gaborit Bénédicte & Berg G

Publié dans *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology,* 2022

Check for updates

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

CLINICAL AND POPULATION STUDIES

Epicardial Adipose Tissue Ceramides Are Related to Lipoprotein Lipase Activity in Coronary Artery Disease: Unfolding a Missing Link

Magalí Barchuk, Patricia Ancel, Verónica Miksztowicz, Elisa Doukbi, Ljubica Svilar, Daniel Yñón, Juan Patricio Nogueira, Miguel Rubio, Laura Schreier, Anne Dutour, Jean Charles Martin, Bénédicte Gaborit*, Gabriela Berg*

BACKGROUND: Epicardial adipose tissue (EAT) contributes to coronary artery disease (CAD). EAT presents a specific lipidomic signature, showing increased ceramides and other proinflammatory lipids content. Besides, LPL (lipoprotein lipase) activity in EAT would contribute to its expansion, supplying fatty acids to the tissue. Our aim was to evaluate the relations between LPL activity, regulators of LPL, and ceramides in EAT from CAD patients.

METHODS: We studied patients undergoing coronary bypass graft (CAD, n=25) and patients without CAD (no CAD, n=14). EAT and subcutaneous AT (SAT) were obtained, tissue LPL activity and its regulator's expression (ANGPTL4, GPIHBP1 [glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1], and PPARγ [peroxisomal proliferator–activated receptor γ]) were assessed. Tissue lipidomes were evaluated by UHPLC-MS, in positive and negative ionization modes.

RESULTS: LPL activity was higher in EAT from CAD ($P<0.001$), and in EAT than SAT in both groups ($P<0.001$). ANGPTL4 levels were lower, GPIHBP1 and PPARγ levels were higher in EAT from CAD ($P<0.001$). In both groups, EAT exhibited more ceramide ($P=0.01$), directly associated with LPL activity, being the strongest association with Cer18:1/24:1 ($P<0.001$). EAT Cer18:1/16:0 to Cer18:1/24:0 and Cer18:1/24:1 to 18:1/24:0 ratios were higher in CAD ($P=0.03$; $P<0.001$, respectively), the latter directly associated with LPL activity ($r=0.63$, $P<0.001$) GPIHBP1 levels ($r=0.68$, $P<0.001$), and inversely to EAT ANGPTL4 expression ($r=-0.49$, $P=0.03$). Pairwise partial correlation network showed associations among bioactive lipids and LPL and its regulators ($P<0.001$ in all cases).

CONCLUSIONS: The association between LPL activity, total ceramide, and the atherogenic ceramide ratios highlights the importance of the enzyme and these bioactive lipids contributing to the different metabolic profile of EAT in CAD.

GRAPHIC ABSTRACT: A graphic abstract is available for this article.

Key Words: ceramides ■ coronary artery disease ■ epicardial adipose tissue ■ lipidomics ■ lipoprotein lipase

Downloaded from http://ahajournals.org by on April 11, 2024

Epicardial adipose tissue (EAT) has emerged as a significant risk factor for cardiovascular disease.[1–3] EAT is a visceral adipose tissue, which is directly adjacent to the myocardium and coronary arteries, with no fascia separating them.[2] As a visceral adipose tissue, epicardial fat is metabolically very active, producing and secreting a huge variety of adipokines[4] that could be protective or harmful, according to the local microenvironment.[4,5] These adipokines may interact locally with the adjacent structures, in a paracrine and/or vasocrine manner, thereby modulating the heart and coronary vessels properties.[4] In physiological conditions, EAT would act as a buffer, protecting myocardium from excess in circulating fatty acids (FA) supply[6,7]; a thermogenic function directed to the heart has also been

Correspondence to: Prof Dr Gabriela Berg, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Departamento de Bioquímica Clínica, Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Junin 956, Ciudad Autonoma de Buenos Aires C1113AAD, Buenos Aires, Argentina. Email berg.gabriela@gmail.com
*B. Gaborit and G. Berg contributed equally.
Supplemental Material is available at https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/ATVBAHA.122.317840.
For Sources of Funding and Disclosures, see page e250.
© 2022 American Heart Association, Inc.
Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at www.ahajournals.org/journal/atvb

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

ABCA1	ATP-binding cassette A1
ABCG1	ATP-binding cassette sub-family G member 1
ANGPTL4	angiopoietin-like 4
CAD	coronary artery disease
CVD	cardiovascular disease
EAT	epicardial adipose tissue
FA	fatty acids
GPIHBP1	glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1
GWAS	genome-wide association studies
HDL-C	high-density lipoprotein cholesterol
hs-CRP	high-sensitivity C reactive protein
IL	interleukin
LDL-C	low-density lipoprotein cholesterol
LPL	lipoprotein lipase
PPARγ	peroxisomal proliferator activated receptor γ
SAT	subcutaneous adipose tissue
TRL-C	TG-rich lipoproteins cholesterol
VLDL-R	very low-density lipoprotein receptor

Highlights

- Epicardial adipose tissue from coronary artery disease patients presents atherogenic ceramide ratios increased compared to no coronary artery disease patients.
- Total ceramide content and the atherogenic ceramide ratios directly correlate with LPL (lipoprotein lipase) activity and its positive regulators and negatively with ANGPTL4 (angiopoietin-like 4).
- Pairwise partial correlation network showed associations among bioactive lipids and LPL and its regulators.
- Lipid ontology enrichment analysis underlies that endoplasmic reticulum and mitochondrion pathways were particularly enriched in epicardial adipose tissue compared to subcutaneous adipose tissue, highlighting the importance of these 2 organelles in epicardial adipose tissue metabolism activity.

proposed to EAT.[7] Nevertheless, under pathological situations, such as obesity or type 2 diabetes, EAT would lose its protective capacity, as it increases in its volume and acquires an inflammatory profile, becoming a deleterious tissue for myocardium and coronary arteries.[5]

The expansion of EAT would be different from that of other fat depots. EAT has shown to present a higher adipocyte density with lower adipocyte size than subcutaneous adipose tissue (SAT).[2,8] These characteristics could support the fact that EAT expansion is mainly dependent on hyperplasia rather than hypertrophy.[9] Among the main actors involved in the FA influx to the tissue, it is worth mentioning that VLDL-R (very low-density lipoprotein receptor) and LPL (lipoprotein lipase) have probably a central role. Previous results from our laboratory showed that VLDL-R expression is higher in EAT compared to SAT in patients with coronary artery disease (CAD),[10] suggesting an active role in the uptake of FA from circulating lipoproteins. Besides, LPL activity would also contribute to the uptake of FA, hydrolyzing triglycerides from VLDL, and chylomicrons. LPL is mainly post-translationally regulated,[11] and its activity is reduced in insulin-resistant states.[12,13] Paradoxically, we have demonstrated that LPL activity is increased in EAT from CAD compared to non-CAD diabetic patients[10]; suggesting that LPL could be implicated in EAT expansion.

Although the main lipids present in fat depots are triglycerides, the amount and type of FA and other lipid species may contribute to the tissue characteristics and metabolism. Lipidomic and genomic studies have revealed that lipids are not neutral molecules, but they exert several functions in cardiovascular disease (CVD) development among many other pathologies.[14] These metabolites serve as signatures of biochemical activity correlated with the phenotype.[15]

Previous studies of EAT lipid composition showed an increase in saturated and conjugated linoleic FA and a decrease in unsaturated FA in EAT of patients with type 2 diabetes.[16,17] Others showed that in patients with obesity and diabetes, bioactive lipids were increased in SAT and EAT.[18] Recently, we demonstrated an enrichment in ceramides, sphingomyelin, phospholipids, and plasmalogens in EAT from CAD patients.[15] Besides, lipidomic signature from EAT was different from SAT.[15,19]

Scarce data about the possible link between LPL and ceramides have been reported. Some studies on brain have shown controversial results in reference to the associations between the lipolytic enzyme and ceramides.[20–22] Nevertheless, no data about this association has been reported in EAT. Given the impact that bioactive lipids may have on the metabolic behavior of the tissue, the aim of this study was to identify possible relations among LPL activity and its regulators, and bioactive lipids in EAT from CAD patients.

