Altérations du tissu adipeux chez les patients infectés par le VIH traités par des antirétroviraux

A. Infection par le VIH et impact sur le tissu adipeux

1) Origine et histoire naturelle de la maladie

L'infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) est une pandémie mondiale dont les premiers cas ont été détectés en Californie et à New-York dans le début des années 1980. Le virus du VIH est responsable du SIDA (Syndrome de l'immunodéficience Acquise), stade ultime de la maladie, favorisant le développement de pathologies opportunistes comme le sarcome de Kaposi ou la tuberculose, mais aussi des syndromes généralisés comme des pneumonies et des lymphadénopathies (Rolston and Bodey 1986). Le virus a été isolé pour la première fois en 1983 par Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier (Barre-Sinoussi et al. 1983).

a) Origine du virus et épidémiologie

Le VIH est un <u>rétrovirus</u> du genre des lentivirus (Briggs et al. 2003). L'ancêtre du VIH est le VIS (Virus de l'Immunodéficience Simienne), qui infecte les grands primates. L'épidémie a débuté en République Démocratique du Congo dans les années 1920-1930 et se serait propagée dans le monde à partir du port de Kinshasa (Faria et al. 2014).

Deux types de virus se côtoient : le <u>VIH-1 et le VIH-2</u> qui diffèrent selon le mécanisme de pathogénie rétrovirale qui reste encore à clarifier.

Le VIH-2 est moins virulent que le VIH-1 et touche une plus petite population, principalement en Afrique. Au sein du type VIH-1, le plus fréquent, il existe différents groupes (Sharp and Hahn 2011). Le groupe M touche 40 millions de personnes et se retrouve partout à travers le monde. Plusieurs facteurs expliquent cette pandémie : l'évolution lente de la maladie, la capacité du virus à muter fréquemment et à échapper aux défenses immunitaires notamment en inhibant l'action des facteurs de restriction de la réplication virale. De plus, il n'existe pas de symptômes spécifiques en début d'infection et le stade SIDA se développe plusieurs années après la contamination.

b) Histoire naturelle de l'infection

L'histoire naturelle de la maladie débute par une contamination par transmission sanguine, sexuelle ou de la mère à l'enfant (*in utero*, pendant l'accouchement ou l'allaitement). Le virus infecte les lymphocytes T CD4+ ainsi que les macrophages et se répand dans l'organisme.

La **primo-infection** est une période d'environ 3 semaines pendant laquelle le virus se réplique abondamment et infecte de nombreux lymphocytes T CD4+, conduisant à une charge virale élevée (Simon and Ho 2003) (Figure 15). Une déplétion importante des lymphocytes T CD4+ est observée et plus de 10¹⁰ nouveaux virions sont produits par jour. Un état grippal avec de la fièvre et des adénopathies peuvent être des symptômes non spécifiques.

Entre trois et neuf semaines, le <u>syndrome du VIH aigu</u> peut se présenter. Le virus a alors une réplication maximale et se dissémine dans les tissus et les organes lymphoïdes (Fauci et al. 1996). Le système immunitaire est activé, des anticorps spécifiques anti-VIH sont produits et sont détectables dans le sérum durant toute l'infection (séropositivité). En parallèle, une réponse de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques dirigés contre le virus se met en place ainsi qu'une sécrétion d'anticorps neutralisants permettant la diminution de la charge virale (Fauci 2003, Bouvin-Pley et al. 2013).

Ensuite, sans traitement ARV, survient la <u>période de latence</u> qui dure huit à dix ans au maximum. La charge virale est stable et le nombre des lymphocytes T CD4+ est maintenu grâce à un renouvellement plus important. Le virus se réplique peu sous la pression de la réponse immunitaire et est majoritairement sous forme latente dans ses réservoirs tissulaires.

Puis, arrive le moment où le taux de CD4+ et le système immunitaire ne contiennent plus la réplication du virus. Le <u>stade SIDA</u> est atteint lorsque que le taux de lymphocytes T CD4+ est inférieur à 200 cellules/ μ L. La personne est dite immunodéprimée et les infections opportunistes peuvent alors se développer.



Figure 15 : Schéma de l'histoire naturelle de l'infection par le VIH adapté de (Fauci et al. 1996).

Avec les ARV, le nombre de CD4+ est maintenu et la charge virale reste faible et stable même si le virus est toujours présent sous forme latente. La production du virus est contrôlée par les ARV qui ciblent différentes étapes de la réplication du VIH.

La majorité des personnes infectées par le VIH sont des **progresseurs typiques** c'est-à-dire des individus avec une charge virale élevée et un nombre de lymphocytes T CD4+ bas sans traitement. Il existe une population de patients infectés par le VIH qui contrôle spontanément le virus. Les non progresseurs à long terme ou <u>élite contrôleurs</u> du VIH représentent moins de 1% des patients VIH. Ils ont une charge virale indétectable en l'absence d'ARV et gardent un taux élevé de lymphocytes T CD4+ même après des années d'infection par le VIH (Noel et al. 2019). Cette population est très intéressante pour comprendre comment leur système immunitaire fonctionne afin de contrôler le virus et potentiellement donner des pistes pour d'autres traitements ou pour un vaccin.

2) Modèles animaux d'infection VIH

Les <u>rongeurs</u> sont des modèles peu utilisés dans la recherche sur le VIH/SIDA. Seul un modèle complexe de souris avec un système immunitaire humanisé peut être infecté par le VIH (Denton and Garcia 2011). Cependant, des modèles transgéniques exprimant de façon constitutive une partie du génome ou une protéine du VIH permettent d'étudier les mécanismes physiopathologiques du virus. Par exemple, la souris Tg26 qui expriment une partie du génome viral sans le gène gag-pol (Villarroya et al. 2010) et la souris qui exprime Vpr (Agarwal et al. 2013) ont notamment été utilisées pour décrire leurs effets sur le métabolisme et le TA.

Les primates non humains sont des modèles privilégiés pour étudier les infections en particulier celle du VIH. 98% de leur génome est commun avec celui de l'homme. Ces modèles permettent l'étude de la capacité du virus à muter et à échapper au système immunitaire, des dysfonctions immunitaires, de la réplication et de la latence virale dans les réservoirs tissulaires.

Les macaques verts d'Afrique sont les hôtes naturels du VIS. Ils peuvent néanmoins avoir une charge virale élevée, une diminution des lymphocytes T CD4+ et une activation du système immunitaire en phase aigüe lorsqu'ils sont infectés mais leurs cellules immunitaires répondent et contrôlent le virus. Ce modèle est intéressant pour comprendre la réponse immunitaire efficace contre la progression de la maladie.

Les macaques d'Asie ne sont pas des porteurs sains du VIS et développent un stade SIDA avec la souche VISmac.

Les trois modèles majoritairement utilisés dans la recherche sur le VIH/SIDA sont le macaque nain (*macaca nemestrina*), le macaque rhésus (*macaca mulatta*) et le macaque cynomolgus (*macaca fascicularis*) (Hatziioannou and Evans 2012). La progression et la pathologie de la maladie varient selon les espèces et la souche du virus utilisée. Le macaque rhésus, d'origine indienne, est le modèle le plus répandu en recherche et évolue vers un stade SIDA entre un et

deux ans post-infection. SIVmac251 et SIVmac239 sont deux souches de virus majoritairement utilisées et isolées de macaque rhésus qui induisent chez l'hôte une charge virale élevée. Le **macaque cynomolgus** également appelé macaque crabier vit en Asie du Sud-Est notamment sur l'île Maurice et en Indonésie. C'est un bon modèle pour étudier l'infection chronique du virus car la pathogenèse du VIS est moins sévère que chez le macaque rhésus. Ce dernier a une virémie plasmatique plus faible, une perte plus lente du taux de lymphocytes T CD4+ et un maintien de la réponse immunitaire (Reimann et al. 2005).

Les modèles primates permettent donc d'étudier la pathogenèse du virus, la réplication virale ainsi que la transmission et sont des modèles précliniques pour les vaccins et les microbicides.

3) Structure et réplication du VIH

a) Génome du VIH-1

Le VIH-1 est un virus à ARN double brin d'environ 145 nm de diamètre (Briggs et al. 2003). Son génome de 9,7 kb est flanqué de deux régions LTR (*long term repeats*). Il est composé de 9 gènes qui codent pour neuf protéines : trois protéines précurseurs structurales (Gag, Pol et Env), deux protéines régulatrices (Tat et Rev) et quatre protéines accessoires : Nef, Vif, Vpr et Vpu (Figure 16). Le VIH-2 et le VIS expriment les mêmes protéines que le VIH-1 à l'exception de Vpu. Vpu est exprimée par quelques souches du VIS alors qu'une autre protéine Vpx est exprimée par le VIH-2 et le VIS.



Figure 16 : Génome du VIH codant pour neuf protéines virales adaptée de (Prokofjeva et al. 2016).

b) Cycle de réplication

Le VIH se réplique au sein de ses cellules cibles qui co-expriment le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 (exprimé par les lymphocytes T CD4+ mémoires effectrices, les monocytes/macrophages) ou CXCR4 (exprimé par les lymphocytes T CD4+ naïfs). Le virus a plus d'affinité pour les cellules immunitaires activées et infecte préférentiellement les lymphocytes T CD4+ mémoires (Chomont et al. 2009, Yukl et al. 2013, Soriano-Sarabia et al. 2014, von Stockenstrom et al. 2015). Par ailleurs, le VIH-1 infecte d'avantage les lymphocytes T folliculaires *helper* situés dans les ganglions et les Treg chez les patients sous ARV (Tran et al. 2008, Lindqvist et al. 2012). Le VIH infecte d'avantage les lymphocytes T CD4+ que les macrophages. Les macrophages disposent d'une plus faible concentration de dNTP nécessaires à la transcription inverse de l'ARN viral en ADN proviral (Diamond et al. 2004). Cependant, au cours de la progression de l'infection, la déplétion de lymphocytes T CD4+ est associée à une augmentation du nombre de macrophages infectés qui produisent de nouveaux virions (Smith et al. 2003).

Le cycle de réplication virale se fait en plusieurs étapes (Figure 17) (Prokofjeva et al. 2016) :

1) <u>L'entrée et la fusion</u> : les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH, Gp120 et Gp41, se lient aux CD4 exprimés par les lymphocytes T CD4+ et les macrophages. Puis Gp120 change de conformation afin que le complexe Gp120/CD4 se lie au co-récepteur CCR5 ou CXCR4. La glycoprotéine Gp41 s'insère dans la membrane, entrainant la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique. La capside virale se déverse alors dans la cellule hôte (Araujo and Almeida 2013).

2) <u>La transcription inverse</u> : l'ARN proviral est rétrotranscrit en ADN double brin par la transcriptase inverse. Puis, le complexe de préintégration (PIC) comprenant entre autres l'intégrase et la transcriptase inverse virale se forme. La protéine accessoire Vpr participe à l'importation nucléaire du PIC *via* sa séquence NLS (*nuclear localisation signal*).

3) <u>L'intégration de l'ADN proviral</u> au génome de la cellule infectée est réalisée à l'aide de l'intégrase. Celle-ci hydrolyse l'ADN nucléaire de façon non spécifique réalise la ligation avec les extrémités LTR de l'ADN proviral.

