



HAL
open science

Capacité des protéines du VIH Tat et Nef et des inhibiteurs de la protéase virale à induire une sénescence des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse et à inhiber leur différenciation ostéoblastique

Carine Beaupère

► To cite this version:

Carine Beaupère. Capacité des protéines du VIH Tat et Nef et des inhibiteurs de la protéase virale à induire une sénescence des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse et à inhiber leur différenciation ostéoblastique. *Physiologie [q-bio.TO]*. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066386 . tel-01127399

HAL Id: tel-01127399

<https://theses.hal.science/tel-01127399>

Submitted on 7 Mar 2015

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

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

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

de L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Physiologie, physiopathologie & thérapeutique

Présentée par

Carine BEAUPERE

Capacité des protéines du VIH Tat et Nef et des inhibiteurs de la protéase virale à induire une sénescence des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse et à inhiber leur différenciation ostéoblastique.

Directeur de recherche : Pr. Jacqueline CAPEAU

Encadrante : Dr. Claire LAGATHU-LAFON

Soutenue le : 24 octobre 2014

Devant le jury composé de :

Pr. Bertrand FRIGUET
Pr. Martine COHEN-SOLAL
Pr. Olivier LAMBOTTE
Dr. Michele GOODHARDT
Pr. Jérémie SELLAM

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Résumé

Les patients infectés par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) traités par les antirétroviraux (ARV) ont aujourd'hui une espérance de vie quasi normale. Cependant, ils présentent une augmentation de la prévalence de pathologies classiquement associées au vieillissement, dont l'ostéoporose, suggérant un vieillissement prématuré ou accentué. Les facteurs impliqués sont, entre autres, l'infection par le VIH, les ARV et un état d'inflammation chronique. L'ostéoporose correspond à une déminéralisation, suite à un déséquilibre entre formation (ostéoblastes) et résorption osseuse (ostéoclastes). L'infection par le VIH et les ARV, en particulier les inhibiteurs de protéase (PI), augmentent la prévalence de l'ostéoporose.

Dans ce contexte, je me suis intéressée à l'effet de certaines protéines du VIH et PI sur les précurseurs ostéoblastiques, les cellules souches mésenchymateuses (MSC). Nous montrons que deux protéines du VIH, Tat et Nef, induisent une sénescence prématurée des MSC, associée à un stress oxydant et in fine à un défaut de différenciation en ostéoblastes. Les effets de Tat sont médiés par le facteur pro-inflammatoire et pro-sénescence NF- κ B, et ceux de Nef sont liés à une inhibition de l'autophagie. Nous montrons également que les PI atazanavir et lopinavir associés au ritonavir induisent une sénescence et un stress oxydant du fait de l'accumulation de prélamine A farnésylée toxique conduisant à un déficit de la différenciation ostéoblastique.

Ces travaux montrent que le VIH et certains PI peuvent jouer un rôle délétère sur les MSC, et mettent en lumière certains des mécanismes impliqués dans le vieillissement des patients infectés par le VIH et traités.

Mots clés : protéines du VIH, inhibiteurs de la protéase du VIH, cellules souches mésenchymateuses, sénescence, différenciation ostéoblastique.

Summary

The efficacy of highly active antiretroviral treatment (ARV) has resulted in a considerable improvement in the life expectancy of HIV (Human Immunodeficiency Virus)-infected patients. However, many patients encounter the early occurrence of several common age-related comorbidities, such as osteoporosis, stressing for a premature or accentuated aging process. Proposed pathogenic mechanisms include HIV infection, ARV treatment and chronic inflammation. Osteoporosis is defined by a decrease in bone mineral density, resulting from the alteration of the balance between bone formation (osteoblasts) and resorption (osteoclasts). HIV infection, through the bystander effect of HIV secreted proteins, and ARV, particularly protease inhibitors (PI) increase the prevalence of osteoporosis.

Our studies focused on the capacity of some HIV proteins, and of some PI to alter osteoblast precursors, namely mesenchymal stem cells (MSC). We showed that two HIV proteins, Tat and Nef, induced premature senescence of MSC, associated with an oxidative stress and a decreased osteoblastic differentiation potential. Tat triggered senescence via NF- κ B activation, whereas the effect of Nef was linked to the inhibition of autophagy. We also showed that the PI, atazanavir and lopinavir boosted with ritonavir, induced senescence and oxidative stress through the accumulation of toxic farnesylated prelamin A, thus leading to a decreased osteoblastic differentiation.

Overall, these data show that some HIV proteins and some PI can exert deleterious effects on MSC, resulting in senescence, and highlight several mechanisms which could be involved in the aging process of ART-controlled HIV infected patients.

Key words : HIV proteins, HIV protease inhibitors, mesenchymal stem cells, senescence, osteoblastic differentiation.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury de ma thèse, en particulier le Pr Bertrand Friguet de me faire l'honneur de la présider. Je remercie également le Pr Martine Cohen-Solal et le Pr Olivier Lambotte d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. J'adresse mes remerciements à mes examinateurs, le Dr Michele Goodhardt et le Pr Jérémie Sellam, également tuteur de ma thèse, d'avoir accepté de participer à ce jury et d'avoir accordé du temps à la lecture de ce manuscrit.

Je voulais remercier très chaleureusement le Pr Jacqueline Capeau, d'avoir co-dirigé mes travaux de thèse, et d'avoir été si présente tout au long de ma thèse. Je suis consciente de la chance que j'ai eu d'avoir pu évoluer dans votre équipe, j'ai beaucoup appris à votre contact.

Un très grand merci également au Dr Claire Lagathu-Lafon d'avoir co-dirigé ma thèse. Merci de ta confiance, d'avoir su me laisser mon autonomie, tout en étant très disponible quand il le fallait. Je suis très honorée d'avoir pu être ta première thésarde. Ton efficacité et ta rapidité d'action m'impressionnent beaucoup, je ne désespère pas d'être un jour aussi efficace quand je serais grande.

Je remercie également le Pr Bruno Fève, directeur de l'unité, merci pour ses conseils pour la rédaction de l'article et de la thèse. Merci d'être toujours disponible, et attentif malgré un emploi du temps chargé.

Merci beaucoup à Marie Garcia, mon acolyte de bureau, mon petit chat noir de la manip ;-). Merci de m'avoir accompagné des heures durant au L1 ou au L2 pour des protocoles « un peu » chargés. Merci de ta bonne humeur, pour tous les moments de rigolade partagés au labo, autour d'un verre, en vacances, à torturer le petit Guillaume, toujours avé l'accent. Ça va me manquer tout ça !

Monsieur le docteur Guillaume Bidault, avec ta phobie du 93, la cohabitation n'a pas toujours été facile, loin de là... souvent des projectiles en tout genre ont fusés à travers le bureau, pauvres anglais, quelle folie de t'avoir pris en post-doc ;-)... Mais il faut le reconnaître, le Dr Bidault possède des qualités scientifiques indéniables : une grande assiduité en manip (surtout quand il s'agit de batailles de pissettes...), la main ferme et le geste sûr pour éviter les projections de β -mercaptoethanol, et un goût prononcé pour la bibliographie bien faite en particulier lorsque cela concerne Brain magazine. Merci « ma gueule » pour tous ces moments, notre petit trio avec Marie-Pauline sus-citée aura quand même été des plus explosif !
Merci à vous deux.

Mes petites pommes Bretonnes, les docteurs Anne-Claire Guénantin et Nolwenn Briand, our very talented post-doc. Merci pour tous ces bons moments passés au labo et en dehors. Merci pour les petites virées nocturnes, les sabrages de bouteilles à coup de poteaux, les sessions chouffe, et les chants au labo.

Vous donnez beaucoup à la recherche, et vous méritez vraiment que la recherche vous donne beaucoup en retour, en tout cas moi j'y crois !

Merci également à mes compagnes de galère, les futures docteurs Pauline Afonso et Huong Do, le docteur Camille Vatie. J'ai plus qu'apprécié ces moments passés avec vous ! Pauline, ma jumelle de formation, même master, même spécialité, même labo, et même tâche d'organisation des réunions d'équipe (non non, ne me remercie pas de cet héritage...), on ne pouvait que bien s'entendre, jusqu'à partir en vacances roots ensemble, de grands moments ! Huong, très discrète, mais un pilier du labo, merci pour ta gentillesse et tes fabuleux nems. Vous ferez toutes les deux une brillante carrière, j'en suis sûre ! Docteur Camille, merci pour tout, et bon courage pour la suite, tu es vraiment impressionnante, très brillante, ton grand avenir est déjà en route, une grande dame !

Martine Auclair, que dire à part merci pour tout. Depuis mon arrivée au labo, tu es la référence en matière de manip, la magicienne de la pipette (n'y voyez rien de salace !). On aura quand même eu de bons moments de rigolade, souvent tu m'as conseillé de m'orienter vers une autre carrière au L2 en particulier. J'ai pris en compte tes conseils, mais malheureusement je prend de l'âge et je n'ai pas la vocation ;-).

Dr Martine Caron, un grand merci à vous aussi pour vos conseils. Vous avez toujours été présente quand il le fallait, en toute discrétion. Je vous souhaite le meilleur, et de profiter pleinement de votre retraite bien méritée.

Dr Véronique Béréziat, Madame Béréziat pour les intimes, merci beaucoup pour ta présence, ton empathie, et ta bonne humeur ! J'ai fait ta connaissance il y a quelques années de cela en atelier nutrition, je n'aurais pas imaginé à l'époque aller boire des coups avec ma prof de master, et bien je ne regrette pas ;-). Bonne continuation madame la responsable du master nutrition.

Merci également à la team IPS, le Pr Corinne Vigouroux, Emilie Capel, merci de votre gentillesse, votre savoir faire, et votre implication dans la vie du labo. Emilie la chef organisation du labo, sans toi on se disputerait les cônes, les gants, et on aurait de belles plantations aux L1+, je te souhaite bon courage pour ta thèse, bienvenue au club !! Je m'inquiète pas pour toi, je suis sûre que tu t'en sortira très bien. Corinne, madame la professeur, félicitations, et tout le meilleur pour la suite !

Un grand merci à toi Betty Jacquin pour ta gentillesse et ta disponibilité, tu manqueras beaucoup au labo et à ses occupants.

Merci aux petites dernières du labo, nos chères étudiantes en Master 2, Chloé, Emilie et Vanessa, vous rencontrer aura été un plaisir. Courage Chloé, tu seras un grand médecin, j'en suis sûre !

Je lance aussi une spéciale cacedédi à mes petits camarades des autres étages, co-organisateurs des JED : Quitterie, Anaïs, Nizar, Thanh pour les essentiels (en plus de Pauline of course). Vous faites aussi parti de mon petit monde du labo, ces rencontres heureuses qui nous permettent de passer de bons moments quoi que l'on fasse (comme porter des cartons, et se battre pour des blocs-notes ;-)).

Je rajoute un petit mot spécial pour Thanh, ma voisine dans le 15^{ème}, toujours partante pour tout (enfin surtout quand il s'agit de sortir), tu auras été une de mes surprises de Saint-Antoine, une amie et qui sait peut-être nous retrouverons nous en post-doc également, ce serait cool !

J'ai beaucoup apprécié ces années au labo, l'ambiance conviviale et remercie tous ceux que je n'ai pas encore cités : Marion Buyse, Marthe Moldes, Bénédicte Antoine, Olivier Lascols, Marie-Lise Lacombe, Josépha Couvreur, Sabine Héréro, Yves Chrétien.

Je finirais ces remerciements par mes proches : amis et famille, sans qui je n'en serais sûrement pas là.

Merci à mes amies d'enfance : Claudia, Titine, Titi, Betty, Cindy, Aurélie. Vous êtes là pour moi depuis l'école primaire, le collège, le BTS. Vous m'avez vu évoluer en bien ou en mal (merci de ne pas partager les photos, hein Titine), connaissez tout de moi et êtes toujours présentes, mes plus belles relations ;-) alors merci à vous!

Merci également à mes copains de beuverie de la Fac : Julie, Hugues et le reste de la fine équipe. Il n'y a pas à dire, avec vous tous les petites problèmes du quotidien sont dilués, et heureusement on trouve toujours un problème à résoudre ;-).

Merci à mes co-équipières de basket, et oui je ne fais pas que boire : Julie qui est aussi mon ancienne coloc d'amour, Julie de Dijon et d'ailleurs, Elo, Audrey, Elen, Céc pour la team NPS ; Marie, Lulu, Vaness, Yvon pour la team ALPB.

Enfin, je finirais (pour de bon) mes remerciements par ma famille : Mon frère, Laura et ma petite nièce Ciara, mes grands-parents, cousines, cousins, oncles, tantes, et surtout mes chers parents, sans qui je ne serais rien, et il faut le dire, il leur en aura fallu du courage pour supporter leur tanguette chez eux jusqu'à quasiment 30 ans, merci pour tout, cette thèse est aussi la votre.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	1
INDEX DES ILLUSTRATIONS	5
AVANT-PROPOS	7
INTRODUCTION.....	9
A-Le vieillissement.....	9
B-La sénescence cellulaire.....	11
B-1-Définition et marqueurs de la sénescence cellulaire	11
B-1-1-Définition	11
B-1-2-Caractéristiques et marqueurs de la cellule sénescence.....	11
B-1-3-Cycle cellulaire et sénescence.....	13
-Le cycle cellulaire :	13
-Arrêt du cycle cellulaire en transition G1/S :	13
B-2-Sénescence prématurée induite par un stress (SIPS)	15
B-2-1-Le stress oxydant.....	15
B-2-2-Les dysfonctions mitochondriales	17
B-2-3-Dommages à l'ADN et raccourcissement des télomères	18
B-3-Sénescence et autophagie.....	19
B-3-1-Définition de l'autophagie.....	19
B-3-2-Déroulement de l'autophagie	20
B-3-3-Régulation de l'autophagie	22
-L'autophagie, senseur nutritionnel et énergétique de la cellule	22
-L'autophagie, une réponse aux stress	23
B-3-4-Autophagie et vieillissement	25
B-4-Sénescence et inflammation	25
B-5-La sénescence cellulaire <i>in vivo</i>	29
B-5-1-Accumulation des cellules sénescences avec l'âge.....	29
B-5-2-Les syndromes de vieillissement prématuré.....	29
B-5-3-Epuisement des cellules souches et immunosénescence.....	30
C-Le tissu osseux.....	33
C-1-Physiologie de l'os.....	33
C-1-1-On est tombé sur un os.....	33
C-1-2-Composition du tissu osseux.....	34
-L'organisation des niches au sein de la moelle osseuse.....	34
-La matrice extracellulaire	35
-Les ostéoclastes.....	35
-Les ostéoblastes.....	36
C-1-3-Renouvellement osseux	38
C-2-Les cellules souches mésenchymateuses.....	39
C-2-1-La découverte des MSC, multipotence et plasticité.....	39
C-2-2-Auto-renouvellement et sénescence des MSC	40
C-2-3-Capacité de différenciation des MSC	40
-Focus sur la différenciation ostéoblastique	40
-Focus sur la différenciation adipocytaire	43
C-2-4-Applications cliniques des MSC	45
C-3-La déminéralisation osseuse	45
C-3-1-Ostéoporose et ostéopénie.....	45
C-3-2-Que se passe-t-il au niveau cellulaire ?	46
-Os vieillissant	46

-Défauts de différenciation et/ou de recrutement	46
-Ostéo-immunologie	47
D-Le VIH & les traitements ARV	49
D-1-L'infection par le VIH.....	49
D-1-1-Originine du virus	49
D-1-2-Les phases de l'infection.....	50
D-1-3-Le génome du VIH.....	51
D-1-4-Vue générale du cycle viral.....	52
D-1-5-Les protéines structurales Gag, Pol, Env.....	54
D-1-6-Les protéines régulatrices.....	55
-La protéine Tat.....	55
-La protéine Rev	55
D-1-7-Les protéines accessoires	56
-La protéine Nef	56
-La protéine Vpu	56
-La protéine Vif.....	56
-La protéine Vpr	57
D-1-8-Effets pléiotropes des protéines du VIH	57
-Apoptose.....	58
-Stress oxydant et dysfonction mitochondriales.....	58
-Sécrétion de cytokines et chimiokines.....	58
-Autophagie.....	59
-Longueur des télomères.....	59
D-2-Le traitement par les ARV.....	59
D-2-1-Les premières stratégies anti-VIH.....	60
D-2-2-Les différentes classes de traitement ARV et la résistance aux traitements	60
-Les inhibiteurs de la transcriptase inverse	60
-Les inhibiteurs de la protéase virale.....	62
-Les inhibiteurs de l'intégrase	63
-Les inhibiteurs d'entrée	64
D-2-3-Pharmacologie.....	65
E-Comorbidités observées chez les patients infectés par le VIH sous traitement ARV efficace	67
E-1-Infection par le VIH et vieillissement accentué	67
E-1-1-Survenue précoce des comorbidités.....	67
E-1-2-Marqueurs de vieillissement observés chez les patients infectés par le VIH.....	67
E-1-3-Mécanismes en cause dans le vieillissement accéléré.....	68
E-1-4-Atteintes du tissu adipeux et cardiométabolique	69
E-2-VIH et pathologies osseuses.....	70
E-2-1-Données cliniques : ostéoporose/ostéopénie	71
E-2-2-Données <i>in vitro</i> : Impact du VIH et des ARV sur la balance osseuse.....	72
-Rôle de l'inflammation	72
-Impact des ARV sur les cellules osseuses.....	72
-Impact du VIH sur les cellules osseuses	73
E-3-Conclusion et objectifs des travaux.....	74
II-Résultats	77
A-Etude 1 : The HIV proteins Tat and Nef promote human bone marrow mesenchymal stem cell senescence and alter osteoblastic differentiation.....	77
A-1-Introduction et objectifs de travail	77
A-1-1-Le choix du modèle cellulaire : MSC.....	77
A-1-2-Le choix des protéines du VIH Tat et Nef.....	78

A-1-3-Objectifs de travail.....	79
A-2-Résultats principaux.....	107
A-3-Résultats complémentaires.....	108
A-4-Discussion	111
B-Etude 2 : HIV protease inhibitors induce senescence and alter osteoblastic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells: beneficial effect of pravastatin	113
B-1-Introduction et objectifs de travail.....	113
B-1-1-Objectifs de travail	113
B-1-2-Introduction aux mécanismes de régulation de la prélamine A	113
B-2-Résultats principaux	127
B-3-Discussion.....	129
III-Discussion générale et perspectives	131
INDEX DES ILLUSTRATIONS	137

ABBREVIATIONS

3TC	Lamivudine
ABC	Abacavir
Akt/PKB	Protéine kinase B
ALP	Phosphatase alcaline
AMBRA1	Autophagy beclin-1 regulator 1
AMPK	adénosine monophosphate kinase
APC	Adenomatous polyposis coli
APOBEC3G	Apolipo-protein B mRNA-editing enzyme 3 G
APV	Amprénavir
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATR and Rad 3 related
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudine
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BECN1	Becline-1
BMD	Densité minérale osseuse
BMP	Bone morphogenic protein
BMU	Basal multicellular unit
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CAT	Catalase
CCR5	C-C chemokine receptor type 5
CD4	cluster de différenciation 4
CDK	Cyclin-dependant kinase
CFU-F	Colony-forming unit fibroblastic
CMH-1 & 2	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I & II
CMV	cytomégalovirus
CP450	Cytochromes P450
CTX-NTX	Collagen type 1 cross-linked C telopeptide ou N-telopeptide
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
d4T	Stavudine
ddC	Zalcitabine
ddI	Didanosine
DDR	DNA damage response
Dlx-5	Distal-less homeobox 5
DRV	Darunavir
DS	Deviation standards
DTG	Dalutégravir
EFV	Efavirenz
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ETR	Etravirine
EVG	Elvitégravir
FGF	Fibroblast growth factors
FOXO	forkhead box O
FPLD	Lipodystrophie partielle familiale de Dunnigan
FTC	Emtribacitabin

Gag	group specific antigen
gp120	glycoprotein 120
gp41	glycoprotein 41
GSH	Glutathion peroxydase
GSK3 β	glycogen synthase kinase 3- β
HGPS	progéria de Hutchinson-Gilford
HSC	Cellules souches hématopoïétiques
IDV	Indinavir
IFN γ	Interferon gamma
IGF1	Insulin growth factor 1
IKK	I κ B kinase
IL-6 & 8	Interleukines 6 & 8
IR	Insulin receptor
I κ B	Inhibitor of kappa B kinase
JNK	c-Jun-N-Terminal kinase
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
Lef/Tcf	Lymphoid enhancer-binding factor/T cell factor
LPV	Lopinavir
LTR	Long terminal repeats
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MMPs	Métalloprotéinases
MSC	Cellules souches mésenchymateuses
Msx-2	muscle segment homeodomain (MSH) homeobox protein
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mTOR complex 1
MVC	Maraviroc
NAC	N-acétyl cystéine
Nef	Negative regulatory factor
NES	Nuclear export signal
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NFV	Nelfinavir
NLS	Nuclear localisation signal
NNRTI	Analogues non-nucléosidiques de la transcriptase inverse
NRTI	Analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse
NtRTI	Inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse
NVP	Névirapine
OIS	Sénescence induite par des oncogènes
OPG	Ostéoprotégérine
OSX	Osterix
P-TEFb	positive transcription elongation factor
p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p53	tumor suppressor p53
p62/SQSTM1	sequestosome 1
PI	inhibiteurs de l'aspartyl protéase virale
PI3K	Phosphatidyl inositol 3 phosphate kinase
Pol	Group specific antigen polymerase
POT1	Telomeres protection proteins

PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
pRb	protéine du rétinoblastome
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTH	Hormone parathyroïdienne
RAL	Raltégravir
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
Raptor	Regulating-associated protein of mTOR
RE	Réticulum endoplasmique
Rev	Regulator of expression of virions proteins
RPV	Rilpivirine
RRE	Rev responsive element
RTC	Reverse transcription complex
RTV	Ritonavir
RUNX2	Runt-related transcription factor-2
SAHF	Sénescence associée à des foci d'hétérochromatine
SASP	Phenotype sécrétoire associé à la sénescence
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SIPS	Sénescence induite par un stress
SIRT1	Sirtuine-1
VIS	Virus de immunodéficience simien
SLC	Solute carrier proteins
SOD	Superoxyde dismutase
SQV	Saquinavir
SREBP1	Sterol-regulatory element binding protein 1
T20	Enfuvirtide
TAR	Transactivation response element
Tat	Transactivating Factor
TCR/BCR	T-cell & B-cell receptor
TDF	Ténofovir
TGF- β	Tumor growth factor β
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRF1 ou 2	Telomeric repeat binding factor1 ou 2
TSC1/TSC2	Tuberous sclerosis 1/2
ULK	Unc-51 like autophagy activating kinase
UNG2	Uracyl DNA glycosylase
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
Vif	Viral infectivity factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
Vpr	Viral protein R
Vps34	Vacuolar protein sorting 34
Vpu	Viral protein unique
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family member
ZMPSTE24	Zinc metalloprotéase STE24

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Les caractéristiques de la cellule sénescente	12
Figure 2 : Sénescence et arrêt du cycle cellulaire	14
Figure 3 : Production d'ERO par la mitochondrie	16
Figure 4 : Extrémité télomérique	18
Figure 5 : Déroulement de l'autophagie	22
Figure 6 : La régulation de l'autophagie	24
Figure 7 : Sénescence et inflammation	26
Figure 8 : La voie de signalisation NF- κ B	28
Figure 9 : Structure de l'os.....	33
Figure 10 : Contre-régulation de l'ostéoblaste et de l'ostéoclaste.....	36
Figure 11 : Le remodelage osseux	38
Figure 12 : La différenciation ostéoblastique	42
Figure 13 : La voie Wnt et le contrôle de la différenciation ostéoblastique	43
Figure 14 : La différenciation adipocytaire	44
Figure 15 : Les différentes phases de l'infection par le VIH	50
Figure 16 : Le génome du VIH-1	51
Figure 17 : Le cycle réplcatif du VIH	53
Figure 18 : Le virion infectieux.....	55
Figure 19 : Effets pléiotropes des protéines du VIH.....	59
Figure 20 : Mode d'action des NRTI	61
Figure 21 : Mode d'action des NNRTI	62
Figure 22 : Mode d'action des PI	63
Figure 23 : Mode d'action des inhibiteurs d'intégrase	64
Figure 24 : Mode d'action de l'inhibiteur de fusion	65
Figure 25 : VIH et comorbidités	69

Figure 26 : La moelle osseuse.....	78
Figure 27: Effet des protéines virales sur l'apoptose des MSC	108
Figure 28 : Spécificité de l'effet des protéines du VIH sur les MSC	109
Figure 29 : Immunoprécipitation de la protéine BECN1	110
Figure 30 : Maturation de la prélamine A	114
Figure 31 : Effet des statines sur la voie de synthèse du groupement farnésyl	130

AVANT-PROPOS

Après l'apparition au début des années 80 de nombreux cas de syndromes de l'immunodéficience acquise (SIDA), l'équipe de L. Montagnier et F. Barré-Sinoussi a identifié en 1983 le virus impliqué, dénommé dès lors virus de l'immunodéficience humaine (VIH). A la fin de l'année 1985, l'identification des sujets porteurs du virus a été possible, montrant la présence d'un grand nombre de personnes infectées symptomatiques et asymptomatiques à travers le monde et faisant de l'infection par le VIH une pandémie mondiale. Aujourd'hui plus de 36 millions de personnes sont mortes du SIDA, et 35 millions vivent avec le VIH, avec 2,5 millions de nouvelles infections chaque année (chiffres de l'OMS).

Il n'existe pas à ce jour de traitement curatif, mais après l'apparition des premiers antirétroviraux (ARV) en 1986 avec la Zidovudine (AZT), un traitement ARV efficace est actuellement disponible permettant de diminuer la charge virale jusqu'à un seuil indétectable et de remonter le taux de lymphocytes CD4. Ainsi l'infection par le VIH de nos jours peut être considérée comme une maladie chronique, et les patients infectés ont vu leur espérance de vie augmenter de plusieurs décennies. Les premiers patients traités ont aujourd'hui environ 60 ans, et sont sous traitement ARV depuis quasiment 30 ans. Cette population présente souvent un certain nombre de comorbidités, dont la plupart sont classiquement associées au vieillissement, suggérant que ces patients pourraient présenter un vieillissement accentué. Les complications identifiées sont multiples, et concernent en premier lieu des atteintes cardiovasculaires, notamment l'athérosclérose et des cancers non classant SIDA, mais également des atteintes métaboliques comme le diabète, les dyslipidémies et les lipodystrophies, des atteintes neurologiques, et des atteintes osseuses, notamment une augmentation de la prévalence de l'ostéopénie et de l'ostéoporose comparativement à la population générale du même âge.

Mes travaux de recherche se sont portés sur la compréhension, à l'aide de modèles *in vitro*, de certains mécanismes en cause dans les complications osseuses, notamment dans la déminéralisation osseuse dans le cadre de l'infection par le VIH. Les différentes études cliniques faites à ce jour ont pu montrer que le traitement ARV et en particulier les molécules de la classe des inhibiteurs de la protéase virale (PI), mais aussi l'infection par le virus étaient associés à la baisse de la densité minérale osseuse chez les patients sans que les mécanismes en cause ne soient clairement identifiés.

L'os est un organe en perpétuel renouvellement, et l'équilibre entre formation osseuse assurée par les ostéoblastes dérivant des cellules souches mésenchymateuses (MSC), et résorption osseuse assurée par les ostéoclastes dérivant des cellules souches hématopoïétiques (HSC) est responsable de la densité

minérale osseuse. Le virus et les PI semblent agir sur la formation et aussi la résorption osseuse, induisant une activité ostéoclastique augmentée et une activité ostéoblastique diminuée.

Dans ce contexte, je me suis intéressée à l'effet à long terme des PI, en particulier le Lopinavir (LPV) et l'Atazanavir (ATV) et de certaines protéines du VIH en particulier les protéines Tat et Nef sur les MSC de la moelle osseuse qui sont les précurseurs ostéoblastiques.

Ce travail a permis de montrer que les PI en particulier l'ATV et le LPV et les protéines du VIH Tat et Nef induisaient la sénescence des MSC. Nous avons pu mettre en lumière différents mécanismes impliqués : les effets de Tat sont très probablement médiés par une activation du facteur de transcription pro-inflammatoire et pro-sénescence NF- κ B, conduisant à une inflammation et des dysfonctions mitochondriales augmentées, tandis que la protéine Nef agit en inhibant l'autophagie un processus de dégradation des déchets cellulaires, ayant un rôle cytoprotecteur (partie B des résultats). Par ailleurs l'ATV/r et le LPV/r induisent une accumulation de prélamine A farnésylée toxique pour la cellule qui est responsable d'une sénescence cellulaire et d'un stress oxydant (partie B des résultats). Enfin la sénescence induite par les protéines du VIH et par les PI va être responsable d'un défaut de différenciation ostéoblastique des MSC.

Ces données sont nouvelles, car elles ont tout d'abord permis de montrer qu'au delà de la dysfonction ostéoblastique, le vieillissement des précurseurs des ostéoblastes peut participer à un défaut de différenciation et d'activité des cellules ostéoformatrices. Le traitement à long terme est aussi une originalité, et semble pertinent dans le contexte du vieillissement des patients infectés traités. Enfin, aucune étude n'a jamais montré que les protéines virales Tat et Nef pouvaient induire une sénescence cellulaire.

Pour présenter ces travaux, l'introduction s'articulera autour de quatre grands chapitres, le premier porte sur le vieillissement et la sénescence cellulaire, ainsi que sur les grands mécanismes impliqués particulièrement dans la sénescence induite par un stress. Le second chapitre aborde la physiologie et la physiopathologie du tissu osseux et les mécanismes régulant le recrutement et la différenciation des MSC. Le troisième chapitre traite de l'infection par le VIH et des traitements antirétroviraux. Enfin le quatrième et dernier chapitre permet d'introduire les comorbidités associées au VIH et plus particulièrement les complications osseuses dans le contexte du vieillissement de l'individu.

INTRODUCTION

A-Le vieillissement

Le vieillissement est un processus physiologique qui correspond à un inévitable et progressif déclin des fonctions physiologiques avec l'âge. Démographiquement, il est caractérisé par une augmentation, dépendante de l'âge, du risque de mortalité et un déclin ou une interruption de la capacité reproductive (Vina et al. 2007). Il s'associe à des dysfonctions tissulaires générant des comorbidités qui touchent presque tous les organes, à des degrés différents selon les individus. Ces dysfonctions peuvent être de type déficitaire (insuffisance) ou prolifératif (cancers). Les pathologies classiquement associées au vieillissement sont nombreuses et plus ou moins fréquentes selon le tissu concerné.

La baisse d'activité physique et le mode de vie contribuent à une augmentation des troubles métaboliques au cours du vieillissement. En effet, il a été constaté une augmentation dépendante de l'âge de la résistance à l'insuline, de l'obésité, et des atteintes métaboliques (Grinker et al. 1995, Denys et al. 2009, Stessman et al. 2014). L'âge avancé est aussi un facteur de risque majeur de survenue des maladies cardiovasculaires. Différents stress, comme l'inflammation chronique, le stress oxydant et les troubles métaboliques, connus pour augmenter au cours du vieillissement sont impliqués dans une détérioration des tissus vasculaires et cardiaques (North et al. 2012, Hall et al. 2013, Corella et al. 2014).

Le vieillissement est aussi associé à une augmentation de la prévalence de cancer dans la population. Ainsi d'après une étude de l'institut national sur le cancer (américain, national Cancer Institute), 54% de tous les cas de cancers sont retrouvés sur des personnes de plus de 65 ans (Dodd 1991, Yancik 1997, Hansen 1998).

Par ailleurs l'âge est associé à une augmentation des désordres du système nerveux central, avec une augmentation des troubles cognitifs, des pertes de mémoires, de capacité auditive, de l'équilibre, du contrôle moteur, conduisant à une rapide perte de qualité de vie, et une augmentation des autres pathologies (Hall et al. 2013).

Enfin, les personnes âgées présentent une perte progressive de la densité minérale osseuse chez les hommes et encore plus chez les femmes après la ménopause. En dehors de l'âge, plusieurs facteurs sont impliqués dans cette déminéralisation tels que le mode de vie ou la diminution des hormones sexuelles (oestrogènes, et testostérone). Les atteintes osseuses peuvent être également secondaires à certaines pathologies rénales et à certains traitements, comme les corticoïdes (Looker et al. 1997, Banu 2013).

Ainsi l'incidence des fractures augmente au cours du vieillissement de 1% à 13,6% chez l'homme et de 4% à 29,3% chez la femme entre 50 et 75 ans (Cummings et al. 2002).

Il est important de noter que 55 à 98 % des personnes âgées de plus de 65 ans présentent plusieurs comorbidités, conduisant à une situation de multimorbidités, dont la prise en charge est difficile (Marengoni et al. 2011). Les facteurs de risque associés à l'apparition de multimorbidités au cours du vieillissement ne sont pas totalement connus. Néanmoins l'inflammation chronique à bas grade (comme montré par l'augmentation d'IL-6) est associée à l'apparition des multimorbidités (Vasto et al. 2007, Fabbri et al. 2014) et à l'origine du concept « d'inflammaging » (Franceschi et al. 2007).

Pourquoi vieillit-on ? Quand commence t'on à vieillir ? Y a-t'il une limite à la longévité d'un individu ? Toutes ces questions sont au coeur des études sur le vieillissement depuis plus d'une centaine d'années, sans pour autant avoir trouvé de réponses formelles. Néanmoins deux grandes théories du vieillissement s'opposent : le vieillissement programmé, décrivant le vieillissement comme une sorte d'échéancier biologique, issu de la sélection naturelle, suggéré par A. Weismann en 1882 (Goldsmith 2004) et la théorie du vieillissement non programmé, sous-produit de la sélection naturelle, lié à l'accumulation stochastique de dommages et de mutations délétères chez l'individu âgé émise par P. Medawar en 1946. Beaucoup d'arguments recueillis au moyen d'études sur des modèles animaux ou cellulaires viennent aujourd'hui étayer ces deux théories. En particulier l'étude de la sénescence cellulaire a permis de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le vieillissement tissulaire et cellulaire.

B-La sénescence cellulaire

B-1-Définition et marqueurs de la sénescence cellulaire

B-1-1-Définition

Suggéré par A. Weismann au 19^{ème} siècle, confirmé par L. Hayflick en culture cellulaire, en 1961, le vieillissement de l'organisme peut s'expliquer par le vieillissement de ses cellules somatiques, conduisant à un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire, et donc à une absence de renouvellement des cellules et tissus endommagés (Hayflick et al. 1961). La sénescence est un état cellulaire viable distinct de l'arrêt de croissance temporaire observé dans les cellules fonctionnelles (Reddel 1998). *In vitro*, des passages répétés de cellules en culture montrent une réduction de la densité cellulaire et une augmentation du temps de doublement de la population cellulaire. En parallèle, le nombre de cellules en sénescence augmente à chaque passage et est dépendant de l'âge du donneur, suggérant que la sénescence est une caractéristique de l'âge cellulaire (Campisi 1996, Smith et al. 1996). La sénescence cellulaire est multifactorielle. On distingue néanmoins trois types de sénescence : la sénescence répliquative associée à un raccourcissement des télomères, la sénescence prématurée induite par un stress (SIPS), et la sénescence induite par les oncogènes (OIS). Néanmoins indépendamment de l'origine, la cellule sénescence présente des caractéristiques et marqueurs communs, décrits dans le paragraphe suivant.

B-1-2-Caractéristiques et marqueurs de la cellule sénescence

La caractéristique la plus évidente de la sénescence cellulaire est l'arrêt de la croissance cellulaire, avec un arrêt du cycle cellulaire en phase de transition G1/S (Sherwood et al. 1988, Cristofalo et al. 1993). Diverses modifications phénotypiques sont aussi caractéristiques de la sénescence, comme un élargissement et un étalement des cellules. Les cellules sénescences présentent des modifications du cytosquelette et un élargissement de leurs noyaux et de leurs nucléoles (Bayreuther et al. 1988). Au niveau nucléaire, l'utilisation d'un marqueur de l'ADN tel que le DAPI montre l'apparition dans les cellules sénescences de foyers d'hétérochromatine (chromatine condensée, transcriptionnellement inactive). Ces foyers sont appelés SAHF, pour senescence-associated heterochromatin foci (Narita et al. 2003) (Figure 1). Par ailleurs, on observe au cours de la sénescence une augmentation de l'activité lysosomale, une accumulation d'agrégats lipido-protéiques (lipofuscine), ainsi qu'un phénotype sécrétoire particulier appelé SASP (Senescence associated secretory phenotype) (Campisi et al. 2007).

La détection de la lipofuscine mais aussi le marquage positif de l'activité β -galactosidase à pH6 sont très utilisés comme marqueurs de la sénescence cellulaire. La β -galactosidase est une hydrolase, active strictement dans les lysosomes à pH4. La détection dans les cellules sénescences de l'activité β -

galactosidase à un pH plus élevé, résulterait de l'augmentation au cours du vieillissement du volume et de l'activité lysosomale (Kurz et al. 2000)(Figure 1).

Enfin, l'entrée en sénescence des cellules induit une résistance à la mort programmée par apoptose. En effet, les cellules sénescents expriment des protéines anti-apoptotiques mais aussi la protéine p53, qui en bloquant le cycle cellulaire empêche l'entrée en apoptose (Jackson et al. 2006) (Figure 1).

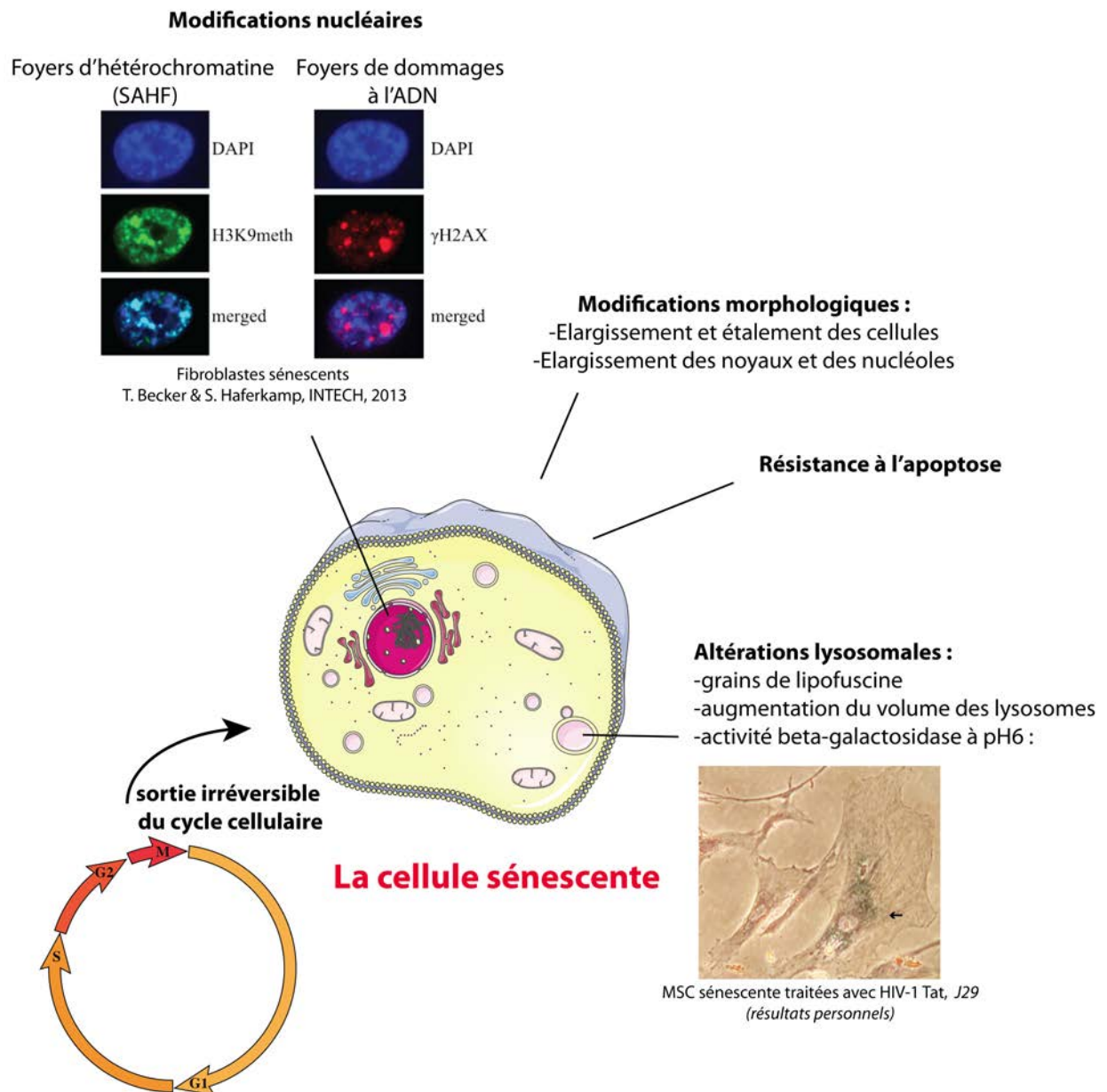


Figure 1 : Les caractéristiques de la cellule sénescente : plusieurs caractéristiques sont associées à la sénescence cellulaire. La première commune à toutes les formes de sénescence est une sortie irréversible du cycle cellulaire, souvent accompagnée de foyers d'hétérochromatine (SAHF), perpétuant l'arrêt du cycle cellulaire. Dans certains cas la sénescence est associée à des dommages de l'ADN, mis en évidence par l'accumulation d'histones γ H2AX. La cellule sénescente présente également des modifications morphologiques, une résistance à l'apoptose et des altérations lysosomales traduisant un défaut de dégradation des déchets macromoléculaires.

B-1-3-Cycle cellulaire et sénescence

-Le cycle cellulaire :

Le cycle cellulaire est composé de quatre phases permettant la division cellulaire : la phase G1 est une phase de préparation à la réplication de l'ADN, la cellule est sensible pendant cette phase aux signaux mitogéniques qui permettront d'enclencher la phase S, au cours de laquelle a lieu la réplication de l'ADN à proprement parler. La phase G2 prépare les cellules à la mitose qui va avoir lieu en phase M, au cours de laquelle le matériel génétique est rigoureusement réparti entre les deux cellules filles. En parallèle de la phase G1, les cellules peuvent également se trouver à un stade quiescent de non-division G0. Elles auront alors besoin d'être activées par des signaux mitogéniques afin de réintégrer le cycle cellulaire (Coller 2007) (Figure 2). Il est important à ce point de distinguer cellule quiescente, et cellule sénescence. Les cellules sénescence ne peuvent pas réintégrer le cycle cellulaire (Sherwood et al. 1988, Cristofalo and Pignolo 1993), même si ces cellules restent métaboliquement actives (Matsumura et al. 1979).

La transition entre les différentes phases du cycle cellulaire se fait sous le contrôle de complexes cycline/CDK. Plus particulièrement l'activation de la phase S est dépendante de la libération du facteur de transcription E2F, ce-dernier est séquestré en phase G1 par la protéine pRb. En réponse aux signaux mitogéniques, les complexes cycline D/CDK4-6 et cycline E/CDK2 en phosphorylant pRb permettent la libération d'E2F et donc le passage G1/S (Coller 2007)(Figure 2).

-Arrêt du cycle cellulaire en transition G1/S :

La sénescence est caractérisée par une inhibition de kinases cycline-dépendantes, en particulier celles régulant la transition G1/S. Deux voies de signalisation essentielles sont impliquées dans l'induction de la sénescence :

-La voie p53-p21-pRb : Différents stress comme la réduction de la taille des télomères, les radiations, le stress oxydant, un stress oncogénique vont induire la DDR (DNA damage response), se traduisant par l'activation des checkpoint-kinases ATM/ATR, CHK1/2, et l'activation par phosphorylation de p53 (d'Adda di Fagagna et al. 2003, Gire et al. 2004). Diverses études ont pu montrer l'importance de ce facteur de transcription, suppresseur de tumeur, dans l'activation de la sénescence, puisque l'inhibition de p53 retarde l'apparition de la sénescence réplivative dans des cellules humaines (Beausejour et al. 2003). Un des gènes cibles de p53 est le gène p21^{CIP1/WAF1} dont l'expression augmente au cours de la sénescence. p21 est une protéine inhibitrice des complexes cycline-CDK induisant une séquestration d'E2F et donc un arrêt du cycle cellulaire (Figure 2).

-La voie p16-pRb : L'autre voie d'induction de la sénescence fait appel à l'activation de p16-pRb. Tout comme p21, p16^{Ink4A} est aussi un inhibiteur des cycline-CDK (Figure 2). Les voies d'activation de p16 sont moins bien comprises que celles de p53, néanmoins p16 est souvent mise en cause dans la sénescence induite par un stress (SIPS). A contrario de p53, p16 n'est par contre pas activée lors de la sénescence réplivative (Lanigan et al. 2011).

L'inactivation de p53-p21 et p16-pRb est souvent nécessaire pour abroger la sénescence cellulaire, indiquant que ces deux voies agissent en parallèle (Wei et al. 2003). p21 et p16 induisent une hypophosphorylation de pRb, et donc une répression des gènes cible de E2F, pérennisée par l'accumulation de foyers d'hétérochromatine, les SAHF, autour des régions promotrices des gènes cibles d'E2F (Narita et al. 2003, Lanigan et al. 2011).

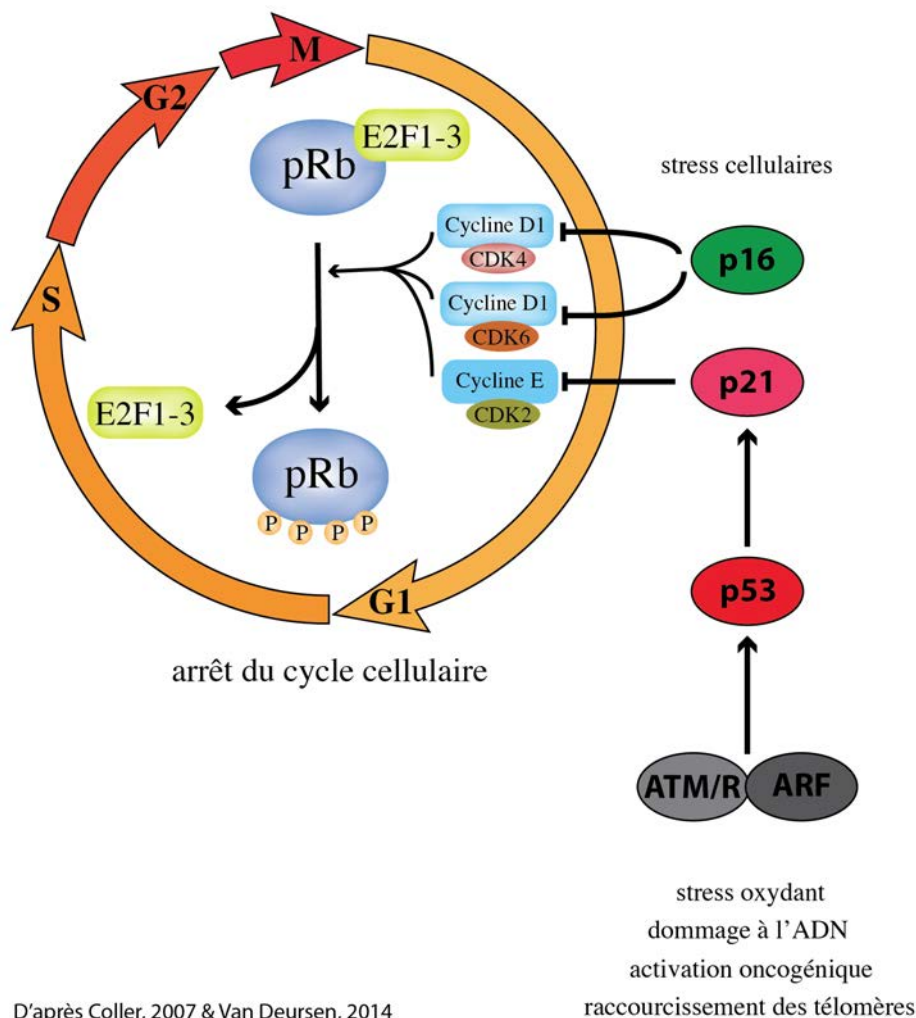


Figure 2 : Sénescence et arrêt du cycle cellulaire : CDK : Cyclin-dépendant kinase ; P : Phosphorylation ; pRb : Protéine du rétinoblastome ; ATM : ataxia telangiectasia mutated ; ATR : ATR and Rad3 related ; ARF : protéine p14ARF.

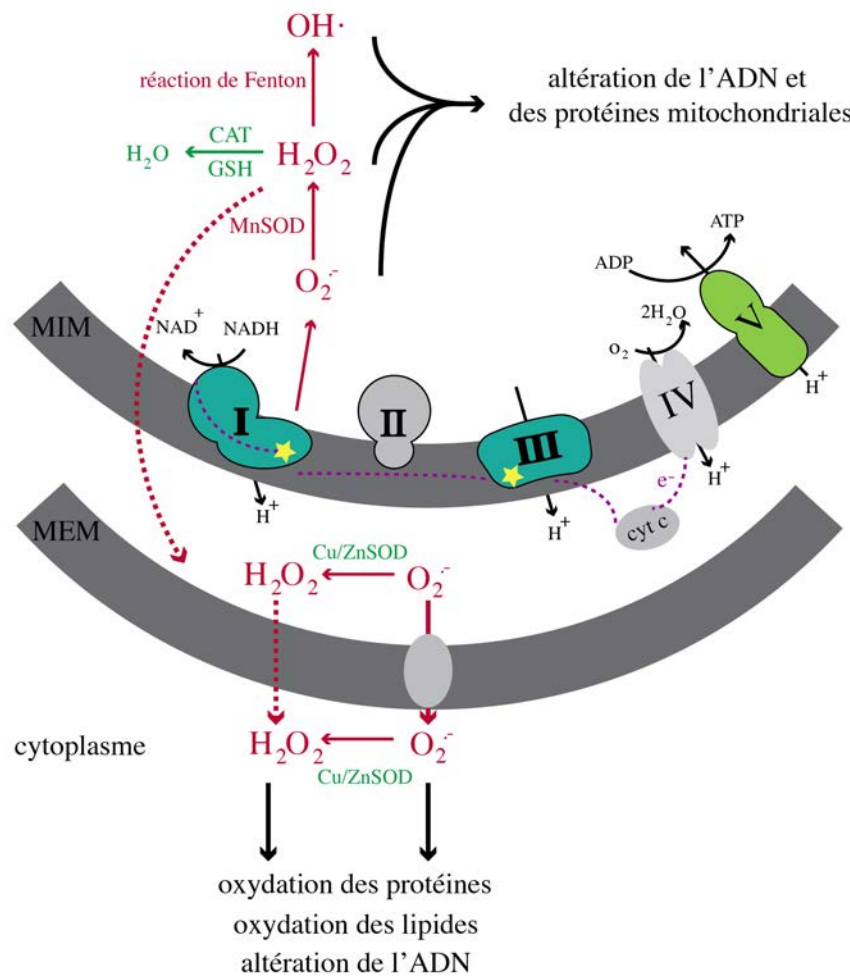
La sénescence replicative, caractérisée par un raccourcissement de la taille des télomères, la sénescence induite par un stress et la sénescence induite par les oncogènes activent donc les protéines d'arrêt du cycle cellulaire, permettant l'instauration de la sénescence. Dans la suite de l'exposé nous décrirons la sénescence induite par un stress.

B-2-Sénescence prématurée induite par un stress (SIPS)

Outre la réduction mitotique de la taille des télomères, un certain nombre de facteurs peuvent accélérer ou induire la sénescence *in vivo* et *in vitro*, entraînant un arrêt de prolifération prématuré. Dans les cellules humaines, nombre de modèles de sénescence prématurée ont été proposés. Plusieurs types de dommages cellulaires contribuent à la SIPS, nous nous intéresserons ci-dessous au stress oxydant, aux dysfonctions mitochondriales et aux dommages à l'ADN (Kirkwood 2005). La SIPS coïncide avec l'activation du locus *INK4a/ARF* induisant la sénescence via les voies p16-pRb et ARF-Mdm2-p53 (Gire 2005). Nous discuterons ensuite le rôle de l'autophagie et de l'inflammation, dont les dérégulations sont fortement associées au vieillissement.

B-2-1-Le stress oxydant

Comme suggéré par D. Harman il y a 50 ans (Harman 1956) le vieillissement peut résulter de l'accumulation d'effets délétères causés par les radicaux libres. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) correspondent à un groupe de molécules chimiquement réactives dérivées d'une réduction partielle de l'O₂. Une des sources majeures d'ERO est l'anion superoxide O₂⁻, produit majoritairement au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il est issu d'une perte d'électron lors de la réduction de l'O₂ (Figure 3). Une autre source majeure d'O₂⁻ est la NADPH-oxydase cytoplasmique. L'O₂⁻ est très instable, toxique et est donc rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène H₂O₂ par les enzymes antioxydantes, superoxide dismutases (SOD): la MnSOD (manganèse SOD) pour la mitochondrie, les Cu et ZnSOD pour les formes cytosoliques et extracellulaires (Figure 3). Moins toxique que l'O₂⁻, H₂O₂ diffuse facilement à travers les membranes, et s'il n'est pas dégradé en H₂O par les catalases, ou les peroxydases (dont la glutathione peroxydase GPx), il va être transformé en radical hydroxyl OH⁻, via la réaction de Fenton (Figure 3). Le radical OH⁻ est très réactif, et va causer des dommages à diverses molécules comme les acides nucléiques, les protéines et lipides (Labunskyy et al. 2013) (Figure 3).



D'après Batty E., 2009

Figure 3 : Production d'ERO par la mitochondrie : Espèces réactives de l'oxygène (ERO) : H₂O₂, O₂⁻, ·OH. Elles sont produites au niveau des complexes I et III de la chaîne mitochondriale (étoile) au cours de la respiration. Elles sont prises en charge par les défenses antioxydantes, SOD : Superoxyde Dismutase, GSH : Glutathion peroxydase, CAT : catalase. MIM/MEM : membranes interne et externe de la mitochondrie.

Les ERO sont très utilisés dans la signalisation cellulaire, en particulier dans la réponse aux stress : inflammation, induction de l'autophagie, mais aussi dans la croissance et le développement. Elles jouent un rôle dual, favorables en concentration modérées, délétères lorsqu'elles s'accumulent (Labunskyy and Gladyshev 2013).

Tandis que les cellules jeunes sont capables de se défendre efficacement contre un stress oxydant, l'incapacité de la cellule âgée à répondre aux dommages cellulaires va conduire à une diminution des défenses antioxydantes et à l'accumulation de facteurs pro-sénescents, comme des altérations de l'ADN et l'accumulation de protéines oxydées (Squier 2001, Jung et al. 2009). En effet, diverses études ont pu montrer dans les tissus âgés l'existence de mutations de l'ADN mitochondrial, associées à une augmentation de la production d'ERO par les mitochondries (Capel et al. 2005, Maynard et al. 2009).

Aussi, dans divers modèles animaux (C. Elegans, Drosophile, Souris), l'augmentation de la résistance au stress ou la diminution de la production de radicaux libres augmente la longévité (Finkel et al. 2000). Cependant, des souris mutées pour certaines enzymes antioxydantes (SOD2, SOD1, ou la catalase) présentent bien une élévation de production d'ERO, mais cela n'altère pas leur longévité. De la même façon, la prise d'antioxydants par les humains, ou les souris n'a quasiment pas d'impact sur la durée de vie, suggérant que les ERO ne sont pas les seules impliquées dans l'induction de la sénescence (Huang et al. 2000, Van Remmen et al. 2003, Chen et al. 2004, Ran et al. 2007).

B-2-2-Les dysfonctions mitochondriales

L'ADN mitochondrial situé à proximité d'une source de production d'ERO est l'un des premiers touché par le stress oxydant. Les mutations et délétions de l'ADN mitochondrial vont conduire à la formation de protéines non ou dys-fonctionnelles. En particulier certains composants de la chaîne de transport d'électron vont être altérés, amplifiant la production d'ERO, créant ainsi un cercle vicieux (Dai et al. 2014). Justifiant le faible effet des traitements antioxydants, cette théorie mitochondriale du vieillissement suggère que les ERO mitochondriales seraient les plus impliquées dans le vieillissement, et que c'est la faible distribution des antioxydants dans la mitochondrie qui explique leur inefficacité. En faveur de cette hypothèse, les souris transgéniques sur-exprimant la catalase dans les mitochondries présentent une augmentation de la longévité (Schriner et al. 2005). Il a été constaté au cours du vieillissement une augmentation des dommages à l'ADN mitochondrial beaucoup plus importants que ceux causés à l'ADN nucléaire (Lee et al. 2010). De plus, dans certaines pathologies comme l'infection par le VIH, il a été observé un vieillissement de la population associé avec une accumulation prématurée d'ADN mitochondrial muté dans le muscle (Payne et al. 2011). Au cours du vieillissement, il y a une accumulation de mitochondries géantes, dysfonctionnelles, présentant une diminution du potentiel de membrane mitochondrial (Mammucari et al. 2010).

La mitochondrie est également un acteur majeur de la voie intrinsèque d'induction de l'apoptose. Brièvement, suite à différents stimuli comme un stress oxydant et/ou des dommages à l'ADN, la translocation et l'oligomérisation de la protéine Bax va induire le relargage du cytochrome C (cyt C) hors de la mitochondrie via l'ouverture des pores de transition membranaire mitochondriaux (mPTP), la déstabilisation du potentiel de membrane et la rupture de la membrane externe de la mitochondrie. Dans le cytoplasme le cyt C va ensuite activer des protéases pro-apoptotiques, les caspases, ces-dernières induisant l'apoptose en clivant un certain nombre de substrats cellulaires comme les lamines nucléaires (Wang et al. 2009).

Les ERO et les mitochondries sont donc au carrefour de la signalisation entre mort cellulaire et sénescence. Les ERO sont des molécules importantes de la signalisation cellulaire mais un stress oxydant trop important est néfaste pour la cellule. Cette-dernière va réagir en activant des mécanismes de défense, comme les enzymes antioxydantes ou l'autophagie, mais si les défenses sont dépassées, les ERO vont induire la mort cellulaire notamment via l'apoptose (Simon et al. 2000).