MATERIALS AND METHODS

We are open to make data, analytic methods, and study materials available to other researchers. The data that support the findings of this study will be available from the corresponding author upon reasonable request.

Patients

We included 39 consecutive patients undergoing coronary artery bypass graft (n=25) or valve replacement (n=14) at the Cardiac Surgery Division of Hospital de Clínicas José de San

Downloaded from http://ahajournals.org by on April 11, 2024

Martín, University of Buenos Aires. Written informed consent was obtained from all patients before the inclusion on the study. The study was performed in accordance with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki of the World Medical Association for medical studies in humans and it was approved by the Ethical Review Committee of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, and by the Ethical Review Committee of the Hospital de Clínicas José de San Martín. Clinical data were obtained upon admission to the hospital before surgery. Diagnosis of CAD was based on coronarography and reductions in luminal coronary artery diameters >70% were considered significant. The study population, to enter the operating room and be revascularized, had to have at least a 70% reduction in luminal diameter, according to the current criteria for indicating coronary bypass. This recommendation emerges from the 2018 ESC/EACTS (European Society of Cardiology/European Association of Cardio-Thoracic Surgery) Guidelines on myocardial revascularization.[23] Paired samples of EAT (≈0.1–1.0 g wet weight, from the origin of the right coronary artery) and subcutaneous adipose tissue (SAT, ≈2.0 g wet weight, from thoracic parasternal region) were obtained before starting extracorporeal circulation, during elective surgical procedure. Tissue samples were aliquoted and immediately flash-frozen in liquid nitrogen before being stored at −80 °C. Previous diagnosis of type 2 diabetes was assessed according to the American Diabetes Association.[24] No CAD patients were randomly selected among those who did not undergo coronary artery bypass graft intervention, without clinical signs of CAD, which artery anatomy corresponds to the absence of alterations of the coronary luminal contour, based on conventional coronary angiography. The weight and height of each participant were measured, and body mass index and blood pressure were recorded in all cases. The following exclusion criteria were considered for both groups: previous heart surgery, concomitant infective diseases, alcohol intake >20 g/d, recent history of acute illness, end-stage organ failure, and any other condition that may interfere with the results.

Blood Samples Collection

Before cardiovascular surgery, and after 10 to 12 hours overnight fast, peripheral venous blood samples were drawn. Serum was kept at 4 °C within 48 hours for the biochemical determinations.

Biochemical Determinations

Total cholesterol, triglycerides, fasting glucose, uric acid, and hs-CRP (high-sensitivity C reactive protein) were measured using commercial enzymatic kits (Roche Diagnostics, Germany) in a Cobas C-501 autoanalyzer; intraassay coefficient of variation (CV) <1.9%, interassay CV <2.4%. HDL-C and LDL-C (high-density and low-density lipoprotein cholesterol) were determined by homogeneous colorimetric method; intraassay CV <2.0% and interassay CV <2.5%, respectively, and Non–HDL-C was calculated as total cholesterol minus HDL-C. Serum apo AI and apoB_{100} were determined by immunoturbidimetry (Roche Diagnostics, Germany); intraassay CV <1.9%, and interassay CV <2.5% for both parameters. Free FA were determined by a spectrophotometric method (Randox, United Kingdom); intraassay CV <2.6% and interassay CV <3.9%. TRL-C (triglyceride-rich lipoprotein cholesterol) was calculated as Total cholesterol–LDL-C–HDL-C. ApoAV circulating levels were determined by ELISA kit (Immuno-Biological Laboratories [IBL], Fujioka, Japan).

LPL Regulators Expression

ANGPTL4, GPIHBP1, and PPARγ (peroxisomal proliferator–activated receptor γ) levels were assessed by Western Blot. EAT and SAT were homogenized as previously described.[10] Tissue homogenates were centrifuged and protein concentrations were determined by Lowry method in the supernatant.[25] Thirty micrograms of protein were separated in a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted onto polyvinylidene difluoride membrane. Blots were blocked with 5% skim milk for 1 hour and incubated overnight at 4 °C with a polyclonal rabbit IgG antibody anti-ANGPTL4 (1:150, Cat. N° SAB1410901; Sigma Aldrich), anti-PPARγ (1:150, Cat N° PA3-821A; Invitrogen), anti-GPIHBP1 (1:500, Cat. N° ab224728; Abcam, United Kingdom) or anti-β-actin (1:300, Cat. N° A2066; Sigma Aldrich). The blots were incubated with horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (1:4000, Cat. N° 170-5046; BioRad) for 90 minutes at room temperature. The specific signals were visualized using the ECL Western Blotting Analysis System (ThermoScientific) enhanced chemiluminescence system. ANGPTL4 (45 kDa), GPIHBP1 (21 kDa), PPARγ (64 kDa), and β-actin (42 kDa) bands were identified by the use of prestained molecular weight standards (BioRad). The relative intensity of protein signal was quantified by densitometric analysis using Fluorchem program (Alpha Innotech Corp). Results are expressed as ANGPTL4, GPIHBP1, or PPARγ protein/actin protein ratio.

LPL Activity

LPL activity assay in EAT and SAT was performed in a blinded manner and each sample was evaluated in three different replicates, as previously described,[10] by measuring the oleic acid produced by the enzyme-catalyzed hydrolysis of an emulsion containing [3H]-triolein (American Radiolabeled Chemicals) according to Nilsson-Ehle method.[26]

Determination of Lipidomic Profile

Lipid Extraction

Starting from 10 mg of adipose tissues, methyl-terbutyl ether was used as the lipid extraction solvent, as fully described by Matyash et al[27] and as we have previously performed and described.[15]

Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Lipidomics

A DionexUltiMate 3000 device UHPLC (ultra high performance liquid chromatography) fitted with an Accucore C18 column (150×2.1 mm, 2.6 µm), separation hyphenated through an ESI (electro spray ionization) source to a Q-exactive plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) was used to perform lipidomic analyses. The column temperature was kept at 45 °C. All the chromatographic conditions, mass spectrometer tuning, data processing with XCMS and W4M (work flow metabolics), and lipid annotation using LipidSearch were detailed previously.[15]

Statistical Analysis

Anthropometric and biochemical parameters were expressed as mean±SD or median and 25th to 75th percentile. Lipid

Downloaded from http://ahajournals.org by on April 11, 2024

species relative quantification was expressed in percentages±SEM. Pathways enrichment was performed with MetaboAnalyst using small molecule pathway database. Cooman plot analysis was performed to determine the effect of sex on the EAT lipidome. Class membership was tested against the 2 principal component analysis models in a SIMCA procedure. The distance from each model is computed (DmodX1 and DmodX2, respectively) and plotted. The Dcrit value for each model defines the class. Thus, there were 4 possible outcomes: an individual could be predicted to be males, females only, neither, or both (eg, undefined). Pairwise relationships among variables were explored using partial correlation network.[28] Lipid enrichment analyses used the Lipid Ontology enrichment analysis web application.[29] The gaussian distribution of the data sets was assessed by Shapiro-Wilk normality test. The significant differences between groups were detected by Student 2-sample *t* test or Wilcoxon rank-sum test when appropriate. The Benjamini Yekutieli procedure for controlling the false discovery rate was applied. $P<0.05$ was considered statistically significant. Pearson or Spearman analysis, for parametric or nonparametric variables, were used to determine correlations between parameters. To verify the differences observed between groups, an ANCOVA, controlling for necessary confounders was performed. The SPSS 19.0 (Chicago) and GraphPad Prism 5.01 (La Jolla) software packages were used for this last statistical analysis.

