

Université de Montréal

Rôle de l'IL-32 dans l'inflammation chronique, la sénescence et le dysfonctionnement cellulaire  
lié aux maladies cardiovasculaires chez les personnes vivant avec le VIH-1

*Par*

Bunet Rémi

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Université de Montréal

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor  
en virologie/immunologie

Décembre 2023

© Bunet, 2023

Université de Montréal

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal

*Cette thèse intitulé(e)*

**Rôle de l'IL-32 dans l'inflammation chronique, la sénescence et le dysfonctionnement cellulaire lié aux maladies cardiovasculaires chez les personnes vivant avec le VIH-1**

*Présenté par*

**Rémi Bunet**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Nathalie Arbour**  
Président-rapporteur

**Cécile Tremblay**  
Directrice de recherche

**Mohamed El-Far**  
Codirecteur

**Nathalie Labrecque**  
Membre du jury

**Stéphanie Lehoux**  
Examineur externe

## Résumé

L'épidémie causée par le virus du VIH-1 touche actuellement 38,4 millions de personnes dans le monde dont environ 63000 au Canada. Depuis 1996 et la mise en pratique de la thérapie antirétrovirale combinée, l'espérance de vie des personnes vivant avec le VIH a augmenté significativement jusqu'à s'approcher de celle de la population générale. Actuellement, 10% des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) dans le monde ont plus de 50 ans et ce chiffre augmente à 50% pour les États-Unis et le Canada. Cette population vieillissante avec le VIH est exposée à un risque plus élevé de développer des comorbidités associées à l'infection chronique. Le développement de meilleures méthodes de gestion des comorbidités est nécessaire afin d'améliorer la qualité de vie des personnes vieillissant avec le VIH. Cela passe notamment par une meilleure connaissance des processus inflammatoires impliqués, la recherche de biomarqueurs et de cibles thérapeutiques.

Nous nous sommes intéressés à l'interleukine-32, une cytokine pro-inflammatoire exprimée en de multiples isoformes et dont l'expression est augmentée dans le sang des PVVIH. Nous avons remarqué que les isoformes d'IL-32 $\beta$  et  $\gamma$  diminuaient l'expression du CD96 à la surface des cellules TCD8<sup>+</sup>. Nous avons déterminé que la perte de son expression était associée avec une diminution de l'expression de CD28 et CD27 et une augmentation de l'expression de CD57. Les cellules TCD8<sup>+</sup> exprimant peu de CD96 avaient une diminution de leur capacité de prolifération et les cellules TCD8<sup>+</sup> spécifiques au VIH exprimant peu de CD96 répondaient moins efficacement aux peptides du VIH. Nos résultats indiquent que le CD96 est un marqueur des cellules compétentes contre le VIH et que la perte de son expression peut être utilisée comme un marqueur de la dysfonction et de la sénescence des cellules TCD8<sup>+</sup>.

Nous avons ensuite étudié le rôle de l'IL-32 dans le développement des maladies cardiovasculaires *via* son impact sur les cellules endothéliales de l'artère coronaire. Nous avons pu montrer que les isoformes de l'IL-32  $\beta$  et  $\gamma$  ont un impact partiel sur la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales. Cependant, ces isoformes d'IL-32 augmentent l'expression des molécules d'adhérence et la production des chimiokines par les cellules endothéliales. Nous avons déterminé que ces isoformes induisent la dysfonction cellulaire et contribuent au recrutement des monocytes et à leur transmigration. Nous avons également déterminé que l'expression des isoformes d'IL-32 corrèle avec la rigidité artérielle de

la carotide autant chez les personnes vivant avec le VIH que dans la population générale. Ces résultats suggèrent qu'IL-32 pourrait constituer une cible thérapeutique pour atténuer l'inflammation chronique, la sénescence cellulaire et la dysfonction cellulaire associés au développement des maladies cardiovasculaires.

Enfin nous nous sommes intéressés à l'utilisation des acides gras à chaîne courte dans la réduction de l'inflammation des cellules endothéliales. Nous avons découvert que plusieurs acides gras à chaîne courte ont le potentiel de diminuer les signes de dysfonction des cellules endothéliales comme l'expression de leurs molécules d'adhérence et leur sécrétion de cytokines et de chimiokines après stimulation par les isoformes d'IL-32 $\beta$  et  $\gamma$ .

**Mots-clés :** VIH-1, Inflammation, Maladies cardiovasculaires, dysfonction endothéliale, IL-32, CD96, Athérosclérose



## Abstract

As of 2023, the HIV-1 epidemic is affecting 38,4 million people worldwide and 63000 in Canada. Since 1996, introduction of the combined antiretroviral therapy led to a very impressive increase in the lifespan of PLWH, which approaches the general population. Currently, 10% of PLWH are over the age of 50 years worldwide and this number is increased to 50% in the US and Canada. This aging population of PLWH is exposed to an increased prevalence of comorbidities associated with the chronic infection on top of the normal age-associated co-morbidities. Thus, improving the management of comorbidities is mandatory to improve quality of life of PLWH. This can be achieved by a better understanding of the inflammatory process involved along with the discovery of new biomarkers of disease progression and identifying new therapeutic targets.

To this end, we got interested in interleukine-32 (IL-32), a pro-inflammatory cytokine expressed in multiple isoforms and upregulated in the blood of PLWH and is associated with disease progression in PLWH. We discovered that IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  decreases the expression of CD96, a transmembrane glycoprotein receptor, at the surface of CD8 T cells. We determined that the loss of CD96 expression was associated with a senescence phenotype translated by the reduction in the expression of CD27 and CD28 and an upregulation in the expression of CD57. CD8<sup>+</sup> T cells expressing low CD96 had their proliferative capabilities altered and responded poorly to HIV-1 antigen recall. Our results suggest that CD96 is a biomarker for competent CD8<sup>+</sup> T cells in the context of HIV-1 infection and that its decreased expression by IL-32-mediated mechanisms may lead to CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction and senescence. These mechanisms are likely to contribute to the persistent inflammation and its associated comorbidities in the aging population of PLWH.

We then investigated the role of IL-32 in the development of cardiovascular diseases by looking at its impact on coronary artery endothelial cells (CAEC). We observed that IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  have a partial impact on CAEC cytokine production. However, these isoforms increased the expression of adhesion molecules and production of chemokines involved in leukocyte recruitment by the CAEC. In this context, we determined that IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  induce the dysfunction of CAEC and lead to monocyte recruitment. We also observed that IL-32 isoforms expression correlates with

carotid artery stiffness in both PLWH and in the general population. These results suggest that IL-32 could be considered as a therapeutic target to attenuate inflammation, cellular senescence, and dysfunction of endothelial cells, which are processes linked to the development of cardiovascular diseases.

Finally, we got interested in the use of short chains fatty acids (SCFA), a group of gut metabolites that we previously shown to be decreased in PLWH with cardiovascular disease, to reduce the impact of IL-32 isoforms on endothelial cells. We discovered that several SCFA have the potential to diminish the impact of IL-32 on markers of CAEC dysfunction, such on the expression of their adhesion molecule and chemokine secretion after stimulation by IL-32 $\beta$  and  $\gamma$ .

**Keywords :** HIV-1, Inflammation, Cardiovascular diseases, Endothelial dysfunction, IL-32, CD96, Atherosclerosis

## Table des matières

Résumé .....	3
Abstract .....	5
Table des matières .....	7
Liste des tableaux .....	11
Liste des figures .....	12
Liste des sigles et abréviations .....	13
Remerciements .....	18
Chapitre 1 : Introduction .....	21
1.1    Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) .....	21
1.1.1    Épidémiologie du VIH .....	21
1.1.2    Découverte et origines du VIH.....	22
1.1.3    Structure et génome du VIH-1 .....	23
1.1.4    Cycle de réplication du VIH-1 .....	25
1.1.5    Phases de développement de la maladie .....	27
1.1.6    Réponse immunitaire à l'infection par le VIH .....	28
1.1.7    Réservoirs viraux.....	35
1.1.8    Thérapie antirétrovirale .....	37
1.2    Conséquences de l'infection chronique par le VIH : .....	41
1.2.1    Inflammation chronique .....	41
1.3    Conséquences de l'inflammation chronique sur le développement du vieillissement prématuré :.....	46
1.3.1    Maladies cardiovasculaires .....	46
1.3.2    Atteintes cérébrales .....	53

1.3.3	Cancer.....	54
1.4	Nouvel acteur de l'inflammation chronique dans le contexte du VIH : Interleukine 3256	
1.4.1	Découverte de l'IL-32 .....	56
1.4.2	Effets de l'IL-32 sur les cellules immunitaires et non-immunitaires .....	57
1.4.3	Induction d'IL-32 .....	58
1.4.4	Rôle de l'IL-32 dans le développement des maladies cardiovasculaires .....	61
1.4.5	Facteurs potentiels pour contrecarrer l'effet de l'Il-32 .....	62
1.5	Rôle des cellules endothéliales dans le développement des maladies cardiovasculaires	64
1.5.1	Rôle des cellules endothéliales dans le maintien de l'homéostasie .....	64
1.5.2	Dysfonction des cellules endothéliales .....	65
1.5.3	Recrutement des cellules immunitaires par les cellules endothéliales .....	67
1.5.4	Infiltration des cellules immunitaires à travers l'endothélium.....	68
1.5.5	Dysfonction de l'endothélium en lien avec la rigidité artérielle .....	69
Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs de la thèse.....		72
Chapitre 3 : Résultats .....		74
Manuscrit #1: Loss of CD96 Expression as a Marker of HIV-Specific CD8+ T-Cell Differentiation and Dysfunction.....		74
	Abstract .....	75
	Introduction .....	76
	Materials and methods .....	78
	Results .....	81
	Discussion .....	85
	References .....	90
	Figures.....	95
	Tables .....	106

Manuscript #2: Differential Impact of IL-32 Isoforms on the Functions of Coronary Artery Endothelial Cells: A Potential Link with Arterial Stiffness and Atherosclerosis .....	107
Abstract .....	109
Introduction .....	110
Material and methods .....	112
Results .....	116
Discussion .....	121
References .....	127
Figures .....	136
Supplementary materials .....	143
Tables .....	145
Manuscript #3: Short communication: A potential role for caproic acid in reversing inflammation-mediated endothelial cell dysfunction .....	146
Abstract .....	147
Introduction : .....	148
Material and methods .....	149
Results and discussion .....	150
References .....	153
Figures .....	156
Chapitre 4 : Discussion .....	158
La perte d'expression de CD96 comme biomarqueur de la différenciation et de la dysfonction des cellules T CD8+ dans le contexte de l'infection par le VIH-1 .....	158
L'expression de CD96 est réduite chez les PVVIH en perte de contrôle immunologique et est liée à la progression de la maladie .....	158
La perte de l'expression de CD96 est associée avec un phénotype mémoire et sénescence ..	160

La perte de l'expression de CD96 modifierait-elle la réponse des cellules T CD8+ spécifiques aux antigènes dans le contexte de l'infection par le VIH ? .....	161
Le lien entre la cytokine pro-inflammatoire IL-32 et la perte d'expression de CD96.....	162
Impact des isoformes d'IL-32 sur la fonction des CAEC, un lien potentiel avec l'athérosclérose et la rigidité artérielle .....	163
Les isoformes d'IL-32 montrent un impact différentiel sur les CAEC.....	163
Les isoformes d'IL-32 $\beta$ et $\gamma$ induisent la dysfonction des CAEC.....	164
Les isoformes d'IL-32 $\beta$ et $\gamma$ augmentent la production de chimiokines des CAEC et leur capacité à recruter des monocytes .....	166
L'expression des isoformes d'IL-32 est associé avec la rigidité artérielle .....	168
Les acides gras à chaînes courtes pour contrecarrer IL-32 ?.....	169
Les acides gras à chaînes courtes atténuent la dysfonction des cellules endothéliales. ....	170
Conclusions .....	171
Perspectives .....	172
Références bibliographiques .....	174

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> – Molécules antirétrovirales approuvées par la FDA .....	38
<b>Tableau 2.</b> – Résumé des principaux facteurs impliqués dans les atteintes cognitives liées au VIH-1.....	54
<b>Tableau 3.</b> – Induction d'IL-32 dans différents types cellulaires.....	61

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> – Représentation schématique du virion du VIH-1 .....	23
<b>Figure 2.</b> – Représentation du génome du VIH-1 .....	25
<b>Figure 3.</b> – Cycle de réplication du VIH-1 .....	26
<b>Figure 4.</b> – Évolution de l'infection par le VIH-1 .....	28
<b>Figure 5.</b> – Gènes stimulés par l'interféron impactant différentes phases de la réplication virale.....	30
<b>Figure 6.</b> – Les facteurs de restriction APOBEC3, SAMHD1 et BST-2.....	31
<b>Figure 7.</b> – Contributions des sous types de T CD4+ à la persistance du VIH .....	36
<b>Figure 8.</b> – Pathogenèse de l'athérosclérose.....	49
<b>Figure 9.</b> – Cancer chez les PVVIH aux États Unis .....	55
<b>Figure 10.</b> – Isoformes d'IL-32.....	57
<b>Figure 11.</b> – Activation de type II des cellules endothéliales .....	66
<b>Figure 12.</b> – Rôle de l'IL-32 dans le dysfonctionnement cellulaire et son effet sur l'inflammation chronique et le développement des maladies cardiovasculaires dans le contexte du VIH-1.....	172



## Liste des sigles et abréviations

	Français	Anglais
ADN:	Acide désoxyribonucléique	Deoxyribonucleic acid
Akt:	Voie de signalisation de l'Akt	Akt signaling pathway
APOBEC3G:	Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G	Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G
ARN:	Acide ribonucléique	Ribonucleic acid
ARNc:	Acide ribonucléique complémentaire	Complementary ribonucleic acid
ARNm:	Acide ribonucléique messenger	Messenger ribonucleic acid
ARNv:	Acide ribonucléique viral	Viral ribonucleic acid
ART:	Thérapie antirétrovirale combinée	Antiretroviral therapy
AVC:	Accident vasculaire cérébral	Stroke
AZT:	Zidovudine	Zidovudine
BCG:	Bacillus Calmette–Guérin	Bacillus Calmette–Guérin
BST2:	Thétérine	Bone marrow stromal antigen 2
CA:	Capside	Capsid
CAEC:	Cellules endothéliales de l'artère coronaire	Coronary artery endothelial cells
CCL:	Ligand de chimiokine	Chemokine ligand
CCR:	Récepteur de chimiokine à motif C-C	C-C chemokine receptor
CD:	Cluster de différenciation	Cluster of differentiation
CLT:	Translation latérale cumulée	Cumulated Lateral Translation
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité	Major histocompatibility complex
CMV:	Cytomégalovirus	Cytomegalovirus
CRP:	Protéine C réactive	C reactive protein
CTLA4:	Protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CXC3CR1:	Récepteur de chimiokine 1 à motif CX3C	CX3C motif chemokine receptor 1
CXCL:	Ligand de chimiokine à motif CXC	Chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR:	Récepteur de chimiokine à motif CXC	CXC chemokine receptors
dNTP:	Deoxyribonucleotide triphosphate	Désoxyribonucléoside triphosphate
EDD:	Dilatation dépendante de l'endothélium	Endothelium dependent dilatation
eNOS:	Oxyde nitrique synthase endothéliale	Endothelial nitric oxide synthase
Env:	Enveloppe	Envelope
ERK:	Kinases réglées par un signal extracellulaire	Extracellular signal-regulated kinases
FDA:	Office des produits alimentaires et des médicaments	Food and Drug Administration
GM-CSF:	Facteur humain stimulant les colonies de granulocytes-macrophages	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GP:	Glycoprotéine	Glycoprotein

H5N1:	Virus de la grippe A	Influenza A virus
HAD:	Démence associée au VIH	HIV-associated dementia
HARSAH:	Hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes	Men having sex with men
HbD-2:	$\beta$ -défensine 2 humaine	Human beta-defensin-2e
HDL:	Lipoprotéines de haute densité	High density lipoprotein
HLA:	Antigènes des leucocytes humains	Human leukocyte antigen
HSV2:	Herpès de type 2	Type 2 herpes simplex virus
HTLV-III:	Virus t-lymphotropique humain 3	Human T-lymphotropic virus 3
ICAM-1:	Molécule d'adhésion cellulaire 1	Intercellular adhesion molecule 1
IFI16:	Protéine inducible par l'interferon- $\gamma$ 16	Interferon- $\gamma$ -inducible protein 16
IFN:	Interféron	Interferon
IKK $\beta$ :	Inhibiteurs du facteur nucléaire kappa B	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
IL:	Interleukine	Interleukin
IN:	Intégrase	Integrase
INNTI:	Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors
INTI:	Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse	Nucleoside reverse transcriptase inhibitors
IPN:	Inhibiteurs de la protéase non peptidique	Non-peptidic protease inhibitor
ISG:	Gènes stimulés par l'interféron	Interferon-stimulated genes
ITIM:	Motif d'inhibition des récepteurs immuns basé sur la tyrosine	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
Jak/STAT:	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription
JAM:	Molécule d'adhésion jonctionnelle	Junctional adhesion molecule
JNK:	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun N-terminal kinase
KB:	Kilobase	Kilobase
LAG3:	Gène d'activation des lymphocytes 3	Lymphocyte-activation gene 3
LAV:	Virus associé à la lymphadénopathie	Lymphadenopathy-associated virus
LCN2:	Lipocaline-2	Lipocalin-2
LDL:	Lipoprotéines de basse densité	Low-density lipoprotein
LFA-1:	Antigène 1 associé à la fonction lymphocyte	Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS:	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharide
LTR:	Longue répétition terminale	Long terminal repeat
MA:	Matrice	Matrix
MAPK:	Protéines kinases activées par les mitogènes	Mitogen-activated protein kinases
MMPs:	Métalloprotéinases de la matrice	Matrix metalloproteinases
NC:	Nucléocapside	Nucleocapsid
NF $\kappa$ B:	Facteur nucléaire-kappa B	Nuclear factor-kappa B

NK:	Tueuse naturelle	Natural Killer
NLRP3:	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NO:	Oxide nitrique	Nitric oxid
oxLDL:	Lipoprotéine de basse densité oxydée	Oxidized low-density lipoprotein
PBMC:	Cellules mononuclées du sang périphérique	Peripheral blood mononuclear cells
PD-1:	Protéine de mort cellulaire programmée 1	Programmed Cell Death Protein 1
PECAM:	Molécule -1 d'adhérence entre les plaquettes et les cellules endothéliales	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PKC:	Protéine kinase C	Protein Kinase C
PR:	Protéase	Protease
PR3:	Protéinase 3	Proteinase 3
PrEP:	Prophylaxie préexposition	Pre-exposure prophylaxis
PRR:	Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires	Pattern recognition receptors
PVVIH:	Personnes vivant avec le VIH	People living with HIV
RGD:	Acide arginylglycylaspartique	Arginylglycylaspartic acid
ROS:	Espèces réactives de l'oxygène	Reactive oxygen species
RT:	Transcriptase inverse	Reverse transcriptase
SAMHD1:	SAM domain and HD domain-containing protein 1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
SASP:	Phénotype sécrétoire associé à la sénescence	Senescence-associated secretory phenotype
SA-β Gal:	Bêta galactosidase associée à la sénescence	Senescence-associated beta galactosidase
SCFA:	Acide gras à chaîne courte	Short chain fatty acid
SIDA:	Syndrome d'immunodéficience acquise	Acquired immunodeficiency syndrome
SR-A:	Récepteur phagocytaire de macrophage de la classe A	Class A macrophage scavenger receptor
Syk:	Tyrosine-protéine kinase	Tyrosine-protein kinase
T CD4+:	Lymphocyte T CD4+	CD4+ T lymphocyte
T CD8+:	Lymphocyte T CD8+	CD8+ T lymphocyte
TACTILE:	T cell-activated increased late expression	T cell-activated increased late expression
TB:	Tuberculose	Tuberculosis
TH:	Lymphocyte T auxiliaire	T helper lymphocyte
TIGIT:	T cell immunoglobulin and ITIM domain	T cell immunoglobulin and ITIM domain
TIL:	Lymphocytes d'infiltration tumorale	Tumor-infiltrating lymphocytes
TIM3:	T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3	T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3
TLR:	Récepteur de type toll	Toll like receptor
TNF:	Facteur de nécrose tumorale	Tumor necrosis factor
TNFR:	Récepteurs de TNF	TNF receptor
TRIM5α:	Tripartite motif-containing protein 5	Tripartite motif-containing protein 5

VCAM-1:	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1	Vascular cell adhesion molecule 1
VHB:	Virus de l'hépatite B	Hepatitis B virus
VHC:	Virus de l'hépatite C	Hepatitis C virus
VIH-1:	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1	Human immunodeficiency virus type 1
VLA-4:	Antigène tardif 4	Very late antigen-4
ZO-1:	Zonula occludens-1	Zonula occludens-1

« *Scientia vincere tenebras* »

Vaincre les Ténèbres par la Science

## Remerciements

Je tiens avant tout à remercier la docteure Cécile Tremblay, ma directrice de thèse, pour sa confiance durant toute la durée de mon doctorat. Grâce à son soutien et ses conseils, j'ai pu réaliser ce projet qui me tenait à cœur. Merci de m'avoir permis de participer à autant de conférences ou j'ai pu présenter fièrement notre travail.

Mohamed, je ne sais pas par où commencer pour te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu as été présent à tous les instants, les bons et les mauvais pour me permettre de surmonter chaque obstacle sur le long chemin du doctorat. Ta patience et ta bienveillance m'ont été inestimables. Tu as été le socle sur lequel j'ai pu prendre appui pour grandir, apprendre et évoluer. Tes conseils avisés, aiguisés et experts continueront à résonner dans mon esprit que je me lance dans un projet scientifique ou personnel. Je suis fier d'avoir pu travailler avec toi durant toutes ces années et j'espère que tu as pris autant de plaisir que moi.

Hardik, merci pour la complicité que nous avons pu développer avec le temps. Bien qu'originaires de deux parties du monde complètement différentes, nous avons tellement de points communs que notre amitié était évidente. Je remercie Annie pour avoir partagé avec moi son retour d'expérience sur la gestion du stress et pour son soutien tout au long du doctorat.

Je remercie Aurélie pour avoir pris le temps de faire mon apprentissage et m'avoir permis de faire de si belles images à la plateforme de microscopie. Je remercie également Valérianne pour m'avoir aidé quand j'en avais le plus besoin, souvent...et avec beaucoup de patience.

Je remercie les phasmes du 9eme étage. Sana, Camille et Victoria, même à nous quatre, on ne doit pas dépasser les 200 kg mais ce que nous n'avons pas en matière, nous l'avons en esprit. Votre amitié et votre bienveillance m'ont permis de grandir, nos discussions animées sur différents sujets de société m'ont certainement aidé à être moins rustre, c'est toujours ça de pris... Je suis impatient de continuer à nourrir notre amitié qui compte beaucoup pour moi.

Merci aux membres de mon jury de thèse pour leur travail sur ce manuscrit.

Enfin, je tiens à remercier ma famille à commencer par mes parents pour leur soutien moral, leurs nombreuses visites durant ces dernières années ont été autant de bouffées d'oxygène nécessaire à l'accomplissement de ce projet.

À ma conjointe, je dis bravo, tu as été à mes côtés durant toute cette aventure et tu as été à la hauteur. Tu as écouté, compris et solutionné mes problèmes lorsque tu as pu le faire et pour ça, je te remercie.

Elena, mon amour, tu es née au milieu de ce moment si stressant de ma vie, et d'un simple sourire, tu y as ramené la paix.





# Chapitre 1 : Introduction

## 1.1 Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

### 1.1.1 Épidémiologie du VIH

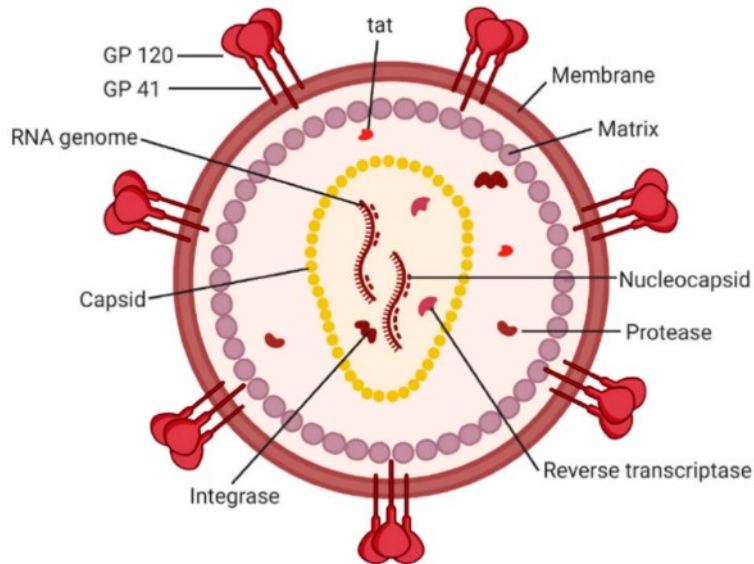
Le VIH-1 et le VIH-2 sont deux virus du genre *Lentivirus* au sein de la famille des *Retroviridae*, sous-famille des *Orthoretrovirinae*. Ils possèdent la capacité d'infecter et de se répliquer dans le corps humain. Le VIH-1 est l'agent infectieux responsable de la vaste majorité des syndromes d'immunodéficiences acquises aussi appelés SIDA. Le VIH-1 est transmis principalement par les rapports sexuels non protégés. Le VIH-1 peut également être transmis horizontalement par le biais d'aiguilles contaminées ou de transfusions sanguines de sang contaminé[1]. Enfin, le VIH-1 peut être transmis verticalement de la mère à l'enfant durant la grossesse, le travail, l'accouchement ou encore l'allaitement en l'absence de traitements antirétroviraux[2]. Chaque année plus de 1,8 millions de nouvelles infections sont recensées dans le monde, ce qui fait de cette épidémie un problème global et de première importance. Cependant, une réduction constante des morts liées aux maladies associées à l'infection par le VIH est observée. Elle est majoritairement imputable à une accessibilité en hausse des thérapies antirétrovirales combinées. En effet, le nombre de personnes ayant accès à un traitement antirétroviral a quadruplé depuis 2010, passant de 7,7 millions à 29,8 millions en 2022[3]. Certains pays ont fait des progrès fulgurants en matière de détection, de traitement et de suivi du VIH, c'est notamment le cas du Botswana, de l'Eswatini, du Rwanda, de la République unie de Tanzanie et du Zimbabwe qui ont atteint les objectifs 95-95-95. Ces objectifs se définissent comme « 95 % des personnes vivant avec le VIH connaissent leur état sérologique, que 95 % de ces personnes suivent un traitement antirétroviral vital et que 95 % des personnes sous traitement ont une charge virale indétectable ». Bien que l'accessibilité des traitements dans cette région se soit nettement améliorée, des efforts restent à fournir pour consolider cette avancée dans d'autres pays aux ressources limitées. En 2022, on estimait que 39 millions de personnes vivaient avec le VIH dans le monde, 1,3 millions de nouvelles infections par le VIH ont eu lieu, 29,8 millions de personnes avaient accès à une thérapie antirétrovirale et 630 000 personnes sont mortes de maladies opportunistes[3].

### **1.1.2 Découverte et origines du VIH**

En 1981, des cliniciens de Californie et de New York ont noté une prévalence inhabituelle de cancer comme le sarcome de Kaposi ainsi que d'infections opportunistes dans la communauté homosexuelle[4]. Compte-tenu de la prédominance des observations dans cette communauté, l'hypothèse d'une transmission par les rapports sexuels a été envisagée[5]. Plus tard, l'observation de ce syndrome dans différents groupes sociaux a orienté le courant de pensée vers une infection transmissible par le sang. Certains patients présentaient des taux de lymphocytes T CD4+ significativement bas ainsi que des lymphadénopathies orientant le diagnostic des cliniciens vers une atteinte immunitaire et lançant la recherche de l'agent infectieux responsable de ce syndrome. En 1983, l'agent pathogène fut identifié, le virus a été isolé à partir d'un ganglion lymphatique infecté par Françoise Barré-Sinoussi sous la supervision de Luc Montagnier à l'Institut Pasteur[6]. Le virus fut nommé « lymphadenopathy associated virus (LAV) pour « virus associé à la lymphadénopathie) et « human T-lymphotropic virus 3 (HTLV-III) et fut ensuite renommé Virus de l'Immunodéficience humaine (HIV) en 1986[7]. Il est majoritairement admis que le VIH-1 trouve son origine chez le singe. Des virus proches du VIH-1 et du VIH-2 ont été identifiés chez les chimpanzés[8] et les singes verts Mangabey[9], respectivement. Cet état de fait a donné une première indication que le VIH avait émergé chez les humains et les macaques via des infections inter-espèces par des lentivirus[10]. Il existe différents groupes de VIH ayant des incidences diverses géographiquement et en termes de nombre de personnes infectées. Ces groupes sont nommés M, O, N, P. Le groupe M (Major) est le groupe le plus représenté mondialement. Ce groupe a été identifié en 1981, est à l'origine de la pandémie, et se subdivise en sous-types génétiquement différents (A, B, C, D, F, G, H, J, K)[11] et en au moins 89 virus recombinants circulants[12]. Le sous-type B est le plus répandu en Amérique du Nord, en Europe et en Australasie et bien qu'il ne représente que 12% des infections dues au VIH-1, une écrasante majorité des recherches lui sont consacrées. Le sous type C a une forte prévalence dans le sud de l'Afrique, l'Inde et la corne de l'Afrique. Il est responsable de 50% des infections au VIH-1. Le groupe O (Outlier) a été découvert en 1990 en Afrique centrale[13] et comptabilise au total 1000 cas déclarés. Le groupe N (New) a été découvert au Cameroun en 1998 et représente une douzaine de cas[14]. Le groupe P (Putative) a été identifié en 2004 au Cameroun chez deux individus[15].

## 1.1.3 Structure et génome du VIH-1

### 1.1.3.1 Structure



**Figure 1.** – Représentation schématique du virion du VIH-1

Les protéines de l'enveloppe (GP120 et GP41) sont présentes à la surface du virion. La couche interne est composée de protéines de matrice. L'intérieur du virion se trouve les protéines virales et le noyau contenant le génome du VIH-1 et certaines protéines essentielles pour son infectivité. *Source : Rossi E, Meuser ME, Cunanan CJ, Cocklin S. Structure, Function, and Interactions of the HIV-1 Capsid Protein. Life (Basel). 2021 Jan 29;11(2):100. doi: 10.3390/life11020100. PMID: 33572761; PMCID: PMC7910843.*

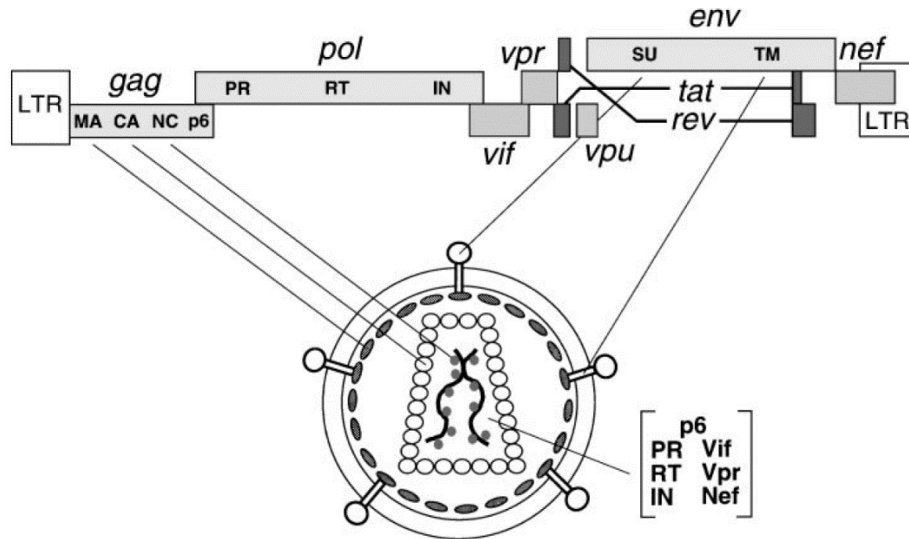
Le VIH-1 est un lentivirus de la famille des rétrovirus. Il fait partie des virus enveloppés. Il se présente sous forme de sphère ayant un diamètre moyen de 120 nanomètres. Il est composé de 2 grandes structures : la capsid (CA) et l'enveloppe (Env) (Figure 1). Sa capsid est composée d'une protéine appelée Gag (Group-specific antigen) qui est divisée en sous-unités qui s'assemblent pour former une structure hexagonale. Ceci forme la base de la capsid qui est refermée par la protéine de matrice MA. La capsid contient 2 autres protéines virales, la protéase (PR) et la transcriptase inverse (RT).