B-2-3-Dommages à l'ADN et raccourcissement des télomères

Les télomères sont des structures composées de protéines et de séquences d'ADN protégeant les extrémités chromosomiques de la dégradation et de la fusion (Armanios et al. 2012) (Figure 4). Ces séquences d'ADN -TTAGGG- sont répétées en tandem, et synthétisées par la télomérase, une ADN polymérase, majoritairement au cours de la vie fœtale, atteignant une longueur moyenne d'environ 10-15kb (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Armanios and Blackburn 2012). Elles forment un échafaudage moléculaire, contenant des sites de liaison sur lesquels peuvent se fixer les protéines télomériques TRF1, TRF2, et POT1 (Figure 4). L'une des fonctions de ces protéines est de séquestrer l'ADN télomérique, formant un complexe ADN-protéines appelé shelterine à l'extrémité des chromosomes eucaryotes, les protégeant ainsi de l'instabilité génomique occasionnée par la dégradation des régions terminales des chromosomes, la fusion des télomères, les recombinaisons inappropriées ou les cassures de l'ADN (Blackburn 2005) (Figure 4).

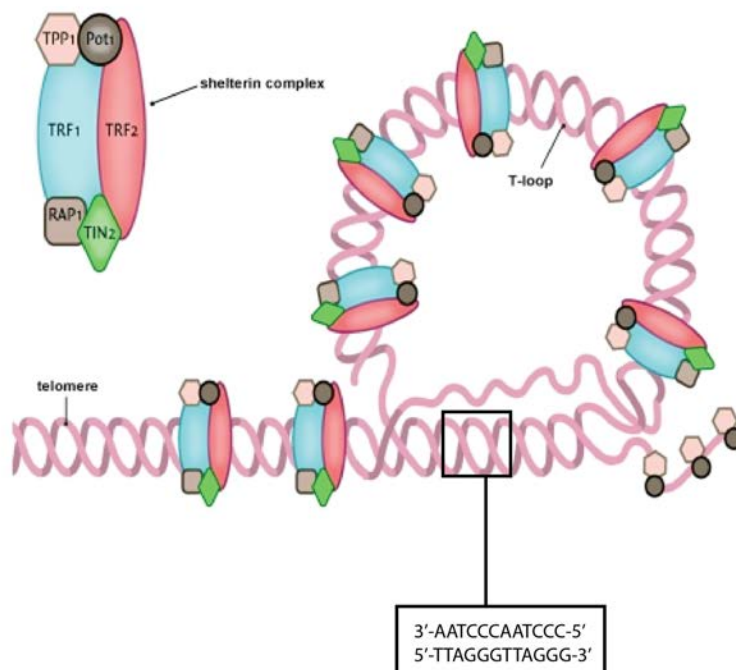


Figure 4 : Extrémité télomérique : TRF1 et 2 : telomeric repeat binding factor 1 et 2 : TPP1 : telomere binding protein 1, TIN2/Pot1 : Telomeres protection proteins

D'après Huzen J., 2008

La télomérase, composée de la ribonucléoprotéine TERT, possédant une activité reverse transcriptase et de la matrice ARN TER, est nécessaire à la réplication de l'ADN télomérique, permettant l'extension 5'-3' de l'extrémité chromosomique. Elle permet de compenser les réductions télomériques occasionnées par les nucléases et par la réplication incomplète de l'ADN terminal (Blackburn 2005). Présente en grande quantité au stade embryonnaire, on ne la retrouve après la naissance, en petite quantité, que dans certaines populations cellulaires somatiques comme la peau, l'intestin et dans les lymphocytes, conférant à ces cellules un avantage prolifératif (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). Quelque soit le type cellulaire une diminution de l'activité télomérase est constatée avec l'âge (Serakinci et al. 2008).

Les dommages à l'ADN causés par un stress oxydant, un mauvais assemblage du complexe shelterine ou une réduction anormale de la taille des télomères, peuvent provoquer l'activation d'une « DNA damage response » (DDR) conduisant à la réparation de l'ADN, à l'apoptose ou à la sénescence cellulaire. Au cours du vieillissement la DDR induit l'activation de protéines senseurs, les kinases ATM/ATR, DNA-PK, puis à la formation de foci de dommage à l'ADN (phosphorylation de l'histone γ H2AX), notamment au niveau des télomères, conduisant finalement à l'induction et à la persistance de la sénescence, via les protéines p53 ou p21 (Hewitt et al. 2012).

Au cours du vieillissement, les protéines et les organites dysfonctionnels s'accumulent. Pour parer à l'accumulation de ces déchets cytoplasmiques, la cellule utilise différents mécanismes de dégradation cytoprotecteurs, dont l'autophagie. Ce processus adaptatif est très impliqué dans la longévité et la réduction de l'autophagie est associée avec un vieillissement prématuré (Rubinsztein et al. 2011).

B-3-Sénescence et autophagie

B-3-1-Définition de l'autophagie

La cellule eucaryote possède deux systèmes de dégradation de ses déchets : le protéasome et l'autophagie. Le protéasome est un processus de dégradation très sélectif des protéines prenant essentiellement en charge les protéines ubiquitinylées, tandis que l'autophagie, beaucoup moins sélective permet la dégradation au sein des lysosomes de macromolécules et de matériel cytoplasmique, y compris des organelles endommagés, en acides aminés et macromolécules qui seront réutilisés par la cellule.

Trois types d'autophagie ont été décrits : la macroautophagie, la microautophagie, et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes. La macroautophagie fait appel à la formation d'une membrane, le phagophore, séquestrant de petites portions de cytoplasme et de ses organites, afin de former une vacuole : l'autophagosome. Ce dernier va fusionner avec les lysosomes, formant l'auto-lysosome, siège

du processus de dégradation. La microautophagie correspond à une insertion de cytoplasme par invagination de la membrane lysosomale. Dans l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes, les substrats protéiques sont transloqués directement à travers la membrane lysosomale après avoir été pris en charge par des protéines chaperonnes (Hsc70). Le terme consensus « autophagie » fait référence au type d'autophagie le plus observé, à savoir la macroautophagie (Mizushima et al. 2011), sur laquelle portera la suite de ce chapitre.

L'autophagie est essentielle pour le développement, la différenciation, la survie et l'homéostasie cellulaire (Mizushima et al. 2008, Kroemer et al. 2010). Une altération de l'autophagie a été montrée dans diverses pathologies neurodégénératives, infections, maladies cardiovasculaires et également au cours du vieillissement.

B-3-2-Déroulement de l'autophagie

L'autophagie est un processus multi-étape complexe finement régulé comprenant initiation, nucléation, expansion de l'autophagosome et enfin la fusion autophagosome-lysosome (Figure 5).

Initiation - La première étape consiste en l'initiation et la nucléation de la membrane qui formera ensuite la vésicule autophagique. En amont de la formation de l'autophagosome, mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), sous l'activation de facteurs de croissance et de nutriments, inhibe l'autophagie et régule la survie et la croissance cellulaire. Lorsque la cellule est riche en énergie, mTORC1 (mTOR Complex 1) composé entre autre de mTOR et Raptor (Regulating-associated protein of mTOR) se lie au complexe ULK (unc-51 like autophagy activating kinase) inhibant ce dernier par phosphorylation. En cas de déficit en nutriments, mTORC1 est inactif et la levée de phosphorylation de ULK va permettre la dissociation de mTORC1-ULK et l'initiation de l'autophagie. ULK va se lier aux membranes permettant ainsi son recrutement au site de formation de l'autophagosome (Hale et al. 2013, Lamb et al. 2013) (Figure 5).

Nucléation - Le complexe ULK en association avec le complexe composé de la phosphatidyl inositol 3 phosphate Kinase (PI3K), de vacuolar protein sorting 34 (Vps34), de Becline-1 (BECN1) et de protéines auxiliaires (ATG14 ou UVRAG ou AMBRA1) va activer la nucléation de l'autophagosome et le recrutement d'autres protéines ATG (autophagy related gene). Le complexe PI3K-BECN1 va avoir différentes actions en fonction des protéines auxiliaires qu'il contient : l'association avec ATG14 ou AMBRA1 (autophagy BECN1 regulator 1) va activer la nucléation de l'autophagosome, tandis que l'association avec UVRAG lui permettra de favoriser la maturation et la formation de l'auto-lysosome (Hale et al. 2013, Lamb et al. 2013) (Figure 5).

Expansion - Après la nucléation, le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 est recruté à la membrane permettant la lipidation des protéines LC3 (Microtubule-associated protein 1 A/MB-light chain 3), GATE16 (Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa) et GABARAP (GABA(A) receptor-associated protein). Ces protéines vont s'associer à la membrane et favoriser l'expansion de l'autophagosome. Tandis que toutes les protéines ATG se dissocient de l'autophagosome mature, les protéines LC3 sont retenues à la surface interne de l'autophagosome jusqu'à sa fusion avec le lysosome (Hale et al. 2013, Lamb et al. 2013) (Figure 5).

Fusion autophagosome-lysosome – Enfin, les autophagosomes sont formés en périphérie de la cellule et migrent le long des microtubules pour rejoindre les lysosomes. Deux types de fusions avec les lysosomes sont observés : une fusion complète des deux membranes, créant un organe hybride, ou un transfert du contenu de l'autophagosome vers le lysosome (Jahreiss et al. 2008). Les lysosomes sont des organites ayant un pH interne bas ($\text{pH} < 5$) contenant des hydrolases acides (protéases, glycosidases, nucléases, lipases, phosphatases) nécessaires à la dégradation des macromolécules et des perméases facilitant l'export de petites molécules issues de la dégradation (Boya 2012). Il est à noter ici que les lysosomes vont dégrader la protéine LC3-II, en faisant un marqueur spécifique de l'autophagosome. Lorsque l'autophagie est activée, le facteur de transcription TFEB est hypophosphorylé, conduisant à sa translocation des lysosomes vers le noyau, où il va activer la transcription de gènes impliqués dans la biogénèse et le fonctionnement des lysosomes, endosomes et autophagosomes. En condition normale, les autolysosomes et endolysosomes sont des organites transitoires (Platt et al. 2012). Mais il a été observé au cours du vieillissement une accumulation de lysosomes dysfonctionnels, participant à l'accumulation dans la cellule de grains de lipofuscine, inversement corrélée avec la longévité (Dimri et al. 1995, Brunk et al. 2002, Kang et al. 2011) (Figure 5).

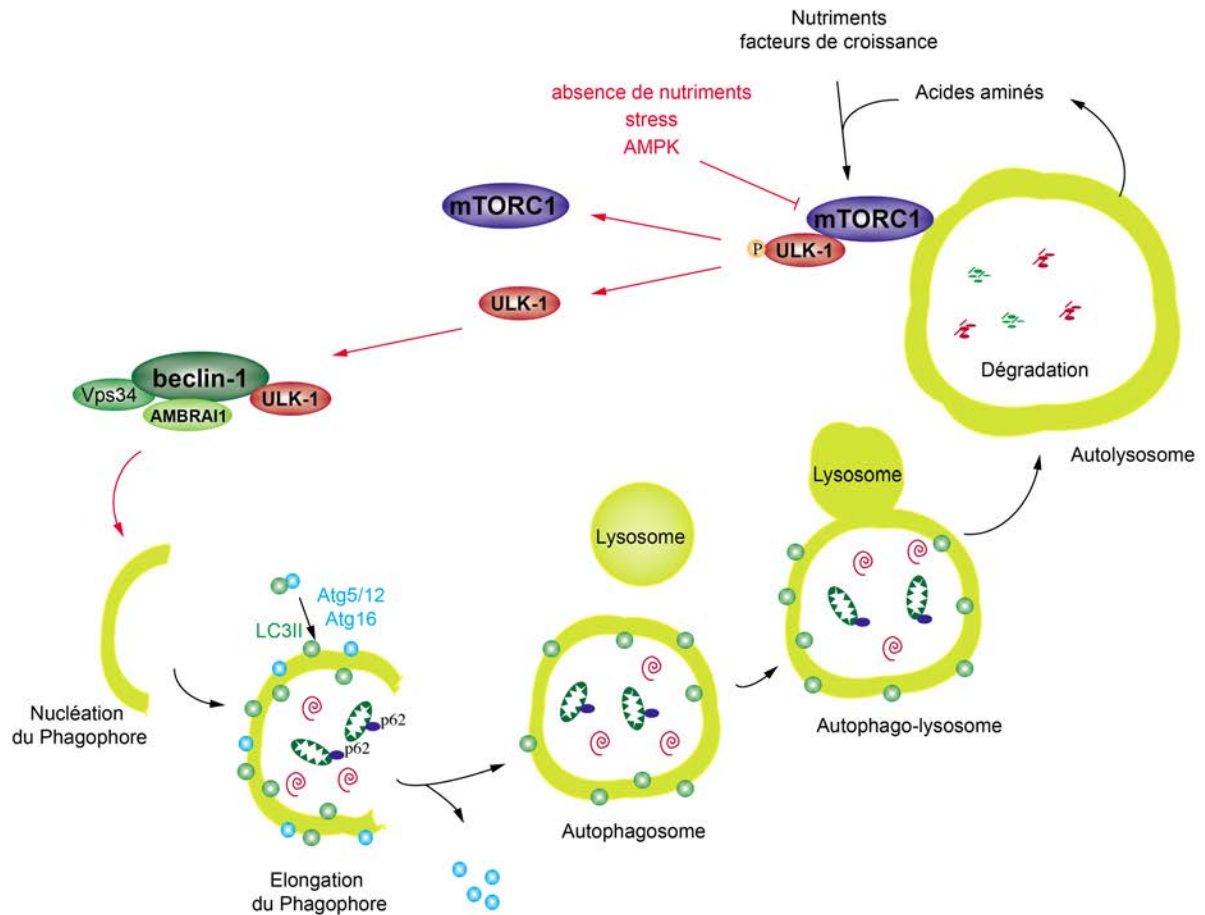


Figure 5 : Déroulement de l'autophagie : Suite à l'inhibition de mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) la kinase ULK-1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1) va induire l'activation du complexe PI3Kinase Beclin-1, permettant la nucléation, l'élongation et la lipidation (LC3II) de l'autophagosome, puis sa fusion avec le lysosome et la dégradation des macromolécules et organites.

B-3-3-Régulation de l'autophagie

Lors d'un stress non léthal tel qu'induit par des variations de l'environnement cellulaire et les signaux extracellulaires comme les hormones, les cytokines ou la présence de pathogènes, la cellule répond en adaptant son métabolisme pour se protéger et survivre. L'autophagie est un processus central dans cette réponse adaptative qui implique différentes voies biochimiques contrôlant l'absorption de nutriments, le métabolisme intermédiaire, le cycle cellulaire et les programmes de survie et mort cellulaire (Kroemer et al. 2010).

-L'autophagie, senseur nutritionnel et énergétique de la cellule

L'une des voies de signalisation principale dans l'activation de mTOR est la voie des facteurs de croissance, comme l'insuline et l'IGF1. Ces facteurs, en se liant à leur récepteur à tyrosine kinase

IR/IGF1R, vont activer Akt via IRS1 et IRS2, inhibant l'activité du complexe TSC1/TSC2, responsable de l'inhibition de mTORC1 (Rubinsztein et al. 2011) (Figure 6).

Les sirtuines (Sirt1) sont des déacétylases NAD-dépendantes inductibles par les stress environnementaux, comme la carence en nutriments. Elles vont activer l'autophagie de plusieurs façons, via l'activation de transcription des différents gènes ATG (atg5, Atg7, LC3), mais aussi en induisant le facteur de transcription FOXO3a, dont diverses cibles sont impliquées dans l'induction de l'autophagie (ULK, beclin-1, Vps34, LC3, GABARAP) (Kroemer et al. 2010) (Figure 6).

Le ratio AMP/ATP dans le cytosol cellulaire est mesuré par l'AMP Kinase (AMPK). L'AMPK agit à plusieurs niveaux : lorsque les niveaux d'AMP sont élevés, l'AMPK active par phosphorylation le complexe TSC, donc inhibe mTORC1 et par ce biais induit l'autophagie. L'AMPK peut également inhiber directement mTORC1 par phosphorylation de sa sous-unité RAPTOR. Enfin l'AMPK peut aussi directement activer ULK1 (Rubinsztein et al. 2011, Lamb et al. 2013) (Figure 6).

-L'autophagie, une réponse aux stress

Tandis que la plupart des stimuli induisant l'autophagie agissent via mTORC1, le déficit en nutriment et le stress du réticulum endoplasmique, via Jnk-1 (c-Jun-N-Terminal kinase-1), l'hypoxie, via le facteur de transcription HIF (hypoxia inducible factor), agissent en dissociant le complexe Bcl-2-BECN1 permettant l'activation de BECN1 (Rubinsztein et al. 2011, Lamb et al. 2013) (Figure 6).

L'autophagie peut être induite suite aux stress oncogéniques, oxydants ou génotoxiques, notamment via p53. p53 peut stimuler l'AMPK ou inhiber Akt via PTEN, induisant l'autophagie (Lionaki et al. 2013) (Figure 6).

Le stress oxydant peut également induire l'autophagie via de nombreux mécanismes ; nous citerons par exemple l'inhibition de mTOR, soit directement, soit via PARP1 (poly ADP-ribose polymérase) suite à des dommages à l'ADN, l'activation de Jnk1 ou de PERK (impliquée également dans le stress du réticulum) (Kroemer et al. 2010).

Une infection virale ou bactérienne peut conduire également à l'induction de l'autophagie via la production de cytokines (IFN γ), secondairement à l'activation de NF- κ B. NF- κ B-p65 peut également activer directement BECN1, induisant l'autophagie. NF- κ B est activée par l'inhibition de l'autophagie, plus particulièrement à cause de l'accumulation de p62/SQSTM1, une protéine dégradée par l'autophagie (Kroemer et al. 2010) (Figure 5).

Le stress du réticulum endoplasmique (RE), médié par le système de réponse aux protéines non correctement repliées (unfolded protein response, UPR) est également un stimulus important de l'autophagie (Kroemer et al. 2010), d'autant plus que le RE est aussi une source capitale pour la formation de la membrane des autophagosomes.

L'autophagie a aussi un rôle central dans le contrôle de la qualité des mitochondries, et par conséquent dans l'élimination de celles qui sont endommagées, par le biais d'une autophagie sélective nommée mitophagie (Wang et al. 2011). En cas de dépolarisation de la membrane mitochondriale la kinase PINK1 s'accumule à la surface de la mitochondrie permettant le recrutement de p62/SQSTM1 et la mitophagie (Kroemer et al. 2010).

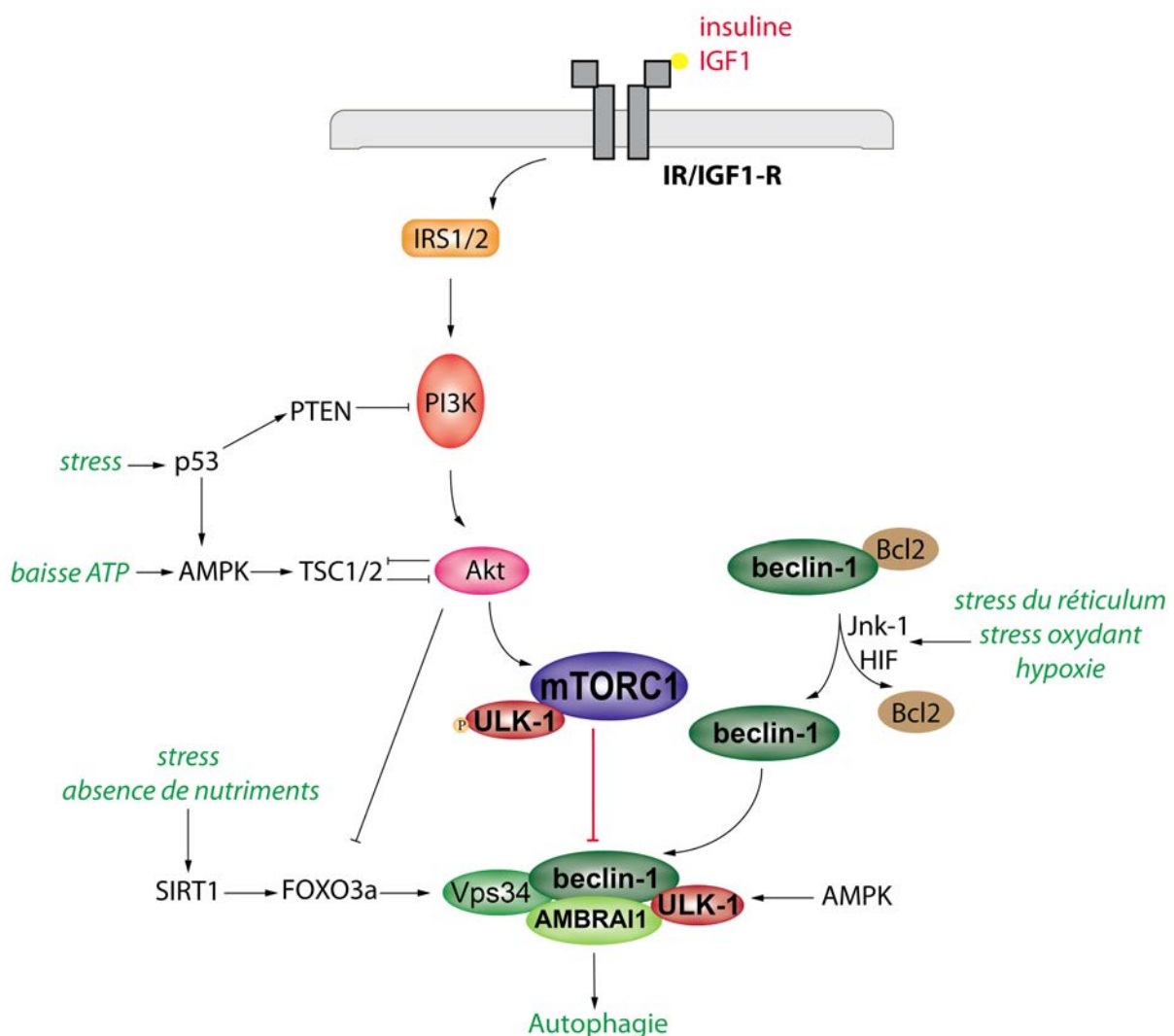


Figure 6 : La régulation de l'autophagie : IRS1 : Insulin receptor 1 ; PI3kinase, Akt/PKB ; AMP Kinase, PTEN : phosphatase and tensin homolog ; TSC1/2 : tuberous sclerosis 1/2 ; Bcl2 : B-cell CLL/lymphoma 2 ; SIRT1 : Sirtuin 1 ; FOXO3a : forkhead box O3 ; Vps34 : phosphatidylinositol 3-kinase ; AMBRA1 : autophagy/beclin-1 regulator 1.

B-3-4-Autophagie et vieillissement

Plusieurs études ont pu mettre en évidence une diminution de l'autophagie au cours du vieillissement *in vivo* et *in vitro* (Rubinsztein et al. 2011). Réciproquement une inhibition de l'autophagie *in vitro* induit la sénescence prématurée de fibroblastes humains (Kang et al. 2011). Chez la souris, un KO tissu spécifique de gènes ATG précipite l'apparition de dysfonctions liées à l'âge dans ces tissus, notamment l'accumulation de lysosomes contenant la lipofuscine, de dysfonctions mitochondriales et de protéines oxydées (Rubinsztein et al. 2011). De même, l'induction de l'autophagie, que ce soit via l'inhibition de la voie insuline-IGF1, ou via la restriction calorique dans divers modèles animaux (du *C. Elegans* au singe Rhesus), augmente la longévité des individus. Et l'inhibition de l'autophagie prévient l'augmentation de la durée de vie induite par la restriction calorique (Levine et al. 2008, Rubinsztein et al. 2011). Ainsi, la restriction calorique induit l'autophagie via l'activation de SIRT1 et de l'AMPK, mais aussi via l'inhibition de l'axe IGF1-Akt-mTOR (Kenyon 2010, Egan et al. 2011)(Figure 6).

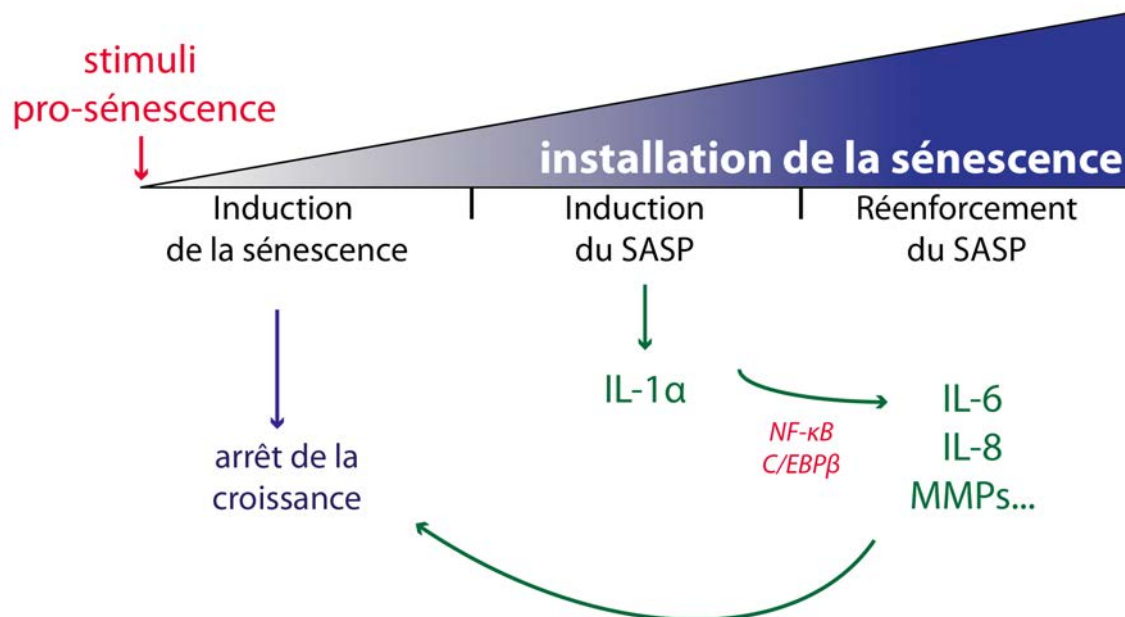
La réduction de l'autophagie au cours du vieillissement est associée avec l'augmentation de pathologies liées à l'âge comme l'ostéoporose. Des souris, avec une déficience pour l'autophagie dans les ostéoblastes, présentent un défaut de différenciation terminale des ostéoblastes et une diminution de la formation osseuse (Liu et al. 2013). De plus des mutations de p62 induisant une activation chronique de NF- κ B-TRAF6, conduisent à une ostéoclastogénèse et un turnover osseux augmentés (Goode et al. 2010). Enfin, un niveau constitutivement élevé d'autophagie a été observé dans les précurseurs ostéoblastiques : les MSCs (cellules souches mésenchymateuses) participant à la maintenance et au renouvellement de ces cellules (Oliver et al. 2012, Lee et al. 2013).

B-4-Sénescence et inflammation

La cellule sénescence a un profil sécrétoire particulier, appelé SASP (senescence-associated secretory phenotype), composé de facteurs de croissance, comme VEGF, EGF, bFGF, de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et immuno-modulatrices : IL-1, IL-6, IL-8, MCP-2, mais aussi de protéases et facteurs remodelant la matrice extracellulaire, le tout lui conférant une activité autocrine ou paracrine (Acosta et al. 2008, Correia-Melo et al. 2014) (Figure 7). Les facteurs de croissance et les protéases composant le SASP sont importants pour la réparation tissulaire, ils participent au recrutement des cellules immunitaires, à l'élimination des pathogènes, à la mobilisation des cellules progénitrices pour la cicatrisation (Krizhanovsky et al. 2008). La fonction première du SASP est donc de corriger les dommages cellulaires et les dysfonctions. Néanmoins le SASP a des effets plus néfastes, il induit la sénescence et l'arrêt de la croissance cellulaire de façon autocrine et paracrine, mais aussi favorise la tumorigénèse, particulièrement via la sécrétion en grande quantité des cytokines et

chimiokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 (Krtolica et al. 2001, Orjalo et al. 2009, Rodier et al. 2011) (Figure 7).

Peu de temps après l'arrêt de sa croissance, la cellule sénescence va sécréter de d'IL-1 α en faible quantité comparativement à IL-6 et IL-8. IL-1 α va néanmoins se lier à son récepteur IL-1R induisant une cascade de signalisation permettant l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et C/EBP β nécessaires à la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 (Orjalo et al. 2009) (Figure 7).



D'après Rodier & Campisi, 2011

Figure 7 : Sénescence et inflammation : SASP : Senescence associated secretory phenotype ; IL-6 : Interleukine-6, IL-8 : Interleukine-8 ; MMPs : Métalloprotéinases ; IL-1 α : Interleukine-1alpha, NF- κ B : Nuclear factor kappa B ; C/EBP β : CCAAT/enhancer binding protein beta.

Le facteur de transcription NF- κ B régule l'expression de nombreux gènes impliqués notamment dans l'inflammation et la réponse cellulaire au stress. C'est le facteur de transcription le plus associé au vieillissement (Adler et al. 2007). NF- κ B est un acteur majeur de la fonction mitochondriale et du stress oxydant. Présent dans la mitochondrie, il régule l'expression de l'ADN mitochondrial (Cogswell et al. 2003, Bakkar et al. 2012). Une augmentation de l'activité de NF- κ B est associée à une augmentation du stress oxydant et des dysfonctions mitochondriales (Mariappan et al. 2010). De plus NF- κ B est connecté à de multiples voies de signalisations impactant la longévité : insuline/IGF1, SIRT, FoxO, mTOR (Tilstra et al. 2011).

Les membres de la famille Rel/NF- κ B, composés de p65/relA, relB, c-rel, p50 et p52, partagent un domaine RHD (Rel Homology Domain) de liaison à l'ADN. En plus de la voie de signalisation en aval de l'IL1-R, il y a beaucoup d'autres activateurs de NF- κ B, notamment les voies de signalisations associées aux TLR (Toll Like Receptor), TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor), TCR et BCR (T-cell & B-cell Receptor), mais aussi secondairement aux dommages à l'ADN, via ATM (Tilstra et al. 2011) (Figure 8).

L'activation de NF- κ B fait appel à deux signalisations : la voie canonique p65/RelA et la voie non canonique p52/RelB. Cependant les réponses aux stress et aux dommages de l'ADN impliquent majoritairement la voie canonique. Brièvement, le complexe IKK γ (NEMO)-IKK α -IKK β , par jeu de phosphorylations, va inhiber I κ B induisant la dégradation de ce-dernier par le protéasome permettant la libération NF- κ B-p65 et sa translocation dans le noyau, où il activera la transcription de nombreux gènes pro-inflammatoires et immuno-modulateurs (Tilstra et al. 2011) (Figure 8).

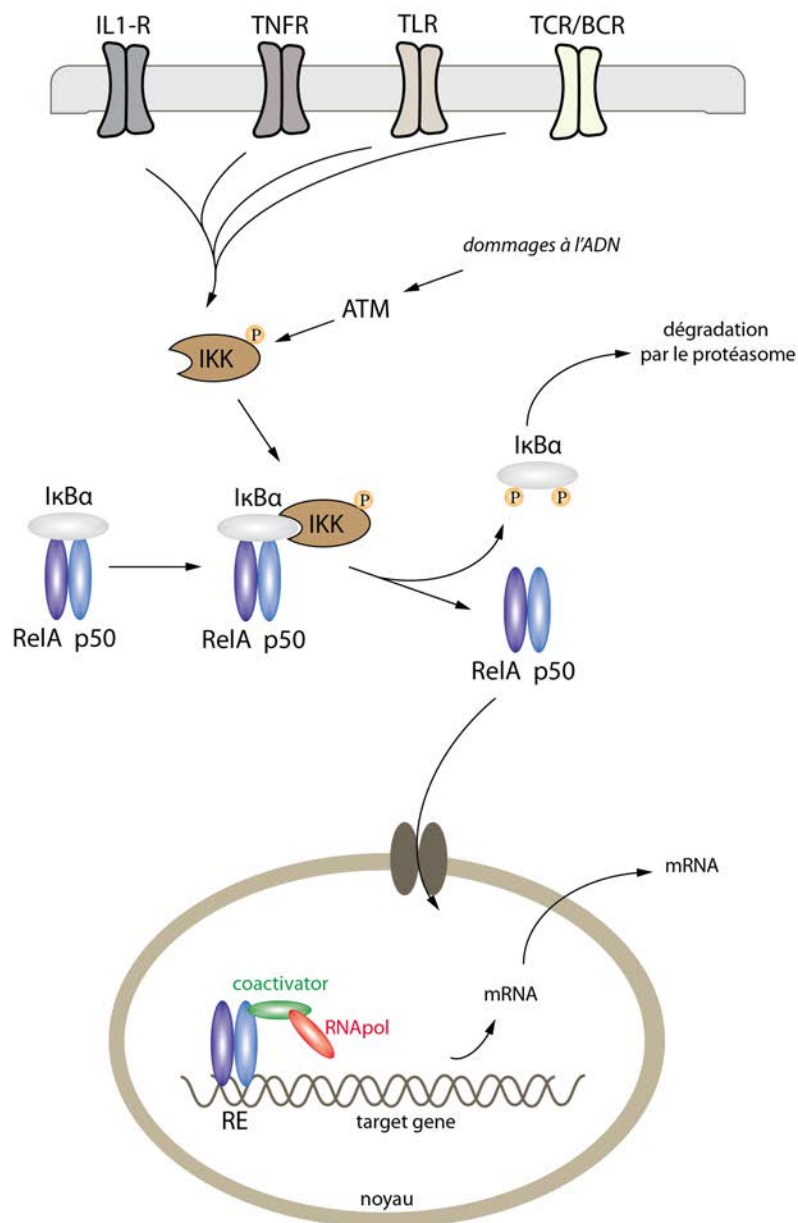


Figure 8 : La voie de signalisation NF- κ B : IL1-R : IL-1 receptor ; TLR : Toll like receptor, TNFR : Tumor necrosis factor receptor ; TCR/BCR : T et B cell receptor ; IKK : I κ B Kinase, I κ Ba : inhibitor of kappaB kinase alpha ; RE : response element, RNAPol : RNA polymerase

Beaucoup d'études ont pu montrer une activation chronique de NF- κ B dans les pathologies liées à l'âge, notamment dans les pathologies osseuses (Berenbaum 2004). Cependant, l'implication de NF- κ B dans l'induction de la sénescence n'a été démontré que récemment, J. Tilstra a ainsi pu montrer que l'inhibition génétique (Knock In) ou pharmacologique (Inhibition de IKK) de NF- κ B chez un modèle de souris progéroïdes, présentant un vieillissement accéléré, retardait la survenue des pathologies et de la sénescence cellulaire, en réduisant le stress oxydant et les dommages à l'ADN (Tilstra et al. 2012).

Au cours du vieillissement, il a été constaté l'installation progressive d'une inflammation de bas grade, à l'origine de la plupart des maladies associées au vieillissement, appelée inflammaging (Franceschi et al. 2007, Chung et al. 2009).

B-5-La sénescence cellulaire *in vivo*

B-5-1-Accumulation des cellules sénescents avec l'âge

Il a été constaté *in vivo*, une accumulation avec l'âge de cellules sénescents dans différents tissus. Au sein des tissus, les cellules exprimant des marqueurs de sénescence sont rares chez les individus jeunes à la différence des individus âgés. En fonction de l'espèce et des tissus il est estimé que les cellules sénescents s'accumulent dans les tissus à hauteur de 1 à 15% (Campisi and d'Adda di Fagnana 2007).

Les cellules sénescents sont retrouvées plus particulièrement dans les tissus affectés par des pathologies liées à l'âge comme la paroi vasculaire dans l'athérosclérose, et le cartilage dans l'arthrose (Chang et al. 1995, Price et al. 2002). Il a été démontré que le système immunitaire pouvait participer à l'élimination des cellules sénescents. Néanmoins on ne sait toujours pas pourquoi les cellules sénescents s'accumulent au cours du vieillissement *in vivo*. Leur implication dans l'induction du vieillissement a pu être montrée, puisque l'élimination des cellules sénescents positives p16^{Ink4a} retarde l'apparition des désordres liés à l'âge chez un modèle de souris BubR1 progéroïde (Baker et al. 2011).

B-5-2-Les syndromes de vieillissement prématuré

Les laminopathies regroupent les maladies dues à des mutations du gène *LMNA*. Elles s'intègrent parmi les « nucléopathies » qui englobent les pathologies liées à des mutations des gènes codant pour les protéines de l'enveloppe nucléaire (Worman 2012). Ces maladies sont dues à des mutations sur les gènes codant la lamine A/C, ZMPSTE24, l'enzyme de maturation de la prélamine A en lamine A, les lamines B, le récepteur aux lamines B ou encore l'émerine. Ces maladies touchent préférentiellement les tissus d'origine mésenchymateuse, comme les tissus musculaires, osseux, cartilagineux, vasculaires, adipeux ou encore la peau. Des syndromes de vieillissement accéléré comme la progéria de Hutchinson-Gilford (HGPS) font partie des laminopathies. Les premiers symptômes apparaissent dans la première année de vie et comprennent retard de croissance, altérations osseuses et de la peau. La mort survient en général à l'adolescence, suite aux atteintes cardiaques (Merideth et al. 2008, Coppede 2013). Cette maladie est due majoritairement à une substitution *de novo* C1824>T du gène *LMNA*. Cette mutation hétérozygote chez les patients est à l'origine de la synthèse d'une prélamine A tronquée de 50 acides aminés au niveau du domaine C-terminal. La délétion touche le site de clivage protéolytique de la ZMPSTE24, empêchant la maturation de la prélamine A. Ce qui va entraîner l'accumulation de

prélamine A tronquée, farnésylée, toxique appelée progérine, à l'origine du vieillissement accéléré (Scaffidi et al. 2008).

Dans cette pathologie sont observés une réduction de la taille des télomères et des dommages à l'ADN, conduisant à une activation de p53, de la sénescence et de l'apoptose. Cela entraîne un défaut de régénération des tissus endommagés, responsable du phénotype de vieillissement accéléré observé.

Il a été démontré également que la progérine s'accumule entre autre dans les cellules souches mésenchymateuses (MSC), rendant la cellule plus sensible au stress oxydant et à la sénescence, confirmant l'importance de cette protéine dans la réponse aux ERO (Boyette et al. 2014). De plus il a été constaté au cours du vieillissement normal une accumulation de progérine et de prélamine A dans les noyaux de certaines cellules (Infante et al. 2014).

B-5-3-Epuisement des cellules souches et immunosénescence

Les cellules souches participent au renouvellement des tissus. Leur vieillissement est responsable du vieillissement tissulaire, particulièrement des tissus possédant un degré élevé de renouvellement cellulaire, comme le système immunitaire.

L'immunosénescence se traduit par une altération avec l'âge de l'activité des cellules souches hématopoïétiques (HSC) dans la moelle osseuse et une involution thymique associées à une réduction progressive du nombre de lymphocytes T CD4+ et CD8+ naïfs, et à une augmentation du ratio cellules mémoires/cellules naïves. Cette sénescence immunitaire participe à l'augmentation des infections, leucémies, et cancers chez les personnes âgées (Appay et al. 2010, Geiger et al. 2013).

Les dysfonctions observées dans les HSC, donnant naissance aux lignées lymphoïdes et myéloïdes, participent au vieillissement de l'immunité innée et adaptative. Ainsi, même si le nombre de HSC multipotentes augmente dans la moelle osseuse des individus âgés, probablement pour compenser un défaut de fonctionnement des cellules, les précurseurs engagés dans la différenciation vers la lignée lymphoïde sont diminués à l'inverse des précurseurs myéloïdes (Kuranda et al. 2011). En accord, il a été constaté dans les HSC sénescents une diminution d'expression des gènes de la lignée lymphoïde et une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, comme NF- κ B et ICAM-1. Parmi les mécanismes impliqués dans la sénescence des HSC sont évoqués la production d'ERO, les dommages à l'ADN et le microenvironnement des cellules. En effet les HSC sont localisées dans des niches au sein de la moelle osseuse composée d'un réseau de vaisseaux, fibres nerveuses, cellules souches mésenchymateuses, adipocytes, ostéoclastes, ostéoblastes et macrophages (voir partie C-1-2). Une niche

âgée pro-inflammatoire, ainsi que la production d'ERO par les cellules qui la compose, participe au vieillissement et au défaut de différenciation des HSC (Geiger et al. 2013).

Diverses infections peuvent également amplifier l'immunosénescence, comme l'infection par le cytomégalovirus (CMV) ou le VIH, augmentant le turnover des cellules immunitaires, le raccourcissement des télomères et l'inflammation (Deeks et al. 2012).

C-Le tissu osseux

C-1-Physiologie de l'os

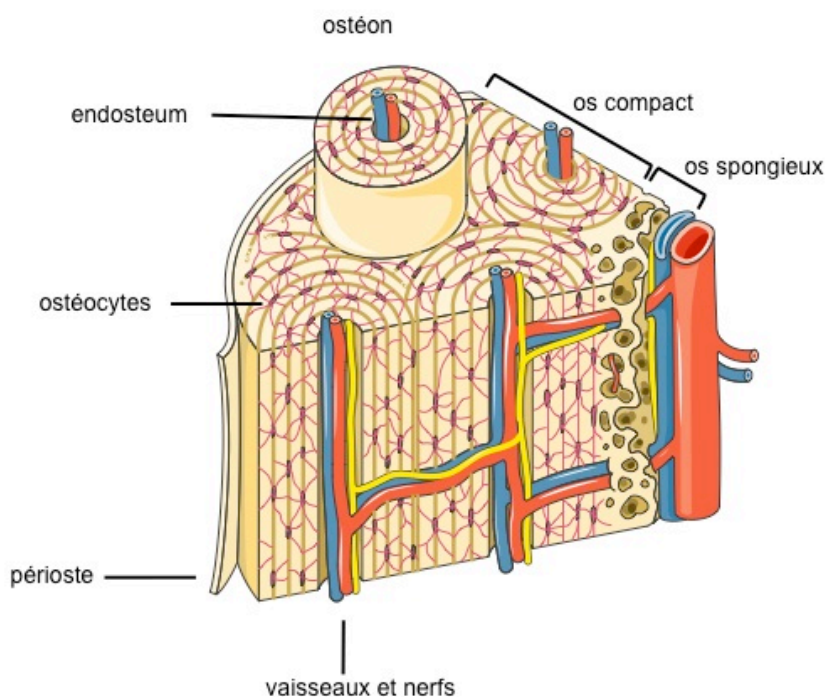
Composé de 213 os, le squelette adulte humain est un organe important du corps humain. Il fournit support et protection pour les autres organes, permet la locomotion, et le maintien de l'homéostasie minérale, notamment calcique et phosphorique.

Le tissu osseux se renouvelle continuellement et la masse osseuse dépend de l'équilibre entre la résorption osseuse assurée par les ostéoclastes et la formation osseuse assurée par les ostéoblastes. Le déséquilibre entre résorption et formation de l'os a des répercussions sur la masse osseuse et peut conduire à long terme à une perte de l'intégrité de la structure du squelette. Le squelette n'est pas un organe inerte, il est en perpétuel renouvellement et la moelle osseuse est le siège de l'hématopoïèse (Clarke 2008).

C-1-1-On est tombé sur un os

Le squelette humain adulte est composé à 80% d'os cortical et 20% d'os trabéculaire. L'os cortical (compact) est dense et solide et entoure la moelle osseuse, tandis que l'os trabéculaire (spongieux) est composé d'un réseau en nid d'abeille de plaques et de tiges trabéculaires intercalées dans la moelle osseuse (Taichman 2005, Clarke 2008). Les deux types d'os sont composés d'ostéones (Figure 9).

Figure 9 : Structure de l'os



Les ostéones corticaux sont également appelés systèmes de Havers ; ce sont des structures cylindriques formées de lamelles concentriques dans lesquelles sont piégés des ostéocytes avec au milieu le canal central contenant le tissu conjonctif, vascularisé, ainsi que les ostéoclastes et les ostéoblastes. A la surface externe de l'os cortical se situe le périoste, un tissu conjonctif

fibreux, important pour la croissance en largeur des os et la réparation des fractures, il assure l'insertion

des ligaments et tendons sur l'os. A la surface interne de l'os se situe l'endosteum, un tissu conjonctif entourant la cavité médullaire (Clarke 2008, Ascenzi et al. 2012, Seeman 2013) (Figure 9).

C-1-2-Composition du tissu osseux

Le tissu osseux est composé de plusieurs types de cellules : ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes et d'une matrice extracellulaire. La moelle osseuse, située au centre de l'os au niveau de l'endosteum, est un organe complexe contenant différents types cellulaires. Les cellules souches présentes dans la moelle osseuse comprennent les cellules souches hématopoïétiques (HSC), à l'origine des lignées myéloïdes et lymphoïdes, et des cellules stromales, dont les cellules souches mésenchymateuses (MSC) et les adipocytes (Clarke 2008, Crane et al. 2014).

-L'organisation des niches au sein de la moelle osseuse

Ces cellules souches sont regroupées dans des niches, un tissu local, dont le microenvironnement régule et maintient le fonctionnement des HSC en particulier. Une portion des HSC est située près de la surface endostéale, majoritairement dans l'os trabéculaire, à proximité des ostéoblastes et des cellules bordantes, indiquant un rôle de la lignée ostéoblastique dans la régulation des HSC. Elles sont aussi retrouvées à proximité des vaisseaux sanguins, dans ce que l'on appelle la niche péri-vasculaire, permettant la migration des HSC vers la circulation sanguine (Yin et al. 2006, Wang et al. 2013, Crane and Cao 2014, Morrison et al. 2014).

Les MSC et les ostéoblastes sont importants pour la régulation des HSC. En effet, ils participent à la formation des niches hématopoïétiques, sécrètent des cytokines et protéines de la matrice impliquées dans la régulation des HSC (Wang et al. 2013). A l'instar des ostéoblastes, les adipocytes dérivent des MSC. Ce sont les cellules stromales les plus abondantes dans la moelle osseuse. Ces cellules, longtemps considérées comme des cellules opportunistes, présentes dans les places non occupées par les HSC ou par les cellules du remodelage osseux, ont maintenant une activité reconnue dans le microenvironnement osseux. Les adipocytes sont particulièrement présents dans les zones de remodelage osseux intense, et servent de réserve d'énergie locale. Les adipocytes sécrètent également divers facteurs solubles modulant le métabolisme osseux comme l'adiponectine et la leptine, connues pour moduler la différenciation et l'activité ostéoblastique, ou comme les acides gras libres, toxiques pour les ostéoblastes. Les adipocytes sécrètent également RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand) favorisant l'ostéoclastogénèse (Sadie-Van Gijsen et al. 2013).

-La matrice extracellulaire

Sécrétée par les ostéoblastes et les chondrocytes, la matrice extracellulaire de l'os comporte une partie organique (20-40%) et une partie minérale (50-70%).

La partie protéique de l'os est constituée à 85 % de collagène, principalement de fibres de collagène de type I et pour 10-15% d'autres protéines non collagéniques comme l'ostéocalcine, et l'ostéopontine, des protéines liant le calcium ou le phosphate, mais aussi des glycoprotéines, comme la fibronectine, permettant l'adhésion des cellules, ou encore les protéoglycanes, des protéines glycosylées et des facteurs de croissance.

Le rôle des protéines osseuses n'est pas encore bien défini. Néanmoins plusieurs semblent impliquées dans l'activité des cellules osseuses, et dans la régulation de la minéralisation, comme la phosphatase alcaline, une protéine glycosylée, liée à la surface des ostéoblastes, qui intervient dans la minéralisation osseuse (Clarke 2008).

De même la présence de séquences RGD (séquences arginine-glycine-acide aspartique permettant la liaison aux intégrines) dans un certain nombre de protéines matricielles : collagène, fibronectine, ostéopontine, et sialoprotéines osseuses, permet l'adhésion des cellules osseuses à la matrice, et donc la résorption et la formation osseuse (Duong et al. 2000). La partie minérale est constituée essentiellement de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

-Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinuclées responsables de la résorption osseuse. Ils dérivent de précurseurs monocyte-macrophage mononucléés provenant majoritairement des HSC et de la lignée monocyttaire de la moelle osseuse. Ces cellules mononucléées vont fusionner pour former des pré-ostéoclastes multinucléés. Ces derniers vont se fixer aux protéines de la matrice osseuse et au niveau des compartiments de résorption osseuse (Boyle et al. 2003) (Figure 11).

La différenciation des ostéoclastes est activée suite à la sécrétion de deux cytokines : RANKL et M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) qui sont majoritairement produites par les cellules stromales de la moelle osseuse et les ostéoblastes. M-CSF est requis pour la prolifération, la survie et la différenciation des précurseurs ostéoclastiques, tandis que RANKL en se fixant à RANK présent à la surface des ostéoclastes, est nécessaire à la formation de ces derniers. La formation et l'activation des ostéoclastes sont sous le contrôle du ratio RANKL sur OPG (ostéoprotégérine) qui est une protéine inhibitrice de RANKL (Boyle et al. 2003) (Figure 10). D'autres facteurs comme IL-1, IL-6, et CSF (colony-stimulating factor) produits localement, mais aussi l'hormone parathyroïdienne (PTH), la

vitamine D, et la calcitonine régulent la résorption osseuse (Figure 10). Afin de résorber l'os, les ostéoclastes se lient à la matrice osseuse via leurs intégrines, deviennent polarisés, et sécrètent des ions H^+ pour dissoudre la partie minérale, ainsi que de la cathepsine K et des métalloprotéinases pour digérer les protéines de la matrice osseuse (Boyle et al. 2003, Clarke 2008) (Figure 11).

La phosphatase acide tartrate résistante (TRAP) est l'enzyme qui caractérise les ostéoclastes. Son activité témoigne de la résorption osseuse, tout comme la libération d'hydroxyproline, et de produits de dégradation du collagène : les peptides C et N terminaux du collagène de type I (CTX et NTX) (Henriksen et al. 2007) (Figure 10).

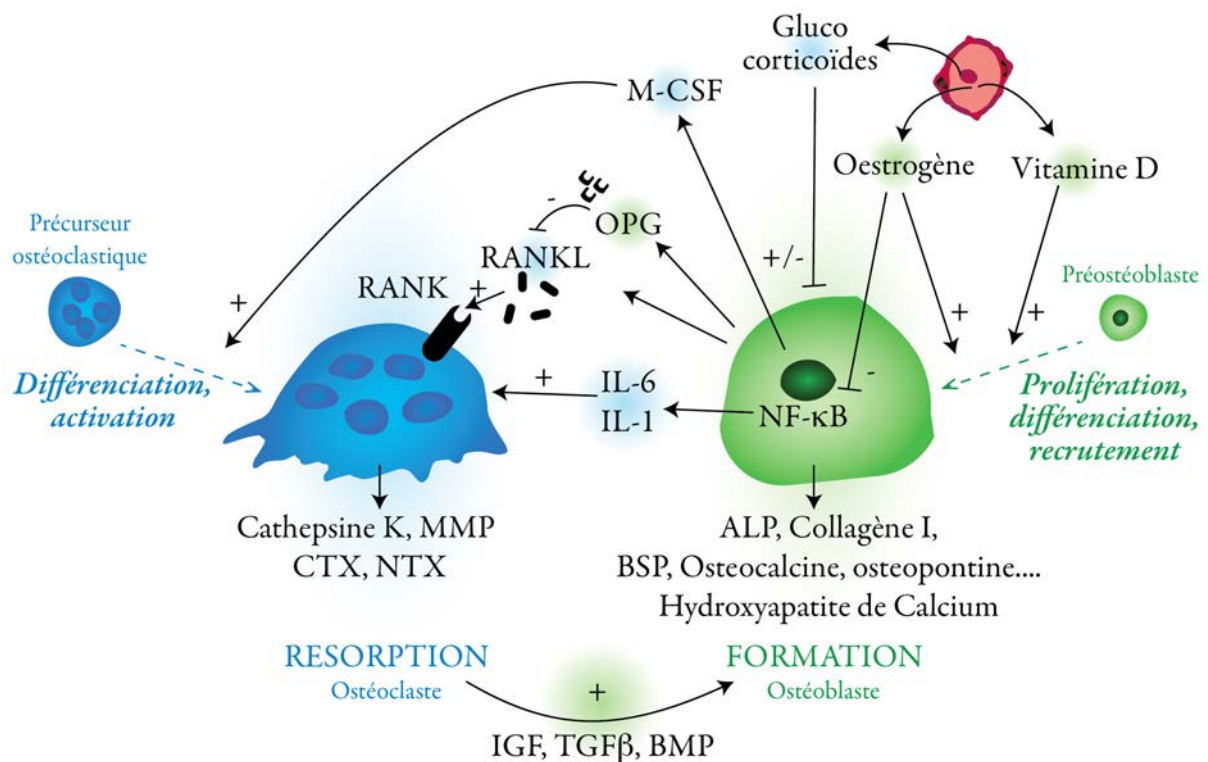


Figure 10 : Contre-régulation de l'ostéoblaste et de l'ostéoclaste : RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand ; OPG : ostéoprotégérine ; M-CSF : macrophage colony-stimulating factor ; ALP : Alcaline phosphatase, BSP : Bone sialoprotein ; IGF : Insulin growth factor ; TGF- β : Tumor Growth factor beta ; BMP : Bone morphogenic protein ; MMP : Metalloproteinase ; CTX/NTX : collagen type 1 cross-linked C-telopeptide ou N-telopeptide

-Les ostéoblastes

L'ostéogénèse est caractérisée par l'engagement et la prolifération de cellules ostéoprogénitrices qui après arrêt de la prolifération cellulaire, se différencient en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la nouvelle matrice osseuse. Les ostéoblastes proviennent de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (voir partie C-2-1) sous l'induction précoce du

facteur de transcription Cbfa/Runx2 (voir partie C-2-3) (Komori et al. 1997). La phase de maturation de l'ostéoblaste est ensuite caractérisée par l'expression de gènes impliqués dans la production de la matrice, comme la phosphatase alcaline (ALP), le collagène de type I, l'ostéopontine et la fibronectine (Harris et al. 1994). Enfin les ostéoblastes différenciés expriment des marqueurs tardifs de différenciation, au début de la phase de minéralisation, tels que l'ostéocalcine et les sialoprotéines (Gordon et al. 2007) (Figure 10).

L'ostéocalcine est sécrétée dans la circulation sanguine et est un bon témoin de la formation osseuse, notamment au cours du vieillissement. Il est à noter que la phosphatase alcaline et l'ostéopontine sont couramment utilisées comme marqueurs de maturation de la matrice extracellulaire osseuse (Seibel 2005).

Plusieurs facteurs contrôlent la différenciation et l'activité ostéoblastique. Certains facteurs locaux sont d'importants régulateurs du recrutement, de la différenciation et de la fonction de l'ostéoblaste (Robubi et al. 2014). Parmi ces facteurs, les plus importants sont ceux produits par les ostéoblastes, s'incorporant dans la matrice osseuse : les IGF, le TGF- β , les BMP (bone morphogenetic proteins) et les FGF (fibroblast growth factors) (Figure 10). L'IGF-1 active la prolifération ostéoblastique et la synthèse de collagène de type I (Giustina et al. 2008, Crane and Cao 2014). Le TGF- β est produit de manière latente par les ostéoblastes, stocké dans la matrice osseuse, puis libéré lors de la résorption osseuse. Le TGF- β stimule la formation osseuse *in vivo*, ainsi que la différenciation et l'activité ostéoblastique *in vitro*. Il augmente la production d'OPG par les MSC et les ostéoblastes et stimule la synthèse de collagène de type I et d'ostéopontine (Chen et al. 2012, Crane and Cao 2014). Les BMP (-2,-4,-6,-7), membres de la famille du TGF- β , jouent un rôle important dans la formation osseuse. Produites par les ostéoblastes, les BMP agissent en augmentant l'expression de Runx2 dans les précurseurs ostéoblastiques, ainsi que l'expression des gènes ostéoblastiques (ALP, collagène I, ostéocalcine) dans les ostéoblastes différenciés (Chen et al. 2012). Enfin les FGF sont des régulateurs importants de la prolifération, de la fonction et de l'apoptose des ostéoblastes.

Un certain nombre de facteurs systémiques contrôlent également l'ostéoformation, notamment les hormones parathyroïdiennes (PTH) et sexuelles, les glucocorticoïdes et la vitamine D (Crane and Cao 2014). La PTH a des effets anaboliques sur la croissance osseuse, elle stimule *in vitro* l'expression de c-fos et inhibe l'apoptose de l'ostéoblaste, mais surtout participe à l'activation et au maintien de Runx2 (Krishnan et al. 2003) (Figure 10). Les oestrogènes augmentent la prolifération, la différenciation et inhibent l'apoptose des ostéoblastes, en activant le facteur de transcription Runx2, la voie Wnt, et en favorisant la production locale de facteurs de croissance comme l'IGF (insulin-like growth factor), et le

TGF- β (McCarthy et al. 2003, Crane and Cao 2014). Ils régulent également négativement la transcription du facteur de transcription NF- κ B, lui-même impliqué dans l'expression de certaines cytokines proinflammatoires (Stein et al. 1995) (Figure 10). La 1,25(OH) $_2$ -dihydroxyvitamine D3, la forme active de la vitamine D stimule l'expression de gènes ostéoblastiques tels que l'ostéopontine et l'ostéocalcine (van de Peppel et al. 2014). Enfin les glucocorticoïdes ont des effets multiples et variés sur les ostéoblastes, en fonction du stade de maturation de ces-derniers : ils inhibent la prolifération des pré-ostéoblastes, mais augmentent la différenciation ostéoblastique des MSC, a contrario ils augmentent également l'apoptose des ostéoblastes, et le ratio RANKL/OPG, induisant la différenciation ostéoclastique (Henneicke et al. 2014) (Figure 10).

Une fois intégrés dans la matrice osseuse, les ostéoblastes se différencient en ostéocytes. Ces derniers forment un réseau au sein de l'os minéralisé en projetant des filopodes au sein de canalicules à travers l'os. Les ostéocytes sont importants pour la structure et le métabolisme osseux, ils expriment diverses protéines matricielles supportant les adhésions intercellulaires, les échanges de minéraux et la mécanosensation (Clarke 2008).

C-1-3-Renouvellement osseux

Le remodelage osseux est le procédé par lequel l'os est renouvelé pour maintenir sa solidité et l'homéostasie minérale. Le remodelage implique le remplacement continu de parties d'os vieux ou endommagé par une nouvelle matrice protéique collagénique qui sera ensuite minéralisée, formant le nouveau tissu osseux. L'unité en charge du renouvellement osseux, appelée Basal Multicellular Unit (BMU), est composée d'ostéoclastes et d'ostéoblastes, assurant respectivement la résorption et la formation osseuse (Clarke 2008, Sims et al. 2014) (Figure 11).