4) La transcription et la traduction du virus s'effectuent grâce à la machinerie cellulaire. La transcription est favorisée par Tat, qui augmente la processivité de l'ARN polymérase cellulaire grâce au recrutement de facteurs de transcription comme le facteur d'élongation P-TEFb. Les ARNm viraux sont obtenus grâce à différents types d'épissage alternatif. Par ailleurs, la polyadénylation des ARNm viraux en 3' assure leur stabilité lors de la transcription (Swanson and Malim 2008). Dans la phase précoce, l'épissage à deux sites permet d'obtenir un ARN codant pour les protéines accessoires : Vpr, Vpu, Vif et les protéines régulatrices Tat et Rev. L'épissage alternatif sur un seul site permet d'obtenir les ARN codants pour le précurseur des protéines de l'enveloppe Env et une protéine accessoire, Nef. Dans la phase tardive, l'ARN non épissé est transcrit à partir du promoteur pour les gènes gag et pol. La traduction des ARNm viraux en protéines est réalisée par la machinerie cellulaire. La protéase joue un rôle de maturation en clivant le précurseur pol des enzymes indispensables à la réplication virale qui vont constituer le virion : la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase. La protéase du VIH clive également le précurseur protéique gag en Gp120 et Gp41.

5) L'assemblage de la particule virale est régulée par Vpu et Vif.

6) Le virion immature <u>bourgeonne</u> alors à partir de la membrane plasmique de la cellule infectée sous le contrôle de Vpu. Le virion devient mature et infectieux lorsque la protéase agit à nouveau et clive les précurseurs gag et gag-pol (Freed 2015).



Figure 17 : Schéma du cycle réplicatif du virus adapté de C. Lagathu.

Parallèlement à la production de nouveaux virions, la cellule infectée sécrète des protéines virales comme Vpr, Tat, Gp120 ou Nef qui peuvent avoir des effets délétères sur des cellules avoisinantes non infectées. Ce phénomène est appelé effet « bystander » ou effet spectateur (Moon and Yang 2006, Raymond et al. 2011, Debaisieux et al. 2012, Rozzi et al. 2017).

4) Protéines du VIH

a) Protéines structurales

Le gène *Env* code pour un précurseur protéique, Gp160 qui subit une maturation dans le RE afin d'obtenir les glycoprotéines de l'enveloppe Gp120 et Gp41. Gp41 est transmembranaire tandis que Gp120 est une protéine de surface.

Les gènes *gag* et *pol* sont transcrits en précurseurs gag et gag-pol. Le précurseur protéique Gag p55 regroupe quatre protéines : p17 (ou MA), la matrice qui se lie à l'enveloppe virale, p24 (ou CA) qui constitue la capside, p7 (ou NC) qui constitue la nucléocapside et enfin p6 impliquée dans le bourgeonnement, dernière étape de la réplication virale. Gagp55 se lie à l'ARN viral, s'oligomérise et se fixe à la membrane plasmique *via* l'ancre myristoylée de MA. Les protéines p24 et p7 forment des multimères et l'ensemble constitue la capside immature (Bell and Lever 2013). Le précurseur gag-pol une fois clivé, produit les trois enzymes du VIH : la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase (Prokofjeva et al. 2016).

Les protéines sont localisées dans les différents compartiments de la particule virale. L'intégrase (IN ou p32) et la transcriptase inverse (RT ou p66/51) sont incluses avec l'ARN viral. Les protéines Vif, Vpr et Nef sont localisées dans la capside avec p24. p24 est détectable dans le sang et constitue un critère diagnostic (Cunningham et al. 1993). L'ARN est protégé par la nucléocapside p7. La protéase (PR ou p10) et p6 se situent entre la capside et la matrice. Enfin, l'enveloppe est composée de p17 et d'une membrane lipidique contenant les glycoprotéines Gp120 et Gp41 (Figure 18).



Figure 18 : Schéma de la structure d'un virion mature du VIH.

b) Les protéines régulatrices

La protéine <u>**Tat**</u> (*transactivator of transciption*) est une protéine de 16 kDa qui favorise la transcription en se liant au TAR (*trans-activation response*) en 5'LTR des ADN proviraux et à des facteurs de transcription comme P-TEF ou NF κ B. Le complexe TAR-Tat-P-TEFb recrute l'ARN polymerase II cellulaire (Debaisieux et al. 2012, Fiume et al. 2012, Prokofjeva et al. 2016). Tat favorise également l'infection virale en augmentant l'expression de CXCR4 et CCR5 dans les lymphocytes T CD4+ (Rayne et al. 2010, Rayne et al. 2010).

La protéine <u>Rev (*regulator of expression of virions proteins*)</u> joue un rôle dans la phase précoce de réplication en inhibant l'activité de l'intégrase *via* sa liaison avec son domaine LEDGF/p75. Rev empêche ainsi une genotoxicité avec des intégrations trop nombreuses de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte (Grewe and Uberla 2010). Rev se lie au RPE (*rev responsive element*) sur les ARNm viraux Gag, Gag-Pol et Env afin d'empêcher l'épissage de ces longs ARNm et d'induire leur exportation *via* son signal NES (*nuclear export signal*). Il augmente ainsi le nombre de copies d'ARNm traduits en protéines Gag, Pol et Env. Rev est également impliquée dans la formation de la capside contenant l'ARN viral au cours de la phase tardive du cycle de réplication (Grewe and Uberla 2010).

c) Les protéines accessoires

Les protéines accessoires sont indispensables à la pathogenèse du VIH *in vivo* (Malim and Emerman 2008).

La protéine Nef (Negative regulatory factor) favorise la pathogenèse du VIH (Dickie et al. 1993, Baba et al. 1999, Dickie 2000, Gorry et al. 2007). Nef augmente la production de virions en activant la transcription du VIH via l'activation de la voie ERK ou de régulateurs positifs comme IRF-2 (Simmons et al. 2001, Witte et al. 2008) et favorise la sécrétion de nouveaux virions infectieux (Ross et al. 1999). Sa concentration plasmatique est corrélée à la progression de l'infection du VIH et maintient la survie des cellules infectées (Jacob et al. 2017). Son expression est précoce et requise pour la réplication virale. Nef induit l'activation des cellules immunitaires, la réplication du virus et sa réactivation lorsqu'il est sous forme latente (Fujinaga et al. 1995, Gorry et al. 2007). Nef joue aussi un rôle dans l'échappement à la surveillance du système immunitaire. Il favorise l'endocytose de CD4 et CMH-1 à la surface des lymphocytes T CD4+ infectés (Garcia and Miller 1992, Schwartz et al. 1996, Wildum et al. 2006, Landi et al. 2011, Raymond et al. 2011). Cela évite la reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques mais aussi la surinfection d'une cellule déjà infectée, qui entrainerait sa mort prématurée. Lorsque Nef est myristoylée en N terminal, elle interagit avec les membranes cellulaires et des kinases possédant des domaines SH3 agissant ainsi sur le trafic intracellulaire (Pereira and daSilva 2016, Moroco et al. 2018). De plus, Nef séquestre aussi le facteur de restriction SERINC5, qui empêche l'entrée du virus dans une nouvelle cellule cible (Jacob et al. 2017).

La protéine <u>Vpr (*viral protein R*)</u> est exprimée tardivement. Vpr peut entrer dans les cellules librement et se localiser dans le cytosol, le noyau ou la mitochondrie. Elle est recrutée dans l'étape d'encapsidation en se liant à Gagp55. Après l'entrée du virus dans la cellule, Vpr est associée à l'ARN viral et permet l'import nucléaire du PIC (ADN viral et intégrase). Cependant, elle n'est pas indispensable pour la réplication du virus mais favorise l'infectivité virale dans les macrophages (Wang and Su 2019). Vpr favorise également l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2, phase où le promoteur LTR est le plus actif (Goh et al. 2004, Blondot et al. 2014, Liang et al. 2015).

La protéine <u>Vpx</u> (*viral protein x*) est une protéine présente dans le VIH-2 et le VIS (Apetrei et al. 2004). Cette protéine virale est essentielle pour l'infection des macrophages et des cellules dendritiques (Goujon et al. 2007, Westmoreland et al. 2014). Vpx, comme Vpr, adresse le PIC au noyau (Singhal et al. 2006). Elle permet également l'échappement contre les défenses de l'hôte au niveau des cellules immunitaires innées en inhibant notamment la voie NF κ B (Su et al. 2019).

La protéine <u>Vpu (*viral protein U*)</u> altère la réponse immune notamment en inhibant NF κ B dans les cellules infectées (Jain et al. 2018, Langer et al. 2019). Elle favorise la réplication virale *in vivo* en activant l'internalisation du CD4 (Wildum et al. 2006).

La protéine <u>Vif (viral infectivity factor)</u> est une protéine nécessaire à la réplication du VIH dans les lymphocytes T CD4+ et les macrophages. Elle constitue un facteur de virulence (Rose et al. 2004). Elle induit la poly-ubiquitination de APOBEC3G (*Apolipo- protein B mRNA-editing enzyme 3G*), un facteur de restriction, et l'adresse au protéasome. En l'absence de Vif, APOBEC3G est une désaminase qui induit des mutations de l'ADN proviral lors de la rétrotranscription (Feng et al. 2014, Ikeda et al. 2019).

5) Réservoirs et effets bystander des protéines virales

De nombreux tissus sont des <u>réservoirs du VIH</u> car ils contiennent des lymphocytes T CD4+ et des macrophages infectés. Parmi eux, se trouvent le tractus gastro-intestinal, la muqueuse gastrique, les ganglions lymphatiques, le tractus génital, le système nerveux central, le foie mais aussi la rate, la moelle osseuse et le TA. Le virus est alors sous forme latente ou se réplique faiblement (Ndung'u et al. 2019). Les cellules infectées produisent de nouveaux virions et sécrètent des protéines virales telles que Tat, Nef, Gp120 et Vpr (Giralt et al. 2011). Ces protéines induisent des altérations fonctionnelles dans les cellules infectées mais peuvent également entrer et avoir un impact dans les cellules avoisinantes non infectées. Ce phénomène est appelé « <u>effet bystander ou</u> <u>spectateur</u> ». Les protéines Tat, Nef ou Vpr sont des protéines retrouvées dans le sang des patients naïfs de traitement et sous ARV (Boya et al. 2004, Hoshino et al. 2007, Raymond et al. 2011, Ferdin et al. 2018). Les effets *bystander* sur les cellules avoisinantes non infectées T CD4+ non infectés. Les protéines telles que Tat, Nef, Gp120 et Vpr sont responsables de leur apoptose (Lenassi et al. 2010, Raymond et al. 2011, Richard et al. 2013, Jacob et al. 2017, Campestrini et al. 2018).

Les protéines Gp120, Tat et Nef induisent l'apoptose dans des types cellulaires autres que ceux du système immunitaire (Fiala et al. 2004, Acheampong et al. 2005, Dickens et al. 2017, Gupta et al. 2017, Rozzi et al. 2017). Elles peuvent induire la voie intrinsèque (diminution de Bcl-2 anti-apoptotique et activation des caspases) ou extrinsèque de l'apoptose (*via* Fas/FasL ou la sécrétion de TNF α) (Perl and Banki 2000, Muratori et al. 2009, Gibellini et al. 2011, Debaisieux et al. 2012, Garg and Joshi 2017, Rozzi et al. 2017).