RESULTS

Clinical and biochemical characteristics of the study population are shown in Table 1. No significant differences were observed between groups regarding age, body mass index, or systolic or diastolic blood pressure. As expected, CAD patients were mostly men and presented higher fasting plasma glucose ($P<0.001$), hs-CRP ($P<0.001$), triglycerides ($P<0.04$), and triglyceride-rich lipoproteins ($P<0.001$).

LPL Activity and Regulators Expression

Table 2 shows LPL activity, ANGPTL4, GPIHBP1, and PPARγ levels in EAT and SAT from CAD and No CAD patients.

LPL activity was higher in EAT from CAD patients compared to No CAD, and in EAT than SAT in both groups. Besides, ANGPTL4 levels were lower, and GPIHBP1 and PPARγ levels were higher in EAT from CAD ($P<0.001$ in all cases), representative blots are shown in Figure S1. LPL activity in EAT was directly associated with

Table 1. Clinical and Biochemical Characteristics of Patients With and Without CAD

	No CAD (n=14)	CAD (n=25)	*P* value
Age, y	64±14	64±11	ns
Sex (men), n (%)	7 (50)	23 (92)	0.005
BMI, kg/m²	29.9±6.6	28.6±4.6	ns
Systolic blood pressure, mm Hg	120±19	132±18	ns
Diastolic blood pressure, mm Hg	60 (60–72)	71 (60–80)	ns
Hypertension, n (%)	9 (64)	17 (68)	ns
Exsmokers, n (%)	2 (14)	12 (48)	0.044
Diabetics, n (%)	0 (0)	8 (32)	0.001
Metformin	0 (0)	6 (75)	
Insulin	0 (0)	2 (25)	
Atrial fibrillation, n (%)	0 (0)	1 (4)	ns
Valvular disease, n (%)	14 (100)	0 (0)	<0.001
Aortic/mitral	12(85) / 2 (15)	…	
Stenosis/insufficiency	8(57) / 6(43)	…	
Glucose, g/L	0.90 (0.85–0.94)	1.07 (0.94–1.37)	<0.001
Uric acid, µmol/L	293.7±53.1	289.4±83.9	ns
GFR (CKD-EPI [mL/min])	80.1±13.4	89.3±13.6	ns
hs-CRP, mg/L	0.61±0.21	2.96±1.41	<0.001
Total cholesterol, g/L	1.35 (1.04–1.73)	1.21 (1.01–1.37)	ns
Triglycerides, g/L	0.93 (0.64–1.39)	1.37 (0.95–1.73)	0.040
LDL-cholesterol, g/L	1.00 (0.67–1.30)	0.72 (0.53–0.86)	ns
HDL-cholesterol, g/L	0.38 (0.30–0.44)	0.30 (0.25–0.39)	ns
Non–HDL-cholesterol, g/L	0.96 (0.71–1.37)	0.85 (0.65–0.98)	ns
TG rich lipoproteins, g/L	0.08 (0.04–0.11)	0.17 (0.08–0.21)	0.001
ApoAV, ng/mL	188±12	267±98	ns

Data are expressed as mean±SD, median range or %. BMI indicates body mass index; CAD, coronary artery disease; CKD-EPI, chronic kidney disease epidemiology collaboration; GFR, glomerular filtration rate; HDL, high-density lipoprotein; hs-CRP, high-sensitivity C reactive protein; LDL, low-density lipoprotein; ns, nonsignificant; and TG, triglycerides.

Downloaded from http://ahajournals.org by on April 11, 2024

Table 2. LPL Activity and Concentration Levels of LPL Regulators in EAT and SAT From CAD and No CAD Patients

	No CAD (n=14)	CAD (n=25)	*P* value
EAT LPL (μIU/mg of tissue)	14.14±2.7	37.7±13.3	<0.001
SAT LPL (μIU/mg of tissue)	6.4±1.7*	7.3±2.3*	ns
EAT ANGPTL4 (RU)	3.7±0.3	1.3±0.7	<0.001
SAT ANGPTL4 (RU)	6.6±2.2†	5.5±3.6‡	ns
EAT GPIHBP1 (RU)	5.8±1.6	9.6±2.5	0.001
SAT GPIHBP1 (RU)	5.7 (4.7–10.1)	7.8 (4.9–11.7)§	0.079
EAT PPARγ (RU)	1.4±0.6	5.0±0.7	<0.001
SAT PPARγ (RU)	1.2 (0.8–1.2)	2.9 (0.7–3.8)‖	0.003

Data are expressed as mean±SD or median range. ANGPTL4 indicates angiopoietin-like 4; CAD, coronary artery disease; EAT, epicardial adipose tissue; GPIHBP1, glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1; IU, International Units; LPL, lipoprotein lipase; No CAD, non coronary patients; Ns, nonsignificant; PPARγ, peroxisome-proliferator activated receptor γ; RU, Relative Units; and SAT, subcutaneous adipose tissue.

*P<0.001 vs EAT.
†P=0.004 vs EAT.
‡P=0.002 vs EAT.
§P=0.046 vs EAT.
‖P=0.005 vs EAT.

PPARγ levels in the tissue (r=0.740, P=0.001), as well as with GPIHBP1 levels (r=0.532, P=0.013). Besides, the enzyme activity was inversely related to ANGPTL4 levels in EAT (r=–0.745, P=0.001; Figure S2).

Given the prevalence of men in CAD group, results were adjusted by sex, remaining all the differences significant after this analysis (Table S1).

Bioactive Lipids and LPL in EAT

In previous studies, we reported that EAT from CAD patients was enriched in ceramides, total (saturated and unsaturated) diglycerides, total (unsaturated) monoglycerides, and presented lower content of total and unsaturated triglycerides.[15] In this opportunity, we searched for links among these lipid species and LPL activity and its regulators to establish a possible explanation for the increase in the enzyme activity.

The main finding was the direct association between LPL activity and total ceramide content in EAT, being the strongest one with ceramides d18:1/24:1(P<0.001; Figure 1a, Table 3). Remarkably, in SAT no association was found (Figure 1b). Regarding the impact of ceramides on LPL regulators, only a significant inverse association was observed between ceramide total content and ANGPTL4 in EAT (r=–0.47; P=0.04), but not in SAT (Figure 2a and 2b). No associations were found between total ceramide content and GPIHBP1 or PPARγ, neither in EAT nor in SAT (Figures S3 and S4). Nevertheless, ceramides d18:1/24:1 was directly associated with GPIHBP1 in EAT (r=0.46; P=0.03).

Besides, LPL activity was correlated to some other lipid species, including triglycerides, diglycerides, one monoglyceride, and 2 phosphatidylethanolamines (1 plasmalogen: 18:1p/22:6; Table S2).