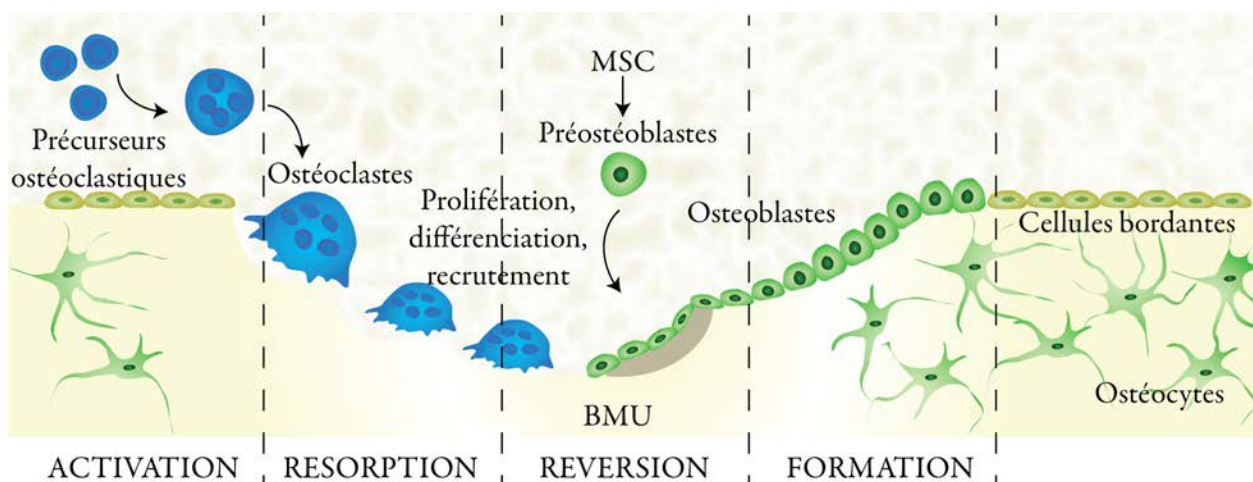


Figure 11 : Le remodelage osseux : MSC : cellules souches mésenchymateuses ; BMU : Basal multicellular unit

Le remodelage est composé de quatre phases : activation, résorption, réversion et formation. La première phase correspond à l'activation du remodelage par le recrutement des précurseurs ostéoclastiques, et la maturation de ces derniers en ostéoclastes. Chaque cycle de résorption osseuse par les ostéoclastes prend entre 2 et 4 semaines. Les ostéoclastes vont sécréter des protons H^+ dans le compartiment de résorption, afin d'abaisser le pH autour de 4,5, permettant la mobilisation des minéraux osseux. Ils vont également sécréter des phosphatases, des métalloprotéinases, de la cathepsine K pour digérer la matrice osseuse, formant ainsi des lacunes dans la matrice osseuse trabéculaire. La phase de réversion marque la transition de la résorption à la formation osseuse, la mort par apoptose des ostéoclastes, et le recrutement des ostéoblastes. La formation osseuse se fait en 4 à 6 mois, les ostéoblastes synthétisent la nouvelle matrice de collagène et régulent sa minéralisation en sécrétant de petites vésicules contenant du calcium et du phosphate. Les ostéoblastes, entourés de matrice calcifiée, deviennent des ostéocytes, ou des cellules bordantes, les ostéoblastes restant, soit 50-70%, meurent par apoptose à la fin du processus de formation osseuse (Clarke 2008, Sims and Martin 2014) (Figure 11).

C-2-Les cellules souches mésenchymateuses

C-2-1-La découverte des MSC, multipotence et plasticité

La découverte de cellules souches non-hématopoïétiques dans la moelle osseuse de rongeurs a été faite dans les années 1970 par Friedenstein. A partir de moelle osseuse, il a pu isoler en culture cellulaire, un groupement hétérogène de cellules d'aspect fibroblastique, clonogéniques et formant en quelques heures des colonies (Colony-forming unit fibroblastic, CFU-F) (Friedenstein et al. 1970). Ces cellules nommées MSC (mesenchymal stem cells) sont multipotentes et capables de se différencier *in vitro* en diverses cellules de la lignée mésenchymateuse : ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, myoblastes (Caplan 2007).

Les MSC dériveraient du mésoderme, bien que l'on ne leur reconnaisse pas de capacité de différenciation en cellules sanguines (d'origine mésodermique) (Schipani et al. 2008). En 2006, la société internationale pour la thérapie cellulaire a établi différents marqueurs caractérisant les MSC : (1) l'adhérence au plastique en culture cellulaire, (2) l'expression de marqueurs antigéniques spécifiques : STRO-1 (+), VCAM (+), CD73 (+), CD105 (+), CD90 (+), CD45 (-) CD34 (-), CD14 ou CD11b (-), CD79 α ou CD19 (-), HLA-DR (-) et (3) par leur capacité de différenciation en ostéoblastes, en adipocytes, en chondrocyte (Zhang et al. 2012).

Les MSC sont présentes dans de nombreux tissus, et couramment isolées de la moelle osseuse, dans laquelle elles représentent moins de 0,01% de la population cellulaire, du tissu adipeux, des tendons, du

sang périphérique, du muscle squelettique, et des tissus néonataux (sang de cordon, placenta). En fonction de leur tissu d'origine, les MSC présentent quelques différences au niveau de leur capacité proliférative et de différenciation notamment. Ainsi les MSC du tissu adipeux prolifèrent mieux que les MSC de la moelle osseuse, mais présentent une plus faible capacité migratoire (Zhang et al. 2012).

C-2-2-Auto-renouvellement et sénescence des MSC

Les MSC sont des cellules capables de s'auto-renouveler, comme le montre leur capacité à former des CFU-F. Contrairement aux cellules souches embryonnaires, les MSC présentent une réduction de leur capacité proliférative au cours des divisions, et le nombre maximal de doublement de la population observé est entre 30-40. Le temps de génération des MSC est compris entre 12-24h, en fonction du donneur et de la densité de cellules (Sethe et al. 2006).

Les MSC sénescents présentent plusieurs caractéristiques communes ou non à d'autres types cellulaires. Les MSC sénescents sont plus larges, et étalées, leur forme est moins étoilée comparativement aux cellules jeunes. Elles présentent une diminution de la capacité répliquative avec l'âge, associée avec une augmentation du temps de génération et une diminution de nombre de CFU-F formées et aussi une altération de la différenciation, avec une ostéoblastogénèse diminuée et une adipogénèse augmentée (Stolzing et al. 2006). Les MSC peuvent présenter un raccourcissement des télomères, et une augmentation de l'activité β -galactosidase à pH6, une diminution des défenses antioxydantes, corrélant avec une augmentation du stress oxydant (Stolzing and Scutt 2006). Les MSC sénescents présentent un profil sécrétoire particulier caractérisé une diminution des sécrétions de TGF- β et BMP2/4, attestant d'une diminution du potentiel de différenciation ostéoblastique, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'IL-6 (Sethe et al. 2006).

C-2-3-Capacité de différenciation des MSC

De par leur origine mésodermique, les MSC sont préférentiellement différenciées en ostéoblastes, adipocytes, et chondrocytes, mais aussi en cellules musculaires lisses et cardiaques. De façon inattendue, les MSC peuvent aussi être différenciées *in vitro* en cellules dérivant d'autres feuillettes embryonnaires : en cellules neuronales, astrocytaires, hépatocytaires, endothéliales. Plusieurs hypothèses peuvent justifier ces différenciations : une partie des MSC pourraient provenir d'autres feuillettes embryonnaires, ou les MSC pourraient subir une transdifférenciation (Zhang et al. 2012).

-Focus sur la différenciation ostéoblastique

La différenciation des MSC en ostéoblastes nécessite l'expression coordonnée du facteur de transcription majeur Cbfa1/Runx2 (Core-binding factor A1/Runx-related transcription Factor-2) et

d'autres facteurs de transcription tels que Msx-2 (MSH homeobox protein), Dlx5 (Distal less homeobox 5) et osterix, qui contrôlent l'expression des gènes cibles au cours de l'ossification (Figure 12).

Dans un premier temps, l'activation du facteur de transcription Cbfa1/Runx2 induit l'engagement des cellules mésenchymateuses vers le lignage ostéoblastique (Komori et al. 1997). Le taux d'expression de Cbfa1/Runx2 dépend de l'expression de facteurs locaux tels que les BMPs (Takazawa et al. 2000, Edgar et al. 2005). Osterix est un autre facteur de transcription indispensable à la différenciation ostéoblastique et au développement osseux (Nakashima et al. 2002). Osterix, en partie sous la dépendance des BMPs, agirait en aval de Cbfa1/Runx2, principalement sur la différenciation terminale des ostéoblastes, distinguant ainsi la voie ostéogénique de la voie chondrogénique. Il a été montré que Osterix pourrait également être régulé par la BMP2 et le gène homéotique Msx2 et agirait indépendamment de l'activité de Cbfa1/Runx2 (Matsubara et al. 2008). Le facteur Dlx-5 stimulerait la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes et la production de protéines d'adhésion comme la fibronectine et le collagène de type I (Ryoo et al. 2006). C'est aussi à ce stade que les pré-ostéoblastes vont synthétiser le TGF- β , ou la BMP2. Au cours de cette phase, on assiste à une augmentation de l'expression et de l'activité de la phosphatase alcaline. La matrice extracellulaire correspond alors à un tissu ostéoïde et le processus de calcification s'effectue en une dizaine de jours. Pendant la phase de maturation de la matrice, la stimulation de l'expression de Cbfa1/Runx2 est régulée par le TGF- β et la BMP2 (Marie 2008). Cbfa1/Runx2 va alors activer la transcription de plusieurs gènes et notamment celui de l'ostéocalcine. Les ostéoblastes vont alors évoluer, soit vers la formation de cellules bordantes ou d'ostéocytes, soit vers la voie de l'apoptose (Figure 12).

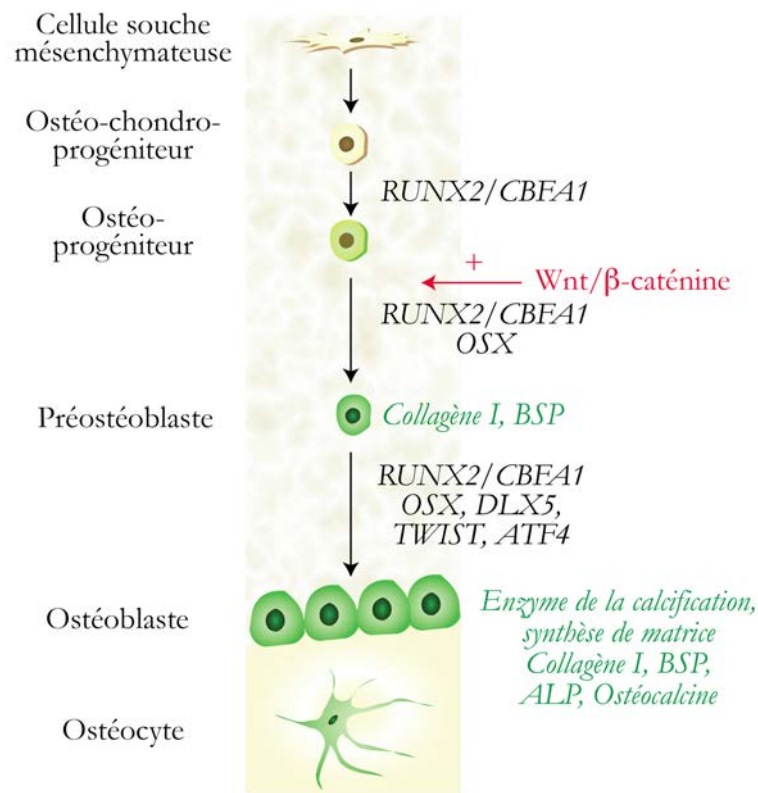


Figure 12 : La différenciation ostéoblastique : RUNX2/CBFA1 : runt-related transcription factor 2 ; OSX : Osterix ; BSP : Bone Sialoprotein ; DLX5 : distal-less homeobox 5 ; TWIST : twist family bHLH transcription factor ; ATF4 : activating transcription factor 4

In vitro la différenciation ostéoblastique des MSC peut être obtenue par adjonction de vitamine D, d'acide ascorbique et de β -glycérophosphate dans le milieu de culture, tandis que *in vivo* l'induction de la différenciation ostéoblastique est sous le contrôle principalement de deux familles de facteurs de croissance : les Wnt et les BMPs.

Les glycoprotéines Wnt jouent un rôle clef au cours du développement et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire (Figure 13). Exprimée par les progéniteurs ostéoblastiques, la protéine Wnt10b est particulièrement impliquée dans la formation osseuse. En se liant à son récepteur Frizzled, elle va permettre de recruter les co-récepteurs LRP5 et 6 afin d'activer la voie de signalisation canonique de Wnt. L'inhibition de GSK3 β (glycogen synthase kinase- β) va permettre la stabilisation et la translocation dans le noyau de la β -caténine, et la production des facteurs de transcription Lef/Tcf (lymphoid enhancer-binding factor/T cell factor). Lef et Tcf ont notamment pour cible Runx2 et Osterix. De plus la signalisation Wnt inhibe les facteurs de transcription pro-adipogéniques PPAR γ et C/EBP α (Canalis 2013, Fakhry et al. 2013) (Figure 13).

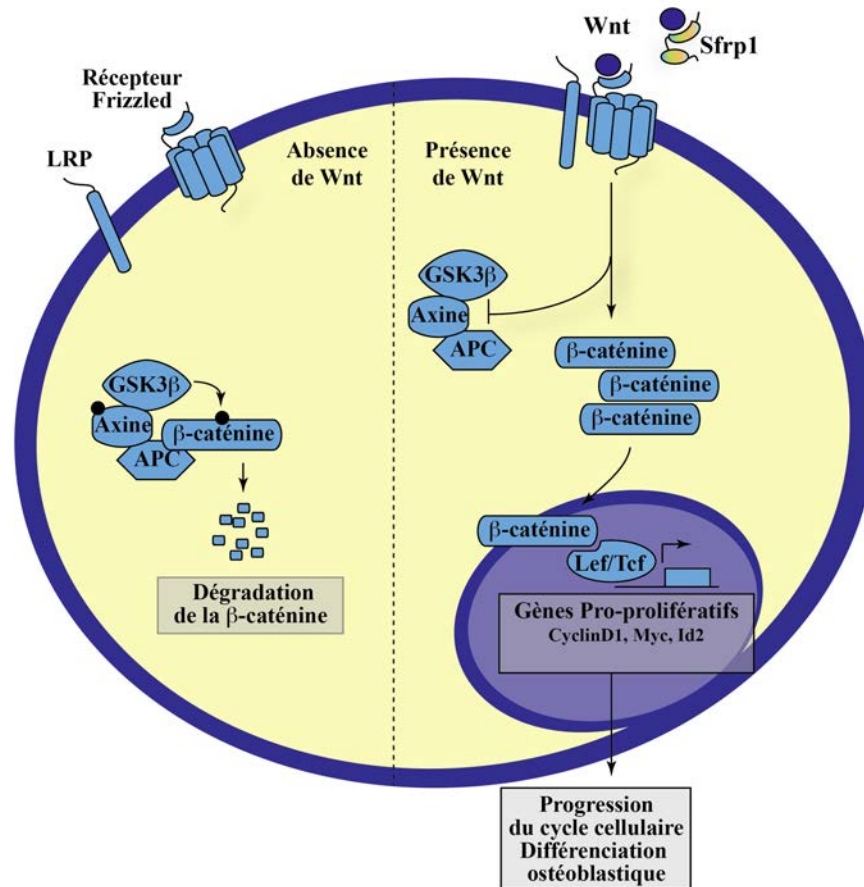


Figure 13 : La voie Wnt et le contrôle de la différenciation ostéoblastique : Wnt : wingless-type MMTV integration site family member ; Sfrp1 : secreted frizzled-related protein 1 ; GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 beta ; APC : adenomatous polyposis coli ; Lef/Tcf : lymphoid enhancer-binding factor/T cell factor

Les BMPs sont des facteurs de croissance de la famille du TGF- β . En se liant à son récepteur sérine/thréonine kinase, les BMPs vont induire la formation de complexes de récepteurs de type I et de type II, conduisant à l'activation par phosphorylation sur sérines des protéines Smad. Ces-dernières vont être transloquées dans le noyau pour activer la transcription de Runx2 et la différenciation ostéoblastique (Chen et al. 2012).

-Focus sur la différenciation adipocytaire

La différenciation adipocytaire correspond à l'activation et à la répression de certains gènes pour aboutir au phénotype adipocytaire. Les protéines spécifiques de l'adipocyte ou marqueurs adipocytaires apparaissent selon une chronologie établie (Ailhaud et al. 1992, Smas et al. 1995)(Figure 14).

C/EBP α et PPAR γ sont les acteurs clés de la différenciation adipocytaire des MSC. PPAR γ 2 est un facteur de transcription de la superfamille des récepteurs nucléaires. Il est nécessaire et suffisant pour induire l'adipogénèse des MSC. En réponse aux hormones pro-adipogéniques telles que l'insuline, C/EBP β et C/EBP δ vont induire l'expression de PPAR γ 2 et de C/EBP α , ce-dernier induisant une

deuxième vague d'expression de PPAR γ 2. La stabilisation et le renforcement de production de PPAR γ 2 va induire l'adipogénèse, à savoir l'expression de marqueurs spécifiques telles que GLUT4 impliqué dans le transport du glucose. PPAR γ 2 libre est présent majoritairement dans le noyau. Son hétérodimérisation avec RXR (Retinoid X Receptor) permet la liaison avec les domaines PPRE (PPAR γ response elements) au niveau des promoteurs de ses gènes cibles (Sadie-Van Gijsen et al. 2013). PPAR γ intervient dans la régulation de l'expression des gènes importants du métabolisme lipidique comme l'acyl-CoA synthase (ACS), la protéine de transport des acides gras au sein de la cellule (Fatty acid transporter protein ou FATP), GLUT4, CD36, l'adiponectine, la périlipine ou aP2 (Gregoire et al. 1998, Spiegelman 1998). Enfin, au cours de la différenciation adipocytaire, l'apparition du facteur SREBP-1c précède légèrement celle de PPAR γ (Tontonoz et al. 1993). SREBP-1c induit l'expression de plusieurs gènes de la lipogénèse mais aussi du gène codant l'adiponectine (Gregoire, Smas et al. 1998). De plus, puisque SREBP-1c contrôle l'expression des gènes de la lipogénèse, il pourrait être impliqué dans la synthèse d'activateurs endogènes de PPAR γ permettant ainsi l'activation de celui-ci (Kim et al. 1998, Desvergne et al. 1999) (Figure 14).

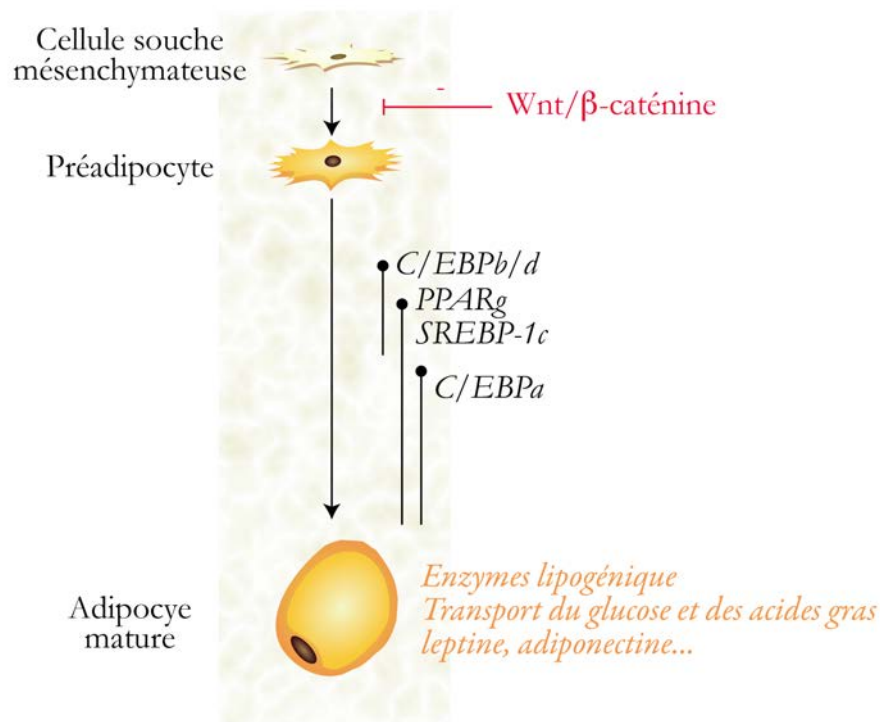


Figure 14 : La différenciation adipocytaire : C/EBP α , β , δ : CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha, beta, delta ; PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma ; SREBP-1c : sterol regulatory element binding transcription factor 1

Les MSC expriment en faible quantité les facteurs de transcription pro-adipogéniques C/EBP α et PPAR γ , mais aussi ceux pro-ostéoblastiques comme Runx2. Cela leur permet de rester à un état indifférencié, puisque les facteurs de transcription adipogéniques et ostéoblastiques se répriment mutuellement. En fonction des conditions, la balance sera modifiée, conduisant à l'induction de l'une ou de l'autre lignée (Rosen et al. 2006).

C-2-4-Applications cliniques des MSC

Les propriétés des MSC, en font une cible de choix en matière d'ingénierie tissulaire. Leur plasticité et leur facilité à être cultivées, en font de bons candidats pour les thérapies basées sur la régénération tissulaire (Farini et al. 2014). Les MSC possèdent une activité immunosuppressive qui leur permet de moduler la fonction des lymphocytes T. De plus les MSC expriment modérément la protéine présentatrice d'antigène CMH-I (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) et pas du tout le CMH-II, leur conférant un caractère non-immunogénique, permettant d'envisager des greffes allogéniques (Farini et al. 2014).

Les MSC sont recrutées aux sites de lésions pour la réparation tissulaire. En condition de stress, comme l'hypoxie et de lésions tissulaires, des MSC sont retrouvées dans le sang. Si l'on ne sait pas encore quels sont les mécanismes inhérents à cette mobilisation, il a été démontré que les MSC sécrètent des facteurs solubles favorisant l'angiogénèse, des peptides et cytokines impliqués dans la réponse inflammatoire et la réparation tissulaire (Farini et al. 2014).

C-3-La déminéralisation osseuse

C-3-1-Ostéoporose et ostéopénie

L'ostéoporose est une maladie du squelette caractérisée par une faible densité osseuse et une détérioration générale de la microarchitecture osseuse. La fragilité de l'os peut entraîner des fractures qui sont la manifestation clinique principale de la maladie (World Health Organization, 1994). L'Organisation Mondiale de la Santé définit l'ostéoporose comme une masse osseuse en-dessous de -2.5 déviations standards (DS) en T-score, qui situe un patient par rapport à la moyenne de référence de la population adulte jeune (au moment du pic de masse osseuse). Entre -1 et -2.5 DS en T-score, il s'agit d'une ostéopénie, c'est à dire une déminéralisation osseuse. Au-dessus de -1 DS, le patient est dans la limite de la normale (WHO, 1994). Une perte osseuse accélérée est induite par un déséquilibre entre la résorption et la formation osseuse.

C-3-2-Que se passe t-il au niveau cellulaire ?

-Os vieillissant

L'âge est le facteur de risque le plus important pour l'ostéoporose. Le vieillissement est associé avec des pertes osseuses chez les femmes et chez les hommes particulièrement au niveau de l'os trabéculaire. Chez les femmes la perte osseuse est accélérée après la ménopause. Les hommes n'étant pas soumis à la ménopause ne présentent pas cette perte osseuse rapide, mais sont malgré tout sujet à une décroissance progressive de la densité minérale osseuse.

Les oestrogènes sont connus pour réduire la sécrétion de RANKL par les lymphocytes T et B et les MSC, et pour augmenter la sécrétion d'OPG, diminuant par ces biais l'activité ostéoclastique. Les oestrogènes favorisent aussi la formation osseuse. Chez les femmes, la survenue de la ménopause conduit à une diminution de la production d'oestrogènes, responsable d'une perte osseuse (Khosla et al. 2006). Nous nous intéresserons dans la suite du manuscrit aux inducteurs non-hormonaux de perte osseuse.

Au cours du vieillissement, la formation osseuse par les ostéoblastes est diminuée, et la résorption par les ostéoclastes augmentée, conduisant à une déminéralisation osseuse, et un risque de fracture augmenté (Chen et al. 2013). Plusieurs facteurs entrent en jeu dans ces dérégulations, notamment l'augmentation de la différenciation et de l'activité ostéoclastique, associées à une augmentation de la sécrétion de PTH, secondaire à un déficit en calcium ou en vitamine D, mais aussi à une augmentation de certaines cytokines pro-inflammatoires comme IL-1, IL-6 et TNF α , et à une augmentation de la sécrétion de RANKL par les MSC (Chung et al. 2014). Par ailleurs, la réduction du pool de précurseurs ostéoblastiques, associée à une augmentation de l'apoptose et de la sénescence des MSC peut également participer à une baisse de la formation osseuse (Bethel et al. 2013). De même, les MSC sénescents présentent souvent une diminution de leur différenciation ostéoblastique au profit de la différenciation adipocytaire, conduisant à un défaut de formation osseuse (Bethel et al. 2013).

-Défauts de différenciation et/ou de recrutement

Dans la moelle osseuse, les ostéoblastes et les adipocytes dérivent des mêmes MSC. Conduisant à une compétition entre l'ostéoblastogénèse et l'adipogénèse, les facteurs stimulant une voie de différenciation inhibent l'autre voie. Ainsi chez l'adulte, l'adiposité de la moelle osseuse est inversement corrélée à la densité minérale osseuse. Il a été constaté au cours du vieillissement normal, une augmentation de l'adiposité de la moelle osseuse. Elle est le résultat d'une hypertrophie et d'une hyperplasie des adipocytes, indépendantes de la masse grasse totale de l'individu. En accord, au cours du vieillissement il

a été constaté une augmentation de l'expression de PPAR γ , associée à une diminution de celle de Runx2 (Sadie-Van Gijzen et al. 2013). Parmi les causes probables de cette orientation de différenciation vers la lignée adipocytaire au cours du vieillissement, le stress oxydant est largement évoqué. L'accumulation de lipides oxydés, en particulier, inhibe la signalisation Wnt/ β -caténine, via l'activation de PPAR γ 2. De plus, l'activation de p53 au cours du vieillissement inhibe le facteur de transcription pro-ostéogénique c-Maf. C-Maf est aussi connu pour inhiber l'expression de PPAR γ 2. L'inhibition de c-Maf serait donc une autre explication à l'augmentation de PPAR γ 2 observée au cours du vieillissement (McCauley 2010, Sadie-Van Gijzen et al. 2013).

La différenciation ostéoblastique des MSC est un procédé complexe, nécessitant le recrutement des MSC jusqu'à une certaine densité, leur stimulation par divers facteurs de croissance, et l'activation de facteurs de transcription spécifiques. Un déficit en nombre de MSC, en facteurs de croissance pro-ostéoblastiques comme le TGF- β , les BMP, ou Wnt10b, affectent la différenciation ostéoblastique (Marie 2008). L'IGF1 est le facteur de croissance le plus abondant dans la matrice osseuse. Au cours de la résorption osseuse, la libération d'IGF1 va induire le recrutement et la différenciation ostéoblastique des MSC. Il a été démontré que les patients atteints d'ostéoporose présentaient une réduction de 40% des concentrations d'IGF1 dans la moelle osseuse (Xian et al. 2012).

-Ostéo-immunologie

En condition normale la densité osseuse est maintenue par une balance entre les activités ostéoclastiques et ostéoblastiques. L'inflammation chronique perturbe cette balance formation-résorption, et certaines pathologies pro-inflammatoires, comme les maladies inflammatoires de l'intestin ou d'autres pathologies auto-immunes, provoquent l'apparition d'ostéopénie et d'ostéoporose chez les patients. Ces observations cliniques ont permis de mettre en évidence des mécanismes de régulation du catabolisme osseux par les cellules immunitaires et les cytokines inflammatoires.

Quels peuvent être les effets du système immunitaire et de l'inflammation dans la promotion de la résorption osseuse ? Un des acteurs clefs de l'ostéo-immunologie est NF- κ B. Il participe à la régulation de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation et la réponse immunitaire. Les gènes activés par NF- κ B incluent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, comme TNF α , IL-1, IL-6, des chemokines comme IL-8, des molécules d'adhésion comme VCAM-1. NF- κ B est également impliqué dans l'ostéoclastogénèse. Deux protéines cruciales dans la différenciation ostéoclastique sont RANK et son ligand RANKL, une cytokine de la superfamille du TNF. La liaison de RANKL et RANK active la voie de signalisation NF- κ B, et la différenciation ostéoclastique (Jimi et al. 2005). Les cytokines pro-inflammatoires, comme IL-1, IL-6 et TNF α favorisent la résorption, et inhibent la formation osseuse.

Le $\text{TNF}\alpha$ promeut l'expression de RANKL par les cellules stromales, et induit aussi directement la différenciation ostéoclastique. Enfin, les lymphocytes T et B sont aussi une source directe de RANKL, favorisant la différenciation ostéoclastique, et les lymphocytes T helper 17 (Th17) produisent de l'IL-17, une interleukine qui va induire la production de RANKL par les MSC et les ostéoblastes (Gruber 2010, Greenblatt et al. 2013).

Qu'en est-il de l'effet du système immunitaire et de l'inflammation dans l'inhibition de la formation osseuse ? Le $\text{TNF}\alpha$ altère également la formation osseuse, en inhibant la voie Wnt et donc la différenciation ostéoblastique. De plus, le $\text{TNF}\alpha$ en association avec $\text{IFN}\gamma$ vont induire l'apoptose des cellules ostéogéniques. Les cellules dendritiques et les neutrophiles sont également recrutés au niveau des sites inflammatoires, induisant l'activation des lymphocytes T et B, la sécrétion de RANKL, la libération de cytokines pro-inflammatoires inhibant la différenciation ostéoblastique. A noter, qu'IL-8, produit par la lignée ostéoblastique est le facteur chemo-attractant responsable du recrutement des neutrophiles (Gruber 2010, Greenblatt and Shim 2013).

Le système immunitaire et l'inflammation ont donc un rôle important dans la physiopathologie osseuse. Il est donc logique que des perturbations du système immunitaire affectent aussi le système osseux. En effet, les patients infectés par le VIH présentent une activation immune et une inflammation chronique qui pourrait affecter la balance osseuse.

D-Le VIH & les traitements ARV

D-1-L'infection par le VIH

Les premiers cas reconnus d'infection par le VIH (Virus de l'immunodéficience humaine) ont été découverts au début des années 1980. A cette époque à New-York et en Californie, parmi la population homosexuelle, jeune, beaucoup d'individus mourraient de pathologies rares, opportunistes : pneumonies, sarcomes de Kaposi, avec des lymphadénopathies, caractérisant ce que l'on appellera plus tard un stade avancé de la maladie : le stade SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise) (Gottlieb et al. 1981, Rolston et al. 1986).

D-1-1-Origine du virus

Le virus, isolé en culture cellulaire pour la première fois en 1983 par l'équipe de Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi, est à l'origine d'une pandémie mondiale, avec 34 millions de personnes porteuses du virus à travers le monde, et 25 millions mortes des suites de l'infection (Barre-Sinoussi et al. 1983, Simon et al. 2003, De Cock et al. 2012).

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un retrovirus de la famille des lentivirus, à l'origine présent chez les grands singes d'Afrique centrale et de l'Ouest. Il est estimé que sa transmission à l'homme date du début du XXème siècle.

Plusieurs facteurs expliquent la transmission à l'échelle mondiale du VIH :

-la latence entre le moment de l'infection et la déclaration des symptômes au stade SIDA, pouvant s'étendre sur plusieurs années, permet une transmission rapide et indétectable du virus entre les individus.

-la complexité du virus, celui-ci possède notamment des protéines accessoires (Nef, Vif, Vpr) lui permettant d'échapper aux défenses cellulaires.

-la haute variabilité du virus, celui-ci mute et se recombine à haute fréquence, lui permettant d'échapper aux stratégies antirétrovirales mise en place.

Deux souches virales sont retrouvées dans la population humaine : le VIH-1, composé de trois groupes M, N et O, le groupe M étant le plus répandu à travers le monde, et le VIH-2. Ces deux souches virales divergent de deux virus de l'immunodéficience simien (VIS) différents, néanmoins leurs modes de transmission restent les mêmes : transmission via le sang, et par contact sexuel (Rambaut et al. 2004).

Pour le reste de l'exposé nous ne présenterons que le VIH-1.

D-1-2-Les phases de l'infection

Le VIH infecte les cellules du système immunitaire, notamment les lymphocytes T CD4, induisant ainsi progressivement un déficit immunitaire.

L'infection par le VIH se déroule selon trois phases. La primo-infection est caractérisée par une réplication virale importante ($>10^{10}$ particules virales produites par jour) avec des taux sanguins de virus (virémie) élevés (Simon and Ho 2003). Cette phase est le plus souvent asymptomatique, mais le tableau clinique peut comporter, entre autre, de la fièvre et des adénopathies. En quelques semaines, des anticorps anti-VIH sont détectables dans le sérum et persistent pendant toute la durée de l'infection, définissant la séropositivité. Enfin, la virémie diminue simultanément à l'apparition d'une réponse cytologique anti-VIH médiée par les lymphocytes T cytotoxiques et les anticorps neutralisants (Fauci 2003, Weiss 2008, Bouvin-Pley et al. 2013) (Figure 15).

La deuxième période est la phase de latence clinique pendant laquelle la personne infectée ne présente aucune pathologie. La durée de cette phase est variable et l'apparente stabilité de la virémie et du taux de LT CD4 circulant résulte d'un équilibre entre la clairance des virions, le nombre de virus produits, et le turnover augmenté des LT CD4 (Figure 15).

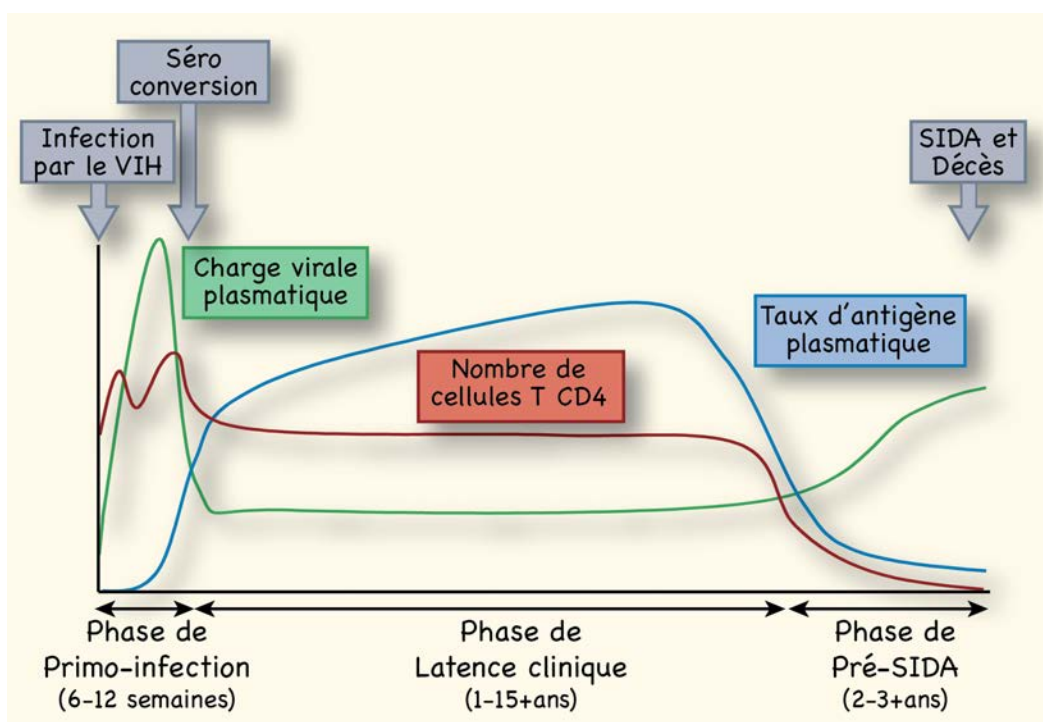


Figure 15 : Les différentes phases de l'infection par le VIH d'après A. Fauci, 2003

La dernière phase est la progression vers le SIDA. A ce stade la virémie, longtemps stable, augmente progressivement et le nombre de lymphocytes T CD4 diminue en parallèle en-dessous de 200

lymphocytes/ μl de sang. On considère que la maladie a progressé vers le stade SIDA lorsque les patients présentent des infections opportunistes, des cancers et des manifestations neurologiques (Figure 15).

D-1-3-Le génome du VIH

D'une longueur d'environ 9,7 kb, le provirus comprend une unique séquence codante flanquée de deux régions LTR (Long Terminal Repeats). La région promotrice pour la transcription des gènes viraux se trouve au niveau du 5'LTR, tandis que la région 3' de terminaison de la transcription permet la polyadénylation des ARNm, leurs assurant stabilité et export hors du noyau (Swanson et al. 2008). Le génome du VIH-1 est composé de neuf gènes. En plus des trois protéines structurales (Gag, Pol et Env) et des deux protéines régulatrices (Tat et Rev) qui sont essentielles à la réplication virale, le génome du VIH code quatre autres protéines accessoires, Nef, Vif, Vpr et Vpu, indispensables au cycle viral *in vivo* (Kwon et al. 2008) (Figure 16). Les fonctions détaillées des différentes protéines du VIH sont présentées dans le paragraphe D-1-5.

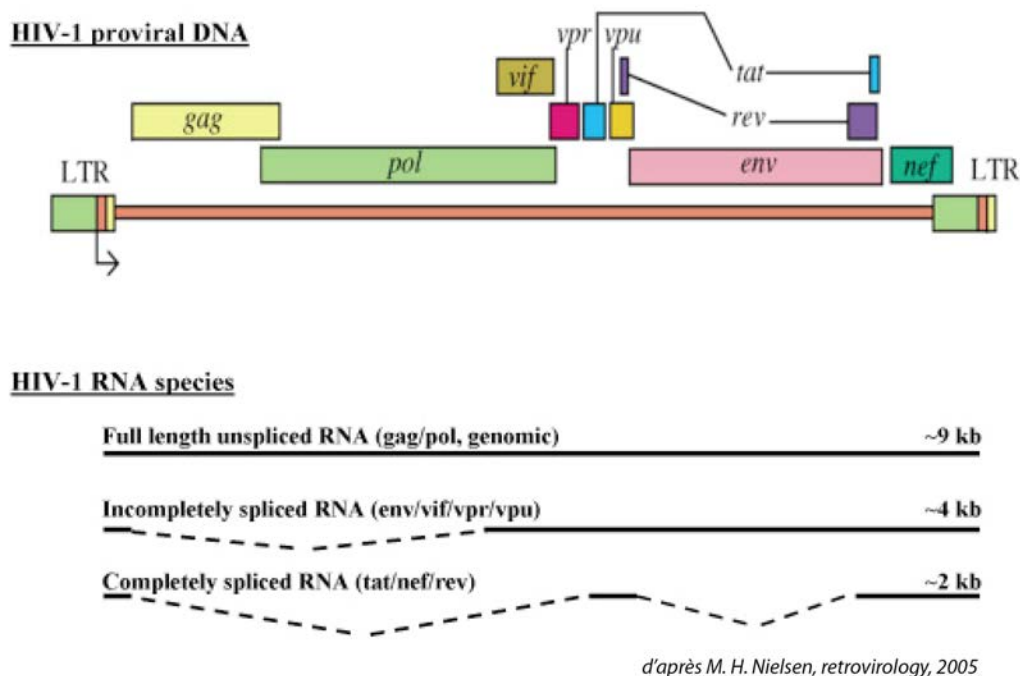


Figure 16 : Le génome du VIH-1 : Représentation du provirus du VIH-1 et des différents ARNm produits. LTR; long terminal repeat.

D-1-4-Vue générale du cycle viral

Le cycle de réplication comprend plusieurs étapes :

- 1) La fixation du virus, via ses glycoprotéines de l'enveloppe virale gp120-gp41, sur les récepteurs CD4 et CCR5/CXCR4 des cellules immunitaires. Il y a alors fusion de la membrane cellulaire avec l'enveloppe virale, internalisation du virion et la libération dans le cytoplasme cellulaire de la capsid virale, contenant le complexe de transcription inverse (RTC : reverse transcription complex), composé de l'ARN viral, de la transcriptase inverse, de l'intégrase, de la protéase virale, et des protéines accessoires (Wilén et al. 2012) (Figure 17).
- 2) Au sein du RTC, la transcriptase inverse va permettre la synthèse d'un ADN viral double brin, formant le PIC (preintegration complex). La transcriptase inverse est l'enzyme clé de la réplication du génome viral qui caractérise les rétrovirus (Nielsen et al. 2005) (Figure 17).
- 3) La protéine virale Vpr possède une séquence NLS (nuclear localisation signal), permettant au PIC de rejoindre le noyau. L'ADN viral va être intégré au génome cellulaire grâce à l'intégrase virale. Cette enzyme a deux fonctions, elle va couper le provirus au niveau des extrémités LTR, couper non-spécifiquement l'ADN cellulaire, puis permettre la ligation de l'ADN viral dans le génome cellulaire (Figure 17).
- 4) La régulation transcriptionnelle des gènes viraux est possible, grâce aux interactions de la protéine virale Tat avec certains facteurs de transcription cellulaires, comme P-TEFb et le recrutement de NF- κ B, qui par rétrocontrôle positif, va favoriser la production d'une grande quantité de protéines Tat, amplifiant d'autant plus la transcription des gènes viraux (Nielsen et al. 2005, Fiume et al. 2012) (Figure 17).
- 5) L'expression des gènes viraux peut être divisée en deux phases : précoce et tardive, respectivement Rev-indépendante et Rev-dépendante. Durant la phase précoce, l'ARNm nouvellement transcrit est épissé par la machinerie cellulaire en de plus petits transcrits à l'origine des protéines du VIH Tat, Rev et Nef. Plus tardivement, l'ARNm produit ne sera pas ou peu épissé, et nécessitera la protéine Rev et sa séquence NES (nuclear export signal) pour sortir du noyau (Figure 17).
- 6) La synthèse des protéines virales est faite par la machinerie cellulaire. Les ARNm mono-épissés sont à l'origine des protéines Env, Vif, Vpr, Vpu, tandis que l'ARNm non épissé code pour les protéines structurales Gag et Gag-Pol (Figure 17).

7) La particule virale est assemblée au niveau de la membrane plasmique, par des interactions entre les protéines de la capsidie Gag et Gag-Pol. L'assemblage est fait en partie sous la régulation des protéines Vpu et Vif (Figure 17).

8) La protéine accessoire Vpu va permettre le bourgeonnement de la particule virale hors de la cellule, suivi par la maturation du nouveau virion infectieux : la protéase virale va cliver Gag et Gag-Pol, pour former la capsidie et les nouvelles enzymes intégrase, reverse-transcriptase et protéase (Nielsen et al. 2005) (Figure 17).

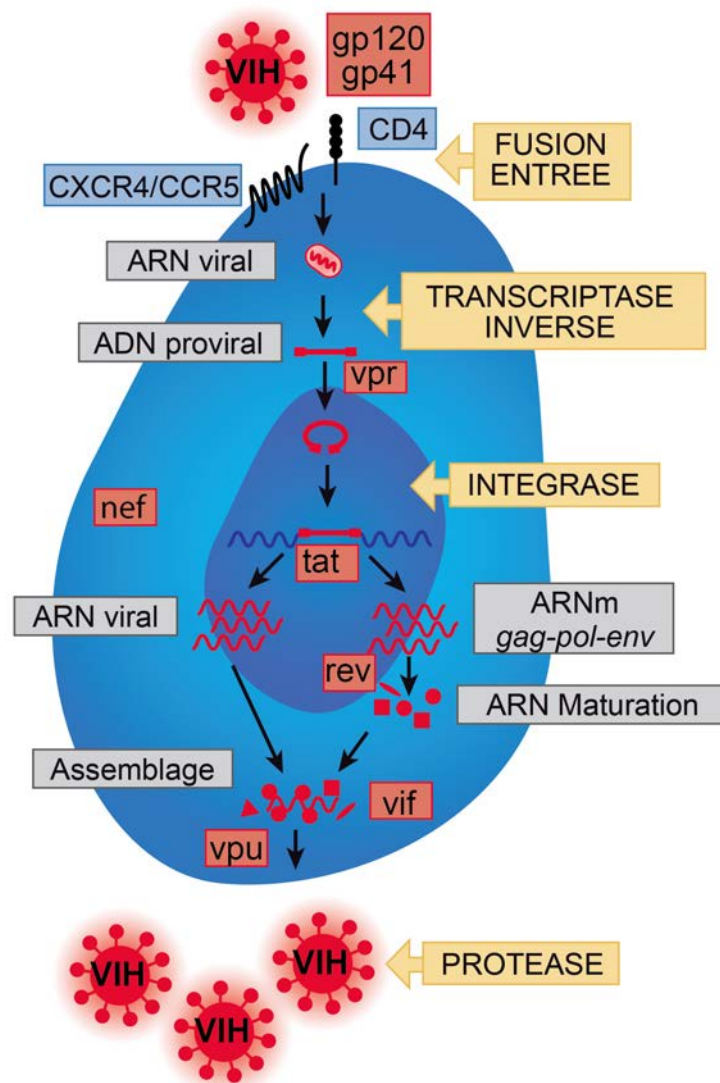


Figure 17 : Le cycle répliatif du VIH : gp120/41 : glycoprotein120/41 ; CCR5 : chemokine receptor 5 ; CD4 : cluster of differentiation 4 ; Vpr : Viral protein R ; Tat : Trans Activating Factor ; Rev : Regulator of Expression of Virion Proteins ; Vif : Viral infectivity factor ; Vpu : Viral Protein Unique ; Nef : Negative Regulatory Factor ; Gag ; group specific antigen, Gag-Pol ; group specific antigen-polymerase, Env ; envelope

D-1-5-Les protéines structurales Gag, Pol, Env

Le gène *gag* code pour les protéines de la capsid virale. Le précurseur peptidique Gag p55 contient quatre domaines fonctionnels impliqués dans la morphogénèse virale : MA (p17) le domaine de liaison à la membrane, CA (p24) responsable de la structuration de la capsid, NC (p7) pour la nucléocapsid, et p6 impliqué dans le bourgeonnement des nouveaux virions. Gag est la seule protéine nécessaire à l'assemblage et au relargage des virions immatures. L'assemblage avec l'ARN génomique et l'oligomérisation des protéines Gag commencent dans le cytoplasme des cellules infectées. Ce complexe va ensuite rejoindre la membrane plasmique grâce au domaine myristoylé MA, où il va subir une multimérisation des domaines CA et NC, formant la capsid immature. La maturation de la capsid aura lieu grâce à la protéase virale, après le bourgeonnement du nouveau virion (Swanson and Malim 2008, Lingappa et al. 2014) (Figure 16-18).

Le gène *pol* est transcrit et traduit sous la forme d'une protéine de fusion Gag-Pol qui va être clivée pour former la protéase virale responsable de la maturation des virions infectieux, l'intégrase impliquée dans l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire, et la transcriptase inverse responsable de la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN génomique viral (Hill et al. 2005) (Figure 16).

Le gène *env* code pour le précurseur protéique gp160 qui va subir plusieurs étapes de maturation dans le réticulum endoplasmique afin de former les glycoprotéines de l'enveloppe virale gp120 et gp41. La protéine gp120 est impliquée dans la reconnaissance et la fixation au récepteur membranaire CD4 et aux corécepteurs CCR5 ou CXCR4. La liaison aux corécepteurs va permettre l'exposition des extrémités hydrophobes Nter et Cter de gp41. Cela va permettre l'insertion de gp41 dans la membrane plasmique, puis la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique et donc le relargage de la capsid contenant toute la machinerie virale dans le cytoplasme de la cellule infectée (Araujo et al. 2013) (Figure 16-18).

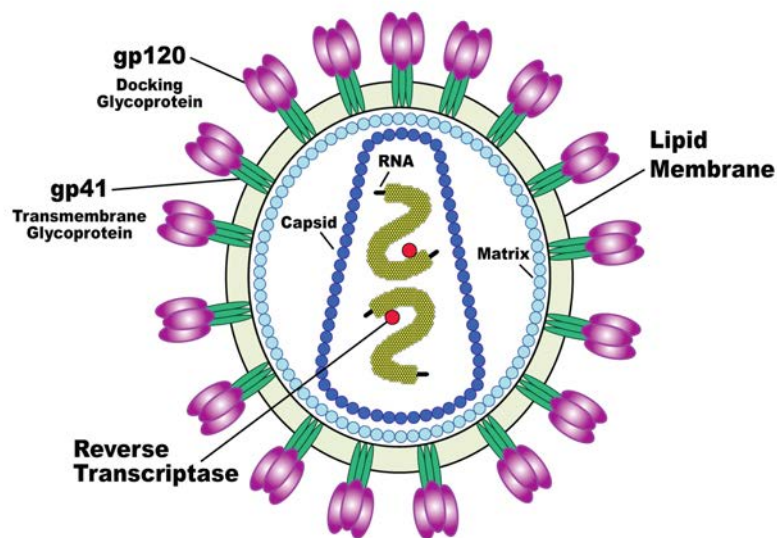


Image US-NIH

Figure 18 : Le virion infectieux

D-1-6-Les protéines régulatrices

Dans les premières phases de l'infection, il va y avoir production d'ARNm épissés codant pour les protéines régulatrices Tat et Rev. Ces-dernières vont stimuler dans un second temps la production d'un grand nombre d'ARNm non épissés codant pour les protéines structurales et les protéines accessoires.

-La protéine Tat

La protéine Tat (Trans Activating Factor) est une protéine régulatrice, de 14-16kDa, indispensable à la réplication virale, puisqu'elle stimule l'expression des gènes viraux. Tat s'accumule dans le noyau, et se lie à la séquence ARN régulatrice TAR (Transactivation Response Element) située dans la région promotrice 5'LTR de l'ADN proviral intégré au génome cellulaire, ainsi qu'au facteur d'élongation P-TEFb. Après initiation de la transcription induite par le recrutement de NF- κ B, le complexe TAR-Tat-P-TEFb va permettre l'activation de l'ARN polymérase II cellulaire et la transcription des gènes viraux (Pugliese et al. 2005, Karn et al. 2012).

-La protéine Rev

La protéine Rev (Regulator of Expression of Virion Proteins) est impliquée dans l'expression des gènes *gag*, *pol* et *env* codant les protéines structurales Gag, Pol et Env mais aussi certaines protéines accessoires telles que Vpu. La protéine Rev se lie au RRE (Rev Responsive Element) sur les ARNm

viraux non épissés codant pour Gag, et Gag-Pol et sur les ARNm mono-épissés codant pour Env. Grâce à cette liaison, Rev va empêcher l'épissage et permettre l'export nucléaire de ces longs ARNm. Par ce biais, Rev induit une augmentation du nombre de copies des ARNm non ou mono-épissés dans le cytoplasme, et donc une plus grande production de protéines Gag, Pol et Env. De plus Rev est également impliquée dans l'encapsidation de l'ARN génomique (Grewe et al. 2010).

D-1-7-Les protéines accessoires

-La protéine Nef

Nef (Negative Regulatory Factor) est une protéine de 27 kDa, exprimée précocement au cours du cycle viral. Nef peut être myristoylée ce qui lui permet d'interagir avec les membranes plasmique et périmoléculaire. Nef interagit avec plusieurs protéines et kinases cellulaires contenant un domaine SH3, et affecte diverses voies de signalisation cellulaire, intervenant notamment dans l'apoptose et le trafic intracellulaire (Geyer et al. 2001). La myristoylation de Nef lui permet d'interagir avec les membranes plasmique et périmoléculaire. La protéine Nef permet d'une part au virus d'échapper aux réponses immunitaires anti-virales de l'hôte, et d'autre part d'augmenter la production et l'infectivité des nouveaux virions. Dans le premier cas, elle favorise l'internalisation par endocytose des complexes CMH-1 (complexe majeur d'histocompatibilité 1), protégeant la cellule infectée de la destruction par les lymphocytes T cytotoxiques (Landi et al. 2011). Dans le deuxième cas, la protéine Nef va agir à différents niveaux : en augmentant l'activité du promoteur viral 5'LTR et en diminuant le taux de récepteurs CD4, elle augmente le relargage de nouveaux virions infectieux (en empêchant la liaison des protéines gp120 des nouveaux virions et des récepteurs CD4 de la cellule déjà infectée) (Vermeire et al. 2011).

-La protéine Vpu

La protéine Vpu (Viral Protein Unique) facilite le relargage des nouveaux virions infectieux, en inhibant le facteur de restriction BST-2 (bone marrow stromal cell antigen 2). BST-2 est une protéine transmembranaire antivirale, empêchant les virions infectieux nouvellement formés de quitter la membrane plasmique cellulaire, en se liant à des protéines de l'enveloppe virale (Strebel 2013).

-La protéine Vif

Le facteur Vif (Viral infectivity factor) est une protéine nécessaire à la virulence des virions infectieux et indispensable à sa réplication. Vif inhibe le facteur de restriction cellulaire APOBEC3G (Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme 3G). En l'absence de Vif, APOBEC3G est encapsidé avec l'ARN génomique dans les nouveaux virions infectieux, et va causer des dommages au génome viral en

transformant les cytidines en deoxyuridines. Cela va conduire à l'insertion de thymidines à la place des cytidines lors de la transcription inverse (Strebel 2013).

-La protéine Vpr

Vpr (Viral protein R) est une petite protéine de 14kDa intervenant à différents niveaux du cycle cellulaire. Elle n'est pas indispensable à la réplication virale, mais joue un rôle important dans l'infectivité du virus (Connor et al 1995). Elle est produite tardivement par les cellules infectées, mais est recrutée lors de l'encapsidation grâce à son association avec p55Gag, suggérant un rôle de la protéine lors de l'infection. Au sein du virion, Vpr est associée à l'ARN viral. Après l'entrée du virus dans la cellule, Vpr permet l'import nucléaire du PIC (pre-integration complex), contenant l'ADN viral et l'intégrase, facilite la transcription inverse et module le taux de mutation du VIH-1. En effet la transcriptase inverse commet beaucoup d'erreurs de transcription, Vpr en recrutant l'uracyl DNA glycosylase (UNG2), une enzyme de réparation de l'ADN, va permettre de corriger une partie de ces erreurs. Il a également été montré que la protéine Vpr favorise l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2-M, via une activation des kinases ATM/ATR. Même si la signification biologique de cet arrêt du cycle cellulaire n'est pas bien comprise, il semblerait que la phase G2/M soit associée à une intense réplication virale (He et al. 1995, Guenzel et al. 2014, Goh et al. 2004).

D-1-8-Effets pléiotropes des protéines du VIH

Les principales cellules cibles du VIH sont les LT CD4 et les monocytes/macrophages. La réplication du VIH dans l'organisme a lieu dans de nombreux tissus (ganglions lymphatiques, cerveau, muscles, etc.) et le sang, dans lesquels on retrouve les cellules cibles du VIH. Cependant en dehors de leurs implications dans le cycle virale et l'infectivité des virions, certaines protéines du VIH sont également sécrétées et vont induire des effets délétères sur des cellules voisines non infectées. Cet effet est nommé effet « bystander » ou effet spectateur. C'est ce qui explique par exemple que la déplétion des LT CD4 soit supérieure au nombre de lymphocytes réellement infectés. En particulier, les protéines du VIH Tat, Nef, Vpr, et gp120, sécrétées par les cellules infectées dans le milieu extracellulaire, ont été mise en cause dans l'induction de ces effets délétères (Oh et al. 1992, Chang et al. 1997, Moon et al. 2006, Raymond et al. 2011).

Parmi les effets des protéines du VIH non directement liés à leur impact dans le cycle viral se trouve l'induction de l'apoptose ou d'un stress oxydant et de dysfonctions mitochondriales.

-Apoptose

Les protéines Tat, Nef, Vpr et Env ont toutes été impliquées dans la mort de différents types cellulaires, principalement via une activation des voies intrinsèques et extrinsèques d'induction de l'apoptose. Ainsi la liaison de gp120-gp41 aux récepteurs membranaires CD4/CXCR4 et Vpr induisent une déstabilisation du potentiel de membrane mitochondrial (Ferri et al. 2000, Moon and Yang 2006). La voie intrinsèque de l'apoptose peut être activée par les protéines Tat, gp120, Nef et Vpr via une diminution de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, suivie d'une activation des caspases. La voie extrinsèque d'induction de l'apoptose faisant intervenir la voie Fas/FasL, peut être induite par les protéines gp120, Tat, et Nef, notamment via une augmentation de la sécrétion du TNF α par la protéine Tat (Perl et al. 2000, Gougeon 2003, Shedlock et al. 2008) (Figure 19).

-Stress oxydant et dysfonction mitochondriales

La protéine régulatrice Tat inhibe les défenses antioxydantes (SOD) et induit un stress oxydant dans divers types cellulaires *in vitro* (Flores et al. 1993, Price et al. 2005, Buccigrossi et al. 2011), ce qui peut conduire à des dysfonctions mitochondriales (Perry et al. 2005, Lecoœur et al. 2012, Zhang et al. 2012). La protéine Tat interagit également avec différentes cibles intracellulaires telles que SIRT1, p53 (Thakur et al. 2012), et NF- κ B impliquées dans la régulation du stress oxydant et de l'inflammation (Westendorp et al. 1995, Kwon et al. 2008). Les protéines Nef et Vpr induisent des dysfonctions mitochondriales, une dépolarisation du potentiel de membrane mitochondrial, conduisant à l'installation d'un cercle vicieux d'induction d'un stress oxydant (Arunagiri et al. 1997, Acheampong et al. 2005, Herbein et al. 2008, Lenassi et al. 2010, Huang et al. 2012, Ferrucci et al. 2013). Nef sensibilise également les cellules telles que les astrocytes à un stress oxydant (Masanetz et al. 2011). L'ensemble de ces données montre que plusieurs protéines du VIH peuvent induire un stress oxydant dans la cellule infectée mais également dans les cellules avoisinantes (Price et al. 2005) (Figure 19).

-Sécrétion de cytokines et chimiokines

Plusieurs protéines du VIH, en particulier les protéines Tat et Nef induisent l'expression de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires, comme TNF α , IL-6, IL-8, dans divers types cellulaires, comme les adipocytes, les cellules dendritiques, et les cellules immunitaires (Kutsch et al. 2000, Mangino et al. 2011, Diaz-Delfin et al. 2012, Sarkar et al. 2013). Ces effets seraient médiés par la l'activation des voies P38/MAPK et NF- κ B (Bai et al. 2013).

-Autophagie

Nef perturbe les étapes tardives du processus d'autophagie au sein des monocytes/macrophages, en interagissant directement avec Becline-1, contribuant à augmenter la virulence (Dinkins et al. 2010, Campbell et al. 2013, Shoji-Kawata et al. 2013). La protéine Tat quand à elle affecte au sein des neurones, mais pas dans les astrocytes, l'intégrité des membrane des endo-lysosomes ce qui conduirait à leur mort prématurée (Hui et al. 2012) (Figure 19).