L'enveloppe virale est composée de 2 couches. La couche interne est constituée de la membrane plasmique de la cellule hôte et la couche externe de glycoprotéine. La chaîne de polypeptide Env est produite en tant que précurseur qui se trimérise en  $(gp160)_3$  et subit ensuite un clivage par une protéase semblable à la furine en deux fragments: le fragment de liaison récepteur gp120 et le

fragment de fusion gp41[16]. Trois copies de chaque fragment constituent le péplomère mature (gp120/gp41)<sub>3</sub>. La liaison de la gp120 avec le CD4 et le corécepteur CCR5 ou CXCR4 induit la réorganisation de la gp41. La gp41, avec son segment C terminal transmembranaire (TM) adopte une conformation de pré-fusion. Le peptide de fusion en N terminale (FP) de la gp41 est ensuite transféré et s'insère dans la membrane de la cellule cible. La gp41 subit ensuite des réarrangements dans une conformation en épingle à cheveux, créant un faisceau de six hélices connue sous le nom de conformation de post-fusion plaçant le segment TM et le peptide de fusion FP du même côté de la molécule permettant ainsi d'amener les deux membranes ensemble[17].

#### 1.1.3.2 Génome

L'ARN génomique dimérique et linéaire mesure 9 kb de long et est contenu entre les séquences répétitives (LTR) 5' et 3' qui contiennent le promoteur viral et les séquences nécessaires pour la transcription inverse, l'intégration et l'expression des gènes. Les LTR se divisent en différentes régions U3, R et U5[18] suivies du signal d'emballage Psi ( $\psi$ ) qui participe à la régulation du processus de conditionnement du génome de l'ARN rétroviral dans la capsid virale pendant la réplication[19]. Le gène Gag code la matrice des protéines structurelles (MA), la capsid (CA) et la nucléocapsid (NC) formant le noyau viral. Le gène *pol* code pour les enzymes virales de la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN). Le gène *Pol* est suivi par les gènes régulateurs *rev*, *tat*, *vif*, *vpr* et *vpu*. Le gène *env* code pour les glycoprotéines de l'enveloppe virale comprenant l'unité de surface (SU) gp120 et l'unité transmembranaire (TU) gp41. Env est suivi par un autre gène régulateur *nef* (Figure 2).



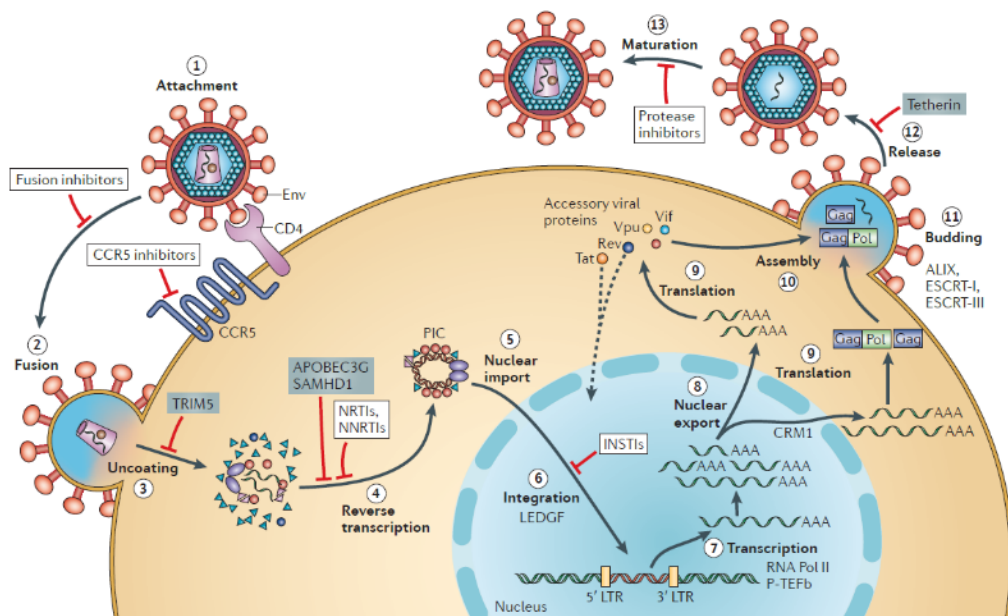
**Figure 2. –** Représentation du génome du VIH-1

Le génome du VIH-1 a une longueur de 9kb, et est formé de 9 gènes codant pour des protéines structurales, des protéines de régulation et des enzymes virales. *Source : Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. Annu Rev Biochem. 1998;67:1-25. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.1. PMID: 9759480.*

### 1.1.4 Cycle de répllication du VIH-1

La première étape de l'infection par le VIH-1 est l'attachement du virus à la cellule cible. Le virus se lie à la cellule par l'interaction entre la glycoprotéine 120 (gp120) et le récepteur CD4. Les co-récepteurs CCR5 et CXCR4 peuvent tous deux être utilisés par le virus selon son tropisme[20]. Des études ont montré que 70 à 80 % des personnes infectées dans le stade précoce de l'infection le sont par un virus au tropisme R5 (CCR5). En revanche si on analyse le tropisme du virus chez des personnes infectées depuis plus longtemps, on observe que 50% de ces personnes sont infectées par des virus au tropisme mixte R5 et X4 (CXCR4) et que les 50% restant sont infectées uniquement par un virus au tropisme R5. Le pourcentage de personnes infectées par un tropisme X4 est extrêmement faible[21-23]. Lorsque le tropisme change, cela augmente la capacité du VIH-1 à infecter les cellules T CD4+ naïves, exprimant peu le CCR5 mais exprimant fortement CXCR4[24]. Après cette phase de liaison, le virus initie sa phase de fusion par le biais de peptides de fusion. Cette phase est initiée par la pénétration des hélices de la glycoprotéine 41 (gp41) qui permet la fusion entre la membrane virale et cellulaire[25]. La

nucléocapside du virus est ainsi relâchée dans le cytoplasme de la cellule cible ou elle est désintégrée, libérant les 2 brins d'ARN viraux. Avec l'aide de la machinerie cellulaire, la reverse transcriptase (RT) va effectuer la transcriptase inverse permettant d'obtenir l'ADN à double brins lors d'un processus générant tout d'abord le brin d'ADN négatif et ensuite le brin d'ADN positif. Cet ADN viral se lie avec des protéines virales comme la protéine de matrice (MA), vpr et la RT et des protéines de la cellule hôte comme les microtubules[26, 27] pour former le complexe de pré-intégration et est ensuite transporté dans le noyau cellulaire. Une fois acheminé au noyau, l'ADN viral contenu dans complexe de pré-intégration est modifié afin qu'il puisse être lié à l'ADN de l'hôte par l'intégrase. L'intégration prend généralement place dans des zones ayant une transcription forte[28]. Le virus est ensuite transcrit par la machinerie cellulaire de l'hôte, cette étape est régulée par le promoteur du VIH-1 qui contient des sites de liaison pour des facteurs de transcription (comme NFκB par exemple). Une fois ses protéines synthétisées, le virus est acheminé et assemblé à la surface de la cellule hôte où il pourra bourgeonner en utilisant la bicouche lipidique de la cellule hôte pour générer son enveloppe virale dans un processus orchestré par la protéine régulatoire gag[29]. (Figure 3)



**Figure 3.** – Cycle de réplication du VIH-1

Le cycle de réplication du VIH-1 se déroule en plusieurs étapes commençant par l'attachement du virus et son entrée dans la cellule hôte. Ensuite il y a rétrotranscription du génome viral et intégration dans l'ADN de la cellule hôte. Il est

ensuite transcrit et traduit par la machinerie cellulaire de la cellule qui forme les protéines composant le virus. Il est ensuite assemblé avant de bourgeonner à la surface de la cellule infectée. Ces différentes étapes peuvent être ciblées par différents facteurs de restriction ainsi que par différentes molécules de la thérapie antirétrovirale. *Source : Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. Nat Rev Microbiol. 2012 Mar 16;10(4):279-90. doi: 10.1038/nrmicro2747. PMID: 22421880; PMCID: PMC3588166.*

## **1.1.5 Phases de développement de la maladie**

### **1.1.5.1 Phase aiguë**

La phase aiguë s'étend sur une période de quelques semaines durant lesquelles les lymphocytes T CD4+, principales cibles du VIH, sont fortement déplétés au niveau des muqueuses intestinales et dans le sang périphérique. Cette déplétion s'accompagne d'une forte augmentation de la charge virale, signe d'une réplication virale particulièrement active. L'infection est ensuite partiellement contrôlée par le développement d'une réponse immunitaire spécifique des lymphocytes T CD8+ et des lymphocytes B[30]. Cette réponse engendre une baisse de la charge virale et une augmentation modeste du nombre de cellules T CD4+ dans le sang (Figure 4).

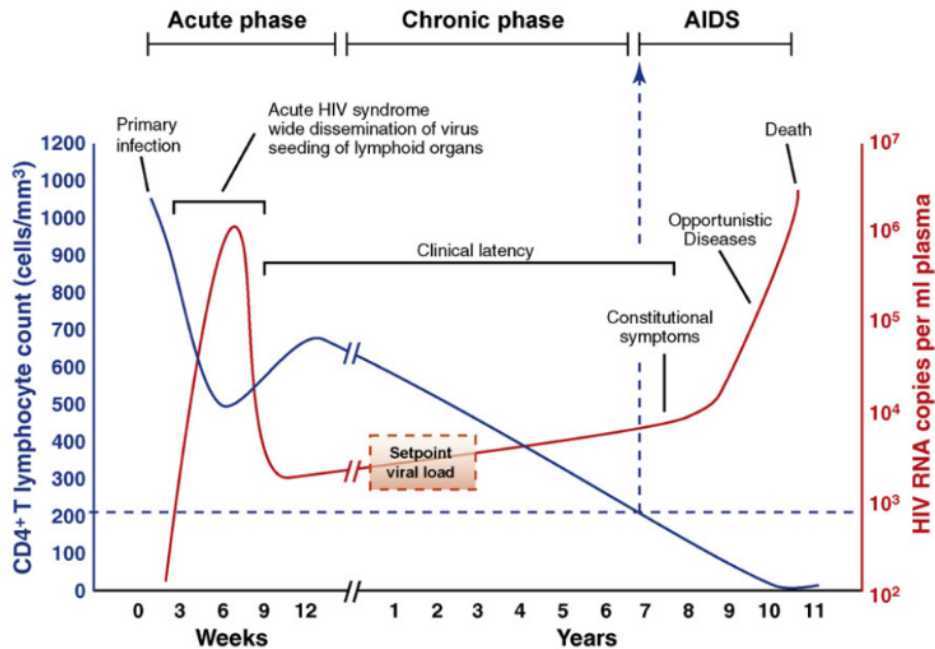
### **1.1.5.2 Phase chronique**

Après la phase aiguë de la maladie vient la phase chronique. Cette phase asymptomatique pouvant durer jusqu'à plusieurs années est caractérisée par une réplication virale résiduelle et une forte activité immunitaire de la part des cellules T CD8+ et CD4+. Durant cette phase, le système immunitaire tient partiellement la réplication virale sous contrôle engendrant une déplétion lente mais persistante des lymphocytes T CD4+ (Figure 4). Durant cette phase, la persistance du VIH[31], la translocation microbienne[32], la déplétion des cellules T régulatrices[33] ou encore les co-infections par d'autres virus [34] sont autant de facteurs menant à l'activation immunitaire et l'inflammation chronique.

### **1.1.5.3 Phase SIDA**

La phase SIDA est déclarée quand le nombre de cellules T CD4+ passe sous le seuil de 200 par ul dans le sang périphérique ou à l'apparition de maladies opportunistes. Cette phase se déclare généralement après plusieurs années d'infection. Elle est associée avec une diminution rapide du nombre de lymphocytes T CD4+ ainsi qu'une augmentation rapide de la charge virale (Figure 4). Cette atteinte du système immunitaire permet à nombres d'infections opportunistes (virales,

fongiques, parasitaires et bactériennes) normalement peu virulentes de se développer (Revue en [35]).



**Figure 4. –** Évolution de l'infection par le VIH-1

Évolution de l'infection par le VIH-1 montrant la phase aiguë durant entre 6 et 12 semaines, une augmentation de la charge virale et une diminution du nombre de T CD4+, la phase latente chronique durant entre 7 à 10 ans et la phase SIDA associée avec une forte réplication virale, et un déclin important des T CD4+. *Source: An P, Winkler CA. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. Trends Genet. 2010 Mar;26(3):119-31. doi: 10.1016/j.tig.2010.01.002. Epub 2010 Feb 10. PMID: 20149939; PMCID: PMC3792714.*

### 1.1.6 Réponse immunitaire à l'infection par le VIH

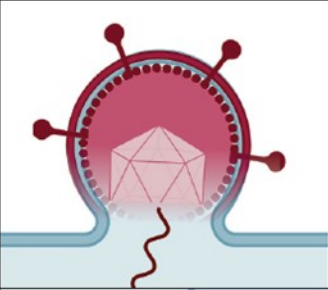
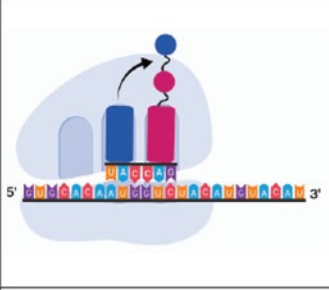
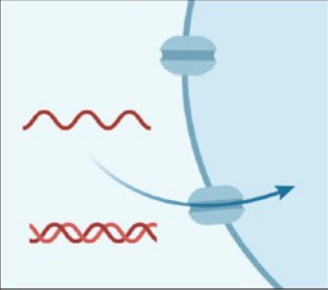
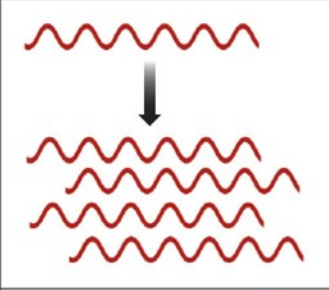
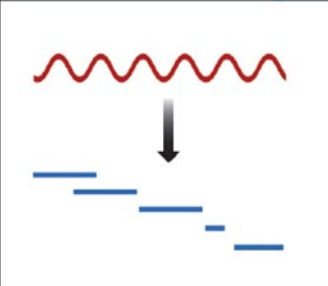
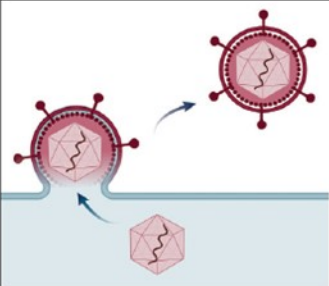
La réponse immunitaire se divise en deux grandes réponses, la réponse innée et la réponse adaptative. Ces deux réponses sont présentes dans le contexte de l'infection par le VIH mais ne permettent pas une clairance du virus.

#### 1.1.6.1 Réponse innée

La réponse innée est une réponse rapide, inflammatoire et non spécifique faisant suite à la détection d'un micro-organisme. Elle représente la première stratégie de défense de l'organisme



face aux différents pathogènes. La détection du pathogène se fait par l'intermédiaire de récepteurs présents à la surface des cellules comme les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs) qui sont capables de réagir aux motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMPs) et aux motifs moléculaires associés au danger (DAMPs). Certains de ces PRRs, appelés Récepteur de type toll (TLRs) sont exprimés dans de nombreuses cellules immunitaires et non-immunitaires. Ils ont un rôle clé dans la détection et la réponse innée face au VIH. Dans le cadre du VIH, l'ADN viral est détecté après l'étape de transcriptase inverse par les PRRs notamment par la protéine inductible par l'interféron- $\gamma$  16 (IFI16) dans les cellules T CD4+ et déclenche la pyroptose des cellules infectées[36, 37]. Le VIH peut également être détecté par les TLR endosomaux, capable de reconnaître l'ARN virale simple brin, notamment par le TLR8 engendrant une production de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  chez les cellules dendritiques et les macrophages. Enfin, certaines protéines du VIH-1 telles que Nef et Vpr peuvent être détectées par les TLR4 et TLR2 engendrant une activation cellulaire ainsi que la production d'IL-6 et du TNF- $\alpha$ . La détection du VIH-1 permet de déclencher l'expression d'interféron de type I engendrant à son tour une réponse des gènes stimulés par l'interféron (ISGs) qui représente des centaines de gènes dont certains impactent différentes étapes du cycle viral. (Voir Figure 5 [38]).

	<p><b>Entry</b> CH25H IFITM1,2,3 NCOA7</p> <p><b>Post entry</b> TRIM5α</p>		<p><b>protein synthesis</b> PKR IFIT1,2,3,5 ZAP PARP12 SFLN11 SAT1</p>
	<p><b>Nuclear import</b> MX1 MX2</p>		<p><b>Replication</b> IFI6 Viperin APOBECs</p> <p><b>Degradation</b> ZAP ISG20 OAS1,2,3</p>
	<p><b>mRNA synthesis</b> APOBECs IFI16 MX1</p>		<p><b>Assembly/egress</b> Tetherin CNP GBP5</p>

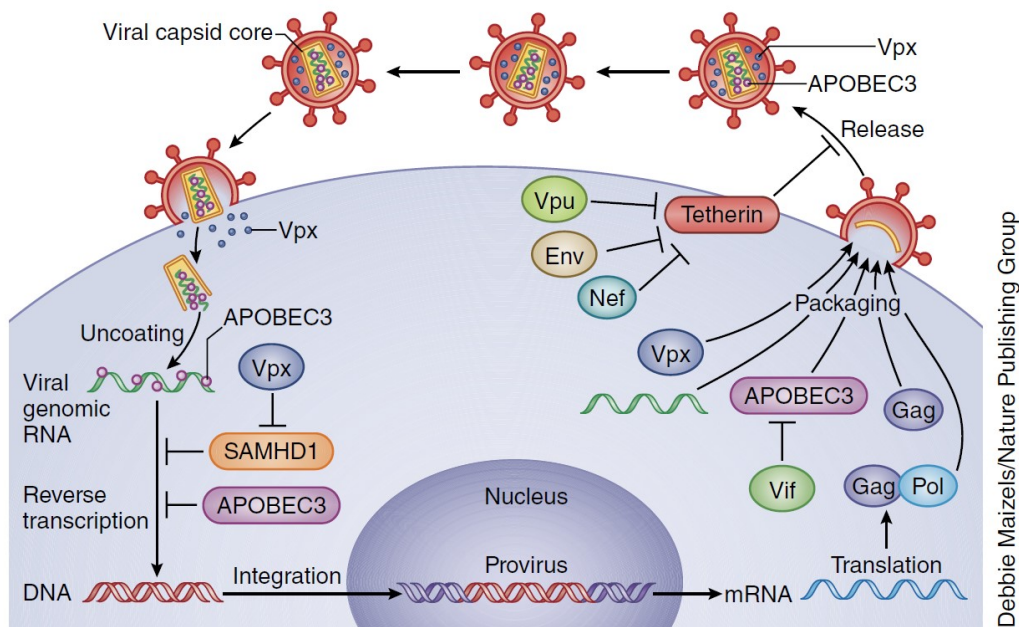
**Figure 5. –** Gènes stimulés par l’interféron impactant différentes phases de la réplication virale

Figure montrant les gènes stimulés par l’interféron et les différentes étapes du cycle de la réplication virale associée. *Source : Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? Annu Rev Virol. 2019 Sep 29;6(1):567-584. doi: 10.1146/annurev-virology-092818-015756. Epub 2019 Jul 5. PMID: 31283436.*

#### 1.1.6.1.1 Les Facteurs de restriction

Les facteurs de restriction font également partie de la réponse innée et leur expression est augmentée par la réponse aux interférons de type I. Les facteurs de restriction viennent bloquer certaines étapes du cycle de réplication virale mais sont souvent contrecarrés par les protéines virales régulatrices (Figure 6). De multiples facteurs de restriction ont un impact sur le cycle de réplication du VIH-1. La tétherine aussi appelée BST-2 est une protéine transmembranaire qui est capable de s’insérer dans la membrane virale empêchant ainsi le virion d’être libéré[39]. L’action de BST-2 permet également de déclencher la voie d’activation NF-κB engendrant l’activation de la réponse innée[40]. La protéine Vpu du VIH-1 est un antagoniste à BST-2, permettant ainsi au virus de contrecarrer son action[41]. Un autre facteur de restriction appelé Tripartite motif-

containing protein 5 (TRIM5 $\alpha$ ) est une protéine agissant comme un PRR et en interagissant avec la capsid du VIH, elle active la voie de transcription NF- $\kappa$ B. L'expression d'une mutation de TRIM5 $\alpha$  est associée avec la capacité de certains individus à contrôler la réplication virale[42]. Le facteur de restriction SAMHD1 est une enzyme dNTPase, elle agit en diminuant les dNTP disponibles pour la transcriptase inverse, principalement dans les cellules myéloïdes[43]. Il est intéressant de noter que les protéines accessoires Vpx et Vpr du VIH-2 viennent contrecarrer l'effet de SAMHD1[44, 45]. Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) est un autre exemple de facteurs de restriction cellulaire. APOBEC3G est une protéine qui provoque des mutations sur le brin d'ADN viral négatif nouvellement synthétisé[46]. APOBEC3G restreint également le VIH en se fixant sur l'ARN viral ce qui a pour effet de bloquer la transcription inverse[47]. La protéine Vif du VIH-1 cible APOBEC3G et entraîne sa dégradation par le complexe ubiquitine-protéasome[48].



**Figure 6.** – Les facteurs de restriction APOBEC3, SAMHD1 et BST-2

Figure montrant les facteurs de restriction SAMHD1, APOBEC3 et BST2 et les protéines virales les contrecarrant dans le contexte de l'infection par le VIH. *Source* : Simon, V., Bloch, N. & Landau, N. *Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. Nat Immunol* 16, 546–553 (2015). <https://doi.org/10.1038/ni.3156>

#### *1.1.6.1.2 Cellules de l'immunité innée et VIH-1*

Les principaux types cellulaires de l'immunité innée sont les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les cellules tueuses naturelles (Natural Killer cells/NK). Ces types cellulaires interviennent différemment dans la défense de l'hôte contre l'infection par le VIH-1 ainsi que dans sa dissémination dans l'organisme.

**Les cellules dendritiques** sont parmi les premières cellules à détecter le virus au niveau des muqueuses et jouent un rôle important dans l'établissement de l'infection au VIH-1 et la progression de la maladie [49]. Les cellules dendritiques détectent l'ARN simple brin du VIH-1 par le TLR7 ce qui conduit à leur activation et leur sécrétion d'interleukines comme IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23 et IL-27[50]. Ces interleukines orchestrent la réponse immunitaire en induisant la maturation, l'activation et la prolifération des cellules Th1. Les cellules dendritiques expriment CD4, CXCR4, et CCR5[49] ce qui les rend susceptibles au VIH-1. Elles ne sont pourtant pas une cible majeure du virus mais leur capacité d'internaliser le VIH-1 en fait un type cellulaire capable d'infecter directement d'autres cellules par contact. Les cellules dendritiques représentent un moyen pour le VIH-1 de se disséminer dans l'organisme du fait de la capacité de relocalisation de ces cellules des tissus vers les organes lymphoïdes secondaires qui comprennent une haute densité de cellules T CD4<sup>+</sup> avec lesquelles les cellules dendritiques forment des synapses immunologiques.

**Les cellules NK** sont des cellules effectrices cytotoxiques innées qui expriment une variété de récepteurs activateurs et inhibiteurs leur permettant de détecter les cellules infectées ou transformées par les virus. La détection de cellules infectées déclenche la libération de granules cytotoxiques et déclenche la production de cytokines par les NK. Les cellules NK sont également capables de déclencher la cytotoxicité à médiation cellulaire (ADCC) dépendante des anticorps par le biais de leur récepteur FcγRIII. Le VIH-1 réduit l'expression du HLA de classe I sur les cellules infectées, ce qui augmente la réponse des NK à leur égard[51, 52]. Néanmoins, le VIH-1 peut aussi échapper à ce mécanisme en ne diminuant pas l'expression des HLA-C et HLA-E, ce qui protège les cellules infectées de la réponse ADCC[53].

**Les monocytes et les macrophages** sont des cellules immunitaires innées d'origine myéloïde qui forment une première ligne de défense contre les pathogènes en les détectant par l'intermédiaire de leur PRR. Ils sont capables de détecter les acides nucléiques et les protéines du VIH-1 par

l'intermédiaire de TLR de surface ou intracellulaires. Cette détection initie leur activation et leur évolution vers un profil inflammatoire[54]. Lorsque les monocytes sont activés, ils peuvent migrer dans les tissus et acquérir un phénotype macrophagique. Les macrophages sont sensibles à l'infection par le VIH-1 et leur localisation tissulaire peut contribuer à la persistance virale en créant des réservoirs [55, 56].

#### 1.1.6.2 Réponse adaptative

La réponse immunitaire adaptative est une réponse spécifique au pathogène impliqué et dans le cadre du VIH, elle repose fortement sur l'activation de la réponse T CD8+, T CD4+ et des lymphocytes B.

##### *1.1.6.2.1 Réponse immunitaire cellulaire*

La réponse immunitaire cellulaire représente une partie majeure de la réponse adaptative, dans le cadre du VIH-1, elle est médiée en grande partie par l'activation des cellules T CD8+ qui sont capables de reconnaître et détruire spécifiquement les cellules infectées par le VIH-1. Elles sont en grande partie responsables de la résolution de l'infection aiguë par le VIH-1. Elles reconnaissent les peptides viraux présentés par le CMH de classe I à la surface des cellules infectées et produisent des enzymes cytotoxiques et des granzymes B qui détruisent les cellules infectées. Le VIH-1 peut néanmoins échapper à la réponse cytotoxique des T CD8+ grâce à la protéine régulatoire Nef qui diminue l'expression du CMH de classe I à la surface des cellules infectées[57]. Les mutations du VIH-1 et plus précisément de ces antigènes viraux lui permettent également d'échapper à cette réponse la rendant inefficace.

Les cellules T CD4+ activées sont la cible privilégiée du VIH-1 dans laquelle le virus se réplique et elles représentent également une composante majeure dans l'orchestration de la réponse adaptative. Les cellules T CD4+ sont nécessaires pour améliorer la réponse des T CD8+ en donnant aux cellules dendritiques le signal (CD40/CD40L) d'augmenter leur capacité de présentation antigénique et de costimulation à un niveau suffisant pour engendrer une activation des T CD8+[58]. Leur déplétion explique en partie pourquoi la réponse adaptative échoue à contrôler le VIH-1.

#### *1.1.6.2.2 Réponse immunitaire humorale*

La réponse humorale implique la production d'anticorps dirigés contre les protéines du VIH-1. La plupart des anticorps développés par l'hôte ciblent principalement l'enveloppe du VIH-1 (*Env*) ce qui ne permet pas de neutraliser le virus. Les anticorps neutralisants sont développés plus tardivement, plusieurs mois après l'infection[59] et sont généralement obsolètes à cause de la capacité de mutation du VIH-1[60, 61]. De plus, les anticorps neutralisants ne sont pas efficaces pour empêcher la transmission du VIH de cellule à cellule. Les protéines virales servant au virus à initier son cycle viral notamment lors de sa liaison ne sont pas accessibles avant qu'il ne se lie. Elles restent inaccessibles jusqu'à l'ouverture de la gp120 au moment de sa liaison avec le CD4. Ses épitopes restent donc cachés au système immunitaire. Certaines recherches laissent penser qu'il serait possible d'ouvrir les protéines de l'enveloppe du VIH afin de mettre en évidence certains épitopes vulnérables de *Env*[62].

Le VIH-1 engendre des changements dans le système immunitaire humoral comprenant une activation anormale des cellules B[63] et un échec de réponses de rappel aux antigènes[64]. De nombreux essais pour développer des vaccins ont été tentés mais aucun vaccin n'a induit de façon fiable des anticorps semblables aux anticorps neutralisant à large spectre[65]. Récemment, une étude clinique de phase I utilisant une triple combinaison d'anticorps neutralisants à large spectre a rendu ses résultats montrant une réduction de la virémie chez des patients non traités mais n'empêchant pas le rebond viral[66].

#### *1.1.6.2.3 Contrôleurs d'élites et perte de contrôle immunologique*

Un groupe d'individu appelé contrôleurs d'élites est capable de maintenir une charge virale sous les limites de détection pendant une longue période en absence de traitement antirétroviral[67]. Ces personnes représentent environ une PVVIH sur 300. Une étude récente a montré que les séquences du provirus du VIH-1 chez les contrôleurs d'élites sont localisées dans des régions chromosomiques répressives engendrant une latence profonde[68].

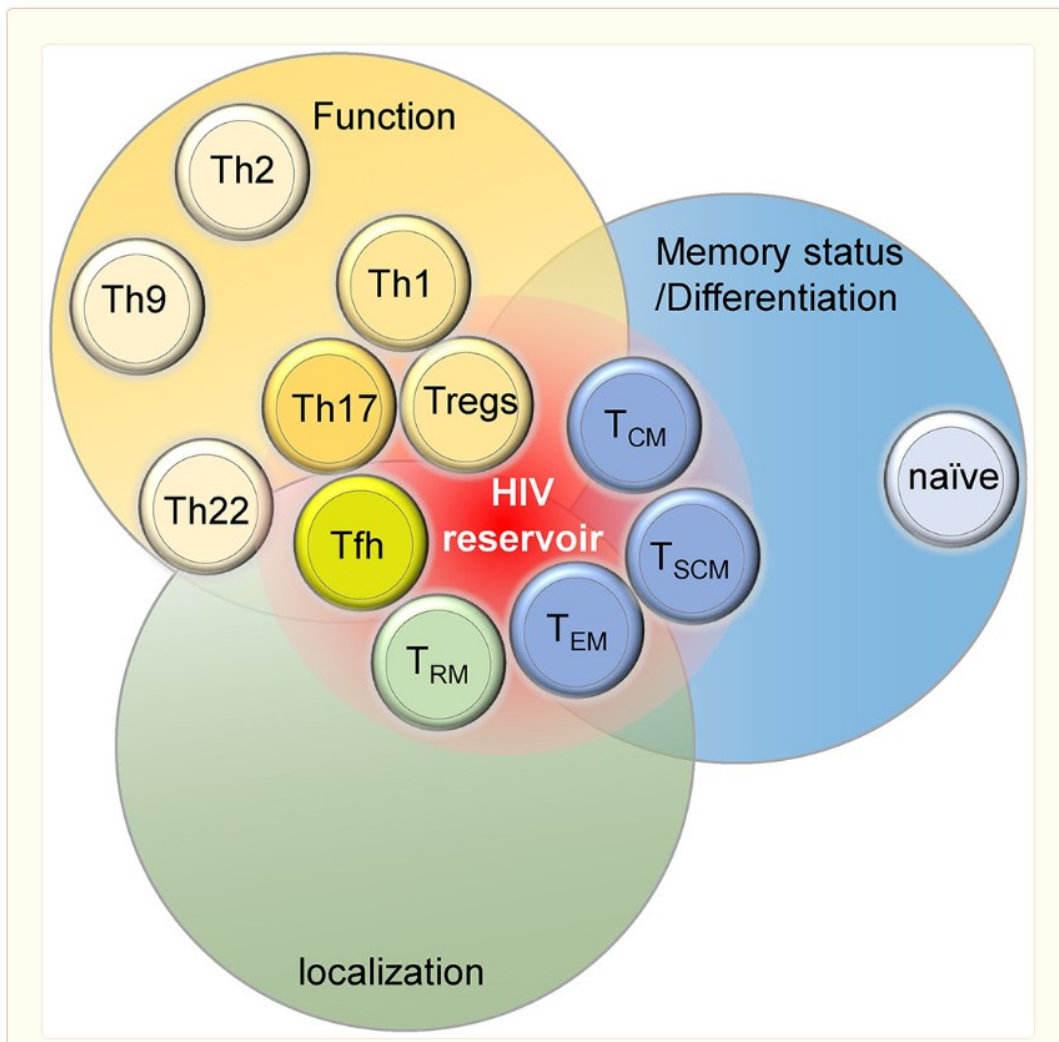
Il est intéressant de noter qu'une étude a démontré une forte expression de SAMHD1 dans les cellules T CD4<sup>+</sup> de contrôleurs d'élites[69]. De plus, une étude a montré une polarisation phénotypique plus marquée des T CD4<sup>+</sup> des contrôleurs d'élites vers les sous types TH1, TH17 et TH22 pouvant expliquer en partie le contrôle viral dont ils sont capables[70]. Des études *in vitro* ont démontré que les cellules T CD8<sup>+</sup> des contrôleurs d'élite ont des fonctions augmentées

et qu'elles sont capables de réduire la réplication du VIH-1 jusqu'à 80 %[71]. Les cellules T CD8<sup>+</sup> des contrôleurs d'élites cibleraient des épitopes ayant peu de variabilité[72], ce qui implique que le choix des épitopes viraux présentés exercerait une influence sur le contrôle de la virémie chez ces individus. Certaines études révèlent également des mutations dans le HLA de classe 1 comme le HLA-B27, le HLA-B52 et le HLA-B57 permettant une présentation plus efficace des peptides viraux aux cellules T CD8<sup>+</sup>[73]. Malgré le contrôle exercé par ces PVVIH, la perte de contrôle immunologique finit systématiquement par se produire. Elle correspond alors à une progression de la maladie avec une augmentation de la charge virale et la diminution du nombre de T CD4<sup>+</sup>[74, 75]. Dans une étude ayant pour objectif l'identification des mécanismes liés à la perte de contrôle immunologique, notre groupe a réalisé une analyse par « microarray » ayant pour but l'identification de biomarqueurs et de facteurs prédictifs. Cette étude a identifié une diminution de l'expression de plusieurs facteurs liés à la réponse innée et à l'activation des cellules T. Cette étude a notamment permis de mettre en évidence une corrélation entre l'IL-32 total et le déclin des cellules T CD4<sup>+</sup>[76].