Lipid Ontology enrichment analysis confirmed that sphingolipids including ceramides and sphingosine were particularly enriched in the EAT of CAD versus No CAD patients (Figure 3). Finally, in EAT, ceramide 18:1/16:0 to ceramide 18:1/24:0 ratio was higher in CAD patients compared to No CAD (1.52±0.60 versus 1.23±0.28 respectively, P=0.03). This index tended to correlate positively with LPL activity in EAT (r=0.34, P=0.07). Regarding other proposed atherogenic indexes, ceramide 18:1/18:0 to ceramide 18:1/24:0 index showed no significant differences between groups (0.50±0.03 in CAD versus 1.10±0.49 in No CAD, P=nonsignificant), although it tended to correlate positively with GPIHBP1 levels in EAT (r=0.37, P=0.08). Ceramide 18:1/24:1 to 18:1/24:0 index was higher in CAD patients (1.63±0.10 in CAD versus 1.11±0.11 in No CAD, P<0.001) and directly associated with LPL activity (r=0.63, P<0.001) and GPIHBP1 levels (r=0.68, P<0.001) in the tissue and inversely related to EAT ANGPTL4 expression (r=–0.49, P=0.03). Besides, ceramides 18:1/24:1 to 18:1/24:0 showed an inverse association with HDL-C (r=–0.404, P=0.013) and direct associations with body mass index (r=0.364, P=0.025) and weight (r=0.332, P=0.042).

Given the presence of diabetic patients in CAD groups, but not in No CAD, we performed the statistical analyses of results adjusting by Diabetes presence. All the previous differences remained significant (Table S3).

Network Partial Correlations Analysis

When analyzing the pairwise partial correlation relationships between all the parameters in a network, as expected, the main nodes were constituted by 2 EAT triglycerides, triglycerides (4:0/18:1/18:3) and triglycerides (4:0/18:1/18:2). The first one was inversely associated with EAT LPL activity, EAT ANGPTL4 and EAT PPARγ levels, and with circulating apoAV levels (P<0.001 in all cases). Regarding triglycerides (4:0/18:1/18:2), it presented associations only with other triglyceride species, but not with LPL and its regulators (Figure 4). Besides, given the huge percentage of triglycerides in adipose tissue, a second network analysis was performed taking them out to reveal other associations with bioactive lipids. In this analysis, in EAT a direct association was observed between ceramides d18:2/24:1 and LPL expression, and between ceramides d18:2/20:0 and PPARγ levels (P<0.001). Moreover, EAT diglyceride (20:1/18:2) was directly related to EAT ANGPTL4 and EAT LPL (both P<0.001) expressions. Finally, a positive correlation was found between EAT diglyceride (19:1/18:1) and EAT GPIHBP1 (P<0.001). Further, Lipid Ontology enrichment analysis underlies that endoplasmic reticulum and mitochondrion pathways were particularly enriched in EAT compared to SAT (Figure 5), highlighting the importance of these 2 organelles in EAT metabolism activity.

Downloaded from http://ahajournals.org by on April 11, 2024

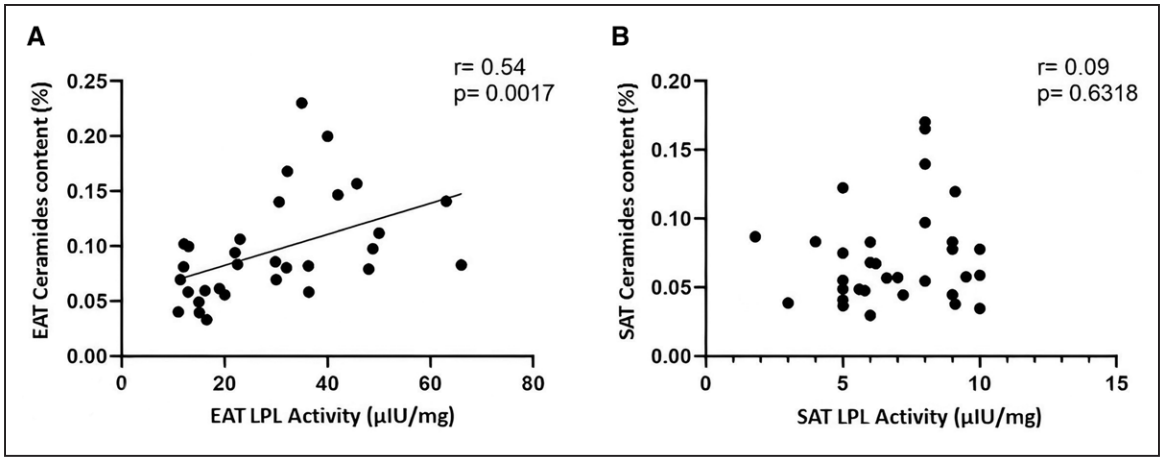


Figure 1. Correlations between ceramide content and LPL (lipoprotein lipase) activity in epicardial adipose tissue (EAT) and subcutaneous adipose tissue (SAT; n=39, 25 coronary artery disease (CAD) patients and 14 no CAD patients).
A, EAT; **B**, SAT.

DISCUSSION

In this study, we report for the first time the positive association between LPL activity and ceramide content in EAT from patients with CAD. Besides, a negative association between ceramide content and ANGPTL4, an LPL inhibitor, was observed. It is worth highlighting the strong association found between LPL activity and ceramides 18:1/24:1, as well as between the enzyme activity and ceramides 18:1/16:0 to ceramides 18:1/24:0 and ceramides 18:1/24:1 to ceramides 18:1/24:0 ratios.

It is widely demonstrated that EAT volume is increased in CAD patients. One of the factors implicated for this expansion could be LPL, increasing the influx of free FA from circulating triglyceride-rich lipoproteins towards EAT. Previous studies from our laboratory demonstrated an increase in LPL activity in EAT from diabetic patients, although no differences in gene or protein expression were found.[10] Despite in this study we evaluated CAD patients, the same higher activity of LPL was observed. As in other tissues,[11] LPL regulation in EAT is mainly post-translational through its main regulators,[10] GPIHBP1, as the necessary protein to anchor LPL to the cell surface allowing triglyceride hydrolysis, and ANGPTL4 which inhibits LPL activity by dissociating its subunits,[30,31] or as recently reported, by promoting the unfolding of LPL, which in cells can lead to the enzyme cleavage and degradation.[32]

Table 3. Pearson or Spearman Correlations Between EAT LPL Activity and EAT Ceramides Content (n=39, 25 CAD Patients and 14 No CAD Patients)

Correlation LPL activity	*r*	*P* value
Cer d16:1/16:0	0.4242	0.0174
Cer d17:1/16:0	0.5133	0.0031
Cer d18:0/16:0	0.448	0.0115
Cer d18:1/16:0	0.4758	0.0068
Cer d18:1/18:0	0.4415	0.0129
Cer d18:1/20:0	0.5294	0.0022
Cer d18:1/22:0	0.4286	0.0161
Cer d18:1/24:0	0.4234	0.0176
Cer d18:1/24:1	0.6577	<0.0001
Cer d18:2/16:0	0.4685	0.0078
Cer d18:2/18:0	0.4105	0.0218
Cer d18:2/20:0	0.4085	0.0225
Cer d18:2/22:0	0.5254	0.0024
Cer d18:2/24:1	0.4181	0.0192

CAD indicates coronary artery disease; Cer, ceramide; EAT, epicardial adipose tissue; and LPL, lipoprotein lipase.