-Longueur des télomères

Les protéines Tat et Vpr inhibent l'activité télomérase dans les lymphocytes en culture (Reynoso et al. 2012, Comandini et al. 2013). Cet effet qui affecte principalement les cellules non infectées participe à la pathogénicité du virus en diminuant le pool de lymphocytes (Comandini et al. 2013) (Figure 19).

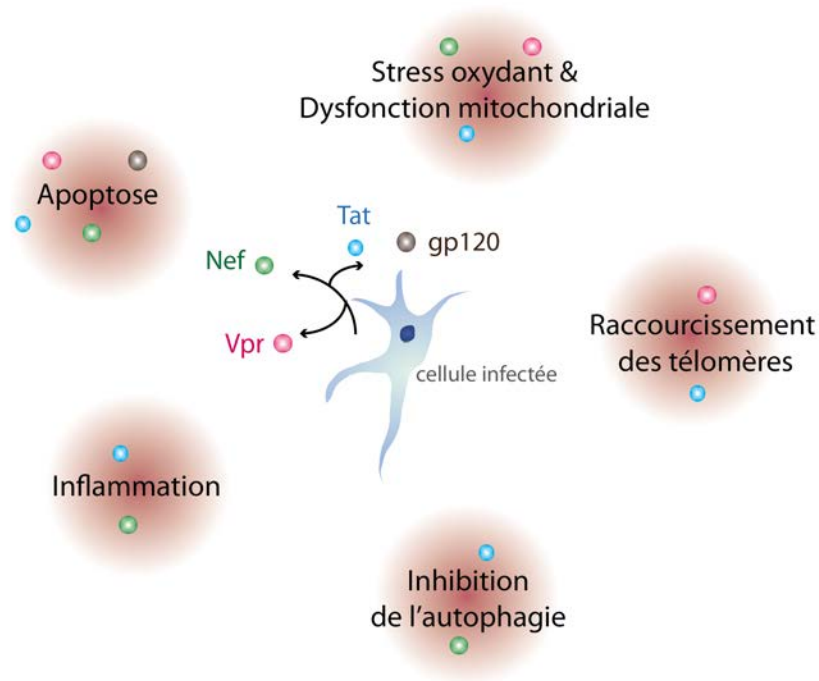


Figure 19 : Effets pléiotropes des protéines du VIH

Aussi, toutes les protéines virales jouent un rôle important dans la réplication virale. Cependant ce sont surtout les enzymes virales qui ont été les cibles privilégiées du développement des thérapies antirétrovirales.

D-2-Le traitement par les ARV

La prise en charge de l'infection par un traitement antirétroviral efficace a permis ces dernières années un contrôle important de l'évolution de la maladie, mais pas une guérison. En cause l'apparition de résistances aux traitements, dues à la haute mutabilité du virus, mais surtout l'existence de réservoirs du

virus, cellules infectées où le virus est en dormance, et où l'absence de réplication active du virus, empêche l'action du traitement ARV.

D-2-1-Les premières stratégies anti-VIH

La première molécule antirétrovirale (ARV) développée à la fin des années 1980 a été la Zidovudine (AZT), un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse. Tout d'abord utilisée en monothérapie, l'essai clinique Concorde en 1993 a pu mettre en évidence l'apparition de virus résistants au traitement, et la nécessité de combiner plusieurs molécules pour maintenir une charge virale basse. Le développement de nouvelles classes de molécules a permis l'établissement de multi-thérapies plus adaptées aux patients, pouvant contrer les résistances virales (Aboulker et al. 1993, Weiss 2008).

La prise en charge de l'infection VIH par les antirétroviraux (ARV) associe depuis plusieurs années différentes classes : les inhibiteurs de la protéase virale (PI) et les analogues nucléosidiques (NRTI) ou non-nucléosique (NNRTI) des inhibiteurs de la transcriptase inverse. Plus récemment des inhibiteurs de fusion, des antagonistes de CCR5, et des inhibiteurs de l'intégrase ont été mis sur le marché.

D-2-2-Les différentes classes de traitement ARV et la résistance aux traitements

-Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Trois types d'inhibiteurs de la transcriptase inverse existent : les inhibiteurs nucléosidiques (NRTI), les inhibiteurs nucléotidiques (NtRTI), et les inhibiteurs non-nucléosidiques (NNRTI).

-Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse :

Le mode d'action des NRTI et NtRTI est essentiellement le même. Ce sont des analogues des déoxynucléotides nécessaires à la synthèse de l'ADN viral. Après triphosphorylation intracellulaire, ils deviennent compétiteurs des substrats (déoxynucléosides triphosphates) naturels dans la chaîne d'ADN en formation. L'absence de fonction hydroxyle en 3' dans les NRTI empêche l'incorporation de nouveaux nucléotides lors de la polymérisation (Cihlar et al. 2010). Les NRTI jouent ainsi le rôle de terminateur de chaîne (Figure 20).

On dénombre actuellement sept NRTI (Lamivudine 3TC, zidovudine AZT, abacavir ABC, stavudine d4T, zalcitabine ddC, didanosine ddI, Emtribacitabin FTC) et un inhibiteur nucléotidique (le ténofovir TDF) approuvés par l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé).

La combinaison AZT/3TC, bien que largement utilisée par le passé, n'est plus aujourd'hui recommandée du fait des effets secondaires qu'elle entraîne (intolérance digestive, anémie, lipotrophie) (van der Valk et al. 2004). Les recommandations aujourd'hui sont à l'association de deux NRTI, classiquement TDF/FTC (Truvada), ou ABC/3TC (Kivexa), avec une autre molécule NNRTI, PI ou inhibiteur d'intégrase.

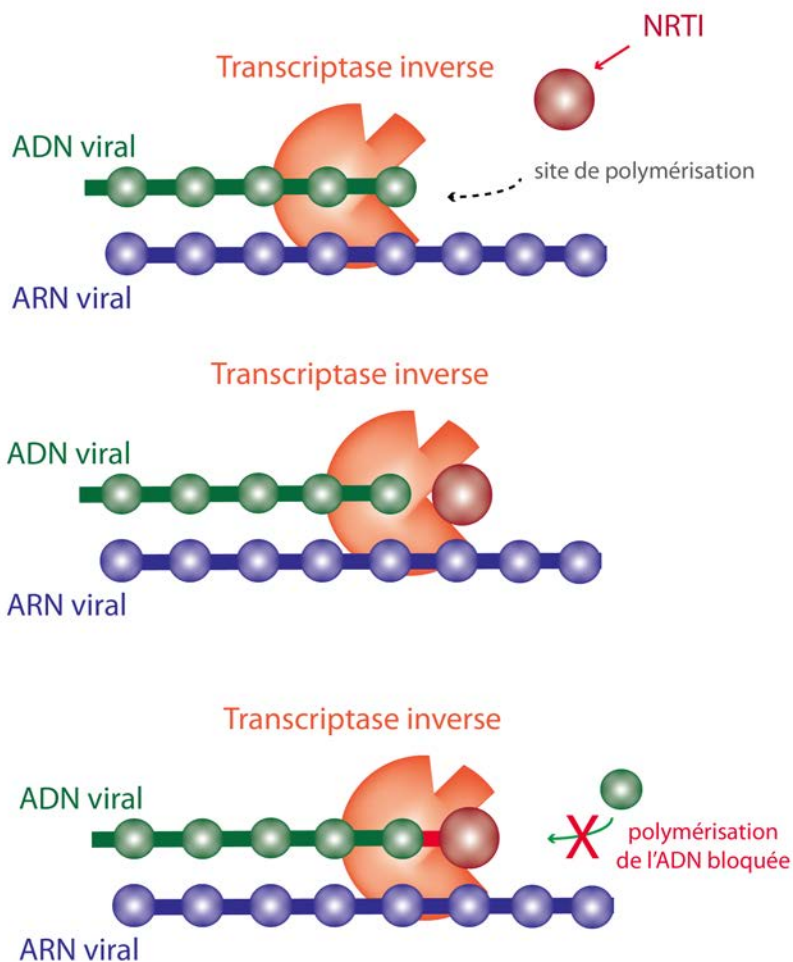


Figure 20 : Mode d'action des NRTI : Les analogues nucléotidiques vont être insérés par la transcriptase inverse à l'ADN viral, et agir comme terminateurs de chaîne, empêchant ainsi l'ajout d'autres nucléotides.

- Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse

Leur mode d'action est différent des NRTI, ils interfèrent avec le site allostérique de la transcriptase inverse de façon non compétitive, modifiant la structure de l'enzyme, ce qui la rend inactive (Joly et al. 2000) (Figure 21).

Il existe à l'heure actuelle deux générations de NNRTI : la première comprend deux molécules : Efavirenz (EFV), et Névirapine (NVP), la seconde comprend Etravirine (ETR) et Rilpivirine (RPV).

Compte tenu de la rapidité de la réplication virale et du haut niveau d'erreurs lors de la transcription, des mutations sont apparues au niveau du site de liaison des NNRTI, compromettant l'efficacité de ces

traitements. Néanmoins les combinaisons NNRTI (EFV en particulier) et NRTI sont souvent utilisées et montrent une bonne efficacité.

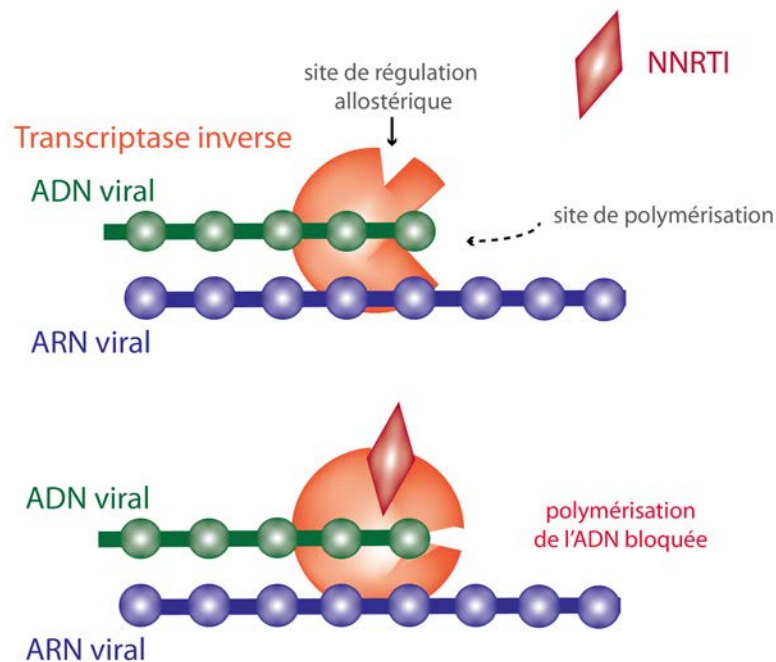


Figure 21 : Mode d'action des NNRTI : Les NNRTI vont inhiber l'action de la transcriptase inverse en se liant à son site de régulation allostérique.

Plusieurs types de mutations génétiques ont été associés à une résistance aux inhibiteurs de la transcriptase inverse. En particulier des mutations aux analogues de la thymidine (TAM) ont communément été sélectionnés par les traitements à l'AZT et d4T, conférant au virus une résistance croisée à d'autres NRTI. La première génération de NNRTI est caractérisée par une rapide sélection de résistances. Globalement les NRTI et les NNRTI ont une faible barrière génétique à la mutation (Michaud et al. 2012).

-Les inhibiteurs de la protéase virale

Les inhibiteurs de l'aspartyl protéase virale (PI) préviennent la réplication virale en empêchant la maturation des virions infectieux par la protéase. Les PI miment les substrats naturels de la protéase, mais sont des structures semi-peptidiques non clivables, leur permettant d'occuper le site actif de l'enzyme (Michaud, Bar-Magen et al. 2012) (Figure 22). Actuellement, il existe sept PI : indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), amprenavir (APV), lopinavir (LPV), ritonavir (RTV), saquinavir (SQV), atazanavir (ATV) et darunavir (DRV). L'apparition des PI a permis de réduire la morbidité et mortalité du VIH, néanmoins il existe des interactions médicamenteuses, et des effets indésirables pour cette classe de médicaments (Winston et al. 2005).

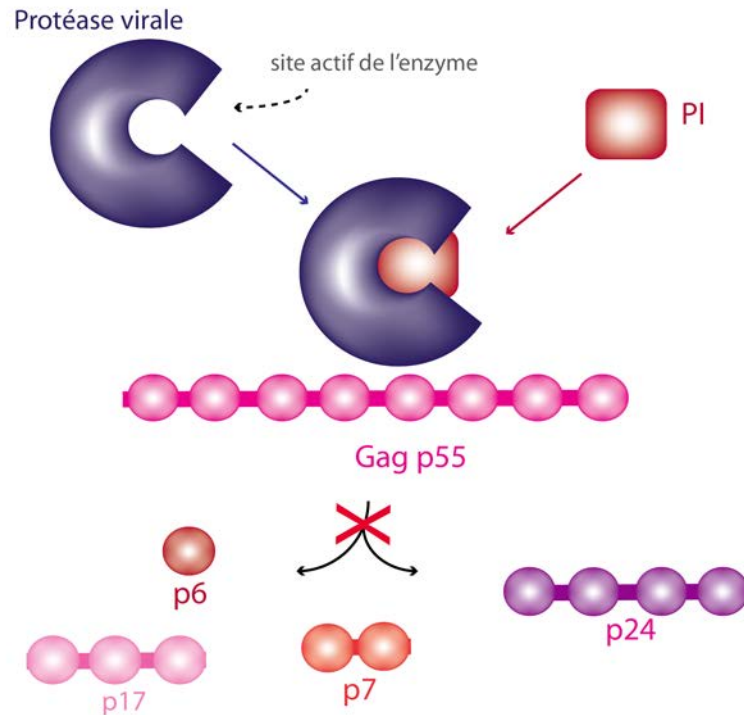


Figure 22 : Mode d'action des PI : Les PI vont occuper le site actif de la protéase virale, empêchant son action de maturation des protéines virales.

Des mutations dans les résidus impliqués dans la liaison de la protéase aux substrats sont responsables de l'apparition de résistances aux PI. Néanmoins cette classe d'ARV présente une plus forte barrière génétique que les NRTI et NNRTI (Michaud et al. 2012). Compte-tenu de ces effets indésirables, des PI non-peptidiques, présentant une meilleure biodisponibilité et stabilité sont à l'étude (Pang et al. 2014).

-Les inhibiteurs de l'intégrase

Cette classe d'inhibiteur bloque le site actif de l'intégrase, et donc l'insertion de l'ADN viral dans le génome cellulaire (Cocohoba et al. 2008) (Figure 23). Trois inhibiteurs d'intégrase ont une autorisation de mise sur le marché : le raltégravir (RAL), l'elvitegravir (EVG), et le dolutégravir (DTG). Le RAL possède une bonne spécificité pour l'intégrase (1000 fois supérieure aux drogues ciblant la transcriptase inverse), et une bonne tolérance pour les patients. Néanmoins il possède une demi-vie courte, nécessitant au moins deux prises médicamenteuses par jour, ainsi qu'une très faible barrière génétique à la résistance virale. La seconde génération de molécules, en particulier le DTG présente une meilleure résistance à la mutation, et une demi-vie plus longue (Metifiot et al. 2013).

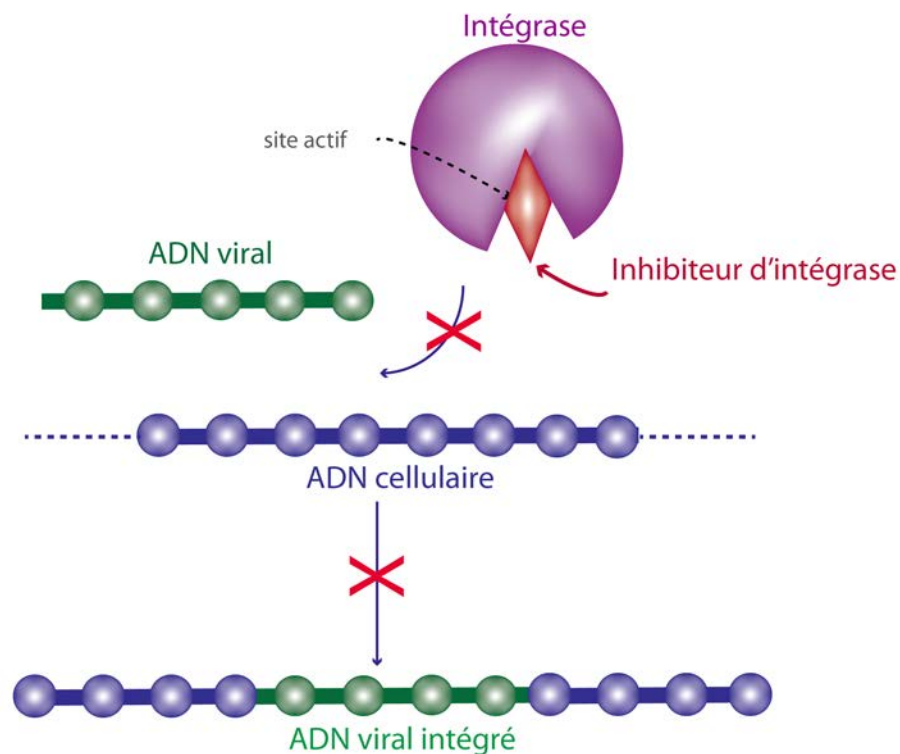


Figure 23 : Mode d'action des inhibiteurs d'intégrase : Les inhibiteurs de l'intégrase occupent le site actif de l'enzyme, empêchant l'intégration du provirus dans l'ADN cellulaire

-Les inhibiteurs d'entrée

Cette classe d'ARV comprend les inhibiteurs de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique, et les inhibiteurs d'adhésion de l'enveloppe virale aux corécepteurs cellulaires.

L'enfuvirtide (T20) approuvé en 2003, est le seul inhibiteur de fusion présent sur le marché. Il s'agit d'un peptide inhibant la protéine de l'enveloppe virale gp41, et donc la fusion du virus avec la cellule. T20 se lie au domaine HR1 de gp41, empêchant sa liaison au domaine HR2. Plusieurs mutations de résistance à T20 ont été découvertes au niveau du domaine HR1 de gp41. Néanmoins si ces mutations empêchent l'action de T20, elles sont aussi associées à une mauvaise efficacité de fusion, et une plus grande sensibilité du virus aux anticorps neutralisants (Haqqani et al. 2013) (Figure 24). Cette molécule qui nécessitait une injection n'est plus utilisée.

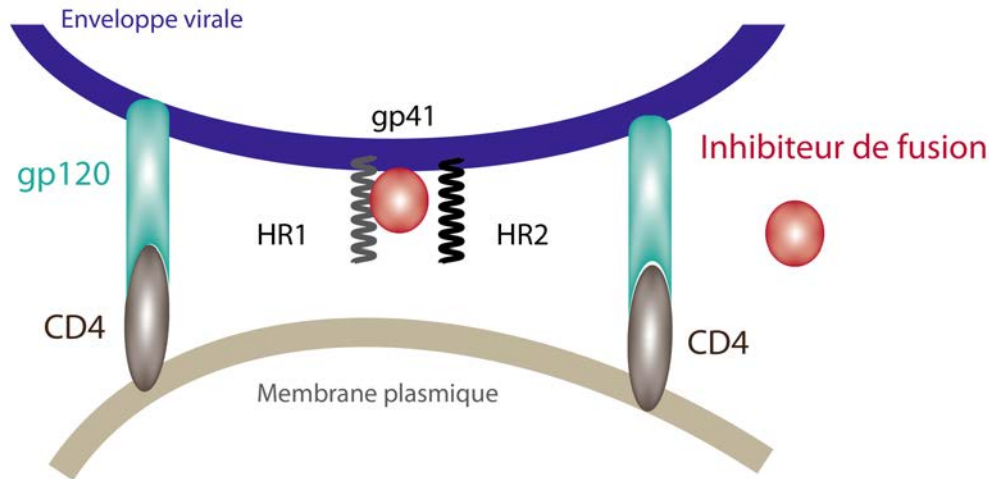


Figure 24 : Mode d'action de l'inhibiteur de fusion : L'Enfuvirtide empêche la liaison des domaines HR1 et HR2 de gp41, inhibant ainsi le harponnage et la fusion de l'enveloppe virale sur la membrane plasmique cellulaire

Le Maraviroc (MVC) est un antagoniste sélectif du corécepteur CCR5, inhibant la liaison de gp120 à CCR5. Le VIH peut utiliser plusieurs corécepteurs pour entrer dans la cellule, communément CCR5 mais aussi CXCR4. Le MVC n'est efficace que contre les lignées virales utilisant CCR5 comme porte d'entrée. Le tropisme viral des patients doit donc être testé avant l'utilisation du MVC. De plus une résistance au MVC est induite par un changement de tropisme des virus de CCR5 vers CXCR4 au cours du traitement (Haqqani and Tilton 2013).

D-2-3-Pharmacologie

Les procédés régissant l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion des ARV sont des déterminants majeurs de leurs concentrations plasmatiques et tissulaires. La plupart des ARV sont administrés oralement et passent la barrière intestinale via des transporteurs sélectifs. Les molécules absorbées rejoignent le foie via la circulation sanguine. Dans les hépatocytes, les molécules sont à nouveau sujettes au transport et au métabolisme avant de rejoindre la circulation systémique et les tissus cibles. Les deux acteurs majeurs de la biodisponibilité des ARV sont donc les transporteurs membranaires impliqués et les enzymes responsables de leur métabolisme (Michaud et al. 2012).

Les transporteurs impliqués dans l'influx et l'efflux des ARV sont de deux groupes : la superfamille de transporteurs ABC (ATP-binding cassette proteins), et la superfamille de transporteurs SLC (solute carrier proteins). La première classe de transporteurs va utiliser de l'ATP pour permettre l'accumulation des molécules contre leur gradient de concentration, la seconde permet un transport passif dans le sens du gradient de concentration. Les transporteurs ABC sont présents dans les cellules épithéliales et endothéliales, et sont surtout impliqués dans l'efflux et l'élimination des ARV, tandis que

les transporteurs SLC sont majoritairement responsables de l'influx. C'est le cas par exemple pour les PI et les NRTI (Cihlar and Ray 2010, Hediger et al. 2013). Les PI possèdent une forte affinité pour le transporteur ABCB1, exprimé dans 30 à 80% des lymphocytes T, et responsable de l'efflux des molécules hors de la cellule (Michaud et al. 2012).

Les enzymes de la famille des cytochromes P450 (CP450) transforment les molécules liposolubles en molécules plus hydrosolubles. Les CP450 sont impliqués dans le métabolisme et la clairance des NNRTI, PI, du MVC et de l'EVG. Concernant les PI, de façon générale, les molécules basées sur un motif peptidique ont une demi-vie courte due à leur dégradation par des enzymes protéolytiques, et présentent une très faible biodisponibilité. Les PI sont, par nature, très hydrophobes et rapidement dégradés dans le foie par les CP450 (CYP3A4) qui convertissent les PI en produits polaires avant leur élimination (Moyle 2001, Michaud et al. 2012). La plupart des PI reconnaissent CYP3A4, mais le RTV est le plus affiné. Ainsi la co-administration de RTV à faibles doses inhibe l'activité de CYP3A4 et permet d'augmenter la concentration des autres PI (Condra et al. 2000, Michaud et al. 2012).

La concentration totale d'ARV dans le plasma correspond à la somme de la fraction libre et de la fraction liée aux protéines plasmatiques.

Les études pharmacocinétiques ont permis d'établir les valeurs thérapeutiques optimales de chaque molécule antirétrovirale. Les concentrations sériques ont été définies : C_{max}, C_{min} (maximale et minimale) et ASC (aire sous la courbe) qui sont les concentrations mesurées entre deux prises chez les patients infectés (Bazzoli et al. 2010). Dans les études expérimentales sur culture cellulaire les concentrations utilisées pour traiter les cellules sont le plus souvent voisines du C_{max}.

E-Comorbidités observées chez les patients infectés par le VIH sous traitement ARV efficace

L'avènement du traitement ARV, en particulier depuis l'apparition des multi-thérapies a permis une augmentation spectaculaire de la durée de vie des patients infectés par le VIH, en faisant une maladie chronique. Les premiers bénéficiaires des ARV, sont maintenant traités depuis plusieurs décennies, et nous constatons aujourd'hui chez cette population vieillissante les effets indésirables du traitement et de l'infection à long terme.

E-1-Infection par le VIH et vieillissement accentué

E-1-1-Survenue précoce des comorbidités

La notion du vieillissement accéléré chez les personnes atteintes du VIH est de plus en plus discutée ces dernières années. Elle est basée sur le fait que les patients sont de plus en plus touchés par les maladies associées à l'âge avancé, à un plus jeune âge que leurs pairs séronégatifs (Capeau 2011). Un nombre important d'études a montré que les patients infectés par le VIH et sous traitement ARV présentaient tôt les mêmes comorbidités que la population générale, ostéoporose, atteinte neurocognitive, sarcopénie, atteinte cardio-vasculaire et infarctus du myocarde, hypertension, insuffisance rénale, dyslipidémie, diabète, cancer non classant SIDA (Effros et al. 2008, Deeks et al. 2009). Ces constatations ont conduit à proposer le concept de "vieillissement prématuré" chez ces patients. Les multi-morbidités sont communes et d'apparitions précoces chez plus de 65% des patients infectés par le VIH (Kim et al. 2012) (Figure 25). Cependant, du fait de la courbe d'âge des patients infectés par le VIH comparée à la population générale, la notion de sénescence prématurée a été discutée. Quoiqu'il en soit, il est clair que les prévalences de certaines comorbidités liées à l'âge sont augmentées chez ces patients.

E-1-2-Marqueurs de vieillissement observés chez les patients infectés par le VIH

Diverses études sur des marqueurs ou acteurs du vieillissement viennent aujourd'hui étayer cette théorie du vieillissement accentué. Il a ainsi été constaté chez les patients infectés par le VIH traités une élévation du stress oxydant, des dysfonctions mitochondriales, une réduction de la taille des télomères et de l'activité télomérase dans les lymphocytes (Ballon et al. 2001, Torres et al. 2014). La perte des télomères serait accélérée par le traitement ARV, et plus particulièrement par l'utilisation de certains NRTI (Hotchkiss et al. 1999, Hukezalie et al. 2012, Leansyah et al. 2013).

Les protéines du VIH, et en particulier Tat sont impliquées dans l'installation d'un stress oxydant conduisant à des dysfonctions mitochondriales dans plusieurs modèles cellulaires (Torres and Lewis

2014). Le traitement ARV est aussi associé à des dysfonctions mitochondriales et au stress oxydant. Ainsi les NRTI induisent une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles dans le tissu musculaire des patients (Payne et al. 2011) (voir parties B-2-1 et B-2-2).

Enfin, dans notre équipe, il a été montré, une accumulation de prélamine A, marqueur de vieillissement dans les cellules mononuclées du sang, chez les patients VIH traités par PI (Lefevre et al. 2010).

E-1-3-Mécanismes en cause dans le vieillissement accéléré.

Les éléments majeurs associés à la morbidité et mortalité des patients infectés par le VIH sont l'inflammation et l'activation immunitaire (Caron-Debarle et al. 2010) (Figure 25). La sénescence et l'« inflammaging » sont aussi associés à l'activation de l'inflammation, via le facteur de transcription NF- κ B, et la production de cytokines et chimiokines inflammatoires comme IL-6 et IL-8, participant au recrutement des cellules immunitaires au sein des tissus (voir partie B-4). Chez les patients infectés par le VIH non traités, l'activation immunitaire résulte de différents facteurs : une réplication virale chronique, une plus grande sensibilité aux pathogènes du fait de la déficience immunitaire, une translocation bactérienne intestinale, mécanismes également impliqués dans l'inflammation chronique observée chez les personnes âgées non infectées (Capeau 2011, Pathai et al. 2014, Vigouroux et al. 2014).

Chez les patients contrôlés par ARV, plusieurs mécanismes se conjuguent également pour rendre compte de la survenue précoce des complications liées au vieillissement, mécanismes qui sont pour la plupart responsables d'une inflammation de bas grade : la présence du virus, même lorsque l'infection est bien contrôlée, le déficit immunitaire qui peut résulter d'un traitement insuffisant mais aussi de l'épuisement du système immunitaire dans le cadre de l'immunosénescence et l'effet délétère de certaines molécules antirétrovirales (Deeks and Phillips 2009). Le rôle essentiel du déficit immunitaire, attesté par la baisse du taux de CD4, dans la morbidité et mortalité dues à des événements non-classants SIDA a été montré dans plusieurs très grandes cohortes internationales suivant des patients infectés par le VIH (Deeks and Phillips 2009, D : A : D et al. 2010) (Figure 25).

Enfin la réplication virale, même faible, entraîne la libération de protéines du VIH capables d'agir sur les cellules de proximité et participer à l'activation immune. Chez les patients bien contrôlés, cette réplication et la libération de protéines virales délétères pourrait concerner en particulier les réservoirs macrophagiques qui sont présents dans différents tissus affectés au cours du vieillissement : tissu adipeux, os, foie, paroi vasculaire, cerveau, muscles. Sur le long terme cet état va conduire peu à peu à un épuisement des ressources immunes avec diminution des capacités répliquatives et diminution de la

réponse anti-VIH. Le système immunitaire sénescé produit plus de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TNF α ou l'IL1- β participant à l'état inflammatoire à bas grade et au processus « d'inflammaging » (Appay et al. 2010) (Figure 25).

Les protéines du VIH telles que Tat et Nef, mais aussi le traitement ARV participent à cette progression, en augmentant l'inflammation, et le recrutement monocytaire, et en participant à l'apoptose des macrophages spumeux (Shrestha et al. 2014). Certains PI (LPV, RTV) induisent une accumulation de prélamine A marqueur de sénescence, le tout conduisant à un stress oxydant et une inflammation augmentée dans adipocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Caron et al. 2007, Lagathu et al. 2007, Lefevre, Auclair et al. 2010).

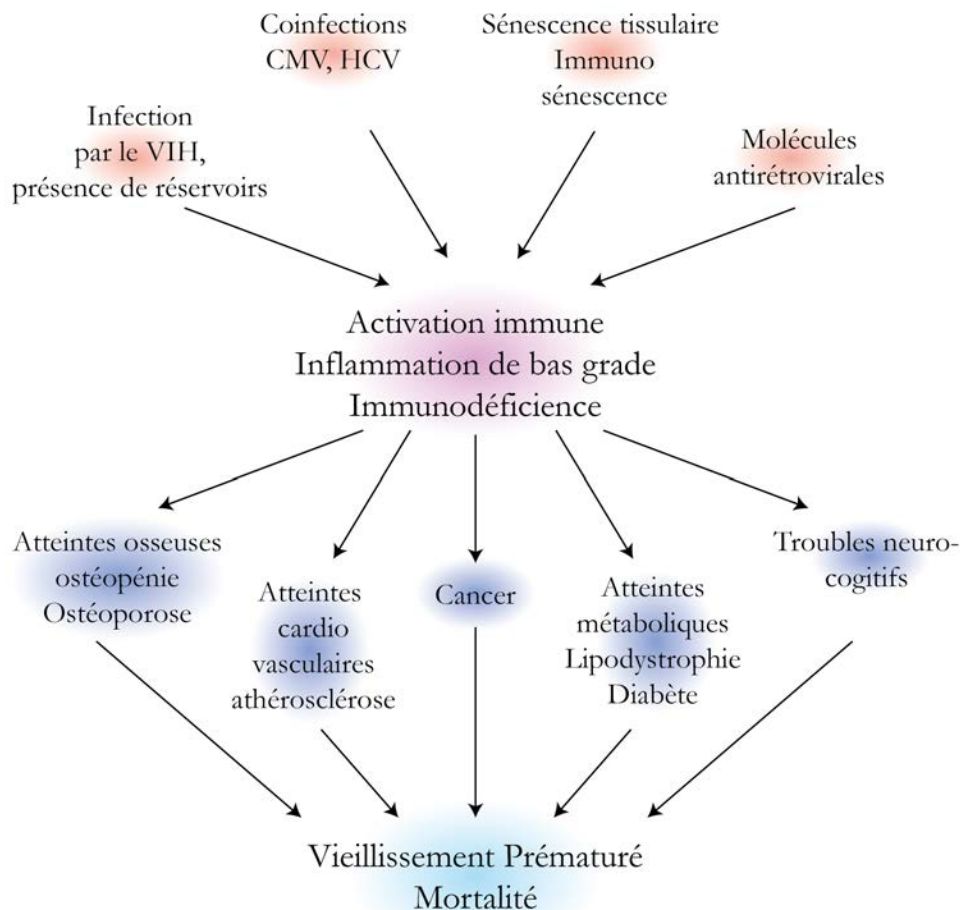


Figure 25 : VIH et comorbidités

E-1-4-Atteintes du tissu adipeux et cardiométabolique

Le vieillissement physiologique est associé à des modifications de répartition du tissu adipeux, à des troubles métaboliques comme la résistance à l'insuline et le diabète, mais également à l'inflammation et au stress oxydant dans plusieurs tissus et notamment le tissu adipeux (Wu et al. 2007). Chez les patients

infectés par le VIH, les atteintes métaboliques sont la résultante de facteurs de risques traditionnels comme l'obésité, de facteurs environnementaux, de facteurs génétiques, mais également de facteurs associés à l'infection par le VIH et au traitement ARV, comme l'inflammation chronique, l'activation immunitaire. Les atteintes métaboliques fréquemment retrouvées chez ces patients sont les lipodystrophies, les dyslipidémies, et le diabète (Caron-Debarle et al. 2010). Ainsi les patients infectés par le VIH traités par les premières générations de NRTI (D4T, AZT) ont présenté fréquemment une lipoatrophie des membres et du visage, ainsi qu'une lipohypertrophie de l'abdomen caractéristique du syndrome lipodystrophique. Si les lipoatrophies sont aujourd'hui moins fréquentes avec les nouvelles générations d'ARV, les lipohypertrophies en particulier abdominales restent fréquentes, conduisant à une augmentation des risques cardiométaboliques et du diabète (Brown et al. 2005, Caron-Debarle et al. 2010). De plus, il a été démontré que chez les patients porteurs du VIH, les premières générations de PI et NRTI altèrent le métabolisme des lipides et du glucose (Lake et al. 2013, Gundurao Sreekantamurthy et al. 2014). Cet effet est moins marqué avec les ARV récents. Par ailleurs, l'inflammation, la dysfonction immunitaire, et l'activation lymphocytaire liées à l'infection par le VIH augmentent le risque de développer des maladies cardiovasculaires, classiquement associées au vieillissement.

L'athérosclérose est l'atteinte retrouvée le plus fréquemment chez les patients VIH (Escarcega et al. 2014). Cependant, l'étude des complications osseuses chez les patients infectés par le VIH prend une importance toute particulière ces dernières années.

E-2-VIH et pathologies osseuses

Deux pathologies du tissu osseux sont retrouvées plus particulièrement chez les porteurs du VIH : l'ostéoporose qui a été décrite précédemment (cf partie C-3-1), et l'ostéonécrose. L'ostéonécrose est caractérisée par une mort du tissu osseux, intervenant suite à un défaut d'irrigation vasculaire. La prévalence d'ostéonécrose chez les patients infectés par le VIH est d'environ 4%, alors que l'incidence dans la population générale est estimée entre 0,01 et 0,1% (Allison et al. 2003). De plus une méta-analyse révèle que parmi la population infectée par le VIH, les patients traités avec des PI ont un risque augmenté de 2,09 (Odds ratio) de développer une ostéonécrose (Permpalung et al. 2014). La déminéralisation osseuse résulterait, outre l'effet du VIH, de l'effet délétère de certains antirétroviraux, mais leur participation respective n'est pas clairement établie (Bonjoch et al. 2010, Stone et al. 2010).

E-2-1-Données cliniques : ostéoporose/ostéopénie

Les différentes études menées chez les patients infectés par le VIH ont révélé une augmentation de la prévalence de l'ostéopénie de 22% à 68% et de l'ostéoporose de 3% à 27% selon les études, avec une prévalence moyenne d'ostéoporose de 17%, soit 3 à 4 fois plus élevée que dans la population générale (Brown et al. 2006, Mallon 2014 Powderly 2012). L'ostéopénie est observée chez les patients naïfs de traitement ARV. Ces-derniers présentent un risque augmenté (Odds ratio) de 3,7 de développer de l'ostéoporose, et l'initiation du traitement ARV augmente la déminéralisation osseuse pendant la première année (Brown and Qaqish 2006, Duvivier et al. 2009). En effet, l'initiation du traitement ARV induit une perte de densité minérale osseuse allant jusqu'à -4% après 96 semaines de traitement. Toutes les molécules ARV n'induisent pas la même déminéralisation osseuse. Ainsi parmi les NRTI, le TDF (Grund et al. 2009, Stellbrink et al. 2010) est associée avec une plus grande perte osseuse, et parmi les PI le lopinavir couplé au ritonavir (LPV/r), ou l'atazanavir couplé au ritonavir (ATV/r) induisent une plus grande déminéralisation que le NNRTI EFV (Tebas et al. 2000, McDermott et al. 2001, Moore et al. 2001, Fernandez-Rivera et al. 2003, Duvivier et al. 2009, McComsey et al. 2011).

L'étude des marqueurs de résorption et formation osseuse a pu mettre en évidence une augmentation du catabolisme osseux avec des niveaux de RANKL augmentés, et en parallèle une formation osseuse diminuée chez les patients infectés par le VIH naïfs de tout traitement (Gibellini et al. 2007, Haskelberg et al. 2011). L'initiation du traitement ARV induit une rapide augmentation du turnover osseux démontré par une augmentation des sécrétions d'ostéocalcine (marqueur de formation) et de C-telopeptide (marqueur de résorption osseuse). Néanmoins durant les 6 premiers mois, la résorption osseuse déjà induite par l'infection VIH en elle-même, prend le pas sur la formation osseuse, créant une sorte de fenêtre catabolique à l'initiation du traitement. Cependant, plusieurs études longitudinales ont pu montrer une stabilisation secondaire de la balance entre résorption et formation osseuse une fois passé la fenêtre catabolique (Bolland et al. 2011, Haskelberg et al. 2011). Attestant de l'impact du traitement ARV, l'étude SMART a pu montrer qu'une stratégie ARV intermittente, par opposition à une prise continue, était associée à une diminution de la perte osseuse (Grund et al. 2009, Hoy et al. 2013).

Différents facteurs environnementaux, ou liés à l'infection par le VIH entrent en compte dans l'instauration de la déminéralisation osseuse chez ces patients. Les facteurs traditionnels comprennent l'âge, le tabagisme, l'alcool, le sexe féminin, la prise de glucocorticoïdes, un faible indice de masse corporelle (IMC), une déficience en calcium et vitamine D. Les patients infectés présentent en plus

d'autres facteurs de risque : l'infection en elle-même, le traitement ARV, et l'activation immunitaire (Aukrust et al. 1999, Brown et al. 2009, Mallon 2014).

En conclusion, plusieurs études de qualité sont en faveur de la contribution du traitement ARV et de l'infection par le VIH dans l'ostéoporose observée chez les patients. À l'avenir, l'allongement de la durée de l'infection et de traitement, ainsi que le vieillissement général des patients, vont probablement contribuer à augmenter la prévalence et la sévérité des atteintes osseuses.

E-2-2-Données *in vitro* : Impact du VIH et des ARV sur la balance osseuse

Très peu d'études se sont intéressées à l'impact du VIH et des antirétroviraux sur les cellules osseuses.

-Rôle de l'inflammation

L'activation immunitaire et la sécrétion de certaines cytokines influencent la balance osseuse. Ainsi le TNF α , l'IL-1 β et IL-6 inhibent la formation osseuse. De plus les lymphocytes T activés induisent la production d'IL-6 par les ostéoblastes, et la différenciation ostéoclastique. En conditions inflammatoire, les cellules immunitaires, en particulier les lymphocytes T et B activés vont également produire RANKL permettant la différenciation et l'activation ostéoclastique. Ces données démontrent que l'environnement pro-inflammatoire, et la détérioration de l'activité des cellules B et T, résultant de l'infection VIH impactent le métabolisme osseux (Ofotokun et al. 2012).

-Impact des ARV sur les cellules osseuses

Parmi les NRTI, le TDF est souvent mis en cause dans la baisse de la densité minérale osseuse. En effet le traitement au TDF induit un défaut de filtration glomérulaire, associé avec un défaut de réabsorption tubulaire des phosphates, une carence en vitamine D, une augmentation des sécrétions de PTH. L'hypophosphatémie et l'augmentation de la PTH en lien ou non avec une déficience en vitamine D peuvent expliquer en partie la perte de densité minérale osseuse (BMD) (Havens et al. 2012). Néanmoins I. Grigsby a pu mettre en évidence des effets *in vitro* du TDF sur l'activité ostéoblastique et ostéoclastique. En étudiant les profils d'expression de cultures primaires d'ostéoblastes et d'ostéoclastes traités au TDF, il a ainsi pu observer que le TDF modifiait dans les ostéoblastes l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (p21), et le métabolisme osseux (Wnt, TGF- β , VEGF) (Grigsby et al. 2010). De la même façon, le TDF modifie les profils d'expression de gènes impliqués dans l'activité ostéoclastique, comme la signalisation MAPK/ERK, et dans le métabolisme énergétique mitochondrial (Grigsby et al. 2010).

Il a également été montré que certains PI influaient sur les profils d'expression génique des ostéoblastes. Ainsi A. Malizia a pu montrer que le NFV et le RTV augmentaient l'expression ARN et protéique de

MCP-1 et IL-8 (Malizia et al. 2007). Mais aussi que le NFV et l'IDV diminuaient l'expression du facteur de transcription ostéoblastique Runx-2, les dépôts calciques et l'activité de l'alcaline phosphatase (Malizia et al. 2007). RG. Jain a pu montrer que le NFV et le RTV augmentaient l'activité ostéoclastique, tandis que le LPV, le NFV et le RTV altéraient la différenciation ostéoblastique des MSC (Jain et al. 2002). Enfin F. Santiago a mis en évidence un effet du RTV sur la promotion de la différenciation ostéoclastique, via une up-régulation de la voie Wnt non-canonique, impliquant Wnt5a/b (Santiago et al. 2012).

-Impact du VIH sur les cellules osseuses

La première question que l'on se pose concernant l'impact du VIH sur les cellules ostéorégulatrices, est de savoir si celles-ci sont susceptibles d'être infectées par le VIH.

Les précurseurs hématopoïétiques, situés dans la moelle osseuse, sont une population hétérogène incluant les très primitives HSC, qui vont se différencier en précurseurs lymphoïdes, donnant naissance aux lymphocytes T et B, et en précurseurs myéloïdes, donnant naissance à la lignée monocyttaire, à l'origine des ostéoclastes. L'expression des co-récepteurs CD4 et CCR5/CXCR4 sur ces cellules varie en fonction de leur stade de différenciation. Ainsi les cellules différenciées expriment plus de co-récepteurs que les cellules non-différenciées, et sont donc plus susceptibles à l'infection. Au sein de la moelle osseuse les monocytes-macrophages sont les cellules infectées par le VIH les plus abondantes (Alexaki et al. 2008).

Les cellules ostéogéniques, puisqu'elles expriment CD4 en faible quantité, ont été suggérée comme potentiel réservoir du virus dans les années 1990 (Mellert et al. 1990). Néanmoins une autre étude en 2001 est venue contredire cette hypothèse, puisqu'aucune trace d'infection n'était détectable dans une culture primaire d'ostéoblastes de patients infectés par le VIH (Nacher et al. 2001). Au final, aucune étude récente n'a pu montrer une infection productive des ostéoblastes ou de leurs précurseurs les MSC, même si certaines études plus anciennes évoquent la possibilité d'une infection non-productive des cellules stromales ou des cellules de la lignée mésenchymateuse comme les fibroblastes, ou les cellules endothéliales (Wang et al. 2002).

Au cours de l'infection par le VIH, des changements au sein de la moelle osseuse ont été observés. Ils sont caractérisés par une diminution de la population stromale fibroblastique, et une augmentation des cellules macrophagiques-monocytaires. Puisque la perte de clonogénicité de la lignée mésenchymateuse ne semble pas résulter de l'infection par le virus lui-même, elle serait plutôt attribuée à une modification du microenvironnement cellulaire. L'inflammation, l'infection par le VIH des précurseurs

hématopoïétiques et le relargage des protéines virales dans le milieu extracellulaire sont incriminés (Wang et al. 2002, Alexaki and Wigdahl 2008).

Plusieurs études démontrent un effet néfaste des protéines du VIH sur la balance ostéoblastes/ostéoclastes. Tout d'abord, D. Gibellini a pu montrer en 2010 que la protéine virale Tat augmentait l'ostéoclastogénèse induite par RANKL et M-CSF (Gibellini et al. 2010). D'autres protéines virales comme gp120 et Vpr sont également connues pour augmenter l'ostéoclastogénèse (Fakruddin et al. 2003, Fakruddin et al. 2005).

Par ailleurs, E. J. Cotter a intensivement étudié l'impact du VIH sur le versant ostéoblastique. Il a pu montrer qu'à l'instar du vieillissement osseux, l'utilisation de sérums provenant de patients infectés par le VIH favorise la différenciation adipogénique des MSC au détriment de la différenciation ostéoblastique (Cotter et al. 2011). Mais aussi que les protéines virales p55-gag et gp120 diminuent l'activité ostéoblastique, à savoir la formation de dépôts calciques, l'activité phosphatase alcaline, les sécrétions de BMP. En parallèle, gp120 et Tat augmentent l'activité de PPAR γ et la différenciation adipogénique. Enfin, la protéine virale p55-gag réduit la différenciation ostéoblastique des MSC, via une diminution de l'activité de Runx-2 (Cotter et al. 2007, Cotter et al. 2008). Pour finir, deux études ont pu montrer un effet des protéines de l'enveloppe virale, en particulier gp120, dans l'induction de l'apoptose de lignées ostéoblastiques, et dans l'altération de la fonction ostéoblastique, via l'inhibition de la voie canonique Wnt/ β -caténine (Gibellini et al. 2008, Butler et al. 2013).

E-3-Conclusion et objectifs des travaux

Dans le contexte de la déminéralisation osseuse en lien avec l'infection par le VIH, la littérature nous a permis de mettre en évidence plusieurs points importants :

- 1) L'ostéoporose est une maladie classiquement associée au vieillissement. Certains mécanismes impliqués sont : l'inflammation et l'hyperactivation ostéoclastique regroupés dans le concept d'ostéoimmunologie (voir partie C-3), la déplétion des MSC, et l'augmentation de l'adiposité de la moelle osseuse, traduisant un défaut de différenciation ostéoblastique (voir parties C-2-2 et C-3).
- 2) Le traitement ARV, en particulier les molécules de la classe des NRTI avec le TDF et de la classe des PI avec le NFV et le RTV *in vitro*, mais aussi le LPV et l'ATV chez l'homme, est impliqué dans des altérations ostéoblastiques, ostéoclastiques et dans la baisse de BMD observée chez les patients (voir parties E-2-1 & E-2-2).
- 3) L'infection par le VIH elle-même participe à l'instauration de l'ostéopénie, puisque les patients infectés par le VIH avant initiation du traitement ARV présentent une baisse de BMD associée à une

augmentation des marqueurs de résorption osseuse et en parallèle une diminution des marqueurs de formation osseuse (voir parties E-2-1 et E-2-2).

4) Les mécanismes impliqués semblent être l'inflammation chronique, une dérégulation de facteurs de transcription et des voies de signalisation importantes pour l'ostéoblastogénèse, telles que Runx2, Wnt/ β -caténine, avec en parallèle une augmentation de la différenciation et de l'activation ostéoclastique (voir partie E-2-2).

5) L'infection par le VIH et le traitement ARV induisent divers mécanismes classiquement associés au vieillissement, comme un raccourcissement des télomères, un stress oxydant, des dysfonctions mitochondriales, de l'inflammation, une accumulation de prélamine A (voir parties D-1-8 et E). En particulier, l'implication des PI dans l'induction de la sénescence des cellules endothéliales a été montrée au sein du laboratoire (Lefevre et al. 2010).

Partant de ces données, et dans l'objectif de démêler les liens entre sénescence, ostéoporose, infection par le VIH et traitement ARV, dans le contexte de l'étude du vieillissement des patients infectés par le VIH, nous avons jugé important d'évaluer l'impact des protéines du VIH et des PI sur la sénescence des précurseurs ostéoblastiques, les cellules souches mésenchymateuses.

L'implication des protéines du VIH dans l'induction de la sénescence n'a pas été documenté à ce jour. Nous nous sommes intéressées dans notre étude à l'impact de deux protéines du VIH : Tat et Nef, déjà connues pour induire certains mécanismes impliqués aussi dans la sénescence, tels que le stress oxydant, les dysfonctions mitochondriales, l'inflammation. L'implication des protéines du VIH Tat et Nef dans l'induction de la sénescence des MSC sera traitée dans la première étude. Dans la deuxième étude, nous nous sommes intéressées à l'impact des PI et plus particulièrement à l'ATV associé au RTV et au LPV associé au RTV dans l'induction de la sénescence des MSC.

II-Résultats

A-Etude 1 : The HIV proteins Tat and Nef promote human bone marrow mesenchymal stem cell senescence and alter osteoblastic differentiation

(C. Beaupere, M. Garcia, J. Larghero, B. Fève, J. Capeau, C. Lagathu, Aging Cell, en révision favorable)

A-1-Introduction et objectifs de travail

Comme décrit précédemment, les patients infectés par le VIH et traités par des ARV présentent un risque accru de développer une déminéralisation osseuse conduisant à une ostéopénie, puis à une ostéoporose. L'infection par le VIH, par le biais de ses protéines virales semble être impliquée dans cette déminéralisation osseuse.

L'objectif de l'étude a été de rechercher les effets d'un traitement à long terme des MSC avec les protéines du VIH Tat et Nef en particulier en ce qui concerne la sénescence, et à évaluer la capacité de différenciation en ostéoblastes de ces précurseurs.

A-1-1-Le choix du modèle cellulaire : MSC

La sénescence, la déplétion, le défaut de recrutement et de différenciation des MSC sont impliqués dans l'installation de l'ostéoporose au cours du vieillissement normal. A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à l'effet à long terme des protéines du VIH sur la sénescence des MSC. Quelques études ont été menées sur l'effet à court terme des protéines virales (telles que Tat, Gag et gp120) sur la différenciation et l'activité ostéoblastique. Les ostéoblastes ne sont pas des cellules pérennes. Après la formation osseuse, ils se transforment en ostéocytes lorsqu'ils sont intégrés dans la matrice calcifiée, en cellules bordantes à l'interface entre moelle osseuse et matrice, ou meurent par apoptose. Nous nous sommes intéressées aux MSC, car ce sont des cellules résidentes permanentes au sein de la moelle osseuse, situées à proximité des niches hématopoïétiques et des vaisseaux sanguins. Lors d'une infection par le VIH, et avant la prise de traitement ARV, la proximité des MSC avec la circulation sanguine, les cellules immunitaires activées, y compris les cellules souches hématopoïétiques et les macrophages-monocytes potentiellement infectés par le VIH, en font très probablement une cible directe des protéines virales. De plus, dans la moelle osseuse, les précurseurs hématopoïétiques pourraient être des réservoirs du virus, présentant une réplication virale de bas grade. Cela implique que, même dans le cas d'une charge virale contrôlée par le traitement ARV, les MSC pourraient se trouver en présence des protéines virales (Figure 26).

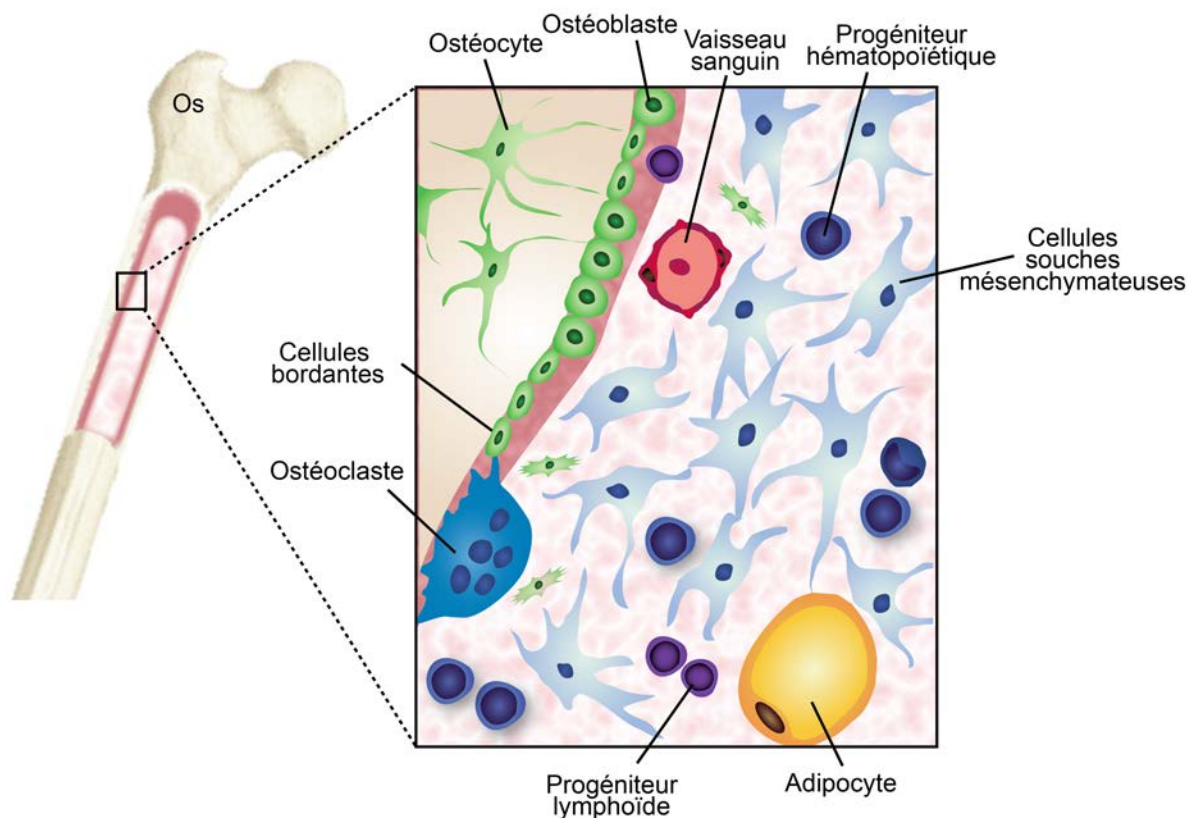


Figure 26 : La moelle osseuse

A-1-2-Le choix des protéines du VIH Tat et Nef

Nous avons privilégié l'étude de protéines du VIH documentées pour être sécrétées par les cellules infectées dans le milieu extracellulaire, à savoir les protéines Tat, Nef, Vpr, et gp120. Parmi ces protéines, Tat et Nef nous ont semblé être de bons candidats pour une implication dans la sénescence.

En effet, la protéine accessoire Nef est excrétée par les cellules infectées dans des microvésicules, et est détectable dans le plasma des patients infectés, indépendamment de leur charge virale ou de la prise de traitement antirétroviral (Raymond et al. 2011). De plus, Nef peut être présente sous forme myristoylée, ce qui lui permet de s'insérer dans les membranes et d'être internalisée dans le cytoplasme des cellules cibles. En plus de ses effets sur le stress oxydant, et l'inflammation, la protéine Nef est connue pour perturber le processus autophagique dans la cellule infectée, via une interaction directe avec la protéine BECN1 (Campbell and Spector 2013).

La protéine régulatrice Tat est une petite protéine transactivatrice sécrétée activement dans le milieu extracellulaire. Elle est fortement impliquée dans l'induction d'effets toxiques sur les cellules non infectées (Frankel et al. 1988, Chang et al. 1997). Tat est internalisée par endocytose dans les cellules non infectées, lui permettant de rejoindre le cytosol, avant de diffuser à travers la membrane nucléaire, ou le transactivateur va agir sur la transcription des gènes viraux (Debaisieux et al. 2012). La protéine

Tat est connue pour induire des dysfonctions mitochondriales, un stress oxydant, une inflammation et donc potentiellement la sénescence (voir partie D-1-8). De plus, il a été montré qu'elle pouvait directement interagir avec la protéine I κ B α et la sous unité P65 de NF- κ B, facteur pro-inflammatoire et pro-sénescent (Fiume et al. 2012).

A-1-3-Objectifs de travail

Pour toutes ces raisons, nous avons utilisé des MSC issues de la moelle osseuse de donneurs sains. Les MSC ont été cultivées en présence des protéines du VIH Tat et Nef. Nous avons étudié différents paramètres : la prolifération cellulaire, la sénescence, le stress oxydant, les dysfonctions mitochondriales, l'inflammation, et l'autophagie à 10 et 20 jours après l'initiation du traitement.

Title

The HIV proteins Tat and Nef promote human bone marrow mesenchymal stem cell senescence and alter osteoblastic differentiation by two independent pathways

Authors

Carine Beaupere^{1,2,3}, Marie Garcia^{1,2,3}, Jerome Larghero^{4,5}, Bruno Fève^{1,2,3,6}, Jacqueline Capeau^{1,2,3,7}, Claire Lagathu^{1,2,3}

Affiliations

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75012, Paris, France

²INSERM, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75012, Paris, France

³Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris, France

⁴Inserm, UMR1160, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France

⁵AP-HP, Hôpital Saint Louis, Unité de Thérapie Cellulaire et CIC de Biothérapies, Paris, France ; Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75475 Paris, France.

⁶APHP, Hôpital Saint-Antoine, F-75012, Paris, France

⁷APHP, Hôpital Tenon, F-75020, Paris, France

Correspondence

Dr Claire Lagathu
Inserm UMRS_938
CdR Saint Antoine
Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie
27 rue Chaligny
75012 Paris
Phone: +33-14001-1321
Fax: +33-14001-1342
claire.lagathu@inserm.fr

Summary

To maintain bone mass turnover and bone mineral density (BMD), bone marrow (BM) mesenchymal stem cells (MSCs) are constantly recruited and subsequently differentiated into osteoblasts. HIV-infected patients present lower BMD than non-HIV infected individuals and a higher prevalence of osteopenia/osteoporosis. In antiretroviral treatment-naive patients, encoded HIV-proteins represent pathogenic candidates. Indeed, they are released by infected cells within BM and can impact on neighbouring cells. In this study, we tested whether HIV proteins Tat and/or Nef could induce senescence of human BM-MSCs and reduce their capacity to differentiate into osteoblasts. When compared to non-treated cells, MSCs chronically treated with Tat and/or Nef for 20 days reduced their proliferative activity, and underwent early senescence, associated with increased oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. The antioxidant molecule N-acetylcysteine partly prevented Tat- but not Nef-induced senescence. Tat but not Nef induced an early increase in NF- κ B activity and cytokine/chemokine secretion. Tat-induced effects were prevented by the NF- κ B inhibitor parthenolide, indicating that Tat triggered senescence via NF- κ B activation leading to oxidative stress. Otherwise, Nef- but not Tat-treated cells displayed early inhibition of autophagy. Rapamycin, an autophagy inducer, reversed Nef-induced senescence and oxidative stress. Tat and Nef added together had cumulative effects. Finally, Tat and/or Nef decreased the MSC-potential of osteoblastic differentiation. In conclusion, our *in vitro* data show that Tat and Nef could reduce the number of available precursors by inducing MSC senescence, through either enhanced inflammation or reduced autophagy. These results offer new insights into the pathophysiological mechanisms of decreased BMD in HIV-infected patients.