### **1.1.7 Réservoirs viraux**

Les cellules T CD4<sup>+</sup> infectées par le VIH-1 meurent généralement rapidement, néanmoins, certaines de ces cellules persistent et se différencient en cellules T mémoires possédant une longue durée de vie créant ainsi des réservoirs viraux[77] représentant un obstacle majeur à l'éradication du VIH-1. Le VIH-1 persiste dans tous les sous-types de cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires, comme les cellules centrales mémoires, les cellules transitionnelles mémoires et les cellules effectrices mémoires ainsi que dans nombres de cellules effectrices comme les cellules folliculaires Tfh, les cellules T régulatrices Treg, les cellules Th1 et les cellules Th17 (Figure 7). Les cellules naïves peuvent également contribuer à la persistance du VIH dans une moindre mesure[78, 79]. Il a été montré que ces réservoirs viraux s'établissent rapidement après l'infection, rendant difficile l'éradication du virus. Les cellules infectées peuvent se réactiver et engendrer un rebond viral en cas d'interruption de la thérapie antirétrovirale combinée. De plus, certaines cellules infectées peuvent se retrouver dans différents tissus dont certains sont peu accessibles aux antirétroviraux engendrant alors des réservoirs actifs contribuant au maintien de l'infection[80]. Chez les personnes traitées par ART, les cellules infectées ont été détectées dans de multiples tissus comme l'intestin, les ganglions lymphatiques, le cerveau ou encore la moelle osseuse. Cette dissémination dans de multiples tissus présentant différentes accessibilités

médicamenteuses représente un frein important à toute stratégie de « shock and kill » ou encore de « block and lock ». La stratégie de « shock and kill » vise à réactiver le réservoir latent (shock) avec des molécules afin d'exposer le virus au système immunitaire et stimuler celui-ci pour qu'il puisse reconnaître et détruire les cellules infectées (kill)[81]. La stratégie de « block and lock » ou blocage et verrouillage empêche la transcription et la réactivation du VIH dans cellules infectées de façon latente en réduisant durablement au silence le provirus latent dans les cellules infectées et en prévenant ainsi le rebond[82].



**Figure 7. –** Contributions des sous types de T CD4+ à la persistance du VIH

Figure montrant la contribution des sous types de cellules T CD4+ à la persistance du VIH-1 en fonction de leur fonctions (en jaune), localisation (en vert) et phénotype mémoire (en bleu). *Source : Fromentin R, Chomont N. HIV persistence in subsets of CD4+ T cells: 50 shades of reservoirs. Semin Immunol. 2021 Jan;51:101438. doi:*



## **1.1.8 Thérapie antirétrovirale**

### 1.1.8.1 Histoire du développement des antirétroviraux

Le développement des antirétroviraux remonte aux années 1980 et a été lourdement influencé par la découverte du VIH ainsi que par le nombre de cas documentés de personnes atteintes par ce virus. En l'absence de traitement, il n'y avait aucun moyen de ralentir la maladie et la médecine ne pouvait qu'essayer de soulager les symptômes des malades et prévenir l'apparition d'infections opportunistes. La première molécule à être approuvée pour le traitement du VIH par la « Food and Drug Administration » (FDA) fut la Zidovudine (AZT) en 1985 pour des essais cliniques sur des sujets infectés. L'AZT est un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse (INTI) qui a été un premier pas franchi dans le traitement du VIH mais cette molécule s'est avérée assez toxique en provoquant des effets secondaires importants comme des maux de tête, des pertes de poids, des nausées et des troubles hématologiques[83]. En 1987, d'autres inhibiteurs de la transcriptase inverse sont développés. Le Dr Bernard Belleau conçoit la lamivudine qui sera synthétisée en 1989 par la société québécoise BioChem Pharma et son activité antivirale contre le VIH sera démontrée in vitro par le chercheur canadien Mark Wainberg. A partir de 1996[84], l'utilisation de la trithérapie a permis de fortement diminuer le nombre de décès imputable au VIH. Depuis cette époque, de nombreuses molécules ont été autorisées par la FDA (Tableau 1).

## FDA Approval of HIV Medicines

1981: First AIDS cases are reported in the United States.	
'85-'89	<p><b>1987</b> Zidovudine (NRTI)</p>
'90-'94	<p><b>1991</b> Didanosine* (NRTI)      <b>1992</b> Zalcitabine* (NRTI)      <b>1994</b> Stavudine* (NRTI)</p>
'95-'99	<p><b>1995</b> Lamivudine (NRTI) Saquinavir (PI)      <b>1996</b> Indinavir* (PI) Nevirapine (NNRTI) Ritonavir (PI)      <b>1997</b> Combivir (FDC) Delavirdine* (NNRTI) Nelfinavir* (PI)      <b>1998</b> Abacavir (NRTI) Efavirenz (NNRTI)      <b>1999</b> Amprenavir* (PI)</p>
'00-'04	<p><b>2000</b> Didanosine EC* (NRTI) Kaletra (FDC) Trizivir (FDC)      <b>2001</b> Tenofovir DF (NRTI)      <b>2003</b> Atazanavir (PI) Emtricitabine (NRTI) Enfuvirtide (FI) Fosamprenavir (PI)      <b>2004</b> Epzicom (FDC) Truvada (FDC)</p>
'05-'09	<p><b>2005</b> Tipranavir (PI)      <b>2006</b> Atripla (FDC) Darunavir (PI)      <b>2007</b> Maraviroc (CA) Raltegravir (INSTI)      <b>2008</b> Etravirine (NNRTI)</p>
'10-'14	<p><b>2011</b> Complera (FDC) Nevirapine XR (NNRTI) Rilpivirine (NNRTI)      <b>2012</b> Stribild (FDC)      <b>2013</b> Dolutegravir (INSTI)      <b>2014</b> Cobicistat (PE) Elvitegravir* (INSTI) Triumeq (FDC)</p>
'15-'19	<p><b>2015</b> Evotaz (FDC) Genvoya (FDC) Prezcobix (FDC)      <b>2016</b> Descovy (FDC) Odefsey (FDC)      <b>2017</b> Juluca (FDC)      <b>2018</b> Biktarvy (FDC) Cimduo (FDC) Delstrigo (FDC) Doravirine (NNRTI) Ibalizumab-uiyk (PAI) Symfi (FDC) Symfi Lo (FDC) Symtuza (FDC) Temixys (FDC)      <b>2019</b> Dovato (FDC)</p>
'20-'24	<p><b>2020</b> Fostemsavir (AI)      <b>2021</b> Cabenuva (FDC) Cabotegravir (INSTI)</p>

**Drug Class Abbreviations:**

AI: Attachment Inhibitor; CA: CCR5 Antagonist; FDC: Fixed-Dose Combination; FI: Fusion Inhibitor; INSTI: Integrase Inhibitor; NNRTI: Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; NRTI: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; PE: Pharmacokinetic Enhancer; PI: Protease Inhibitor; PAI: Post-Attachment Inhibitor



\*Note: Drugs with an asterisk are no longer available and/or are no longer recommended for use in the United States by the HHS HIV/AIDS medical practice guidelines. These drugs may still be used in fixed-dose combination formulations.

**Tableau 1. – Molécules antirétrovirales approuvées par la FDA**

Tableau relatant des avancées en matière de molécules approuvées par la FDA pour le traitement du VIH-1 entre 1985 et 2021. Source : <https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/infographics/fda-approval-hiv-medicines>

## 1.1.8.2 Mode d'action des antirétroviraux

### 1.1.8.2.1 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse (ITI)

Cette première classe d'inhibiteur permet de contrecarrer l'enzyme de la transcriptase inverse permettant au VIH de convertir son ARN viral en ADN viral. Cette étape est cruciale pour le cycle de réplication du VIH et son blocage s'avère très efficace. Il existe deux types d'ITI, les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) et les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI). Les INTI s'incorporent directement dans la chaîne ADN en cours de synthèse (terminaison de chaîne) tandis que les INNTI sont capables de se lier directement à la transcriptase inverse pour la neutraliser[85].

### 1.1.8.2.2 Les inhibiteurs d'entrées

Les inhibiteurs d'entrées impactent le cycle de réplication du VIH dans sa phase la plus précoce à savoir sa liaison avec ses corécepteurs (inhibiteurs de corécepteurs) et la fusion de sa membrane avec la membrane cellulaire (inhibiteur de fusion). Les inhibiteurs de corécepteurs se lient avec le corécepteur du VIH comme le CCR5 (maraviroc)[86] ou directement avec la protéine virale GP120 (fostemsavir)[87].

### 1.1.8.2.3 Les inhibiteurs de la protéase

Les inhibiteurs de la protéase agissent en bloquant l'enzyme de la protéase qui est nécessaire au virus dans son cycle de réplication afin de cliver et d'assembler les protéines virales. Il existe deux types d'inhibiteurs de la protéase. Les inhibiteurs de la protéase non peptidique (IPN) se lient directement à la protéase du VIH. Les inhibiteurs de la protéase peptidique (IPP) agissent en bloquant les sites actifs de la protéase, c'est le cas du ritonavir ou encore du saquinavir[88].

### 1.1.8.2.4 Les inhibiteurs d'intégrases

Les inhibiteurs d'intégrases agissent sur l'intégrase, une enzyme primordiale pour la phase d'intégration du VIH dans le génome de la cellule hôte. Ces inhibiteurs se lient à l'intégrase et bloquent son activité biologique[89], c'est le cas raltegravir et de l'elvitégravir (tous deux de

première génération) et également du bictégravir, du dolutégravir et du carbotégravir (de deuxième génération).

#### *1.1.8.2.5 Les inhibiteurs de capsid*

Le Lenacapavir est un inhibiteur à longue durée de vie de la capsid du VIH-1. Il s'attache directement aux sous-unités protéiques de la capsid du VIH-1. Il intervient dans différentes phases du cycle viral comme le transport nucléaire, l'assemblage virale, le relargage ou l'assemblage de la capsid[90, 91].

#### 1.1.8.3 Thérapie antirétrovirale combinée

Le concept de thérapie combinée a été démontré pour la première fois lors de la 11<sup>e</sup> conférence internationale sur le SIDA à Vancouver (Canada) en 1996. Elle consiste en l'utilisation de plusieurs molécules ayant différents impacts sur le cycle de réplication du VIH afin de réduire le risque de résistance et d'évasion virale. Au départ, les traitements consistaient en une combinaison d'INNTI et d'INTI afin de contrecarrer la transcriptase inverse du VIH. Avec le temps, les traitements ont inclus des inhibiteurs de protéase, de l'intégrase, des inhibiteurs d'entrée et des inhibiteurs de fusion. Il existe actuellement de nombreuses molécules et anticorps dans 6 classes permettant un grand nombre de combinaisons (voir Tableau 1).

#### 1.1.8.4 Traitements préventifs

La PrEP (Prophylaxie préexposition) est une méthode approuvée par la FDA depuis 2012 qui consiste en l'administration d'antirétroviraux de manière préventive. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a recommandé l'utilisation de la PrEP à partir de 2014, après la publication des premières études sur cette prophylaxie préexposition[92]. Elle repose sur l'utilisation d'agents antirétroviraux pour réduire les risques d'infection chez les personnes à risque comme les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HARSAH), les personnes en relation avec une personne vivant avec le VIH, les personnes prenant des drogues injectables ou encore les travailleurs du sexe. Elle consiste en l'utilisation d'une combinaison d'antirétroviraux comme l'emtricitabine et le tenofovir. Elle est particulièrement efficace chez les HARSAH car des concentrations plus élevées de PrEP ont été détectées dans les tissus rectaux, comparativement aux tissus vaginaux[93]. L'étude française IPERGAY a été publiée pour étudier la PrEP

intermittente avec tenofovir disoproxil et emtricitabine, par rapport à un placebo[94]. La PrEP intermittente a révélé une réduction significative du risque de contracter le VIH chez ces HARSAH ayant des comportements à risque (86 %, 95 % IC 40-99) par rapport au groupe placebo. L'efficacité était de 99% chez les individus prenant le médicament tel que prescrit.

## **1.2 Conséquences de l'infection chronique par le VIH :**

### **1.2.1 Inflammation chronique**

Nombres de cytokines jouent un rôle inflammatoire dans le corps dans le cadre de la réaction immunitaire. Ces cytokines reviennent à un niveau basal une fois le pathogène éliminé grâce à des contres mécanismes ayant pour but le maintien de l'homéostasie dans le corps. Cependant, dans le cadre d'infection chronique comme l'infection par le VIH, le système immunitaire reste toujours en alerte et les cellules impliquées continuent de sécréter des cytokines inflammatoires qui jouent alors un rôle délétère. Dans ce cas, on parle d'inflammation chronique. Cette inflammation persistante est due principalement à la translocation microbienne. Elle est une résultante de la forte déplétion immunitaire engendrée par le VIH-1 au niveau de la barrière intestinale[95]. Les cellules Th17 sont un sous type de cellules T CD4+ jouant un rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale notamment en défendant l'organisme contre les bactéries et les champignons[96]. Les cellules Th17 produisent IL-17 et IL-22 induisant la sécrétion de peptides antimicrobiens tels que la  $\beta$ -défensine 2 humaine (HbD-2) et la lipocaline-2 (LCN2) par les cellules épithéliales intestinales. Les cellules Th17 sont particulièrement sensibles à l'infection par le VIH-1[97]. La déplétion des Th17 et la reconstitution incomplète de cette population sous ART entraînent une atteinte prolongée de la défense immunitaire antimicrobienne[98]. La translocation microbienne est associée avec une augmentation de la perméabilité intestinale favorisant la libération de bactéries et de produits bactériens dans la circulation sanguine[99]. Cette dérégulation entraîne une activation immunitaire et participe ainsi à l'inflammation chronique en plus d'entraîner sa dysfonction et son épuisement[100]. Les taux plasmatiques de LPS (lipopolysaccharide) et de CD14 solubles, marqueurs de la translocation microbienne, sont augmentés chez les sujets infectés par le VIH non traités et traités[101]. Des études ont montré que la supplémentation quotidienne en probiotique chez des PVVIH n'étant

pas traitées par thérapie antirétrovirale était capable de réduire les niveaux de marqueurs inflammatoires dans le sérum, de réduire les niveaux d'activation des cellules immunitaires et de réduire la translocation microbienne[102, 103]. Les mêmes résultats ont été observés chez les PVVIH sous traitements antirétroviraux[104]. Chez les PVVIH, une dysbiose peut être observée quand une augmentation des germes pathogéniques se produit en comparaison à la flore commensale[105]. Une étude menée sur des PVVIH non traitées a observé une augmentation de l'abondance de bactéries du genre *Pseudomonadota* (anciennement *Proteobacteria*) et une diminution de l'abondance de *Bacillota* (anciennement *Firmicutes*) chez les PVVIH en comparaison à la population non-infectée[106]. Une telle modification d'équilibre engendre des changements dans l'homéostasie du tissu, dans le maintien de la perméabilité intestinale et dans la diminution de la présence d'acides gras à chaîne courte jouant un rôle anti-inflammatoire. Une étude a démontré que la prévalence d'*Enterobacteriaceae* et de *Streptococcus* était plus haute chez les personnes possédant de l'athérosclérose en comparaison à la population générale[107]. Chez les PVVIH, une étude a montré que les changements dans le microbiote pouvaient être associés avec le statut inflammatoire de l'hôte avec le genre *Collinsella* étant enrichi dans le microbiote des personnes avec de l'athérosclérose symptomatique tandis que les genres *Roseburia* et *Eubacterium* étaient enrichis dans le microbiote du groupe contrôle[108].

Les cytokines impliquées dans l'inflammation chronique sont multiples mais quelques-unes y jouent un rôle plus prépondérant, c'est notamment le cas du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6, de l'IL-1 $\beta$  et de l'IFN- $\gamma$ [109, 110].

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine inflammatoire majeure étant considéré comme le maître de l'inflammation. Cette molécule est produite principalement par les cellules hématopoïétiques, les macrophages et les lymphocytes T[111]. La production de TNF- $\alpha$  est augmentée par la liaison entre la GP120 et le récepteur CD4 à la surface des macrophages mais aussi en réponse à la protéine Nef dans ce même type cellulaire. L'expression du TNF- $\alpha$  est augmentée dans les ganglions lymphatiques, le plasma et le liquide céphalo-rachidien des personnes vivant avec le VIH. Les concentrations plasmatiques de TNF augmentent dans toutes les phases de l'infection par le VIH, et les niveaux circulants de récepteurs du TNF sont souvent utilisés comme indicateurs de l'activité du TNF *in vivo*[112]. Le TNF- $\alpha$  est également augmenté indirectement dans l'infection par le VIH par la translocation microbienne résultant de l'insulte subit par les

intestins lors de la primo-infection. La liaison du TNF à ses récepteurs déclenche plusieurs cascades de signalisation comme NF- $\kappa$ B, MAPK, ERK et JNK[112]. Le TNF- $\alpha$  joue un rôle dans la pathogenèse de l'athérosclérose en augmentant l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales via l'induction de l'expression de molécules d'adhérence cellulaires telles que ICAM-1 et la molécule d'adhérence cellulaire vasculaire-1 (VCAM-1)[113]. Il joue également un rôle dans le développement des maladies cardiovasculaires en modifiant le métabolisme des lipides et notamment en induisant une hypertriglycéridémie[114].

De hauts niveaux d'IL-6 ont été relevés dans le sang de patients atteints de maladies coronariennes en comparaison à la population générale[115]. L'interleukine 6 (IL-6) est une cytokine jouant un rôle crucial dans la réponse inflammatoire aiguë et chronique[116]. L'IL-6 est produite par de nombreuses cellules immunitaires comme les cellules T, les macrophages, les cellules dendritiques, les monocytes, les cellules B et non immunitaires comme les kératinocytes, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires[117, 118]. L'IL-6 peut engendrer la production d'autres cytokines inflammatoires tel que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . De hauts niveaux d'IL-6 ont été relevés chez des patients ayant eu une rupture de la plaque d'athérosclérose coronaire[119] l'associant donc à une progression plus rapide de la maladie ainsi qu'à une mortalité augmentée. L'augmentation des niveaux d'IL-6 dans l'aorte engendre une boucle de rétroaction positive avec un dysfonctionnement mitochondrial vasculaire et ces altérations favorisent le développement de l'athérosclérose[120]. Dans le contexte du VIH-1, l'IL-6 plasmatique est augmentée chez les PVVIH même sous traitement antirétroviral[121, 122].

L'interleukine 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) est une cytokine inflammatoire produite par différents types cellulaires qui peut provoquer la sécrétion d'autres cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6. L'IL-1 $\beta$  est produite par de nombreuses cellules immunitaires comme les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes, les cellules NK, les cellules B et T, les neutrophiles et les monocytes et non immunitaires comme les cellules endothéliales[123-125]. L'IL-1 $\beta$  joue un rôle sur les cellules endothéliales humaines en activant leurs fonctions inflammatoires comme leur expression de molécules d'adhérence, comme VCAM-1[126] et de chimiokines comme CCL-2 ou encore leur activité coagulante. Ces changements induisent une capacité augmentée des cellules endothéliales à recruter des monocytes, qui sont un type cellulaire clé dans le développement de l'athérosclérose. L'expression d'IL-1 $\beta$  est augmentée dans les artères

athérosclérotiques en comparaison aux artères saines et corrèle avec la sévérité de la maladie[127]. Dans le contexte du VIH-1, l'IL-1 $\beta$  est augmentée notamment dans le compartiment lymphatique et est associée avec la progression de la maladie[128].

L'IFN- $\gamma$  joue un rôle dans le développement de l'athérosclérose. Il impacte le recrutement des cellules immunitaires sur les sites d'accumulation de lipoprotéines et également le développement des plaques et leur stabilité[129, 130]. L'IFN- $\gamma$  modifie l'expression des protéines de transport du cholestérol comme les récepteurs capteurs ce qui favorise la formation de cellules spumeuses qui est un des premiers signes du développement de l'athérosclérose[131]. Il a été démontré que la stimulation de macrophages par l'IFN- $\gamma$  pouvait augmenter l'expression de ces récepteurs capteurs [132] tout en inhibant les protéines dites de transport inverse du cholestérol, ce qui résulte en l'accumulation de lipides et la formation de cellules spumeuses [133]. L'IFN- $\gamma$  est fortement produit par les cellules Th1[134] qui est le sous-type de lymphocyte T le plus répandu dans les plaques athérosclérotiques[135, 136]. L'IFN- $\gamma$  déclenche l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires dans de nombreuses cellules qui favorisent le recrutement de monocytes de la circulation sanguine vers les cellules endothéliales où il augmente l'expression de leurs molécules d'adhérence comme ICAM-1 et VCAM-1[137, 138].

#### 1.2.1.1 Inflammageing

L'inflammageing ou en français l'inflammation liée à l'âge peut être décrit dans une population âgée par une présence élevée de marqueurs inflammatoires, un risque augmenté de mort prématurée, une forte incidence de comorbidités et un risque augmenté d'invalidité et de faiblesse[139-142]. Plusieurs marqueurs inflammatoires sont augmentés chez les personnes âgées tel que l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et les CRP et ces marqueurs ont été identifiés dans le plasma et le sérum comme étant de forts prédictors de mortalité dans cette population dans de nombreuses études[143-145]. L'IL-1 $\beta$  a également été identifiée comme étant impliquée dans la pathogenèse de maladies liées à l'âge[146]. Dans le contexte du VIH, une augmentation de la circulation de CRP et d'IL-6 est prédictrice du développement de maladies liées à l'âge qui sont déjà plus prévalentes dans cette population en comparaison à la population générale[147-150]. Une étude réalisée en 2014[151] a cherché plus de biomarqueurs pouvant être associés avec le vieillissement et l'inflammation. Sur 19 biomarqueurs potentiels, 10 étaient significativement liés à l'âge. C'est le cas des CRP, de l'IL-1RA, de l'IL-6, de l'IL-10, de l'IL-15, de l'IL-18, de CCL4, de sGP130



et des sTNFR I et II. Cette étude nuance le dogme selon lequel le vieillissement augmente uniquement la production de médiateurs inflammatoires. En effet, une augmentation de l'expression de molécules anti-inflammatoires est observée parmi ces biomarqueurs suggérant que le processus de vieillissement engendre des contres mécanismes à l'inflammation pouvant dans une certaine mesure protéger les personnes contre l'inflammation de faible intensité[151].

#### 1.2.1.2 Sénescence cellulaire

La sénescence est un phénomène associé avec la diminution de la taille des télomères en conséquence d'un grand nombre de réplication de l'ADN[152]. Les télomères sont formés d'un complexe d'ADN et de protéines localisées à l'extrémité des chromosomes et qui avec la télomérase, jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du génome[153]. La taille moyenne des télomères ainsi que l'activité de la télomérase diminuent dans les lymphocytes avec l'âge[154]. La sénescence peut également être provoquée par diverses insultes tel que le stress oxydatif ou encore l'activation de signaux tumorigènes[155, 156]. La sénescence cellulaire engendre un phénotype similaire dans la plupart des cellules comprenant l'arrêt du cycle cellulaire, une augmentation de l'activité de la bêta galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$  Gal), des dégâts au niveau de l'ADN lorsque les télomères sont érodés et la sécrétion de cytokines inflammatoires comme IL-6 et IL-8[157]. Chez les PVVIH, les cellules T du sang périphérique présentent plus de signes de sénescence tels qu'une augmentation de l'expression de CD57 et une diminution de l'expression de CD28[158]. Dans cette population, on note un enrichissement de cellules effectrices et de cellules « terminally differentiated » démontrant une activation immunitaire déterminée par la co-expression d'HLA-DR et du CD38[159].

#### 1.2.1.3 Immunosénescence

L'immunosénescence peut être décrite comme un déclin de la fonction du système immunitaire engendrant une augmentation de la prévalence de comorbidités comme les cancers, les maladies cardiovasculaires, les infections et les maladies auto-immunes dans la population âgée[160, 161]. Elle est influencée par l'historique des expositions antigéniques d'un individu, le stress environnemental et les infections aigues ou chroniques[160]. Les maladies cardiovasculaires sont associées à l'immunosénescence par différents mécanismes. Les cellules T sénescents secrètent des cytokines pro-inflammatoires activant les macrophages ce qui engendre la dégradation de la

matrice cellulaire par le relargage de métalloprotéinases. Elles secrètent également des granzymes et des perforines engendrant des dégâts aux cellules endothéliales.[162, 163].

#### 1.2.1.4 Épuisement immunitaire

L'épuisement immunitaire est la résultante d'un dysfonctionnement d'un mécanisme normal ayant pour rôle de contrôler l'activation des cellules T afin de retrouver un niveau d'activation homéostatique[164]. Il est régulé par des inhibiteurs de checkpoint immunitaires incluant PD-1, CTLA4, LAG3 ou encore TIM3, entre autres [165]. Cependant, dans le cas où le pathogène ne peut être éliminé, ce processus s'intensifie et les cellules immunitaires entrent alors dans une phase dite d'épuisement cellulaire. Chez les cellules T CD8+, Cet état correspond à une perte de la capacité effectrice des cellules, la perte de l'expression d'IL-2, suivi par une perte de l'expression de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  et une co-expression augmentée de molécules inhibitrices[165, 166].

### **1.3 Conséquences de l'inflammation chronique sur le développement du vieillissement prématuré :**

La thérapie antirétrovirale combinée a fortement réduit la mortalité chez les PVVIH ce qui a induit une augmentation importante de leur espérance de vie[167]. Aux États-Unis en 2021, la proportion de PVVIH de plus de 50 ans était de 53%[168]. Un chiffre qui pourrait atteindre 73% d'ici à 2030 selon une étude[169]. Dans ce contexte, le vieillissement prématuré constitue un obstacle à l'augmentation de l'espérance de vie des PVVIH pour la rapprocher de celle de la population générale. Les PVVIH peuvent en effet montrer des signes de vieillissement accéléré même à un âge relativement jeune comme une occurrence prématurée du développement de maladies cardiovasculaires, d'atteintes cérébrales ou de cancer.

#### **1.3.1 Maladies cardiovasculaires**

Les PVVIH recevant un traitement antirétroviral sont en effet plus à risque en comparaison à la population générale d'être affecté par des infarctus du myocarde[170], des accidents vasculaires cérébraux[171] (un risque de 1.7[172]) et de l'insuffisance cardiaque[173] (une incidence de 2,8% supérieure[174]), des pathologies liées au développement de l'athérosclérose[175]. Des études ont démontré que parmi les patients âgés, le risque de développer des maladies cardiovasculaires augmente à la fois chez les PVVIH et dans la population générale mais que le

risque était plus grand chez les PVVIH[176, 177]. Dans une étude de 2007 et dans une population de PVVIH, il a été montré que le taux d'infarctus du myocarde passait de 0,27 pour 1000 personnes par ans chez des individus de 25 à 30 ans à 16,99 pour 1000 personnes par ans chez des individus d'âge supérieur à 70 ans. L'athérosclérose joue un rôle majeur dans l'occurrence des maladies cardiovasculaires et son étude est d'une importance capitale pour réduire la prévalence des maladies cardiovasculaires chez les PVVIH[178].

La formation des plaques d'athérosclérose commence par l'accumulation de LDL-oxydées (ox-LDL) dans la paroi artérielle et plus précisément dans l'intima[179]. Cette rétention provoque une inflammation locale avec un afflux de monocytes qui se différencient en macrophages. Ils accumulent le cholestérol intracellulairement et produisent des médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs inflammatoires incluent IL-6 qui déclenche l'activation de la phase de réponse aigue au niveau du foie et augmente la circulation de CRP dans l'organisme[180]. Les cellules vasculaires musculaires lisses jouent également un rôle dans le développement de l'athérosclérose. Dans les lésions athérosclerotiques avancées, il est considéré que plus le ratio de ces cellules en comparaison aux macrophages est élevé, plus la plaque sera stable[181]. Il était soupçonné depuis plusieurs dizaines d'années que les cellules vasculaires musculaires lisses possédaient la capacité de se transdifférencier vers un phénotype proche des macrophages afin de stocker des lipides[182], des études ont pu confirmer cette affirmation[183, 184]. Plusieurs types de cellules immunitaires jouent un rôle important dans le développement de l'athérosclérose (Figure 8).

Les monocytes jouent un rôle important dans le développement de l'athérosclérose, après leur attraction et leur migration trans-endothéliale, ils se différencient en macrophages sur les sites inflammatoires, accumulent des lipides (LDL-oxydées) par phagocytose et forment les cellules spumeuses [185]. Les monocytes engendrant cette réponse font majoritairement partie du sous-type dit « classique » qui se caractérise par une forte expression de CCR2 et une faible expression de CX3CR1. Il a été montré que ce sous-type de monocytes infiltre rapidement les tissus inflammés tout en participant à l'inflammation chronique[186]. Ces cellules spumeuses peuvent jouer un rôle dans la déstabilisation de la plaque en sécrétant des métalloprotéinases de la matrice (MMPs) et en dégradant les fibres de collagène dans la matrice extracellulaire de la plaque [187, 188]. La résolution de l'inflammation au niveau des plaques d'athéroscléroses ne peut se faire à

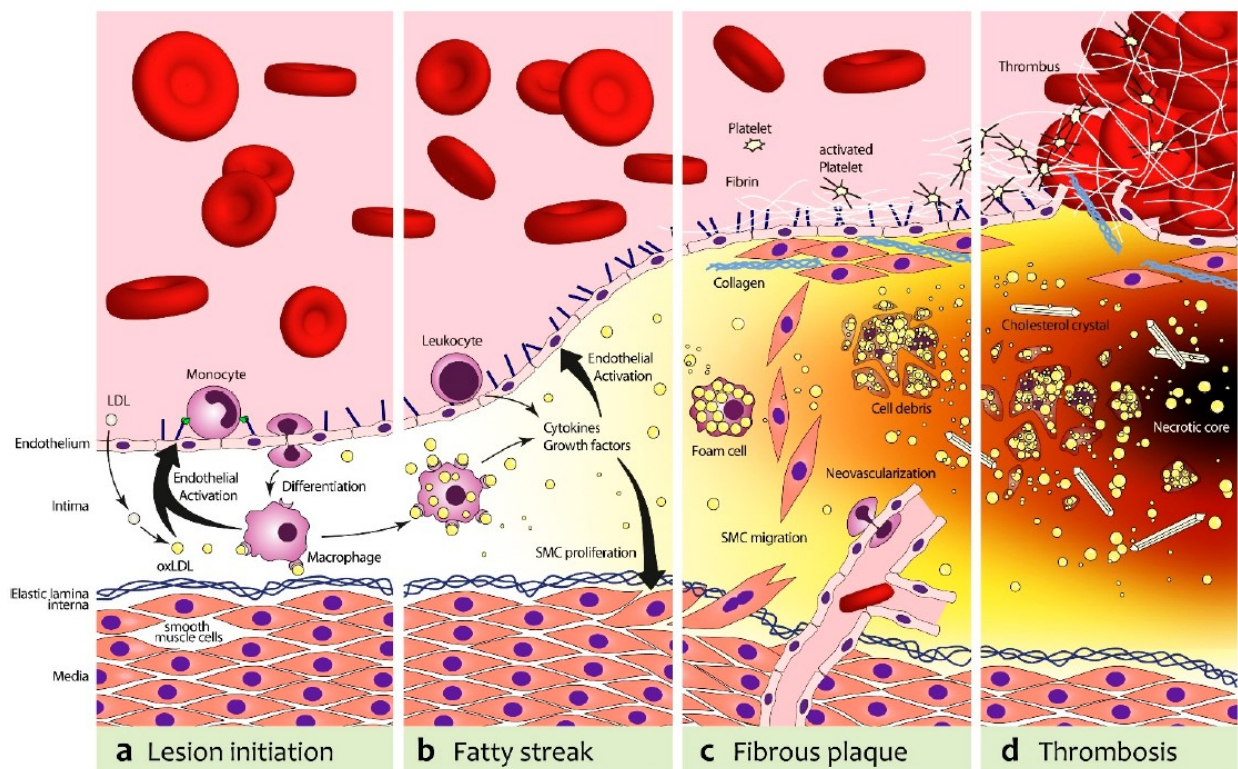
cause de la persistance des corps apoptotiques des cellules ayant accumulé des lipides engendrant une inflammation chronique localisée et persistante.

Les neutrophiles sont impliqués dans le développement de l'athérosclérose. Ils sont recrutés au niveau des artères par la liaison du CCL5 avec CCR1 et CCR5, et de l'adhérence ferme avec CCR2 et CXCR2[189]. L'infiltration de neutrophiles est associée à des lésions tissulaires dans une grande variété de contextes cliniques, y compris les lésions pulmonaires aiguës, les infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux[190, 191]. Les neutrophiles sont capables d'activer des pièges extracellulaires. Ce processus commence par l'activation des récepteurs de surface qui modifie la perméabilité de la membrane plasmique, la réorganisation du cytosquelette et de l'enveloppe nucléaire et l'assemblage de protéines antimicrobiennes comme des histones, des protéines granuleuses et des protéines cytosoliques sur la chromatine[192, 193]. Le piège extracellulaire extériorise l'ADN nucléaire et mitochondrial[194]. Ce processus permet de limiter la dissémination des pathogènes en les capturant. Lorsque les pièges extracellulaires des neutrophiles se retrouvent dans les artères, ils peuvent contribuer à la formation de thrombus en exerçant des activités pro-coagulantes et pro-thrombotiques et pouvant entraîner une thrombose veineuse et artérielle[195]. C'est un mécanisme délétère retrouvé dans les maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose et les accidents vasculaires cérébraux[196]. De plus, les histones contenues dans ces pièges extracellulaires stimulent les monocytes[197] et les cellules endothéliales[198], deux types cellulaires jouant un rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose.