Tat, Nef, Gp120 et Vpr peuvent également altérer les fonctions cellulaires du système immunitaire (Cerboni et al. 2007, Ward et al. 2009, Richard et al. 2010, Debaisieux et al. 2015), des vaisseaux (Gibellini et al. 2011, Hijmans et al. 2019, Agarwal et al. 2020) et du cerveau (Khan et al. 2016, Rozzi et al. 2017). Toutes ces altérations cellulaires participeraient aux comorbidités et perturbations cognitives observées chez les patients infectés par le VIH. Les protéines du VIH induisent également des altérations (stress oxydant, dysfonctions mitochondriales, altération de l'autophagie) associées à la sénescence cellulaire et cet aspect sera abordé dans le chapitre III.

6) Le tissu adipeux, une nouvelle cible du virus

Les atteintes du TA ont été originellement associées aux ARV chez les patients infectés par le VIH. La question du rôle propre du virus et des protéines virales au sein du TA a été quelque peu documentée et des questions mécanistiques subsistent.

a) Altérations du TA chez les patients naïfs de traitement

Au début de l'étude de l'infection du VIH, un phénomène de *wasting syndrome* ou cachexie a été observé chez les patients ayant une déplétion importante de lymphocytes T CD4+. Elle est

définie par une perte de poids de plus de 10% avec une perte de TA et de muscle (Rivera et al. 1998). Elle est associée à un déficit calorique, une diminution de l'absorption due aux perturbations gastro-intestinales, et à une augmentation du métabolisme énergétique basal résultant d'une augmentation du catabolisme protéique (Melchior et al. 1991, Sharpstone et al. 1996, Kotler 1998). Au niveau du TA, ce syndrome est caractérisé par une diminution de la taille des adipocytes. Plus tard, au stade SIDA, les femmes perdent davantage de TA périphérique tandis que les hommes perdent davantage de masse musculaire (Grinspoon et al. 1997).

Certains patients naïfs de traitements, qui ne sont pas au stade SIDA, présentent une redistribution (Madge et al. 1999) ou une perte de TA (Visnegarwala et al. 2005). Ces modifications de répartition peuvent être associées à des altérations fonctionnelles du TA, en particulier : une toxicité mitochondriale (Garrabou et al. 2011, Vidal et al. 2012), une diminution de l'expression des gènes adipogéniques, de stockage des lipides et des adipokines (PPAR γ , CEBP α , LPL, FABP4, leptine, adiponectine), et une augmentation de l'expression des cytokines inflammatoires (IL-6) (Giralt et al. 2006, Vidal et al. 2012). En accord, les concentrations plasmatiques d'adiponectine et de leptine sont diminuées (Das et al. 2006).

D'autres études ont été menées sur le TA de macaques infectés par le VIS et non traités. Le TA de ces animaux présente des désordres métaboliques similaires à ceux observés chez les patients infectés par le VIH, caractérisés par une activation des cellules immunitaires, une augmentation des cellules de la FSV, une hypertriglycéridémie, une augmentation de l'expression de cytokines et une diminution de l'expression de gènes adipogéniques (Damouche et al. 2015, Couturier et al. 2016). Par ailleurs, une étude intéressante montre qu'un régime hypergras exacerbe l'infiltration des cellules immunitaires dans le TA et la pathogenèse du VIS chez un modèle de macaques verts d'Afrique (He et al. 2019). De plus, la souris transgénique Tg26, exprimant une partie du génome du VIH, présente une diminution du TAV associée à une augmentation de l'inflammation locale et systémique, une diminution locale et circulante des concentrations de leptine et d'adiponectine (Villarroya et al. 2010). L'ensemble de ces données suggèrent donc que l'infection par le VIH peut être responsable par elle-même d'atteintes du TA.

En revanche, peu de travaux se sont intéressés aux mécanismes liés à l'impact du VIH sur le TA de patients infectés par le VIH ainsi qu'au rôle du virus et des protéines virales dans les atteintes du TA.

b) Le tissu adipeux, un réservoir longtemps négligé du VIH

Le TA est un tissu réservoir du VIH et du VIS (Couturier et al. 2015, Damouche et al. 2015, Couturier et al. 2016, Couturier and Lewis 2018). En effet, l'ADN et l'ARN du VIH ont été mesurés dans les lymphocytes T CD4+ et les macrophages chez les patients, et dans un modèle de macaque infecté par le VIS. Les lymphocytes T CD4+ et les macrophages sont plus activés chez les macaques infectés par rapport au groupe contrôle. Les lymphocytes T CD4+ cytotoxiques sont augmentés et proches des capillaires tandis que les lymphocytes T CD4+ résidents sont à distance et diminués dans le TASC et le TAV du modèle simien d'infection. De plus, ces lymphocytes T CD4+ infectés sont compétents pour la réplication virale (Damouche et al. 2015). La grande proportion de lymphocytes T CD4+ résidents mémoires dans le TA le rend d'autant plus susceptible au VIH (Couturier et al. 2015, Damouche et al. 2017). Cependant, une question subsiste. Les cellules non-immunitaires du TA comme les ASC ou les adipocytes peuvent-elles être infectées par le VIH. Par ailleurs, la biodistribution des ARV diffère au sein du TA selon leurs propriétés physico-chimiques ce qui module la persistance ou non du virus sous traitement ARV (Couturier et al. 2018).

7) Article 1: Impact of HIV/simian immunodeficiency virus infection and viral proteins on adipose tissue fibrosis and adipogenesis

Mon sujet de thèse a pour but de comprendre les mécanismes physiopathologiques des atteintes du TA liées au VIH et aux ARV. Nous avons donc étudié l'impact du VIH *in vivo* sur le TA issu de macaques ou de patients infectés et/ou traités, et *in vitro* sur des cellules souches adipeuses humaines (ASC) traitées par les protéines virales Tat et Nef. Ces études ont été possibles grâce à plusieurs collaborations. En collaboration avec l'équipe du Pr O Lambotte, le Dr C Bourgeois et le Pr R Le Grand, nous avons eu accès à un modèle de macaque infecté par le VIS. Les biopsies de patients infectés et traités ont été obtenues en collaboration avec le Pr V Pourcher et le Dr G Pourcher. Enfin, nous avons isolé les ASC à partir de liposuccion du TASC abdominal de donneurs sains en collaboration avec le Dr M Atlan.

a) Contexte de l'étude et résumé des résultats

Comme décrit plus haut, les patients infectés par le VIH naïfs de traitement présentent une redistribution et des altérations du TA (Visnegarwala et al. 2005, Giralt et al. 2006, Garrabou et al. 2011, Vidal et al. 2012) suggérant un rôle de l'infection VIH et des protéines virales dans les atteintes du TA. De plus, les patients infectés par le VIH présentent une fibrose du TA mais qui

n'a pas été caractérisée (Bastard et al. 2002, Utay et al. 2018). En revanche, dans un contexte d'obésité sans infection, la fibrose du TA a été bien documentée et les ASC y jouent un rôle clé (Divoux et al. 2010, Sun et al. 2013, Marcelin et al. 2017). Par ailleurs, les protéines virales comme Tat et Nef sont sécrétées par les cellules infectées et peuvent avoir des effets délétères dits *bystander* sur des cellules avoisinantes non infectées comme les ASC et les adipocytes (Raymond et al. 2011, Debaisieux et al. 2012). Nous avons donc émis l'hypothèse que le virus et les protéines virales induisent des atteintes du TA dont une accumulation de MEC et que cette dernière était produite en partie par les ASC.

Dans cette étude, nous avons montré que d'une part l'infection VIS/VIH mais aussi les protéines virales Tat et Nef, induisaient une fibrose accrue et une altération de l'adipogenèse. Le TA de macaques infectés par le VIS présentait des adipocytes plus petits et une expression génique de PPARG diminuée (facteur clef de l'adipogenèse), suggérant une dysfonction adipocytaire. Le TA de ces animaux présentait également une fibrose plus importante que celui des macaques non traités, avec un effet plus marqué dans le TASC par rapport au TAV. Cette fibrose était caractérisée par une augmentation de l'expression des collagènes I et VI, de la fibronectine et du TGF-B, un facteur majeur de la fibrose. Ces données ont été confirmées dans des prélèvements de TASC et de TAV de patients obèses infectés par le VIH et sous ARV. Afin de valider que le virus lui-même était responsable de la mise en place de cette fibrose dans le TA, nous avons mené des études in vitro sur des ASC. L'exposition des ASC aux protéines du VIH, Tat et Nef, favorisait l'acquisition d'un phénotype pro-fibrosant, caractérisé par l'expression de αSMA, de TGF-β et de différents composants de la MEC. Le traitement par Nef conduisait également à une baisse de la différenciation adipocytaire, caractérisée par une diminution du contenu en triglycérides et de l'expression de marqueurs adipogéniques, et accentuait la production de MEC dans des adipocytes différenciés in vitro dans un modèle original de culture en 3D.

Impact of HIV/simian immunodeficiency virus infection and viral proteins on adipose tissue fibrosis and adipogenesis

Jennifer Gorwood^a, Christine Bourgeois^b, Matthieu Mantecon^a, Michael Atlan^{a,c}, Valérie Pourcher^d, Guillaume Pourcher^e, Roger Le Grand^b, Delphine Desjardins^b, Bruno Fève^{a,f}, Olivier Lambotte^{b,g}, Jacqueline Capeau^a, Véronique Béréziat^{a,*} and Claire Lagathu^{a,*}

Objective: HIV-infected patients receiving antiretroviral treatment (ART) often present adipose tissue accumulation and/or redistribution. adipose tissue has been shown to be an HIV/SIV reservoir and viral proteins as Tat or Nef can be released by infected immune cells and exert a bystander effect on adipocytes or precursors. Our aim was to demonstrate that SIV/HIV infection *per se* could alter adipose tissue structure and/or function.

Design: Morphological and functional alterations of subcutaneous (SCAT) and visceral adipose tissue (VAT) were studied in SIV-infected macaques and HIV-infected ART-controlled patients. To analyze the effect of Tat or Nef, we used human adipose stem cells (ASCs) issued from healthy donors, and analyzed adipogenesis and extracellular matrix component production using two dimensional (2D) and three-dimensional (3D) culture models.

Methods: Adipocyte size and index of fibrosis were determined on Sirius red-stained adipose tissue samples. Proliferating and adipocyte 2D-differentiating or 3D-differentiating ASCs were treated chronically with Tat or Nef. mRNA, protein expression and secretion were examined by RT-PCR, western-blot and ELISA.

Results: SCAT and VAT from SIV-infected macaques displayed small adipocytes, decreased adipogenesis and severe fibrosis with collagen deposition. SCAT and VAT from HIV-infected ART-controlled patients presented similar alterations. *In vitro*, Tat and/or Nef induced a profibrotic phenotype in undifferentiated ASCs and altered adipogenesis and collagen production in adipocyte-differentiating ASCs.

Conclusion: We demonstrate here a specific role for HIV/SIV infection per se on adipose tissue fibrosis and adipogenesis, probably through the release of viral proteins, which could be involved in adipose tissue dysfunction contributing to cardiometabolic alterations of HIV-infected individuals. Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

AIDS 2019, 33:953-964

Keywords: adipogenesis, adipose tissue, fibrosis, mesenchymal stromal cells, virus proteins

Correspondence to Claire Lagathu, PhD, Sorbonne Université, INSERM UMR_S938, Centre de Recherche Saint Antoine, Institut Hospitalo-Universitaire de Cardio-Métabolisme et Nutrition (ICAN), 27 rue Chaligny, 75012 Paris, France.