Key words

HIV proteins, senescence, oxidative stress, inflammation, autophagy, osteoblastic differentiation

Running title

HIV-induced mesenchymal stem cell senescence

Introduction

Bone remodelling is controlled by the balance between osteoblast-mediated bone deposition and osteoclast-mediated bone resorption. Under pathophysiological conditions, this balance is affected and leads to abnormal bone mass turnover and to bone loss. Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent precursors, with the capacity to differentiate towards multiple tissue lineages such as adipocytes, chondroblasts and osteoblasts (Verma *et al.* 2002; Kim *et al.* 2012). To achieve osteogenic differentiation and maintain bone mass, MSCs within the bone marrow (BM) proceed through a number of functional stages including proliferation, matrix maturation, and mineralisation.

Osteoporosis and osteopenia are bone disorders characterized by a loss of bone mass and consequent reduction in bone strength, which in turn leads to an increased risk of fractures (Mazziotti *et al.* 2010). While a certain degree of bone weakening with age is considered normal, several clinical studies conducted over the past decade have shown that there is, among the HIV-infected population, an increased prevalence of osteopenia ranging from 20% to 50%, and of osteoporosis reaching up to 20% (Powderly 2002; Brown & Qaqish 2006; Stone *et al.* 2010). It is now clearly established that HIV infection is an independent risk factor for osteopenia and osteoporosis (Dolan *et al.* 2006; Stone *et al.* 2010). Cross-sectional studies of antiretroviral treatment (ART)-naive HIV infected patients found altered levels of bone turnover markers, in accordance with a reduced level of bone formation when compared to HIV-uninfected controls (Haskelberg *et al.* 2011).

Currently HIV-infection is controlled by efficient ART, transforming this situation into a chronic disease. However, elderly HIV-infected patients often present an increased incidence of age-related comorbidities, including significant reductions in bone mineral density (BMD). These observations led to propose that HIV-infected patients suffer from accentuated aging (Capeau 2011). The increased risk of premature osteoporosis in HIV-infected patients probably results from a combined effect of ART and HIV infection, in addition to other classical risk factors as drug consumption, low body weight and immune dysfunction (Stone *et al.* 2010; Castronuovo *et al.* 2013). To better understand the pathophysiology of bone loss in these patients is an important challenge.

Clinical studies have established that several HIV-related factors, including HIV infection and chronic inflammation, affected the balance between bone formation and resorption (Aukrust *et al.* 1999; Haskelberg *et al.* 2011). Since MSCs express the CD4 receptors and CCR5 and CXCR4 co-receptors, it is conceivable that these cells are susceptible to HIV infection, although integrated proviruses are rarely found and a productive infection has not yet been documented (Nazari-Shafti *et al.* 2011). Nonetheless, hematopoietic progenitor cells (HPCs) in the BM of HIV-infected individuals have been proposed as a persistent HIV-reservoir (McNamara *et al.* 2013), releasing HIV proteins or infectious virions that could induce bystander harmful effect on surroundings cells, such as apoptosis, oxidative stress, mitochondrial dysfunctions or autophagy alterations (Kyei *et al.* 2009; Raymond *et al.* 2011; Debaisieux *et al.* 2012). Proximity of MSCs and infected HPCs in the BM niche, makes MSCs a direct target of the HIV proteins. Some HIV proteins as gp120, Gag, Tat and Rev have been shown to affect osteoblastic differentiation and activity *in vitro* (Cotter *et al.* 2007; Gibellini *et al.* 2010; Cotter *et al.* 2011).

Aging MSCs display reduced proliferative and osteoblastic differentiation capacities (Fehrer &

Lepperdinger 2005; Zhou *et al.* 2008), which contribute to decreased bone formation. Therefore, in the present study, we hypothesized that bystander effects of HIV proteins arising from neighbouring infected cells or from reservoirs may abrogate marrow MSC self-renewal by inducing early aging and affecting differentiation properties. We chose to study two HIV proteins secreted by infected cells in the extracellular medium: Tat (Trans-Activator of Transcription) which is essential for transcriptional activation, and able to recruit and activate NF- κ B (Nuclear Factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells) (Westendorp *et al.* 1995; Ju *et al.* 2012) and Nef (Negative-regulating Factor), an accessory protein protecting HIV from degradation by acting as an anti-autophagic maturation factor (Dinkins *et al.* 2010; Raymond *et al.* 2011). We tested whether Tat and/or Nef could induce premature senescence of osteoblast precursor stem cells, namely MSCs, which in turn could be involved in osteoblast depletion and bone loss. The data presented in this study show that both Tat and Nef can induce cellular senescence and oxidative stress of MSCs, however through different mechanisms, with cumulative effects when added together.

Results

Long term treatment with Tat and/or Nef inhibits proliferation and induces senescence of MSCs. We first evaluated whether chronic exposure for 20 days to the HIV proteins Tat and/or Nef affected the proliferation capacities of MSCs *in vitro*. Human MSCs treated with Tat and/or Nef displayed a reduced proliferative activity that worsened with increasing cellular passages (Fig. 1A). Whereas population doubling level (PDL) did not significantly vary in control cells up to 20 days, it declined from day 5 to day 20 in the presence of the HIV proteins. After 20 days, Tat-treated MSC displayed a $21.4 \pm 4.5\%$ inhibition in cell proliferation compared to controls whereas Nef-treated cells displayed a $10.6 \pm 3.0\%$ inhibition (Fig. 1B). Moreover, we observed an early cumulative effect of Tat and Nef added together with an inhibition of proliferation of $15.5 \pm 0.9\%$ after 5 days of treatment and up to $35.5 \pm 0.4\%$ after 20 days. Reduced proliferation was confirmed by a decreased number of proliferative cells labelled with BrdU at day-20 (Fig. 1C-D). Apoptosis was not increased, when assayed by caspase 3/7 activity (data not shown).

In control cells, the percentage of senescent cells, measured by extra-lysosomal β -galactosidase activity, was $8.6 \pm 2.2\%$ and $9.3 \pm 2.2\%$, after 10 and 20 days of cell culture respectively (Fig. 1E-F). After 10 days, senescence was increased in cells treated with Tat+Nef but not with either Tat or Nef. After 20 days, the percentage of senescent cells was significantly increased in all cases and reached $17.1 \pm 1.6\%$, $18.0 \pm 4.1\%$ and $20.2 \pm 3.7\%$ in Tat-, Nef- and Tat+Nef-treated cells, respectively (Fig. 1E). Accordingly, the HIV proteins increased lysosome accumulation, a hallmark of aging, after 20 but not 10 days (Fig. 1G). Finally, we also found an increased protein expression of the cell cycle arrest marker p21^{WAF1} after 20 days of treatment (Fig. 1H). Taken as a whole, these results show that Tat- or Nef-treated cells presented an increased onset on cell senescence after 20 days of treatment, as compared to control cells. Moreover Tat and Nef co-treatment resulted in an early onset of cellular senescence.

Long-term treatment with Tat and/or Nef induces oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. The production of reactive oxygen species (ROS), measured by CM-H₂-DCFDA oxidation, was unchanged after 10 days of treatment with the HIV proteins, but was increased after 20 days by 1.3- to 1.4-fold by Tat and/or Nef, when compared to control cells (Fig. 2A). Equally, the reduction of NitroBlue Tetrazolium (NBT), which measures cellular oxidase activity, was also increased after 20 days of Tat and/or Nef treatment (Fig. 2B) along with an increased superoxide dismutase activity (SOD) (Fig. 2C). As mitochondrial dysfunction is often associated with ROS production, we evaluated mitochondrial volume by using Mitotracker Red labelling of mitochondria. We observed that, while the volume of mitochondria on day-10 was mildly increased in Tat and/or Nef-treated MSCs, this volume reached up to 1.5 fold of control on day-20 (Fig. 2D). In parallel, we observed a destabilisation of the mitochondrial membrane potential, as shown by the JC1 test (Fig. 2E). After 20 but not 10 days of treatment, we observed a 20% decrease in JC-1 fluorescence in Tat- or Nef-treated cells, and a 30% decrease in Tat+Nef treated cells, in accordance with the onset of mitochondrial dysfunction.

An antioxidant treatment prevents Tat and/or Nef-induced oxidative stress. To assess whether ROS production was involved in the onset of cellular senescence, MSCs were long-term

treated with the anti-oxidant N-acetyl cysteine (NAC) (from day 10 to day 20). As shown in figures 3A-B, on day 20, NAC prevented increased ROS production induced by Tat and/or Nef. NAC also normalized altered mitochondrial volume and function induced by Tat but not by Nef (Fig. 3C-D). Regarding senescence, NAC partly prevented Tat-decreased proliferation and lysosome accumulation, but induced no significant changes in SA- β -galactosidase activity (Fig. 3E-G). This suggests that even if oxidative stress participates to Tat-related dysfunction, it is not primordial in the induction of Tat-related senescence. In parallel, NAC was not able to prevent Nef-induced decrease in cell proliferation, lysosome accumulation, and SA- β -galactosidase activity (Fig. 3E-G). Overall, these results show that oxidative stress participates to Tat- but not Nef-related mitochondrial dysfunction and senescence.

Tat but not Nef induces inflammation: reversion of Tat-effects by the NF- κ B inhibitor parthenolide.

Treatment with Tat but not Nef resulted in an increased nuclear translocation of the activated pro-inflammatory and pro-senescent transcription factor NF- κ B, as shown by Figure 4A. In agreement, Tat- but not Nef-treated MSCs displayed an inflammatory phenotype, as shown by the increased secretion of IL-6 and IL-8 (Fig. 4B-C) observed after 10 days and persistent at 20 days.

To evaluate whether in Tat-treated cells, the early activation of NF- κ B and inflammatory markers could be responsible for the onset of cellular senescence, we used parthenolide, an NF- κ B inhibitor, over a short period of time (48 hours) on MSCs treated for 18 days with Tat or Tat+Nef. As expected, treatment with the NF- κ B inhibitor was able to prevent the increased secretion of IL-6 and IL-8 (Fig. 4D-E) induced by Tat and Tat+Nef. Regarding senescence, parthenolide significantly reduced the inhibition of cellular proliferation induced by Tat (from 21.4 \pm 3.2% to 16.7 \pm 1.1%) and Tat+Nef (from 34.2 \pm 3.9% to 28.9 \pm 1.6%) (Fig. 4F), and normalised the percentage of senescent cells in Tat- and Tat+Nef-treated cells to about 15% (Fig. 4G). Accordingly, parthenolide decreased lysosome accumulation (Fig. 4H). Regarding oxidative stress, parthenolide prevented ROS production (Fig. 4I) and mitochondrial dysfunction in Tat- and Tat+Nef-treated MSCs (Fig. 4J-K). Taken as a whole, these results show that Tat exerted its effect via the activation of NF- κ B, which induced the secretion of cytokines/chemokines leading to cellular senescence and oxidative stress.

Nef but not Tat decreases autophagy: prevention of Nef-induced effects by rapamycin.

Since Nef has been previously shown to inhibit Beclin-1, a protein involved in the induction of autophagy (Dinkins *et al.* 2010), we evaluated the effect of Nef on the autophagic process. After 20 days of treatment, Nef- but not Tat-treated cells showed a decreased LC3II labelling of the autophagosomes of about 25% as compared to the control (Fig. 5A-B). In accordance with an inhibition by Nef of the early autophagic efflux, we observed in Nef- but not Tat-treated cells, a decreased mRNA expression of autophagy-inducing proteins such as *ULK1*, *BECN1* and *GABARAP* (Fig. 5C) and the accumulation of the p62 protein (Fig. 5D), a marker of autophagy inhibition, upon day-10. We highlighted also that Nef-induced decrease of autophagy occurred together with a hyperactivation of protein kinase B (Akt/PKB) from day-10 (Fig. 5E), a kinase acting upstream of mTOR, implicated in the inhibition of autophagy in response to IGF1 (Nair & Ren 2012).

To evaluate whether Nef-induced inhibition of autophagy was a primary event leading to senescence, we used rapamycin, an immunosuppressant that acts through the inhibition of mTOR, thus activating autophagy (Kapahi *et al.* 2010; Markaki & Tavernarakis 2013). When rapamycin was added to the MSCs from day-15 to day-20 of treatment with Nef and Tat+Nef, we observed a decrease in MSC proliferation, as expected owing to the known antiproliferative activity of rapamycin (Fig. 5F). Despite the effect on cell proliferation, rapamycin treatment increased the amount of the autophagy marker LC3II (Fig. 5G). Rapamycin decreased the level of senescence as shown by the reduced percentage of β -galactosidase positive cells in control and Nef-treated MSCs by 25% (Fig. 5H), and reduced the volume of lysosomes by about 45% for Nef, and 52% for Tat+Nef (Fig. 5I). Regarding oxidative stress, rapamycin decreased ROS production induced by Nef and Tat+Nef by 74% and 77% (Fig. 5J), mitochondrial content by 33% and 49% (Fig. 5K), and increased the mitochondrial membrane potential (Fig. 5L). These results show that Nef inhibited autophagy, possibly in part through the activation of the Akt/PKB signalling pathway, leading to the onset of cellular senescence and oxidative stress.

Long-term treatment with Tat and/or Nef alters MSC osteoblastic differentiation. Age-related loss of bone mass is associated with altered differentiation capacities affecting osteoblastic fate. Thus, we undertook a study to evaluate the impact of Tat and/or Nef on the ability of MSCs to differentiate into mature osteoblasts. After a 20-day pre-treatment with Tat and/or Nef, cells were induced to differentiate in a pro-osteoblastic media, in the presence of the HIV proteins. After 15 days of differentiation, a decreased staining with alizarin red, which visualizes calcium deposition, was observed in MSCs long-term treated with Tat and/or Nef (Fig. 6A-B). Accordingly, the decreased ability of MSCs to undergo osteoblastic differentiation in the presence of the HIV proteins was supported by the lower level of the RUNX2 protein (Fig. 6C), decreased RUNX2 mRNA expression (Fig. 6D), and also a decreased level of osteocalcin secretion (Fig. 6E). These markers stress for a decreased level of osteoblastic differentiation in the presence of Tat and/or Nef.

Discussion

We show here that the HIV proteins Tat and Nef can induce cellular senescence and oxidative stress in BM MSCs, leading to a reduced capacity of differentiation towards the osteoblastic lineage. Importantly, for the first time, we demonstrate that Tat-induced senescence was mediated by the activation of the NF- κ B pathway, while Nef-induced senescence resulted from the inhibition of autophagy. We propose that Tat and Nef, at low concentrations, could alter the osteoblastic precursors, namely MSCs, giving new insights into the decreased BMD observed in HIV-infected patients.

We evaluated here the impact of the HIV proteins Tat and Nef, since both are known to be secreted by infected cells into the extracellular media, and suspected to induce bystander cellular damage to non-infected surroundings cells (Kyei *et al.* 2009; Raymond *et al.* 2011; Debaisieux *et al.* 2012). Indeed, within the BM, MSCs could be the indirect target of HIV infection.

We observed, at first, that both Tat and Nef induced cellular senescence. Moreover Tat and Nef co-treatment induced an earlier onset of senescence, and a stronger decrease in cell proliferation, in accordance with a cumulative effect of the two HIV proteins related to the different signalling pathways affected by Tat and Nef. Tat- and Nef-decreased cell proliferation was a sensitive marker since it can be observed as soon as after 5 days of treatment. Otherwise, the increase in senescence-related markers, as SA- β -galactosidase activity occurred only after 10 days when Tat and Nef were added together, or 20 days of treatment for SA- β -galactosidase activity induced by Tat or Nef alone, and for lysosome accumulation.

Many studies have shown that oxidative stress plays a major role in MSC alterations (Stolzing *et al.* 2008; Kasper *et al.* 2009; Brandl *et al.* 2011). Moreover, ROS and mitochondrial dysfunction are key mediators of signalling pathways that underlie cellular senescence (Le Bras *et al.* 2005). First we observed that increased ROS production occurred later than the decreased cell proliferation, in response to the HIV proteins. To analyse whether ROS could contribute to the triggering of cellular senescence, the anti-oxidant molecule NAC was tested for its ability to reverse some effects of Tat and/or Nef. Whereas NAC reduced ROS production in both Tat and Nef-treated MSCs as expected, it could not prevent any of the effect induced by Nef alone. Therefore, we propose that Nef-induced oxidative stress is a late event induced by senescence. By contrast, NAC prevented the effect of Tat on mitochondrial dysfunction, but also moderately improved cell proliferation and the level of lysosomes. Thus, these results suggest that oxidative stress may participate to the ability of Tat to induce senescence, but acts also as a secondary event being increased by senescence, and thereby enhancing cellular senescence.

When evaluating the mechanisms whereby Tat altered MSCs, we observed that cytokine secretion and NF- κ B activation were affected early after 10 days. These results are in accordance with the literature, indicating that Tat mediates part of its effect through the activation of NF- κ B (Mahieux *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2011). A common feature of aging tissues is low-level chronic inflammation, termed inflammaging. The transcription factor NF- κ B has been shown to play a role in the induction of senescence (Tilstra *et al.* 2011). In accordance, senescent cells secrete proinflammatory cytokines and chemokines (such as IL-8 and IL-6) representative of a senescence-associated secretory phenotype (Coppe *et al.* 2008). Proinflammatory signals are reinforced by an intracellular signalling loop including oxidative stress, and the transcription factor

NF- κ B that is implicated in apoptosis, cell cycle progression, cell senescence, and inflammation (Tilstra *et al.* 2011; Tchkonina *et al.* 2013). To assess the implication of the NF- κ B pathway in Tat-induced senescence, we used parthenolide, a selective inhibitor of the I κ B kinase, resulting in stabilization of the cytoplasmic I κ B α , which in turn leads to inhibition of NF- κ B nuclear translocation (Saadane *et al.* 2007). We found that all the effects of Tat, in particular decreased cell proliferation, increased senescence, oxidative stress and mitochondrial dysfunction could be prevented by parthenolide. These experiments, together with those using an antioxidant, allowed us to establish that NF- κ B activation is a primary event in Tat-induced premature senescence.

We then analysed the mechanisms whereby Nef induced cellular senescence. Previous studies have shown that Nef can inhibit autophagy through a direct interaction with Beclin 1, a protein required for the nucleation of the autophagosome (Kyei *et al.* 2009; Killian 2012). Autophagy is the central degradation process in cells required for the recycling of damaged organelles and macromolecules (Rubinsztein *et al.* 2011). We confirmed here that Nef, but not Tat, could inhibit autophagy using several markers including LC3II, mRNA expression of specific markers of the initiation of autophagy (ULK1) and autophagosome formation (Beclin1, GABARAP) and accumulation of the protein P62, an autophagic adaptor. We also show that Nef could induce the activation of Akt, known to activate the TOR kinase in the signalling cascade leading to the activation of mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), which promotes growth by negatively regulating autophagy. Indeed, in response to growth factors, mTORC1, composed of mTOR (the direct target rapamycin), associates with the autophagy complex (which includes Ulk1), thus inhibiting autophagy. NAC failed to rescue Nef-induced decreased autophagy and senescence, showing that oxidative stress was a late event. To analyse the role of reduced autophagy in the Nef effect, we used rapamycin, an activator of autophagy (Kapahi *et al.* 2010; Markaki & Tavernarakis 2013). Rapamycin was able to prevent the effect of Nef on both oxidative stress and cellular senescence. Moreover, as Nef inhibits autophagy it can also affect mitophagy, inducing dysfunctional mitochondria accumulation, which was also prevented in our study by the addition of rapamycin (Dinkins *et al.* 2010), but not NAC. Therefore, these results suggest that inhibition of the autophagic pathway could be the primary event in Nef-induced senescence. Since we observed that NAC prevented Nef-induced oxidative stress, but not senescence, this suggests that senescence was responsible for increased ROS production.

Senescent MSCs are present in human BM of aged patients, presenting increased oxidative stress and decreased cell plasticity, affecting more particularly the osteoblast differentiation (Zhou *et al.* 2008). Thus we undertook a study to evaluate the impact of Tat and/or Nef on the ability of MSCs to differentiate into mature osteoblasts. Early senescence induced by Tat and Nef, was associated with a loss of the ability of MSCs to differentiate into osteoblasts, as shown by the decrease of several osteoblastic markers and calcium deposition. These results are in keeping with clinical data, showing a decreased BMD in HIV-infected patients (Powderly 2002; Brown & Qaqish 2006; Stone *et al.* 2010), stressing a direct role of HIV in decreased bone formation.

Our study has limitations. It may not account for many factors involved in the accelerated pro-osteoporotic process observed in HIV-infected patients, meaning the HIV infection itself, immune balance, environmental factors, and genetic predispositions, together with ART. As cellular senescence is a common pathway of many cell lineages other than MSCs, it is possible that Tat and Nef could induce senescence of several cell types in addition to MSCs, including

hematopoietic stem cells. The impact of Tat and Nef on osteoclasts, derived from the hematopoietic lineage, remains to be evaluated, as several studies indicate an increased level of resorption markers in HIV-infected patients (Barkhordarian *et al.* 2011; Haskelberg *et al.* 2011), emphasising the role of HIV infection on bone destruction. Our data suggest that some HIV proteins could induce premature senescence of MSCs, therefore precluding the regeneration process normally associated with bone loss. However, we have not tested other HIV-1 proteins, which could also exert deleterious effects.

In conclusion, our data provide the first experimental support that HIV proteins could induce senescence of MSCs. It has been suggested that the regenerative capacity of tissues with high cell turnover, such as bone, might be reduced due to exhaustion of progenitor cells. We hypothesize that during HIV infection, induction of premature aging in MSCs, along with chronic inflammation and continuous oxidative stress could contribute to cell attrition and MSCs exhaustion. Therefore, the consequence of early senescence induced by HIV would be the lack of an appropriate number of stem cells for further tissue replacement and the development of bone loss and aging. While Nef inhibited autophagy, we show that Tat induced an inflammatory phenotype in MSCs, the two proteins exhibiting cumulative effects. Thus our results support the idea that HIV-induced premature aging in MSCs, along with chronic inflammation, autophagy inhibition and sustained oxidative stress, could contribute to MSC exhaustion.

Experimental procedures

Cell culture and treatment. Experimental procedures, with human bone marrow, have been approved by the Saint Louis Hospital Ethical Committees for human research (Paris, France), in accordance with the European Union guidelines and the declaration of Helsinki. MSCs were isolated from washed filters used during bone marrow graft processing. MSCs were obtained and cultured as previously described (Hernandez-Vallejo *et al.* 2013). Briefly, healthy donors bone marrow cells obtained after Ficoll (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA) were cultured at the initial density of 5.10^4 cells/cm² in alpha-minimum essential medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA), 2mmol/L glutamine, 2.5ng/mL basic fibroblast growth factor (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), Penicillin/Streptomycin (Gibco, Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA). After 24-48 h, non-adherent cells were removed and medium was changed. Adherent cells were then trypsinised, harvested and cultured by seeding 5.10^3 cells/cm². Cultures were fed every 2 to 3 days and trypsinised every 5 days. All experiments were performed on MSCs isolated from at least 3 different bone marrow donors. Cells were exposed to the HIV recombinant proteins Tat 40nmol/L and/or Nef 40nmol/L (Diatheva, Fano, Italy), at clinically relevant concentrations observed in HIV-infected patients naive of treatment (Gougeon 2003; Boya *et al.* 2004; Raymond *et al.* 2011), or to the solvent (PBS) for 20 days, from passage 3 to 8. The cells were also incubated, concomitantly with Tat and/or Nef treatment, for 10 days with 250µmol/L N-acetyl-cysteine (NAC), or for 5 days with 100nmol/L Rapamycin (Rapa) or for 2 days with 100µmol/L parthenolide (Part) (all from Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA).

Cell proliferation and apoptosis. Cellular senescence was evaluated by the cell population doubling level (PDL) calculated as described previously (Hernandez-Vallejo *et al.* 2013), as $\log_2(D5/D0)$, where D0 and D5 are the number of cells at seeding and harvesting, respectively. Dividing cells were identified by measuring bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Briefly, upon day 8 and days 18 post-HIV-protein treatment, cells were incubated for 16 h with BrdU (15µmol/L), then fixed and permeabilised. Anti-BrdU antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was revealed by using secondary antibodies coupled to Texas Red (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Cell nuclei were visualized after diamidino-phenylindole hydrochloride staining (DAPI, Sigma-Aldrich). Dividing cells, examined by fluorescence microscopy, were counted in four randomly selected fields and expressed as a percentage of total cells. The percentage of apoptotic cells was determined using Apo-ONE homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega Biosciences, San Luis Obispo, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Quantification was performed on a plate fluorescence reader (Spectrafluor Plus, Tecan-France, Trappes, France) at 530 nm.

Cellular senescence and autophagy. The positive blue staining of β -galactosidase was used as a biomarker of cellular senescence. To detect senescence-associated- β -galactosidase activity, cells were incubated with appropriate buffer solution containing X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) as described previously (Hernandez-Vallejo *et al.* 2013). The blue stained cells observed at pH 6 and pH 4 were counted in 8 fields at 20X magnification and the percentage of pH6 positive blue cells, which specifically represents SA- β -galactosidase activity, was calculated. We used the acidotropic dye LysoTracker (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA) to evaluate lysosomal mass. Briefly, cells were cultured in 96-

well plates, washed and incubated with LysoTracker (50 nmol/L) in DMEM, for 30 min at 37°C in the dark. Quantification was performed on a plate fluorescence reader (Spectrafluor Plus, Tecan-France, Trappes, France) at 620 nm. Autophagosome formation was visualized by immunofluorescence with an antibody directed against LC3II (LC3, M152-3, MBL international, Woburn MA, USA) in MSCs cultured with the HIV proteins for 20 days (Leica TCS SP microscope, 40X magnification). Nuclear DNA was stained with DAPI.

Cytokine/chemokine and osteocalcin secretion. Human IL-6 and IL-8 concentrations in cell culture media from MSCs were determined after 10 and 20 days of incubation with Tat and/or Nef, by using Quantikine human sandwich ELISA kits (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA). The sensitivity of the assays was: 0.7pg/ml for IL-6 and 7.5pg/ml for IL-8. Human osteocalcin concentration in cell culture media from differentiated MSCs was determined after 15 days of differentiation, by using Osteocalcin Human Direct ELISA Kit (Life technologies, Gaithersburg, MD, USA). The sensitivity of the assays was 0.4ng/mL.

Osteoblast Differentiation. Differentiation was triggered on MSCs in the presence of HIV proteins. MSCs were differentiated into osteoblasts by culture in the osteoblast differentiation media for 15 days (10mmol/L β -glycerophosphate, 50 μ g/mL ascorbate). Cells were then stained for Alizarin Red (Sigma Aldrich, St Louis, MO, US) as described previously (Hernandez-Vallejo *et al.* 2013).

Mitochondrial dysfunctions and oxidative stress. We used the cationic dye JC-1 (tetrachloro-tetra-ethyl-benzimidazolyl-carbocyanine iodide) to evaluate mitochondrial membrane potential, and the MitoTracker Red probe (Both from Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA) to measure mitochondrial mass, as previously described (Hernandez-Vallejo *et al.* 2013). Briefly, cells were cultured in 96-well plates, washed and incubated with JC-1 (4 μ g/ml), or Mitotracker (50nmol/L) in DMEM, for 60 min at 37°C in the dark. Quantification was performed on a plate fluorescence reader (Spectrafluor Plus, Tecan-France, Trappes, France) at 595 and 530 nm (JC-1 aggregates and monomers, respectively) or 630 nm (MitoTracker). The production of ROS was assessed by the oxidation of 5-6-chloromethyl-2,7-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA) (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA) or the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) as previously described (Hernandez-Vallejo *et al.* 2013). Results were normalized to cell protein content. Superoxide dismutase (SOD) activity was evaluated using a commercially available kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), according to the manufacturer's instructions.

Protein extraction and Western blotting. Proteins were extracted from cell monolayers as previously described (Hernandez-Vallejo *et al.* 2013), and were electro-blotted on nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences GE Healthcare Europe, Velizy Villacoublay, France). Specific proteins were detected by incubation with the appropriate primary antibodies (P21^{WAF1}, Phospho P65 subunit of NF- κ B, P62, Akt, Phospho Akt, RUNX2/CBFA, ERK1/2, PCNA) and horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies. Immune complexes were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences GE Healthcare Europe, Velizy Villacoublay, France).

RNA isolation and quantitative RT-PCR. Total RNA was isolated from cultured cells using an RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA,) and mRNA expression was analysed by RT-PCR as described previously (Hernandez-Vallejo *et al.* 2013). The sequence of the oligonucleotides used

as primers are available upon request.

Statistical analysis. All experiments were performed at least three times on triplicate samples. Data are expressed as means \pm SEM. Statistical significance, between HIV-protein-treated cells vs control with or without parthenolide, rapamycin or NAC, was determined with non-parametric Wilcoxon's test.

For Peer Review

Acknowledgments

Research is funded by UPMC, INSERM and ANRS. Personal support is acknowledged as follows: DIM-STEMPOLE doctoral fellowship (CB).

Conflict of interest.

No conflict of interest could be disclosed for any author.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CB and CL. Performed the experiments: CL, CB and MG. Analysed the data: CB, CL and JC. Contributed reagents/materials/analysis tools: JL. Wrote the paper: CB, CL, JC, BF.

References

- Aukrust P, Haug CJ, Ueland T, Lien E, Muller F, Espevik T, Bollerslev J, Froland SS (1999). Decreased bone formative and enhanced resorptive markers in human immunodeficiency virus infection: indication of normalization of the bone-remodeling process during highly active antiretroviral therapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. **84**, 145-150.
- Barkhordarian A, Ajaj R, Ramchandani MH, Demerjian G, Cayabyab R, Danaie S, Ghodousi N, Iyer N, Mahanian N, Phi L, Giroux A, Manfrini E, Neagos N, Siddiqui M, Cajulis OS, Brant XM, Shapshak P, Chiappelli F (2011). Osteoimmunopathology in HIV/AIDS: A Translational Evidence-Based Perspective. *Pathology research international*. **2011**, 359242.
- Boya P, Pauleau AL, Poncet D, Gonzalez-Polo RA, Zamzami N, Kroemer G (2004). Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochimica et biophysica acta*. **1659**, 178-189.
- Brandl A, Meyer M, Bechmann V, Nerlich M, Angele P (2011). Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Experimental cell research*. **317**, 1541-1547.
- Brown TT, Qaqish RB (2006). Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *AIDS*. **20**, 2165-2174.
- Capeau J (2011). Premature Aging and Premature Age-Related Comorbidities in HIV-Infected Patients: Facts and Hypotheses. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. **53**, 1127-1129.
- Castronuovo D, Cacopardo B, Pinzone MR, Di Rosa M, Martellotta F, Schioppa O, Moreno S, Nunnari G (2013). Bone disease in the setting of HIV infection: update and review of the literature. *European review for medical and pharmacological sciences*. **17**, 2413-2419.
- Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology*. **6**, 2853-2868.
- Cotter EJ, Chew N, Powderly WG, Doran PP (2011). HIV type 1 alters mesenchymal stem cell differentiation potential and cell phenotype ex vivo. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **27**, 187-199.
- Cotter EJ, Malizia AP, Chew N, Powderly WG, Doran PP (2007). HIV proteins regulate bone marker secretion and transcription factor activity in cultured human osteoblasts with consequent potential implications for osteoblast function and development. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **23**, 1521-1530.
- Debaisieux S, Rayne F, Yezid H, Beaumelle B (2012). The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic*. **13**, 355-363.
- Dinkins C, Arko-Mensah J, Deretic V (2010). Autophagy and HIV. *Seminars in cell & developmental biology*. **21**, 712-718.
- Dolan SE, Kanter JR, Grinspoon S (2006). Longitudinal analysis of bone density in human immunodeficiency virus-infected women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. **91**, 2938-2945.
- Fehrer C, Lepperdinger G (2005). Mesenchymal stem cell aging. *Experimental gerontology*. **40**, 926-930.

- Gibellini D, De Crignis E, Ponti C, Borderi M, Clo A, Misericocchi A, Viale P, Re MC (2010). HIV-1 Tat protein enhances RANKL/M-CSF-mediated osteoclast differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*. **401**, 429-434.
- Gougeon ML (2003). Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nature reviews. Immunology*. **3**, 392-404.
- Haskelberg H, Carr A, Emery S (2011). Bone turnover markers in HIV disease. *AIDS reviews*. **13**, 240-250.
- Hernandez-Vallejo SJ, Beaupere C, Larghero J, Capeau J, Lagathu C (2013). HIV protease inhibitors induce senescence and alter osteoblastic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells: beneficial effect of pravastatin. *Aging Cell*. **12**, 955-965.
- Ju SM, Goh AR, Kwon DJ, Youn GS, Kwon HJ, Bae YS, Choi SY, Park J (2012). Extracellular HIV-1 Tat induces human beta-defensin-2 production via NF-kappaB/AP-1 dependent pathways in human B cells. *Molecules and cells*. **33**, 335-341.
- Kapahi P, Chen D, Rogers AN, Katewa SD, Li PW, Thomas EL, Kockel L (2010). With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell metabolism*. **11**, 453-465.
- Kasper G, Mao L, Geissler S, Draycheva A, Trippens J, Kuhnisch J, Tschirschmann M, Kaspar K, Perka C, Duda GN, Klose J (2009). Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton. *Stem Cells*. **27**, 1288-1297.
- Killian MS (2012). Dual role of autophagy in HIV-1 replication and pathogenesis. *AIDS research and therapy*. **9**, 16.
- Kim M, Kim C, Choi YS, Kim M, Park C, Suh Y (2012). Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: implication to age-associated bone diseases and defects. *Mechanisms of ageing and development*. **133**, 215-225.
- Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Dong C, Wu L, Kominami E, Ueno T, Yamamoto A, Federico M, Panganiban A, Vergne I, Deretic V (2009). Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *The Journal of cell biology*. **186**, 255-268.
- Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S, Brenner C (2005). Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and histopathology*. **20**, 205-219.
- Mahieux R, Lambert PF, Agbottah E, Halanski MA, Deng L, Kashanchi F, Brady JN (2001). Cell cycle regulation of human interleukin-8 gene expression by the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *Journal of virology*. **75**, 1736-1743.
- Markaki M, Tavernarakis N (2013). Metabolic control by target of rapamycin and autophagy during ageing - a mini-review. *Gerontology*. **59**, 340-348.
- Mazziotti G, Canalis E, Giustina A (2010). Drug-induced osteoporosis: mechanisms and clinical implications. *Am J Med*. **123**, 877-884.
- McNamara LA, Onafuwa-Nuga A, Sebastian NT, Riddell Jt, Bixby D, Collins KL (2013). CD133+ hematopoietic progenitor cells harbor HIV genomes in a subset of optimally treated people with long-term viral suppression. *The Journal of infectious diseases*. **207**, 1807-1816.
- Nair S, Ren J (2012). Autophagy and cardiovascular aging: lesson learned from rapamycin. *Cell Cycle*. **11**, 2092-2099.

- Nazari-Shafti TZ, Freisinger E, Roy U, Bulot CT, Senst C, Dupin CL, Chaffin AE, Srivastava SK, Mondal D, Alt EU, Izadpanah R (2011). Mesenchymal stem cell derived hematopoietic cells are permissive to HIV-1 infection. *Retrovirology*. **8**, 3.
- Powderly WG (2002). Long-term exposure to lifelong therapies. *J Acquir Immune Defic Syndr*. **29 Suppl 1**, S28-40.
- Raymond AD, Campbell-Sims TC, Khan M, Lang M, Huang MB, Bond VC, Powell MD (2011). 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*. **27**, 167-178.
- Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G (2011). Autophagy and aging. *Cell*. **146**, 682-695.
- Saadane A, Masters S, DiDonato J, Li J, Berger M (2007). Parthenolide inhibits I κ B kinase, NF- κ B activation, and inflammatory response in cystic fibrosis cells and mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. **36**, 728-736.
- Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mechanisms of ageing and development*. **129**, 163-173.
- Stone B, Dockrell D, Bowman C, McCloskey E (2010). HIV and bone disease. *Arch Biochem Biophys*. **503**, 66-77.
- Tchkonia T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *The Journal of clinical investigation*. **123**, 966-972.
- Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD (2011). NF- κ B in Aging and Disease. *Aging and disease*. **2**, 449-465.
- Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ (2002). Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J Clin Pathol*. **55**, 693-698.
- Westendorp MO, Shatrov VA, Schulze-Osthoff K, Frank R, Kraft M, Los M, Krammer PH, Droge W, Lehmann V (1995). HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF- κ B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *The EMBO journal*. **14**, 546-554.
- Zhang HS, Sang WW, Ruan Z, Wang YO (2011). Akt/Nox2/NF- κ B signaling pathway is involved in Tat-induced HIV-1 long terminal repeat (LTR) transactivation. *Arch Biochem Biophys*. **505**, 266-272.
- Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, Leboff MS, Glowacki J (2008). Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*. **7**, 335-343.

Figure legends

Figure 1 Long term exposure to Tat and/or Nef inhibits proliferation and induces senescence in MSCs. The population doubling level (PDL) was calculated as stated in Experimental procedures. Mean PDL values (\pm SEM), were determined at the indicated days post-HIV-proteins treatment (**A**). The % inhibition of cell proliferation was calculated for each HIV protein by determining the increase in total cell number that occurred after 20 days of continuous exposure to HIV proteins, compared to control cells (**B**). Cultures of non-confluent MSCs on coverslips were fixed, stained with BrdU and analysed by immunofluorescence microscopy to determine the number of dividing cells after day-20 of HIV-proteins treatment (**C**). Representative micrographs of BrdU positive cells and DAPI stained cells, are shown (**D**). Senescence was evaluated by SA- β -galactosidase activity and expressed as the total % of SA- β -galactosidase positive cells at pH6 (**E**). Representative micrographs of SA- β -galactosidase positive cells are shown (**F**). Lysosomal accumulation was assessed by LysoTracker fluorescence probe and expressed as % of control cells (**G**). Whole-cell lysates were extracted from MSCs at day 20 of HIV-proteins treatment, and analysed by immunoblotting. Representative immunoblots of cell cycle arrest markers P21WAF1 and ERK1/2 (loading control) are shown (**H**). Results are mean \pm SEM. All experiments were performed in duplicate or triplicate in MSCs isolated from 3 to 4 different bone marrow donors. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, vs control cells.

Figure 2 Tat and/or Nef induce oxidative stress and mitochondrial dysfunction in MSCs. MSCs were treated with the HIV proteins Tat and/or Nef up to 20 days. ROS production was assessed at the indicated days post-HIV-protein treatment by the oxidation of CM-H₂DCFDA (**A**) and the reduction of NBT (**B**), and expressed as % of control cells. Superoxide dismutase activity was evaluated as stated in Experimental procedures at the indicated days post-HIV-proteins treatment and expressed as % of control cells (**C**). Mitochondrial mass was evaluated by MitoTracker Red-Probe and results are expressed as % of Control cells (**D**). The cationic dye JC-1 evaluates mitochondrial membrane potential, monomers (green fluorescence) and aggregates (red–orange fluorescence) were quantified. The results are expressed as the ratio of aggregate/monomer fluorescence (**E**). Results are mean \pm SEM. All experiments were performed in duplicate or triplicate. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, vs control cells.

Figure 3 NAC treatment prevents oxidative stress and partially prevents Tat-induced senescence in MSCs. NAC was added or not at day-10, for 10 days. ROS production was assessed on day-20 post-HIV-protein treatment by the oxidation of CM-H₂DCFDA (**A**) and the reduction of NBT (**B**). Mitochondrial mass was evaluated by MitoTracker Red-Probe (**C**), and mitochondrial membrane potential by JC-1 fluorescent dye as described in Experimental procedures (**D**). Mean cell number, and the percent inhibition of cell proliferation were calculated for each condition (**E**). Senescence was evaluated by SA- β -galactosidase activity and expressed as the total % of SA- β -galactosidase cells at pH6 (**F**). Lysosomal accumulation was assessed by LysoTracker fluorescence probe and expressed as % of control cells (**G**). Results are mean \pm SEM. All experiments were performed in duplicate or triplicate. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, vs control or vs Tat- and/or Nef-treated cells without NAC. NS, non significant.

Figure 4 Tat but not Nef induces a pro-inflammatory profile: reversion by the NF- κ B inhibitor parthenolide Representative immunoblots of Nuclear phospho-P65-NF- κ B and PCNA/proliferating cell nuclear antigen (loading control) at day-20 (**A**) are shown. Upon day 10

and day 20, the levels of IL-6 (B), and IL-8 (C) in the cell culture media were determined with ELISA assays. Parthenolide (Part) was added or not at day 18 for 48 hours. IL-6 (D), and IL-8 (E) in the cell culture media were determined. Results are expressed as ng/mg of total cell proteins-24 hours. Mean cell number, and the percent inhibition of cell proliferation were calculated for each condition (F). Senescence was evaluated by SA- β -galactosidase activity and expressed as the total % of SA- β -galactosidase cells at pH6 (G). Lysosomal accumulation was assessed by LysoTracker fluorescence probe and expressed as % of control cells (H). ROS production was assessed on day 20 by the oxidation of CM-H₂DCFDA (I). Mitochondrial mass was evaluated by MitoTracker Red-Probe (J), and mitochondrial membrane potential by JC-1 fluorescent dye as described in Experimental procedures (K). Results are mean \pm SEM. All experiments were performed in duplicate or triplicate. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, vs control or vs Tat- and/or Nef-treated cells without parthenolide. NS, non significant.

Figure 5 Nef impedes the autophagic efflux in MSCs: prevention by rapamycin. MSCs were treated with the HIV proteins Tat and Nef for up to 20 days. The level of autophagic activity was determined by LC3-II staining of autophagic vesicles, as stated in Experimental procedures. Total fluorescence of LC3-II was evaluated and results are expressed as % of control cells (A). Representative micrographs of LC3-II-labelled and DAPI-stained cells are shown (B). Human BECN1, GABARAP and ULK mRNA levels were measured using real time RT PCR on day-20 post HIV proteins treatment. The relative mRNA expression levels were normalized to PPIA (C). Whole-cell lysates were extracted from MSCs at day-10 of treatment with the HIV proteins, and analysed by immunoblotting. Representative immunoblots of P62, actin (Loading control) (D), and Akt, Phospho Akt (E) are shown. Rapamycin (Rapa) was added from day 15 to day-20. Mean cell number, and the percent inhibition of cell proliferation were calculated for each condition (F). The level of autophagic activity was determined by with LC3-II staining of autophagic vesicles, as stated in Experimental procedures. Total fluorescence of LC3-II was evaluated and results are expressed as % of control cells (G). Senescence was evaluated by SA- β -galactosidase activity and expressed as the total % of SA- β -galactosidase cells at pH6 (H). Lysosomal accumulation was assessed by LysoTracker fluorescence probe and expressed as % of control cells (I). ROS production was assessed on day-20 by the oxidation of CM-H₂DCFDA (J). Mitochondrial mass was evaluated by MitoTracker Red-Probe (K), and mitochondrial membrane potential by JC-1 fluorescent dye as described in Experimental procedures (L). Results are mean \pm SEM. All experiments were performed in duplicate or triplicate. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, vs control or vs Tat- and/or Nef-treated cells without rapamycin. NS, non significant.

Figure 6 Tat- and Nef-induced senescence is associated with altered osteoblastic potential of MSCs. MSCs were differentiated into osteoblasts after 20 days of treatment with Tat and/or Nef. To evaluate the osteoblastic potential of MSCs, cells were stained with Alizarin Red 15 days post-induction of differentiation. Quantification of Alizarin Red is expressed as % of control cells (A), and representative micrographs are shown (B). Whole-cell lysates were extracted at day-15 post-induction of differentiation from MSCs, and analysed by immunoblotting. Representative immunoblots of RUNX2 and ERK1/2 are shown (C). Human *RUNX2* and *OSX* mRNA levels were measured using real time RT-PCR. The relative mRNA expression levels were normalized to PPIA (D). Osteocalcin in the cell culture media was determined with ELISA assays. Results are expressed as pg/mg of total cell proteins-24 hours (E). Results are mean \pm SEM. All experiments

were performed in duplicate or triplicate. *P<0.05, **P<0.01,***P<0.001, vs control cells.

For Peer Review

Figure 1

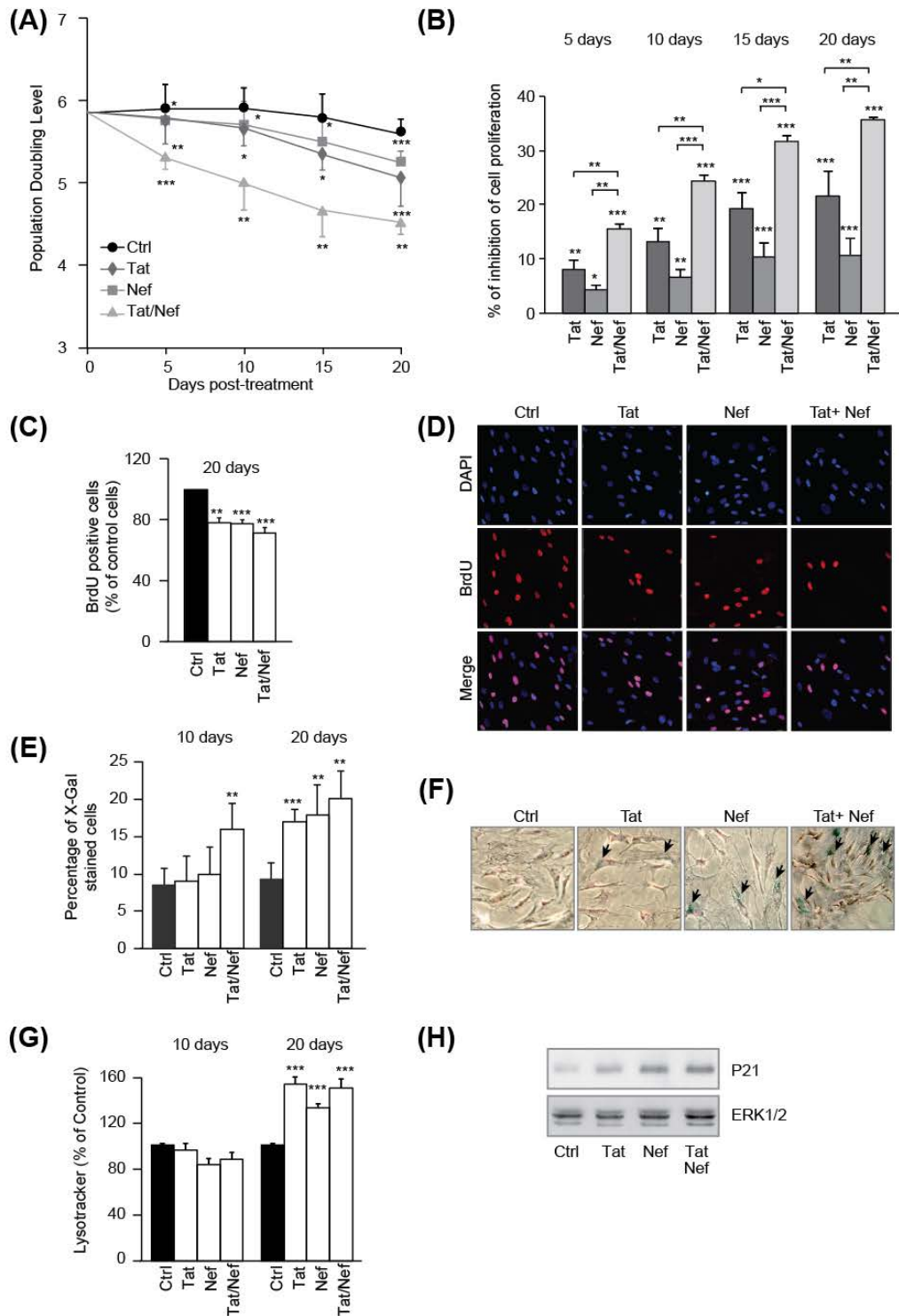


Figure 2

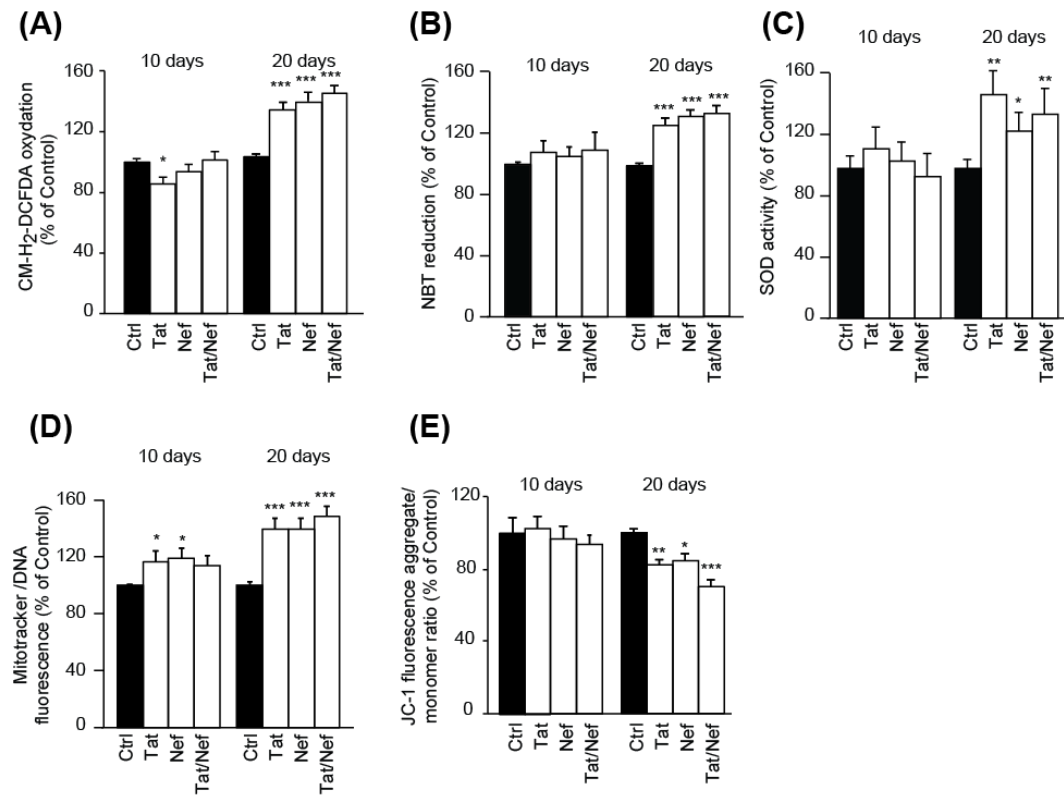


Figure 3

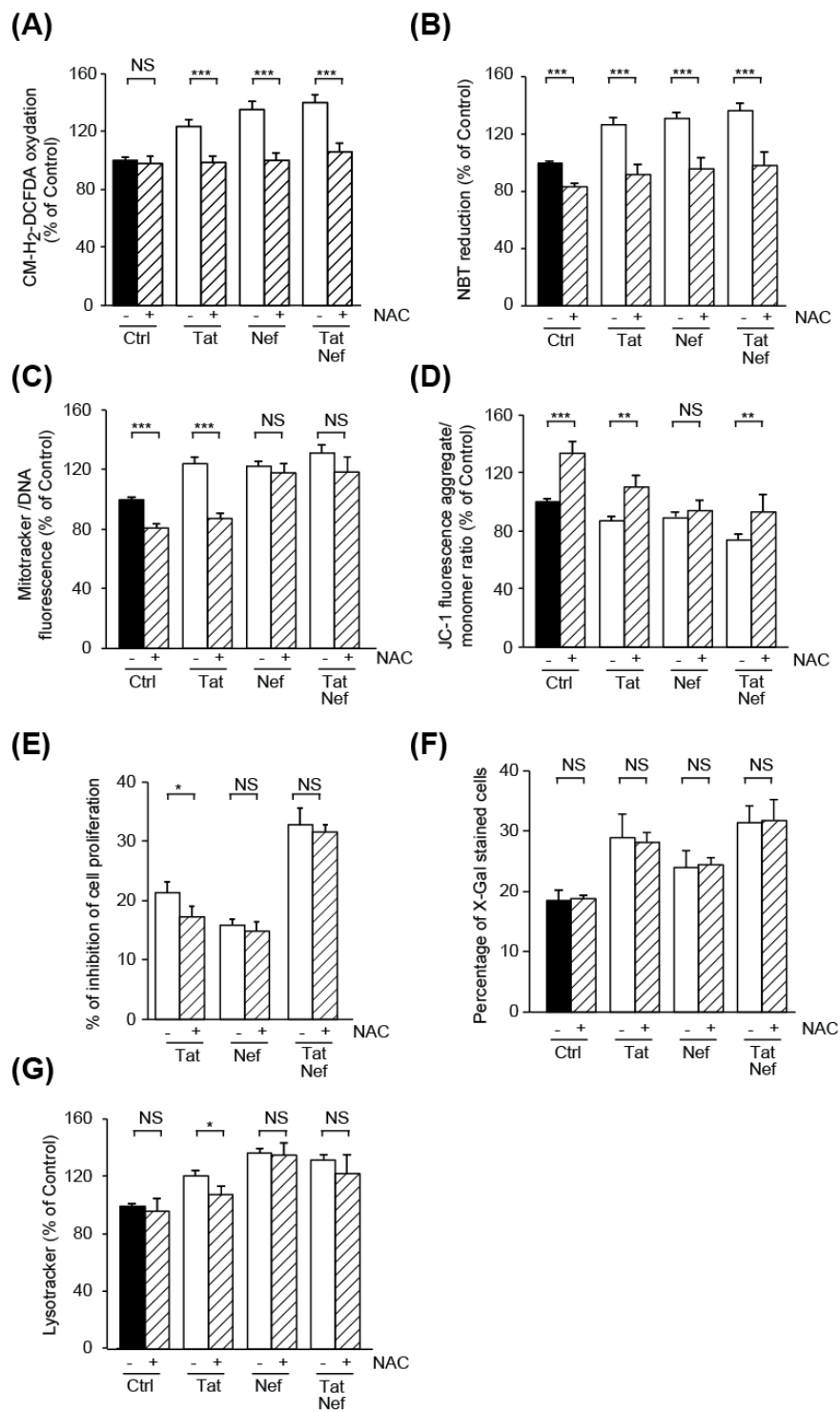


Figure 4

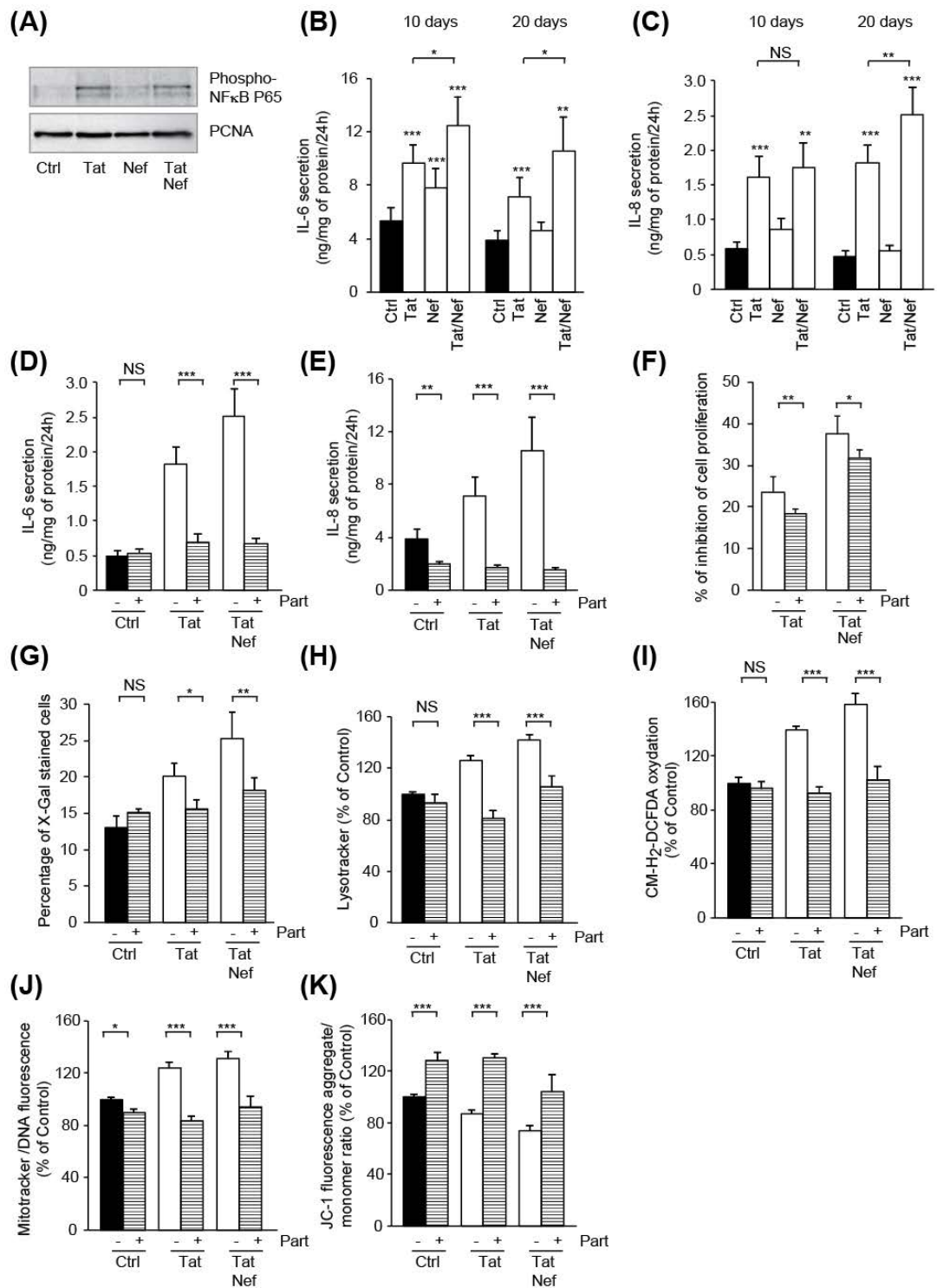


Figure 5

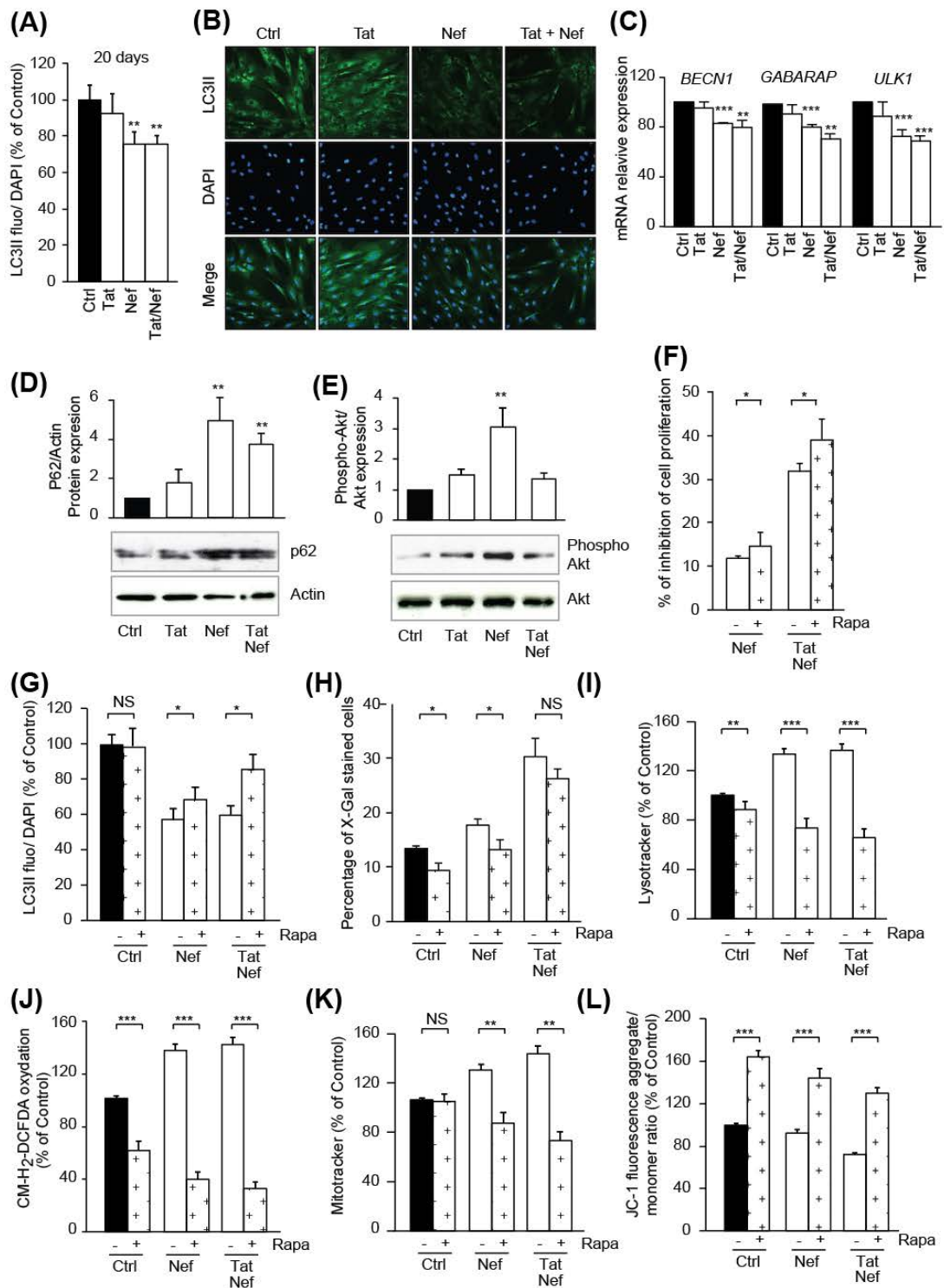
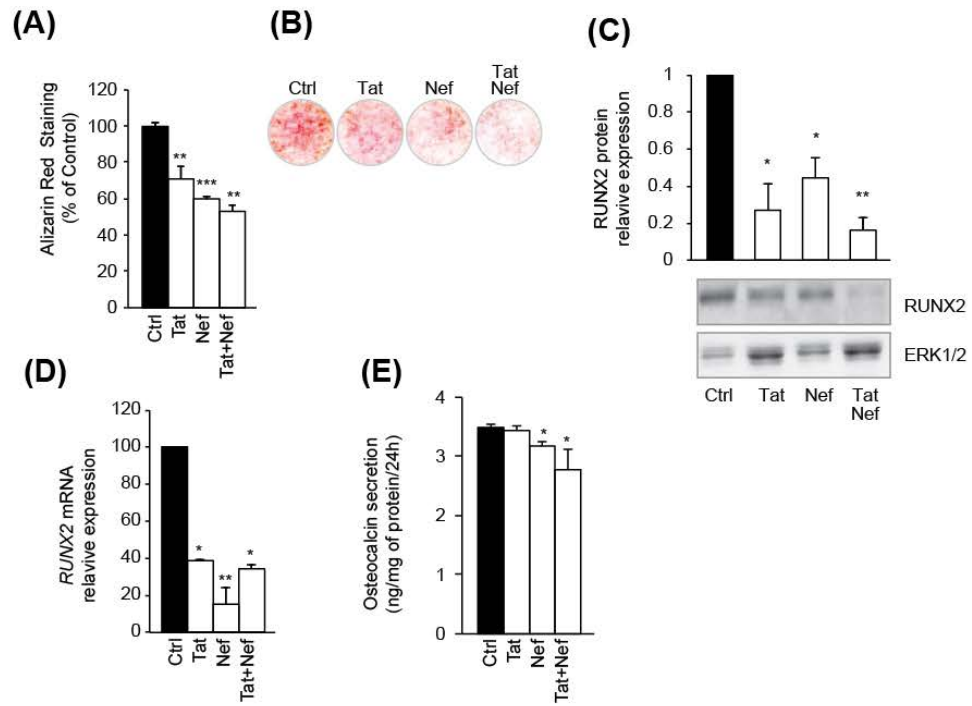


Figure 6



A-2-Résultats principaux

- ◆ Les protéines Tat et Nef induisent un ralentissement précoce de la prolifération cellulaire et une sénescence prématurée, avec un effet cumulé des deux protéines, dès J10.
- ◆ Les protéines Tat et Nef induisent une augmentation du stress oxydant, des dysfonctions mitochondriales à J20.
- ◆ Le co-traitement des MSC avec un antioxydant, le NAC (N-acétyl Cystéine) de J10 à J20, réduit le stress oxydant induit par les protéines Tat et Nef. Le traitement au NAC améliore les dysfonctions mitochondriales, et partiellement la prolifération réduite initialement par Tat mais pas par Nef. Le NAC ne prévient pas la sénescence induite par les protéines Tat et Nef.
- ◆ La protéine Tat, mais pas Nef, active la voie NF- κ B et induit la sécrétion d'IL-6 et IL-8 dès J10. Le co-traitement des MSC avec la protéine Tat et un inhibiteur de NF- κ B, le parthénolide, prévient tous les effets induit par Tat.
- ◆ La protéine Nef, mais pas Tat, induit une réduction du flux autophagique, avec une augmentation de l'activation d'Akt et une réduction de l'expression de gènes contrôlant l'autophagie : *BECNI*, *ULK1* et *GABARAP* dès J10.
- ◆ Le co-traitement des MSC avec la protéine Nef et un inducteur de l'autophagie, la rapamycine, prévient la sénescence, le stress oxydant, les dysfonctions mitochondriales induites par Nef.
- ◆ Le traitement chronique des MSC par les protéines Tat et Nef réduit leur potentiel de différenciation ostéoblastique.