Recently, ceramides have emerged as new markers for CVD risk,[33] as studies with large patient cohorts reported that these sphingolipids are altered in plasma before the onset of atherosclerosis and CVD.[34,35] Ceramides are not only structural components of cell membrane, but they also play an important role as bioactive lipids. Some ceramides present neutral or benign forms, while others are harmful species related to increased cardiovascular risk. Among these, direct impact on inflammation, promoting inflammasome activation and IL (interleukin)-1β release,[36] have been described; they also disrupt insulin signaling,[37] promote monocyte adhesion,[38] and LDL oxidation[39] and are associated with the formation of coronary plaques[40] among many other deleterious vascular effects. However, the source of these ceramides to the plaques is still a matter of discussion, being plasma LDL,[41] arterial wall cells[40,41] or human blood monocyte-derived macrophages among some of the proposed sources.[33]

Circulating ceramide concentrations have been suggested to be more accurate markers of CVD risk than LDL/HDL ratio. In this regard, ceramides d18:1/C16:0, ceramides d18:1/C18:0, and ceramides d18:1/C24:1 are proposed to be indicative of plaque instability and cardiovascular mortality[42–44] being the ceramides d18:1/

Downloaded from http://ahajournals.org by on April 11, 2024

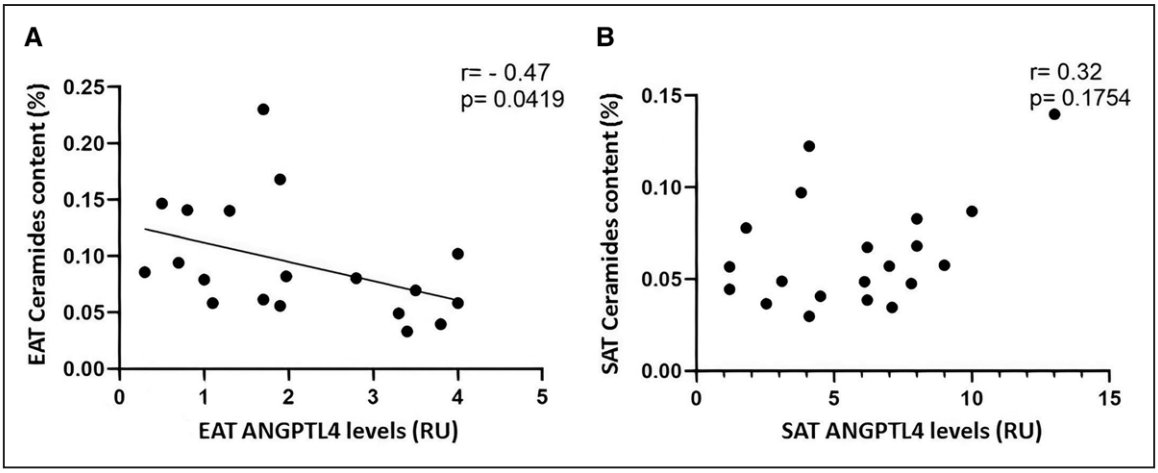


Figure 2. Correlations between ceramide content and ANGPTL4 (angiopoietin-like 4) levels in epicardial adipose tissue (EAT) and subcutaneous adipose tissue (SAT; n=39, 25 coronary artery disease [CAD] patients and 14 no CAD patients).
RU indicates Relative Units. **A**, EAT; **B**, SAT.

C16:0 to ceramides d18:1/C24:0 ratio a better CAD predictor.[35,42] In addition, other risk ratios have been proposed, such as ceramides d18:1/C18:0 and ceramides d18:1/C24:1 versus ceramides d18:1/C24:0 as markers of cardiovascular event, cardiovascular death, or overall death.[33,34] In our study, the finding of high ceramide levels in EAT, as well as the increased ceramides 18:1/16:0 to ceramides 18:1/24:0 and ceramides 18:1/24:1 to ceramide 18:1/24:0 ratios are highly informative, and the flux of these sphingolipids from EAT toward the intima is a new possibility to consider. Besides, in line with this, in our study, the ratio ceramides 18:1/24:1 to ceramide 18:1/24:0 in EAT was directly associated with LPL activity and GPIHBP1 levels in the tissue, and negatively with ANGPTL4, proposing an effect of these indexes not only on LPL activity but also on its post-translational regulators, or vice versa. Besides, despite the higher expression of PPARγ observed in EAT, in accordance with previous reports from our laboratory,[10] this transcription factor was not associated with ceramides atherogenic indexes.

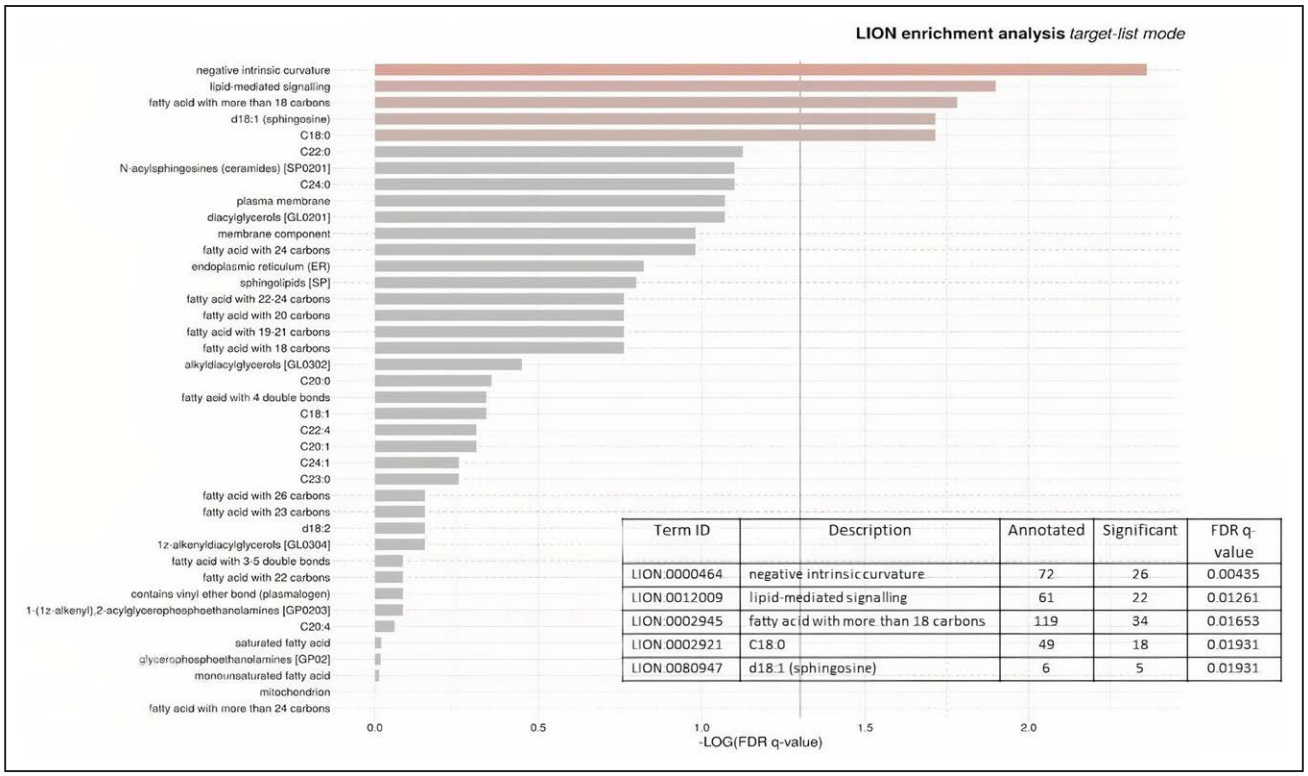


Figure 3. Lipid ontology (LION)–term all lipids enrichment analysis of coronary artery disease (CAD) versus non-CAD patients
Epicardial adipose tissue (EAT). The gray vertical lines indicate the cutoff value of significant enrichments ($Q<0.05$). Bar colors are scaled with the enrichment (–log Q values) Orange bars are considered significant. FDR indicates false discovery rate.