Les cellules T sont également recrutées sur les lieux d'inflammation et peuvent être retrouvées dans les plaques d'athérosclérose[199]. Des cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> sont présentes dans les plaques bien que la majorité des cellules soient des T CD4<sup>+</sup>. Ces cellules T CD4<sup>+</sup> peuvent alors se différencier en Th1 et produire des cytokines inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$ , IL12 et IL-18 jouant un rôle délétère dans le développement de l'athérosclérose[200]. Des cellules T CD8<sup>+</sup> ont été retrouvées dans des lésions athérosclérotiques dans un modèle murin[201]. Les cellules T CD8<sup>+</sup> retrouvées dans les lésions athérosclérotiques présentent un phénotype mémoire en exprimant CD45RO et VLA-1[202]. Peu d'information permet de déterminer comment les cellules T CD8<sup>+</sup> se retrouvent dans les plaques. Une étude chez l'humain a récemment identifié un sous type de cellules T CD8<sup>+</sup> exprimant le récepteur CX3CR1, ce qui pourrait expliquer le

recrutement de ce sous type par les cellules endothéliales produisant CX3CL1[203]. Deux études ont déplétées les cellules T CD8+ dans un modèle murin développant de l'athérosclérose ce qui a permis d'observer une diminution importante du développement des lésions athérosclerotiques après 8 semaines de nourriture enrichie en lipides. Ces études ont également mis en évidence une diminution du CCL-2 circulant, logiquement associée avec une diminution du nombre de macrophages accumulés dans les plaques d'athérosclérose. Enfin, une diminution de la taille du cœur nécrotique a pu être observé dans les plaques, suggérant un rôle cytotoxique des cellules T CD8+ dans ce contexte[201, 204].

Dans le contexte du VIH-1, en plus de l'inflammation chronique jouant un rôle majeur, une augmentation des niveaux des espèces réactives de l'oxygène (ROS)[205], notamment par l'effet de la protéine régulatoire Nef provoque la dysfonction des cellules endothéliales[206].



**Figure 8. –** Pathogenèse de l'athérosclérose

Présentation schématique de la pathogenèse de l'athérosclérose présentant les différents stades de développement des lésions, le stade d'initiation, le stade de strie lipidique, le stade de plaque fibreuse et le stade de thrombose. Source: *Stein DC, Kaufmann BA. Ultrasound imaging for risk assessment in atherosclerosis. Int J Mol*

### 1.3.1.1 Les facteurs de risques dans le développement des maladies cardiovasculaires

#### *1.3.1.1.1 Hypertension*

L'hypertension est un facteur de risque majeur dans le développement des maladies cardiovasculaires. Approximativement un adulte sur 4 développe de l'hypertension[207]. Une étude a conclu que le risque de développer une maladie cardiovasculaire augmente en fonction de la pression systolique[208]. Une méta analyse a conclu que l'hypertension artérielle est associée à un risque augmenté de développer des maladies coronariennes, de l'insuffisance cardiaque, des accidents vasculaires cérébraux et une insuffisance rénale[209]. Chez les PVVIH, la prévalence de l'hypertension est augmentée et de nombreuses études se sont intéressées à comprendre pourquoi sans trouver de lien direct avec le traitement antirétroviral[210]. Il ressort néanmoins de ces études que certains facteurs de risques liés aux habitudes de vie impactant l'hypertension sont plus présents chez les PVVIH en comparaison à la population générale comme la consommation de tabac, de même que certaines comorbidités comme le diabète et les maladies rénales chroniques[210]. Certaines études suggèrent également que la dysfonction des cellules endothéliales liée à l'infection et/ou au traitement par antirétroviraux pourrait contribuer au développement de l'hypertension chez les PVVIH[211].

#### *1.3.1.1.2 Anomalies lipidiques*

Les anomalies lipidiques sont un facteur de risque important dans le développement des maladies cardiovasculaires, il a en effet été montré que des taux élevés de lipoprotéines de basse densité (LDL) et des taux bas de lipoprotéines de haute densité (HDL) sont associés à un risque augmenté de développer des maladies cardiovasculaires[212]. Dans le contexte du VIH, il a été déterminé que la thérapie antirétrovirale combinée pouvait induire des lipodystrophies et de la dyslipidémie[213]. Chez les PVVIH une augmentation des lipoprotéines de basse densité oxydées (oxLDL) est observée, contribuant à l'apparition de cellules spumeuses inflammatoires[214] résultant de l'internalisation de oxLDL par les macrophages et à la formation des plaques d'athérosclérose.

#### *1.3.1.1.3 Consommation de tabac*

Beaucoup d'études ont mis en avant le lien entre le tabagisme et les maladies cardiovasculaires depuis de nombreuses années. Ces études rapportent un risque d'infarctus du myocarde 4,5 fois plus grand et d'un risque de maladies coronariennes 2 fois plus élevé chez les fumeurs en comparaison de la population générale[215, 216]. La prévalence des fumeurs parmi les PVVIH est supérieure à la population générale et oscille entre 40 et 80 % selon les différentes études sur le sujet[217, 218]. Nombre de complications sont associées à la consommation de tabac chez les PVVIH comme une forte prévalence de problèmes pulmonaires incluant le cancer du poumon[219]. Globalement, des études reportent une perte de la qualité de vie chez les fumeurs vivant avec le VIH[220]. La consommation de tabac chez les PVVIH est un facteur de risque cardiovasculaire important et il a été montré que l'arrêt de la consommation de tabac dans cette population serait d'une importance capitale pour impacter positivement sa santé cardiovasculaire[221].

#### *1.3.1.1.4 Obésité*

L'obésité est associée à une augmentation significative du risque cardiovasculaire. Elle augmente le risque de développer une maladie coronarienne ayant pour origine l'accumulation de plaque à l'intérieur de la paroi des artères, le risque d'accident vasculaire cérébrale (AVC) et le risque de développer de l'insuffisance cardiaque[222]. De plus l'obésité entraîne une inflammation chronique qui accélère le développement de l'athérosclérose[223]. Les adipocytes peuvent en effet produire des cytokines inflammatoires telles qu'IL-6, IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  ainsi que des chimiokines comme CCL2[224] qui jouent un rôle délétère dans le développement de l'athérosclérose[225]. Chez les PVVIH, l'accumulation de graisse viscérale est un facteur important de morbidité[226] et l'accumulation de graisse sous-cutanée corrèle avec des marqueurs d'inflammation comme le TNF- $\alpha$  dans cette population, surtout dans un contexte de diabète[227].

#### *1.3.1.1.5 Diabète*

Le diabète impacte significativement le risque de développement de maladies cardiovasculaires. Les personnes atteintes par le diabète de type 2 ont jusqu'à 4 fois plus de risque de développer une maladie cardiovasculaire en comparaison à la population générale[228, 229]. De plus, le diabète cause une inflammation chronique et une dysfonction endothéliale accélérant le

développement de l'athérosclérose[230]. Chez les PVVIH, des études suggèrent que le traitement par thérapie antirétrovirale et notamment par des inhibiteurs de la protéase augmente les dérèglements métaboliques et le développement du diabète de type 2[231]. La prévalence du diabète chez les PVVIH est de 10,3% en comparaison à la population générale qui est à 8.3%[232].

#### *1.3.1.1.6 Maladie rénale chronique*

La prévalence des maladies rénales chroniques est en augmentation mondialement et est liée au développement des maladies cardiovasculaires[233]. Il a été montré que les patients avec des maladie rénale de stade 4 et 5 sont plus à risque d'avoir des événements cardiovasculaires graves[234]. Les maladies rénales chroniques sont fréquentes chez les PVVIH [235]. Les mécanismes par lesquels les maladies rénales chroniques peuvent contribuer au risque cardiovasculaire dans le cadre de l'infection par le VIH restent incertains mais il a été démontré que les maladies rénales chroniques et l'albuminurie sont associées aux maladies cardiovasculaires et à la mortalité chez les personnes infectées par le VIH[236]. Une étude suggère que les effets néfastes de la fonction rénale réduite sur le contrôle de la pression artérielle, l'inflammation, la résistance à l'insuline et la dyslipidémie pourrait être des causes du développement de l'athérosclérose chez les PVVIH[237].

#### *1.3.1.1.7 Toxicité des traitements*

Il a été suggéré que les inhibiteurs de la protéase jouent un rôle important dans la lipolyse et que les INTIs sont responsables d'une toxicité mitochondriale[238]. Parmi ceux-ci l'abacavir a été associé à un risque accru de maladies cardiovasculaires. Après l'implémentation des inhibiteurs de la protéase dans le traitement antirétrovirale, des rapports ont commencé à lier leur utilisation avec le développement de diabète ou une aggravation d'un diabète préexistant [239, 240] et le développement d'une résistance à l'insuline[241, 242]. La dyslipidémie est également un problème récurrent chez les personnes traitées par thérapie antirétrovirale. Une étude a détecté une augmentation des taux de triglycérides ou de cholestérol chez jusqu'à 74 % de leurs patients recevant un traitement par inhibiteur de la protéase (IP)[243]. De plus, des taux de lipides plus élevés ont été décrits chez les patients recevant des INNTI, et des taux élevés de triglycérides ont été trouvés chez les patients non traités par inhibiteur de la protéase et traités par des INTI[244,



245]. Les conséquences des effets métaboliques du traitement antirétroviral contribuent à une prévalence accrue des maladies cardiovasculaires, majoritairement de l'athérosclérose[246].

#### *1.3.1.1.8 Usage de drogues*

Il y a une forte prévalence de personnes s'injectant des drogues parmi les PVVIH en comparaison à la population générale. L'injection de drogue est un vecteur majeur de maladies transmises par le sang. Il est estimé que 17.8% des personnes s'injectant des drogues sont des PVVIH. Il est également estimé que 52% des personnes s'injectant des drogues sont infectées par l'hépatite C[247]. L'utilisation de drogues injectables peut générer de l'inflammation via les blessures causées par l'injection ou les infections y étant associées[248, 249]. Il a également été montré que les personnes s'injectant des drogues quotidiennement avaient des niveaux d'IL-6 plus élevés que les personnes n'ayant injecté aucune drogue dans les six derniers mois[250], une cytokine jouant un rôle dans le développement des maladies cardiovasculaires.

### **1.3.2 Atteintes cérébrales**

Le VIH-1 est transporté jusqu'au cerveau par les monocytes[251] environ deux semaines après l'infection[252]. Avant le développement de la thérapie antirétrovirale combinée, 50% des patients atteints par le VIH-1 développaient de la démence associée au VIH (HAD)[253]. Depuis l'implémentation de la thérapie antirétrovirale combinée la population vivant avec le VIH n'a cessé de gagner en âge et l'incidence des conditions neurologiques associées au VIH-1 a été fortement diminuée[254]. Cette population étant plus sujette à des comorbidités liées à l'âge, elle présente également un risque plus élevé de dysfonctionnements cognitifs[255]. En effet les protéines régulatrices du VIH sont impliquées dans le développement de la HAD notamment Nef, Tat, Env et Vpu[256-259]. Une étude a montré que les personnes vieillissant avec le VIH ont de moins bonnes performances en ce qui concerne l'attention, les capacités psychomotrices, l'attention visuelle, et la capacité à exécuter une tâche en comparaison à la population générale[260]. Cette atteinte du système nerveux est liée à de multiples facteurs imputables à la présence du pathogène viral mais également à la toxicité des traitements, à la présence de comorbidités, à l'état psychologique, au style de vie et à l'âge (Tableau 2). L'inflammation joue également un rôle important dans le développement de la HAD. Les niveaux de TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-6 corréleront avec la gravité des neuropathologies[261, 262].

La dépression est 2 ou 3 fois plus commune chez les personnes vivant avec le VIH en comparaison à la population générale[263]. Cette forte prévalence est multifactorielle, elle inclut le stress de vivre avec une maladie chronique, le choc du diagnostic, la stigmatisation, et la difficulté d'accès à des supports sociaux[264, 265].

Factor	Clinical risk factor	Pathogenic mechanisms
Viral factors	Systemic antiretroviral treatment failure Cerebrospinal fluid escape History of advanced immunosuppression	Ongoing HIV replication in the CNS leading to CNS cell damage CNS cell damage due to HIV sustained prior to ART (legacy effect)
Neuroinflammation Antiretroviral drug toxicity	Longer duration of untreated HIV disease Specific antiretroviral agents with known toxicities e.g., efavirenz	Persistent CNS immune and glial cell activation Multiple potential mechanisms
Comorbid conditions	Cardiovascular risk factors, in particular hypertension Hepatitis C seropositivity	Cerebrovascular disease Mechanisms unclear
Mental health conditions Lifestyle factors Age	Depression, anxiety, and stress Recreational drug use and other lifestyle factors Ageing	Psychological and/or organic factors Multiple mechanisms Neurodegeneration Cerebrovascular disease

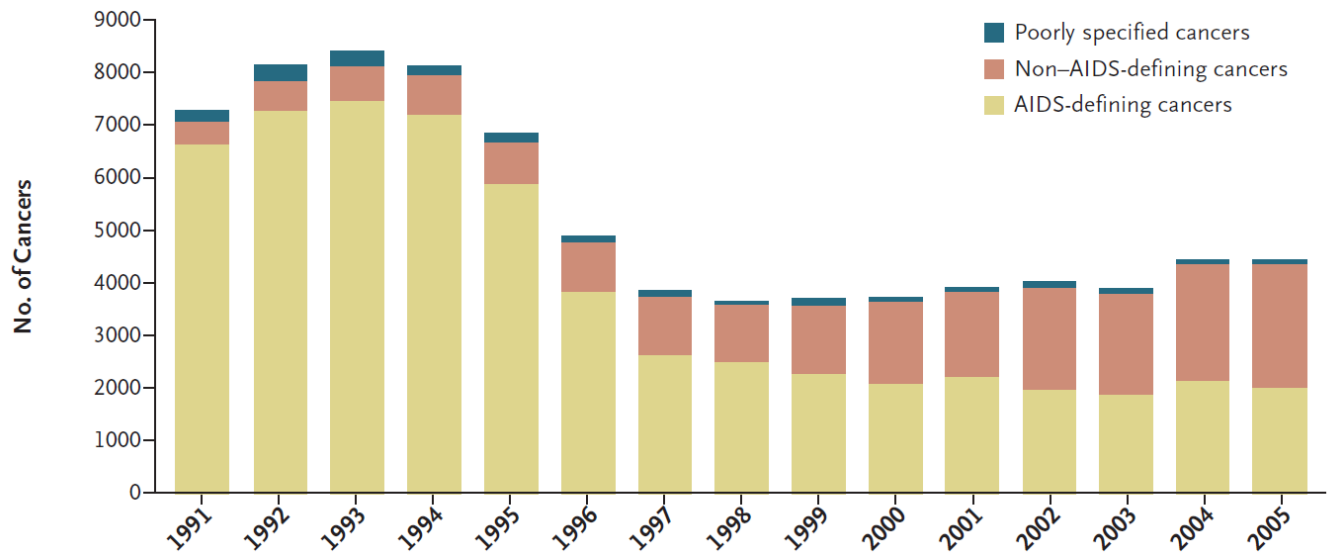
ART, antiretroviral therapy; CNS, central nervous system; IRIS, immune reconstitution inflammatory syndrome.

**Tableau 2.** – Résumé des principaux facteurs impliqués dans les atteintes cognitives liées au VIH-1

Tableau montrant les liens entre les facteurs de risques et les mécanismes pathogéniques engendrant des atteintes cognitives chez les PVVIH. *Source* : Nightingale S, Winston A. *Measuring and managing cognitive impairment in HIV. AIDS. 2017 Jun 1;31 Suppl 2:S165-S172. doi: 10.1097/QAD.0000000000001402. PMID: 28471947.*

### 1.3.3 Cancer

Les PVVIH ont plus de risque de développer des cancers en comparaison à la population générale bien que le traitement par thérapie antirétrovirale combinée ait significativement diminuer leur incidence[266] (Figure 9). Malgré tout, le risque relatif de développer un cancer reste 1.7 fois plus élevé pour une PVVIH. Jusqu'à 20% des décès de PVVIH sont causés par des cancers et le taux de survie dans cette population est inférieur à la population générale[266, 267]. On distingue deux types de cancer touchant les PVVIH, d'un côté les cancers définis par le VIH et les cancers non-définis par le VIH.



**Figure 9. –** Cancer chez les PVVIH aux États Unis

Graphique montrant l'estimation du nombre de cancers chez les PVVIH aux États-Unis entre 1991 et 2005 et séparé entre les cancers définis par le VIH, les cancers non-définis par le VIH et les cancers non spécifiques. *Source : Yarchoan R, Uldrick TS. HIV-Associated Cancers and Related Diseases. N Engl J Med. 2018 Mar 15;378(11):1029-1041. doi: 10.1056/NEJMra1615896. PMID: 29539283; PMCID: PMC6890231.*

#### 1.3.3.1.1 Cancers définis par le VIH

Les cancers définis par le VIH sont distingués des autres types de cancers chez les PVVIH, les plus courants sont le cancer invasif du col de l'utérus, le lymphome non Hodgkinien ou encore le sarcome de Kaposi[268]. Le risque pour une PVVIH de développer un cancer défini par le VIH reste élevé malgré le traitement par thérapie antirétrovirale combinée et est proportionnel au compte de T CD4+ et à la charge virale[269, 270]. Ce genre de cancer répond mieux au traitement par chimiothérapie quand il est administré pendant la thérapie antirétrovirale combinée[271].

#### 1.3.3.1.2 Cancers non-définis par le VIH

Les cancers non définis par le VIH ont plus de risques de se développer chez les PVVIH, représentent 2/3 des cancers dans cette population et sont deux fois plus fréquents que les cancers définis par le VIH[148]. Leur incidence est expliquée par les cancers d'origine virale notamment ceux liés aux virus de l'hépatite B et C, le virus d'Epstein-Barr et le papillomavirus[267]. Cette

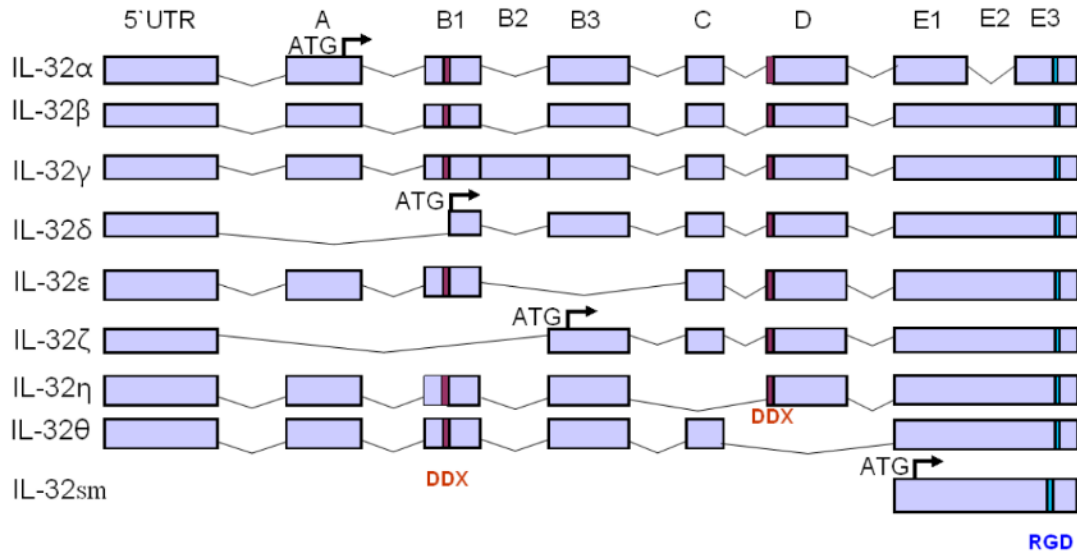
incidence est également expliquée par un impact plus marqué de facteurs de risque comme le tabagisme et l'usage de drogue.

## **1.4 Nouvel acteur de l'inflammation chronique dans le contexte du VIH : Interleukine 32**

Étant donné le rôle de l'inflammation chronique persistante dans le contexte de l'infection par le VIH-1 et sa contribution au développement des comorbidités listées ci-avant, il est d'une grande importance de continuer à identifier de nouveaux médiateurs inflammatoires afin de comprendre leurs mécanismes d'actions et éventuellement des moyens de bloquer leur impact.

### **1.4.1 Découverte de l'IL-32**

L'IL-32 est une cytokine pro-inflammatoire découverte après la stimulation d'une lignée cellulaire NK par l'IL-2 et des mitogènes[272]. A sa découverte, elle fut d'abord baptisée NK4 Transcript. Il a été rapidement suggéré que NK4 Transcript pourrait jouer un rôle dans l'adhérence cellulaire de par la présence d'un site RGD (Arg-Gly-Asp) dans sa structure[273]. La protéine recombinante pour NK4 transcript a été synthétisée et a mené à l'identification d'un potentiel d'induction de cytokines inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) et d'activation du signal de transduction par NF- $\kappa$ B and p38 MAPK dans une lignée monocytique. NK4 transcript est ensuite renommé Interleukine 32 bien qu'il ne partage aucune homologie avec les cytokines connues[274]. La localisation génomique d'IL-32 a montré que son gène se situait sur le chromosome 16 p13.3 et se composait de 8 exons. Il a été découvert qu'IL-32 est exprimé en de multiples isoformes générées par épissage alternatif[275]. Neuf isoformes d'IL-32 générées par épissage alternatif ont été identifiées (IL-32 $\alpha$ , IL-32 $\beta$ , IL-32 $\gamma$ , IL-32D, IL-32 $\epsilon$ , IL-32 $\zeta$ , IL-32 $\eta$ , IL-32 $\theta$  et IL-32 small) (Figure 10). Les fonctions des isoformes de l'IL-32 ne sont pas toutes clairement établies. Les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont les plus étudiées et des études ont montré des fonctions différentes pour ces isoformes. IL-32 a été identifié dans d'autres mammifères mais n'est pas conservé chez les rongeurs, ce qui rend son étude sur les modèles animaux difficile[274]. Le récepteur d'IL-32 n'a pas encore été découvert bien que plusieurs liaisons protéiques aient pu être identifiées avec les intégrines  $\alpha$ V $\beta$ 3 et  $\alpha$ V $\beta$ 6 et la Protéinase 3[276].



**Figure 10. –** Isoformes d'IL-32

Représentation graphique montrant les 9 isoformes d'IL-32 obtenues par épissage alternatif (IL-32 $\alpha$ , IL-32 $\beta$ , IL-32 $\gamma$ , IL-32 $\delta$ , IL-32 $\epsilon$ , IL-32 $\zeta$ , IL-32 $\theta$ , IL-32 and IL-32 small). *Source : Hong JT, Son DJ, Lee CK, Yoon DY, Lee DH, Park MH. Interleukin 32, inflammation and cancer. Pharmacol Ther. 2017 Jun;174:127-137. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.025. Epub 2017 Feb 14. PMID: 28223235.*

## 1.4.2 Effets de l'IL-32 sur les cellules immunitaires et non-immunitaires

Dès que les protéines recombinantes ont été disponibles, de nombreuses études ont été publiées sur les effets des isoformes de l'interleukine 32 sur différents types cellulaires. Ces études ont été majoritairement menées sur les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , seules disponibles commercialement. Des études sur des monocytes, des macrophages dérivés des THP-1 et des macrophages dérivés des monocytes ont montré la capacité de l'IL-32 $\gamma$  à provoquer l'activation des voies de signalisation ERK1/2, Akt et la tyrosine-protéine kinase Fyn induisant la production d'IL-6, d'IL-8, du TNF- $\alpha$ , de CXCL-1 et CCL-2[277]. Une autre étude utilisant IL-32 $\gamma$  pour stimuler la lignée THP-1 a montré son potentiel à activer les voies de signalisation NF- $\kappa$ B, la caspase-1 et le p38 induisant la production d'IL-8, d'IL-6, d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$ [278]. Une étude conduite sur les éosinophiles a démontré que leur traitement par NOD-1 et NOD-2 et IL-32 $\gamma$  induisait la production de chimiokines (CCL-3, CCL-4 et CXCL-8), de cytokines (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) et de molécules d'adhérence (intégrine bêta 2 et ICAM-1)[279]. Cet effet synergétique de NOD-1 et NOD-2 avec IL-32 $\gamma$  a pu être aboli par l'utilisation d'un inhibiteur de la protéinase 3 (PR3) suggérant l'importance de l'interaction de PR3 et IL-32 $\gamma$  pour l'activité biologique de ce dernier sur les

éosinophiles[279]. Il a été montré dans une étude que l'IL-32 induit par IL-1 $\beta$  engendrait à son tour une augmentation dans l'expression d'IL-1 $\alpha$ , IL-8, IL-6 et ICAM-1 dans les cellules endothéliales[280]. De plus il a été montré que l'IL-32 $\beta$  intracellulaire joue un rôle prépondérant dans les cellules endothéliales en contrôlant l'expression des molécules d'adhérence induite par l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ [281]. Le rôle de l'IL-32 $\beta$  demeure néanmoins sujet à débat concernant son rôle pro ou anti-inflammatoire car certaines études rapportent un rôle anti-inflammatoire de l'IL-32 $\beta$  par sa capacité à induire IL-10[282, 283]. IL-32 $\beta$  joue un rôle pro-inflammatoire par sa capacité à induire le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 dépendamment des contextes[282]. IL-32 $\theta$  a la capacité d'inhiber TNF- $\alpha$  dans un contexte de leucémie myéloïde aigue[284] mais une étude récente a démontré que cette isoforme a un fort potentiel d'induction de cytokines pro inflammatoires en comparaison aux autres isoformes d'IL-32, notamment dans des cellules pulmonaires humaines et de souris[285].

### **1.4.3 Induction d'IL-32**

Les transcrits d'IL-32 peuvent être retrouvés dans divers cellules immunitaires, non-immunitaires, tissus et organes comme la prostate, le placenta, l'intestin grêle, le cerveau, les leucocytes, les reins, les poumons, le colon, le cœur, le foie, le pancréas, le thymus, la rate et les muscles[274, 286, 287]. L'IL-32 peut être induite par différents médiateurs inflammatoires et par la présence d'infections bactériennes et virales (Tableau 3). L'induction d'IL-32 dans les cellules immunitaires a été documentée dans nombres d'études depuis sa découverte. Les mitogènes ont montré un potentiel d'induction d'IL-32 dans les PBMCs[274]. L'induction d'IL-32 par des cytokines inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$ , IL-18 et IL-1 $\beta$  a été démontrée dans une lignée de cellules épithéliales de même que par l'IL-12 dans les NK et les cellules T CD4+[274, 287]. Le GM-CSF induit IL-32 dans les éosinophiles en activant la voie de signalisation de la caspase-1[278, 288]. IL-32 est induit par l'activation des voies de signalisation Jak/STAT et NF- $\kappa$ B après stimulation de monocytes par le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ [289]. Il est également induit dans les fibroblastes synoviaux par l'activation des voies de signalisation Syk/PKC-d/JNK/c-J un après traitement avec le TNF- $\alpha$ [290].

#### 1.4.3.1 Induction et rôle dans les infections virales

IL-32 peut également être induite par différents agents pathogènes. IL-32 est induite dans le cas d'infections virales par le TLR3 de même que par les protéines virales de la grippe dans les cellules épithéliales. Cette observation a été conduite à la fois *in vivo* et *in vitro* dans la lignée cellulaire épithéliale pulmonaire A549[291-293]. IL-32 peut également être induite par les virus de l'hépatite C (VHC) et B (VHB)[289]. L'expression d'IL-32 est ainsi augmentée dans le sérum des patients atteints par le virus de la grippe A H5N1. Une corrélation a été observée entre les niveaux d'ARNm d'IL-32 exprimés dans le foie de patients infectés de manière chronique par l'hépatite C et le degré d'inflammation, de fibrose et de stéatose de leur foie. *In vitro*, l'infection de la lignée cellulaire Huh-7.5 par le virus de l'hépatite C induit l'expression d'IL-32[289]. Dans le contexte du virus de l'herpès de type 2, il a été montré que les cellules T CD8<sup>+</sup> de la muqueuse génitale associée avec le contrôle viral expriment fortement l'IL-32[294]. IL-32 est induite dans le contexte de l'infection par le VIH-1. Le niveau d'expression d'IL-32 totale est augmenté dans le sérum des patients vivants avec le VIH-1[295]. Une augmentation de l'expression d'IL-32 a été observée dans l'intestin et les ganglions lymphatiques à différents stades de l'infection[296]. L'expression de toutes les isoformes de l'IL-32 est significativement augmentée dans les PBMC des PVVIH traitées par rapport au groupe contrôle. Cette étude a également montré que l'IL-32 $\beta$  représente l'isoforme la plus exprimée dans les lymphocytes T et les cellules NK. [297]. L'IL-32 plasmatique est diminuée par le traitement contre le VIH-1 mais elle demeure plus élevée chez les patients infectés par le virus par rapport au groupe contrôle[76]. Certaines études ont montré qu'IL-32 $\gamma$  pourrait augmenter la réplication du VIH-1 en constatant que les niveaux d'infection étaient significativement accrus dans les cellules T CD4<sup>+</sup> stimulés en présence d'IL-32 $\gamma$ , tandis que des niveaux d'infection semblables à ceux des cellules témoins non traitées étaient obtenus après stimulation avec l'IL-32 $\alpha$ [298]. Une autre étude au contraire a montré que le siRNA pour IL-32 augmente la réplication dans la lignée cellulaire Jurkat suggérant un rôle antiviral d'IL-32 dans le contexte du VIH[295]. Il a également été montré qu'IL-32 $\gamma$  peut réactiver le VIH-1 dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> isolés chez des sujets traités par thérapie antirétrovirale[297]. Une étude a montré une augmentation de la réplication du VIH dans la lignée cellulaire monocytique U1 après le silençage génique des gènes de l'IL-32 et a déterminé que cet effet était médié par un mécanisme dépendant de l'IFN- $\alpha$ . De plus dans la même étude, il a été démontré que le silençage génique d'IL-32 augmentait la présence de la protéine p24 de 4 fois dans les PBMC[299]. Une

seconde étude a montré que l'activité des séquences terminales longues répétées (LTR) du VIH-1 était augmentée jusqu'à six fois quand l'IL-32 endogène était réduit[295]. Le rôle antiviral d'IL-32 a également été démontré dans le cadre de l'infection par le virus de la grippe H5N1 suggérant que la production virale est fortement inhibée par IL-32 $\gamma$ , modérément affectée par IL-32 $\zeta$  et IL-32 $\beta$  et peu affectée par IL-32 $\delta$  et IL-32 $\epsilon$ . Dans cette même étude, il a été montré qu'IL-32 $\gamma$  endogène impact négativement la production de ARNm, d'ARNc et d'ARNv du virus de la grippe A H5N1 et qu'IL-32 $\gamma$  exogène inhibe sa réplication[300]. Il a été montré que l'IL-32 endogène protège contre les virus à ADN et ARN comme l'herpès de type 2 (HSV2)[301].

#### 1.4.3.2 Induction et rôle dans les infections bactériennes

IL-32 est induit dans différentes infections bactériennes. De nombreuses recherches liant IL-32 et la tuberculose (TB) ont été menées. L'infection de PBMC ou de macrophages humains par *M. tuberculosis* induit la production d'IL-32[302, 303]. Le silençage génique de l'IL-32 endogène dans la lignée monocytique THP-1 a significativement diminué la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , et IL-8 entraînant un effet délétère pour combattre l'infection[303]. Un des mécanismes antimycobactérien supposés d'IL-32 serait lié à sa capacité à induire l'apoptose des cellules infectées par la voie de la caspase-3. IL-32 $\gamma$  induit la production d'IFN $\gamma$  ce qui augmente l'expression du récepteur de la vitamine D, menant à l'expression de la cathelicidine et de la  $\beta$ -defensin-2, deux peptides anti-microbiaux intracellulaires[304]. L'expression d'IL-32 est augmentée dans les poumons réséqués des patients atteints de TB. Cela indique un potentiel rôle protecteur d'IL-32 *in vivo* contre la TB[305]. Il a été montré que la stimulation de PBMC humains par le BCG provoquait la production d'IL-32[306]. Une stimulation de la lignée cellulaire monocytique THP-1 par le LPS de *Porphyromonas gingivalis* a significativement augmenté la transcription d'IL-32[307]. De plus une costimulation de PBMC de donneurs sains par IL-32 et le peptide de muramyle qui est un composant du peptidoglycane bactérien a engendré une augmentation de l'IL-6.