A-3-Résultats complémentaires

◆ Nous avons tout d'abord voulu vérifier que la mort cellulaire par apoptose n'était pas responsable de la baisse du nombre de MSC traitées avec les protéines du VIH. Brièvement, les MSC ont été cultivées en plaques 96 puits avec les protéines Tat et Nef. A J20, les cellules ont été incubées pendant 2 heures avec une solution contenant un substrat des caspases 3/7, le Z-DEVD-R110 couplé avec un fluorophore la rhodamine (Promega). Le clivage du peptide DEVD par les caspases 3/7 permet de libérer la rhodamine 110 fluorescente, mesurée au spectrophotomètre à 520nm, ce qui permet d'avoir une mesure quantifiable de l'activité des caspases 3/7 pro-apoptotiques. La mesure de cette activité nous a permis d'établir le % moyen de cellules apoptotiques pour chaque condition (+/-écart-type).

Il s'avère que les MSC à J20 présentent environ 10% de cellules apoptotiques, indépendamment de la présence ou non des protéines du VIH, confirmant que les protéines virales Tat et Nef n'induisent pas une apoptose accrue des MSC, et que la baisse observée du nombre de cellules est bien la résultante d'un ralentissement de la prolifération cellulaire et d'une sénescence accrue (Figure 27).

	% of apoptotic cells 20 days	
Control	9.92	± 0.41 %
Tat	10.59	± 0.66 %
Nef	10.31	± 0.69 %
Tat+ Nef	10.38	± 1.37 %

Figure 27: Effet des protéines virales sur l'apoptose des MSC : Evaluation à J20 des cellules présentant une activité caspase 3/7.

Résultats exprimés en % de cellules apoptotiques +/- SEM. n=3

◆ Nous avons ensuite voulu vérifier que les effets observés sur les MSC étaient bien provoqués par les protéines du VIH. Pour cela, après avoir traité les MSC avec les protéines Tat et Nef pendant 20 jours, la culture a été poursuivie jusqu'à 30 jours dans du milieu de croissance sans protéines virales. Nous avons à 30 jours évalué les mêmes paramètres que précédemment, à savoir : prolifération cellulaire, stress oxydant, dysfonctions mitochondriales, accumulation lysosomale. Nous avons constaté que la soustraction des protéines virales induisait une nette amélioration de la capacité proliférative (A), une réversion du stress oxydant (B), une réduction de l'accumulation lysosomale (C) et des dysfonctions mitochondriales (D-E) des MSC précédemment traitées avec les protéines Tat et Nef. Nous confirmons ainsi que les effets précédemment observés étaient bien provoqués par l'exposition aux protéines du VIH (Figure 28).

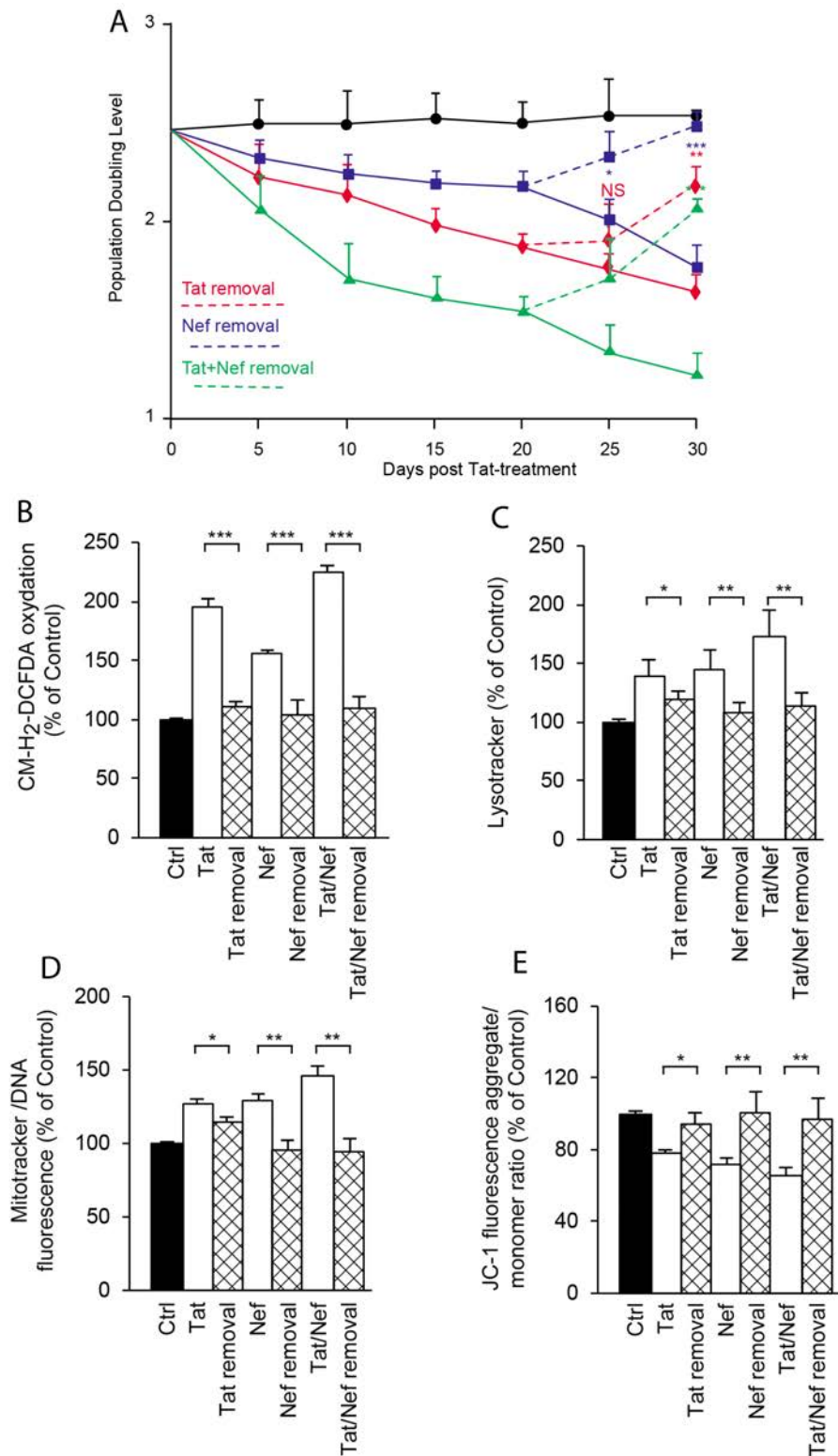


Figure 28 : Spécificité de l'effet des protéines du VIH sur les MSC : à partir de J20, nous avons retiré les protéines du VIH et poursuivi la culture jusqu'à J30. A J30 différents paramètres ont été évalués, comme la prolifération, le stress oxydant, les dysfonction mitochondriales et lysosomales (méthodes décrites dans l'article). n=3

◆Enfin, nous avons voulu savoir si dans nos cellules, l'effet de Nef était provoqué par une inhibition directe de la BECN1. A J10, par co-immunoprécipitation, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une interaction de la protéine BECN1 avec la protéine Nef. Afin de confirmer cette spécificité, nous avons pu constater également la perte de cette interaction entre les protéines Nef et BECN1, lorsque les MSC sont incubées avec une protéine recombinante Nef mutée dans son domaine SH3 (Src Homology region 3) (Jena Bioscience), domaine impliqué dans la signalisation cellulaire et l'internalisation des récepteur CD4 et du CMH1 à la surface des cellules (Geyer et al. 2001) (Figure 29). L'analyse de l'effet de ce mutant déficient de Nef sur la sénescence des MSC est en cours.

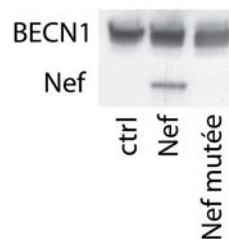


Figure 29 : Immunoprécipitation de la protéine BECN1 : La protéine BECN1 a été immunoprécipités à partir des extraits cellulaires totaux. La liaison des protéines BECN1 et Nef a été évaluée par Western Blot. Résultats préliminaires n=1.

A-4-Discussion

Cette étude nous a permis de montrer qu'un traitement à long terme par les protéines du VIH, Tat et Nef, induit la sénescence des MSC, un stress oxydant et des dysfonctions mitochondriales. Les deux protéines virales agissent par des mécanismes différents, expliquant leur effet cumulé lorsqu'elles sont ajoutées simultanément. La protéine Tat induit la sénescence par le biais de l'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire et pro-sénescence NF- κ B, et la protéine Nef par une inhibition du flux autophagique. De plus le traitement à long terme des MSC avec les protéines virales perturbe leur différenciation ostéoblastique.

◆Discussion sur le choix du matériel

Nous avons travaillé sur une culture primaire de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse de donneurs sains. Les MSC représentent un bon modèle d'exploration des dysfonctions de la formation osseuse, dans le contexte de l'infection par le VIH, de par leur proximité avec la circulation sanguine et avec les cellules infectées au sein des niches hématopoïétiques, et de par leur implication dans la déminéralisation osseuse observée au cours du vieillissement normal de l'individu. Afin d'éviter un biais induit par la sénescence répliquative, nous avons utilisé des MSC ayant un faible nombre de passages (inférieur à P10), et limité la durée du traitement chronique aux protéines du VIH à 20 jours. Nous avons choisi dans cette étude de tester les effets du traitement à long terme des MSC avec les protéines du VIH Tat et Nef à une concentration de l'ordre du nM, proche des concentrations plasmatiques des protéines virales Tat et Nef détectées dans le plasma des patients infectés par le VIH naïfs de tout traitement (Raymond et al. 2011, Debaisieux et al. 2012). De plus la proximité des MSC avec les progéniteurs hématopoïétiques, monocytes-macrophages au sein de la moelle osseuse, nous laisse à penser que localement les concentrations en protéines virales pourraient être plus élevées.

◆Discussion sur les stratégies de prévention des effets des protéines virales

Pour étudier les mécanismes par lesquels les protéines virales sont impliquées dans l'induction de la sénescence, notre stratégie a été d'analyser les effets des inhibiteurs du stress oxydant, de l'inflammation, et un activateur de l'autophagie sur les effets de Tat et Nef.

Le NAC est un antioxydant, qui agit de deux façons : il est un précurseur du GSH (glutathion), qui est un antioxydant et il peut également agir en réduisant directement les radicaux libres. Toutefois il a été reporté une toxicité cellulaire du NAC à de fortes concentrations de l'ordre du mM (Sadowska et al. 2007). Nos résultats sur la prévention des effets des protéines virales avec le NAC ont quelques limites : nous avons choisi d'utiliser une faible concentration de 250 μ M, minorant peut-être les effets bénéfiques

du NAC. Nous ne pouvons pas exclure une certaine toxicité du NAC dans notre étude. Pour confirmer nos résultats, nous aurions pu utiliser d'autres antioxydants comme le GSH, le Trolox (vitamine E).

Le parthénolide est une molécule ayant des effets pléiotropes, qui va principalement inhiber l'activation de NF- κ B et permettre sa séquestration dans le cytoplasme, en inhibant la kinase IKK (voir partie B-4). Mais le parthénolide peut également induire l'apoptose, et un stress oxydant (Zunino et al. 2007). Nous avons pu effectivement constater l'effet toxique du parthénolide en réalisant préalablement une expérience dose-réponse sur les MSC. Nous avons donc choisi une concentration faible de 100nM sur un temps court de 2 jours.

La rapamycine est un médicament couramment utilisé pour ses propriétés immunosuppressives. Il agit en inhibant le complexe mTORC1, et par ce biais active l'autophagie. La rapamycine a également des propriétés antiprolifératives, que nous avons pu constater lors du traitement de nos MSC, ce qui nous a limité dans l'étude de la capacité proliférative des cellules traitées avec la protéine Nef et la rapamycine. Nous avons pu mettre en évidence l'induction d'une dysfonction lysosomale par les protéines virales. Il aurait sans doute été intéressant d'utiliser d'autres modulateurs de l'autophagie, en particulier les molécules ciblant des étapes plus tardives du processus autophagique, comme la bafilomycine qui inhibe la fusion de l'autophagosome et des lysosomes, ou la chloroquine qui affecte l'activité des enzymes lysosomales (Sciarretta et al. 2012).

B-Etude 2 : HIV protease inhibitors induce senescence and alter osteoblastic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells: beneficial effect of pravastatin

(S. Jimena Hernandez-Vallejo, C. Beaupere, J. Larghero, J. Capeau, C. Lagathu, *Aging Cell*, 2013)

B-1-Introduction et objectifs de travail

Comme abordé dans l'introduction, les antirétroviraux et plus particulièrement les PI jouent un rôle important dans la déminéralisation osseuse observées chez les patients infectés par le VIH. Cependant, malgré les nombreuses études transversales et méta-analyses effectuées, le fait que les patients reçoivent des associations d'ARV et qu'ils modifient leur traitement sur la durée, rend plus difficile l'identification des molécules responsables de ces atteintes osseuses. Aucune étude publiée à ce jour, n'aborde l'impact direct de l'ATV et du LPV associés au RTV sur les MSC.

B-1-1-Objectifs de travail

Des MSC issues de la moelle osseuse de donneurs sains ont été cultivées en présence de PI, l'ATV et le LPV associés ou non à de faibles doses de RTV (ATV/r et LPV/r). Nous avons étudié différents paramètres : la prolifération cellulaire, le stress oxydant, et des marqueurs de sénescence cellulaire comme l'accumulation de prélamine A farnésylée à 10, 20 et 30 jours après l'initiation du traitement. Pour analyser les mécanismes en cause dans les effets délétères des PI, nous avons évalué l'effet de la pravastatine, un inhibiteur de la synthèse du farnésyl, qui inhibe la formation de prélamine A farnésylée. Enfin nous avons évalué le potentiel de différenciation ostéoblastique et adipocytaire des MSC sénescents prétraités aux PI.

B-1-2-Introduction aux mécanismes de régulation de la prélamine A

Il a été précédemment montré par l'équipe de Coffinier et al. et au laboratoire que certains PI, comme le LPV et le RTV peuvent inhiber directement la protéase ZMPSTE24 qui intervient dans la maturation de la prélamine A en Lamine A mature induisant aussi une sénescence cellulaire (Caron et al. 2007, Coffinier et al. 2007, Coffinier et al. 2008).

Les lamines font partie de la famille des filaments intermédiaires. Dans le noyau, les lamines A, B et C vont se polymériser entre elles pour former le réseau sous-membranaire de la lamina, participant à la structuration du noyau et interagissant avec plusieurs protéines de la membrane nucléaire, comme l'émerine, avec la chromatine. La lamine A, issue du gène LMNA, est formée suite aux clivages protéolytiques de son précurseur, la prélamine A, notamment via l'action d'une protéase appelée Zmpste24, libérant dans le noyau la lamine A mature (Misteli et al. 2005) (Figure 30).

Les mutations de la lamine A/C, responsables de lipodystrophies génétiques appelées FPLD (familial partial lipodystrophy de Dunnigan), induisent une mauvaise organisation des lamines A/C, une dysmorphie et une fragilité nucléaires (Vigouroux et al. 2001). Nous avons montré une accumulation de prélamine A farnésylée, chez les patients présentant une laminopathie comme chez les patients sous PI, entraînant un stress oxydatif, la formation d'ERO et une sénescence cellulaire (Caron et al. 2007). Il a été montré au laboratoire que la sénescence induite par les PI dans des fibroblastes et des cellules endothéliales était associée à l'accumulation de prélamine A farnésylée et au stress oxydant, et que ces effets étaient prévenus par l'ajout d'inhibiteurs de la synthèse du farnésyle (statines) ou de la farnésylation (FTI) (Figure 30) (Lefevre et al. 2010).

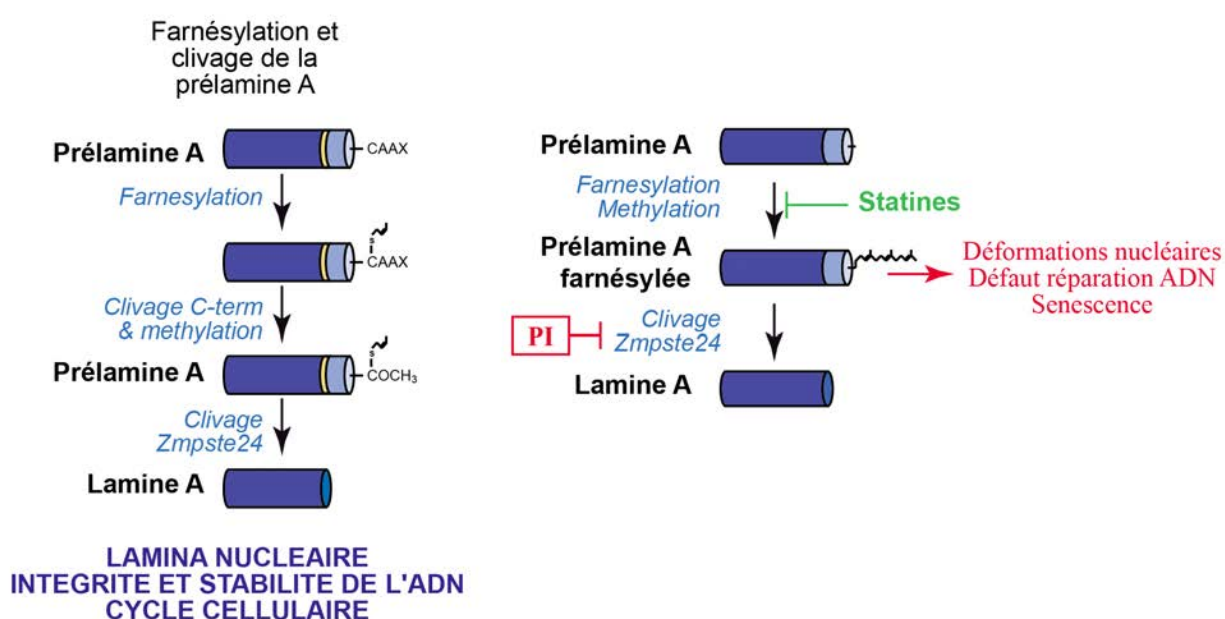


Figure 30 : Maturation de la prélamine A : La maturation de la prélamine A en Lamine A passe par plusieurs étapes : la farnésylation, et le clivage C-terminal, conduisant à la formation de prélamine A farnésylée, puis le clivage du groupement farnésyl par l'enzyme Zmpste24, à l'origine de la Lamine A mature. Les PI sont connus pour inhiber l'action de l'enzyme Zmpste24, conduisant à l'accumulation de prélamine A farnésylée toxique. Les statines inhibent la synthèse du groupement farnésyl.



HIV protease inhibitors induce senescence and alter osteoblastic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells: beneficial effect of pravastatin

Sandra J. Hernandez-Vallejo,^{1,2,3} Carine Beaupere,^{1,2,3} Jerome Larghero,^{4,5,6} Jacqueline Capeau^{1,2,3,7} and Claire Lagathu^{1,2,3}

¹INSERM UMRS938, Paris, France

²UPMC Univ Paris 06, UMRS 938, Paris, France

³Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris, France

⁴Cell Therapy Unit, Hôpital Saint Louis, Paris, France

⁵Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cite, Paris, France

⁶INSERM UMRS940, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

⁷APHP, Hôpital Tenon, Paris, France

Summary

HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy present an increased prevalence of age-related comorbidities, including osteoporosis. HIV protease inhibitors (PIs) have been suspected to participate to bone loss, but the mechanisms involved are unknown. In endothelial cells, some PIs have been shown to induce the accumulation of farnesylated prelamin-A, a biomarker of cell aging leading to cell senescence. Herein, we hypothesized that these PIs could induce premature aging of osteoblast precursors, human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs), and affect their capacity to differentiate into osteoblasts. Senescence was studied in proliferating human MSCs after a 30-day exposure to atazanavir and lopinavir with or without ritonavir. When compared to untreated cells, PI-treated MSCs had a reduced proliferative capacity that worsened with increasing passages. PI treatment led to increased oxidative stress and expression of senescence markers, including prelamin-A. Pravastatin, which blocks prelamin-A farnesylation, prevented PI-induced senescence and oxidative stress, while treatment with antioxidants partly reversed these effects. Moreover, senescent MSCs presented a decreased osteoblastic potential, which was restored by pravastatin treatment. Because age-related bone loss is associated with increased bone marrow fat, we also evaluated the capacity of PI-treated MSCs to differentiate into adipocyte. We observed an altered adipocyte differentiation in PI-treated MSCs that was reverted by pravastatin. We have shown that some PIs alter osteoblast formation by affecting their differentiation potential in association with altered senescence in MSCs, with a beneficial effect of statin. These data corroborate the clinical observations and allow new insight into pathophysiological mechanisms of PI-induced bone loss in HIV-infected patients.

Key words: adipocyte; HIV protease inhibitors; oxidative stress; osteoblast; senescence; statin.

Correspondence

Claire Lagathu, Inserm UMRS938, Centre de Recherche Saint Antoine, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, 27 rue de Chaligny, Paris 75012, France.

Tel.: +331 4001 1321; fax: +331 4001 1432; e-mail: claire.lagathu@inserm.fr

Accepted for publication 09 June 2013

Introduction

Treatment of HIV-infected patients with combination antiretroviral therapy (cART) has led to a significant reduction in morbidity and mortality. However, despite unquestioned success, these patients present an increased risk of a number of 'non-AIDS'-related complications (Capeau, 2011). These complications, which include cardiovascular, liver, brain and bone diseases, are similar to those observed among the elderly. These observations led to propose that HIV-infected persons suffer from accelerated or amplified aging (Capeau, 2011). The occurrence of these complications was proposed to result from both HIV infection and antiretroviral treatment, in addition to aging and immune dysfunction. Regarding adipose tissue, alterations are characterized by a lipodystrophy syndrome with subcutaneous lipoatrophy and visceral fat hypertrophy (Mallon *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2004; Caron-Debarle *et al.*, 2010). Bone disorders are mainly characterized by reduced bone mineral density (BMD), leading to the development of osteopenia and osteoporosis (Stone *et al.*, 2010).

Osteoporosis is a bone disorder characterized by a severe loss of bone mass and consequent reduction in bone strength, which in turn leads to an increased risk of fractures. Osteopenia is defined by a lesser reduction in bone mass and precedes osteoporosis (Mazziotti *et al.*, 2010). Although a certain degree of bone weakening with age is considered normal, several clinical studies have shown that there is an increased incidence of reduced BMD, osteopenia and osteoporosis in HIV patients in general and in those receiving cART in particular (Brown & Qaqish, 2006; Powderly, 2012). This increased risk of premature osteoporosis seems to be linked to both cART and HIV infection itself (Stone *et al.*, 2010). Brown's meta-analysis showed that among HIV-infected patients, 67% had osteopenia, and 15%, osteoporosis. The effect on bone was striking because a vast majority were young men under the age of 40 (Brown & Qaqish, 2006). Low body weight is a major contributor to low BMD in HIV infection. Moreover, cART initiation has been associated with decreased BMD (Duvivier *et al.*, 2009). Several studies suggest that the prevalence of reduced BMD in cross-sectional studies of patients receiving cART ranges from 20% to 50%, with rates of osteoporosis up to 20% (Stone *et al.*, 2010; Powderly, 2012). Another meta-analysis showed that in HIV-infected patients on cART at baseline, BMD remained stable, whereas in patients initiating cART, BMD declined by 2–4% regardless of ART regimens after 2 years (Bolland *et al.*, 2011).

The exact role of specific agents, including the HIV aspartyl protease inhibitors (PIs), in the pathogenesis of bone loss remains unknown. PIs belong to a potent class of antiretrovirals and are commonly used as first-line therapy in addition to nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). Ritonavir is not used for its own antiviral activity, but as a booster of other PIs. Existing data demonstrate significantly lower BMD with PI initiation (Duvivier *et al.*, 2009), suggesting that PIs are indeed important players in decreased BMD. More specifically, atazanavir (ATV) and lopinavir (LPV) boosted with ritonavir (LPV/r and ATV/r), which are frequently used PIs in clinical practice, have been associated with bone loss. This has been shown in numerous studies for LPV/r (Grund *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2011) and also for ATV/r (Grund *et al.*, 2009).

Under physiological conditions, the balance between osteoclast-mediated bone resorption and osteoblast-mediated bone deposition controls bone remodelling. Within bone marrow, mesenchymal stem cells (MSCs) are pluripotent precursors, capable of differentiating into several cell types, including osteoblasts and adipocytes (Kim *et al.*, 2012). To achieve osteogenic differentiation, MSCs proceed through a number of functional stages including proliferation, matrix maturation and mineralization. It has been hypothesized that a reciprocal relationship exists in the bone marrow cavity, where production of adipocytes from MSCs is at the expense of osteoblasts (Verma *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2012). *In vitro* studies have demonstrated the balance between the transcription factors RUNX2 (Runt-related transcription factor 2), driving the pro-osteogenic phenotype, and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ), the pro-adipogenic one (Nuttall & Gimble, 2004). Therefore, the respective activities of PPAR γ and RUNX2 are key determinants of the relationship between fat and bone. Numerous clinical data support this idea, such as increased adipocyte content of aging bone (Verma *et al.*, 2002; Nuttall & Gimble, 2004). Initiation of cART affects whole body composition of HIV-infected patients with increased fat mass and decreased BMD. The role of some PIs in cART-induced lipodystrophy has been proposed according to *in vitro* studies and *in vivo* observations (Caron-Debarle *et al.*, 2010). Among HIV-infected patients, lipodystrophy, and in particular increased visceral abdominal fat, is significantly and independently associated with reduced BMD (Huang *et al.*, 2001). Importantly, treatment with ATV/r and LPV/r is associated with decreased BMD and alterations in adipose tissue storage/accumulation (Carr *et al.*, 1999; McComsey *et al.*, 2011).

We have previously shown that treatment of endothelial cells with RTV or LPV induces cellular senescence, characterized by a decreased cell proliferation and the accumulation of the pro-senescence protein prelamin-A (Lefevre *et al.*, 2010). The post-translational processing of prelamin-A to mature lamin A requires a farnesylation step and a cleavage by the zinc metallopeptidase ZMP-STE24. The inhibition of ZMP-STE24 by RTV and LPV results in permanently farnesylated prelamin-A, which has been shown to induce cell senescence (Caron *et al.*, 2007; Coffinier *et al.*, 2007). LPV and, to a lesser extent, ATV can inhibit prelamin-A maturation (Liu *et al.*, 2010). Moreover, blocking the farnesylation of prelamin-A, using statins, has been shown to ameliorate cellular senescence phenotype of accelerated aging (Capell *et al.*, 2005). Few studies have examined the direct effect of PIs on osteoblasts and more specifically on MSCs. *In vitro* experiments demonstrated that a subset of PIs could inhibit both osteogenic and adipogenic differentiation (Jain & Lenhard, 2002).

In the present study, we hypothesized that PIs could induce premature senescence of osteoblast precursor stem cells, namely MSCs, which in turn could be involved in osteoblast depletion and bone loss. We investigated whether frequently used PIs, atazanavir (ATV), lopinavir (LPV) alone or associated with ritonavir (ATV/r and LPV/r), and ritonavir alone (RTV), were capable of inducing premature senescence in MSCs. We then examined the consequences of PI-induced senescence on MSCs fate evaluated by their osteoblastic and adipogenic potential. The data presented in this study show that PIs can induce cellular senescence of MSCs and alter both osteoblastic and adipogenic potential. Moreover, while antioxidant molecules only partially reversed the effect of PIs, pravastatin, used as a farnesyl synthesis inhibitor, prevented PI-induced senescence and restored adipocyte and osteoblast differentiation capacities. These findings offer new insights on the role of MSCs in PI-associated bone loss.

Results

Chronic exposure to ATV or LPV induces senescence and oxidative stress in proliferating MSCs

We first evaluated whether chronic PI exposure affected *in vitro* cell proliferation capacities. Human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) treated with LPV and ATV alone or in association with RTV (LPV/r and ATV/r) displayed a reduced proliferative activity that worsened with increasing cellular passages, but cell survival remained unaffected (data not shown). We observed a progressive decline in the population doubling level (PDL) between passages 3 and 9 (30 days of treatment) in ATV- and LPV-treated cells, whereas PDL did not vary in control cells (DMSO-treated) and RTV-treated cells (Fig. 1A). Although RTV did not exert an effect on cell proliferation on its own, we observed an additive effect of RTV on ATV- and LPV-treated cells on day 30 (Fig. 1B).

In control cells, the percentage of senescent cells (senescence-associated β -galactosidase positive) was about 2–3%. The percentage of senescent cells was similar in RTV-treated cells. Conversely, it reached 8.8% in ATV/r-treated and 16.3% in LPV/r-treated cells after 30 days (Fig. 1C–D). LPV/r and, to a lesser extent, ATV/r chronic exposure led to a progressive increase in SA- β -galactosidase activity (Fig. 1D–E). Thus, PI-treated MSCs presented an early onset on cell senescence (2- to 4-fold increase on day 30) in both ATV- and LPV-treated cells (Fig. 1E). In accordance with decreased cell proliferation and cellular senescence, long-term ATV and LPV exposure also increased the protein expression of cell cycle arrest markers p16^{INK4} and p21^{WAF1} upon 30 days of treatment (Fig. 1F) when compared to control and RTV-treated cells. LPV and ATV with or without RTV induced the accumulation of prelamin-A, on day 30 (Fig. 1G), while prelamin-A expression was almost undetectable in control and RTV-treated cells. In parallel, we observed a decreased protein expression of mature Lamin A/C, as an increased amount of unprocessed prelamin-A is often balanced by a decreased amount of matured Lamin A (Liu *et al.*, 2010).

Finally, long-term ATV and LPV exposure markedly increased reactive oxygen species (ROS) production when compared to control and RTV-treated cells. Starting from day 10 post-PI treatment for LPV/r and from day 20 for ATV/r, we observed a significant increase in ROS production (up to 4-fold in LPV/r-treated cells on day 30), as quantified by the reduction in nitroblue tetrazolium (oxidase substrate) (Fig. 1H) and by the oxidation of CM-H₂DCFDA by ROS (Fig. 1I). Parallel to this increase, we observed a decreased superoxide dismutase (SOD) activity by up to 45% in ATV/r-treated and 75% in LPV/r-treated cells (Fig. S1A).

Potent antioxidant treatment partially prevents PI-induced decline of MSCs proliferation

We performed experiments in which MSCs were treated with different antioxidant molecules. We first used NAC (N-acetyl cysteine) over a short period of time (72 h) on MSCs treated for 15 days with LPV/r and ATV/r. As shown in Fig. 2A, on day 20, NAC was able to significantly decrease ROS production, but this effect was transient and no longer seen upon day 30. Under these short-term conditions, NAC treatment failed to improve cell proliferation (Fig. 2B). We compared the differences in PDL between day 20 and day 30 by the means of PDL ratios (Fig. 2C). This representation allows to evaluate the impact of antioxidants and to show that PDL ratio remained unchanged when MSCs were treated with NAC (Fig. 2C). We then studied the effect of antioxidant molecules on a longer term, and cells were incubated for the last 15 days with a

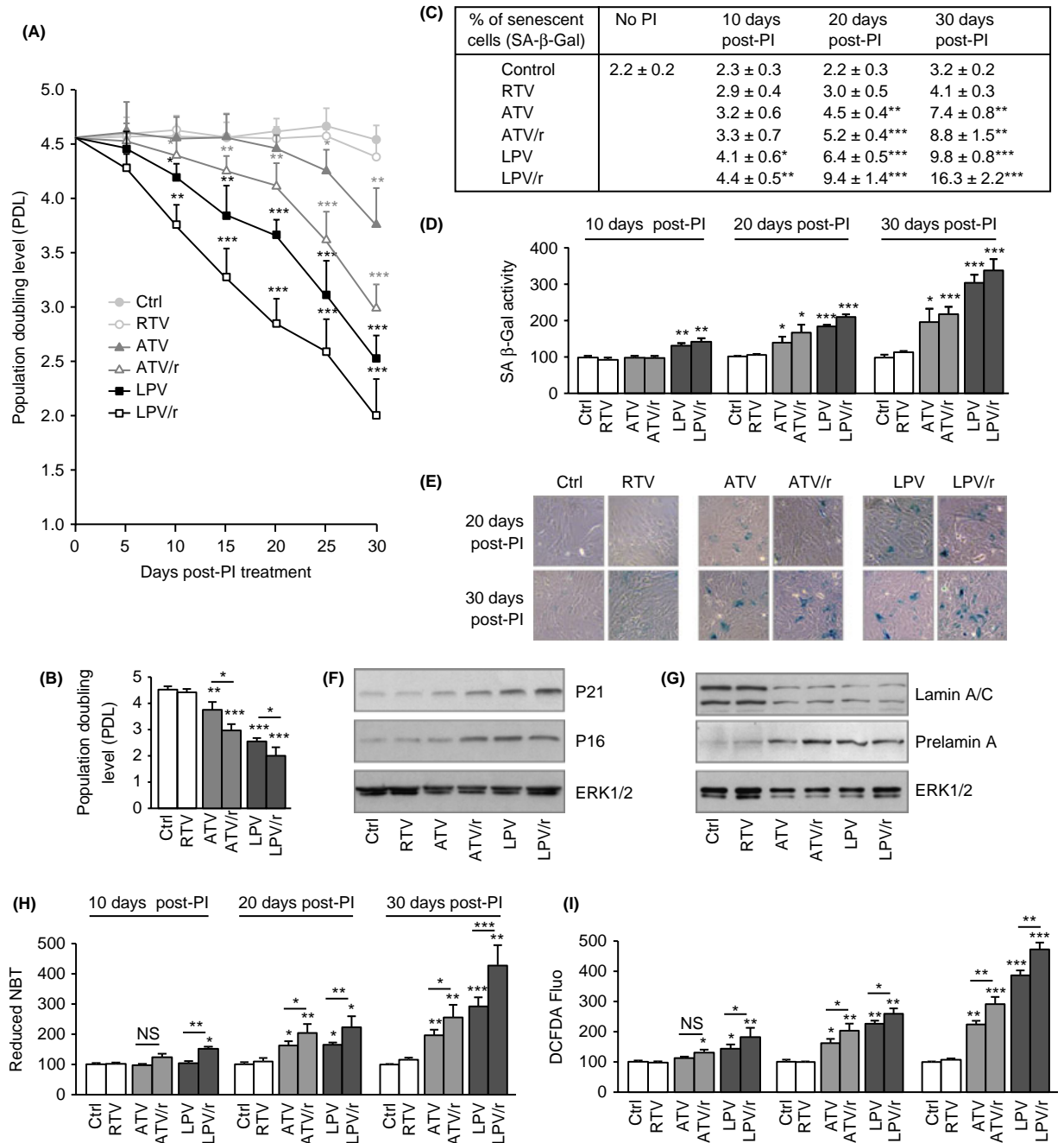


Fig. 1 Protease inhibitors (PIs) trigger senescence and oxidative stress in MSCs. The population doubling level (PDL) was calculated as stated in Experimental procedures. (A) Mean PDL values (\pm SEM) were determined at the indicated days post-PI treatment and (B) at day 30 post-PI treatment. SA- β -galactosidase activity was assessed by (C) the total % of SA- β -galactosidase cells at pH6 or by (D) the ratio of pH6- to pH4-positive staining at the indicated days post-PI treatment and expressed as % of control cells. (E) Representative micrographs of SA- β -galactosidase positive cells are shown. Whole cell lysates were extracted from MSCs at day 30 of PI treatment and analysed by immunoblotting. Representative immunoblots of cell cycle arrest markers P21, P16 and ERK1/2 (loading control) (F) and of prelamin-A, Lamin A/C and ERK1/2 (G) are shown. Reactive oxygen species (ROS) production was assessed at the indicated days post-PI treatment by (H) the reduction in nitroblue tetrazolium (NBT) and by (I) the oxidation of CM-H₂DCFDA and expressed as % of control cells. All experiments were performed in duplicate or triplicate in MSCs isolated from 3 to 4 different bone marrow donors. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs. control cells.

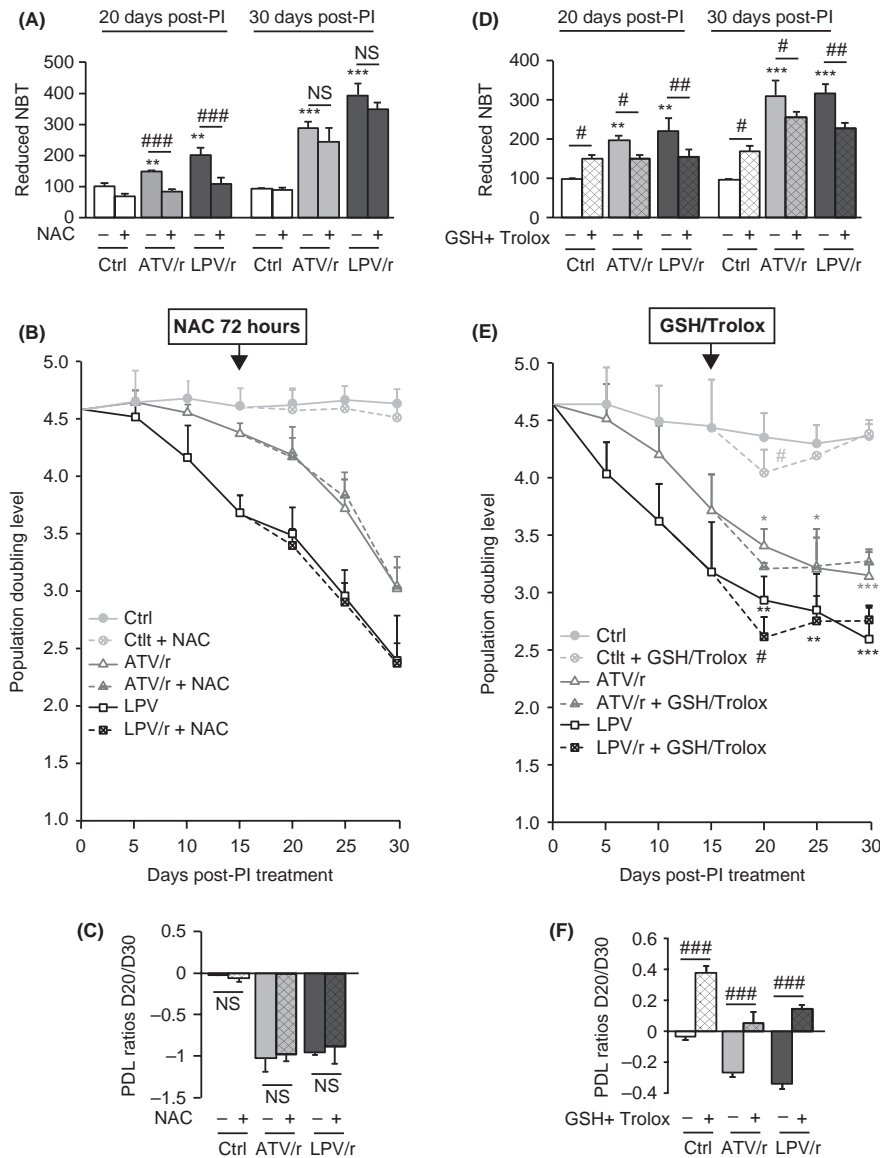


Fig. 2 Antioxidant treatment prevents oxidative stress and partially prevents PI-induced senescence of MSCs. NAC was added upon day 15, for 72 h, and a combination of GSH and Trolox was added for the last 15 days of the 30-day PI treatment. Reactive oxygen species (ROS) production was assessed at the indicated days post-PI treatment with or without NAC for 72 h, by the reduction in nitroblue tetrazolium (NBT) (A). Mean population doubling level (PDL) values (\pm SEM) were determined at the indicated days post-PI treatment (B), and the PDL ratio between day 20 and day 30 was determined (C). Reactive oxygen species (ROS) production was assessed at the indicated days post-PI treatment with or without GSH/Trolox for 15 days (D). The population doubling level (PDL) was calculated as stated in Experimental procedures. Mean PDL values (\pm SEM) were determined at the indicated days post-PI treatment (E), and the PDL ratio between day 20 and day 30 was determined (F). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control cells, and # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. antioxidant-treated cells.

combination of Trolox, an antioxidant derivative of vitamin E and reduced glutathione (GSH). This association did not affect MTT survival test, but increased ROS production in control cells (Fig. 2D). However, importantly, the combination of Trolox and GSH did decrease ROS production in ATV/r and LPV/r cells at days 20 and 30 (Fig. 2D) although it failed to increase SOD activity (Fig. S1B). Even if this antioxidant treatment induced a slight decrease in cell proliferation on day 20 for all conditions, thereafter, it prevented the ongoing deleterious effect of PIs on the decline of cell proliferation, stressing the role of oxidative stress in the PI-induced reduced cell proliferation (Fig. 2E). Indeed, when comparing the differences in PDL between day 20 and day 30, PDL ratio became positive when treated by GSH/Trolox (Fig. 2F). Thus, GSH/Trolox, despite an early deleterious effect, was able to partially rescue PDL levels in PI-treated MSCs. These results indicate that a strong and prolonged

antioxidant treatment was able to partially reverse the effect of PIs. However, none of these treatments were able to normalize SOD activity in PI-treated cells (Fig. S1B–C). Overall, these results suggest that increased oxidative stress during the onset of cellular senescence participated to PI-induced altered cell proliferation.

Pravastatin prevents PI-induced senescence of MSCs

To assess the implication of prelamin-A accumulation in the deleterious effect of PIs, we used pravastatin. We evaluated the ability of pravastatin to prevent or reverse PI-induced senescence by decreasing the amount of farnesylated prelamin-A and hence its cellular toxicity (Capell *et al.*, 2005; Lefevre *et al.*, 2010). Cells were treated with PIs up to 15 days, and pravastatin was added for the last 15 days. Upon day 30, pravastatin

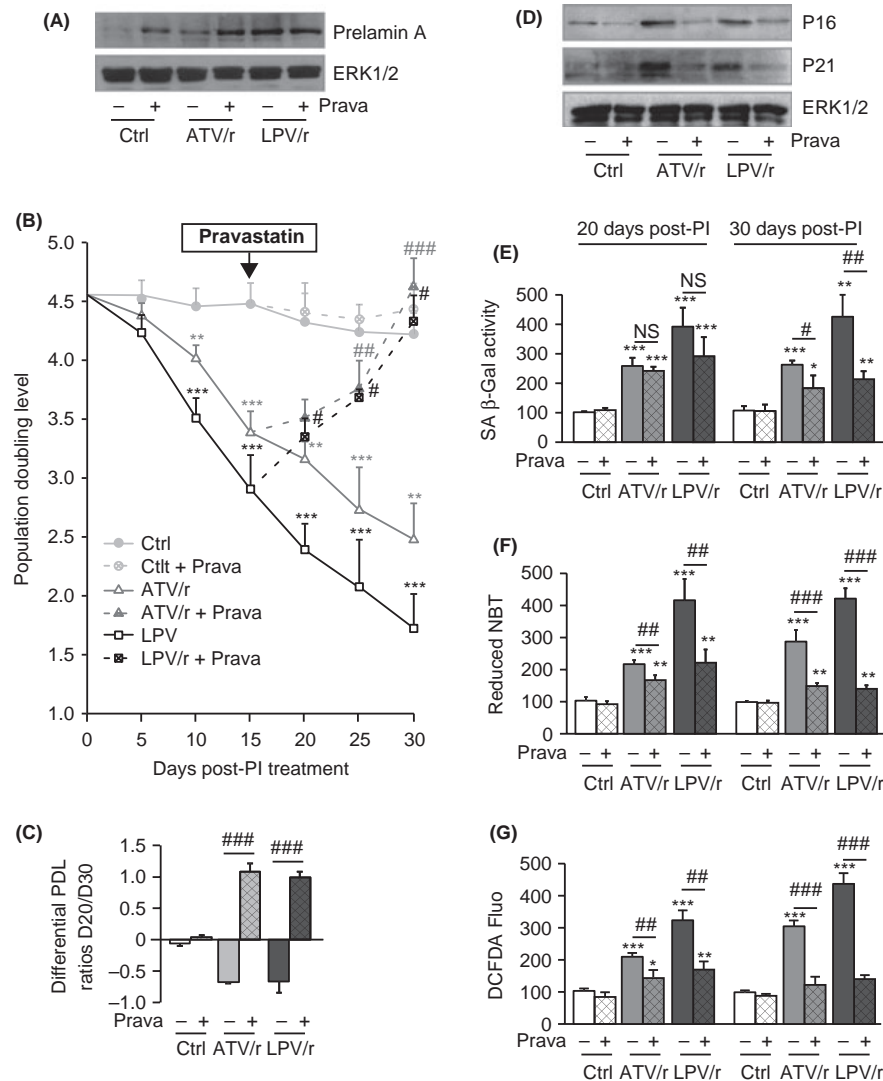


Fig. 3 Pravastatin prevents protease inhibitors (PI)-induced senescence and oxidative stress of MSCs. Pravastatin was added for the last 15 days of the 30-day PI treatment. Whole cell lysates were extracted from MSCs treated or not with pravastatin at day 30 post-PI treatment and analysed by immunoblotting. (A) Whole cell lysates were extracted from MSCs at day 30 of PI treatment and analysed by immunoblotting. Representative immunoblots of prelamin-A, and ERK1/2 are shown. (B) Mean population doubling level (PDL) values (\pm SEM) were determined at the indicated days post-PI treatment, and (C) the PDL ratio between day 20 and day 30 was determined. (D) SA- β -galactosidase activity was assessed by the ratio of pH6- to pH4-positive blue staining at the indicated days post-PI treatment and expressed as % of control cells. (E) Representative immunoblots of P21, P16 and ERK1/2 from three separate experiments are shown. Reactive oxygen species (ROS) production was assessed at the indicated days post-PI treatment with or without pravastatin by (F) the reduction in NBT and by (G) the oxidation of CM-H₂DCFDA and expressed as % of control cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs. control cells, and ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. pravastatin-treated cells.

induced prelamin-A accumulation in control cells, as nonfarnesylated prelamin-A cannot be cleaved, and did not affect the prelamin-A accumulation in PI-treated cells, as it was already presented (Fig. 3A). Pravastatin markedly improved cell proliferation of ATV/r- and LPV/r-treated MSCs (Fig. 3B). After only 5 days of pravastatin treatment, PDL of PI-treated cells increased, whereas it continued to decrease in cells not treated with pravastatin. After 15 days, the reversion by pravastatin was complete. To quantify the impact of pravastatin, we used the same representation as above, determining the means of PDL ratios between

day 20 and day 30 (Fig. 3C). Here, MSCs cotreated with PIs and pravastatin display an increased proliferation (positive PDL ratios), suggesting that proliferating cells overtook nonproliferating cells with a positive cumulative effect. Pravastatin also improved senescence markers in PI-exposed MSCs. It partly or totally reversed the expression of p16^{INK4} and p21^{WAF1} (Fig. 3D) and the SA- β -galactosidase activity (Fig. 3E). Pravastatin treatment normalized PI-induced overproduction of ROS (Fig. 3F-G) and SOD activity (Fig. S1D), by day 30, when PI- and pravastatin-treated cells have reached the level of proliferation achieved by control cells.

PI-induced senescence alters the osteoblastic differentiation potential of MSCs, and this potential is restored by pravastatin

As age-related loss of bone mass is associated with decreased osteoblast differentiation capacities, we undertook a study to evaluate the impact of PIs on the ability of MSCs to differentiate into mature osteoblasts. After a 30-day PI treatment, PIs were removed, and osteoblastic differentiation was induced. The ability of MSCs that displayed senescence makers at day 30 to differentiate into osteoblasts was then evaluated. MSCs pretreated with ATV/r and LPV/r displayed a severe decrease in calcium deposition, visualized by alizarin red staining (Fig. 4A–B), and in alkaline phosphatase activity (Fig. 4C–D). In accordance, we found that the mRNA expression of the osteoblast-specific markers *COL1A1* and *COL1A2* (Fig. 4E) and the protein expression of RUNX2 were decreased in ATV- and LPV-treated MSCs compared with control and RTV-treated cells (Fig. 4F). These results indicate that MSCs, in which cellular senescence was triggered by PIs, have a reduced osteoblastic potential.

We performed additional experiments regarding the impact of PIs during the osteoblast differentiation process itself. MSCs were treated

from day 0 to day 15 of osteoblast differentiation. As shown in Fig. S2 (Supporting information), PI treatment affected osteoblast differentiation of MSCs (Fig. S2A–D) and increased oxidative stress (Fig. S2F–G). Thus, MSCs treated with PIs when induced to differentiate towards osteoblasts also present impaired differentiation.

We then tested the effect of pravastatin on the capacity of PI-exposed MSCs to differentiate towards the osteoblastic lineage. Similarly to the previous experiment, PIs and pravastatin were removed from the differentiation media, on the day of induction. As shown by calcium accumulation visualized by alizarin red staining (Fig. 5 A–B) and by the evaluation of ALP activity (Fig. 5C–D), cells treated for 15 days with pravastatin recovered their ability to differentiate into osteoblasts. This effect cannot be attributed to cell proliferation, as in all conditions, cells were confluent when osteoblast differentiation was induced.