E-mail: claire.lagathu@inserm.fr

^{*} Véronique Béréziat and Claire Lagathu contributed equally to this work.

Received: 13 December 2018; revised: 18 January 2019; accepted: 24 January 2019.

DOI:10.1097/QAD.00000000002168

ISSN 0269-9370 Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved. Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

^aSorbonne Université, INSERM UMR_S938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Institut Hospitalo-Universitaire de Cardio-Métabolisme et Nutrition (ICAN), Paris, ^bCEA - Université Paris Sud 11 - Inserm U1184, Center for Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases, IDMIT Department, IBFJ, 92265 Fontenay-aux-Roses, ^cAP-HP, Hôpital Tenon, Service de Chirurgie Plastique et Esthétique, ^dAP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Sorbonne Université, ^e Institut Mutualiste Montsouris, Service de Chirurgie Digestive, ^fAP-HP, Hôpital Saint-Antoine, PRISIS, Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Reproduction, Paris, and ^gAP-HP, Groupe Hospitalier Universitaire Paris Sud, Hôpital Bicêtre, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Le Kremlin-Bicêtre, France.

Introduction

HIV-infected patients receiving current antiretroviral treatment (ART) are generally well controlled for HIV replication. However, some of them present fat accumulation and/or redistribution associated with altered adipose tissue homeostasis, differentiation, and function, which could lead to metabolic and cardiovas-cular comorbidities [1–5].

The pathophysiological mechanisms involved in adipose tissue dysfunction, in the context of HIV infection, are still poorly understood and probably multifactorial. Many studies have involved some ART molecules in these abnormalities [2,6-8]. However, adverse effects of ART cannot explain all aspects of the phenotype. Importantly, adipose tissue has been shown to be a HIV/simian immunodeficiency virus (SIV) reservoir [9–11], and some recent studies suggested that HIV infection per se could play an important role in the pathophysiology of adipose tissue alterations and associated metabolic defects. Accordingly, ART-naive HIV-infected patients can present decreased body fat [12], with sometimes fat redistribution [13], affecting both subcutaneous adipose tissue (SCAT) and visceral adipose tissue (VAT) [14]. VAT accumulation is often associated with metabolic defects, such as liver steatosis, dyslipidemia, insulin resistance and hyperglycemia [14,15]. Within adipose tissue of ART-naive patients, abnormal adipogenic gene expression and mitochondrial damage have been reported [16-19]. However, the in-vivo mechanisms whereby the virus could induce adipocyte defects in humans are still poorly understood.

Recent evidence indicates that adipose tissue inflammation and fibrosis are hallmarks of metabolically challenged adipocytes in adipose tissue disorders, contributing to the development of comorbidities [20]. In obesity, fibrotic and dysfunctional adipose tissue displays excess collagen deposition, mainly collagen 6, in humans and in rodents [21–24]. Adipocytes and adipose precursors are the main cells producing extracellular matrix (ECM) proteins [25] and, by the acquisition of a profibrotic phenotype [26,27], adipocyte precursors are key actors in the onset of fibrosis [20]. Thus, adipose tissue-resident mesenchymal stem cells (ASCs) can turn into myofibroblast-like cells expressing α -smooth muscle actin (α SMA) and transforming growth factor (TGF)- β [28–31], as a result of an unresolved chronic inflammation. Of note, in LMNAlinked lipodystrophy, interscapular fat pads display fibrotic changes but no evidence of ongoing inflammatory processes, suggesting that fibrosis and inflammation are not always associated [32,33]. Fibrotic lesions in adipose tissue have been observed in response to ART in people living with HIV [32,34,35], but the impact of HIV infection itself on adipose tissue fibrosis has never been studied.

As adipose tissue is an HIV reservoir [9-11], we hypothesized that HIV-infected immune cells within adipose tissue could release viral proteins, even in the presence of ART, which could exert a direct effect on bystander cells, such as adipocytes or their precursors. In fact, HIV-viral proteins like Vpr, Tat or Nef have been detected in the plasma of HIV-infected individuals receiving ART [36–38]. The pathogenic role of Vpr, which can corepress peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), includes decreased adipose tissue depots mass and increased macrophage infiltration in a mouse transgenic model [38]. In vitro, several HIV proteins, including Tat or Nef, can induce inflammation and senescence that could alter adipogenesis and affect mature adipocyte function [36-42]. In addition, Tat and Nef alter osteogenesis in bone-marrow mesenchymal stem cells [40]. In this context, our aim was to characterize the impact of HIV/SIV on adipose tissue morphology and function in vivo together with the ability of Tat and Nef to alter ECM production by ASCs and adipocytes.

Methods

Animals, infection and adipose tissue samples

Seven cynomolgus macaques (Macaca fascicularis) were infected via the intravenous route with SIVmac251 as previously described [9]. They were not used for any other protocol before euthanasia. Seven non-SIVinfected animals were used as controls. Adult macaques were imported from Mauritius and housed in the animal facilities at the 'Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives' (CEA, Fontenay-aux- Roses, France), under the accreditation number D92-032-02. The CEA facilities comply with the Standards for Human Care and Use of Laboratory of the Office for Laboratory Animal Welfare (OLAW, USA) under OLAW assurance number #A5826-01 and with the European Directive (2010/63, recommendation N°9). The study was approved by the 'Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' (France) and the ethics committee 'Comité d'éthique en expérimentation animale n°44' under reference 2015102713323361.02 (APAFIS#2453). Ketamine chlorhydrate-sedated animals were euthanized by intravenous injection of sodium pentobarbital (Vetoquinol, Paris, France). SCAT and VAT samples were collected at necropsy, at the same location in each animal. Special care was taken to remove any nonadipose-associated tissues from the depot including lymph nodes. Control animals had a mean age of 7.2 ± 1.1 years and weighed 9.3 ± 5.5 kg. SIV-infected macaques had a mean age of 4.4 ± 0.3 years and weighed 5.5 ± 0.6 kg. The mean duration of SIV infection was of 342 ± 31 days, with a mean viral load of $6.8 \times 10^4 \pm 2.9 \times 10^4$ RNA copies/ml and a mean CD4⁺ cell count of $421 \pm 174/\mu$ l.

Adipose tissue samples from human HIV-infected patients and healthy donors

Human SCAT and VAT samples were obtained from HIV-infected and HIV-negative women undergoing bariatric surgery (n=4 per group). Mean age was 37 ± 6.2 years, and 38.5 ± 4 years for HIV-infected and control patients, respectively. BMI was 47.7 ± 2.6 and 45.8 ± 2.4 kg/m² in HIV-infected and control patients, respectively. HIV infection duration was of 11.8 ± 5.3 years and the mean CD4⁺ cell count was $480 \pm 88/\mu$ l. None of them had diabetes at the time of the surgery.

Otherwise, human SCAT samples used for adiposederived mesenchymal stem cell (ASC) isolation were obtained from 14 healthy women undergoing plastic surgery (BMI < 25 kg/m^2) with a mean age of 47.8 ± 3.9 years. All research patients provided informed written consent before their surgery allowing the use of their tissue specimens for research purposes. The protocols followed the Declaration of Helsinki guidelines and were approved by the local ethics committee.

Adipose stem cell isolation, culture, treatment and differentiation

ASCs were isolated using a collagenase digestion as previously described [43], seeded in α MEM (Minimum Eagle's Medium) with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mmol/l glutamine, penicillin/streptomycin (all from Gibco, Invitrogen Corporation, San Diego, California, USA), and 2.5 ng/ml basic fibroblast growth factor (PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, USA). Upon confluence, adherent cells were trypsinized and seeded at 10^3 cells/cm². During expansion, cells were exposed or not to 40 ng/ml of the recombinant HIV-proteins Tat or Nef (Jena Bioscience, Jena, Germany) for 15 days. Differentiation of ASCs was induced by addition of proadipogenic medium (DMEM, Dulbecco Modified Eagle's Medium) with 10% FBS, 1 µmol/l dexamethasone, 500 µmol/l IBMX, 1 µmol/l rosiglitazone, 1 µmol/l insulin) for 6 days, and then maintained in DMEM (1 µmol/l insulin) for 8 days. Tat or Nef were added throughout the whole differentiation process. Cells were stained for Oil-red-O (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) as described previously [8]. For the three-dimensional (3D) culture, Puramatrix hydrogel (Corning, Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) was sonicated for 30 min and diluted with 20% sucrose. ASCs were embedded and differentiated in the hydrogel as previously described into round bottom wells of a 96-well plate [25].

Protein extraction and western blotting

Frozen adipose tissues biopsies were lysed with Laemmli Buffer and ground using a Precellys tissue homogenizer with CKmix ceramic beads (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Proteins were extracted from cell monolayers as previously described [6]. Samples were subjected to SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membranes. Specific proteins were detected using antibodies directed against PPAR γ , collagen1- α 2, collagen6- α 1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) and tubulin (Sigma-Aldrich). Immunoreactive complexes were detected by horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA) and by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences GE Healthcare Europe, Velizy-Villacoublay, France).

RNA isolation and quantitative reverse transcriptase-PCR

Total RNA from human and macaque adipose tissue samples were isolated by Qiazol extraction and purification using Qiagen RNeasy mini-columns according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Courtaboeuf, France). Total RNA was isolated from cultured cells using RNeasy mini-columns. mRNA expression was analyzed by RT-PCR as described previously [32,44]. The sequence of primers is available upon request.

Adipose tissue histology

Light microscopy and immunohistochemical studies were performed as previously described [32]. Briefly, human and macaque adipose tissue samples were collected and fixed in 4% buffered paraformaldehyde (Sigma Aldrich) for 48 h, embedded in paraffin, and sectioned at 5 µm. Adipose tissue sections were deparaffinized and stained with Sirius red for 1h to detect collagen fibrils. The adipocyte mean areas and index of fibrosis were determined using a semiautomatic image analysis system as previously described [32] in three randomly chosen regions. Parallel sections were immunostained and quantified for collagen6- α 1 expression as previously described [32,44]. The ratio of fibrosis to total adipose tissue surfaces defined the index of fibrosis. Adipocyte size distribution was determined as previously described [32,45].

TGF-β and fibronectin secretion

TGF- β and fibronectin concentrations in cell culture media from ASCs were determined after 15 days of incubation with Tat or Nef, by using Quantikine human ELISA kits for fibronectin or multianalyte cartridge ELLA immunoassay for TGF- β according to the manufacturer's instructions (Bio-Techne, San Jose, California, USA).

All experiments were performed at least three times (n=3-8) on triplicate samples. Data are expressed as means \pm SEM. Statistical significance between SIV-infected and noninfected macaques, or between HIV-infected and noninfected patients, was determined with nonparametric Mann–Whitney *U*-test. Relationships between index of fibrosis and adipocyte size information in VAT and SCAT were visualized by scatter plots and assessed by Pearson correlation analysis. Statistical significance between HIV-protein-treated vs. control

cells was determined with parametric (t test) or nonparametric tests, as appropriate.