Downloaded from http://ahajournals.org by on April 11, 2024

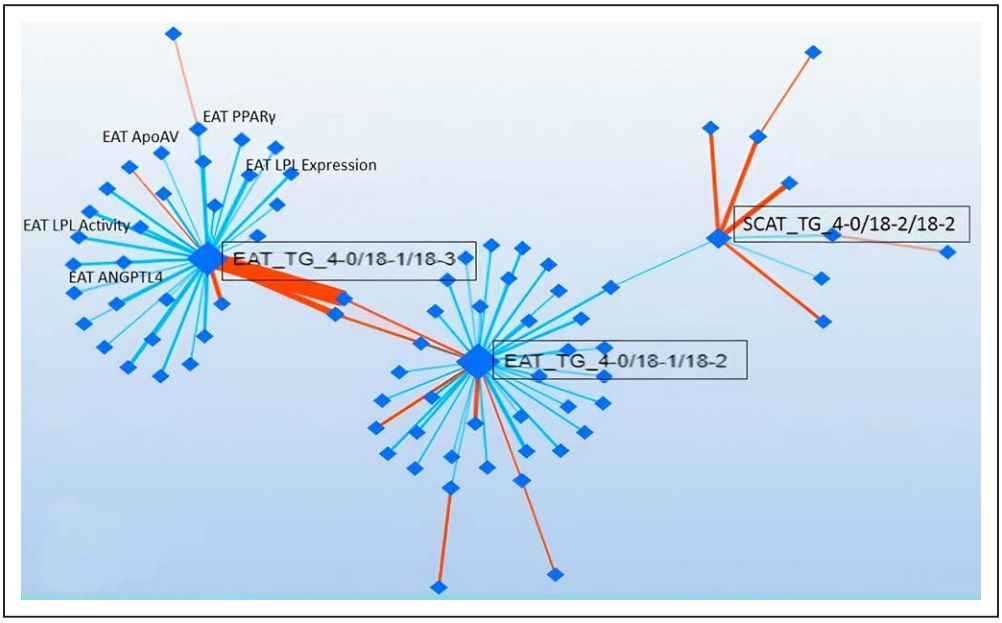


Figure 4. Network pairwise partial correlation relationships between all the parameters.
Red lines indicate direct relations, blue lines indicate indirect relations. ANGPTL4 indicates angiopoietin-like 4; EAT, epicardial adipose tissue; LPL, lipoprotein lipase; and PPARγ, peroxisomal proliferator activated receptor γ.

Further studies are necessary to finally elucidate the role of PPARγ in EAT and its relation with ceramides in the tissue.

Although FAs released by LPL mostly undergo triglyceride synthesis in adipose tissue, the increase in ceramides content and its association with LPL activity in EAT observed in this study is challenging.

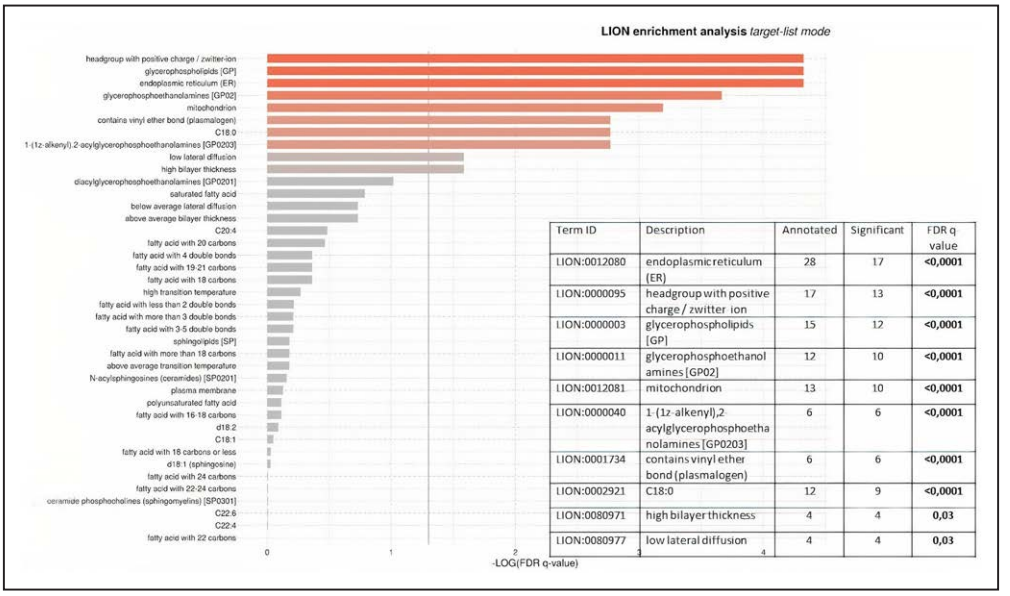
Currently, there are no data about the link between LPL and ceramides in EAT. In fact, there is scarce information about this association in other tissues or organs. Laperrousaz et al[20] described that the partial deletion of LPL in mediobasal hypothalamus in mice led to a decrease in ceramides content. On the contrary, Picard et al[22] showed that decreased LPL activity in the hippocampus was associated with increased de novo ceramide synthesis. In line with this, it was demonstrated that astrocytic LPL deficiency triggered increased ceramide content.[21] Taking these data into account, ceramides and LPL relation is controversial and challenging. In our study, a direct association between total ceramides and LPL activity was observed in EAT, along with an inverse association with the enzyme inhibitor ANGPTL4. This result sheds light on 2 possible scenarios: either LPL would be promoting the influx of FAs to EAT, which could be delivered to ceramides synthesis, or ceramides could be regulating LPL activity through ANGPTL4. Nevertheless, any of these possibilities are related to a more deleterious EAT metabolic profile, contributing to CVD risk. The association between LPL activity and other bioactive lipids such as diglycerides, highlights, even more, the importance of LPL contributing to the deleterious phenotype of EAT in CAD. As an additional comment, butyrate (C4:0) is not usually reported in adipose tissue triglycerides, but rather in milk-fat triglycerides. It may actually occur from the bacterial activity from fiber degradation in the gut. It can influence adipose tissue lipogenesis, including LPL and PPARγ.[45] Accordingly, we describe that triglycerides bearing butyrate have a hub position in the network, highlighting a possible important regulatory role.

In previous studies, we reported that EAT was enriched in plasmalogens, which could be implicated in brown activation of EAT through the regulation of mitochondrial dynamics.[15] Supporting this previous finding, we now demonstrated the importance of endoplasmic reticulum and mitochondrion pathways in EAT, both organelles implicated in plasmalogens synthesis and activity.[46]

The importance of our results lies in the fact that they add metabolic information to previous genome-wide association studies, in which ceramides metabolism and LPL-associated genes were related to CVD risk.[14] Furthermore, a recent study reported that CAD was associated with ABCA1 (ATP-binding cassette A1) and ABCG1 (ATP-binding cassette sub-family G member 1) DNA hypermethylation in EAT. Besides, CAD with concomitant carotid artery disease or peripheral artery disease was accompanied by decreased ABCA1 gene expression in EAT, indicating that the process of reverse cholesterol transport may be also impaired in EAT of CAD patients.[47]

Our study has some potential limitations. First, the number of patients was rather small, nevertheless, it must be taken into account the difficulty to obtain human EAT samples; besides, rigorous exclusion criteria were applied. Second, this was an observational study, so no mechanistic conclusions can be established from the obtained results. Third, it would have been very valuable to have the information on HbA1c (glycated hemoglobin) as a