Inducteur	Type cellulaire	Voie de signalisation	Reference
Mitogenes	Pbmc	N.R	[274]
IFN- $\gamma$ , IL-18, IL-1 $\beta$	Cellule épithéliale	N.R	[274]
IL-12	NK, T CD4	N.R	[287]
GM-CSF	Éosinophile	Caspase-1	[278,288]
TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$	Monocyte	Jak/STAT, NF-kB	[289]
TNF- $\alpha$	Fibroblastes synoviaux	Syk/PKC-d/JNK/c-J	[290]
Virus de la grippe	A549	N.R	[291-293]
Hépatite C et B	Hepatocyte	Jak/STAT, NF-kB	[289]
Hépatite C	Huh-7.5	Jak/STAT, NF-kB	[289]
HSV2	T CD8	N.R	[294]
VIH-1	Pbmc	N.R	[76]
Tuberculose	Pbmc	N.R	[302,303]
Porphyromonas gingivalis	THP-1	N.R	[307]

**Tableau 3.** – Induction d’IL-32 dans différents types cellulaires

Tableau récapitulatif montrant les différents inducteurs d’IL-32 dans les cellules immunitaires et non-immunitaires. N.R : non renseigné.

#### 1.4.4 Rôle de l’IL-32 dans le développement des maladies cardiovasculaires

L’interleukine-32 est capable d’entraîner l’induction d’autres cytokines inflammatoires jouant un rôle délétère sur le système cardiovasculaire comme l’IL-6, le TNF- $\alpha$  ou encore l’IFN- $\gamma$  dans le cas des cellules T CD4+[76, 297]. Le développement de l’athérosclérose dans un contexte inflammatoire chronique est très étudié. L’interleukine-32 est impliquée dans des maladies inflammatoires telles que l’arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l’intestin ou encore les maladies pulmonaires obstructives chroniques. Ces maladies sont liées au développement des maladies cardiovasculaires puisqu’elles accélèrent le développement de l’athérosclérose. Les cytokines impliquées dans l’inflammation chronique telles que l’IL-6, l’IL-1 $\beta$ , l’IL-8 et le TNF- $\alpha$  peuvent être induites par IL-32. Cette boucle de rétroaction engendre un état inflammatoire constant propice à l’accélération du développement de l’athérosclérose. L’IL-32 est augmentée dans le cadre de nombreuses infections notamment dans le cadre de l’infection par le VIH-1 où le traitement par ART ne normalise pas son expression, dans ce cadre, elle joue

un rôle inflammatoire persistant[297]. Notre groupe a démontré que les isoformes IL-32D et IL-32θ sont significativement plus élevées chez les PVVIH atteintes d'athérosclérose subclinique en comparaison aux PVVIH sans athérosclérose subclinique indépendamment de l'âge, du tabagisme ou de traitement par des statines[308]. Dans cette même étude, il a été déterminé que l'expression d'IL-32 corrèle avec l'IL-18 et l'IL-1β[308], deux cytokines effectrices du complexe inflammasome NLRP3 médiatrices des maladies cardiovasculaires[309, 310]. Une autre étude de notre groupe se concentrant sur les femmes vivant avec le VIH-1 et étant sous traitement montre que les niveaux d'expression des isoformes IL-32α, β et ε sont significativement plus élevés dans les PBMCs isolés des donneuses avec de l'athérosclérose subclinique par rapport aux témoins dans la même tranche d'âge sans athérosclérose subclinique[311]. Une étude a montré l'expression d'IL-32 dans les cellules endothéliales et a été localisée dans les parois des artères dans une autre étude[286, 312]. IL-32 a également été associée avec la sténose de l'artère coronaire et sa circulation est associée avec un mauvais pronostic chez les personnes souffrant d'insuffisance cardiaque ayant eu un infarctus[313, 314].

## **1.4.5 Facteurs potentiels pour contrecarrer l'effet de l'IL-32**

### **1.4.5.1 IL-17 A**

Les cellules épithéliales intestinales produisent IL-32 *in vitro* et *in vivo*[315-317]. Son expression a également été rapportée dans le contexte du VIH-1 chez des individus non traités[296]. Une étude récente a montré l'expression de six isoformes spécifiques de l'IL-32 dans le côlon des PVVIH traitées par traitement antirétroviral combiné et a conclu que l'IL-32β était significativement surexprimée par rapport aux individus non infectés. Dans cette même étude, il a été démontré qu'IL-17A a le potentiel de diminuer l'expression d'IL-32 induite par l'activation du TLR3[318]. Dans cette étude, des cellules HT-29 ont été stimulées avec du TNF-α en présence de différentes concentrations d'IL-17A et les auteurs ont constaté une diminution de l'ARNm et des protéines d'IL-32 dépendante de la dose d'IL-17A. Il est important de noter que cette diminution n'a pas été observée dans le cas d'un traitement par l'IL-17A seule, sans TNF-α.

#### 1.4.5.2 Acides gras à chaîne courte

Les acides gras à chaîne courte (SCFA) sont des acides gras possédant entre deux et six carbones et comprenant les acides acétique (C2), propionique (C3), butyrique (C4), valérique (C5) et caproïque (C6). Ils sont le produit final majeur que les bactéries métabolisent dans le gros intestin par la fermentation des fibres non digestibles[319]. Ils sont formés par les bactéries anaérobies à partir de protéines, polysaccharides, oligosaccharides, glycoprotéines et peptides[320]. La fermentation des glucides et des acides aminés engendre principalement la formation des acides acétique, butyrique et propionique avec un ratio molaire dans le côlon de 60:15:25, respectivement[321]. Le catabolisme des acides aminés comme la valine, la leucine et l'isoleucine mène à la formation des acides valérique et caproïque qui sont produits dans des quantités inférieures[322]. La diminution de l'abondance des SCFA est associée avec le diabète de type I et II, l'athérosclérose, le syndrome du côlon irritable et la cirrhose du foie[108, 323-325]. Nombreux facteurs de l'hôte influencent la formation des SCFA dans les intestins comme le vieillissement, la diète, le stress, la présence de maladie, de drogue ou encore la prise d'antibiotiques pour n'en citer qu'une partie. Leur formation est également dépendante des populations bactériennes colonisant l'intestin de l'hôte et de la compétition entre ces différentes populations. Il a été montré que dans le cadre de maladies inflammatoires de l'intestin, les quantités d'acides gras à chaîne courte sont fortement réduites et que la prise de souches bactériennes du genre *Lactobacillus* diminuait l'inflammation intestinale et restaurait la barrière intestinale[326]. Il est probable que la réduction de l'inflammation chez les PVVIH traités par des probiotiques proviennent de la restauration de la formation des acides gras à chaîne courte[327]. Une étude a démontré que l'acide butyrique engendre une restauration de la population de Treg anti-inflammatoire dans les tissus intestinaux dans un modèle murin[328]. Les PVVIH sous traitement antirétroviral ayant une plus forte présence de souches bactériennes du genre *lactobacillus* dans leurs intestins ont une diminution de la translocation bactérienne et une augmentation de leur compte de T CD4+[329]. Une étude a également montré une diminution des acides butyrique et valérique chez les PVVIH en comparaison à la population générale[330]. Dans une étude de notre groupe, il a été démontré que l'acide caproïque est diminué chez les PVVIH et est associé avec l'athérosclérose de l'artère coronaire. Dans la même étude il a été observé que le pré-traitement de PBMC par l'acide caproïque avant stimulation par le LPS diminuait l'IL-32 intracellulaire ainsi que la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18. Ces résultats

suggèrent que l'acide caproïque pourrait représenter un important modulateur de l'inflammation[308].

## **1.5 Rôle des cellules endothéliales dans le développement des maladies cardiovasculaires**

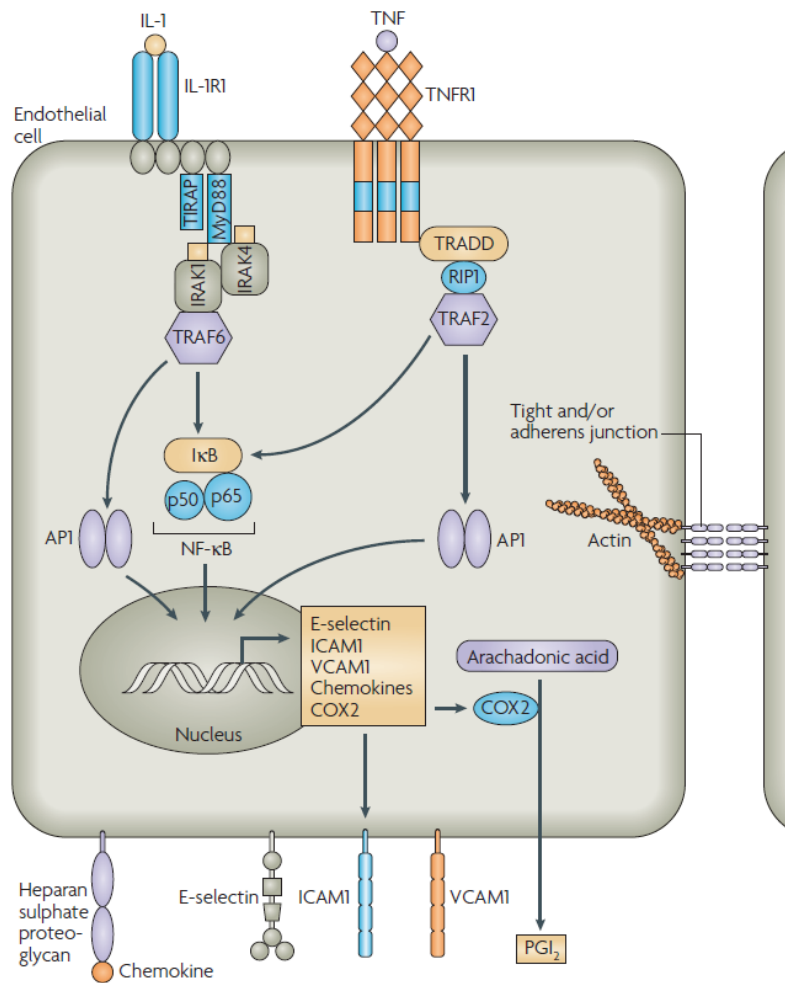
### **1.5.1 Rôle des cellules endothéliales dans le maintien de l'homéostasie**

Les cellules endothéliales jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie. Elles régulent la perméabilité vasculaire en contrôlant physiquement la sortie de liquide, de protéines et de cellules sanguines dans les tissus environnant par leurs jonctions serrées[331, 332]. Des protéines tel que ZO-1, Claudin-1 & 5, JAM-A ou encore l'occludine maintiennent les cellules proches les unes des autres (jonctions serrées) et représentent un processus essentiel pour le maintien de l'équilibre osmotique dans l'organisme[333]. Bien que formant une barrière physique, les cellules endothéliales participent à l'acheminement des protéines vers les cellules adjacentes par le biais de vésicules de transport[334]. Les cellules endothéliales régulent également la coagulation sanguine en produisant des molécules qui inhibent ou activent les facteurs de coagulation. Elles produisent des facteurs anticoagulants tel que l'antithrombine III, la thrombomoduline et la protéine C inhibant les enzymes impliquées dans la coagulation sanguine mais également des facteurs pro-coagulants tel que le facteur de von Willebrand[335]. Cette double régulation permet ainsi de garder un équilibre entre la formation de caillot de sang et la prévention de saignements excessifs. Elles régulent aussi le flux sanguin en produisant des molécules qui dilatent les vaisseaux sanguins comme l'oxyde nitrique[336] ou les contractent comme l'endothéline-1[337]. Elles sont également capables de sentir les variations de pression sanguine et d'ajuster la taille des vaisseaux sanguins en réponse à ce stimulus[338]. Les cellules endothéliales jouent un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire en régulant l'adhérence et la migration des cellules immunitaires. Dans des conditions homéostatiques, elles n'interagissent pas avec les leucocytes[339] et répriment l'expression de leurs molécules d'adhérence tel que la P-selectin, E-selectin, VCAM-1 et ICAM-1. En cas de dommages au niveau de l'endothélium, les cellules endothéliales se divisent afin de régénérer la zone touchée. En cas de dommages plus importants,

cette régénération peut être assistée par le recrutement de cellules progénitrices endothéliales qui migrent jusqu'à la paroi artérielle depuis la moelle osseuse[340].

### **1.5.2 Dysfonction des cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales peuvent s'activer de deux manières différentes, soit par une activation de type I soit par une activation de type II. Lors d'une activation de type I, les cellules endothéliales réagissent fortement à un stimulus (comme l'histamine par exemple) et modifient de manière transitoire la perméabilité de l'endothélium et leur capacité à recruter et transmigrer des leucocytes sur les lieux de l'inflammation[341]. Cette première activation est très rapide, limitée dans le temps et n'engendre pas de profonds changements métaboliques dans les cellules endothéliales et correspond aux signes cardinaux de l'inflammation aiguë et transitoire (rougeur, chaleur, gonflement, douleur). La dysfonction des cellules endothéliales est provoquée par la présence continue de stimuli engendrant une activation de type II (Figure 11) tels que le LPS, le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$ [342]. Cette réponse engendre l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et une forte augmentation de l'expression de molécules d'adhérence comme l'E-selectin, VCAM-1 et ICAM-1 ainsi que de chimiokines comme CCL-2 et CXCL-8[343-345]. Elles produisent également du GM-CSF et de l'IL-1 créant ainsi une boucle de rétroaction localisée au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins[346]. L'hypertension artérielle, le tabagisme, le vieillissement, le diabète ou encore une inflammation chronique sont autant de facteurs pouvant entraîner leur dysfonction.



**Figure 11. –** Activation de type II des cellules endothéliales

Représentation graphique montrant l'activation de type II des cellules endothéliales après binding de l'IL-1 $\beta$  ou du TNF montrant les voies de signalisation impliquées et les effets de cette activation sur l'expression de différentes molécules d'adhérence et de chimiokines. *Source : Pober, J., Sessa, W. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. Nat Rev Immunol 7, 803–815 (2007). <https://doi.org/10.1038/nri2171>*

Des études cherchant à déterminer si les cellules endothéliales sont directement susceptibles à l'infection par le VIH ont donné des résultats contradictoires[347, 348]. Il est néanmoins établi que l'endothélium est constamment exposé à une variété de stimuli inflammatoires d'origine virale ou étant liés à la thérapie antirétrovirale[349] qui sont susceptibles de contribuer à la dysfonction des cellules endothéliales. Il a été montré que le relargage de protéines virales du VIH-1 par les vésicules extracellulaires et notamment Nef induit la dysfonction des cellules endothéliales[350]. De la même manière, la protéine du VIH-1 Tat augmente l'expression de

VCAM-1 dans des cellules endothéliales humaines de l'artère pulmonaire[351]. La protéine du VIH-1 Nef quant à elle augmente la production de CCL-2 des cellules endothéliales par l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B[352]. Il a également été montré que le traitement de cellules endothéliales cérébrales humaines primaires par Vpr induisait leur apoptose[353]. L'inflammation liée à l'infection par le VIH-1 joue un rôle important dans le développement de la dysfonction des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales vasculaires sont considérées comme une cible importante du TNF- $\alpha$  [354]. Dans ce type cellulaire, le TNF- $\alpha$  entraîne la translocation de NF- $\kappa$ B du cytosol vers le noyau où il engendre l'expression de nombreux gènes pro inflammatoires dont le TNF- $\alpha$  lui-même, formant ainsi une boucle de rétroaction perpétuant la réaction inflammatoire. Il augmente également l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1[355]. Les cellules endothéliales sont également sensibles à l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  et il a été montré que ces cytokines entraînent une augmentation de l'inflammation vasculaire, de l'athérosclérose et de la dysfonction endothéliale[356]. Le traitement antirétroviral en lui-même peut impacter la dysfonction endothéliale. Il a notamment été montré *in vitro* que le traitement des cellules endothéliales de l'artère coronaire avec l'Éfavirenz augmente significativement leur perméabilité. Une diminution dans l'expression de protéines des jonctions serrées a en effet été observée pour l'occludine, la claudine-1, JAM-1 et ZO-1[357]. Le Ritonavir a également un effet sur les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire humaine où on dénote une diminution de l'ARNm et de la protéine d'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS : une enzyme responsable de la génération de NO dans l'endothélium vasculaire[358])[359].

### **1.5.3 Recrutement des cellules immunitaires par les cellules endothéliales**

Durant la réponse inflammatoire, les cellules endothéliales coordonnent la transition des leucocytes à travers l'endothélium dans un processus appelé la migration trans-endothéliale.

La première étape de ce processus est une augmentation de la capacité des cellules endothéliales à recruter des cellules immunitaires par l'augmentation de la production de chimiokines telles que CXCL-8, CXCL-1 et CCL-2[360]. Le recrutement des neutrophiles se fait principalement par le biais de CXCL-8 et de la E-selectin[339]. CXCL-8 participe à l'attachement ferme des neutrophiles aux cellules endothéliales et induit leur diapédèse dans les tissus adjacents. CXCL-1 est exprimé de manière constitutive par les cellules endothéliales mais est rapidement relâché au courant de la réponse inflammatoire[361, 362]. CXCL-1 joue deux rôles distincts dans le

recrutement des monocytes, d'abord comme une molécule chimio-attractrice permettant leur recrutement sur le lieu de l'inflammation mais aussi en étant exprimé directement à la surface des cellules endothéliales où il permet leur adhérence[363, 364]. CCL-2 joue un rôle dans le recrutement des monocytes sur les lieux d'inflammation[365, 366] et est considérée comme la chimiokine majeure dans ce processus. Il est intéressant de noter que les monocytes classiques sont préférentiellement recrutés durant le développement de l'athérosclérose du fait de leur forte expression de CCR2 (récepteur de CCL-2)[367].

La deuxième étape est l'adhérence des cellules immunitaires. Les leucocytes ayant migré vers les cellules endothéliales sont capturés par la P-selectin et la E-selectin dans deux phases appelées la capture et le roulement[368]. Ce roulement est progressivement stoppé par la liaison de molécules d'adhérence supplémentaires comme ICAM-1 et VCAM-1 formant respectivement des liaisons avec LFA-1 et VLA-4, deux intégrines exprimées à la surface des leucocytes. Cette étape dite d'adhérence ferme permet de stopper les leucocytes du flux sanguin afin qu'ils puissent commencer leur migration trans-endothéliale[369] et initie une activation cellulaire leur permettant d'altérer la structure de leur cytosquelette[370].

#### **1.5.4 Infiltration des cellules immunitaires à travers l'endothélium**

A la suite de la phase de recrutement et d'adhérence, les leucocytes transmigrent à travers les cellules endothéliales. Durant leur réponse inflammatoire, les cellules endothéliales entrouvrent leurs jonctions serrées afin de permettre la transmigration des leucocytes sans pour autant entraîner une augmentation importante de la perméabilité. La VE-cadherin est une protéine majeure dans le maintien des jonctions serrées, elle forme des homodimères avec les molécules présentes à la surface des cellules endothéliales adjacentes[371]. La liaison de LFA-1 présent à la surface des leucocytes et ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales entraîne la phosphorylation de la VE-cadherin et le réarrangement de l'actine permettant l'ouverture des jonctions intercellulaires[372]. Les leucocytes entament leur diapédèse à travers l'endothélium. L'interaction de PECAM avec le CD99 exprimé à la surface des leucocytes permet de faciliter leur transport vers une jonction et leur migration[373]. Les jonctions se ferment après leur passage et les leucocytes se détachent des cellules endothéliales.



### **1.5.5 Dysfonction de l'endothélium en lien avec la rigidité artérielle**

Le dysfonctionnement artériel joue un rôle dans la plupart des maladies cardiovasculaires. Des données montrent que des changements dans les fonctions artérielles sont notés après 50 ans de vie et notamment une altération de la vitesse de l'onde de pouls et la dilatation endothéliale des petites artères. Chez les PVVIH, des résultats contradictoires ont été obtenus au fil des années et des études essayant de trouver le lien entre rigidité artérielle et VIH-1. Certaines études ont en effet observé une augmentation de la rigidité aortique chez les PVVIH[374, 375], tandis que d'autres études n'ont trouvé aucun lien[376, 377]. Une étude ayant rapporté une augmentation de la rigidité aortique entre les PVVIH en comparaison à la population générale note cependant que le vieillissement a également un rôle à jouer dans son développement[374].

Le vieillissement engendre une perte de l'élasticité de l'aorte, elle devient plus rigide ce qui a pour effet d'augmenter la pression artérielle systolique[378]. Ce constat est aussi vrai dans les autres grandes artères où le vieillissement contribue au risque de maladies cardiovasculaires telles que les accidents vasculaires cérébraux, la fibrose cardiaque, l'hypertrophie ventriculaire ou encore l'hypertension[379]. Il a été montré qu'un inversement du ratio du collagène et de l'élastine dans la paroi artérielle augmente la rigidité artérielle[380, 381]. La réduction de l'élasticité a également été liée à la glycosylation du collagène[382]. Des changements importants dans le comportement de la paroi artérielle sont donc en partie responsables pour le développement de la rigidité artérielle et le développement de l'athérosclérose. L'endothélium représente une partie importante de la structure de la paroi artérielle. Un marqueur important de la dysfonction de l'endothélium est la dilatation dépendante de l'endothélium (EDD). Son altération est corrélée à l'âge et est prédictive d'événements cardiovasculaires[383]. Les changements dans l'EDD avec l'âge contribuent au développement de l'athérosclérose et de l'hypertension[384, 385]. De la même manière, l'inflammation liée à l'âge est associée avec la circulation de TNF- $\alpha$ , VCAM-1, CRP et IL-6[386]. Les cytokines inflammatoires sont connues pour impacter la réponse vasodilatatrice des vaisseaux sanguins en affectant la production d'oxyde nitrique (NO), tandis que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) créées pendant la réponse inflammatoire consomment le NO existant[387]. Les cytokines comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  peuvent également modifier la demi-vie de l'ARNm codant pour l'oxyde nitrique (NO) dans les cellules endothéliales[388]. Une étude a montré que le VIH-1 peut également diminuer la

disponibilité du NO[389], contribuant ainsi à la dysfonction de la réponse vasodilatatrice des vaisseaux sanguins.

La présence de facteurs inflammatoires chroniques est associée avec le dérèglement des fonctions des cellules endothéliales et une augmentation de la rigidité artérielle dans les grandes artères. L'IL-6 et les CRP sont deux facteurs inflammatoires circulants étant liés à la rigidité artérielle[390] de même que le TNF- $\alpha$  produit par les cellules vasculaires comme les cellules endothéliales[391]. Les cellules endothéliales peuvent également entrer dans un état de sénescence. La sénescence des cellules endothéliales est normale chez les individus vieillissants[392, 393]. *In vitro*, cette sénescence se produit lorsque les cellules vasculaires sont gardées en culture sur de longues périodes. Elles adoptent alors un profil de phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) et secrètent des niveaux élevés de cytokines inflammatoires, de chimiokines et de facteurs de croissance. Elles produisent des médiateurs inflammatoires tels que le ROS, des cytokines comme IL-6, IL-1, IL-8 et le TNF- $\alpha$  et la chimiokine CCL-2[394, 395]. Ce profil peut être retrouvé *in vivo* dans les cellules endothéliales chez des sujets âgés. La sénescence des cellules vasculaires est associée à nombre de maladies cardiovasculaires tel que le développement de l'athérosclérose et de l'hypertension[396]. De plus certaines études soutiennent un rôle important de NF $\kappa$ B dans l'induction de SASP chez l'humain[397, 398]. D'autres types cellulaires contribuent à l'inflammation vasculaire comme les cellules immunitaires infiltrant les artères qui sont une source de ROS et de cytokines inflammatoires. Les ROS jouent un rôle dans l'inflammation des artères et dans le développement des maladies cardiovasculaires[399]. En réponse aux ROS ou à d'autres stimuli inflammatoires, I $\kappa$ B- $\alpha$  est phosphorylé par l'inhibiteur de la kinase IKK $\beta$  qui va relâcher son inhibition sur NF $\kappa$ B, conduisant à sa translocation nucléaire et à l'activation de la transcription de gènes induisant la production de cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$  et IL-6[400]. Des études *in vitro* ont identifié de nombreux facteurs liés au vieillissement pouvant engendrer la sénescence des cellules endothéliales comme la persistance de conditions inflammatoires[401], un stress oxydatif, une altération du flux sanguin ou encore l'hypoxie[402]. Cette sénescence des cellules endothéliales est liée au développement de l'athérosclérose. La longueur des télomères des cellules endothéliales aortiques est diminuée chez les patients âgés et a également été observée chez les patients atteints d'athérosclérose[403, 404]. Des cellules endothéliales sénescents ont également été retrouvées dans les lésions athérosclérotiques de patients lors d'autopsies[405].

Des études suggèrent que la sénescence des cellules endothéliales peut être considérée comme la cause et la conséquence de la dysfonction endothéliales[406, 407]. Étant donné l'impact direct et indirect du VIH-1 sur cette dysfonction (voir paragraphe « Dysfonction des cellules endothéliales ») il est probable que le VIH-1 joue un rôle sur la sénescence prématurée des cellules endothéliales et donc sur le développement des maladies cardiovasculaires. Une étude donne des résultats dans ce sens en affirmant que la gp120 et Tat accélèrent la sénescence des cellules endothéliales[408].

## Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs de la thèse

Ma thèse est construite en trois parties complémentaires ayant pour **objectif principal** une meilleure compréhension de la biologie d'IL-32 dans le contexte du développement des maladies cardiovasculaires et du vieillissement prématuré chez les PVVIH. Cela afin d'envisager l'IL-32 comme une cible thérapeutique potentielle pour atténuer l'incidence des comorbidités liées au VIH-1. Pour ce faire, nous avons voulu examiner l'impact d'IL-32 sur la dysfonction des cellules immunitaires et non-immunitaires et investiguer la manière de bloquer les effets d'IL-32.

**Manuscrit #1 :** Dans un premier temps, à la suite d'observations recueillies par notre groupe de recherche dans le passé montrant qu'IL-32 était augmentée chez PVVIH en perte de contrôle immunologique et que CD96 était diminué dans ce même groupe, nous avons émis l'hypothèse d'un lien fonctionnel entre l'augmentation d'IL-32 et la diminution de CD96.

Pour cette hypothèse les objectifs étaient :

1. Déterminer l'impact des isoformes d'IL-32 sur l'expression du CD96 chez les cellules T.
2. Étudier l'expression de CD96 sur les sous types de cellules T CD8+ chez les PVVIH en fonction de leur statut immunologique.
3. Chercher l'existence de différences phénotypiques associées à la différenciation et la fonction cellulaire des T CD8+ ayant une perte de l'expression du CD96.
4. Identifier l'impact de la perte d'expression du CD96 sur la réponse des cellules T CD8+ spécifiques aux antigènes du VIH-1.

**Manuscrit #2 :** Dans un deuxième temps, nous avons émis l'hypothèse que les isoformes d'IL-32 jouent un rôle dans le développement de l'athérosclérose en impactant les cellules endothéliales de l'artère coronaire en nous appuyant sur des études démontrant une augmentation d'IL-32 dans les cellules endothéliales de personnes ayant des maladies coronariennes. Nous avons choisi de réaliser cette étude sur des cellules de l'artère coronaire humaines primaires (Coronary Artery Endothelial Cells / CAEC) étant donné leur rôle clé dans le développement de l'athérosclérose.

Pour cette hypothèse, les objectifs étaient les suivants :

1. D'étudier les cytokines sécrétées par les CAEC après stimulation par les isoformes d'IL-32 afin de voir si ce profil de sécrétion était similaire à nos précédentes études sur les cellules immunitaires (monocytes/cellules T).
2. D'évaluer des différences dans la sécrétion de chimiokines par les CAEC et d'éventuels changements dans leur capacité à recruter des monocytes en réponse aux isoformes d'IL-32.
3. D'identifier un lien entre l'expression des isoformes d'IL-32 et des facteurs de risques liés à l'athérosclérose tel que la rigidité artérielle chez les PVVIH.

**Manuscrit #3 :** Enfin, dans un troisième temps, en nous basant sur des résultats obtenus par notre équipe démontrant le lien entre la diminution des niveaux intestinaux d'acides gras à chaînes courtes (Short Chain Fatty Acid / SCFA), la présence de maladies cardiovasculaires et une augmentation des niveaux d'IL-32, nous avons émis l'hypothèse que les SCFA pourraient représenter une piste pour réduire les effets inflammatoires des isoformes d'IL-32. Nous avons concentré nos efforts sur l'acide caproïque qui était significativement diminué dans ce contexte.

Pour cette hypothèse, l'objectif était le suivant :

Déterminer la capacité des acides gras à chaînes courtes à réduire l'intensité de la réponse inflammatoire et la dysfonction endothéliale engendré par les isoformes d'IL-32 $\beta$  et  $\gamma$ .

## Chapitre 3 : Résultats

### Manuscrit #1: Loss of CD96 Expression as a Marker of HIV-Specific CD8+ T-Cell Differentiation and Dysfunction

# Loss of CD96 Expression as a Marker of HIV-Specific CD8<sup>+</sup> T-Cell Differentiation and Dysfunction

Rémi Bunet<sup>1,2</sup>, Manon Nayrac<sup>1</sup>, Hardik Ramani<sup>1,2</sup>, Mohamed Sylla<sup>1</sup>, Madeleine Durand<sup>1,3</sup>, Carl Chartrand-Lefebvre<sup>1</sup>, Jean-Pierre Routy<sup>4</sup>, Alan L. Landay<sup>5</sup>, Jean-Francois Gauchat<sup>6</sup>, Nicolas Chomont<sup>1,2</sup>, Petronela Ancuta<sup>1,2</sup>, Daniel E. Kaufmann<sup>1,3</sup>, Nicole Bernard<sup>4</sup>, Cécile L. Tremblay<sup>1,2\*</sup> and Mohamed El-Far<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CHUM-Research Centre, Montréal, Montréal, QC, Canada, <sup>2</sup> Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, <sup>3</sup> Département de Médecine, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, <sup>4</sup> Research Institute of McGill University Health Centre, Montréal, QC, Canada, <sup>5</sup> Department of Internal Medicine, Rush University Medical Center, Chicago, IL, United States, <sup>6</sup> Faculté de Médecine, Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

**Publication : Front Immunol. 2021 May 27;12:673061. doi: 10.3389/fimmu.2021.673061. PMID: 34122431; PMCID: PMC8190400.**

Contribution des auteurs : RB a planifié et exécuté les expériences, analysé et interprété les données et écrit le manuscrit. MN a exécuté les expériences d'activation par les peptides du VIH-1 et aidé à l'écriture du manuscrit. HR a aidé pour les analyses des expériences de FACS. MS a aidé avec la préparation des échantillons humains. MD et J-PR ont mis à disposition les échantillons de patients et discuté les résultats. AL, J-FG et NC ont aidé aux analyses et interprétation des résultats et à la révision du manuscrit. PA a mis à disposition le protocole pour la réalisation des expériences de CFSE, a discuté les données et révisé le manuscrit. DK a aidé avec l'analyse et l'interprétation des données et révisé le manuscrit. NB a discuté les résultats et révisé le manuscrit. CT et ME-F ont planifié et supervisé les expériences, ont analysé et interprété les données et supervisé l'étude. Tous les auteurs ont contribué à l'article et approuvé la version soumise.

## **Abstract**

Persistent immune activation and inflammation in people living with HIV (PLWH) are associated with immunosenescence, premature aging and increased risk of non-AIDS comorbidities, with the underlying mechanisms not fully understood. In this study, we show that downregulation of the T-cell immunoglobulin receptor CD96 on CD8<sup>+</sup> T cells from PLWH is associated with decreased expression of the co-stimulatory receptors CD27 and CD28, higher expression of the senescence marker CD57 and accumulation of a terminally differentiated T-cell memory phenotype. In addition, we show that CD96-low CD8<sup>+</sup> T-cells display lower proliferative potential compared to their CD96-high counterparts and that loss of CD96 expression by HIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cells is associated with a suboptimal response to HIV antigens. In conclusion, our results suggest that CD96 marks CD8<sup>+</sup> T-cells with competent responses to HIV and the loss of its expression might be used as a biomarker for CD8<sup>+</sup> T-cell senescence and dysfunction in PLWH.

**Keywords:** HIV, CD96, people living with HIV (PLWH), T-cell senescence, T-cell dysfunction, IL-32

## Introduction

Since the introduction of anti-retroviral therapy (ART) in 1996, mortality and morbidity associated with HIV infection have declined in people living with HIV (PLWH) (1, 2). However, as HIV persists in latent reservoirs, PLWH have to adhere to lifelong therapy to avoid viral rebound (3, 4). Furthermore, HIV persistence under ART is associated with immune activation and low-grade inflammation that drive dysregulated immune functions. The hallmark of these dysregulated functions is a state of immune exhaustion and immunosenescence (premature aging of the immune system) that are associated with the development of multiple comorbidities. At the T cell level, two phenotypes are described: (i) T-cell exhaustion was characterized by the upregulation of multiple negative immune regulators, such as PD-1 and CTLA-4, which leads to a reversible loss of the proliferative capacity and cytokine production in response to the cognate HIV antigens; and (ii) T-cell senescence was characterized by the upregulation of surface markers, such as CD45RA+, KLRG1, and CD57, with no expression of the costimulatory receptors CD27 and CD28 (5–7) and a loss of the proliferative capacity associated with shortened telomeres [a consequence of intense proliferative pressure in response to chronic antigenic exposure and unresolved DNA damage (8, 9)]. Although senescent cells have altered replicative capacities, they remain biologically active and may acquire a senescence associated secretory phenotypes (SASP) characterized by the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-8, and IL-1b, which contribute to persistent inflammation, disruption of tissue functions and development of aging (10, 11). Yet, senescence and exhaustion phenotypes overlap in multiple characteristics that drive the T-cell dysfunction (12). Therefore, identification of cellular proteins/receptors involved in pathways governing the development of both phenotypes in PLWH is of particular importance for T-cell potentiation (reversing T-cell exhaustion) while protecting against chronic inflammation (generation of senescent cells that may perpetuate chronic inflammation). In this study, we investigated the role of the human CD96 molecule (also known as TACTILE: T cell-activated increased late expression) in T-cell functions and senescence. CD96 is an immunoglobulin-like receptor expressed on both NK and T-cells (13, 14). Although it was initially discovered on T-cells, much of the available knowledge on CD96 biology is related to NK cell functions (14, 15). Here, we show evidence that expression of CD96 characterizes CD8 T-cells with competent proliferation potential and function against HIV



cognate antigens and the loss of which is associated with a T-cell phenotype related to dysfunction and senescence in PLWH.