Results

Simian immunodeficiency virus infection alters adipocyte size and induces fibrosis in macaque adipose tissue

SIV infection in macaques, which closely recapitulates the major features of HIV infection [46], allows to assess the impact of the virus on abdominal SCAT and VAT, two depots that accumulate during HIV-linked fat redistribution [2]. We first determined the impact of SIV infection on adipose tissue architecture. The repartition of adipocytes was overall homogeneous in both SCAT and VAT of control macaques with adipocytes of different sizes. In contrast, adipose tissue from SIV-infected macaques had a heterogeneous repartition with clusters of small and of medium-sized adipocytes together with fibrotic bundles (Fig. 1 a). In addition, the percentage of large adipocytes was higher in the control than in the SIVinfected group (Fig. 1b). Accordingly, the mean size of adipocytes measured in adipose tissue of control macaques was higher than that of SIV-infected animals (in SCAT, 3811 ± 1230 vs. $1866 \pm 142 \,\mu\text{m}^2$ for control and SIVinfected groups, respectively; in VAT, 3505 ± 1036 vs. $1955 \pm 156 \,\mu\text{m}^2$ for control and SIV-infected groups, respectively). We evaluated the level of expression of the main adipogenic transcription factor, PPAR γ . We found that its expression was decreased, at the mRNA and protein level, in SIV-infected macaques as compared with controls (Fig. 1c and d). Finally, regarding ECM remodeling, marked collagen deposition was present in both depots of SIV-infected macaques with presence of fibrotic bundles and/or fibrotic thickening of fat lobules as shown by Sirius red staining and a higher index of fibrosis (3.3 and 9.9% area of fibrosis in SCAT for control and SIV-infected group, respectively; 3.2 and 8.8% area of fibrosis in VAT, for control and SIV-infected animals, respectively; Fig. 1a and e). Accordingly, an increased mRNA expression of type $1-\alpha 2$ and $6-\alpha 1$ collagens was observed in SCAT and to a lesser extent in VAT from infected-macaques, in association with an increased expression of fibronectin and TGF- β (Fig. 1f). We searched for relationships between adipocyte mean size and the fibrosis index in SIV-infected and control macaques. We observed a negative correlation in SCAT (P=0.03, R=-0.72) but not VAT (P=0.11, R=-0.72)R = -0.57).

HIV infection alters adipocyte size and induces fibrosis in human adipose tissue

We also examined samples from HIV-infected patients. In agreement with the observations made in SIV-infected macaques, we observed a marked fibrosis in both SCAT and VAT of obese HIV-infected patients compared to sex-paired, age-paired and BMI-paired noninfected obese individuals (Fig. 2 a). First, fat architecture of HIV-infected human samples was altered, with a higher number of smaller adipocytes (Fig. 2b) and increased fibrosis characterized by compact and thick fibrils of collagen invading the intercellular area. By contrast, in noninfected patients, collagen staining was thinner and mainly located around adipocytes (Fig. 2a and c; i.e. 2.4fold increased fibrosis in SCAT and 2.0-fold increase in VAT of HIV-infected vs. control patients, respectively). Second, we also observed a 6.4-fold induction in collagen 6-α1 expression in SCAT but not VAT of HIV-infected patients compared with control samples, as assessed using immunostaining (Fig. 2d and e). Considered together, these data suggest that HIV/SIV infection results in a marked fibrosis in adipose tissue in both depots.

HIV-proteins Tat and Nef alter extracellular matrix component production in proliferating adipose stem cells *in vitro*

To investigate the mechanisms whereby SIV/HIV infection induced fibrosis in adipose tissue and to identify the cellular and viral actors responsible for ECM remodeling, we studied the impact of two HIV proteins, either on proliferating adipocyte precursors or when these cells were differentiated into adipocytes, by using human ASCs from lean healthy donors. Proliferating ASCs, chronically treated for 15 days with recombinant HIV proteins Tat or Nef, displayed a marked increase in the mRNA and protein levels of collagen $1-\alpha 2$ (Fig. 3a) and collagen 6- α 1 (Fig. 3b). Both HIV-proteins induced a profibrotic phenotype in proliferating ASCs, as shown by the increased secretion of fibronectin and TGF- β 1 (Fig. 3c and d) and expression of the myofibroblast marker, aSMA (ACTA2) (Fig. 3e). These results strongly suggest that HIV/SIV could induce fibrosis in adipose tissue through the release of Tat and Nef and interaction with ASCs.

Nef alters adipogenesis and induces extracellular matrix component production in differentiating adipocytes

We differentiated ASCs into adipocytes for 15 days in 2D culture conditions, in order to search whether HIV proteins could also impact ECM component production during the course of adipogenesis. First, Nef, but not Tat, decreased cellular lipid accumulation (Oil-red-O staining; Fig. 4a and b) and the protein and/or mRNA expression of the adipogenic markers *PPARG* and *FABP4* (Fig. 4c and d). These results were in accordance with our in-vivo data, showing a decreased adipocyte size and PPAR γ expression in SIV-infected macaques. However, in the 2D-model, Nef or Tat had no significant effect on collagen production (Fig. 4e). In order to unmask an effect of HIV-proteins on ECM composition, we used a 3D system, where ASCs were embedded and differentiated into a peptide hydrogel (Puramatrix). The



Fig. 1. Subcutaneous and visceral adipose tissue from simian immunodeficiency virus-infected cynomolgus macaques shows reduced adipocyte size and increased fibrosis. (a) Light microscopy analysis of adipose tissue depots, stained with Sirius red to detect collagen fibers. Representative photographs are shown (magnification X40) (scale bar, 50 μ m). (b) Frequency distribution of adipocyte size in SCAT and VAT depots in control and SIV-infected macaques. (c) *PPARG* mRNA levels were measured using real-time PCR. The relative mRNA expression levels were normalized to *HPRT* mRNA. (d) PPAR γ and tubulin (loading control) protein levels were measured. Whole-adipose tissue lysates were extracted from fat depots and analyzed by immunoblotting. Representative immunoblots are shown. (e) Index of fibrosis in VAT and SCAT measured as described in 'Material and methods' section. (f) *COL1A2*, *COL6A1*, *FN* and *TGFB* mRNA levels were measured using real-time PCR. The relative mRNA expression levels were obtained from triplicate measurements and are expressed as mean \pm SEM for control and SIV-infected group (n=4-7 animals per group). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. control animals. SIV, simian immunodeficiency virus.

effect of HIV proteins on adipogenesis was similar to that observed in the 2D culture system, as shown by Oil-red-O staining and PPAR γ protein expression (Fig. 5a and b). Moreover, Nef induced collagen 1- α 2 expression and both HIV-proteins induced collagen 6- α 1 expression (Fig. 5c).

Altogether, these data demonstrate that HIV proteins can have a direct impact on adipogenesis and ECM component production, in particular when differentiating adipocytes are cultured into a 3D more physiological system, thus recapitulating the observations made in SCAT from SIV-infected macaques and HIV-infected individuals. They also demonstrate that both precursor cells and adipocytes can participate to the onset of fibrosis within adipose tissue.

Discussion

We show here that the morphological and functional analysis of SCAT and VAT from SIV-infected macaques and HIV-infected individuals revealed fibrosis, with increased deposition of collagens, together with a decreased adipocyte size. To go further, we addressed the specific relationship between ASCs, adipocytes and HIV/SIV infection. We show here, for the first time, that HIV proteins, Tat and Nef, promoted the acquisition of a profibrotic phenotype of human ASCs and to a lesser extent of adipocytes.

HIV-infected patients receiving current ART, and well controlled for HIV replication, often present trunk fat accumulation associated with metabolic and



Fig. 2. Subcutaneous and visceral adipose tissue from HIV-infected obese patients shows reduced adipocyte size and increased fibrosis. (a) Light microscopy analysis of adipose tissue depots, stained with Sirius red to detect collagen fibers. Representative photographs are shown (magnification ×10) (scale bar, 100 μ m). (b) Frequency distribution of adipocyte size in SCAT and VAT depots in control and HIV-infected treated patients. (c) Index of fibrosis measured in VAT and SCAT as described in the 'Material and methods' section. (d) Quantification and (e) representative photographs of collagen 6 α 1 immunostaining (magnification ×40; scale bar, 25 μ m). Arrows indicate Collagen 6 α 1 positive cells. All results were obtained from triplicate measurements and are expressed as mean ± SEM for control and HIV-infected group (n=4 individuals per group). *P < 0.05, **P < 0.01 vs. non-HIV-infected obese individuals. NS, nonsignificant; SCAT, subcutaneous adipose tissue; VAT, visceral adipose tissue.

cardiovascular comorbidities [1]. Nonetheless, adverse effects of ART cannot explain all these metabolic alterations, and growing evidence suggest that HIV-infection per se could play a role. Importantly, adipose tissue has been shown to be an HIV/SIV reservoir, the virus being located in immune cells [9,10], suggesting that within adipose tissue, infected cells could release viral proteins, such as Tat and Nef [37,47], which in turn could represent key effectors of adipose tissue remodeling.

We observed that fibrosis was up to three-fold higher in SCAT and VAT from SIV-infected animals when compared with uninfected macaques [22]. Indeed, SIV infection was associated with fibrotic bundles and increased collagen 1 expression in both depots. These results were also confirmed in adipose tissue from obese HIV-infected patients treated with ART. In SIV-infected macaques, we observed an increased expression of collagen 6, fibronectin and of the profibrotic factor TGF- β in SCAT and to a lesser extent in VAT. These results were also confirmed in adipose tissues from obese HIV-infected patients treated with ART. An increased level of collagen 6 is often associated with pericellular fibrosis, whereas collagen 1 and collagen 3 are usually found in bundles of fibrosis [48]. Our results, regarding increased collagen 6 mainly in SCAT, may highlight different types of fibrosis in VAT or SCAT in both humans and macaques. The differences regarding collagen 6 in VAT between macaques and patients could result from species or sex differences and/or from the metabolic state and could also be related partly to ART in HIV-infected patients. Nonetheless, both our in-vitro results and the presence of an adipose tissue fibrosis in untreated

Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.



Fig. 3. Long-term exposure to Tat or Nef of proliferating adipose stem cells increases extracellular matrix component production. ASCs were maintained in a proliferating and undifferentiated state for 15 days. Total mRNA and whole-cell lysates were extracted from ASCs, treated or not with HIV-proteins Tat or Nef, and analyzed by RT-PCR and immunoblotting, respectively. (a) *COL1A2* and (b) *COL6A1* mRNA levels normalized to *PPIA* mRNA and representative immunoblots and quantification normalized to tubulin (loading control) are shown. Fibronectin (c) and TGF β 1 (d) levels in the cell culture media were determined with ELISA. (e) *ACTA2* mRNA levels normalized to *PPIA* mRNA. Results are expressed as ng/ml per 24 h for fibronectin and as pg/ml per 24 h for TGF β 1. Results are presented as mean ± SEM. All experiments were performed in triplicate. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs. control cells. ASCs, adipose stem cells.