Pis modulate the adipogenic differentiation potential of MSC: beneficial effect of pravastatin

As age-related loss of bone mass is associated with increased marrow fat, we hypothesized that PI-induced senescence of MSCs would favour

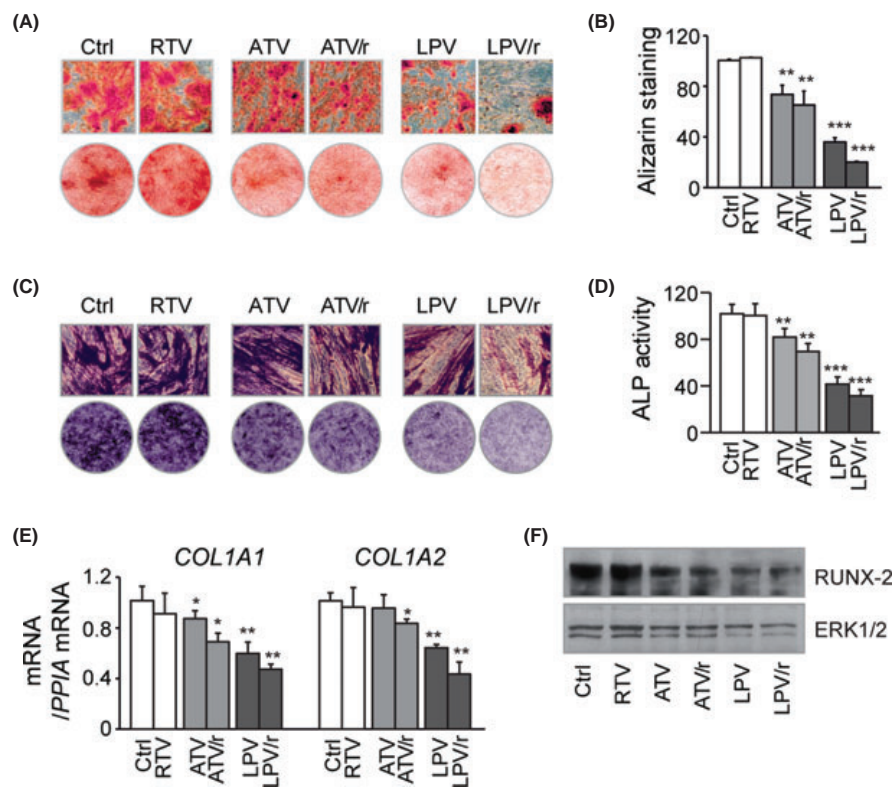
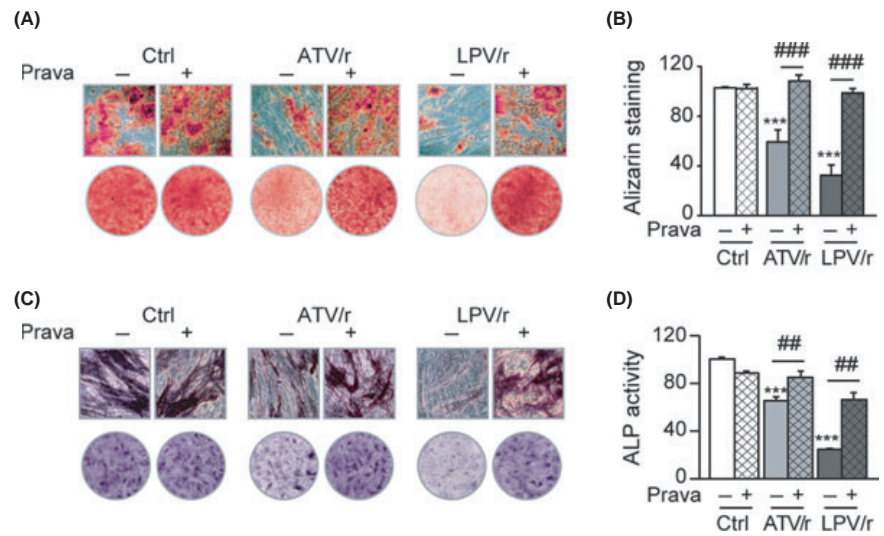


Fig. 4 PI-induced senescence is associated with altered osteoblastic potential of MSCs. MSCs were differentiated into osteoblasts or adipocytes after 30 days of treatment with PIs. To evaluate the osteoblastic potential of MSC, PIs were removed on the day of induction of differentiation, and osteoblastic differentiation media were added. (A) Cells were stained with alizarin red 15 days postinduction, and representative micrographs and scans are shown. (B) Quantification of alizarin red is expressed as percentage of control cells. (C) ALP activity was assessed using BCIP/NBT staining, and representative micrographs and scans are shown. (D) Quantification ALP is expressed as percentage of control cells. (E) Human *COL1A1* and *COL1A2* mRNA levels were measured using real-time RT-PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. control cells, $n = 4$ experiments performed in duplicate. (F) Whole cell lysates were extracted at day 15 postinduction of differentiation from MSCs and analysed by immunoblotting. Representative immunoblots of RUNX2 and ERK1/2 are shown.

Fig. 5 Pravastatin restores MSCs osteoblast differentiation potential. MSCs were differentiated into osteoblasts or adipocytes after a 30-day PI treatment with or without a 15-day pravastatin treatment. (A) Cells were stained with alizarin red to visualize calcium deposition 15 days postinduction, and representative micrographs and scans are shown. (B) Quantification of alizarin red is expressed as % of control cells. (C) ALP activity was assessed, and representative micrographs and scans are shown. (D) Quantification ALP is expressed as percentage of control cells. *** $P < 0.001$ vs. control cells and ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. pravastatin-treated cells.



the adipocyte differentiation, probably by altering the delicate balance between osteoblast and adipocyte differentiation. We therefore assessed whether cell fate could be affected by a pretreatment of MSCs with PIs.

As for osteoblast differentiation, upon 30 days of PI exposure, MSCs were induced to differentiate into adipocytes in the absence of PIs. The adipogenic potential of PI-exposed MSCs was evaluated by lipid accumulation by Oil-Red-O staining and by the expression of the adipocyte-specific transcription factor PPAR γ . As shown in Figs 6A,B, lipid accumulation in MSCs after a 30-day exposure to LPV and LPV/r was significantly decreased by 50–65%. Conversely, ATV-treated MSCs showed an enhanced lipid accumulation (120%), and ATV/r-treated cells showed the same tendency although not significant. Relatedly and in contrast with LPV and LPV/r, ATV and ATV/r increased the protein expression of PPAR γ (Fig. 6C) and the mRNA expression of the adipocyte-specific marker, fatty acid binding protein 4 (FABP4) (Fig. 6D), in differentiated MSCs.

Finally, a 15-day treatment with pravastatin before the induction of adipocyte differentiation improved the adipogenic potential of LPV/r-exposed MSCs (Fig. 6E–F). Therefore, pravastatin rescued the adipocyte differentiation potential of LPV/r-treated MSCs.

Discussion

We show here that some PIs, frequently used to control HIV infection, can induce cellular senescence and oxidative stress in bone marrow MSCs, which is associated with a reduced capacity of differentiation towards the osteoblastic lineage. Importantly, for the first time, we show that a treatment with pravastatin was able to reverse these alterations and restore osteoblast differentiation.

We evaluated the impact of widely used PIs, ATV/r and LPV/r, previously shown to increase the prevalence of osteopenia and osteoporosis in HIV-infected patients (Stone *et al.*, 2010). In an initial experiment, we demonstrated that long-term exposure of MSCs to these PIs triggered the senescence programme. Senescent MSCs are present in human bone marrow of aged patients (Zhou *et al.*, 2008) and in patients with severe progeroid syndromes (Scaffidi & Misteli, 2008), in which bone loss is a main feature (Rivas *et al.*, 2009). It has been shown that senescent MSCs presented increased oxidative stress and decreased

cell plasticity, affecting more particularly the osteoblast differentiation (Zhou *et al.*, 2008).

Many studies have shown that oxidative stress plays a major role in MSCs alterations. Moreover, ROS are key mediators of signalling pathways that underlie cellular senescence. In other cell types, PI-induced ROS production via mitochondrial dysfunction was shown to be, at least in part, responsible for triggering senescence (Caron *et al.*, 2007). Moreover, antioxidants improved PI-induced senescence in endothelial cells (Lefevre *et al.*, 2010). Here, antioxidant molecules, Trolox/GSH, decreased ROS production and prevented further decline in cell proliferation of PI-treated MSCs, suggesting that increased oxidative stress participated to PI-induced altered cell proliferation. Additionally, using a statin, which exerts pleiotropic effects, including anti-oxidant effects (Iwasaki *et al.*, 2011), we prevented PI-induced toxicity. The beneficial effect of pravastatin, which inhibits farnesyl synthesis in PI-treated MSCs, is in favour of the toxicity of farnesylated prelamin-A. It has been already shown that genetically determined accumulation of permanently farnesylated prelamin-A was responsible for severe syndromes of accelerated aging with early osteoporosis (Varela *et al.*, 2008). Our present study favours the hypothesis that prelamin-A accumulation is the initial toxic event in MSCs and that ROS production is the secondary event responsible for the decrease in cell proliferation.

Increased adipogenesis and accumulation of bone marrow fat are features of aging bone (Verma *et al.*, 2002). Early senescence induced by ATV was associated with the loss of the ability of MSCs to differentiate into osteoblasts but, in contrast, with an increase in their adipogenic capacities. The effect of ATV on adipogenesis is minor and does not really mirror the negative effect of ATV observed upon osteoblast differentiation. This observation is in agreement with recent clinical data revealing that ATV/r exerts a dual effect on bone and adipose tissue in HIV-infected patients with decreased BMD and increased central adipose tissue accumulation (McComsey *et al.*, 2011). The ability of LPV/r to inhibit both osteoblast and adipocyte differentiation could be related to the fact that LPV accumulates into MSCs (Vernochet *et al.*, 2005). Thus, it is possible that LPV accumulated prior to the induction of differentiation has an impact afterwards on the differentiation process itself. These results are in keeping with clinical data. Indeed, reduced intervertebral bone marrow fat was found in HIV-infected men treated

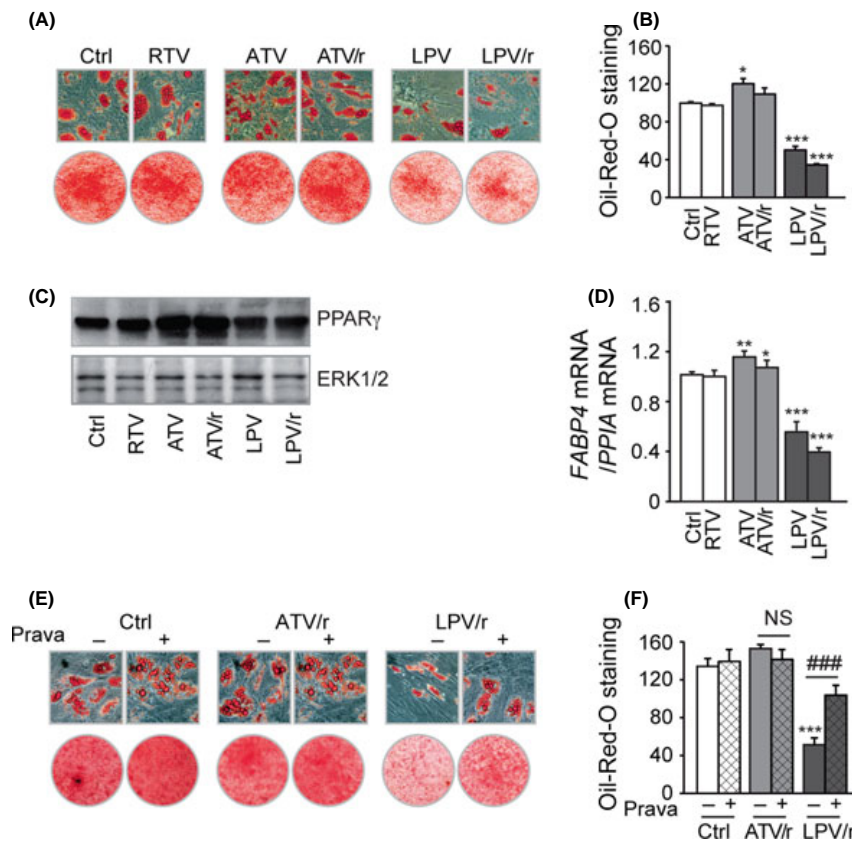


Fig. 6 PI-induced senescence is associated with altered adipogenic differentiation potential in MSCs and restored by pravastatin. MSCs were differentiated into adipocytes after a 30-day PI treatment. To evaluate the adipogenic potential of MSC, on the day of induction, PIs were removed, and pro-adipogenic differentiation media were added. (A) Cells were stained with Oil-Red-O to visualize lipid droplets 15 days postinduction, and representative micrographs and scans are shown. (B) Quantification of Oil-Red-O staining is expressed as percentage of control cells. (C) Whole cell lysates were extracted at day 15 postinduction from differentiated MSCs and analysed by immunoblotting. Representative immunoblots of PPAR γ and ERK1/2 are shown. (D) Human FABP4 mRNA levels were measured using real-time RT-PCR. MSCs were differentiated into adipocytes after a 30-day PI treatment with or without pravastatin. (E) Representative micrographs and scans of cells stained with Oil-Red-O are shown. (F) Oil-Red-O staining quantification is expressed as percentage of control cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control cell, and ### $P < 0.001$ vs. pravastatin-treated cells. $n = 3$ experiments performed in duplicate or triplicate.

by LPV/r (Huang *et al.*, 2002), and the use of LPV/r was not associated with an increased amount of fat in HIV-infected patients (Carr *et al.*, 2008). It could be hypothesized that in PI-treated HIV-infected patients, increased adipogenic potential of MSCs could lead to an increased fat mass and a reduced availability of osteoblast precursors. In conjunction with the reported increased incidence of fractures in HIV-1-infected patients, the management of these fractures has been shown to be complicated by poor regrowth of bone, suggesting reduced functional regenerative capacity of osteoblast precursors (Triant *et al.*, 2008). These observations fit with the data indicating that increased abdominal visceral fat is associated with reduced bone density in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy (Huang *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2004).

Moreover, as shown here and in previous studies, some PIs can directly alter osteoblast and adipocyte differentiation (Lagathu *et al.*, 2007; Caron-Debarle *et al.*, 2010). We show here that long-term treatment with some PIs induces senescence and thereafter alters osteoblast and adipocyte differentiation. Possibly, this senescence phenotype could impede the differentiation of MSCs into other lineages. In particular, it could impact on myoblast differentiation, which could participate to the increased prevalence of frailty, muscle atrophy and sarcopenia observed in aging HIV-infected patients (Capeau, 2011).

We have shown here the beneficial effect of pravastatin on PI-induced senescence and osteoblast differentiation of MSCs. Accordingly, in the general population, statins were shown to moderately but significantly improve BMD and have been suggested to have a positive effect on bone turnover markers (Tang *et al.*, 2008). It has been clearly

shown that as the level of senescence of MSCs increases, adipogenic capacities increase and osteogenic differentiation decreases as a result of increased oxidative stress (Kim *et al.*, 2012).

First, pravastatin could restore MSCs differentiation capacities by preventing severe oxidative stress (Iwasaki *et al.*, 2011). MSCs shift from osteogenic to adipogenic lineage differentiation has been attributed to oxidative stress during the aging process (Kim *et al.*, 2012). Oxidative stress is a pivotal pathogenic factor in age-related bone loss in mice, leading to decreased osteoblast number and bone formation (Almeida *et al.*, 2007). Age-related shifts in stem cell commitment may be secondary to lineage-specific differences in susceptibility to oxidative stress and apoptosis (Bruedigam *et al.*, 2010). Second, pravastatin could prevent the accumulation of farnesylated prelamin-A induced by PIs. Indeed, lamin A/C, which plays an important role in age-related bone loss, is required for osteoblast differentiation in MSCs. In contrast, lamin A/C inhibition in MSCs enhanced adipocyte differentiation (Akter *et al.*, 2009; Naito *et al.*, 2012), while the accumulation of farnesylated prelamin-A in MSCs results in premature cellular senescence and impaired adipocyte lineage (Ruiz de Eguino *et al.*, 2012). Although a role of pravastatin on oxidative stress cannot be excluded, our results suggest that pravastatin counteracts all of the effect of PIs, including on cell differentiation, by preventing farnesylated prelamin-A accumulation.

Our study has some limitations. It may not account for many factors involved in the accelerated pro-osteoporotic process observed in HIV-infected patients, including HIV infection itself, immune balance, environmental factors and genetic predispositions. As cellular senescence is a common pathway of many cell lineages other than MSCs, it is

possible that PIs could induce senescence of several cell types other than MSCs, including hematopoietic stem cells. The impact of PIs on osteoclasts, derived from the hematopoietic lineage, remains to be evaluated. Indeed, reduced BMD induced by cART is postulated to result from an imbalance between osteoclast and osteoblast activity. In clinical studies, bone turnover markers are often used to evaluate the balance between bone resorption and formation. Several studies indicate an increased level of resorption markers in HIV-infected patients, emphasizing the role of ART and more specifically of the NRTI class, on bone destruction rather than bone formation itself (Haskelberg *et al.*, 2011). Our data suggest that some PIs could induce premature senescence of MSCs, therefore precluding the regeneration process normally associated with bone loss.

In conclusion, these data provide the first experimental support that RTV-boosted ATV (ATV/r) and LPV (LPV/r) could induce senescence of MSCs. This suggests that treatment with some PIs might participate to the early development of osteoporosis in HIV-infected patients. In several clinical studies, data on the benefit of pravastatin treatment on the fracture risk are controversial (Rejnmark *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2008). However, they suggest that pravastatin exerts a direct effect on osteoblast function and/or differentiation *in vivo* (Rejnmark *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2008). Thus, the ability of statins to improve PI-induced MSCs senescence could be beneficial in HIV-infected patients.

Experimental procedures

Cell culture and treatment

Experimental procedures, with human bone marrow, have been approved by the Saint Louis Hospital Ethical Committees for human research (Paris, France), in accordance with the European Union guidelines and the Declaration of Helsinki. MSCs were isolated from washed filters used during bone marrow graft processing. MSCs were obtained and cultured as previously described (Arnulf *et al.*, 2007). Briefly, healthy donors' bone marrow cells obtained after Ficoll (Gibco, Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA) were cultured at the initial density of 5×10^4 cells cm^2 in alpha-minimum essential medium, supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco; Invitrogen Corporation), 2 mM glutamine, 2.5 ng mL^{-1} basic fibroblast growth factor (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), penicillin and streptomycin (Gibco; Invitrogen Corporation). After 24–48 h, nonadherent cells were removed, and medium was changed. Adherent cells were then trypsinized, harvested and cultured by seeding 5×10^3 cells cm^2 . Cultures were fed every 2–3 days and trypsinized every 5 days.

All experiments were performed on MSCs isolated from at least 3 different bone marrow donors. Cells were exposed to 5 μM atazanavir (ATV) (kindly provided by Dr S. Azoulay, CNRS UMR 6001, Nice, France), 10 μM lopinavir (LPV) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), alone or in association with 2 μM ritonavir (ATV/r and LPV/r), or to ritonavir alone (RTV) (Sigma-Aldrich), at clinically relevant concentrations near C_{max} (Lagathu *et al.*, 2007), or to the solvent (0.1% DMSO) for 30 days, from passages 2–9. The cells were also incubated with 25 μM pravastatin or a combination of 100 μM Trolox and 100 μM reduced glutathione during the last 15 days concomitantly with PI treatment, or with 1 mM N-Acetyl Cysteine, for 72 h from day 15 (All from Sigma-Aldrich).

Cellular proliferation and senescence

Cellular senescence was evaluated by the cell population doubling level (PDL) calculated as described previously (Caron *et al.*, 2007), as $\log_2(D5/$

$D0)$, where $D0$ and $D5$ are the number of cells at seeding and harvesting, respectively. The positive blue staining of β -galactosidase has been used as a biomarker of cellular senescence (Dimri *et al.*, 1995). To detect senescence-associated β -galactosidase activity, cells were incubated with appropriate buffer solution containing X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) as described previously (Caron *et al.*, 2007; Lefevre *et al.*, 2010). The blue-stained cells observed at pH 6 and pH 4 were counted in 8 fields at 20 \times magnification, and the ratio of pH6- to pH4-positive blue cells, which specifically represents SA- β -galactosidase activity, was calculated. X-gal cellular staining was also dissolved in water, sonicated and quantified at 630 nm.

Cell differentiation

Adipogenic and osteogenic MSCs differentiation assays were performed in specific media. Differentiation was triggered on MSCs in the absence of PIs and/or pravastatin. Cells were differentiated into osteoblasts by culturing cells in osteoblast differentiation media for 15 days (10 mM β -glycerophosphate, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ascorbate). MSCs were then stained for alizarin red (Sigma-Aldrich) as described previously (Cotter *et al.*, 2011). Alkaline phosphatase (ALP) activity was determined using the BCIP/NBT substrate staining method (Sigma-Aldrich) described previously (Cotter *et al.*, 2011). For adipogenic differentiation, MSCs were maintained for 3 days in an adipogenic induction media (1 μM dexamethasone, 500 μM IBMX, 1 μM insulin) followed by an adipogenic maintenance medium (1 μM insulin). Cells were then stained for Oil-red-O (Sigma-Aldrich) as described previously (Lagathu *et al.*, 2007). All quantifications were normalized to protein content.

Oxidative stress

The production of ROS was assessed by the oxidation of 5-6-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA) (Invitrogen) or the reduction in nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich) as previously described (Lefevre *et al.*, 2010). Results were normalized to protein content. Superoxide dismutase (SOD) activity was evaluated using a commercially available kit (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions.

Protein extraction and Western blotting

Proteins were extracted from cell monolayers as previously described (Caron *et al.*, 2007). Proteins were electroblotted on nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe, Velizy Villacoublay, France). Specific proteins were detected by incubation with the appropriate primary and horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies. Immune complexes were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences).

RNA isolation and quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from cultured cells using an RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), and mRNA expression was analysed by RT-PCR as described previously (Lagathu *et al.*, 2007). The sequences of the oligonucleotides used as primers are available upon request.

Statistical analysis

All experiments were performed at least three times on triplicate samples. All results are expressed as means \pm SEM. Statistical

significance, between PI-treated cells vs. control (DMSO-treated) and pravastatin- or antioxidant-treated cells, was determined with parametric (Student's *t*-test) or nonparametric (Mann-Whitney *U*-test) tests, as appropriate.

Acknowledgments

We Thank Dr Stephane Azoulay (CNRS, UMR 6001, Nice, France) for providing atazanavir. Research is funded by UPMC, INSERM and ANRS. Personal support is acknowledged as follows: ANRS postdoctoral fellowship (CL and SHV) and DIM-STEMPOLE doctoral fellowship (CB).

Conflict of interest

No conflict of interest could be disclosed for any author.

Author contributions

CL and SHV conceived and designed the experiments. SHV, CL and CB performed the experiments. CL, SHV and JC analysed the data. JL contributed reagents/materials/analysis tools. CL and JC wrote the manuscript.

References

Akter R, Rivas D, Geneau G, Drissi H, Duque G (2009) Effect of lamin A/C knockdown on osteoblast differentiation and function. *J. Bone Miner. Res.* **24**, 283–293.

Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC (2007) Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting β -catenin from T cell factor to FOXO. *J. Biol. Chem.* **282**, 27298–27305.

Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne MN, Crinquette A, Dessoly J, Sciacini AK, Benbunan M, Chomienne C, Femand JP, Marolleau JP, Larghero J (2007) Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia* **21**, 158–163.

Bolland MJ, Wang TK, Grey A, Gamble GD, Reid IR (2011) Stable bone density in HAART-treated individuals with HIV: a meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 2721–2731.

Brown TT, Qaqish RB (2006) Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *AIDS* **20**, 2165–2174.

Brown TT, Ruppe MD, Kassner R, Kumar P, Kehoe T, Dobs AS, Timpone J (2004) Reduced bone mineral density in human immunodeficiency virus-infected patients and its association with increased central adiposity and postload hyperglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 1200–1206.

Bruedigam C, Eijken M, Koedam M, van de Peppel J, Drabek K, Chiba H, van Leeuwen JP (2010) A new concept underlying stem cell lineage skewing that explains the detrimental effects of thiazolidinediones on bone. *Stem Cells* **28**, 916–927.

Capeau J (2011) Premature aging and premature age-related comorbidities in HIV-infected patients: facts and hypotheses. *Clin. Infect. Dis.* **53**, 1127–1129.

Capell BC, Erdos MR, Madigan JP, Fiordalisi JJ, Varga R, Conneely KN, Gordon LB, Der CJ, Cox AD, Collins FS (2005) Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 12879–12884.

Caron M, Auclair M, Donadille B, Bereziat V, Guerci B, Laville M, Narbonne H, Bodemer C, Lascols O, Capeau J, Vigouroux C (2007) Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin-A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ.* **14**, 1759–1767.

Caron-Debarle M, Lagathu C, Boccarda F, Vigouroux C, Capeau J (2010) HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol. Med.* **16**, 218–229.

Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, Kaufmann GR, Chisholm DJ, Cooper DA (1999) Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* **353**, 2093–2099.

Carr A, Ritzhaupt A, Zhang W, Zajdenverg R, Workman C, Gatell JM, Cahn P, Chaves R (2008) Effects of boosted tipranavir and lopinavir on body composition, insulin sensitivity and adipocytokines in antiretroviral-naive adults. *AIDS* **22**, 2313–2321.

Coffinier C, Hudon SE, Farber EA, Chang SY, Hrycyna CA, Young SG, Fong LG (2007) HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin-A in cells. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 13432–13437.

Cotter EJ, Chew N, Powderly WG, Doran PP (2011) HIV type 1 alters mesenchymal stem cell differentiation potential and cell phenotype ex vivo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **27**, 187–199.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9363–9367.

Duvivier C, Kolta S, Assoumou L, Ghosn J, Rozenberg S, Murphy RL, Katlama C, Costagliola D (2009) Greater decrease in bone mineral density with protease inhibitor regimens compared with NNRTI regimens in HIV-1 infected naive patients. *AIDS* **23**, 817–824.

Grund B, Peng G, Gibert CL, Hoy JF, Isaksson RL, Shlay JC, Martinez E, Reiss P, Visnegarwala F, Carr AD (2009) Continuous antiretroviral therapy decreases bone mineral density. *AIDS* **23**, 1519–1529.

Hansen AB, Obel N, Nielsen H, Pedersen C, Gerstoft J (2011) Bone mineral density changes in PI-sparing vs. nucleoside reverse transcriptase inhibitor-sparing highly active antiretroviral therapy: data from a randomized trial. *HIV Med.* **12**, 157–165.

Haskelberg H, Carr A, Emery S (2011) Bone turnover markers in HIV disease. *AIDS Rev.* **13**, 240–250.

Huang JS, Rietschel P, Hadigan CM, Rosenthal DI, Grinspoon S (2001) Increased abdominal visceral fat is associated with reduced bone density in HIV-infected men with lipodystrophy. *AIDS* **15**, 975–982.

Huang JS, Mulkern RV, Grinspoon S (2002) Reduced intravertebral bone marrow fat in HIV-infected men. *AIDS* **16**, 1265–1269.

Iwasaki Y, Yamato H, Fukagawa M (2011) Treatment with pravastatin attenuates oxidative stress and protects osteoblast cell viability from indoxyl sulfate. *Ther. Apher. Dial.* **15**, 151–155.

Jain RG, Lenhard JM (2002) Select HIV protease inhibitors alter bone and fat metabolism ex vivo. *J. Biol. Chem.* **277**, 19247–19250.

Kim M, Kim C, Choi YS, Kim M, Park C, Suh Y (2012) Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: implication to age-associated bone diseases and defects. *Mech. Ageing Dev.* **133**, 215–225.

Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, Bastard JP, Maachi M, Azoulay S, Briggs M, Caron M, Capeau J (2007) Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir. Ther.* **12**, 489–500.

Lefevre C, Auclair M, Boccarda F, Bastard JP, Capeau J, Vigouroux C, Caron-Debarle M (2010) Premature senescence of vascular cells is induced by HIV protease inhibitors: implication of prelamin-A and reversion by statin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 2611–2620.

Liu Q, Kim DI, Syme J, LuValle P, Burke B, Roux KJ (2010) Dynamics of lamin-A processing following precursor accumulation. *PLoS ONE* **5**, e10874.

Mallon PW, Miller J, Cooper DA, Carr A (2003) Prospective evaluation of the effects of antiretroviral therapy on body composition in HIV-1-infected men starting therapy. *AIDS* **17**, 971–979.

Mazziotti G, Canalis E, Giustina A (2010) Drug-induced osteoporosis: mechanisms and clinical implications. *Am. J. Med.* **123**, 877–884.

McComsey GA, Kitch D, Sax PE, Tebas P, Tierney C, Jahed NC, Myers L, Melbourne K, Ha B, Daar ES (2011) Peripheral and central fat changes in subjects randomized to abacavir-lamivudine or tenofovir-emtricitabine with atazanavir-ritonavir or efavirenz. *Clin. Infect. Dis.* **53**, 185–196.

Naito M, Omoteyama K, Mikami Y, Takagi M, Takahashi T (2012) Suppression of lamin A/C by short hairpin RNAs promotes adipocyte lineage commitment in mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26. *Histochem. Cell Biol.* **137**, 235–247.

Nuttall ME, Gimble JM (2004) Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 290–294.

Powderly WG (2012) Osteoporosis and bone health in HIV. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **9**, 218–222.

Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L (2006) Statin but not non-statin lipid-lowering drugs decrease fracture risk: a nation-wide case-control study. *Calcif. Tissue Int.* **79**, 27–36.

- Rivas D, Li W, Akter R, Henderson JE, Duque G (2009) Accelerated features of age-related bone loss in *zmpste24* metalloproteinase-deficient mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **64**, 1015–1024.
- Ruiz de Eguino G, Infante A, Schlangen K, Aransay AM, Fullaondo A, Soriano M, García-Verdugo JM, Martín AG, Rodríguez CI (2012) Sp1 transcription factor interaction with accumulated prelamin-A impairs adipose lineage differentiation in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* **1**, 309–321.
- Scaffidi P, Misteli T (2008) Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat. Cell Biol.* **10**, 452–459.
- Stone B, Dockrell D, Bowman C, McCloskey E (2010) HIV and bone disease. *Arch. Biochem. Biophys.* **503**, 66–77.
- Tang QO, Tran GT, Gamie Z, Graham S, Tsiologiannis E, Tsiridis E, Linder T (2008) Statins: under investigation for increasing bone mineral density and augmenting fracture healing. *Expert Opin. Investig. Drugs* **17**, 1435–1463.
- Triant VA, Brown TT, Lee H, Grinspoon SK (2008) Fracture prevalence among human immunodeficiency virus (HIV)-infected vs non-HIV-infected patients in a large U.S. healthcare system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 3499–3504.
- Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suarez MF, Cau P, Cadinanos J, Osorio FG, Foray N, Cobo J, de Carlos F, Levy N, Freije JM, Lopez-Otin C (2008) Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat. Med.* **14**, 767–772.
- Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ (2002) Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J. Clin. Pathol.* **55**, 693–698.
- Vernochet C, Azoulay S, Duval D, Guedj R, Cottrez F, Vidal H, Ailhaud G, Dani C (2005) Human immunodeficiency virus protease inhibitors accumulate into cultured human adipocytes and alter expression of adipocytokines. *J. Biol. Chem.* **280**, 2238–2243.
- Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, Leboff MS, Glowacki J (2008) Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell* **7**, 335–343.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Fig. S1. Effect of PIs associated or not with pravastatin or antioxidant treatment on SOD Activity in MSCs.

Fig. S2. Direct effect of PIs on osteoblast differentiation of MSCs.

B-2-Résultats principaux

- ◆ L'ATV et plus encore le LPV induisent un ralentissement de la prolifération cellulaire, le RTV seul n'affecte pas la prolifération cellulaire, mais amplifie les effets de l'ATV et du LPV.
- ◆ Le ralentissement de la prolifération est associée avec une induction de la sénescence dès J10 pour le LPV et dès J20 pour l'ATV, et une accumulation de prélamine A farnésylée.
- ◆ La sénescence est associée avec une augmentation du stress oxydant. Le co-traitement des MSC avec des molécules antioxydantes à J15 reverse partiellement la baisse de prolifération induite par l'ATV/r et le LPV/r.
- ◆ La sénescence induite par l'ATV, le LPV et plus encore avec le boost de RTV dans les MSC induit une réduction de leur potentiel de différenciation ostéoblastique. Le LPV en association ou non avec le RTV mais pas l'ATV réduit également le potentiel de différenciation adipocytaire des MSC.
- ◆ Le co-traitement des MSC avec de la pravastatine à partir de J15 provoque l'accumulation de prélamine A non farnésylée et réduit ainsi la sénescence et le stress oxydant induits par les deux PI. De même, les MSC précédemment co-traitées avec la pravastatine récupèrent un potentiel de différenciation ostéoblastique et adipocytaire quasi normal.

B-3-Discussion

♦Le choix des concentrations d'ATV/r et de LPV/r :

Afin de se rapprocher le plus des conditions *in vivo*, les concentrations d'ATV de 5 μM , de LPV de 10 μM et de RTV de 2 μM ont été choisies car elles correspondent aux concentrations maximales (C_{max}) retrouvées dans le sang des patients entre deux prises médicamenteuses.

De la même façon l'ATV et le LPV en clinique sont prescrits avec une faible dose (boost) de RTV (voir partie C-2-3). Nous avons donc combiné l'ATV et le LPV avec le RTV dans nos expériences.

♦Etude mécanistique : choix des molécules antioxydantes :

Nous avons utilisé dans cet article plusieurs stratégies antioxydantes : le NAC à forte concentration 1mM pendant 72h, ou une combinaison de Trolox 100 μM et GSH 100 μM à partir de J15. Comme discuté dans la première étude, le choix de la stratégie antioxydante est difficile à mettre en place. En effet, le Trolox, le GSH et le NAC éliminent les radicaux libres présents dans le cytoplasme de la cellule, changeant le statut redox de la cellule, et modifiant donc diverses réponses cellulaires comme la prolifération, la différenciation, l'inflammation, l'apoptose. Cependant, les antioxydants à forte dose peuvent avoir des effets néfastes, le Trolox par exemple est connu pour induire un stress oxydant toxique au-dessus de 1mM (Wattamwar et al. 2011). Le GSH de 1-5mM *in vitro* sur une durée allant de quelques heures à 24h n'est pas connu dans la littérature pour induire une toxicité propre, cependant on ne peut pas exclure une toxicité du GSH et/ou de son solvant à long terme.

♦Etude mécanistique : la pravastatine :

Afin d'inhiber l'accumulation de prélamine A farnésylée toxique pour la cellule, nous avons traité les cellules avec de la pravastatine à 25 μM de J15 à J30. Les statines sont des inhibiteurs compétitifs de l'HMG-CoA-réductase, une enzyme impliquée dans la voie de synthèse du cholestérol, dont un des intermédiaires est le groupement farnésyl (Singla et al. 2012) (Figure 31). Néanmoins les statines ont des effets pléiotropiques en plus de l'inhibition de la farnésylation, pouvant également expliquer l'amélioration de la sénescence des MSC traitées aux PI. En effet elles sont connues pour également réduire l'inflammation et le stress oxydant (Lahera et al. 2007, Quist-Paulsen 2010). De plus les statines ont également un effet anabolique sur l'os *in vivo*. A l'instar des biphosphonates, elles inhibent l'activité ostéoclastique, du fait de l'inhibition de la voie de synthèse du cholestérol, dont l'intermédiaire farnésyl est requis pour l'activation ostéoclastique (Figure 31) (Tsartsalis et al. 2012). Les statines augmentent également l'expression de BMP-2, et donc la différenciation ostéoblastique (Mundy et al. 1999) et

inhibent l'apoptose des ostéoblastes en augmentant l'expression du TGF- β et d'autres facteurs de croissance (Kaji et al. 2008, Liu et al. 2009).

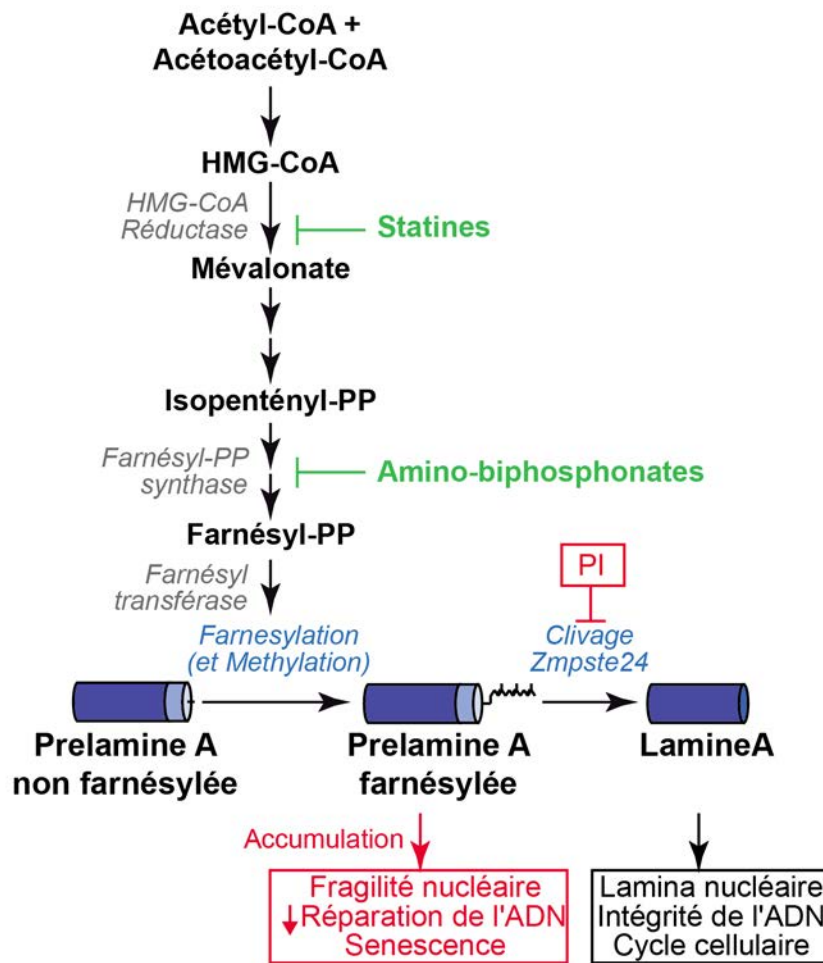


Figure 31 : Effet des statines sur la voie de synthèse du groupement farnésyl

III-Discussion générale et perspectives

Ces études nous ont permis de montrer que, *in vitro*, le traitement à long terme des MSC avec les protéines du VIH, Tat et Nef, ou les PI, ATV et LPV, induit une sénescence cellulaire et un défaut de différenciation des MSC en ostéoblastes.

Une des limites de l'étude concerne le temps de traitement en culture cellulaire. Il est impossible de reproduire les conditions retrouvées *in vivo* chez le patient infecté, puisque les cellules de ce dernier sont exposées aux protéines virales et aux ARV pendant des années. Pour y pallier partiellement nous utilisons des concentrations maximales observées chez les patients.

De la même façon, la question de la relevance *in vivo* de l'effet des protéines virales sur les MSC des patients infectés par le VIH sous traitement ARV efficace se pose. En effet, ces patients ont une forte suppression de la réplication virale conduisant à une charge virale quasi indétectable et une réduction du taux circulant des protéines du VIH. Néanmoins plusieurs arguments de la littérature suggèrent la possibilité d'un effet propre du VIH et des protéines virales, même chez les patients traités. Premièrement, même chez les patients très bien contrôlés, il est possible de retrouver une faible réplication virale au sein de cellules latentes comme les lymphocytes T mémoires (Zaikos et al. 2014), faisant de ces cellules des réservoirs potentiels du virus et des cellules infectées peuvent relâcher des protéines virales mais pas de virions infectieux (Chun et al. 1997). De fait, différents tissus sont suspectés d'être des réservoirs du VIH, dont la moelle osseuse (Folks et al. 1988), laissant à penser qu'à proximité des MSC, une production de protéines virales est possible localement même sous traitement ARV efficace. Aussi, les protéines de l'enveloppe et de la capsid virale sont détectées dans les ganglions lymphatiques des patients très bien contrôlés (<25 copies de virus/mL de sang) indiquant que la production des protéines virales persiste même si la charge virale est indétectable (Popovic et al. 2005). En accord avec cette observation, il est possible de retrouver une transcription persistante des gènes viraux codants pour les protéines Tat, Nef et Rev, dans des PBMC de patients ayant une charge virale plasmatique indétectable (Zhang et al. 2001).

En poussant la réflexion un peu plus loin, nous pouvons faire l'hypothèse qu'au sein de la moelle osseuse, le traitement ARV et les protéines virales pourraient avoir des effets cumulés sur l'induction de la sénescence des MSC. Nos résultats vont en ce sens, puisque nous avons pu montrer l'implication de mécanismes différents dans l'induction de la sénescence par la protéine Tat, la protéine Nef et les PI. De façon intéressante, en clinique, il a été montré que l'initiation du traitement ARV amplifie dans un premier temps l'effet du VIH sur la déminéralisation osseuse, créant une fenêtre catabolique d'environ

6 mois (voir partie E-2-1 de l'introduction). Les mécanismes impliqués dans cette déminéralisation amplifiée ne sont pas connus, mais plusieurs hypothèses peuvent l'expliquer. En premier lieu, elle pourrait résulter d'un effet cumulé du virus et des ARV. A l'initiation du traitement ARV, la charge virale est encore élevée, il y a donc une sécrétion importante de protéines virales, dont nous avons pu montrer en partie les effets néfastes sur les précurseurs ostéoblastiques. On peut donc supposer que le cocktail des inhibiteurs de protéase et des protéines virales induise une sénescence massive des précurseurs ostéoblastiques. Et puisqu'en parallèle, il a été montré que les PI et certaines protéines virales, notamment Tat, induisent une augmentation de l'activité ostéoclastique, le déséquilibre entre formation et résorption osseuse s'aggraverait (voir partie E-2-2 de l'introduction). On peut supposer également que dans un second temps, passé 6 mois, le traitement ARV est efficace, les protéines virales sécrétées sont en moindre quantité, et la formation osseuse vient équilibrer la résorption osseuse.

L'ostéoimmunologie peut également justifier d'une autre façon l'effet du virus et des ARV sur la déminéralisation osseuse. L'infection par le VIH induit très rapidement une forte inflammation chez les patients, en partie causée par l'infection en elle-même, par une atteinte de la barrière intestinale permettant une translocation bactérienne et une perte de la barrière immunitaire intestinale (Brenchley et al. 2006). Il a été montré que les cellules du métabolisme osseux, en particulier les ostéoclastes sont activées par l'inflammation et l'activation immunitaire (voir parties C-3-2 et E-2-2 de l'introduction), tandis qu'en parallèle les ostéoblastes sont inhibés. Aussi le contexte pro-inflammatoire pourrait participer également à la dérégulation de la balance osseuse en particulier avant l'initiation du traitement. Le traitement antirétroviral induit ensuite une restauration partielle de la barrière intestinale et donc une réduction de l'inflammation, pouvant expliquer la stabilisation secondaire de la balance osseuse. Néanmoins cette théorie n'explique pas l'amplification de l'écart entre résorption et formation osseuse à l'initiation du traitement.

Cet écart pourrait être du au laps de temps nécessaire au renouvellement osseux en lui-même. L'infection par le VIH, via l'inflammation et les effets des protéines virales, induit une forte activation ostéoclastique et une diminution de l'activité ostéoblastique. La résorption osseuse se fait rapidement entre 2 et 4 semaines, tandis que la formation osseuse prend 4 à 6 mois (voir partie C-1-3 de l'introduction). On peut donc légitimement penser que le « temps de réaction » des ostéoblastes expliquerait la fenêtre catabolique à l'initiation du traitement.

Au cours du vieillissement osseux il a été constaté une augmentation de l'adiposité de la moelle osseuse, et une différenciation adipocytaire accrue au détriment de la différenciation ostéoblastique (voir partie C-3-2 de l'introduction). Notre étude nous a permis de mettre en évidence une altération du potentiel

de différenciation ostéoblastique des MSC traitées avec Tat et Nef, mais nous n'avons pas regardé les effets des protéines Tat et Nef sur la balance de différenciation adipocytaire-ostéoblastique des MSC, ni sur la régulation des voies de signalisation impliquées dans ces différenciations. Des résultats préliminaires semblent indiquer qu'à contrario de ce qui a été observé dans la littérature sur les MSC sénescents, il n'y aurait pas d'augmentation de la différenciation adipocytaire, mais à l'inverse plutôt une diminution, particulièrement pour les cellules traitées avec Nef et Tat+Nef. Les PI aussi perturbent la balance de différenciation ostéoblastique et adipocytaire des MSC. Comme montré dans le second article, le LPV avec ou sans RTV induit une diminution de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des MSC. A l'inverse l'ATV seul induit une légère augmentation de la différenciation adipocytaire des MSC, à l'instar de ce qui a pu être observé au cours du vieillissement. Au final ces résultats suggèrent que les protéines virales et les PI ont des effets sur la différenciation adipocytaire aussi, et le rôle dual de l'ATV induisant la différenciation adipocytaire au détriment de la différenciation ostéoblastique est en accord avec des données cliniques qui suggèrent une augmentation de l'adiposité centrale et une diminution de la densité minérale osseuse chez les patients traités à l'ATV/r (McComsey et al. 2011). De plus, chez les patients infectés par le VIH, on constate une modification de la répartition du tissu adipeux avec une augmentation de l'adiposité viscérale avec l'âge (Guaraldi et al. 2014).

Les cellules de la lignée mésenchymateuse sont retrouvées dans tous les tissus, on peut donc envisager que les PI et les protéines Tat et Nef aient des effets similaires sur d'autres tissus tels que le cartilage et le muscle, puisque les chondroblastes et myoblastes dérivent eux aussi des MSC. Une atteinte de ces tissus chez les patients infectés par le VIH et contrôlés par le traitement ARV est effectivement observée lorsqu'ils vieillissent, avec notamment une augmentation de l'arthrose (Fillipas et al. 2014, Meynard et al. 2014) et de la sarcopénie (Serrano-Villar et al. 2014).

Au final, nos résultats suggèrent que les protéines virales Tat et Nef et les PI en particulier l'ATV et le LPV induisent la sénescence des MSC. Nous posons comme hypothèse que cette sénescence induit un défaut de prolifération des MSC qui pourrait être à l'origine d'une déplétion du pool de précurseurs ostéoblastiques dans la moelle osseuse, et aussi d'un défaut de différenciation des MSC au moins vers la lignée ostéoblastique, participant à la réduction de la formation osseuse observée chez les patients infectés par le VIH non traités. Le traitement antirétroviral induit, après la fenêtre catabolique, une augmentation globale du turnover osseux. Un turnover augmenté des MSC pourrait accélérer la sénescence répliquative des cellules, amplifiant d'autant plus la sénescence déjà directement induite par les protéines virales et les PI (Mansilla et al. 2011).

Le dernier point que je me propose de discuter ici concerne le vieillissement de la population infectée par le VIH. Une grande question aujourd'hui est de savoir si les patients infectés par le VIH vieillissent prématurément en comparaison de la population générale. L'étude de la cohorte Swiss HIV montre que les incidences de certaines maladies liées à l'âge comme le diabète, les maladies cardiovasculaires, l'ostéoporose et les cancers non classant SIDA sont augmentés chez les personnes infectées par le VIH de plus de 50 ans en comparaison de patients plus jeunes, attestant d'un vieillissement de la population après 50 ans (Hasse et al. 2011). L'étude de G. Guaraldi en 2011 montre également une apparition précoce d'environ 15 ans de ces comorbidités en comparaison de la population générale, suggérant un vieillissement prématuré des patients infectés par le VIH (Guaraldi et al. 2011). Néanmoins d'autres études pointent du doigt la disparité de distribution des âges entre la population VIH et la population générale. Ainsi les individus souffrant de comorbidités dans la population générale sont plus âgés. Mais les sujets âgés sont très peu représentés dans la population VIH. Si les données sont ajustées sur l'âge, il ne semble pas y avoir globalement une survenue plus précoce des comorbidités, mais elles surviendraient de façon plus prévalente conduisant à la notion de vieillissement accentué. De plus, les patients infectés par le VIH sont médicalement suivis jeunes, et donc leurs comorbidités sont diagnostiquées précocement, comparativement aux individus de la population générale qui sont moins diagnostiqués (Costagliola 2014). Enfin, ces sujets présentent plus souvent des facteurs personnels (tabagisme, sédentarité, consommation de drogues, coinfections) qui peuvent aussi rendre compte d'une augmentation du vieillissement.

Le vieillissement de l'individu est associé à la dégénérescence de ses tissus, et à la sénescence cellulaire. Même si nos résultats ne nous permettent pas de présumer de la précocité du vieillissement des individus infectés par le VIH, il est intéressant de constater qu'*in vitro* les protéines virales et les PI amplifient le nombre de MSC sénescents à un temps T. La prolifération cellulaire induit au cours des passages une sénescence répllicative, c'est ce qui explique que même les cellules contrôles finissent par entrer en sénescence, nos résultats semblent indiquer que les protéines du VIH et les PI accélèrent cette entrée en sénescence, suggérant l'induction d'une sénescence prématurée. La relation avec le vieillissement de l'individu n'est pas intuitive et encore moins avec la survenue de comorbidités associées au vieillissement.

Ainsi nos modèles *in vitro* offrent des pistes de réflexion nouvelles sur les mécanismes en cause dans certaines comorbidités, en particulier la déminéralisation osseuse. Ils offrent également des perspectives thérapeutiques et la mise sous statine des patients à risque est un objectif raisonnable en clinique. Ils peuvent aussi permettre de tester d'autres pistes thérapeutiques, contrôlant l'inflammation, le stress

oxydant ou l'autophagie, pistes qui sont attendues pour compléter la prise en charge des patients et leur permettre de « vieillir » dans les meilleures conditions possibles.

INDEX DES ILLUSTRATIONS

- Aboulker, J. P. and A. M. Swart (1993). "Preliminary analysis of the Concorde trial. Concorde Coordinating Committee." *Lancet* **341**(8849): 889-890.
- Acheampong, E. A., Z. Parveen, L. W. Muthoga, M. Kalayeh, M. Mukhtar and R. J. Pomerantz (2005). "Human Immunodeficiency virus type 1 Nef potently induces apoptosis in primary human brain microvascular endothelial cells via the activation of caspases." *J Virol* **79**(7): 4257-4269.
- Acosta, J. C., A. O'Loughlen, A. Banito, S. Raguz and J. Gil (2008). "Control of senescence by CXCR2 and its ligands." *Cell Cycle* **7**(19): 2956-2959.
- Adler, A. S., S. Sinha, T. L. Kawahara, J. Y. Zhang, E. Segal and H. Y. Chang (2007). "Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity." *Genes Dev* **21**(24): 3244-3257.
- Ailhaud, G., P. Grimaldi and R. Negrel (1992). "Cellular and molecular aspects of adipose tissue development." *Annu Rev Nutr* **12**: 207-233.
- Alexaki, A. and B. Wigdahl (2008). "HIV-1 infection of bone marrow hematopoietic progenitor cells and their role in trafficking and viral dissemination." *PLoS Pathog* **4**(12): e1000215.
- Allison, G. T., M. P. Bostrom and M. J. Glesby (2003). "Osteonecrosis in HIV disease: epidemiology, etiologies, and clinical management." *AIDS* **17**(1): 1-9.
- Appay, V., D. Sauce and M. Prelog (2010). "The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals." *Aging (Albany NY)* **2**(2): 78-81.
- Araujo, L. A. and S. E. Almeida (2013). "HIV-1 diversity in the envelope glycoproteins: implications for viral entry inhibition." *Viruses* **5**(2): 595-604.
- Armanios, M. and E. H. Blackburn (2012). "The telomere syndromes." *Nat Rev Genet* **13**(10): 693-704.
- Arunagiri, C., I. Macreadie, D. Hewish and A. Azad (1997). "A C-terminal domain of HIV-1 accessory protein Vpr is involved in penetration, mitochondrial dysfunction and apoptosis of human CD4+ lymphocytes." *Apoptosis* **2**(1): 69-76.
- Ascenzi, M. G. and A. K. Roe (2012). "The osteon: the micromechanical unit of compact bone." *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**: 1551-1581.
- Aukrust, P., C. J. Haug, T. Ueland, E. Lien, F. Muller, T. Espevik, J. Bollerslev and S. S. Froland (1999). "Decreased bone formative and enhanced resorptive markers in human immunodeficiency virus infection: indication of normalization of the bone-remodeling process during highly active antiretroviral therapy." *J Clin Endocrinol Metab* **84**(1): 145-150.
- Bai, L., X. Zhu, T. Ma, J. Wang, F. Wang and S. Zhang (2013). "The p38 MAPK NF-kappaB pathway, not the ERK pathway, is involved in exogenous HIV-1 Tat-induced apoptotic cell death in retinal pigment epithelial cells." *Int J Biochem Cell Biol* **45**(8): 1794-1801.
- Baker, D. J., T. Wijshake, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, J. L. Kirkland and J. M. van Deursen (2011). "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders." *Nature* **479**(7372): 232-236.
- Bakkar, N., K. Ladner, B. D. Canan, S. Liyanarachchi, N. C. Bal, M. Pant, M. Periasamy, Q. Li, et al. (2012). "IKKalpha and alternative NF-kappaB regulate PGC-1beta to promote oxidative muscle metabolism." *J Cell Biol* **196**(4): 497-511.

- Ballon, G., L. Ometto, E. Righetti, A. M. Cattelan, S. Masiero, M. Zanchetta, L. Chieco-Bianchi and A. De Rossi (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 modulates telomerase activity in peripheral blood lymphocytes." *J Infect Dis* **183**(3): 417-424.
- Banu, J. (2013). "Causes, consequences, and treatment of osteoporosis in men." *Drug Des Devel Ther* **7**: 849-860.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 868-871.
- Bayreuther, K., H. P. Rodemann, R. Hommel, K. Dittmann, M. Albiez and P. I. Francz (1988). "Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(14): 5112-5116.
- Bazzoli, C., V. Jullien, C. Le Tiec, E. Rey, F. Mentre and A. M. Taburet (2010). "Intracellular Pharmacokinetics of Antiretroviral Drugs in HIV-Infected Patients, and their Correlation with Drug Action." *Clin Pharmacokinet* **49**(1): 17-45.
- Beausejour, C. M., A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S. W. Lowe, P. Yaswen and J. Campisi (2003). "Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways." *EMBO J* **22**(16): 4212-4222.
- Berenbaum, F. (2004). "Signaling transduction: target in osteoarthritis." *Curr Opin Rheumatol* **16**(5): 616-622.
- Bethel, M., B. R. Chitteti, E. F. Srouf and M. A. Kacena (2013). "The changing balance between osteoblastogenesis and adipogenesis in aging and its impact on hematopoiesis." *Curr Osteoporos Rep* **11**(2): 99-106.
- Blackburn, E. H. (2005). "Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions." *FEBS Lett* **579**(4): 859-862.
- Bolland, M. J., T. K. Wang, A. Grey, G. D. Gamble and I. R. Reid (2011). "Stable bone density in HAART-treated individuals with HIV: a meta-analysis." *J Clin Endocrinol Metab* **96**(9): 2721-2731.
- Bonjoch, A., M. Figueras, C. Estany, N. Perez-Alvarez, J. Rosales, L. del Rio, S. di Gregorio, J. Puig, et al. (2010). "High prevalence of and progression to low bone mineral density in HIV-infected patients: a longitudinal cohort study." *AIDS* **24**(18): 2827-2833.
- Bouvin-Pley, M., M. Morgand, A. Moreau, P. Jestin, C. Simonnet, L. Tran, C. Goujard, L. Meyer, et al. (2013). "Evidence for a continuous drift of the HIV-1 species towards higher resistance to neutralizing antibodies over the course of the epidemic." *PLoS Pathog* **9**(7): e1003477.
- Boya, P. (2012). "Lysosomal function and dysfunction: mechanism and disease." *Antioxid Redox Signal* **17**(5): 766-774.
- Boyette, L. B. and R. S. Tuan (2014). "Adult Stem Cells and Diseases of Aging." *J Clin Med* **3**(1): 88-134.
- Boyle, W. J., W. S. Simonet and D. L. Lacey (2003). "Osteoclast differentiation and activation." *Nature* **423**(6937): 337-342.
- Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, et al. (2006). "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection." *Nat Med* **12**(12): 1365-1371.

- Brown, T. T., S. R. Cole, X. Li, L. A. Kingsley, F. J. Palella, S. A. Riddler, B. R. Visscher, J. B. Margolick, et al. (2005). "Antiretroviral therapy and the prevalence and incidence of diabetes mellitus in the multicenter AIDS cohort study." *Arch Intern Med* **165**(10): 1179-1184.
- Brown, T. T., G. A. McComsey, M. S. King, R. B. Qaqish, B. M. Bernstein and B. A. da Silva (2009). "Loss of bone mineral density after antiretroviral therapy initiation, independent of antiretroviral regimen." *J Acquir Immune Defic Syndr* **51**(5): 554-561.
- Brown, T. T. and R. B. Qaqish (2006). "Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review." *AIDS* **20**(17): 2165-2174.
- Brunk, U. T. and A. Terman (2002). "Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function." *Free Radic Biol Med* **33**(5): 611-619.
- Buccigrossi, V., G. Laudiero, E. Nicastro, E. Miele, F. Esposito and A. Guarino (2011). "The HIV-1 transactivator factor (Tat) induces enterocyte apoptosis through a redox-mediated mechanism." *PLoS One* **6**(12): e29436.
- Butler, J. S., E. C. Dunning, D. W. Murray, P. P. Doran and J. M. O'Byrne (2013). "HIV-1 protein induced modulation of primary human osteoblast differentiation and function via a Wnt/beta-catenin-dependent mechanism." *J Orthop Res* **31**(2): 218-226.
- Campbell, G. R. and S. A. Spector (2013). "Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 through autophagy." *Curr Opin Microbiol* **16**(3): 349-354.
- Campisi, J. (1996). "Replicative senescence: an old lives' tale?" *Cell* **84**(4): 497-500.
- Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(9): 729-740.
- Canalis, E. (2013). "Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches." *Nat Rev Endocrinol* **9**(10): 575-583.
- Capeau, J. (2011). "[Premature aging in human immunodeficiency virus (HIV) infected patients: detection, pathophysiological mechanisms and management]." *Bull Acad Natl Med* **195**(9): 2013-2022; discussion 2022-2014.
- Capel, F., V. Rimbart, D. Lioger, A. Diot, P. Rousset, P. P. Mirand, Y. Boirie, B. Morio, et al. (2005). "Due to reverse electron transfer, mitochondrial H₂O₂ release increases with age in human vastus lateralis muscle although oxidative capacity is preserved." *Mech Ageing Dev* **126**(4): 505-511.
- Caplan, A. I. (2007). "Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine." *J Cell Physiol* **213**(2): 341-347.
- Caron, M., M. Auclair, B. Donadille, V. Bereziat, B. Guerci, M. Laville, H. Narbonne, C. Bodemer, et al. (2007). "Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence." *Cell Death Differ* **14**(10): 1759-1767.
- Caron-Debarle, M., C. Lagathu, F. Boccara, C. Vigouroux and J. Capeau (2010). "HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging." *Trends Mol Med* **16**(5): 218-229.
- Chang, E. and C. B. Harley (1995). "Telomere length and replicative aging in human vascular tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11190-11194.
- Chang, H. C., F. Samaniego, B. C. Nair, L. Buonaguro and B. Ensoli (1997). "HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region." *AIDS* **11**(12): 1421-1431.