Downloaded from http://ahajournals.org by on April 11, 2024



Term ID	Description	Annotated	Significant	FDR q value
LION:0012080	endoplasmic reticulum (ER)	28	17	<0,0001
LION:0000095	headgroup with positive charge / zwitter ion	17	13	<0,0001
LION:0000003	glycerophospholipids [GP]	15	12	<0,0001
LION:0000011	glycerophosphoethanol amines [GP02]	12	10	<0,0001
LION:0012081	mitochondrion	13	10	<0,0001
LION:0000040	1-(1z-alkenyl),2-acylglycerophosphoetha nolamines [GP0203]	6	6	<0,0001
LION:0001734	contains vinyl ether bond (plasmalogen)	6	6	<0,0001
LION:0002921	C18:0	12	9	<0,0001
LION:0080971	high bilayer thickness	4	4	0,03
LION:0080977	low lateral diffusion	4	4	0,03

Figure 5. Lipid ontology (LION)–term without triglyceride lipids enrichment analysis of epicardial adipose tissue versus subcutaneous adipose tissue.
The gray vertical lines indicate the cutoff value of significant enrichments ($Q<0.05$). Bar colors are scaled with the enrichment (–log Q values). Orange bars are considered significant. FDR indicates false discovery rate.

glycemic control of the patients. Finally, it is future challenge to have the information on LPL activity related to the adipocyte size, beyond the mass of the tissue.

In conclusion, our study demonstrates that lipidomics enables deeper insights into the EAT metabolism and its harmful profile in the context of CAD. This might help guide future biomarker and drug target discovery for disease treatment and prevention.

ARTICLE INFORMATION

Received December 23, 2021; accepted May 31, 2022.

Affiliations

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Departamento de Bioquímica Clínica, Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Buenos Aires, Argentina (M.B., L.S., G.B.). Aix-Marseille University, INSERM, INRAE, C2VN, France (P.A., E.D., L.S., A.D., J.C.M., B.G.). Endocrinology, Metabolic Diseases and Nutrition Department, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, France (A.D., B.G.). CRIBIOM, Criblage Biologique Marseille, Faculté de Medecine de la Timone, France (L.S.). Universidad de Buenos Aires, CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Argentina (M.B., V.M., G.B.). Universidad de Buenos Aires, Hospital de Clínicas "José de San Martín", División de Cirugía Cardiovascular, Argentina (D.Y., M.R.). Servicio de Docencia e Investigación, Hospital Central de Formosa, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Formosa, Argentina (J.P.N.).

Acknowledgments

The authors thank Dr Katsuyuki Nakajima for his collaboration in ApoAV measurement.

Sources of Funding

This work was supported by the Agencia Nacional de Promoción Científca y Tecnológica (Grant number: PICT 0930-2019), the Universidad de Buenos Aires (Grant number: UBACYT 20020190100033BA).

Disclosures

None.

Supplemental Material

Figures S1–S4
Tables S1–S3

REFERENCES

1. Powell-Wiley TM, Poirier P, Burke LE, Després JP, Gordon-Larsen P, Lavie CJ, Lear SA, Ndumele CE, Neeland IJ, Sanders P, et al; American Heart Association Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Council on Epidemiology and Prevention; and Stroke Council. Obesity and cardiovascular disease: a scientific statement from the american heart association. *Circulation*. 2021;143:e984–e1010. doi: 10.1161/CIR.0000000000000973
2. Gaborit B, Sengenes C, Ancel P, Jacquier A, Dutour A. Role of epicardial adipose tissue in health and disease: a matter of fat? *Compr Physiol*. 2017;7:1051–1082. doi: 10.1002/cphy.c160034
3. Mahabadi AA, Berg MH, Lehmann N, Kälsch H, Bauer M, Kara K, Dragano N, Moebus S, Jöckel KH, Erbel R, et al. Association of epicardial fat with cardiovascular risk factors and incident myocardial infarction in the general population: the Heinz Nixdorf Recall Study. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61:1388–1395. doi: 10.1016/j.jacc.2012.11.062
4. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, Sarov-Blat L, O'Brien S, Keiper EA, Johnson AG, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 2003;108:2460–2466. doi: 10.1161/01.CIR.0000099542.57313.C5
5. Iacobellis G. Local and systemic effects of the multifaceted epicardial adipose tissue depot. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11:363–371. doi: 10.1038/nrendo.2015.58
6. Berg G, Miksztowicz V, Morales C, Barchuk M. Epicardial Adipose Tissue in Cardiovascular Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1127:131–143. doi: 10.1007/978-3-030-11488-6_9
7. Rabkin SW. Epicardial fat: properties, function and relationship to obesity. *Obes Rev*. 2007;8:253–261. doi: 10.1111/j.1467-789X.2006.00293.x
8. Miksztowicz V, Morales C, Barchuk M, López G, Póveda R, Gelpi R, Schreier L, Rubio M, Berg G. Metalloproteinase 2 and 9 activity increase in epicardial adipose tissue of patients with coronary artery disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 2017;15:135–143. doi: 10.2174/1570161114666161024124244
9. Aitken-Buck HM, Moharram M, Babakr AA, Reijers R, Van Hout I, Fomison-Nurse IC, Sugunesegran R, Bhagwat K, Davis PJ, Bunton RW, et al. Relationship between epicardial adipose tissue thickness and epicardial