2D differentiation

Fig. 4. Effect of a chronic treatment with Tat or Nef on adipogenesis and extracellular matrix component production of adipocyte-differentiating adipose stem cells grown in 2D culture. ASCs were differentiated into adipocytes in the presence of Tat or Nef. To evaluate the adipogenic potential of ASCs, cells were stained with Oil-Red-O 14 days postinduction of differentiation. (a) Representative micrographs of cells (left, magnification ×10) and scans of culture dishes (right) are shown. (b) quantification of Oil-Red-O staining expressed as percent of control cells. Whole-cell lysates were extracted at day 14 postinduction of differentiation from ASCs and analyzed by immunoblotting for PPAR γ (c) and tubulin (loading control) protein expression. Representative immunoblots are shown. (d) *PPARG* and *FABP4* mRNA levels measured using real time RT-PCR. The relative mRNA expression levels were normalized to *PPIA*. (e) Representative immunoblots of Collagen 1A2, Collagen 6A1 and tubulin (loading control) are shown. Results are presented as mean ± SEM. All experiments were performed in triplicate. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs. control cells. ASCs, adipose stem cells; NS, nonsignificant.

Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.



3D matrix differentiation

Fig. 5. Chronic treatment with Tat or Nef alters adipogenesis and extracellular matrix component production of adipocytedifferentiating adipose stem cells grown in 3D culture. Adipogenesis and ECM remodeling of ASCs differentiated for 15 days in the 3D culture model using puramatrix were evaluated. (a) Representative micrographs of Oil-Red-stained adipocytes (top, magnification ×40 and bottom: magnification ×10). (b) Representative immunoblots of PPAR_Y (c) Collagen 1A2, Collagen 6A1and tubulin (loading control) are shown. Whole-cell lysates were extracted at day 15 postinduction of differentiation and analyzed by immunoblotting. Results are presented as mean \pm SEM. All experiments were performed in triplicate. **P*<0.05, ***P*<0.01, vs. control cells. ASCs, adipose stem cells; ECM, extracellular matrix; NS, nonsignificant.

SIV-infected macaques indicate a key role for SIV/HIV infection in collagen deposition and fibrosis.

Adipose precursors and other stroma–vascular cells of adipose tissue have been implicated in the onset of fibrosis [23–24]. Here, we showed that, in proliferating ASC, Tat and Nef altered ECM component production as shown by increased pro-fibrotic markers (TGF- β , fibronectin, and α -SMA). These results are in accordance with a myofibroblast–like phenotype of ASCs [27,29,30]. Similar patterns were observed in mesenchymal precursors in the case of muscle fibrosis [49]. This phenotype could result from interactions between ASCs and macrophages, the latter being a major regulator of fibrosis [20,27,31,50]. Furthermore, the impact of Tat and Nef in 3Ddifferentiated ASC are modest and suggest that mainly adipose precursor, and to a lesser extent adipocyte, participate to the onset of HIV-induced fibrosis. Of note, it would be interesting to study the impact on ECM in adipose tissue of other secreted HIV proteins as Vpr. It should be noted that ASCs were isolated from SCAT in accordance with HIV/SIV-induced collagen 6 production in SCAT rather than VAT.

In obese individuals, fibrosis negatively correlates with adipocyte size and has been suggested to limit adipocyte plasticity, therefore, contributing to the onset of metabolic alterations [20]. Accordingly, in our study, HIV/SIV infection was associated with smaller adipocytes in both SCAT and VAT and adipocyte mean size was negatively related to the size of fibrosis in SCAT of SIV-infected and control macaques. As previously described by the group of Villarroya [51], we observed a dramatic decrease in the adipogenic effector PPAR γ suggesting

that HIV infection itself could contribute to adipose tissue failure to expand, leading to fat redistribution. In line with this observation, we found that Nef can alter adipogenesis of ASCs as shown by reduced lipid accumulation and expression of adipogenic markers in both 2D and 3D models of differentiation. Nef has been shown to interact with PPAR γ in hematopoietic progenitors, suggesting a possible mechanism whereby Nef alters adipogenesis [52]. Moreover, fibrosis could also have a negative effect on adipogenesis, through the action of the profibrotic factor TGF- β [53]. Hypoxia can also participate to the onset of fibrosis and altered adipocyte differentiation and represents a possible pathway, which remains to be investigated [54]. Finally, adipose tissue inflammation can lead to excessive synthesis of ECM proteins. HIV infection is associated with low-grade inflammation in adipose tissue [19], characterized by immune cells recruitment [55,56], which can directly participate to the onset of fibrosis in SCAT and VAT [27,50]. However, several studies on chronically SIVinfected macaques showed no increased inflammatory cytokine expression in adipose tissue [9,11] supporting the idea that HIV infection can be directly responsible for fibrosis in adipose tissue.

We acknowledge that our study has some limitations. First, our in-vivo data provide association and not causality. We have evaluated Tat and Nef but not the other HIV proteins that could also induce fibrosis. Several reasons could potentially explain the differences between human and macaques regarding collagen 6, including differences in species, sex (female patients vs. male macaques), metabolic state (obese vs. lean) and/or ART. Otherwise, results obtained in human adipose tissue samples were limited to women presenting morbid obesity and undergoing bariatric surgery and can neither be directly extrapolated to all people living with HIV, nor to men. The number of patients was low, nonetheless, obese HIV-infected patients were paired for sex, age and BMI to noninfected obese individuals, and all samples were withdrawn by surgical biopsies at similar locations. As well, a similar necropsy procedure was performed for adipose tissue samples from macaques.

Altogether, these results allow a better understanding of adipose tissue alteration in SIV-infected macaques and HIV-infected patients. We show here for the first time that HIV/SIV infection per se is associated with adipose tissue fibrosis and dysfunction that could, in turn, participate to the onset of cardiovascular and metabolic disorders commonly observed in ART-controlled HIVinfected patients.

Acknowledgements

We thank the patients, Professor K. Clément's team and in particular Dr S. André for providing surgical samples of adipose tissue from noninfected obese individuals, Dr R. Ho Tsong Fang for veterinary assistance and the IDMIT core facilities for excellent technical assistance. We also thank R. Morichon for his help on the analysis of adipocyte size, F. Merabtene (UMS30 LUMIC, Sorbonne Université) for performing the Sirius red-stained adipose tissue sections and T. Ejlalmanesh, A. Kergoat, C. Rose for their participation to some of the experimental work.

This research work was supported by a Sidaction PhD Fellowship (J.G.), by an ANRS grant (C.L. and V.B.) and by the 'Programme Investissements d'Avenir' (PIA) managed by the ANR (ANR-11-INBS-0008 and ANR-10-EQPX-02-01).

Funding: This research was supported by a Sidaction PhD Fellowship (J.G.), an ANRS grant (N17020DR), the 'Programme Investissements d'Avenir' (ANR-11-INBS-0008 infrastructure and ANR-10-EQPX-02-01 FlowCyTech facility) (IDMIT), Inserm and Sorbonne Université funding.

Author contribution and approval of text: Conception and design of the experiments: J.G., C.L., V.B., J.C., D.D., C.B., O.L. Acquisition of data: J.G., C.L., M.M., V.B. Analysis of the data: J.G., C.L., V.B. Contribution of reagents/biological materials: C.B., G.P., M.A., O.L., R.L., V.P., D.D. Writing of the article: J.G., C.L., V.B., J.C., B.F. All authors approved the final manuscript.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- 1. Lake JE, Stanley TL, Apovian CM, Bhasin S, Brown TT, Capeau J, et al. **Practical review of recognition and management of obesity and lipohypertrophy in human immunodeficiency virus infection.** *Clin Infect Dis* 2017; **64**:1422–1429.
- McComsey GA, Moser C, Currier J, Ribaudo HJ, Paczuski P, Dube MP, et al. Body composition changes after initiation of raltegravir or protease inhibitors: ACTG A5260s. Clin Infect Dis 2016; 62:853–862.
- Beraldo RA, Meliscki GC, Silva BR, Navarro AM, Bollela VR, Schmidt A, et al. Anthropometric measures of central adiposity are highly concordant with predictors of cardiovascular disease risk in HIV patients. Am J Clin Nutr 2018; 107:883–893.
- Bakal DR, Coelho LE, Luz PM, Clark JL, De Boni RB, Cardoso SW, et al. Obesity following ART initiation is common and influenced by both traditional and HIV/ART-specific risk factors. J Antimicrob Chemother 2018; 73:2177–2185.
- Srinivasa S, Fitch KV, Torriani M, Zanni MV, Defilippi C, Christenson R, et al. Relationship of visceral and subcutaneous adipose depots to markers of arterial injury and inflammation among individuals with HIV. AIDS 2018; 33:229–236.
- 6. Caron M, Auclairt M, Vissian A, Vigouroux C, Capeau J. **Contribution of mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cellular premature senescence induced by antiretroviral thymidine analogues.** *Antivir Ther* 2008; **13**:27–38.
- Lagathu C, Kim M, Maachi M, Vigouroux C, Cervera P, Capeau J, et al. HIV antiretroviral treatment alters adipokine expression and insulin sensitivity of adipose tissue in vitro and in vivo. Biochimie 2005; 87:65–71.

- Hernandez-Vallejo SJ, Beaupere C, Larghero J, Capeau J, Lagathu C. HIV protease inhibitors induce senescence and alter osteoblastic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells: beneficial effect of pravastatin. Aging Cell 2013; 12:955-965.
- Damouche A, Lazure T, Avettand-Fenoel V, Huot N, Dejucq-9 Rainsford N, Satie AP, et al. Adipose tissue is a neglected viral reservoir and an inflammatory site during chronic HIV and SIV infection. PLoS Pathog 2015; 11:e1005153.
- Couturier J, Suliburk JW, Brown JM, Luke DJ, Agarwal N, Yu X, 10. et al. Human adipose tissue as a reservoir for memory CD4+ T cells and HIV. AIDS 2015; 29:667-674
- Couturier J, Agarwal N, Nehete PN, Baze WB, Barry MA, 11. Jagannadha Sastry K, et al. Infectious SIV resides in adipose tissue and induces metabolic defects in chronically infected rhesus macaques. *Retrovirology* 2016; **13**:30. Visnegarwala F, Raghavan SS, Mullin CM, Bartsch G, Wang J,
- 12. Kotler D, et al. Sex differences in the associations of HIV disease characteristics and body composition in antiretroviral-naive persons. Am J Clin Nutr 2005; 82:850-856.
- 13. Madge S, Kinloch-de-Loes S, Mercey D, Johnson MA, Weller IV. Lipodystrophy in patients naive to HIV protease inhibitors. AIDS 1999; 13:735–737.
- Agarwal N, Balasubramanyam A. Viral mechanisms of adipose 14. dysfunction: lessons from HIV-1 Vpr. Adipocyte 2015; 4:55-59
- Balasubramanyam A, Sekhar RV, Jahoor F, Jones PH, Pownall 15. HJ. Pathophysiology of dyslipidemia and increased cardiovascular risk in HIV lipodystrophy: a model of 'systemic steatosis'.
- *Curr Opin Lipidol* 2004; **15**:59–67. Garrabou G, Lopez S, Moren C, Martinez E, Fontdevila J, Cardellach F, et al. **Mitochondrial damage in adipose tissue** 16. of untreated HIV-infected patients. AIDS 2011; 25:165-170.
- Rozzi SJ, Avdoshina V, Fields JA, Trejo M, Ton HT, Ahern GP, 17. *et al.* Human immunodeficiency virus promotes mitochondrial toxicity. *Neurotox Res* 2017; **32**:723–733.
- 18. Gallego-Escuredo JM, Villarroya J, Domingo P, Targarona EM, Alegre M, Domingo JC, et al. Differentially altered molecular signature of visceral adipose tissue in HIV-1-associated lipodystrophy. J Acquir Immune Defic Syndr 19992013; 64:142-148.
- Vidal É, Domingo P, Villarroya É, Giralt M, Lopez-Dupla M, Gutierrez M, et al. Adipogenic/lipid, inflammatory, and mito-19. chondrial parameters in subcutaneous adipose tissue of untreated HIV-1-infected long-term nonprogressors: significant alterations despite low viral burden. J Acquir Immune Defic Syndr 2012; 61:131-137.
- 20. Sun K, Tordjman J, Clement K, Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. Cell Metab 2013; 18:470-477.
- Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-21. Millo M, et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. Genome Biol 2008; 9:R14.
- Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, 22. et al. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. Diabetes 2010; **59**:2817-2825
- Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D, Remedios I, Hymel 23. D, Gimble J, et al. Adipose tissue collagen VI in obesity. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94:5155-5162
- Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, 24. et al. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. Mol Cell Biol 2009; 29:1575-1591.
- 25. Pellegrinelli V, Heuvingh J, du Roure O, Rouault C, Devulder A, Klein C, et al. Human adipocyte function is impacted by mechanical cues. J Pathol 2014; 233:183-195.
- Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. 26. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. Endocrinology 2007; 148:868-877.
- 27. Bourlier V, Sengenes C, Zakaroff-Girard A, Decaunes P, Wdziekonski B, Galitzky J, et al. TGFbeta family members are key mediators in the induction of myofibroblast phenotype of human adipose tissue progenitor cells by macrophages. PLoS One 2012; 7:e31274.
- 28. Marcelin G, Ferreira A, Liu Y, Atlan M, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, et al. A PDGFRalpha-mediated switch toward CD9 (high) adipocyte progenitors controls obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Cell Metab* 2017; **25**:673–685.