## **Materials and methods**

### **Study Population**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) used in the current study were isolated from individuals participating in three different cohorts: i) treatment naïve Elite Controllers (ECs, n=9) participating in the Canadian Cohort of HIV+ Slow Progressors (CCHSP), Log<sub>10</sub> average viral load  $1.67 \pm 0.08$  copies/ml and median CD4 count  $842 \pm 246$  cells/mm<sup>3</sup>; ii) treatment-naïve viremic typical progressors (TP, n=9) participating in the Montreal Primary Infection (PI) cohort, Log<sub>10</sub> average viral load  $4.76 \pm 0.51$  HIV copies/ml and average CD4 count  $389 \pm 97$  cells/mm<sup>3</sup>; and iii) ART-treated individuals (n=10) participating in the Canadian HIV and Aging Cohort Study (CHACS), average Log<sub>10</sub> viral load  $1.84 \pm 0.75$  HIV copies/ml and CD4 count  $450 \pm 292$  cells/mm<sup>3</sup> in addition to n=28 HIV seronegative controls.

### **Ethics Statement**

This study was approved by the Institutional Review Boards (IRB) of the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research (CRCHUM) and at all participating sites' IRBs. Experiments were performed in accordance with the guidelines and regulations approved by the ethic committees from CRCHUM and all IRBs (Ethical approval #SL 04–061). Study participants provided written informed consent for use of plasma and cells in the current research investigation.

### **Cells and Reagents**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood or from leukapheresis samples by density gradient centrifugation. Cells were frozen in 90% Fetal Bovine Serum (FBS, VWR International, Radnor, PA) 10% dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), and stored in liquid nitrogen until use.

## **Flow Cytometry**

Flow cytometry analysis was used to study the phenotype of CD96 on T-cells from HIV-positive and HIV-negative individuals using a BD LSRII FACS Analyser (BD Biosciences, San Jose, CA). Stainings was performed on 1 million of PBMCs with the following fluorochrome-conjugated antibodies: mouse anti-human CD3-Pacific Blue (Clone UCHT1), mouse antihuman CD4-Alexa Fluor 700 (Clone SK3), mouse anti-human CD8- APC-H7 (Clone SK1), mouse anti-human CD45RA-APC (Clone HI100), mouse anti-human CD27-PE-CF594 (Clone MT271), mouse anti-human CD28-V450 (Clone CD28.2), mouse anti-human CD96-PE (Clone 6F9), and mouse anti-human CD57-FITC (Clone NK-1) (all from BD Biosciences, SanJose, CA).

## **Cell Stimulations and Proliferation Assay**

PBMCs were resuspended at 2 million cells/ml in RPMI 1640 medium (Gibco by Life Technologies, Waltham, MA) complemented with 10% FBS and stimulated with 500 ng/ml of IL-32 $\alpha$ , IL-32 $\beta$ , or IL-32 $\gamma$  (R&D Systems, Minneapolis MN) in final volume of 1 ml. Cells were incubated for 5 days at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. For cell proliferation, PBMC were labeled with 2.5 mM of 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE) according to manufacturer's instructions (SigmaAldrich, St Louis, MO) and stimulated with 1  $\mu$ g/ml of phytohemagglutinin-L (PHA-L) (Sigma) and 10 ng/ml IL-2 (R&D systems) for 4 days.

## **Intracellular Cytokine Staining**

PBMCs were thawed and rested for 2 h in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA) and HEPES (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA) and stimulated with 0.5 mg/ml of HIV-1 Consensus B Gag peptide pool, HIV-1 Consensus B Pol peptide pool, HIV-1 Consensus B Env peptide pool or HIV-1 Consensus B Nef peptide pool (all from JPT Berlin, Germany) corresponding to 150 15meric peptide/pool derived from Gag, Pol, Env and Nef polyproteins, respectively. Stimulations were carried out for 6 h in the presence of mouse anti-human CD107A-BV786, Brefeldin A, and monensin (BD Biosciences, San Jose, CA) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. DMSO-treated cells served as a negative control. Cells were stained for aquavid viability marker (Thermo Fisher scientific,

Waltham, MA) for 20 min at 4°C and surface markers (30 min, 4°C), followed by intracellular detection of cytokines using the IC Fixation/Permeabilization kit (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA) according to the manufacturer's protocol before acquisition at a Symphony flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). The antibodies used for the surface staining were: mouse anti-human CD3-BUV395 (Clone UCHT1), mouse antihuman CD45RA-BUV563 (Clone HI100), mouse anti-human CD28-BUV737 (Clone CD28.2), mouse anti-human CD107aBV786 (Clone H4A3), mouse anti-human CD4-BB630 (Clone SK3), CD57-FITC, CD96-PE, CD27-PE CF594, CD8-APC-H7, all from BD Biosciences, San Jose, CA. Antibodies used for the intracellular staining were the following: mouse anti-human CD69-BV650 (Clone FN50), mouse anti-human CD40L-BV711 (Clone 24–31) from Biolegend, San Diego, CA, mouse antihuman IFN $\gamma$ -PECy7 (Clone B27), mouse anti-human Granzym-B -Alexa Fluor 700 (Clone GB11), mouse anti-human TNF- $\alpha$  APC (Clone Mab11) all from BD Biosciences (San Jose, CA).

### **Statistical Analysis**

Data were analyzed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Comparison of two groups for the same variable were analyzed using non-parametric Mann Whitney tests (unpaired) or Wilcoxon signed-rank tests (paired comparisons). Kruskal–Wallis with Dunn's post-tests were used to analyze more than two groups for the same variable. Between group differences were considered statistically significant when two-tailed p-values were <0.05.

## Results

### **Down-Regulation of CD96 on T Cells Is Associated With Disease Progression**

We have previously shown that persistent immune activation and chronic inflammation are associated with increased viral load and decreased CD4<sup>+</sup> T-cell counts in HIV-infected slow progressors who experience loss of immunological and virological control (16). Our transcriptomic analysis on PBMCs collected from these slow progressor individuals failing control demonstrated that the human immunoglobulin-like receptor CD96 was significantly down-regulated at the transcriptional level (Figure 1A, full data set available at the Gene Expression Omnibus (GEO) database under the accession number GSE74790 (16)). Given the concomitant downregulation of CD96 transcription with increased viral load, we aimed to validate this phenotype at the protein level in HIV-infected typical progressors; individuals with significantly high viral loads in the absence of ART (Log<sub>10</sub> average viral load  $4.76 \pm 0.51$  HIV copies/ml) that do not meet the criteria of Slow Progressors as we previously described (16). To this end, we measured CD96 expression on CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cells from ART-naive typical progressors (TP: n=9) and compared it to that in HIV-infected Elite Controllers (EC: n=9) and uninfected controls (HIVneg, n=10) (study participants in Table 1) by flow cytometry. In line with earlier reports (17), we observed that CD96 expression measured by mean fluorescence intensity (MFI) was significantly downregulated on total CD8<sup>+</sup> T-cells from both EC and TP compared to HIVneg individuals ( $p=0.0189$  and  $p < 0.0001$ , respectively), although it was more pronounced in TP compared to EC. Meanwhile, differences in CD96 expression on CD4<sup>+</sup> T cells in both HIV<sup>+</sup> groups compared to non-infected controls did not reach statistical significance (Figure 1B).

CD96 expression on CD8<sup>+</sup> T cells was previously shown to be downregulated at least in part by LPS stimulation of human PBMCs (17). Activated CD8 T-cells are known to respond to LPS via the surface expression of TLR4 and CD14 (18). However, the mechanism and/or the inflammatory mediator by which LPS induces CD96 downregulation is not yet clear. Here, we investigated the potential impact of IL-32, a proinflammatory cytokine that we have previously shown to be upregulated in HIV-infected slow progressors upon loss of immunological and virological control and that coincides with CD96 downregulation (16). Of note, LPS is known to

be a strong inducer of IL-32 (19, 20). Our data demonstrated that the dominantly expressed IL32 $\beta$  and IL-32 $\gamma$  isoforms (21) significantly downregulated CD96 on CD8<sup>+</sup> T-cells upon PBMC stimulation (Figure 1C p=0.031 for both). Together, these results indicated that CD96 expression on CD8<sup>+</sup> T cells is subject to downregulation by IL-32, which further links this mechanism to disease progression in HIV infection.

### **Loss of CD96 Expression Is Associated With a Differentiated CD8<sup>+</sup> T Cell Memory and Senescence-Like Phenotypes**

Similar to earlier reports (17), we observed significant loss of CD96 expression on the different CD8 T-cell subsets; Naïve (TN;CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), Central Memory(TCM;CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup> CD27<sup>+</sup>), Effector Memory (TEM ; CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup>CD27<sup>neg</sup>) and terminally differentiated effector memory re-expressing CD45RA (TEMRA;CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>neg</sup>) from HIV-infected TP (Figure 2, p=0.0027, p=0.0002, p=0.0044, and p=0.0008, respectively). However, in the EC group, loss of CD96 expression was only significant for TN and TEMRA (p=0.0186 and 0.0163, respectively, Figure 2). To further investigate the contribution of these subsets to the pool of CD8 T-cells losing CD96 expression, we determined the frequency of TN, TCM, TEM, and TEMRA in CD96<sup>+</sup> and CD96<sup>-</sup> cells (gated on total CD8 T-cells as shown in Figure 3A) from multiple groups of HIV<sup>+</sup> individuals including EC, TP as well as ART-treated (Table 1). Interestingly, the CD8<sup>+</sup>CD96<sup>-</sup> population was enriched with the more differentiated cells; TEM (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup>CD27<sup>neg</sup>) and terminally differentiated effector memory (TEMRA; CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>neg</sup>), in the three groups of HIV<sup>+</sup> individuals (Figure 3B, right panels, p<0.0001 for both). In contrast, the CD8<sup>+</sup>CD96<sup>+</sup> population was enriched with the less differentiated TN and TCM cells from all the HIV<sup>+</sup> individuals (Figure 3B, left panels, p=0.0007 and p<0.0001, respectively). Similar phenotypes were also observed in the HIV<sup>neg</sup> controls with the exception of the TN that were not different between CD96<sup>+</sup> and CD96<sup>-</sup> subsets (Figure 3C). Given the fact that differentiated cells are enriched in CD96<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-cells and that the down-regulation of CD96 is associated with disease progression as shown in Figure 1, we hypothesized that the loss of CD96 expression might be associated with T-cell senescence. To validate this hypothesis, we assessed the expression of CD96 on CD8 T-cells with the CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> phenotype (a hallmark of cell senescence) within

each of the four subsets; TN, TCM, TEM and TEMRA. As shown in Figures 4A, B, cells with CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> phenotype expressed significantly lower CD96 levels, determined by the mean fluorescence intensity (MFI), when compared with CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> cells ( $p < 0.0001$  for all subsets). This was further confirmed by measuring CD96 on total CD8 T-cells after gating on the co-stimulatory molecules CD28 and CD27 [the loss of both is associated with cell senescence (22–24)]. As shown in Figure 4C, cells with the double negative DN phenotype (CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>) expressed significantly lower levels of CD96 compared to their double positive DP counterparts ( $p < 0.0001$ ). We further adjusted these data for age as a confounder. ANCOVA test was run to determine the effect of different readouts (flow cytometry values) after controlling for age. Prior to linear modeling, MFI values were log<sub>2</sub>-transformed and tested for normality before testing and the effect size was reported as GES (generalized eta squared). As shown in Table 2, differences in CD96 expression between the different subsets remained significant suggesting these differences are age-independent. Taken together, these results demonstrate that downregulation of CD96 on CD8<sup>+</sup> T cells is associated with a senescence-like phenotype.

### **Loss of CD96 Expression on CD8<sup>+</sup> T Cells Is Characteristic of Low Proliferative Capacity and Poor Response to HIV Stimulation**

T-cell senescence is associated with a low proliferative potential (25). To validate this hypothesis as related to CD96 downregulation, we assessed the proliferative capacity of CD96<sup>-</sup> and CD96<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-cells, from HIV<sup>neg</sup> individuals, in response to the mitogenic stimulation with PHA. Interestingly, we observed that proliferating cells (CFSE<sup>lo</sup> cells) in both CD45RA<sup>+</sup> and CD45RA<sup>neg</sup> CD8<sup>+</sup> T cells expressed significantly higher levels of CD96 compared to nonproliferating cells (CFSE<sup>hi</sup> cells) (Figure 5,  $p = 0.0079$  and  $p = 0.0079$ , respectively).

To further investigate this phenotype on HIV-specific T cells, we developed an intracellular staining (ICS) to identify the specific cytokine responses of the CD8<sup>+</sup> T cells from ART-treated individuals ( $n = 6$ , Log<sub>10</sub> average viral load 1.6 HIV copies/ml plasma and average CD4 count  $590 \pm 343$  cells/mm<sup>3</sup>) to HIV-1 peptides (HIV-1 consensus B pools of Env, Gag, Nef or Pol, peptides). Following a 6-h stimulation, we characterized two cell populations: (I) activated cells that expressed one or more of the following proteins, TNF- $\alpha$ , CD40L, CD107a, and IFN $\gamma$  and co-expressed the activation marker CD69 (called responding cells [R]); and (II) non-activated cells,

negative for the above markers and CD69 expression [called non-responding cells [NR]] (Figure 6A). Interestingly, we observed that TN, TCM, and TEMRA CD8<sup>+</sup> T-cells from responding cells had a significantly higher expression of CD96 compared to their counterparts of non-responding cells (Figure 6B,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$  and  $p = 0.0058$ , respectively). However, differences in CD96 expression within the TEM subsets from responding compared to non-responding cells did not reach statistical significance. Furthermore, we observed a negative correlation between the expression of CD96 and the senescence marker CD57 on the pool of responses from the different memory subsets to the 4-peptide pools (Figure 6C,  $r = -0,41$ ,  $p = 0.0008$ ). In line with these observations, CD96 expression was significantly higher on CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> double positive (DP) CD8<sup>+</sup> T-cells when compared to the senescent-like cells with the CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> double negative (DN) subsets from either R or NR CD8<sup>+</sup> T-cells (Figure 6D,  $p = 0.0005$  and  $p < 0.0001$ , respectively). Taken together, these observations demonstrated that CD96 expression is associated with functionally competent responses to HIV and its loss contributes to altering the effectiveness of T-cell responses and potentially contributes to cell senescence.



## Discussion

In this study, we showed that CD96 was downregulated on CD8<sup>+</sup> T-cells from HIV-infected slow progressors who experienced loss of virological and immunological control. We confirmed these observations in HIV<sup>+</sup> TP, in whom CD96 downregulation was more pronounced than in EC. These data suggested that CD96 downregulation is linked to HIV disease progression and, in accordance with previous studies supporting a protective role for this protein (17). CD96 is a member of the immunoglobulin superfamily (IgSF), which is expressed on both NK and T-cells and contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) (26). The presence of this ITIM suggests that CD96 may function as an inhibitory receptor. Indeed, CD96 binds to the poliovirus receptor (PVR)/CD155 to facilitate cell adhesion and also to play a positive co-stimulatory role by promoting NK redirected killing through increased adhesion to target cells (27). However, recent data, both in vitro and in vivo mouse models, showed that CD96 negatively regulates cytokine production by NK cells (15). In these studies, CD96<sup>-/-</sup> mice developed NK-mediated hyperinflammatory response to toxic bacterial toxins, such as lipopolysaccharide (LPS), which led to decreased animal survival and increased death mediated by septic shock (15). These observations support the inflammatory potential of cells lacking CD96 expression. In contrast to NK cells, less is known about the exact functions of CD96 on T-cells. In line with our observations, Eriksson et al. (17), reported that CD96 expression is lower on T-cells from HIV<sup>+</sup> viremic individuals and EC compared to uninfected individuals. Their studies showed that CD96<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-cells expressed higher levels of perforin although both CD96<sup>+</sup> and CD96<sup>neg</sup> cells produce similar levels of IFN- $\gamma$ . These observations suggested that CD96 may play a selective or a regulatory role on the functions of some, but not all, T-cell subsets where the functions of subsets producing perforin are more regulated by CD96 expression. In line with these observations, the regulatory role of CD96 on specific T-cell functions was also supported by data from murine models where Th9 (cells producing IL-9) but not Th1 (cells producing IFN- $\gamma$ ) lacking CD96 expression showed highly inflammatory profiles contributing to intestinal and colonic inflammation (28). Paradoxically, an emerging role for CD96 as a negative immune checkpoint was recently proposed, since antibodies targeting CD96 seemed to enhance the anti-tumor potential of CD8<sup>+</sup> T-cells in a number of mouse tumor models (29). However, it is still unclear whether this proposed role of negative regulation of T-cells by

CD96 is linked with immune exhaustion, which is a typical characteristic for the expression of negative immune checkpoint receptors (30). Intriguingly, recent data on CD96 functions challenge the hypothesis of the negative regulation of T-cells (31). In these studies, antibody-mediated cross-linking of CD96 on CD8<sup>+</sup> T cells from both human and mouse clearly demonstrated that CD96 had positive co-stimulatory functions. The authors showed that CD96 triggering enhanced cytokine production and T-cell proliferation through MEK-ERK dependent pathway (31). To gain insights into the potential role of CD96 on T-cell functions in HIV infection, we characterized the memory phenotype of cells with low compared to high expression of this immunoglobulin-like receptor. Indeed, we observed that CD96 downregulation was associated with a differentiated memory phenotype (effector memory and terminally differentiated effector memory) compared to cells with high expression of CD96 that were enriched in naïve and central memory T cell subsets. In addition, downregulation of CD96 expression was associated with loss of CD27 and CD28. In this regard, signaling provided by the co-stimulatory receptors CD27 and CD28 in the context of T-cell receptor (TCR) stimulation plays an important role in T-cell survival and IL2 production (32, 33). However, these co-stimulatory receptors are known to be progressively downregulated as cycles of cell activation increase, consequently leading to progressive loss of the replicative capacity and accumulation of cells with the CD28<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> phenotype. These later cells are compromised in their ability to up-regulate the telomerase activity (34). Such a progressive loss of surface markers is widely believed to correspond to the impairment or loss of T-cell functions (35). In addition, loss of CD27 and CD28 expression is typical of a cellular phenotype characterizing effector memory cells that reexpress CD45RA (TEMRA), as we observed in our current studies. These cells acquire the expression of markers associated with dysfunction and senescence, such as PD-1, CD57, and KLRG-1 (36, 37).

Indeed, in our studies, we observed that cells negative for CD27 and CD28 expressed significantly lower levels of CD96, but higher levels of CD57, which links the loss of CD96 with cell senescence. This is further supported by inferior proliferative capacity of cells with lower CD96 expression in response to PHA stimulation. In addition, CD8<sup>+</sup> T-cells expressing lower levels of CD96 responded poorly to HIV peptides as reflected by the absence of cytokine production compared to their counterparts with higher CD96 expression. In this regard, the absence of cytokine production by the CD96<sup>-</sup> senescent-like cells is intriguing as senescent cells

are known for their production of inflammatory cytokines (38, 39). These observations may suggest that loss of CD96 expression may characterize T-cells with an intermediate state preceding the senescence phase. Accumulation of such cells might contribute to the accelerated and premature aging observed in the HIV infected individuals, which are associated with the increased burden of non-AIDS co-morbidities (40–42). This premature aging was even shown in children < 5 years old where the infection was associated with shorter telomere length (43), which is characteristic of cell senescence (44). In this regard, we acknowledge the limitation of our current study where we investigated the senescence-like phenotype of cells with low CD96 expression (cells upregulating CD57 and downregulating CD27 and CD28) and their proliferation potential without characterizing the telomere length of these cells. However, future studies are planned to address this question.

Since we observed the downregulation of CD96 in PBMCs from HIV+ slow progressors and a significant upregulation of the proinflammatory cytokine IL-32 in their plasma (16), it was important to study the link between these two proteins. Our data showed that IL-32 decreases CD96, consistent with earlier studies on the activation-induced downregulation of this immunoglobulin-like molecule (17). Our present study suggests that IL-32 is likely contributing to T-cell dysfunction since cells downregulating CD96 showed a poor response to challenge with HIV cognate peptides. However, it remains unclear by which mechanism IL-32 interferes with CD96 expression on CD8+ T-cells and further studies are needed to answer this question.

Together, our data suggest that CD96 expression is linked to T-cell differentiation and plays a protective role against loss of Tcell proliferative potential and cytokine production. The compromised expression of CD96 on T-cells by IL-32 and potentially with other inflammatory cytokines in HIV infection may lead to the accumulation of senescent-like cells with biased replicative capacities. This phenotype impairs the potential of the memory T-cells to respond to persistent HIV infection, which represents a major hurdle to viral control and a significant contributor to the development of inflammation-associated comorbidities in PLWH (45).

### **Data availability statement**

The data sets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, GSE74790.

### **Ethics statement**

The studies involving human participants were reviewed and approved by Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research (CHUM). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

### **Author contributions**

RB planned and performed the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. MN performed the experiments on activation with HIV peptides and helped with the manuscript preparation. HR assisted with the FACS analysis. MS helped with preparation of patient samples. MD, CC-L, and J-PR provided samples from the research subjects and discussed results. AL, J-FG, and NC helped with data analysis and interpretation and revision of the manuscript. PA provided experimental layout for CFSE analysis, discussed the data, and revised the manuscript. DK helped with data analysis and interpretation, discussed the data, and revised the manuscript. NB discussed results and reviewed the manuscript. CT and ME-F planned and supervised the experiments, data analysis and interpretation and supervised the study. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

### **Funding**

This work was supported by funds through the Canadian Institutes of Health Research, CIHR [grant numbers PJT 148482, HAL 398643 and PJT 168901] and National Institutes of Health, NIH [grant number R01AG054324]. This study was supported in part by the « Fonds de la Recherche Québec-Santé (FRQ-S): Réseau SIDA/Maladies infectieuses et Thérapie cellulaire ». MD is supported by a clinician researcher salary award from the Fonds de recherche en Santé-Québec. DK is an FRQS Merit Research Scholar. The CHACS is supported by the Canadian Institutes of Health Research Clinical Trial Network for HIV research.

### **Acknowledgement**

We would like to thank the following CRCHUM platforms for their help with this study, the NC3 lab (Dr. Olfa Debbache), the Flow cytometry platform (Dr. Dominique Gauchat and Mr Philippe St-Onge), and Genome Quebec/McGill University. We would also like to thank Annie Chamberland, Mario Legault, and Stéphanie Matte for their help with administrative duties and cohort database.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### **Copyright © 2021**

Bunet, Nayrac, Ramani, Sylla, Durand, Chartrand-Lefebvre, Routy, Landay, Gauchat, Chomont, Ancuta, Kaufmann, Bernard, Tremblay and El-Far. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## References

1. Legarth RA, Ahlstrom MG, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen C, Pedersen G, et al. Long-Term Mortality in HIV-Infected Individuals 50 Years or Older: A Nationwide, Population-Based Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2016) 71(2):213–8. doi: 10.1097/QAI.0000000000000825
2. Teeraananchai S, Kerr SJ, Amin J, Ruxrungtham K, Law MG. Life Expectancy of HIV-positive People After Starting Combination Antiretroviral Therapy: A Meta-Analysis. *HIV Med* (2017) 18(4):256–66. doi: 10.1111/hiv.12421
3. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, et al. Presence of an Inducible HIV-1 Latent Reservoir During Highly Active Antiretroviral Therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94(24):13193–7. doi: 10.1073/pnas.94.24.13193
4. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Science* (1997) 278(5341):1295–300. doi: 10.1126/science.278.5341.1295
5. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 Expression on HIV-Specific CD8<sup>+</sup> T Cells Leads to Reversible Immune Dysfunction. *Nat Med* (2006) 12(10):1198–202. doi: 10.1038/nm1482
6. Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-Specific CD4<sup>+</sup> T Cells Correlates With Disease Progression and Defines a Reversible Immune Dysfunction. *Nat Immunol* (2007) 8(11):1246–54. doi: 10.1038/ni1515
7. Larbi A, Fulop T. From “Truly Naive” to “Exhausted Senescent” T Cells: When Markers Predict Functionality. *Cytometry A* (2014) 85(1):25–35. doi: 10.1002/cyto.a.22351
8. Mudd JC, Lederman MM. CD8 T Cell Persistence in Treated HIV Infection. *Curr Opin HIV AIDS* (2014) 9(5):500–5. doi: 10.1097/COH.000000000000086
9. Henson SM, Lanna A, Riddell NE, Franzese O, Macaulay R, Griffiths SJ, et al. p38 Signaling Inhibits mTORC1-Independent Autophagy in Senescent Human CD8<sup>+</sup> T Cells. *J Clin Invest* (2014) 124(9):4004–16. doi: 10.1172/JCI75051

10. Borodkina AV, Deryabin PI, Giukova AA, Nikolsky NN. “Social Life” of Senescent Cells: What is SASP and Why Study it? *Acta Naturae* (2018) 10 (1):4–14. doi: 10.32607/20758251-2018-10-1-4-14
11. Hernandez-Segura A, de Jong TV, Melov S, Guryev V, Campisi J, Demaria M. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol* (2017) 27(17):2652–60.e4. doi: 10.1016/j.cub.2017.07.033
12. Zhao Y, Shao Q, Peng G. Exhaustion and Senescence: Two Crucial Dysfunctional States of T Cells in the Tumor Microenvironment. *Cell Mol Immunol* (2020) 17(1):27–35. doi: 10.1038/s41423-019-0344-8
13. Wang PL, O’Farrell S, Clayberger C, Krensky AM. Identification and Molecular Cloning of Tactile. A Novel Human T Cell Activation Antigen That is a Member of the Ig Gene Superfamily. *J Immunol* (1992) 148(8):2600–8.
14. Seth S, Maier MK, Qiu Q, Ravens I, Kremmer E, Forster R, et al. The Murine Pan T Cell Marker CD96 Is an Adhesion Receptor for CD155 and Nectin-1. *Biochem Biophys Res Commun* (2007) 364(4):959–65. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.102
15. Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Chow MT, Town L, et al. The Receptors CD96 and CD226 Oppose Each Other in the Regulation of Natural Killer Cell Functions. *Nat Immunol* (2014) 15(5):431–8. doi: 10.1038/ni.2850
16. El-Far M, Kouassi P, Sylla M, Zhang Y, Fouda A, Fabre T, et al. Investigators of the Canadian Hivspc. Proinflammatory Isoforms of IL-32 as Novel and Robust Biomarkers for Control Failure in HIV-Infected Slow Progressors. *Sci Rep* (2016) 6:22902. doi: 10.1038/srep22902
17. Eriksson EM, Keh CE, Deeks SG, Martin JN, Hecht FM, Nixon DF. Differential Expression of CD96 Surface Molecule Represents CD8(+) T Cells With Dissimilar Effector Function During HIV-1 Infection. *PloS One* (2012) 7(12):e51696. doi: 10.1371/journal.pone.0051696
18. Komai-Koma M, Gilchrist DS, Xu D. Direct Recognition of LPS by Human But Not Murine CD8+ T Cells Via TLR4 Complex. *Eur J Immunol* (2009) 39 (6):1564–72. doi: 10.1002/eji.200838866

19. Nold-Petry CA, Nold MF, Zepp JA, Kim SH, Voelkel NF, Dinarello CA. IL-32-dependent Effects of IL-1 $\beta$  on Endothelial Cell Functions. *Proc Natl Acad Sci USA* (2009) 106(10):3883–8. doi: 10.1073/pnas.0813334106
20. Nakayama M, Niki Y, Kawasaki T, Takeda Y, Ikegami H, Toyama Y, et al. IL32-PAR2 Axis Is an Innate Immunity Sensor Providing Alternative Signaling for LPS-TRIF Axis. *Sci Rep* (2013) 3:2960. doi: 10.1038/srep02960
21. Zaidan SM, Leyre L, Bunet R, Larouche-Anctil E, Turcotte I, Sylla M, et al. Upregulation of IL-32 Isoforms in Virologically Suppressed HIV-Infected Individuals: Potential Role in Persistent Inflammation and Transcription From Stable HIV-1 Reservoirs. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2019) 82 (5):503–13. doi: 10.1097/QAI.0000000000002185
22. Xu W, Larbi A. Markers of T Cell Senescence in Humans. *Int J Mol Sci* (2017) 18(8):1742. doi: 10.3390/ijms18081742
23. Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-Mediated Signalling Co-Stimulates Murine T Cells and Prevents Induction of Anergy in T-Cell Clones. *Nature* (1992) 356(6370):607–9. doi: 10.1038/356607a0
24. Czesnikiewicz-Guzik M, Lee WW, Cui D, Hiruma Y, Lamar DL, Yang ZZ, et al. T Cell Subset-Specific Susceptibility to Aging. *Clin Immunol* (2008) 127 (1):107–18. doi: 10.1016/j.clim.2007.12.002
25. Akbar AN, Henson SM, Lanna A. Senescence of T Lymphocytes: Implications for Enhancing Human Immunity. *Trends Immunol* (2016) 37(12):866–76. doi: 10.1016/j.it.2016.09.002
26. Bernhardt G. TACTILE Becomes Tangible: CD96 Discloses its Inhibitory Peculiarities. *Nat Immunol* (2014) 15(5):406–8. doi: 10.1038/ni.2855
27. Fuchs A, Cella M, Giurisato E, Shaw AS, Colonna M. Cutting Edge: CD96 (Tactile) Promotes NK Cell-Target Cell Adhesion by Interacting With the Poliovirus Receptor (CD155). *J Immunol* (2004) 172(7):3994–8. doi: 10.4049/jimmunol.172.7.3994
28. Stanko K, Iwert C, Appelt C, Vogt K, Schumann J, Strunk FJ, et al. CD96 Expression Determines the Inflammatory Potential of IL-9-producing Th9 Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (2018) 115(13):E2940–E9. doi: 10.1073/pnas.1708329115



29. Mittal D, Lepletier A, Madore J, Aguilera AR, Stannard K, Blake SJ, et al. Cd96 Is an Immune Checkpoint That Regulates CD8(+) T-Cell Antitumor Function. *Cancer Immunol Res* (2019) 7(4):559–71. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0637
30. El-Far M, Halwani R, Said E, Trautmann L, Doroudchi M, Janbazian L, et al. T-Cell Exhaustion in HIV Infection. *Curr HIV/AIDS Rep* (2008) 5(1):13–9. doi: 10.1007/s11904-008-0003-7
31. Chiang EY, de Almeida PE, de Almeida Nagata DE, Bowles KH, Du X, Chitre AS, et al. CD96 Functions as a Co-Stimulatory Receptor to Enhance CD8(+) T Cell Activation and Effector Responses. *Eur J Immunol* (2020) 50(6):891–902. doi: 10.1002/eji.201948405
32. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 System of T Cell Costimulation. *Annu Rev Immunol* (1996) 14:233–58. doi: 10.1146/annurev.immunol.14.1.233
33. Hendriks J, Xiao Y, Borst J. CD27 Promotes Survival of Activated T Cells and Complements CD28 in Generation and Establishment of the Effector T Cell Pool. *J Exp Med* (2003) 198(9):1369–80. doi: 10.1084/jem.20030916
34. Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. Cd28(-) T Cells: Their Role in the Age Associated Decline of Immune Function. *Trends Immunol* (2009) 30(7):306–12. doi: 10.1016/j.it.2009.03.013
35. Reinke S, Geissler S, Taylor WR, Schmidt-Bleek K, Juelke K, Schwachmeyer V, et al. Terminally Differentiated CD8(+) T Cells Negatively Affect Bone Regeneration in Humans. *Sci Transl Med* (2013) 5(177):177ra36. doi: 10.1126/scitranslmed.3004754
36. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 Defines Replicative Senescence and Antigen Induced Apoptotic Death of CD8+ T Cells. *Blood* (2003) 101(7):2711–20. doi: 10.1182/blood-2002-07-2103
37. Dolfi DV, Mansfield KD, Polley AM, Doyle SA, Freeman GJ, Pircher H, et al. Increased T-bet is Associated With Senescence of Influenza Virus-Specific CD8 T Cells in Aged Humans. *J Leukoc Biol* (2013) 93(6):825–36. doi: 10.1189/jlb.0912438
38. Ye J, Huang X, Hsueh EC, Zhang Q, Ma C, Zhang Y, et al. Human Regulatory T Cells Induce T-Lymphocyte Senescence. *Blood* (2012) 120(10):2021–31. doi: 10.1182/blood-2012-03-416040