Downloaded from http://ahajournals.org by on April 11, 2024

adipocyte size with increasing body mass index. *Adipocyte*. 2019;8:412–420. doi: 10.1080/21623945.2019.1701387
10. Barchuk M, Schreier L, López G, Cevey A, Baldi J, Fernandez Tomé MDC, Goren N, Rubio M, Miksztowicz V, Berg G. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 and angiopoietin-like protein 4 are associated with the increase of lipoprotein lipase activity in epicardial adipose tissue from diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2019;288:51–59. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.915
11. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297:E271–E288. doi: 10.1152/ajpendo.90920.2008
12. Miksztowicz V, Schreier L, McCoy M, Lucero D, Fassio E, Billheimer J, Rader DJ, Berg G. Role of SN1 lipases on plasma lipids in metabolic syndrome and obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:669–675. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.303027
13. Barchuk M, Miksztowicz V, Zago V, Cevey A, López G, Goren N, Friedman S, Gelpi RJ, Morales C, Fernandez Tomé MDC, et al. Endothelial lipase is an alternative pathway for fatty acid release from lipoproteins: evidence from a high fat diet model of obesity in rats. *Lipids*. 2018;53:993–1003. doi: 10.1002/lipd.12107
14. Tabassum R, Ripatti S. Integrating lipidomics and genomics: emerging tools to understand cardiovascular diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78:2565–2584. doi: 10.1007/s00018-020-03715-4
15. Barchuk M, Dutour A, Ancel P, Svilar L, Miksztowicz V, Lopez G, Rubio M, Schreier L, Nogueira JP, Valéro R, et al. Untargeted lipidomics reveals a specific enrichment in plasmalogens in epicardial adipose tissue and a specific signature in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40:986–1000. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.313955
16. Pezeshkian M, Noori M, Najjarpour-Jabbari H, Abolfathi A, Darabi M, Darabi M, Shaaker M, Shahmohammadi G. Fatty acid composition of epicardial and subcutaneous human adipose tissue. *Metab Syndr Relat Disord*. 2009;7:125–131. doi: 10.1089/met.2008.0056
17. Pezeshkian M, Mahtabipour MR. Epicardial and subcutaneous adipose tissue Fatty acids profiles in diabetic and non-diabetic patients candidate for coronary artery bypass graft. *Bioimpacts*. 2013;3:83–89. doi: 10.5681/bi.2013.004
18. Błachnio-Zabielska AU, Baranowski M, Hirnle T, Zabielski P, Lewczuk A, Dmitruk I, Górski J. Increased bioactive lipids content in human subcutaneous and epicardial fat tissue correlates with insulin resistance. *Lipids*. 2012;47:1131–1141. doi: 10.1007/s11745-012-3722-x
19. Tomášová P, Čermáková M, Pelantová H, Vecka M, Kratochvílová H, Lipš M, Lindner J, Ivák P, Netuka I, Šedivá B, et al. Lipid Profiling in Epicardial and Subcutaneous Adipose Tissue of Patients with Coronary Artery Disease. *J Proteome Res*. 2020;19:3993–4003. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00269
20. Laperrousaz E, Denis RG, Kassis N, Contreras C, López M, Luquet S, Cruciani-Guglielmacci C, Magnan C. Lipoprotein lipase expression in hypothalamus is involved in the central regulation of thermogenesis and the response to cold exposure. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:103. doi: 10.3389/fendo.2018.00103
21. Gao Y, Vidal-Itriago A, Kalsbeek MJ, Layritz C, García-Cáceres C, Tom RZ, Eichmann TO, Vaz FM, Houtkooper RH, van der Wel N, et al. Lipoprotein Lipase Maintains Microglial Innate Immunity in Obesity. *Cell Rep*. 2017;20:3034–3042. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.008
22. Picard A, Rouch C, Kassis N, Moullé VS, Croizier S, Denis RG, Castel J, Coant N, Davis K, Clegg DJ, et al. Hippocampal lipoprotein lipase regulates energy balance in rodents. *Mol Metab*. 2014;3:167–176. doi: 10.1016/j.molmet.2013.11.002
23. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, Byrne RA, Collet JP, Falk V, Head SJ, et al; ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 2019;40:87–165. doi: 10.1093/eurheartj/ehy394
24. American Diabetes Association 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2019. *Diabetes Care*. 2019;42:S13–S28. doi:10.2337/dc19-S002
25. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951;193:265–275.
26. Nilsson-Ehle P, Ekman R. Rapid, simple and specific assay for lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Artery*. 1977;3:194–209.
27. Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TV, Shevchenko A, Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res*. 2008;49:1137–1146. doi: 10.1194/jlr.D700041-JLR200
28. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2019;68:e86. doi: 10.1002/cpbi.86
29. Martijn R. Molenaar, Aike Jeucken, Tsjerk A. Wassenaar, Chris H. A. van de Lest, Jos F. Brouwers, J. Bernd Helms. LION/web: a web-based ontology enrichment tool for lipidomic data analysis). *Gigascience*. 2019;8: giz061. doi: 10.1093/gigascience/giz061
30. Wu SA, Kersten S, Qi L. Lipoprotein lipase and its regulators: an unfolding story. *Trends Endocrinol Metab*. 2021;32:48–61. doi: 10.1016/j.tem.2020.11.005
31. Basu D, Goldberg IJ. Regulation of lipoprotein lipase-mediated lipolysis of triglycerides. *Curr Opin Lipidol*. 2020;31:154–160. doi: 10.1097/MOL.0000000000000676
32. Kersten S. Role and mechanism of the action of angiopoietin-like protein ANGPTL4 in plasma lipid metabolism. *J Lipid Res*. 2021;62:100150. doi: 10.1016/j.jlr.2021.100150
33. Zelnik ID, Kim JL, Futerman AH. The complex tail of circulating sphingolipids in atherosclerosis and cardiovascular disease. *J Lipid Atheroscler*. 2021;10:268–281. doi: 10.12997/jla.2021.10.3.268
34. Leiherer A, Mündlein A, Laaksonen R, Lääperi M, Jylhä A, Fraunberger P, Drexel H. Comparison of recent ceramide-based coronary risk prediction scores in cardiovascular disease patients. *Eur J Prev Cardiol*. 2021;29:947–956. doi: 10.1093/eurjpc/zwab112
35. Hilvo M, Meikle PJ, Pedersen ER, Tell GS, Dhar I, Brenner H, Schöttker B, Lääperi M, Kauhanen D, Koistinen KM, et al. Development and validation of a ceramide- and phospholipid-based cardiovascular risk estimation score for coronary artery disease patients. *Eur Heart J*. 2020;41:371–380. doi: 10.1093/eurheartj/ehz387
36. Jiang J, Shi Y, Cao J, Lu Y, Sun G, Yang J. Role of ASM/Cer/TXNIP signaling module in the NLRP3 inflammasome activation. *Lipids Health Dis*. 2021;20:19. doi: 10.1186/s12944-021-01446-4
37. Aburasayn H, Al Batran R, Ussher JR. Targeting ceramide metabolism in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;311:E423–E435. doi: 10.1152/ajpendo.00133.2016
38. Gao D, Pararasa C, Dunston CR, Bailey CJ, Griffiths HR. Palmitate promotes monocyte atherogenicity via de novo ceramide synthesis. *Free Radic Biol Med*. 2012;53:796–806. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.026
39. Li W, Yang X, Xing S, Bian F, Yao W, Bai X, Zheng T, Wu G, Jin S. Endogenous ceramide contributes to the transcytosis of oxLDL across endothelial cells and promotes its subendothelial retention in vascular wall. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:823071. doi: 10.1155/2014/823071
40. Schissel SL, Tweedie-Hardman J, Rapp JH, Graham G, Williams KJ, Tabas I. Rabbit aorta and human atherosclerotic lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low-density lipoprotein. Proposed role for arterial-wall sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation of atherogenic lipoproteins. *J Clin Invest*. 1996;98:1455–1464. doi: 10.1172/JCI118934
41. Marathe S, Schissel SL, Yellin MJ, Beatini N, Mintzer R, Williams KJ, Tabas I. Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J Biol Chem*. 1998;273:4081–4088. doi: 10.1074/jbc.273.7.4081
42. Laaksonen R, Ekroos K, Sysi-Aho M, Hilvo M, Vihervaara T, Kauhanen D, Suoniemi M, Hurme R, März W, Scharnagl H, et al. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur Heart J*. 2016;37:1967–1976. doi: 10.1093/eurheartj/ehw148
43. ChengJM,SuoniemiM,KardysI,VihervaaraT,deBoerSP,AkkerhuisKM,Sysi-AhoM, Ekroos K, Garcia-Garcia HM, Oemrawsingh RM, et al. Plasma concentrations of molecular lipid species in relation to coronary plaque characteristics and cardiovascular outcome: Results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Atherosclerosis*. 2015;243:560–566. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.022
44. Saleem M, Herrmann N, Dinoff A, Marzolini S, Mielke MM, Andreazza A, Oh PI, Vattem Venkata SL, Haughey NJ, Lanctôt KL. Association between sphingolipids and cardiopulmonary fitness in coronary artery disease patients undertaking cardiac rehabilitation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020;75:671–679. doi: 10.1093/gerona/gly273
45. Yan H, Ajuwon KM. Mechanism of butyrate stimulation of triglyceride storage and adipokine expression during adipogenic differentiation of porcine stromovascular cells. *PLoS One*. 2015;10:e0145940. doi: 10.1371/journal.pone.0145940
46. Park H, He A, Lodhi IJ. Lipid regulators of thermogenic fat activation. *Trends Endocrinol Metab*. 2019;30:710–723. doi: 10.1016/j.tem.2019.07.020
47. Miroshnikova VV, Panteleeva AA, Pobozheva IA, Razgildina ND, Polyakova EA, Markov AV, Belyaeva OD, Berkovich OA, Baranova EI, Nazarenko MS, et al. ABCA1 and ABCG1 DNA methylation in epicardial adipose tissue of patients with coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord*. 2021;21:566. doi: 10.1186/s12872-021-02379-7

Downloaded from http://ahajournals.org by on April 11, 2024