- Chen, G., C. Deng and Y. P. Li (2012). "TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation." *Int J Biol Sci* **8**(2): 272-288.
- Chen, Q., K. Liu, A. R. Robinson, C. L. Clauson, H. C. Blair, P. D. Robbins, L. J. Niedernhofer and H. Ouyang (2013). "DNA damage drives accelerated bone aging via an NF-kappaB-dependent mechanism." *J Bone Miner Res* **28**(5): 1214-1228.
- Chen, X., H. Liang, H. Van Remmen, J. Vijg and A. Richardson (2004). "Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress." *Arch Biochem Biophys* **422**(2): 197-210.
- Chun, T. W., L. Stuyver, S. B. Mizell, L. A. Ehler, J. A. Mican, M. Baseler, A. L. Lloyd, M. A. Nowak, et al. (1997). "Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24): 13193-13197.
- Chung, H. Y., M. Cesari, S. Anton, E. Marzetti, S. Giovannini, A. Y. Seo, C. Carter, B. P. Yu, et al. (2009). "Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases." *Ageing Res Rev* **8**(1): 18-30.
- Chung, P. L., S. Zhou, B. Eslami, L. Shen, M. S. LeBoff and J. Glowacki (2014). "Effect of age on regulation of human osteoclast differentiation." *J Cell Biochem* **115**(8): 1412-1419.
- Cihlar, T. and A. S. Ray (2010). "Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine." *Antiviral Res* **85**(1): 39-58.
- Clarke, B. (2008). "Normal bone anatomy and physiology." *Clin J Am Soc Nephrol* **3** Suppl 3: S131-139.
- Cocohoba, J. and B. J. Dong (2008). "Raltegravir: the first HIV integrase inhibitor." *Clin Ther* **30**(10): 1747-1765.
- Coffinier, C., S. E. Hudon, E. A. Farber, S. Y. Chang, C. A. Hrycyna, S. G. Young and L. G. Fong (2007). "HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(33): 13432-13437.
- Coffinier, C., S. E. Hudon, R. Lee, E. A. Farber, C. Nobumori, J. H. Miner, D. A. Andres, H. P. Spielmann, et al. (2008). "A potent HIV protease inhibitor, darunavir, does not inhibit ZMPSTE24 or lead to an accumulation of farnesyl-prelamin A in cells." *J Biol Chem* **283**(15): 9797-9804.
- Cogswell, P. C., D. F. Kashatus, J. A. Keifer, D. C. Guttridge, J. Y. Reuther, C. Bristow, S. Roy, D. W. Nicholson, et al. (2003). "NF-kappa B and I kappa B alpha are found in the mitochondria. Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF-kappa B." *J Biol Chem* **278**(5): 2963-2968.
- Coller, H. A. (2007). "What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(8): 667-670.
- Comandini, A., C. Naro, R. Adamo, A. N. Akbar, A. Lanna, E. Bonmassar and O. Franzese (2013). "Molecular mechanisms involved in HIV-1-Tat mediated inhibition of telomerase activity in human CD4(+) T lymphocytes." *Mol Immunol* **54**(2): 181-192.
- Condra, J. H., C. J. Petropoulos, R. Ziermann, W. A. Schleif, M. Shivaprakash and E. A. Emini (2000). "Drug resistance and predicted virologic responses to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor therapy." *J Infect Dis* **182**(3): 758-765.
- Coppede, F. (2013). "The epidemiology of premature aging and associated comorbidities." *Clin Interv Aging* **8**: 1023-1032.
- Corella, D. and J. M. Ordovas (2014). "Ageing and cardiovascular diseases: the role of gene-diet interactions." *Ageing Res Rev*.

- Correia-Melo, C., G. Hewitt and J. F. Passos (2014). "Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence?" Longev Healthspan **3**(1): 1.
- Costagliola, D. (2014). "Demographics of HIV and aging." Curr Opin HIV AIDS **9**(4): 294-301.
- Cotter, E. J., N. Chew, W. G. Powderly and P. P. Doran (2011). "HIV type 1 alters mesenchymal stem cell differentiation potential and cell phenotype ex vivo." AIDS Res Hum Retroviruses **27**(2): 187-199.
- Cotter, E. J., H. S. Ip, W. G. Powderly and P. P. Doran (2008). "Mechanism of HIV protein induced modulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation." BMC Musculoskelet Disord **9**: 33.
- Cotter, E. J., A. P. Malizia, N. Chew, W. G. Powderly and P. P. Doran (2007). "HIV proteins regulate bone marker secretion and transcription factor activity in cultured human osteoblasts with consequent potential implications for osteoblast function and development." AIDS Res Hum Retroviruses **23**(12): 1521-1530.
- Crane, J. L. and X. Cao (2014). "Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF-beta signaling in bone remodeling." J Clin Invest **124**(2): 466-472.
- Cristofalo, V. J. and R. J. Pignolo (1993). "Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture." Physiol Rev **73**(3): 617-638.
- Cummings, S. R. and L. J. Melton (2002). "Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures." Lancet **359**(9319): 1761-1767.
- d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter, et al. (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." Nature **426**(6963): 194-198.
- Dai, D. F., Y. A. Chiao, D. J. Marcinek, H. H. Szeto and P. S. Rabinovitch (2014). "Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan." Longev Healthspan **3**: 6.
- Data Collection on Adverse Events of Anti, H. I. V. d. S. G., C. Smith, C. A. Sabin, J. D. Lundgren, R. Thiebaut, R. Weber, M. Law, A. Monforte, et al. (2010). "Factors associated with specific causes of death amongst HIV-positive individuals in the D:A:D Study." AIDS **24**(10): 1537-1548.
- De Cock, K. M., H. W. Jaffe and J. W. Curran (2012). "The evolving epidemiology of HIV/AIDS." AIDS **26**(10): 1205-1213.
- Debaisieux, S., F. Rayne, H. Yezid and B. Beaumelle (2012). "The ins and outs of HIV-1 Tat." Traffic **13**(3): 355-363.
- Deeks, S. G. and A. N. Phillips (2009). "HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity." BMJ **338**: a3172.
- Deeks, S. G., E. Verdin and J. M. McCune (2012). "Immunosenescence and HIV." Curr Opin Immunol **24**(4): 501-506.
- Denys, K., M. Cankurtaran, W. Janssens and M. Petrovic (2009). "Metabolic syndrome in the elderly: an overview of the evidence." Acta Clin Belg **64**(1): 23-34.
- Desvergne, B. and W. Wahli (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." Endocr Rev **20**(5): 649-688.
- Diaz-Delfin, J., P. Domingo, M. Wabitsch, M. Giralt and F. Villarroya (2012). "HIV-1 Tat protein impairs adipogenesis and induces the expression and secretion of proinflammatory cytokines in human SGBS adipocytes." Antivir Ther **17**(3): 529-540.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-9367.

- Dinkins, C., J. Arko-Mensah and V. Deretic (2010). "Autophagy and HIV." Semin Cell Dev Biol **21**(7): 712-718.
- Dodd, G. D. (1991). "Cancer control and the older person. An overview." Cancer **68**(11 Suppl): 2493-2495.
- Duong, L. T., P. Lakkakorpi, I. Nakamura and G. A. Rodan (2000). "Integrins and signaling in osteoclast function." Matrix Biol **19**(2): 97-105.
- Duvivier, C., S. Kolta, L. Assoumou, J. Ghosn, S. Rozenberg, R. L. Murphy, C. Katlama, D. Costagliola, et al. (2009). "Greater decrease in bone mineral density with protease inhibitor regimens compared with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor regimens in HIV-1 infected naive patients." AIDS **23**(7): 817-824.
- Edgar, A. J., S. L. Dover, M. N. Lodrick, I. J. McKay, F. J. Hughes and W. Turner (2005). "Bone morphogenetic protein-2 induces expression of murine zinc finger transcription factor ZNF450." J Cell Biochem **94**(1): 202-215.
- Effros, R. B., C. V. Fletcher, K. Gebo, J. B. Halter, W. R. Hazzard, F. M. Horne, R. E. Huebner, E. N. Janoff, et al. (2008). "Aging and infectious diseases: workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions." Clin Infect Dis **47**(4): 542-553.
- Egan, D., J. Kim, R. J. Shaw and K. L. Guan (2011). "The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR." Autophagy **7**(6): 643-644.
- Escarcega, R. O., J. J. Franco, B. C. Mani, A. Vyas, E. M. Tedaldi and A. A. Bove (2014). "Cardiovascular disease in patients with chronic human immunodeficiency virus infection." Int J Cardiol **175**(1): 1-7.
- Fabbri, E., Y. An, M. Zoli, E. M. Simonsick, J. M. Guralnik, S. Bandinelli, C. M. Boyd and L. Ferrucci (2014). "Aging and the Burden of Multimorbidity: Associations With Inflammatory and Anabolic Hormonal Biomarkers." J Gerontol A Biol Sci Med Sci.
- Fakhry, M., E. Hamade, B. Badran, R. Buchet and D. Magne (2013). "Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts." World J Stem Cells **5**(4): 136-148.
- Fakruddin, J. M. and J. Laurence (2003). "HIV envelope gp120-mediated regulation of osteoclastogenesis via receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) secretion and its modulation by certain HIV protease inhibitors through interferon-gamma/RANKL cross-talk." J Biol Chem **278**(48): 48251-48258.
- Fakruddin, J. M. and J. Laurence (2005). "HIV-1 Vpr enhances production of receptor of activated NF-kappaB ligand (RANKL) via potentiation of glucocorticoid receptor activity." Arch Virol **150**(1): 67-78.
- Farini, A., C. Sitzia, S. Erratico, M. Meregalli and Y. Torrente (2014). "Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases." Stem Cells Int **2014**: 306573.
- Fauci, A. S. (2003). "HIV and AIDS: 20 years of science." Nat Med **9**(7): 839-843.
- Fernandez-Rivera, J., R. Garcia, F. Lozano, J. Macias, J. A. Garcia-Garcia, J. A. Mira, J. E. Corzo, J. Gomez-Mateos, et al. (2003). "Relationship between low bone mineral density and highly active antiretroviral therapy including protease inhibitors in HIV-infected patients." HIV Clin Trials **4**(5): 337-346.
- Ferri, K. F., E. Jacotot, J. Blanco, J. A. Este and G. Kroemer (2000). "Mitochondrial control of cell death induced by HIV-1-encoded proteins." Ann N Y Acad Sci **926**: 149-164.

- Ferrucci, A., M. R. Nonnemacher and B. Wigdahl (2013). "Extracellular HIV-1 viral protein R affects astrocytic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity and neuronal survival." J Neurovirol **19**(3): 239-253.
- Fillipas, S., S. Tanamas, M. Davies-Tuck, A. Wluka, Y. Wang, A. Holland, C. Cherry and F. Cicuttini (2014). "The relationship between body composition and knee structure in patients with human immunodeficiency virus." Int J STD AIDS.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**(6809): 239-247.
- Fiume, G., E. Vecchio, A. De Laurentiis, F. Trimboli, C. Palmieri, A. Pisano, C. Falcone, M. Pontoriero, et al. (2012). "Human immunodeficiency virus-1 Tat activates NF-kappaB via physical interaction with IkappaB-alpha and p65." Nucleic Acids Res **40**(8): 3548-3562.
- Flores, S. C., J. C. Marecki, K. P. Harper, S. K. Bose, S. K. Nelson and J. M. McCord (1993). "Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 represses expression of manganese superoxide dismutase in HeLa cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(16): 7632-7636.
- Folks, T. M., S. W. Kessler, J. M. Orenstein, J. S. Justement, E. S. Jaffe and A. S. Fauci (1988). "Infection and replication of HIV-1 in purified progenitor cells of normal human bone marrow." Science **242**(4880): 919-922.
- Franceschi, C., M. Capri, D. Monti, S. Giunta, F. Olivieri, F. Sevini, M. P. Panourgia, L. Invidia, et al. (2007). "Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans." Mech Ageing Dev **128**(1): 92-105.
- Frankel, A. D. and C. O. Pabo (1988). "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." Cell **55**(6): 1189-1193.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan and K. S. Lalykina (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.
- Geiger, H., G. de Haan and M. C. Florian (2013). "The ageing haematopoietic stem cell compartment." Nat Rev Immunol **13**(5): 376-389.
- Geyer, M., O. T. Fackler and B. M. Peterlin (2001). "Structure-function relationships in HIV-1 Nef." EMBO Rep **2**(7): 580-585.
- Gibellini, D., M. Borderi, E. De Crignis, R. Cicola, F. Vescini, R. Caudarella, F. Chiodo and M. C. Re (2007). "RANKL/OPG/TRAIL plasma levels and bone mass loss evaluation in antiretroviral naive HIV-1-positive men." J Med Virol **79**(10): 1446-1454.
- Gibellini, D., E. De Crignis, C. Ponti, M. Borderi, A. Clo, A. Miserocchi, P. Viale and M. C. Re (2010). "HIV-1 Tat protein enhances RANKL/M-CSF-mediated osteoclast differentiation." Biochem Biophys Res Commun **401**(3): 429-434.
- Gibellini, D., E. De Crignis, C. Ponti, L. Cimatti, M. Borderi, M. Tschon, R. Giardino and M. C. Re (2008). "HIV-1 triggers apoptosis in primary osteoblasts and HOBIT cells through TNFalpha activation." J Med Virol **80**(9): 1507-1514.
- Gire, V. (2005). "[Senescence: a telomeric limit to immortality or a cellular response to physiologic stresses?]." Med Sci (Paris) **21**(5): 491-497.
- Gire, V., P. Roux, D. Wynford-Thomas, J. M. Brondello and V. Dulic (2004). "DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence." EMBO J **23**(13): 2554-2563.

- Giustina, A., G. Mazziotti and E. Canalis (2008). "Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton." Endocr Rev **29**(5): 535-559.
- Goh, W. C., et al. (2004). "The human immunodeficiency virus Vpr protein binds Cdc25C: implications for G2 arrest." Virology **318**(1): 337-349.
- Goldsmith, T. C. (2004). "Aging as an evolved characteristic - Weismann's theory reconsidered." Med Hypotheses **62**(2): 304-308.
- Goode, A. and R. Layfield (2010). "Recent advances in understanding the molecular basis of Paget disease of bone." J Clin Pathol **63**(3): 199-203.
- Gordon, J. A., C. E. Tye, A. V. Sampaio, T. M. Underhill, G. K. Hunter and H. A. Goldberg (2007). "Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization *in vitro*." Bone **41**(3): 462-473.
- Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf and A. Saxon (1981). "Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency." N Engl J Med **305**(24): 1425-1431.
- Gougeon, M. L. (2003). "Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack." Nat Rev Immunol **3**(5): 392-404.
- Greenblatt, M. B. and J. H. Shim (2013). "Osteoimmunology: a brief introduction." Immune Netw **13**(4): 111-115.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas and H. S. Sul (1998). "Understanding adipocyte differentiation." Physiol Rev **78**(3): 783-809.
- Grewe, B. and K. Uberla (2010). "The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: manage a trois during the early phase of the lentiviral replication cycle." J Gen Virol **91**(Pt 8): 1893-1897.
- Grigsby, I. F., L. Pham, R. Gopalakrishnan, L. M. Mansky and K. C. Mansky (2010). "Downregulation of Gnas, Got2 and Snord32a following tenofovir exposure of primary osteoclasts." Biochem Biophys Res Commun **391**(3): 1324-1329.
- Grigsby, I. F., L. Pham, L. M. Mansky, R. Gopalakrishnan, A. E. Carlson and K. C. Mansky (2010). "Tenofovir treatment of primary osteoblasts alters gene expression profiles: implications for bone mineral density loss." Biochem Biophys Res Commun **394**(1): 48-53.
- Grinker, J. A., K. Tucker, P. S. Vokonas and D. Rush (1995). "Body habitus changes among adult males from the normative aging study: relations to aging, smoking history and alcohol intake." Obes Res **3**(5): 435-446.
- Gruber, R. (2010). "Cell biology of osteoimmunology." Wien Med Wochenschr **160**(17-18): 438-445.
- Grund, B., G. Peng, C. L. Gibert, J. F. Hoy, R. L. Isaksson, J. C. Shlay, E. Martinez, P. Reiss, et al. (2009). "Continuous antiretroviral therapy decreases bone mineral density." AIDS **23**(12): 1519-1529.
- Guaraldi, G., G. Orlando, S. Zona, M. Menozzi, F. Carli, E. Garlassi, A. Berti, E. Rossi, et al. (2011). "Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population." Clin Infect Dis **53**(11): 1120-1126.
- Guaraldi, G., C. Stentarelli, S. Zona, A. Santoro, B. Beghetto, F. Carli, G. Orlando, A. Franceschetto, et al. (2014). "The natural history of HIV-associated lipodystrophy in the changing scenario of HIV infection." HIV Med.
- Guenzel, C. A., C. Herate and S. Benichou (2014). "HIV-1 Vpr-a still "enigmatic multitasker"." Front Microbiol **5**: 127.

- Gundurao Sreekantamurthy, G., N. B. Singh, T. B. Singh, T. S. Singh and K. R. Singh (2014). "Study of Body Composition and Metabolic Parameters in HIV-1 Male Patients." *J Nutr Metab* **2014**: 498497.
- Hale, A. N., D. J. Ledbetter, T. R. Gawriluk and E. B. Rucker, 3rd (2013). "Autophagy: regulation and role in development." *Autophagy* **9**(7): 951-972.
- Hall, J. A., J. E. Dominy, Y. Lee and P. Puigserver (2013). "The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies." *J Clin Invest* **123**(3): 973-979.
- Hansen, J. (1998). "Common cancers in the elderly." *Drugs Aging* **13**(6): 467-478.
- Haqqani, A. A. and J. C. Tilton (2013). "Entry inhibitors and their use in the treatment of HIV-1 infection." *Antiviral Res* **98**(2): 158-170.
- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J Gerontol* **11**(3): 298-300.
- Harris, S. E., L. F. Bonewald, M. A. Harris, M. Sabatini, S. Dallas, J. Q. Feng, N. Ghosh-Choudhury, J. Wozney, et al. (1994). "Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts." *J Bone Miner Res* **9**(6): 855-863.
- Haskelberg, H., A. Carr and S. Emery (2011). "Bone turnover markers in HIV disease." *AIDS Rev* **13**(4): 240-250.
- Hasse, B., B. Ledergerber, H. Furrer, M. Battegay, B. Hirschel, M. Cavassini, B. Bertisch, E. Bernasconi, et al. (2011). "Morbidity and aging in HIV-infected persons: the Swiss HIV cohort study." *Clin Infect Dis* **53**(11): 1130-1139.
- Havens, P. L., C. B. Stephensen, R. Hazra, P. M. Flynn, C. M. Wilson, B. Rutledge, J. Bethel, C. G. Pan, et al. (2012). "Vitamin D3 decreases parathyroid hormone in HIV-infected youth being treated with tenofovir: a randomized, placebo-controlled trial." *Clin Infect Dis* **54**(7): 1013-1025.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." *Exp Cell Res* **25**: 585-621.
- He, J., S. Choe, R. Walker, P. Di Marzio, D. O. Morgan and N. R. Landau (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity." *J Virol* **69**(11): 6705-6711.
- Hediger, M. A., B. Clemencon, R. E. Burrier and E. A. Bruford (2013). "The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction." *Mol Aspects Med* **34**(2-3): 95-107.
- Henneicke, H., S. J. Gasparini, T. C. Brennan-Speranza, H. Zhou and M. J. Seibel (2014). "Glucocorticoids and bone: local effects and systemic implications." *Trends Endocrinol Metab* **25**(4): 197-211.
- Henriksen, K., L. B. Tanko, P. Qvist, P. D. Delmas, C. Christiansen and M. A. Karsdal (2007). "Assessment of osteoclast number and function: application in the development of new and improved treatment modalities for bone diseases." *Osteoporos Int* **18**(5): 681-685.
- Herbein, G., A. Varin, A. Larbi, C. Fortin, U. Mahlknecht, T. Fulop and B. B. Aggarwal (2008). "Nef and TNFalpha are coplayers that favor HIV-1 replication in monocytic cells and primary macrophages." *Curr HIV Res* **6**(2): 117-129.
- Hewitt, G., D. Jurk, F. D. Marques, C. Correia-Melo, T. Hardy, A. Gackowska, R. Anderson, M. Taschuk, et al. (2012). "Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence." *Nat Commun* **3**: 708.

- Hill, M., G. Tachedjian and J. Mak (2005). "The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins." Curr HIV Res **3**(1): 73-85.
- Hotchkiss, G., P. O. Pehrson, S. Larsson, L. Ahrlund-Richter and S. Britton (1999). "Telomere loss in peripheral blood mononuclear cells may be moderately accelerated during highly active antiretroviral therapy (HAART)." J Acquir Immune Defic Syndr **22**(5): 445-452.
- Hoy, J., B. Grund, M. Roediger, K. E. Ensrud, I. Brar, R. Colebunders, N. D. Castro, M. Johnson, et al. (2013). "Interruption or deferral of antiretroviral therapy reduces markers of bone turnover compared with continuous therapy: The SMART body composition substudy." J Bone Miner Res **28**(6): 1264-1274.
- Huang, C. Y., S. F. Chiang, T. Y. Lin, S. H. Chiou and K. C. Chow (2012). "HIV-1 Vpr triggers mitochondrial destruction by impairing Mfn2-mediated ER-mitochondria interaction." PLoS One **7**(3): e33657.
- Huang, T. T., E. J. Carlson, A. M. Gillespie, Y. Shi and C. J. Epstein (2000). "Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **55**(1): B5-9.
- Hui, L., X. Chen, N. J. Haughey and J. D. Geiger (2012). "Role of endolysosomes in HIV-1 Tat-induced neurotoxicity." ASN Neuro **4**(4): 243-252.
- Hukezalie, K. R., N. R. Thumati, H. C. Cote and J. M. Wong (2012). "*In vitro* and ex vivo inhibition of human telomerase by anti-HIV nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) but not by non-NRTIs." PLoS One **7**(11): e47505.
- Infante, A., A. Gago, G. R. de Eguino, T. Calvo-Fernandez, V. Gomez-Vallejo, J. Llop, K. Schlangen, A. Fullaondo, et al. (2014). "Prelamin A accumulation and stress conditions induce impaired Oct-1 activity and autophagy in prematurely aged human mesenchymal stem cell." Aging (Albany NY) **6**(4): 264-280.
- Jackson, J. G. and O. M. Pereira-Smith (2006). "p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts." Cancer Res **66**(17): 8356-8360.
- Jahreiss, L., F. M. Menzies and D. C. Rubinsztein (2008). "The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes." Traffic **9**(4): 574-587.
- Jain, R. G. and J. M. Lenhard (2002). "Select HIV protease inhibitors alter bone and fat metabolism ex vivo." J Biol Chem **277**(22): 19247-19250.
- Jimi, E. and S. Ghosh (2005). "Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone." Immunol Rev **208**: 80-87.
- Joly, V. and P. Yeni (2000). "[Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors]." Ann Med Interne (Paris) **151**(4): 260-267.
- Jung, T., A. Hohn, B. Catalgol and T. Grune (2009). "Age-related differences in oxidative protein-damage in young and senescent fibroblasts." Arch Biochem Biophys **483**(1): 127-135.
- Kaji, H., J. Naito, Y. Inoue, H. Sowa, T. Sugimoto and K. Chihara (2008). "Statin suppresses apoptosis in osteoblastic cells: role of transforming growth factor-beta-Smad3 pathway." Horm Metab Res **40**(11): 746-751.
- Kang, H. T., K. B. Lee, S. Y. Kim, H. R. Choi and S. C. Park (2011). "Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts." PLoS One **6**(8): e23367.

- Karn, J. and C. M. Stoltzfus (2012). "Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(2): a006916.
- Kenyon, C. (2010). "A pathway that links reproductive status to lifespan in *Caenorhabditis elegans*." Ann NY Acad Sci **1204**: 156-162.
- Khosla, S., L. J. Melton, 3rd, S. J. Achenbach, A. L. Oberg and B. L. Riggs (2006). "Hormonal and biochemical determinants of trabecular microstructure at the ultradistal radius in women and men." J Clin Endocrinol Metab **91**(3): 885-891.
- Kim, D. J., A. O. Westfall, E. Chamot, A. L. Willig, M. J. Mugavero, C. Ritchie, G. A. Burkholder, H. M. Crane, et al. (2012). "Multimorbidity patterns in HIV-infected patients: the role of obesity in chronic disease clustering." J Acquir Immune Defic Syndr **61**(5): 600-605.
- Kim, J. B., P. Sarraf, M. Wright, K. M. Yao, E. Mueller, G. Solanes, B. B. Lowell and B. M. Spiegelman (1998). "Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1." J Clin Invest **101**(1): 1-9.
- Kirkwood, T. B. (2005). "Understanding the odd science of aging." Cell **120**(4): 437-447.
- Komori, T., H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R. T. Bronson, et al. (1997). "Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts." Cell **89**(5): 755-764.
- Krishnan, V., T. L. Moore, Y. L. Ma, L. M. Helvering, C. A. Frolik, K. M. Valasek, P. Ducy and A. G. Geiser (2003). "Parathyroid hormone bone anabolic action requires *Cbfa1/Runx2*-dependent signaling." Mol Endocrinol **17**(3): 423-435.
- Krizhanovskiy, V., W. Xue, L. Zender, M. Yon, E. Hernando and S. W. Lowe (2008). "Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **73**: 513-522.
- Kroemer, G., G. Marino and B. Levine (2010). "Autophagy and the integrated stress response." Mol Cell **40**(2): 280-293.
- Krtolica, A., S. Parrinello, S. Lockett, P. Y. Desprez and J. Campisi (2001). "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12072-12077.
- Kuranda, K., J. Vargaftig, P. de la Rochere, C. Dosquet, D. Charron, F. Bardin, C. Tonnelle, D. Bonnet, et al. (2011). "Age-related changes in human hematopoietic stem/progenitor cells." Aging Cell **10**(3): 542-546.
- Kurz, D. J., S. Decary, Y. Hong and J. D. Erusalimsky (2000). "Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells." J Cell Sci **113** (Pt 20): 3613-3622.
- Kutsch, O., J. Oh, A. Nath and E. N. Benveniste (2000). "Induction of the chemokines interleukin-8 and IP-10 by human immunodeficiency virus type 1 tat in astrocytes." J Virol **74**(19): 9214-9221.
- Kwon, H. S., M. M. Brent, R. Getachew, P. Jayakumar, L. F. Chen, M. Schnolzer, M. W. McBurney, R. Marmorstein, et al. (2008). "Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein inhibits the SIRT1 deacetylase and induces T cell hyperactivation." Cell Host Microbe **3**(3): 158-167.
- Labunskyy, V. M. and V. N. Gladyshev (2013). "Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging." Antioxid Redox Signal **19**(12): 1362-1372.

- Lagathu, C., B. Eustace, M. Prot, D. Frantz, Y. Gu, J. P. Bastard, M. Maachi, S. Azoulay, et al. (2007). "Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages." *Antivir Ther* **12**(4): 489-500.
- Lahera, V., M. Goicoechea, S. G. de Vinuesa, M. Miana, N. de las Heras, V. Cachofeiro and J. Luno (2007). "Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins." *Curr Med Chem* **14**(2): 243-248.
- Lake, J. E. and J. S. Currier (2013). "Metabolic disease in HIV infection." *Lancet Infect Dis* **13**(11): 964-975.
- Lamb, C. A., T. Yoshimori and S. A. Tooze (2013). "The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(12): 759-774.
- Landi, A., V. Iannucci, A. V. Nuffel, P. Meuwissen and B. Verhasselt (2011). "One protein to rule them all: modulation of cell surface receptors and molecules by HIV Nef." *Curr HIV Res* **9**(7): 496-504.
- Lanigan, F., J. G. Geraghty and A. P. Bracken (2011). "Transcriptional regulation of cellular senescence." *Oncogene* **30**(26): 2901-2911.
- Lecoeur, H., A. Borgne-Sanchez, O. Chaloin, R. El-Khoury, M. Brabant, A. Langonne, M. Porceddu, J. J. Briere, et al. (2012). "HIV-1 Tat protein directly induces mitochondrial membrane permeabilization and inactivates cytochrome c oxidase." *Cell Death Dis* **3**: e282.
- Lee, H. C., C. M. Chang and C. W. Chi (2010). "Somatic mutations of mitochondrial DNA in aging and cancer progression." *Ageing Res Rev* **9 Suppl 1**: S47-58.
- Lee, Y., J. Jung, K. J. Cho, S. K. Lee, J. W. Park, I. H. Oh and G. J. Kim (2013). "Increased SCF/c-kit by hypoxia promotes autophagy of human placental chorionic plate-derived mesenchymal stem cells via regulating the phosphorylation of mTOR." *J Cell Biochem* **114**(1): 79-88.
- Leeansyah, E., P. U. Cameron, A. Solomon, S. Tennakoon, P. Velayudham, M. Gouillou, T. Spelman, A. Hearps, et al. (2013). "Inhibition of telomerase activity by human immunodeficiency virus (HIV) nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors: a potential factor contributing to HIV-associated accelerated aging." *J Infect Dis* **207**(7): 1157-1165.
- Lefevre, C., M. Auclair, F. Boccara, J. P. Bastard, J. Capeau, C. Vigouroux and M. Caron-Debarle (2010). "Premature senescence of vascular cells is induced by HIV protease inhibitors: implication of prelamin A and reversion by statin." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(12): 2611-2620.
- Lenassi, M., G. Cagney, M. Liao, T. Vaupotic, K. Bartholomeeusen, Y. Cheng, N. J. Krogan, A. Plemenitas, et al. (2010). "HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells." *Traffic* **11**(1): 110-122.
- Levine, B. and G. Kroemer (2008). "Autophagy in the pathogenesis of disease." *Cell* **132**(1): 27-42.
- Lingappa, J. R., J. C. Reed, M. Tanaka, K. Chutiraka and B. A. Robinson (2014). "How HIV-1 Gag assembles in cells: Putting together pieces of the puzzle." *Virus Res*.
- Lionaki, E., M. Markaki and N. Tavernarakis (2013). "Autophagy and ageing: insights from invertebrate model organisms." *Ageing Res Rev* **12**(1): 413-428.
- Liu, C., Z. Wu and H. C. Sun (2009). "The effect of simvastatin on mRNA expression of transforming growth factor-beta1, bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in tooth extraction socket." *Int J Oral Sci* **1**(2): 90-98.
- Liu, F., F. Fang, H. Yuan, D. Yang, Y. Chen, L. Williams, S. A. Goldstein, P. H. Krebsbach, et al. (2013). "Suppression of autophagy by FIP200 deletion leads to osteopenia in mice through the inhibition of osteoblast terminal differentiation." *J Bone Miner Res* **28**(11): 2414-2430.

- Looker, A. C., E. S. Orwoll, C. C. Johnston, Jr., R. L. Lindsay, H. W. Wahner, W. L. Dunn, M. S. Calvo, T. B. Harris, et al. (1997). "Prevalence of low femoral bone density in older U.S. adults from NHANES III." *J Bone Miner Res* **12**(11): 1761-1768.
- Malizia, A. P., E. Cotter, N. Chew, W. G. Powderly and P. P. Doran (2007). "HIV protease inhibitors selectively induce gene expression alterations associated with reduced calcium deposition in primary human osteoblasts." *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**(2): 243-250.
- Mallon, P. W. (2014). "Aging with HIV: osteoporosis and fractures." *Curr Opin HIV AIDS* **9**(4): 428-435.
- Mammucari, C. and R. Rizzuto (2010). "Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging." *Mech Ageing Dev* **131**(7-8): 536-543.
- Mangino, G., Z. A. Percario, G. Fiorucci, G. Vaccari, F. Acconcia, C. Chiarabelli, S. Leone, A. Noto, et al. (2011). "HIV-1 Nef induces proinflammatory state in macrophages through its acidic cluster domain: involvement of TNF alpha receptor associated factor 2." *PLoS One* **6**(8): e22982.
- Mansilla, E., V. Diaz Aquino, D. Zambon, G. H. Marin, K. Martire, G. Roque, T. Ichim, N. H. Riordan, et al. (2011). "Could metabolic syndrome, lipodystrophy, and aging be mesenchymal stem cell exhaustion syndromes?" *Stem Cells Int* **2011**: 943216.
- Marengoni, A., S. Angleman, R. Melis, F. Mangialasche, A. Karp, A. Garmen, B. Meinow and L. Fratiglioni (2011). "Aging with multimorbidity: a systematic review of the literature." *Ageing Res Rev* **10**(4): 430-439.
- Mariappan, N., C. M. Elks, S. Sriramula, A. Guggilam, Z. Liu, O. Borkhsenius and J. Francis (2010). "NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes." *Cardiovasc Res* **85**(3): 473-483.
- Marie, P. J. (2008). "Transcription factors controlling osteoblastogenesis." *Arch Biochem Biophys* **473**(2): 98-105.
- Masanetz, S. and M. H. Lehmann (2011). "HIV-1 Nef increases astrocyte sensitivity towards exogenous hydrogen peroxide." *Virology* **8**: 35.
- Matsubara, T., K. Kida, A. Yamaguchi, K. Hata, F. Ichida, H. Meguro, H. Aburatani, R. Nishimura, et al. (2008). "BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation." *J Biol Chem* **283**(43): 29119-29125.
- Matsumura, T., Z. Zerrudo and L. Hayflick (1979). "Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology." *J Gerontol* **34**(3): 328-334.
- Maynard, S., S. H. Schurman, C. Harboe, N. C. de Souza-Pinto and V. A. Bohr (2009). "Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging." *Carcinogenesis* **30**(1): 2-10.
- McCarthy, T. L., W. Z. Chang, Y. Liu and M. Centrella (2003). "Runx2 integrates estrogen activity in osteoblasts." *J Biol Chem* **278**(44): 43121-43129.
- McCauley, L. K. (2010). "c-Maf and you won't see fat." *J Clin Invest* **120**(10): 3440-3442.
- McComsey, G. A., D. Kitch, E. S. Daar, C. Tierney, N. C. Jahed, P. Tebas, L. Myers, K. Melbourne, et al. (2011). "Bone mineral density and fractures in antiretroviral-naive persons randomized to receive abacavir-lamivudine or tenofovir disoproxil fumarate-emtricitabine along with efavirenz or atazanavir-ritonavir: Aids Clinical Trials Group A5224s, a substudy of ACTG A5202." *J Infect Dis* **203**(12): 1791-1801.

- McDermott, A. Y., A. Shevitz, T. Knox, R. Roubenoff, J. Kehayias and S. Gorbach (2001). "Effect of highly active antiretroviral therapy on fat, lean, and bone mass in HIV-seropositive men and women." Am J Clin Nutr **74**(5): 679-686.
- Mellert, W., A. Kleinschmidt, J. Schmidt, H. Festl, S. Emler, W. K. Roth and V. Erfle (1990). "Infection of human fibroblasts and osteoblast-like cells with HIV-1." AIDS **4**(6): 527-535.
- Merideth, M. A., L. B. Gordon, S. Clauss, V. Sachdev, A. C. Smith, M. B. Perry, C. C. Brewer, C. Zalewski, et al. (2008). "Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome." N Engl J Med **358**(6): 592-604.
- Metifiot, M., C. Marchand and Y. Pommier (2013). "HIV integrase inhibitors: 20-year landmark and challenges." Adv Pharmacol **67**: 75-105.
- Meynard, J. L., A. L. Tomi, J. Sellam, K. Lacombe, F. Berenbaum and P. M. Girard (2014). "[In Process Citation]." Med Mal Infect **44**(6 Suppl): 91.
- Michaud, V., T. Bar-Magen, J. Turgeon, D. Flockhart, Z. Desta and M. A. Wainberg (2012). "The dual role of pharmacogenetics in HIV treatment: mutations and polymorphisms regulating antiretroviral drug resistance and disposition." Pharmacol Rev **64**(3): 803-833.
- Misteli, T. and P. Scaffidi (2005). "Genome instability in progeria: when repair gets old." Nat Med **11**(7): 718-719.
- Mizushima, N. and M. Komatsu (2011). "Autophagy: renovation of cells and tissues." Cell **147**(4): 728-741.
- Mizushima, N., B. Levine, A. M. Cuervo and D. J. Klionsky (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." Nature **451**(7182): 1069-1075.
- Moon, H. S. and J. S. Yang (2006). "Role of HIV Vpr as a regulator of apoptosis and an effector on bystander cells." Mol Cells **21**(1): 7-20.
- Moore, A. L., A. Vashisht, C. A. Sabin, A. Mocroft, S. Madge, A. N. Phillips, J. W. Studd and M. A. Johnson (2001). "Reduced bone mineral density in HIV-positive individuals." AIDS **15**(13): 1731-1733.
- Morrison, S. J. and D. T. Scadden (2014). "The bone marrow niche for haematopoietic stem cells." Nature **505**(7483): 327-334.
- Moyle, G. (2001). "Use of HIV protease inhibitors as pharmacoenhancers." AIDS Read **11**(2): 87-98; quiz 107-108.
- Mundy, G., R. Garrett, S. Harris, J. Chan, D. Chen, G. Rossini, B. Boyce, M. Zhao, et al. (1999). "Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins." Science **286**(5446): 1946-1949.
- Nacher, M., S. Serrano, A. Gonzalez, A. Hernandez, M. L. Marinoso, R. Vilella, P. Hinarejos, A. Diez, et al. (2001). "Osteoblasts in HIV-infected patients: HIV-1 infection and cell function." AIDS **15**(17): 2239-2243.
- Nakashima, K., X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J. M. Deng, R. R. Behringer and B. de Crombrughe (2002). "The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation." Cell **108**(1): 17-29.
- Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon, et al. (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." Cell **113**(6): 703-716.
- Nielsen, M. H., F. S. Pedersen and J. Kjems (2005). "Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication." Retrovirology **2**: 10.

- North, B. J. and D. A. Sinclair (2012). "The intersection between aging and cardiovascular disease." Circ Res **110**(8): 1097-1108.
- Oforokun, I., E. McIntosh and M. N. Weitzmann (2012). "HIV: inflammation and bone." Curr HIV/AIDS Rep **9**(1): 16-25.
- Oh, S. K., W. W. Cruikshank, J. Raina, G. C. Blanchard, W. H. Adler, J. Walker and H. Kornfeld (1992). "Identification of HIV-1 envelope glycoprotein in the serum of AIDS and ARC patients." J Acquir Immune Defic Syndr **5**(3): 251-256.
- Oliver, L., E. Hue, M. Priault and F. M. Vallette (2012). "Basal autophagy decreased during the differentiation of human adult mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev **21**(15): 2779-2788.
- Orjalo, A. V., D. Bhaumik, B. K. Gengler, G. K. Scott and J. Campisi (2009). "Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(40): 17031-17036.
- Pang, X., Z. Liu and G. Zhai (2014). "Advances in non-peptidomimetic HIV protease inhibitors." Curr Med Chem **21**(17): 1997-2011.
- Pathai, S., H. Bajillan, A. L. Landay and K. P. High (2014). "Is HIV a model of accelerated or accentuated aging?" J Gerontol A Biol Sci Med Sci **69**(7): 833-842.
- Payne, B. A., I. J. Wilson, C. A. Hateley, R. Horvath, M. Santibanez-Koref, D. C. Samuels, D. A. Price and P. F. Chinnery (2011). "Mitochondrial aging is accelerated by anti-retroviral therapy through the clonal expansion of mtDNA mutations." Nat Genet **43**(8): 806-810.
- Perl, A. and K. Banki (2000). "Genetic and metabolic control of the mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate production in HIV disease." Antioxid Redox Signal **2**(3): 551-573.
- Permpalung, N., P. Ungprasert, S. Summachiwakij, N. Leeaphorn and E. L. Knight (2014). "Protease inhibitors and avascular necrosis: A systematic review and meta-analysis." Int J Antimicrob Agents **44**(2): 93-95.
- Perry, S. W., J. P. Norman, A. Litzburg, D. Zhang, S. Dewhurst and H. A. Gelbard (2005). "HIV-1 transactivator of transcription protein induces mitochondrial hyperpolarization and synaptic stress leading to apoptosis." J Immunol **174**(7): 4333-4344.
- Platt, F. M., B. Boland and A. C. van der Spoel (2012). "The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction." J Cell Biol **199**(5): 723-734.
- Popovic, M., K. Tenner-Racz, C. Pelsler, H. J. Stellbrink, J. van Lunzen, G. Lewis, V. S. Kalyanaraman, R. C. Gallo, et al. (2005). "Persistence of HIV-1 structural proteins and glycoproteins in lymph nodes of patients under highly active antiretroviral therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(41): 14807-14812.
- Price, J. S., J. G. Waters, C. Darrah, C. Pennington, D. R. Edwards, S. T. Donnell and I. M. Clark (2002). "The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis." Aging Cell **1**(1): 57-65.
- Price, T. O., N. Ercal, R. Nakaoke and W. A. Banks (2005). "HIV-1 viral proteins gp120 and Tat induce oxidative stress in brain endothelial cells." Brain Res **1045**(1-2): 57-63.
- Pugliese, A., V. Vidotto, T. Beltramo, S. Petrini and D. Torre (2005). "A review of HIV-1 Tat protein biological effects." Cell Biochem Funct **23**(4): 223-227.
- Quist-Paulsen, P. (2010). "Statins and inflammation: an update." Curr Opin Cardiol **25**(4): 399-405.
- Rambaut, A., D. Posada, K. A. Crandall and E. C. Holmes (2004). "The causes and consequences of HIV evolution." Nat Rev Genet **5**(1): 52-61.

- Ran, Q., H. Liang, Y. Ikeno, W. Qi, T. A. Prolla, L. J. Roberts, 2nd, N. Wolf, H. Van Remmen, et al. (2007). "Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **62**(9): 932-942.
- Raymond, A. D., T. C. Campbell-Sims, M. Khan, M. Lang, M. B. Huang, V. C. Bond and M. D. Powell (2011). "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 **27**(2): 167-178.
- Reddel, R. R. (1998). "Genes involved in the control of cellular proliferative potential." Ann N Y Acad Sci **854**: 8-19.
- Reynoso, R., M. Wieser, D. Ojeda, M. Bonisch, H. Kuhnel, F. Bolcic, H. Quendler, J. Grillari, et al. (2012). "HIV-1 induces telomerase activity in monocyte-derived macrophages, possibly safeguarding one of its reservoirs." J Virol **86**(19): 10327-10337.
- Robubi, A., C. Berger, M. Schmid, K. R. Huber, A. Engel and W. Krugluger (2014). "Gene expression profiles induced by growth factors in *in vitro* cultured osteoblasts." Bone Joint Res **3**(7): 236-240.
- Rodier, F. and J. Campisi (2011). "Four faces of cellular senescence." J Cell Biol **192**(4): 547-556.
- Rolston, K. V. and G. P. Bodey (1986). "Acquired immunodeficiency syndrome." Semin Surg Oncol **2**(2): 53-71.
- Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2006). "Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis." Nature **444**(7121): 847-853.
- Rubinsztein, D. C., G. Marino and G. Kroemer (2011). "Autophagy and aging." Cell **146**(5): 682-695.
- Ryoo, H. M., M. H. Lee and Y. J. Kim (2006). "Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells." Gene **366**(1): 51-57.
- Sadie-Van Gijsen, H., F. S. Hough and W. F. Ferris (2013). "Determinants of bone marrow adiposity: the modulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 activity as a central mechanism." Bone **56**(2): 255-265.
- Sadowska, A. M., Y. K. B. Manuel and W. A. De Backer (2007). "Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant *in vitro* and *in vivo* dose-effects: a review." Pulm Pharmacol Ther **20**(1): 9-22.
- Santiago, F., J. Oguma, A. M. Brown and J. Laurence (2012). "Noncanonical Wnt signaling promotes osteoclast differentiation and is facilitated by the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir." Biochem Biophys Res Commun **417**(1): 223-230.
- Sarkar, R., D. Mitra and S. Chakrabarti (2013). "HIV-1 gp120 protein downregulates Nef induced IL-6 release in immature dendritic cells through interplay of DC-SIGN." PLoS One **8**(3): e59073.
- Scaffidi, P. and T. Misteli (2008). "Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing." Nat Cell Biol **10**(4): 452-459.
- Schipani, E. and H. M. Kronenberg (2008). Adult mesenchymal stem cells. StemBook. Cambridge (MA).
- Schriner, S. E., N. J. Linford, G. M. Martin, P. Treuting, C. E. Ogburn, M. Emond, P. E. Coskun, W. Ladiges, et al. (2005). "Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria." Science **308**(5730): 1909-1911.
- Sciarretta, S., P. Zhai, M. Volpe and J. Sadoshima (2012). "Pharmacological modulation of autophagy during cardiac stress." J Cardiovasc Pharmacol **60**(3): 235-241.
- Seeman, E. (2013). "Age- and menopause-related bone loss compromise cortical and trabecular microstructure." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **68**(10): 1218-1225.

- Seibel, M. J. (2005). "Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability." Clin Biochem Rev **26**(4): 97-122.
- Serakinci, N., J. Graakjaer and S. Kolvraa (2008). "Telomere stability and telomerase in mesenchymal stem cells." Biochimie **90**(1): 33-40.
- Serrano-Villar, S., S. Moreno, M. Fuentes-Ferrer, C. Sanchez-Marcos, M. Avila, T. Sainz, N. G. de Villar, A. Fernandez-Cruz, et al. (2014). "The CD4:CD8 ratio is associated with markers of age-associated disease in virally suppressed HIV-infected patients with immunological recovery." HIV Med **15**(1): 40-49.
- Sethe, S., A. Scutt and A. Stolzing (2006). "Aging of mesenchymal stem cells." Ageing Res Rev **5**(1): 91-116.
- Shedlock, D. J., D. Hwang, A. Y. Choo, C. W. Chung, K. Muthumani and D. B. Weiner (2008). "HIV-1 viral genes and mitochondrial apoptosis." Apoptosis **13**(9): 1088-1099.
- Sherwood, S. W., D. Rush, J. L. Ellsworth and R. T. Schimke (1988). "Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 9086-9090.
- Shoji-Kawata, S., R. Sumpter, M. Leveno, G. R. Campbell, Z. Zou, L. Kinch, A. D. Wilkins, Q. Sun, et al. (2013). "Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide." Nature **494**(7436): 201-206.
- Shrestha, S., M. R. Irvin, C. Grunfeld and D. K. Arnett (2014). "HIV, inflammation, and calcium in atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(2): 244-250.
- Simon, H. U., A. Haj-Yehia and F. Levi-Schaffer (2000). "Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction." Apoptosis **5**(5): 415-418.
- Simon, V. and D. D. Ho (2003). "HIV-1 dynamics *in vivo*: implications for therapy." Nat Rev Microbiol **1**(3): 181-190.
- Sims, N. A. and T. J. Martin (2014). "Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit." Bonekey Rep **3**: 481.
- Singla, S. and J. R. Jacobson (2012). "Statins as a novel therapeutic strategy in acute lung injury." Pulm Circ **2**(4): 397-406.
- Smas, C. M. and H. S. Sul (1995). "Control of adipocyte differentiation." Biochem J **309** (Pt 3): 697-710.
- Smith, J. R. and O. M. Pereira-Smith (1996). "Replicative senescence: implications for *in vivo* aging and tumor suppression." Science **273**(5271): 63-67.
- Spiegelman, B. M. (1998). "PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor." Diabetes **47**(4): 507-514.
- Squier, T. C. (2001). "Oxidative stress and protein aggregation during biological aging." Exp Gerontol **36**(9): 1539-1550.
- Stein, B. and M. X. Yang (1995). "Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta." Mol Cell Biol **15**(9): 4971-4979.
- Stellbrink, H. J., C. Orkin, J. R. Arribas, J. Compston, J. Gerstoft, E. Van Wijngaerden, A. Lazzarin, G. Rizzardini, et al. (2010). "Comparison of changes in bone density and turnover with abacavir-lamivudine versus tenofovir-emtricitabine in HIV-infected adults: 48-week results from the ASSERT study." Clin Infect Dis **51**(8): 963-972.
- Stessman, J. and J. M. Jacobs (2014). "Diabetes Mellitus, Physical Activity, and Longevity Between the Ages of 70 and 90." J Am Geriatr Soc.

- Stolzinger, A. and A. Scutt (2006). "Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function." *Aging Cell* **5**(3): 213-224.
- Stone, B., D. Dockrell, C. Bowman and E. McCloskey (2010). "HIV and bone disease." *Arch Biochem Biophys* **503**(1): 66-77.
- Strebel, K. (2013). "HIV accessory proteins versus host restriction factors." *Curr Opin Virol* **3**(6): 692-699.
- Swanson, C. M. and M. H. Malim (2008). "SnapShot: HIV-1 proteins." *Cell* **133**(4): 742, 742 e741.
- Taichman, R. S. (2005). "Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche." *Blood* **105**(7): 2631-2639.
- Takazawa, Y., K. Tsuji, A. Nifuji, H. Kurosawa, Y. Ito and M. Noda (2000). "An osteogenesis-related transcription factor, core-binding factor A1, is constitutively expressed in the chondrocytic cell line TC6, and its expression is upregulated by bone morphogenetic protein-2." *J Endocrinol* **165**(3): 579-586.
- Tebas, P., W. G. Powderly, S. Claxton, D. Marin, W. Tantisriwat, S. L. Teitelbaum and K. E. Yarasheski (2000). "Accelerated bone mineral loss in HIV-infected patients receiving potent antiretroviral therapy." *AIDS* **14**(4): F63-67.
- Thakur, B. K., A. Chandra, T. Dittrich, K. Welte and P. Chandra (2012). "Inhibition of SIRT1 by HIV-1 viral protein Tat results in activation of p53 pathway." *Biochem Biophys Res Commun* **424**(2): 245-250.
- Tilstra, J. S., C. L. Clauson, L. J. Niedernhofer and P. D. Robbins (2011). "NF-kappaB in Aging and Disease." *Aging Dis* **2**(6): 449-465.
- Tilstra, J. S., A. R. Robinson, J. Wang, S. Q. Gregg, C. L. Clauson, D. P. Reay, L. A. Nasto, C. M. St Croix, et al. (2012). "NF-kappaB inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice." *J Clin Invest* **122**(7): 2601-2612.
- Tontonoz, P., J. B. Kim, R. A. Graves and B. M. Spiegelman (1993). "ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation." *Mol Cell Biol* **13**(8): 4753-4759.
- Torres, R. A. and W. Lewis (2014). "Aging and HIV/AIDS: pathogenetic role of therapeutic side effects." *Lab Invest* **94**(2): 120-128.
- Tsartsalis, A. N., C. Dokos, G. D. Kaiafa, D. N. Tsartsalis, A. Kattamis, A. I. Hatzitolios and C. G. Savopoulos (2012). "Statins, bone formation and osteoporosis: hope or hype?" *Hormones (Athens)* **11**(2): 126-139.
- van de Peppel, J. and J. P. van Leeuwen (2014). "Vitamin D and gene networks in human osteoblasts." *Front Physiol* **5**: 137.
- van der Valk, M., M. Casula, G. J. Weverlingz, K. van Kuijk, B. van Eck-Smit, H. J. Hulsebosch, P. Nieuwkerk, A. van Eeden, et al. (2004). "Prevalence of lipodystrophy and mitochondrial DNA content of blood and subcutaneous fat in HIV-1-infected patients randomly allocated to zidovudine- or stavudine-based therapy." *Antivir Ther* **9**(3): 385-393.
- Van Remmen, H., Y. Ikeno, M. Hamilton, M. Pahlavani, N. Wolf, S. R. Thorpe, N. L. Alderson, J. W. Baynes, et al. (2003). "Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging." *Physiol Genomics* **16**(1): 29-37.

- Vasto, S., G. Candore, C. R. Balistreri, M. Caruso, G. Colonna-Romano, M. P. Grimaldi, F. Listi, D. Nuzzo, et al. (2007). "Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity." Mech Ageing Dev **128**(1): 83-91.
- Vermeire, J., G. Vanbillemont, W. Witkowski and B. Verhasselt (2011). "The Nef-infectivity enigma: mechanisms of enhanced lentiviral infection." Curr HIV Res **9**(7): 474-489.
- Vigouroux, C., M. Auclair, E. Dubosclard, M. Pouchelet, J. Capeau, J. C. Courvalin and B. Buendia (2001). "Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene." J Cell Sci **114**(Pt 24): 4459-4468.
- Vigouroux, C., J. P. Bastard and J. Capeau (2014). "Emerging clinical issues related to management of multiorgan comorbidities and polypharmacy." Curr Opin HIV AIDS **9**(4): 371-378.
- Vina, J., C. Borras and J. Miquel (2007). "Theories of ageing." IUBMB Life **59**(4-5): 249-254.
- Wang, C. and R. J. Youle (2009). "The role of mitochondria in apoptosis*." Annu Rev Genet **43**: 95-118.
- Wang, H., P. Zhang, L. Liu and L. Zou (2013). "Hierarchical organization and regulation of the hematopoietic stem cell osteoblastic niche." Crit Rev Oncol Hematol **85**(1): 1-8.
- Wang, K. and D. J. Klionsky (2011). "Mitochondria removal by autophagy." Autophagy **7**(3): 297-300.
- Wang, L., D. Mondal, V. F. La Russa and K. C. Agrawal (2002). "Suppression of clonogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by HIV type 1: putative role of HIV type 1 tat protein and inflammatory cytokines." AIDS Res Hum Retroviruses **18**(13): 917-931.
- Wattamwar, P. P., S. S. Hardas, D. A. Butterfield, K. W. Anderson and T. D. Dziubla (2011). "Tuning of the pro-oxidant and antioxidant activity of trolox through the controlled release from biodegradable poly(trolox ester) polymers." J Biomed Mater Res A **99**(2): 184-191.
- Wei, W., W. A. Jobling, W. Chen, W. C. Hahn and J. M. Sedivy (2003). "Abolition of cyclin-dependent kinase inhibitor p16Ink4a and p21Cip1/Waf1 functions permits Ras-induced anchorage-independent growth in telomerase-immortalized human fibroblasts." Mol Cell Biol **23**(8): 2859-2870.
- Weiss, R. A. (2008). "Special anniversary review: twenty-five years of human immunodeficiency virus research: successes and challenges." Clin Exp Immunol **152**(2): 201-210.
- Westendorp, M. O., V. A. Shatrov, K. Schulze-Osthoff, R. Frank, M. Kraft, M. Los, P. H. Krammer, W. Droge, et al. (1995). "HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state." EMBO J **14**(3): 546-554.
- Wilen, C. B., J. C. Tilton and R. W. Doms (2012). "HIV: cell binding and entry." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(8).
- Winston, A. and M. Boffito (2005). "The management of HIV-1 protease inhibitor pharmacokinetic interactions." J Antimicrob Chemother **56**(1): 1-5.
- Worman, H. J. (2012). "Nuclear lamins and laminopathies." J Pathol **226**(2): 316-325.
- Wu, D., Z. Ren, M. Pae, W. Guo, X. Cui, A. H. Merrill and S. N. Meydani (2007). "Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue." J Immunol **179**(7): 4829-4839.
- Xian, L., X. Wu, L. Pang, M. Lou, C. J. Rosen, T. Qiu, J. Crane, F. Frassica, et al. (2012). "Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells." Nat Med **18**(7): 1095-1101.
- Yancik, R. (1997). "Cancer burden in the aged: an epidemiologic and demographic overview." Cancer **80**(7): 1273-1283.
- Yin, T. and L. Li (2006). "The stem cell niches in bone." J Clin Invest **116**(5): 1195-1201.

- Zaikos, T. D. and K. L. Collins (2014). "Long-lived reservoirs of HIV-1." Trends Microbiol **22**(4): 173-175.
- Zhang, J. and C. S. Crumpacker (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients receiving prolonged highly active antiretroviral therapy." J Infect Dis **184**(10): 1341-1344.
- Zhang, Y., D. Khan, J. Delling and E. Tobiasch (2012). "Mechanisms underlying the osteo- and adipodifferentiation of human mesenchymal stem cells." ScientificWorldJournal **2012**: 793823.
- Zhang, Y., M. Wang, H. Li, H. Zhang, Y. Shi, F. Wei, D. Liu, K. Liu, et al. (2012). "Accumulation of nuclear and mitochondrial DNA damage in the frontal cortex cells of patients with HIV-associated neurocognitive disorders." Brain Res **1458**: 1-11.
- Zunino, S. J., J. M. Ducore and D. H. Storms (2007). "Parthenolide induces significant apoptosis and production of reactive oxygen species in high-risk pre-B leukemia cells." Cancer Lett **254**(1): 119-127.

Résumé

Les patients infectés par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) traités par les antirétroviraux (ARV) ont aujourd'hui une espérance de vie quasi normale. Cependant, ils présentent une augmentation de la prévalence de pathologies classiquement associées au vieillissement, dont l'ostéoporose, suggérant un vieillissement prématuré ou accentué. Les facteurs impliqués sont, entre autres, l'infection par le VIH, les ARV et un état d'inflammation chronique. L'ostéoporose correspond à une déminéralisation, suite à un déséquilibre entre formation (ostéoblastes) et résorption osseuse (ostéoclastes). L'infection par le VIH et les ARV, en particulier les inhibiteurs de protéase (PI), augmentent la prévalence de l'ostéoporose.

Dans ce contexte, je me suis intéressée à l'effet de certaines protéines du VIH et PI sur les précurseurs ostéoblastiques, les cellules souches mésenchymateuses (MSC). Nous montrons que deux protéines du VIH, Tat et Nef, induisent une sénescence prématurée des MSC, associée à un stress oxydant et in fine à un défaut de différenciation en ostéoblastes. Les effets de Tat sont médiés par le facteur pro-inflammatoire et pro-sénescence NF- κ B, et ceux de Nef sont liés à une inhibition de l'autophagie. Nous montrons également que les PI atazanavir et lopinavir associés au ritonavir induisent une sénescence et un stress oxydant du fait de l'accumulation de prélamine A farnésylée toxique conduisant à un déficit de la différenciation ostéoblastique.

Ces travaux montrent que le VIH et certains PI peuvent jouer un rôle délétère sur les MSC, et mettent en lumière certains des mécanismes impliqués dans le vieillissement des patients infectés par le VIH et traités.

Mots clefs : protéines du VIH, inhibiteurs de la protéase du VIH, cellules souches mésenchymateuses, sénescence, différenciation ostéoblastique.

Summary

The efficacy of highly active antiretroviral treatment (ARV) has resulted in a considerable improvement in the life expectancy of HIV (Human Immunodeficiency Virus)-infected patients. However, many patients encounter the early occurrence of several common age-related comorbidities, such as osteoporosis, stressing for a premature or accentuated aging process. Proposed pathogenic mechanisms include HIV infection, ARV treatment and chronic inflammation. Osteoporosis is defined by a decrease in bone mineral density, resulting from the alteration of the balance between bone formation (osteoblasts) and resorption (osteoclasts). HIV infection, through the bystander effect of HIV secreted proteins, and ARV, particularly protease inhibitors (PI) increase the prevalence of osteoporosis.

Our studies focused on the capacity of some HIV proteins, and of some PI to alter osteoblast precursors, namely mesenchymal stem cells (MSC). We showed that two HIV proteins, Tat and Nef, induced premature senescence of MSC, associated with an oxidative stress and a decreased osteoblastic differentiation potential. Tat triggered senescence via NF- κ B activation, whereas the effect of Nef was linked to the inhibition of autophagy. We also showed that the PI, atazanavir and lopinavir boosted with ritonavir, induced senescence and oxidative stress through the accumulation of toxic farnesylated prelamin A, thus leading to a decreased osteoblastic differentiation.

Overall, these data show that some HIV proteins and some PI can exert deleterious effects on MSC, resulting in senescence, and highlight several mechanisms which could be involved in the aging process of ART-controlled HIV infected patients.

Key words : HIV proteins, HIV protease inhibitors, mesenchymal stem cells, senescence, osteoblastic differentiation.