39. Ye J, Ma C, Hsueh EC, Dou J, Mo W, Liu S, et al. TLR8 Signaling Enhances Tumor Immunity by Preventing Tumor-Induced T-Cell Senescence. *EMBO Mol Med* (2014) 6(10):1294–311. doi: 10.15252/emmm.201403918
40. Guaraldi G, Orlando G, Zona S, Menozzi M, Carli F, Garlassi E, et al. Premature Age-Related Comorbidities Among HIV-Infected Persons Compared With the General Population. *Clin Infect Dis* (2011) 53(11):1120–6. doi: 10.1093/cid/cir627
41. High KP, Brennan-Ing M, Clifford DB, Cohen MH, Currier J, Deeks SG, et al. HIV and Aging: State of Knowledge and Areas of Critical Need for Research. A Report to the NIH Office of AIDS Research by the HIV and Aging Working Group. *J AcquirImmuneDeficSyndr*(2012)60(Suppl1):S1–18.doi:10.1097/QAI.0b013e31825a3668
42. Quiros-Roldan E, Properzi M, Paghera S, Raffetti E, Castelli F, Imberti L. Factors Associated With Immunosenescence During Early Adulthood in HIV-infected Patients After Durable Efficient Combination Antiretroviral Therapy. *Sci Rep* (2020) 10(1):10057. doi: 10.1038/s41598-020-67100-8
43. Gianesin K, Noguera-Julian A, Zanchetta M, Del Bianco P, Petrara MR, Freguja R, et al. Premature Aging and Immune Senescence in HIV-Infected Children. *AIDS* (2016) 30(9):1363–73. doi: 10.1097/QAD.0000000000001093
44. Campisi J, d’Adda di Fagagna F. Cellular Senescence: When Bad Things Happen to Good Cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2007) 8(9):729–40. doi: 10.1038/nrm2233
45. Nou E, Lo J, Grinspoon SK. Inflammation, Immune Activation, and Cardiovascular Disease in HIV. *AIDS* (2016) 30(10):1495–509. doi: 10.1097/QAD.0000000000001109

# Figures

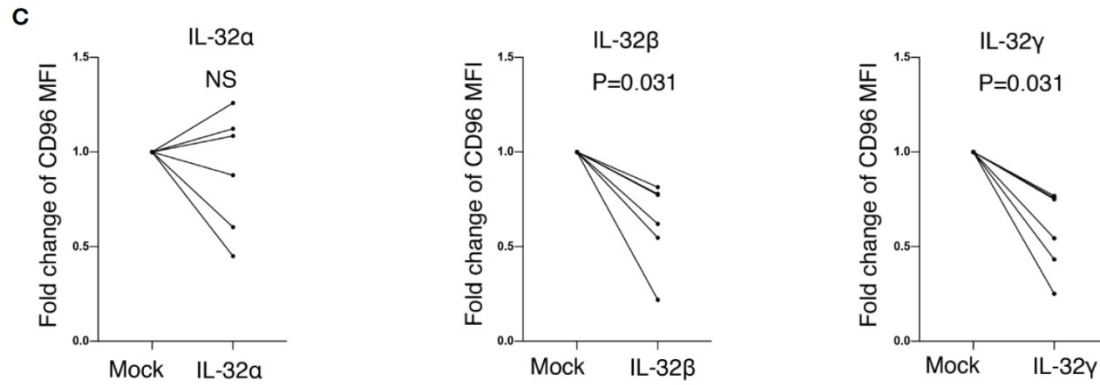
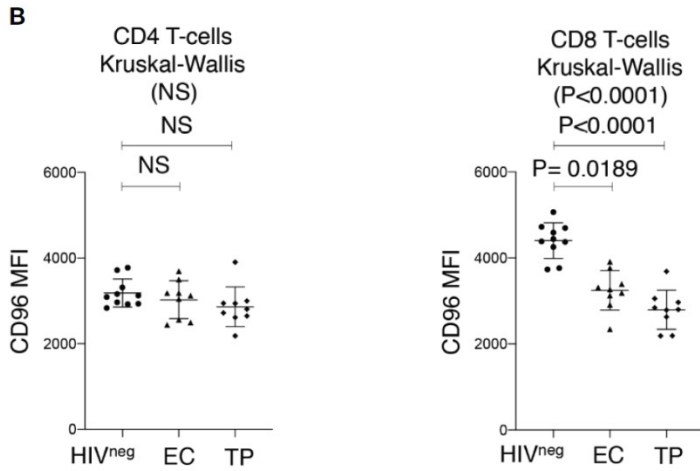
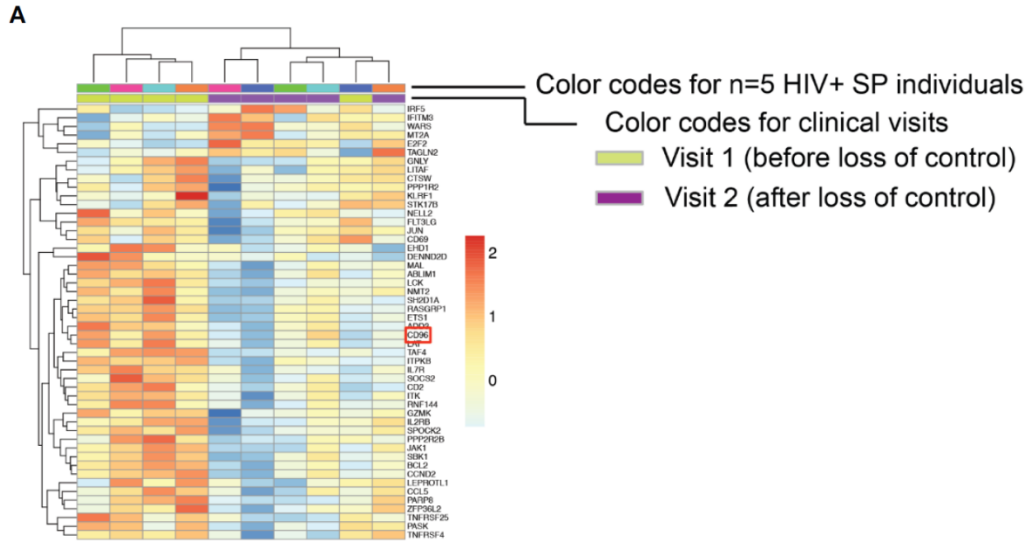


Figure 1: Down-Regulation of CD96 on total CD8 T-cells in HIV infection. (A) Heat map showing transcriptional analysis by microarrays of total PBMC from HIV+ slow progressor participants losing virological and immunological control (increased viral load and decreased CD4 counts, n=5) between Visit 1 (before loss of control) and Visit 2 (after loss of control). Selection of modulated genes with a cutoff of 1.3-fold and a p value <0.05. CD96 is highlighted by red square. (B) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD96 expression assessed by flow cytometry on CD4 (left) and CD8 T-cells (right) from HIVneg (n=10) as compared to Elite Controllers (EC) and Typical Progressors (TP) (n=9 per group). Data analyzed with the non-parametric test Kruskal-Wallis and Dunn's subtest. (C) Impact of the proinflammatory cytokine IL-32 (isoforms a, b and g) on CD96 expression on CD8 T-cells (from n=5 non-infected donors) following 5 days of stimulation. Data are shown as fold increase/decrease relative to mock-stimulated cells and analyzed with the matched pair Wilcoxon test. NS, Non-significant.

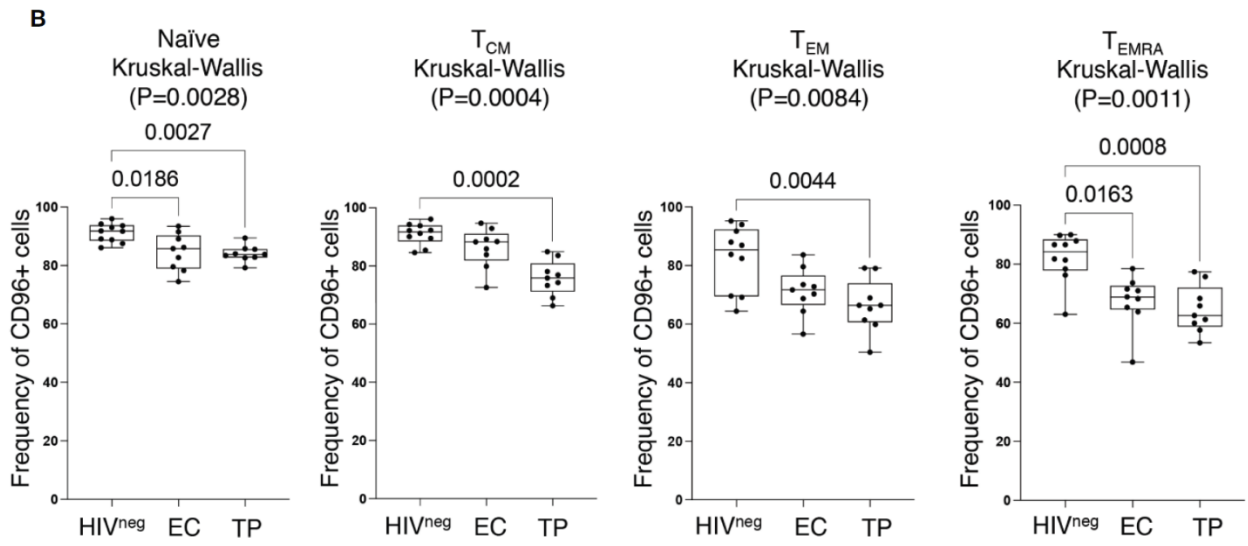
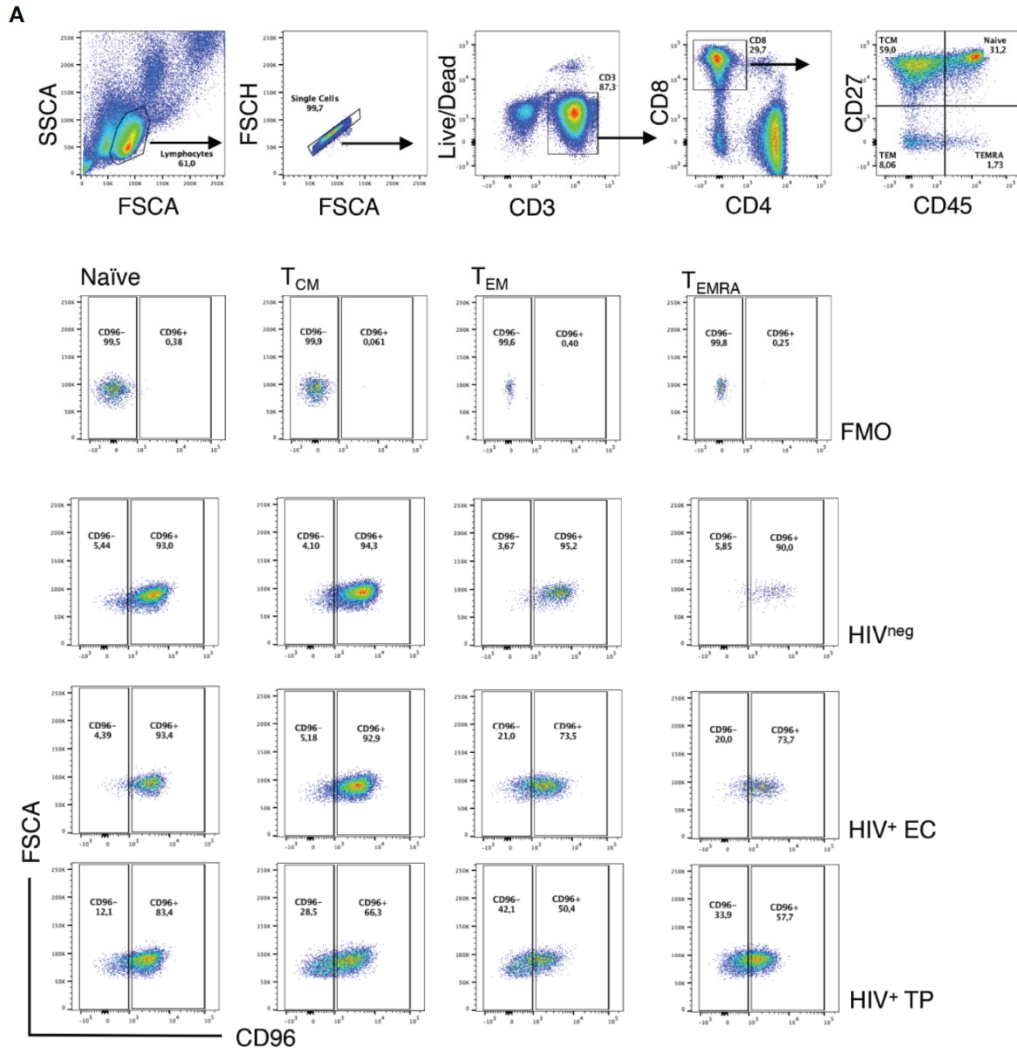


Figure 2: Decreased CD96 expression on CD8 T-cell subsets. (A) Representative ex vivo Flow cytometry dot plots showing the gating strategy for CD96<sup>+</sup> and CD96<sup>-</sup> expression on each of the four CD8 T-cell subsets; Naïve (TN; CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), Central Memory (TCM; CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup>CD27<sup>+</sup>), Effector Memory (TEM; CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup>CD27<sup>neg</sup>) and terminally differentiated effector memory re-expressing CD45RA (TEMRA; CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>neg</sup>) based on the Fluorescence Minus One (FMO) staining. (B) Analysis of CD96 on the different CD8 T-cell subsets from HIV<sup>neg</sup> (n=10), TP (n=9) and EC (n=9) showing the decreased frequency of CD96<sup>+</sup> cells in HIV<sup>+</sup> individuals. Data analyzed with the non-parametric Kruskal-Wallis and Dunn's subtest.

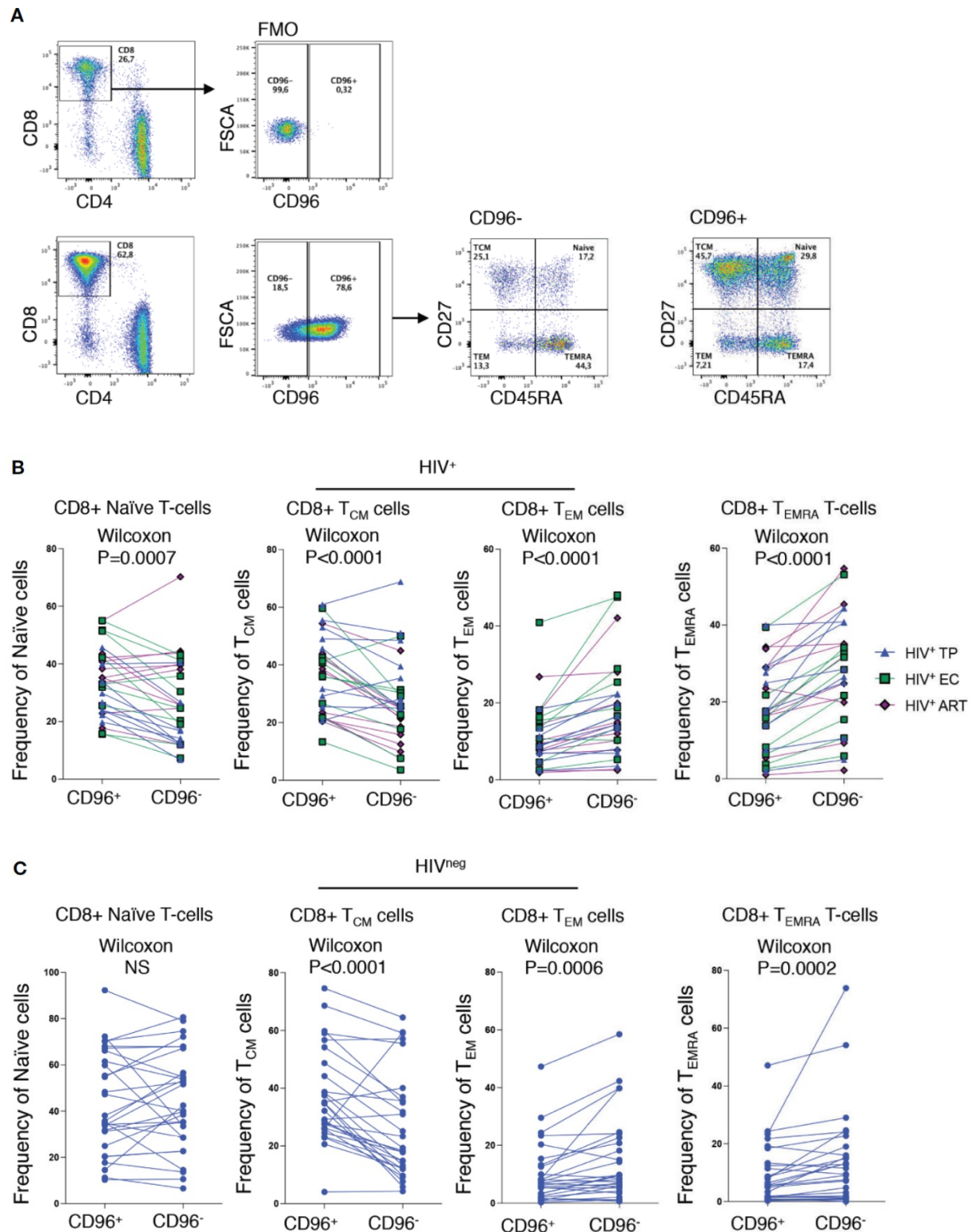


Figure 3: Loss of CD96 expression is associated with more differentiated phenotypes. (A) Representative ex vivo staining showing the gating strategy for CD96<sup>+/−</sup> cells based on FMO (upper panels) and gating on memory subsets; TN, TCM, TEM and TEMRA from CD96<sup>−</sup> and

CD96+ CD8 T-cells (lower panels). (B) Pair analysis for the frequency of TN, TCM, TEM, and TEMRA between CD96<sup>-</sup> and CD96<sup>+</sup> cells from the HIV<sup>+</sup> individuals EC (n=9) TP (n=9), and ART-treated (n=10). (C) Same analysis as in (B) on HIV<sup>neg</sup> (n=28). Data analyzed with Wilcoxon matched pair test. NS, Non-significant.



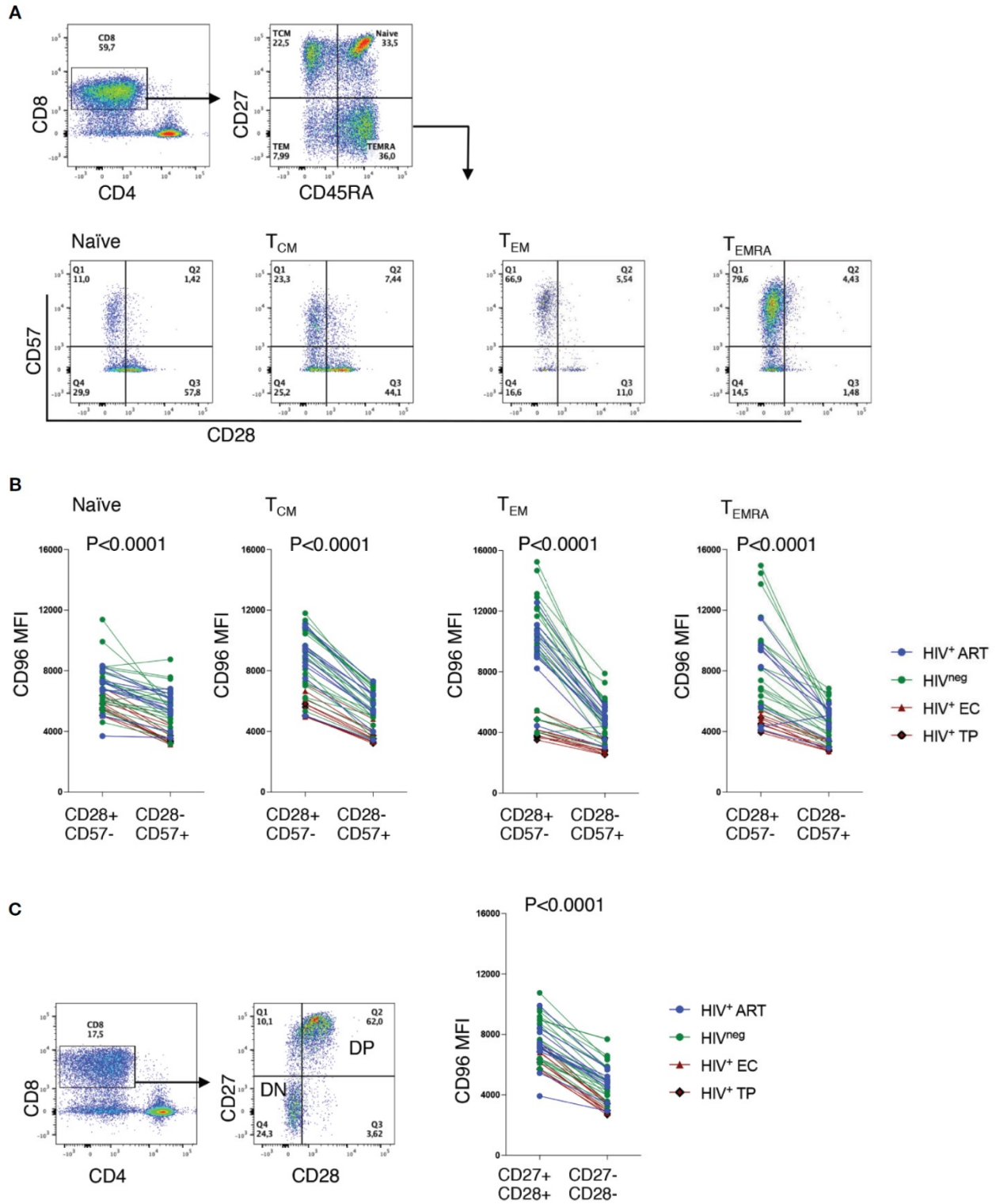


Figure 4: Low CD96 expression is associated with a senescence-like phenotype. (A) Representative ex vivo Flow cytometry dot plots showing the gating strategy on CD28 and CD57 from TN, TCM, TEM and TEMRA CD8 T-cells. (B) Analysis of CD96 expression on

CD28+CD57- senescent compared to their counterparts of CD28-CD57+ cells from HIV+ EC (n=5), TP (n=5), ART-treated (n=10) and HIVneg controls (n=23). (C) Analysis of CD96 expression on total CD8 T-cells with CD27+CD28+ double positive (DP) cells and CD27-CD28- double negative (DN) cells from the same individuals as in (B) Data analyzed with Wilcoxon matched pair test.

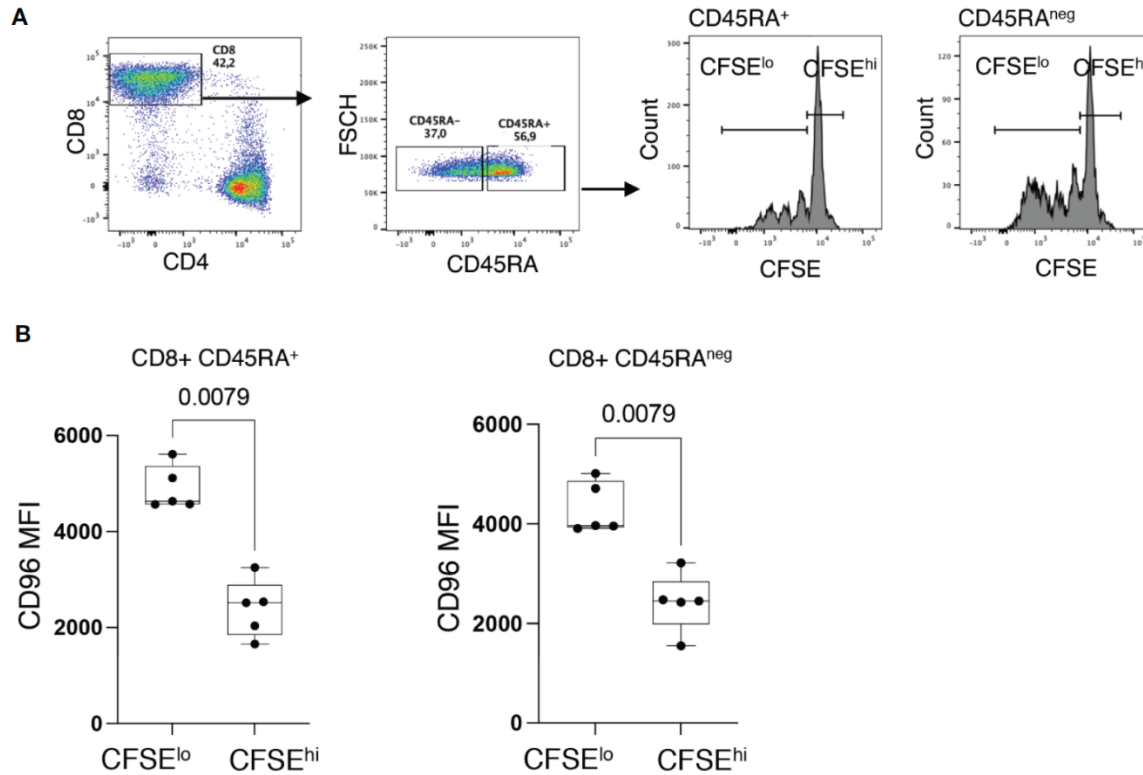


Figure 5: Down-regulation of CD96 is associated with poor T-cell proliferation. (A) Representative flow cytometry dot plots showing the gating strategy on proliferating (CFSE<sup>lo</sup>) and non-proliferating (CFSE<sup>hi</sup>) cells from CD8+CD45RA<sup>+</sup> and CD8+CD45RA<sup>neg</sup> T-cells. (B) Expression of CD96 on proliferating (CFSE<sup>lo</sup>) and non-proliferating (CFSE<sup>hi</sup>) in CD8+CD45RA<sup>+</sup> and CD8+CD45RA<sup>neg</sup> T-cells in response to PHA stimulation (1 mg/ml) and IL-2 (10 ng/ml) and 4 days incubation (n=5). Data analyzed with the non-parametric Mann-Whitney test.

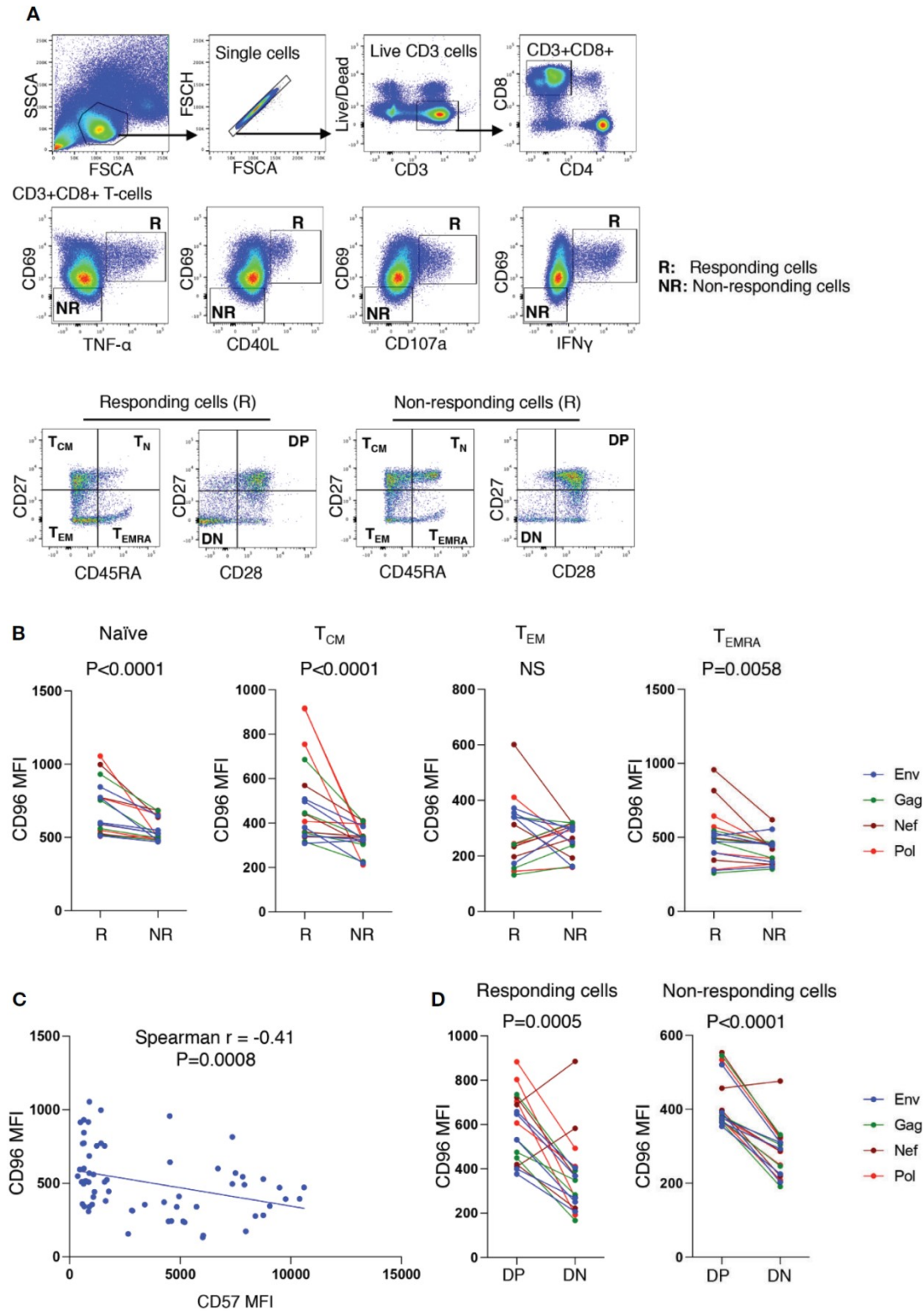


Figure 6: Higher expression of CD96 on responding CD8<sup>+</sup> T-cells from ART-treated individuals, stimulated with HIV antigens. (A) Gating strategy used to identify CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-cells

responding to HIV-1 peptide pools (6 h stimulation with Env, Gag, Nef, or Pol peptide pools) evaluated by intracellular cytokine staining in n=6 individuals on continuous ART (upper and middle panels). Responding cells are represented by R, whereas non-responding cells are represented by NR. Responding cells to each peptide pool (cells expression CD69 together either TNFa, CD40L, CD107, or IFNg) were grouped together by OR Boolean gating followed by gating on the memory subsets TCM, TEM, TEMRA and TN as well as gating on CD27 and CD28 (lower left panels). Similar gating strategy was also used for nonresponding cells (lower right panels). (B) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD96 on TCM, TEM, TEMRA and TN from responding compared to non-responding cells (responses corresponding to cells from six participants stimulated with four peptide pools). (C) Correlations between CD96 MFI and CD57 MFI on all responding cells (corresponding to the pool of responses from TCM, TEM, TEMRA and TN from n=6 participants). (D) Comparison of CD96 MFI on CD27+CD28+ double positive (DP) and CD27-CD28- double negative (DN) subsets from both responding and non-responding cells (corresponding to cells from 6 participants stimulated with 4 peptide pools). P values were calculated by matched-pair Wilcoxon test in (B, D) and Spearman correlation in (C).

## Tables

Study participants	HIV+ EC	HIV+ TP (ART-naïve)	HIV+ (On ART)	HIV <sup>neg</sup>
Number/group	9	9	10	28
(Men/Women)	(7/2)	(9/0)	(10/0)	(19/9)
Age (Years)	43 ± 5	40 ± 10	59 ± 6	52 ± 8*
Log <sub>10</sub> Viral load	1.67 ± 0.08	4.76 ± 0.51	1.84 ± 0.75	N/A
Time since ART initiation (Years)	N/A	N/A	16 ± 6	N/A
CD4 count (Cells/mm <sup>3</sup> )	842 ± 246	389 ± 97	450 ± 292	NA
CD8 count (cell/mm <sup>3</sup> )	710 ± 281	911 ± 210	637 ± 400	NA
CD4/CD8 ratio	1 ± 0.32	0.40 ± 0.06	0.88 ± 0.62	NA

Numbers are shown in mean ± SD.

\*Unknown age for n = 8 individuals.

N/A, non-applicable; NA, non-available.

Table 1: Demographic and clinical parameters for the study participants.

Population	Effect on CD96	DFn	DFd	F	P	P < 0.05	GES	P. Sig
<b>CD8 subsets</b>								
<b>Naïve</b>	CD28/CD57	1	66	17.531	8.55E-05	*	0.210	****
<b>T<sub>CM</sub></b>	CD28/CD57	1	66	57.699	0.00E+00	*	0.466	****
<b>T<sub>EM</sub></b>	CD28/CD57	1	66	52.672	0.00E+00	*	0.444	****
<b>T<sub>EMRA</sub></b>	CD28/CD57	1	58	35.477	2.00E-07	*	0.380	****
<b>Total CD8</b>	CD27/CD28	1	66	59.856	7.84E-11	*	0.476	****

Data analysis account for comparisons of populations from the same individual.