- 29. Desai VD, Hsia HC, Schwarzbauer JE. Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells. PLoS One 2014; 9:e86865.
- Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lizartza K, Gomez MG, Garcia Mdel 30. P, Saez FJ, et al., Anat Rec (Hoboken). Behavior of in situ human native adipose tissue CD34+ stromal/progenitor cells during different stages of repair. Tissue-resident CD34+ stromal cells as a source of myofibroblasts. Anatomical record 2015; **298**:917-930
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. / 31. Pathol 2008; 214:199-210.
- Bereziat V, Cervera P, Le Dour C, Verpont MC, Dumont S, 32. Vantyghem MC, et al., Lipodystrophy Study Group. LMNA mutations induce a non-inflammatory fibrosis and a brown fat-like dystrophy of enlarged cervical adipose tissue. Am J Pathol 2011; 179:2443-2453.
- Le Dour C, Wu W, Bereziat V, Capeau J, Vigouroux C, Worman 33. HJ. Extracellular matrix remodeling and transforming growth factor-beta signaling abnormalities induced by lamin A/C variants that cause lipodystrophy. J Lipid Res 2017; 58:151-163.
- 34. Bastard JP, Caron M, Vidal H, Jan V, Auclair M, Vigouroux C, et al. Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipoatrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. Lancet 2002; 359:1026-1031.
- Utay NS, Kitch DW, Yeh E, Fichtenbaum CJ, Lederman MM, Estes JD, et al., A5317 AIDS Clinical Trials Group Team. 35. Telmisartan therapy does not improve lymph node or adipose tissue fibrosis more than continued antiretroviral therapy alone. J Infect Dis 2018; 217:1770-1781.
- Dupin N, Buffet M, Marcelin AG, Lamotte C, Gorin I, Ait-36. Arkoub Z, et al. HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV-infected patients with lipodystrophy. AIDS 2002; 16:2419-2424.
- Raymond AD, Campbell-Sims TC, Khan M, Lang M, Huang MB, 37. Bond VC, et al. HIV Type 1 Nef is released from infected cells in CD45(+) microvesicles and is present in the plasma of HIV-infected individuals. AIDS Res Hum Retroviruses 2011; 27:167-178.
- Agarwal N, Iyer D, Patel SG, Sekhar RV, Phillips TM, Schubert 38. U, et al. HIV-1 Vpr induces adipose dysfunction in vivo through reciprocal effects on PPAR/GR co-regulation. Sci Transl Med 2013; 5:213ra164.
- Diaz-Delfin J, Domingo P, Wabitsch M, Giralt M, Villarroya F. 39. HIV-1 Tat protein impairs adipogenesis and induces the expression and secretion of proinflammatory cytokines in human SGBS adipocytes. Antivir Ther 2012; 17:529-540.
- Beaupere C, Garcia M, Larghero J, Feve B, Capeau J, Lagathu C. 40 The HIV proteins Tat and Nef promote human bone marrow mesenchymal stem cell senescence and alter osteoblastic differentiation. Aging Cell 2015; 14:534–546. Otake K, Omoto S, Yamamoto T, Okuyama H, Okada H, Okada
- 41. N, et al. HIV-1 Nef protein in the nucleus influences adipogenesis as well as viral transcription through the peroxisome proliferator-activated receptors. *AIDS* 2004; **18**:189–198. Cotter EJ, Chew N, Powderly WG, Doran PP. **HIV type 1 alters**
- 42. mesenchymal stem cell differentiation potential and cell phenotype ex vivo. AIDS Res Hum Retroviruses 2011; 27:187-199.
- Zhu M, Heydarkhan-Hagvall S, Hedrick M, Benhaim P, Zuk P. 43 Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. J Vis Exp 2013; 79:e50585
- Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, Bastard JP, et al. 44 Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. Antivir Ther 2007; 12:489-500.
- 45. Dalle H, Garcia M, Antoine B, Boehm V, Huong Do TT, Buyse M, et al. Adipocyte glucocorticoid receptor deficiency promotes adipose tissue expandability and improves the metabolic profile under corticosterone exposure. Diabetes 2019; 68:305-317
- Reimann KA, Parker RA, Seaman MS, Beaudry K, Beddall M, 46. Peterson L, et al. Pathogenicity of simian-human immunodeficiency virus SHIV-89.6P and SIVmac is attenuated in cynomolgus macaques and associated with early T-lymphocyte responses. J Virol 2005; **79**:8878–8885. Debaisieux S, Rayne F, Yezid H, Beaumelle B. **The ins and outs**
- 47. of HIV-1 Tat. Traffic 2012; 13:355-363.
- 48. Divoux A, Clement K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. Obes Rev 2011; **12**:e494–e503.

- Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, et al. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. J Cell Sci 2011; 124 (Pt 21):3654–3664.
- Vila IK, Badin PM, Marques MA, Monbrun L, Lefort C, Mir L, et al. Immune cell Toll-like receptor 4 mediates the development of obesity- and endotoxemia-associated adipose tissue fibrosis. Cell Rep 2014; 7:1116–1129.
 Giralt M, Domingo P, Villarroya F. HIV-1 infection and the
- 51. Giralt M, Domingo P, Villarroya F. HIV-1 infection and the PPARgamma-dependent control of adipose tissue physiology. PPAR Res 2009; 2009:607902.
- 52. Prost S, Le Dantec M, Auge S, Le Grand R, Derdouch S, Auregan G, et al. Human and simian immunodeficiency viruses deregulate early hematopoiesis through a Nef/PPARgamma/STAT5 signaling pathway in macaques. J Clin Invest 2008; 118:1765–1775.
- 53. Pellegrinelli V, Carobbio S, Vidal-Puig A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia* 2016; **59**:1075–1088.
- Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. Mol Cell Biol 2009; 29:4467–4483.
- 55. Kaminski DA, Randall TD. Adaptive immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol* 2010; **31**:384–390.
- 56. d'Ettorre G, Paiardini M, Zaffiri L, Andreotti M, Ceccarelli G, Rizza C, et al. HIV persistence in the gut mucosa of HIVinfected subjects undergoing antiretroviral therapy correlates with immune activation and increased levels of LPS. Curr HIV Res 2011; 9:148–153.

b) Discussion et perspectives

Nous avons observé une fibrose dans le TASC et le TAV ainsi qu'une augmentation de la quantité de collagène VI dans le TASC des patients et dans le modèle macaque infecté. Le collagène VI est un marqueur de fibrose péricellulaire, associée à des dysfonctions métaboliques (Khan et al. 2009, Pasarica et al. 2009, Divoux et al. 2010). Il serait intéressant de discerner la fibrose péricellulaire de la périlobulaire dans notre modèle. Nous avons également observé que les protéines du VIH Tat et Nef induisaient la production de collagènes dans les ASC et dans une moindre mesure dans les adipocytes, et participeraient ainsi à la mise en place de cette fibrose chez les patients. Dans d'autres types cellulaires, il a été décrit que les protéines Tat et Nef induisaient la production de TGF-β (Zauli et al. 1992, Poggi and Zocchi 2006, Chompre et al. 2019) et une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Debaisieux et al. 2012, Clark et al. 2017, Lehmann et al. 2019, Mukhamedova et al. 2019), participant ainsi à la production de collagènes. Tat peut également se lier aux intégrines $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$, ce qui pourrait être un autre mécanisme pro-fibrotique dans les ASC et les adipocytes (Monini et al. 2012, Shimojo et al. 2015, Chang et al. 2017). Tat et Nef pourraient donc agir de façon directe (via les intégrines) ou indirecte (via la voie du TGF-β ou de l'inflammation) dans les ASC, pour favoriser la production de la MEC au sein du TA.

Les modifications de la composition de la MEC pourraient être aussi liées à la modulation de l'activité de certaines MMP par Tat (Rozzi et al. 2017, Bozzelli et al. 2019, Sil et al. 2020). Pour aller plus loin dans cette étude et tester cette dernière hypothèse, nous souhaitons étudier l'impact du virus et des protéines du VIH Tat et Nef sur l'activité des MMP. De plus, les macrophages ont été impliqués dans la fibrose du TA au cours de l'obésité (Vila et al. 2014). Il serait intéressant d'analyser leur rôle potentiel pro-fibrosant dans nos modèles.

Dans notre modèle expérimental, seul Nef altère l'adipogenèse des ASC. Cela est en accord avec la littérature. Il a été montré que Nef interagissait avec PPARγ (Otake et al. 2004, Prost et al. 2008) ce qui pourrait être un mécanisme possible dans les ASC. Nous souhaitons réaliser des co-immunoprécipitations afin de confirmer cette l'interaction dans notre modèle. Nef pourrait également affecter l'accumulation des lipides non seulement en diminuant l'adipogenèse mais également en inhibant la lipogenèse ou en augmentant la lipolyse. L'effet de Tat sur l'adipogenèse est dépendant des modèles (Cotter et al. 2011, Diaz-Delfin et al. 2012).

Nous avons émis l'hypothèse que les cellules infectées au sein du TA sécrètent Tat et Nef, et vont avoir des impacts sur les cellules avoisinantes (ASC et adipocytes). Tat et Nef sont

détectables dans le sang de patients infectés et contrôlés (Raymond et al. 2011, Tugizov et al. 2013, Gupta et al. 2017, Ferdin et al. 2018). Pour compléter notre étude, il aurait été intéressant de pouvoir mesurer les concentrations de Tat et Nef dans le TA *in vivo*. Par ailleurs, nous nous sommes concentrés dans ce travail sur les protéines virales sécrétées Tat et Nef mais d'autres protéines ont un effet connu sur le TA. En effet, l'impact du virus dépend du modèle utilisé et de la protéine virale étudiée. Vpr co-réprime PPARγ et par conséquent l'expression de ses gènes cibles (*FABP4, ADIPOQ, PPARG, GLUT4, LPL, PLIN1*) dans les adipocytes (Shrivastav et al. 2008). De plus, Vpr induit également des dysfonctions mitochondriales et l'apoptose des adipocytes (Balasubramanyam et al. 2007, Agarwal et al. 2013, Agarwal and Balasubramanyam 2015). Il serait pertinent d'étudier l'impact des protéines Vpr et Gp120 dans notre modèle d'ASC humaines.

Les altérations du TA des patients infectés traités associées ou non à une redistribution ou une prise de poids sous ARV pourraient contribuer au développement un diabète ou des maladies cardiovasculaires (Balasubramanyam et al. 2004, Kuller et al. 2008, Herrin et al. 2016, Hulgan 2018). De plus, des études suggèrent que Vpr, Tat et Nef pourraient contribuer au développement de la dyslipidémie et de l'athérosclérose observées chez les patients VIH. Vpr induit une lipolyse accrue qui a pour conséquence, une stéatose hépatique, une hyperglycémie et une résistance à l'insuline chez la souris (Agarwal et al. 2013, Agarwal and Balasubramanyam 2015). Nef altère aussi le métabolisme lipidique dans les macrophages en augmentant l'expression d'ABCA1 (*ATP-binding cassette A1*), un transporteur qui favorise l'accumulation des lipides (Cui et al. 2014). Tat augmente aussi la libération du cholestérol (Mohseni Ahooyi et al. 2018, Sviridov et al. 2020). Pour aller plus loin, il serait donc important d'évaluer l'effet des protéines virales sur le métabolisme lipidique et la fonction endothéliale.

Le macaque cymolgus infecté par SIVmac251 est un bon modèle d'étude d'infection chronique du VIS (Reimann et al. 2005). De plus, leur charge virale moyenne est inférieure à 10^5 et leur taux de CD4+ moyen est supérieur à 200 CD4+/mm³ (Mannioui et al. 2009). Ils sont donc bien en infection chronique et non au stade SIDA, et leurs atteintes du TA ne sont donc pas liées à une perte importante de TA et de muscle. Par ailleurs, le macaque est un bon modèle pour l'étude du TA et des maladies métaboliques. L'obésité chez le macaque est similaire à la pathologie humaine avec une augmentation de la leptine, de la glycémie et du risque de diabète (Chen et al. 2002), une diminution de l'adiponectine et une résistance à l'insuline (Hotta et al. 2001). Nous avons observé une diminution de l'expression des marqueurs adipogéniques dans le

TA de macaques infectés en accord avec l'étude de Couturier *et al* menée sur des macaques rhésus infectés (Couturier et al. 2016).

En conclusion, l'infection par le VIH/VIS joue un rôle spécifique dans les atteintes du TA mais ces dernières ont été tout d'abord associées à l'apparition des traitements ARV.

B. Impact des antirétroviraux sur le tissu adipeux

1) Les différentes classes d'antirétroviraux

Les ARV permettent d'empêcher la progression de la pathologie en inhibant les différentes étapes du cycle réplicatif du virus. Ils sont regroupés dans différentes classes : les inhibiteurs d'entrée et de fusion, de la transcriptase inverse, de l'intégrase et de la protéase (Figure 20).



Figure 20 : Schéma de l'inhibition des étapes du cycle réplicatif du VIH selon les différentes classes d'antirétroviraux.

Leurs effets secondaires ont amené le développement de classes de molécules dites de « nouvelle génération » davantage prescrits. De fait, on peut les classer en générations selon leur année de mise sur le marché (Figure 21). Ces médicaments ne sont cependant pas suffisants pour guérir de l'infection car la forme latente du virus au sein des réservoirs empêcherait l'action des ARV. De plus, le virus mute facilement et fréquemment et peut rendre certaines souches résistantes aux ARV. La barrière génétique d'un ARV à la mutation est dite faible lorsque qu'il existe de nombreuses souches du virus résistantes à l'ARV. Le patient est alors en échec virologique et la réplication du VIH n'est pas contrôlée. A l'inverse, une barrière génétique d'un ARV élevée indique qu'il est nécessaire que la souche virale subisse plusieurs mutations avant de devenir résistante à l'ARV.



Figure 21 : Frise chronologique de la mise sur le marché en France des principaux antirétroviraux d'après le site de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé ((ANSM)).

NRTI : inhibiteur nucléosidique ou nucléotidique de la transcriptase inverse (violet), PI : inhibiteur de la protéase (rouge), *NNRTI* : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (bleu), IE : inhibiteur d'entrée ou de fusion (vert), INI : inhibiteur d'intégrase (rose).

Les études pharmacocinétiques des ARV permettent de déterminer les valeurs thérapeutiques avec une efficacité optimale, le nombre de prise par jour et la Cmax. La Cmax est la concentration maximale des ARV mesurée dans le sang entre deux prises. Cette concentration est souvent utilisée dans les modèles *in vitro* (Bazzoli et al. 2010). Cependant, la concentration plasmatique totale d'un ARV est composée de sa fraction libre et de sa fraction liée aux protéines plasmatiques. Les ARV sont libérées dans le sang, distribuées aux tissus dans l'organisme et dégradés dans le foie. La biodisponibilité des ARV dépend des transporteurs utilisés et des enzymes hépatiques qui les métabolisent (Michaud et al. 2012).

La distribution et les concentrations plasmatiques et intracellulaires des ARV dépendent également de leurs propriétés physico-chimiques. En effet, les inhibiteurs de la transcriptase inverse nucléosidiques sont de faible poids moléculaire, se lient faiblement aux protéines plasmatiques et sont hydrophiles. A l'inverse, les inhibiteurs de la protéase sont plutôt lipophiles et se lient fortement aux protéines dans le sang (Jones et al. 2001). Deux études ont montré que certains ARV comme les inhibiteurs de la transcriptase inverse non nucléosidiques et les inhibiteurs d'intégrase pouvaient être séquestrés sous forme inactive dans les adipocytes (Dupin et al. 2002, Couturier et al. 2018).

a) Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Les deux premières drogues antirétrovirales mises sur le marché sont des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse la zidovudine (AZT) en 1987 et la stavudine (d4T) en 1994. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse sont des analogues nucléosidiques (NRTI, *nucleoside analog reverse-transcriptase inhibitors*), nucléotidique (tNRTI, *nucleotide analog reverse-transcriptase inhibitors*) ou non nucléosidiques (NNRTI, *non nucleoside analog reverse-transcriptase inhibitors*). Ils bloquent l'étape précoce de la réplication virale. Ils ont d'abord été prescrits en monothérapie mais rapidement des virus résistants à la zidovudine sont apparus menant à l'utilisation d'une combinaison de molécules de différentes classes afin de contrôler la réplication du VIH et maintenir une charge virale faible (Prokofjeva et al. 2016).

Les <u>tNRTI et NRTI</u> sont des analogues des substrats, à savoir les nucléotides ou nucléosides nécessaires à la transcriptase inverse (Tableau 1). Lorsqu'ils entrent dans la cellule, ils sont phosphorylés par les kinases cellulaires. Les NRTI et les tNRTI ont besoin d'être triphosphorylés pour agir dans la cellule. Les tNRTI (analogues nucléotidiques) sont sous forme monophosphorylée lorsqu'ils entrent dans la cellule infectée tandis que les NRTI ne possèdent pas de groupement phosphate à l'entrée de la cellule. Pour les NRTI, la première phosphorylation est donc une étape limitante dans la cellule afin de pouvoir exercer son activité inhibitrice sur la transcriptase inverse. Les NRTI et les tNRTI bloquent la synthèse de l'ADN lorsqu'ils sont incorporés car ils n'ont pas de fonction hydroxyle en 3' (Cihlar and Ray 2010). AZT, d4T et lamivudine (3TC) appartiennent à la première génération des NRTI nucléosidiques et nucléotidiques tandis que didanosine (DDI), abacavir (ABC), emtricitabine (FTC) et tenofovir disoproxil fumarate (TDF) (tNRTI) constituent la seconde génération. Le Tenofovir alafénamide (TAF), un dérivé du tNRTI tenofovir, est une molécule de troisième génération. Il a été autorisé en 2016 aux USA et en 2018 en France (De Clercq 2016).

Analogues	Analogues	Analogues	Analogues
dTTP	dCTP	dATP	dGTP
Stavudine (d4T)	Lamivudine	Didanosine (ddI)	Abacavir (ABC)
Zidovudine (AZT)	(3TC)	Tenofovir disoproxil	
	Entricitabine	fumarate	
	(FTC)	(TDF)	
		Tenofovir alafénamide (TAF)	

Tableau 1 : Tableau des NRTI classés selon l'analogie du nucléoside.

Les NNRTI sont des inhibiteurs non-compétitifs. La première génération de NNRTI regroupe l'efavirenz (EFV) et la nevirapine (NVP). La deuxième génération comprend l'etravirine (ETR), la rilpivirine (RPV) et la doravirine (DOR). Actuellement, l'EFV est le plus prescrit des NNRTI.

Les NRTI et les NNRTI ont une barrière génétique faible à la mutation, il y a de nombreuses souches résistantes à l'AZT et au d4T qui confèrent des résistances croisées à d'autres NRTI. Deux mécanismes expliquent cette résistance : l'excision d'un composé phosphorylé par la transcriptase inverse et de la diminution de l'affinité de cette enzyme pour des substrats synthétiques. La combinaison NRTI/NNRTI est cependant efficace et est encore prescrite aujourd'hui. Actuellement, l'OMS recommande deux NNRTI comme TDF/FTC (Truvada) ou ABC/3TC (Kivexa), avec un inhibiteur d'intégrase (INI) ou EFV (Organization 2019). De plus, le Truvada est utilisé pour la PreP ou prophylaxie préexposition. Ce traitement préventif fait l'objet d'un suivi médical.

b) Les inhibiteurs de la protéase

Les inhibiteurs de la protéase (PI) ont révolutionné la prise en charge des patients, avec la mise en place de la trithérapie qui associe deux NRTI et un PI. Cette combinaison de différentes classes d'inhibiteurs appelée HAART (*Highly Active Aniretroviral Therapy*) était efficace chez les patients et est recommandée aujourd'hui comme seconde ligne de traitement ARV.

Les PI possèdent une structure semi-peptidique et sont des inhibiteurs compétitifs de la protéase insensibles au clivage protéolytique (Michaud et al. 2012). La première génération de PI comprend l'indinavir (IDV), le ritonavir (RTV), le saquinavir (SQV) et le nelfinavir (NFV). La deuxième génération regroupe l'amprénavir (APV), le lopinavir (LPV), l'atazanavir (ATV) et le darunavir (DRV). Les PI ont une barrière génétique élevée et peu de souches sont résistantes aux PI.

Les PI sont généralement associés au ritonavir qui a un effet « *booster* ». En effet, ils ont une demi-vie courte car ils sont dégradés rapidement par les enzymes protéolytiques du foie, les