DFn, degrees of freedom in the numerator; DFd, degrees of freedom in the denominator; F, statistic test for ANCOVA; P. Sig, P Significance.

\*p < 0.05, \*\*\*\*p < 0.0001.

Table 2: ANCOVA analysis for adjustment of CD96 expression by age on T-cell subsets.

# Manuscrit #2: Differential Impact of IL-32 Isoforms on the Functions of Coronary Artery Endothelial Cells: A Potential Link with Arterial Stiffness and Atherosclerosis



Article

## Differential Impact of IL-32 Isoforms on the Functions of Coronary Artery Endothelial Cells: A Potential Link with Arterial Stiffness and Atherosclerosis

Rémi Bunet <sup>1,2</sup>, Marie-Hélène Roy-Cardinal <sup>3</sup>, Hardik Ramani <sup>1,2</sup>, Aurélie Cleret-Buhot <sup>2</sup>, Madeleine Durand <sup>2,4</sup>, Carl Chartrand-Lefebvre <sup>2,5</sup>, Jean-Pierre Routy <sup>6</sup>, Réjean Thomas <sup>7</sup>, Benoît Trottier <sup>8</sup>, Petronela Ancuta <sup>1,2</sup>, David B. Hanna <sup>9</sup>, Alan L. Landay <sup>10</sup>, Guy Cloutier <sup>3,5,11</sup>, Cécile L. Tremblay <sup>1,2,\*,†</sup> and Mohamed El-Far <sup>2,\*,†</sup>

<sup>1</sup> Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

<sup>2</sup> Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC H2X 0A9, Canada

<sup>3</sup> Laboratory of Biorheology and Medical Ultrasonics, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC H2X 0A9, Canada

<sup>4</sup> Département de Médecine, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada

<sup>5</sup> Département de Radiologie, Radio-Oncologie et Médecine Nucléaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

<sup>6</sup> Chronic Viral Illness Service, Division of Hematology, McGill University Health Centre, Montréal and Research Institute of McGill University Health Centre, Montréal, QC H4A 3J1, Canada

<sup>7</sup> Clinique Médicale l'Actuel, Montréal, QC H2L 4P9, Canada

<sup>8</sup> Centre de Médecine Urbaine du Quartier Latin, Montréal, QC H2L 4E9, Canada

<sup>9</sup> Department of Epidemiology and Population Health, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA

<sup>10</sup> Department of Internal Medicine, Rush University Medical Center, Chicago, IL 60612, USA

<sup>11</sup> Institut de Génie Biomédical, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada

\* Correspondence: c.tremblay@umontreal.ca (C.L.T.); mohamed.el.far.chum@ssss.gouv.qc.ca (M.E.-F.)

† These authors contributed equally to this work.

**Publication : Viruses 2023, 15, 700. <https://doi.org/10.3390/v15030700>**

Contribution des auteurs : R.B. a planifié et exécuté les expériences, analysé et interprété les données et écrit le manuscrit. M.-H.R.-C a planifié les mesures par ultrason et aidé à l'analyse des données. HR et A.C.-B ont aidé pour les essais in vitro et les analyse d'imagerie cellulaire. M.D., C.C.-L. et G.C. ont mis à disposition les échantillons et les images d'artères carotides des

participants, et ont discuté les données, aidé à l'interprétation et révisé le manuscrit. J.-P.R., R.T., B.T., A.L.L. et P.A. ont mis à disposition les échantillons et contribué à la révision du manuscrit. D.B.H. a aidé à l'analyse de régression linéaire. C.L.T et M.E.-F. ont planifié et supervisé les expériences, ont analysé et interprété les données et supervisé l'étude. Tous les auteurs ont contribué à l'article et approuvé la version soumise.



## **Abstract**

Chronic inflammation is associated with higher risk of cardiovascular disease (CVD) in people living with HIV (PLWH). We have previously shown that interleukin-32 (IL-32), a multiisoform proinflammatory cytokine, is chronically upregulated in PLWH and is linked with CVD. However, the mechanistic roles of the different IL-32 isoforms in CVD are yet to be identified. In this study, we aimed to investigate the potential impact of IL-32 isoforms on coronary artery endothelial cells (CAEC), whose dysfunction represents a major factor for atherosclerosis. Our results demonstrated that the predominantly expressed IL-32 isoforms (IL-32 $\beta$  and IL-32 $\gamma$ ) have a selective impact on the production of the proinflammatory cytokine IL-6 by CAEC. Furthermore, these two isoforms induced endothelial cell dysfunction by upregulating the expression of the adhesion molecules ICAM-I and VCAM-I and the chemoattractants CCL-2, CXCL-8 and CXCL-1. IL-32-mediated expression of these chemokines was sufficient to drive monocyte transmigration in vitro. Finally, we demonstrate that IL-32 expression in both PLWH and controls correlates with the carotid artery stiffness, measured by the cumulated lateral translation. These results suggest a role for IL-32-mediated endothelial cell dysfunction in dysregulation of the blood vessel wall and that IL-32 may represent a therapeutic target to prevent CVD in PLWH.

**Keywords:** HIV; inflammation; cardiovascular disease; IL-32; arterial stiffness; endothelial cell dysfunction; CCL-2; CXCL-8; CXCL-1

## Introduction

Life expectancy of people living with HIV (PLWH) has been greatly enhanced with anti-retroviral therapy, ART [1,2]. However, long-term health management is strictly needed as PLWH are aging and are exposed to age-associated comorbidities. For instance, 10% of PLWH worldwide are now over the age of 50, whereas in US and Canada, the aging population represents 50% of PLWH [3]. This natural biological aging is further associated with inflammation and chronic activation of the immune system in PLWH even under ART, which accelerates the development of multiple comorbidities such as cancer, neurological, and cardiovascular diseases [4–6]. In this regard, arterial dysfunction is known to be involved in cardiovascular diseases including hypertension, stroke and heart disease [7,8]. The development of dysfunctional arterial endothelium with age contributes to a number of hemodynamic changes in the body by increasing large artery stiffness, oscillatory shear stress and resistant arterial tone [9].

At the cellular level, endothelial dysfunction leads to an increase in CXCL-8 and CCL-2 chemokine secretion and increased expression of the adhesion molecules ICAM-I and VCAM-I [10,11]. Among these, CCL-2 is a strong chemoattractant that guides monocyte trafficking to the inflamed arteries and combined with CXCL-8 they play a role in firm adhesion of monocyte into the endothelium [12]. Meanwhile, upregulation of the adhesion molecules ICAM-I and VCAM-I promotes slow rolling, firm adhesion and migration of monocytes through the endothelium [13]. This endothelial dysfunction phenotype increases extravasation and subendothelial accumulation of monocytes that can differentiate into macrophages and give rise to the pathogenic foam cells [14,15]. Along with the endothelial dysfunction, elevated levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  inflammatory cytokines contribute to atherosclerotic plaque formation and cardiac irritability [10,16,17]. IL-6 and TNF- $\alpha$  have been directly correlated with obstructive coronary artery disease (CAD) along with IL-32 that was shown to be highly expressed in the coronary artery endothelium in people with CAD [18,19].

IL-32 is a pro-inflammatory cytokine produced by immune and nonimmune cells and is expressed in at least 10 different isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , D,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ , and small/sm, generated by alternative splicing) [20–22]. We and others have shown that plasmatic IL-32 levels are

upregulated in PLWH even under ART treatment [23,24]. We further demonstrated that specific IL-32 isoforms (IL-32  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\epsilon$  in women but IL-32 D and  $\theta$  in men living with HIV) were associated with carotid artery and coronary artery subclinical atherosclerosis, respectively [25,26]. These observations warranted further studies to dissect the roles of IL-32 isoforms in mechanisms underlying the development of CVD in PLWH. Herein, we aimed to investigate the impact of exogenous IL-32 isoforms on the dysfunction of coronary artery endothelial cells (CAEC) and carotid artery stiffening, and to identify their profile of key cytokines and chemokines secretion in response to IL-32 activation.

## **Material and methods**

### **The Study Participants**

The current study included PLWH (n = 60) and control (n = 53) individuals participating in the Canadian HIV and Aging Cohort Study (CHACS). The CHACS cohort follows longitudinally PLWH and controls for the development of cardiovascular diseases where subclinical atherosclerosis is measured using a cardiac computed tomography (CT) scan with injection of contrast media and defined by the presence of atherosclerotic plaque (plaque+) in the coronary arteries [27].

### **Cells**

Primary Human Coronary Artery Endothelial Cells were obtained from Creative Bioarray (Shirley, NY, USA). Cells were maintained in culture in Human Coronary Artery Endothelial Cell Medium (Creative Bioarray, Shirley, NY, USA) and experiments were conducted between passage 5 to 10.

### **Flow Cytometry Analysis**

Flow cytometry analysis was used to study the expression of adhesion molecules on CAEC using BD FACSAria (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Staining was performed with 1 million CAEC cells detached with Accutase (STEMCELL, Vancouver, CAN) in 4% Fetal Bovine Serum (FBS) in PBS. Cell surface staining was performed with fluorochromeconjugated antibodies from Biolegend (San Diego, CA, USA); Alexa Fluor 700 Mouse anti-Human CD54 (Clone HA58, Cat # 353126), APC Mouse anti-Human CD106 (Clone STA, Cat # 305810) and FITC Mouse anti-Human CD31 (Clone WM59, Cat # 303104).

### **Cell Stimulation**

CAEC were stimulated with 500 ng/mL of IL-32 isoforms  $\alpha$  (RND Systems Minneapolis, MN, USA Cat # 3040-IL-050),  $\beta$  (Cat # 6769-IL-025) and  $\gamma$  (Cat # 4690-IL-025/CF) at 90% cell confluence. Cells were incubated for 3 h, 12 h or 72 h at 37 °C with 5%CO<sub>2</sub> as appropriate and as described in the Figure legends. All stimulations were done in the presence of Polymyxin B (inhibitor of the lipopolysaccharide LPS) at 1  $\mu$ g/mL.

## **ELISA**

IL-10, IL-18, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL-2, CXCL-1, CXCL-8, ICAM-I and VCAM-I were quantified using commercially available ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA Cat # DY217B-05, DY318-05, DY406-05, DY210-05, DY201-05, DY279-05, DY275-05, DY20805, DY720-05 and DY809-05, respectively) as per the manufacturer's recommendations in CAEC supernatant.

## **Quantitative Reverse Transcription Assays (RT-qPCR)**

Total RNA was isolated from CAEC using the RNeasy plus mini kit (QIAGEN, Toronto, ON, CAN. Catalog No. 74134) as per the manufacturer's protocol. Primers sets for the quantification of the different genes were as follows: CXCL-1 (Forward 50- AACCGAAGTCATAGCCACAC-30 and reverse 50- GTTGGATTTGTCAGTTCAGC-30) [28], CXCL-8 (Forward 50- GACCACACTGCGCCAACAC-30 and reverse 50- CTTCTCCA CAACCCTCTGCAC-30) [29], CCL-2 (Forward 50-CAGCCAGATGCAATCAATGC-30 and reverse 50-TGGAATCCTGAACCCACTTCT-30) [30], ICAM-I (Forward 50-GGCCGGCCAGCT TATACA-30 and reverse 50-TAGACACTTGAGCTCGGGCA-30) [31] and VCAM-I (Forward 50-TCAGATTGGAGACTCAGTCATG-30 and reverse 50-ACTCCTCACCTTCCCGCTC-30) [31]. Primers used for the IL-32 isoforms quantification can be found in supplementary material in our previous publication [22]. The IL-32 isoforms quantification assays were carried out using one-step SYBR Green quantitative real-time PCR on RNA from PBMCs isolated from the study participants and extracted using the RNeasy plus mini kit from Qiagen as per the manufacturer's protocol. RT-qPCR was performed on a LightCycler 480 II (Roche, Mississauga, ON, CAN) apparatus using QIAGEN (Toronto, ON, CAN) reagents (RNase-Free DNase Set (50); Cat. No.

79254). Real-time RT-qPCR was performed using 25ng RNA per reaction. Gene expression was normalized to the housekeeping gene  $\beta$ -glucuronidase. RT-qPCR data were analyzed with the  $\Delta$ CT method using the housekeeping gene  $\beta$ -glucuronidase as an internal reference as we previously described [22].

### **Transwell Assay**

Negatively selected monocyte (STEMCELL, Vancouver, BC, CAN Cat #19058) migration was carried out in a 3  $\mu$ m transwell insert (CELLTREAT, Pepperell, MA, USA. Cat # 230631) by placing the monocytes in the upper chamber while placing the supernatants from IL-32 isoform-stimulated CAEC in the lower chamber for 3 h with or without antagonists for CXCR2 (TOCRIS, Toronto, ON, CAN. Cat # 2725) and CCR2 (TOCRIS, Toronto, CAN. Cat # 2517). Transwell membranes were stained with DAPI (Sigma, Saint-louis, MO, USA Cat # D9542) for cell nucleus and imaged with a Zeiss microscope with Z-stack. Automatic cell counting was performed using FIJI (NIH, ImageJ2, v1.8.0\_172) macro developed by the cell imaging facility of the CRCHUM.

### **Carotid Artery Ultrasound Imaging and Image Analysis**

Ultrasound imaging and image analysis have been carried as described in our previous work [32]. Ultrasound acquisitions were performed between October 2015 and October 2017. Arterial walls of left and right common and internal carotids were assessed in this study; 4 cine-loops were thus acquired for each participant. Longitudinal views of each vessel were acquired with an Aixplorer system (SuperSonic Imagine, Aix-en-provence, FRA) using a 256-element linear array probe (SuperLinear™ SL15-4) at 7.5 MHz. Participants were asked to hold breath during acquisitions. The frame rate was set to 50 frames per s, and cine-loops of raw US radiofrequency data were recorded for approximately 5 s. Examinations were performed by a vascular technologist with more than 20 years of experience.

## **Statistical Analysis**

Data were analyzed using GraphPad Prism 8 (GraphPad software, San Diego, CA, USA) and SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Non-parametric Kruskal–Wallis and Dunn’s subtests were used to analyze more than 2 groups for the same variable whereas Mann-Whitney non-parametric analysis was used to compare two groups for the same variable. Linear regression was used for multivariable analysis, adjusting for age, Framingham risk score, body mass index, and LDL and HDL cholesterol levels. Differences between groups were considered statistically significant at values of  $p < 0.05$  with two-tailed analysis.

## Results

### **IL-32 Isoforms Exhibit a Differential Impact on Cytokine Production by the Primary Coronary Artery Endothelial Cells**

We first aimed to determine whether IL-32 isoforms would upregulate the production of inflammatory cytokines by the primary CAEC based on our previous observations on both CD4 T-cells and monocytes where IL-32 isoforms induce multiple inflammatory mediators [24]. We tested the production of key cytokines involved in CVD such as IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-18 as well as the anti-inflammatory cytokine IL-10 in CAEC supernatant by ELISA following 72 h of stimulation with IL-32 isoforms. We observed that IL-32 $\beta$  and  $\gamma$ , but not IL-32 $\alpha$ , significantly upregulated the production of the inflammatory cytokine IL-6 ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0095$ , respectively) compared to the non-stimulated conditions (Figure 1A, left panel). In contrast to what we observed on other cell types [24], CAEC did not upregulate any other inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or IL-18 in response to IL-32 isoforms (Figure 1B), or even to LPS stimulation (data not shown), suggesting that CAEC are not a source for these inflammatory cytokines. Interestingly, we observed that IL-32 $\beta$ , and to a lesser extent IL-32 $\gamma$ , decreased the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in CAEC (Figure 1A, right panel,  $p = 0.0011$  for IL-32 $\beta$ ). These results demonstrated that, in contrast to the impact of IL-32 isoforms on T-cells and monocytes where they induce a number of inflammatory cytokines [22,24,26], endothelial cells respond to IL-32 isoforms by increasing the expression of the CVD-associated cytokine IL-6 and decreasing the atheroprotective cytokine IL-10.

### **IL-32 $\beta$ and $\gamma$ Induce Coronary Artery Endothelial Cell Dysfunction**

Given the prominent role of IL-6 in endothelial cell dysfunction [33] and the specific upregulation of IL-6 by CAEC in response to IL-32 as shown above, we aimed to determine the impact of the IL-32 isoforms on the typical endothelial dysfunction markers ICAM-I and VCAM-I [34]. We quantified these adhesion molecules at the RNA level by RT-qPCR in CAEC following a 12h stimulation with IL-32 isoforms  $\alpha$ ,  $\beta$  or  $\gamma$ . We observed that IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  significantly upregulated ICAM-I ( $p = 0.0028$  and  $p = 0.0303$ , respectively) and VCAM-I ( $p = 0.0016$  and  $p = 0.0383$ , respectively) RNA expression compared to nonstimulated cells (Figure 2A). The upregulated RNA expression of ICAM-I and VCAM-I was associated with significantly



increased levels of their secreted proteins quantified by ELISA in the supernatants of CAEC following 72 h stimulation with IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  (ICAM-I;  $p = 0.0053$  and  $p = 0.0068$ , respectively, and VCAM-I;  $p < 0.0001$  and  $p = 0.0001$ , respectively, Figure 2B). Furthermore, the expression of ICAM-I and VCAM-I on the cell surface (a feature associated with the recruitment of leukocytes to the inflammatory sites) was assessed by flow cytometry following 72 h stimulation under the same conditions. In line with the RNA transcription and secreted protein data, IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  significantly upregulated ICAM-I ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0005$ , respectively) and VCAM-I ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0007$ , respectively) on the surface of CAEC compared to non-stimulated cells (Figure 2C). Taken together, these results suggest that IL-32 isoforms  $\beta$  and  $\gamma$ , but not  $\alpha$ , induce cell dysfunction in CAEC.

### **IL-32 $\beta$ and $\gamma$ Increase Chemokine Production in Coronary Artery Endothelial Cells**

Expression of the adhesion molecules ICAM-I and VCAM-I, which are involved in leukocyte recruitment by endothelial cells, further suggests that IL-32 isoforms might also impact the chemokine production in CAEC, which together (adhesion molecules and chemokines) would enhance the leukocyte recruitment potential of these cells to the site of inflammation. To this end, we evaluated the expression of key chemokines known to be involved in leukocytes chemotaxis, namely, CCL-2, CXCL-1, and CXCL-8 [35–38]. These chemokines were first quantified by RT-qPCR following a 12 h stimulation with IL-32 isoforms. Similar to the CAEC dysfunction markers, we observed that IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  significantly upregulated the RNA expression of CCL-2 ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0012$  respectively), CXCL-1 ( $p = 0.0001$  and  $p = 0.0023$  respectively) and CXCL-8 ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0028$ , respectively) compared to the non-stimulated condition or IL-32 $\alpha$ -stimulated cells (Figure 3A). The protein expression of these chemokines was further assessed in CAEC supernatant by ELISA following 72 h stimulation with IL-32 isoforms. Of note, all experiments were carried out in the presence of the endotoxin inhibitor Polymyxin B, which did not significantly impact the CAEC response to IL-32 isoforms, while completely diminishing the impact of LPS stimulation that was used at a similar concentration to IL-32 isoforms (500 ng/mL) (Supplemental Figure S1). Under these experimental conditions, we observed that IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  upregulated CCL-2 ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0132$ , respectively), CXCL-1 ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0198$ , respectively) and CXCL-8 ( $p = 0.030$  and  $p = 0.066$  (marginally significant), respectively) compared to the non-stimulated or IL-32 $\alpha$ -stimulated cells (Figure

3B). These results suggested a specific effect of IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  to induce chemokines' expression by CAEC, which would potentially increase their capacity to attract immune cells.

### **IL-32 $\beta$ - and $\gamma$ -Induced Chemokines Drive Monocyte Transmigration towards CAEC Supernatants**

Since CCL-2 and CXCL-8 are known to be potent monocyte chemoattractants [36], we hypothesized that CAEC stimulated with IL-32 isoforms would increase their potential to recruit monocytes. We assessed the transmigration of primary monocytes towards the supernatant of CAEC stimulated with IL-32 isoforms  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  in transwell assays and the total migrated cells were counted by imaging (DAPI stain was used to identify the migrated cells on the transwell membranes). We observed that supernatant from IL-32  $\beta$  and  $\gamma$ -stimulated CAEC significantly attracted higher numbers of monocytes ( $p = 0.0005$  and  $p = 0.0141$ , respectively) compared to the non-stimulated cells (Figure 4A). To ensure this effect was specific and related to the upregulation of CCL-2 and CXCL-8 by IL-32 isoforms, we pre-treated the monocytes with the antagonists RS504393 and SB225002, which target CCR2 (CCL-2 receptor) and CXCR2 (CXCL-8 receptor), respectively, before running the transwell assay. Under these conditions, we observed a significant decrease in the number of transmigrating monocytes compared to the non-treated cells (IL-32 $\beta$ :  $p = 0.0018$  for CXCR2 antagonist and  $p = 0.0051$  for CCR2 antagonist, IL-32 $\gamma$ :  $p = 0.0045$  for CXCR2 antagonist and  $p = 0.0078$  for CCR2 antagonist, Figure 4B). Of note, the use of CXCR2 antagonist showed a modest but significant impact on the non-stimulated and IL-32 $\alpha$ -stimulated supernatants ( $p = 0.0039$  and  $p = 0.0003$ , respectively), likely driven by the inhibition of the spontaneous CXCL-8 production by CAEC as could be seen in Figure 3B. Intriguingly, the use of either CCR2 or CXCR2 antagonists in the IL-32-stimulated conditions strongly diminished the monocyte migration to levels close to the non-stimulated cells. However, earlier studies demonstrated that monocyte migration by these chemokines (CCL-2 and CXCL-8) and chemokine receptors (CCR2 and CXCR2) are highly interdependent through a synergistic mechanism involving the activation of ERK1/ERK2 pathways and intracellular calcium signaling [39]. These studies demonstrated that CXCL-8 largely enhances the chemoattraction potential of CCL-2 [39]. Therefore, inhibition of CCL-2 in our assays would likely diminish the monocytes migration as expected, but additionally, CXCL-8 inhibition would, on its turn, diminish the synergistic effect for CCL-2-mediated migration as well. Taken together, these results suggest

that IL-32-induced expression of the chemokines CCL-2 and CXCL-8 has the potential to significantly and specifically increase monocyte recruitment by coronary artery endothelial cells.

### **IL-32 Expression Is Associated with Carotid Artery Wall Stiffness**

Since we had established the functional link between IL-32 and endothelial cell's dysfunction and cytokine/chemokine production, we further aimed to investigate whether IL-32 expression in vivo might be correlated with arterial diseases. Accordingly, we quantified the IL-32 isoforms  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , D,  $\epsilon$  and  $\theta$  (isoforms for which we have established RT-qPCR assays [22,25,26]) from both PLWH (n = 60) and controls (n = 53) (Table 1), and studied their correlation with arterial stiffness determined by cumulated lateral translation in the common carotid artery (CLT-CCA) that is measured by ultrasound noninvasive vascular elastography (NIVE) [32]. CLT-CCA represents the cyclic translation motion, during pulsation, of the arterial wall along the longitudinal vessel axis. Consistent with our earlier observations [22,25,26], all IL-32 isoforms that were tested ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , D,  $\epsilon$  and  $\theta$ ) were significantly upregulated in PBMCs from PLWH compared to controls ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0049$ ,  $p = 0.0001$  and  $p < 0.0001$ , respectively) (Figure 5A). Interestingly, the levels of IL-32 isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , D,  $\epsilon$  and  $\theta$ ) negatively and significantly correlated with cumulated lateral translation in the common carotid artery (CLT-CCA) from the controls ( $p = 0.042$ ,  $p = 0.017$ ,  $p = 0.018$ ,  $p = 0.019$ ,  $p = 0.009$  and  $p = 0.03$ , respectively, Figure 5B). These associations remained statistically significant after adjustment for age, Framingham risk score, body mass index, and LDL and HDL cholesterol levels, with the exception of isoforms  $\alpha$  and D which became marginally significant ( $p = 0.09$  and  $p = 0.06$ , respectively). In PLWH, no significant correlation was observed between IL-32 and CLT-CCA when we analyzed the total population of PLWH (Supplemental Figure S2A). However, the negative significant correlations with IL-32 isoforms in PLWH were only observed in the CLT-CCA measures within the upper quartiles (n = 30) but not the lower quartiles (n = 30) ( $p = 0.015$ ,  $p = 0.029$ ,  $p = 0.024$  for IL-32 $\gamma$ , D and  $\epsilon$ , respectively, and marginally significant for isoforms  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\theta$  with  $p = 0.054$ ,  $p = 0.071$  and  $p = 0.061$ , respectively) (Figure 5C). In further analyses adjusted for age, Framingham risk score, body mass index, and LDL and HDL cholesterol levels, the associations between IL-32 and CLT-CCA strengthened and were statistically significant for all isoforms except for  $\theta$  ( $p = 0.09$ ). These results were intriguing

given the higher levels of IL-32 isoform expression in PLWH compared to the controls. However, when we stratified PLWH by age for the upper and lower CLT-CCA quartiles, we observed that individuals within the lower quartile of CLT-CCA (more arterial stiffness) were older compared to individuals within the upper CLT-CCA quartiles (individuals with less diseased arteries) (Supplemental Figure S2B, left panel). Of note, this effect was not observed within the controls, where individuals within the upper (n = 27) and lower (n = 26) CLT-CCA quartiles had similar ages (Supplemental Figure S2B, left panel). These results demonstrated that the association between IL-32 expression and arterial stiffness was only observed in the relatively younger but not the older PLWH, even with the significant correlation between IL-32 and aging (Supplemental Figure S2B, right panel). These results also suggested that IL-32 may accelerate co-morbidities such as vascular diseases in PLWH at an earlier age; however, advanced biological aging remains a dominant mediator/predictor for the deterioration of the arterial functions.

## Discussion

IL-32 is known to be upregulated in multiple inflammatory conditions associated with increased risk for the development of cardiovascular diseases, such with chronic viral and bacterial infections, inflammatory bowel disease and chronic obstructive pulmonary disease [40–43]. Previous studies including ours demonstrated that IL-32 is persistently upregulated in both cells and plasma from people living with HIV and is associated with the presence of coronary artery and carotid artery atherosclerosis [23,25,26,44]. However, whether IL-32 contributes to the pathogenesis of atherosclerosis is not clear. In the current study, we assessed the impact of IL-32 isoforms on endothelial cell functions and cytokines/chemokines expression as it relates to inflammation and recruitment of leukocytes. We demonstrated that specific exogenous IL-32 isoforms (IL-32 $\beta$  and  $\gamma$ ) have the potential to impact coronary artery endothelial cells leading to their dysfunction and recruitment of monocytes, two conditions linked with the development of atherosclerosis [45,46]. We first assessed CAEC pro-inflammatory cytokine production for IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-18 and IL-1 $\beta$ , which are four important players for the development of cardiovascular diseases [47–49] together with the anti-inflammatory cytokine IL-10. Interestingly, only IL-6 was upregulated by IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  as these CAEC do not produce either TNF- $\alpha$ , IL-18 or IL-1 $\beta$ , even in response to LPS. IL-6 is considered to be an upstream inflammatory cytokine that is associated with endothelial dysfunction (mediating the upregulation of the leukocytes' adhesion molecules ICAM-I and VCAM-I) and subclinical atherosclerosis [33,50] and therefore, its production by CAEC in response to IL-32  $\beta$  and  $\gamma$  may represent one of the mechanisms by which IL-32 contributes to coronary artery dysfunction and inflammation. To validate this hypothesis, we investigated the dysfunction of CAEC following IL-32  $\beta$  and  $\gamma$  stimulation by measuring their expression of ICAM-I and VCAM-I. ICAM-I and VCAM-I were both upregulated at the RNA level as well as at the protein level on cell surface. ICAM-I and VCAM-I have been shown to be removed from the endothelial cell surface by proteolytic cleavage and shedding as a control mechanism to limit the effect of the inflammatory process [51] and high levels of plasmatic ICAM-I and VCAM-I have been shown to directly correlate with atherosclerosis [52]. This phenotype was also induced by IL-32 in the current study and indicated that IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  induce the upregulation of typical dysfunction biomarkers in CAEC. However, it remains unclear

whether this mechanism is directly mediated by IL-6 and how IL-6 may signal in the context of endothelial cells *in vitro*.

On top of being dysfunction markers, cell-associated ICAM-I and VCAM-I play a role in the slow rolling and firm adhesion of monocytes to the arterial endothelium and initiation of atherosclerosis [52,53]. The upregulation of these adhesion receptors by IL-32 isoforms suggests a potential role for IL-32 in recruitment of immune cells and the contribution to the pathogenesis of atherosclerosis. Indeed, not only IL-32 isoforms upregulate the adhesion receptors but also increase the expression of a number of chemoattractants, namely, CCL-2, CXCL-1 and CXCL-8 at the RNA and protein levels. CCL-2, the prototype of chemoattractants, and CXCL-8 are both known to be strong mediators of monocyte and macrophage chemotaxis/recruitment, firm-adhesion and infiltration to the inflammation site [12,54]. The induction of these chemokines further highlights the potential role of IL-32 in the pathogenesis of atherosclerosis given the high expression of this cytokine in the atherosclerotic lesions [19]. Indeed, under the *in vitro* conditions that we employed in the current study, the IL-32-mediated expression of both CCL-2 and CXCL-8 by the coronary artery endothelial cells was sufficient to induce monocytes' recruitment in a specific manner demonstrated by the CCR2 and CXCR2 antagonists (ligands of CCL-2 and CXCL-8, respectively). Monocytes play a crucial role in atherosclerosis by infiltrating the atherosclerotic lesions, differentiating into macrophages, and forming inflammatory foam cells [55–57]. Given these effects, we suggest an inflammatory role for IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  on endothelial cells leading to their dysfunction and release of both inflammatory cytokines and chemokines, which might promote arterial inflammation and monocyte recruitment to the atherosclerotic sites. The deleterious effects of chronic upregulation of IL-32 and IL32-mediated chemokine expression may also expand beyond atherosclerosis. For instance, CCL-2 was recently shown to mediate early seeding of the HIV reservoir by recruiting a unique subset of CCR2/5+ CD4+ T-cells which become infected and form a significant reservoir for latent infection [58]. Similar studies were also reported on CXCL-1 (an IL32 induced chemokine) on the enhancement of HIV replication [59]. Moreover, CXCL-8, another IL-32-induced chemokine, was shown to be upregulated in the plasma, serum and brain of PLWH presenting neurocognitive impairment [60].

While the current study as well as studies by other groups highlighted the role of IL-32 isoforms  $\beta$  and  $\gamma$  as proinflammatory [61], the role of IL-32 $\alpha$  is not clearly established in the literature. In previous studies, the anti-atherosclerotic potential of IL-32 $\alpha$  was demonstrated as it inhibits endothelial inflammation and vascular smooth muscle cell activation [62]. In line with these observations, our earlier studies suggested an anti-inflammatory role of IL-32 $\alpha$  as it induces IL-10 expression in activated T-cells [22,24]. In the current study we further observed a tendency for IL-32 $\alpha$  to decrease the production/secretion of ICAM-I and CXCL-8 compared to the other IL-32 isoforms. However, this effect did not reach statistical significance under the current experimental conditions. While our study was focused on the effect of exogenous IL-32 that mimics the circulating IL-32 proteins, it was also shown that intracellular IL-32 could induce the production of ICAM-I, IL-6 and CXCL-8 in HUVEC endothelial cells in response to IL-1 $\beta$  [63]. However, in the current study, IL-32 mediated these effects without the need for IL-1 $\beta$ , which suggests the independent role of IL-32 on endothelial inflammation and dysfunction.

The arterial endothelium plays a critical role in maintaining a healthy vascular tone [64]. Changes in the endothelium functions may lead to arterial stiffness [65,66] and contribute to CVD and heart failure (HF) [67]. On the other hand, IL-32 was recently reported to be upregulated in HF, with higher levels of IL-32 upon initial myocardial infarction predicting lower probability of HF-free status for a period of 2 years [68]. This aligns with our own observations on the negative association between the expression of IL-32 isoforms in blood from either PLWH or controls and the common carotid artery health marker cumulated lateral translation. Of note, we have recently shown that PLWH, when compared with controls, have lower lateral translation of common and internal carotid artery walls, measured with ultrasound elastography, which indicates increased vessel wall stiffness [32]. This was further accompanied with increased prevalence of carotid artery atherosclerotic plaques [32]. The negative associations between IL-32 isoforms and the arterial lateral translation further support the deleterious role of this inflammatory cytokine on the cardiovascular system. Meanwhile, this association was only observed in the relatively younger individuals of PLWH compared to the older population, which suggests that other inflammatory mediators may also play similar roles during the aging process. For instance, earlier studies demonstrated that inflammatory factors such as IL-6, hsCRP and D-dimers tend to remain higher in PLWH, even after HIV-RNA is suppressed by therapy [69] and that cytokines such as IL-6 are increased with aging [70]. Under this complex inflammatory condition, which characterizes the

aging process of PLWH compared to the general population [71], it might be difficult to observe clear associations with and discern the disease progression to one single inflammatory mediator such as IL-32.

One limitation for the current study was the failure to integrate sex and gender into our analysis of association between IL-32 expression and arterial stiffness. However, this was not possible as the carotid artery stiffness measures were carried out on participants from the Canadian HIV and Aging Cohort Study (CHACS), which is mainly a cohort of men with a very limited number of women participants [27]. Of note are our recent studies on two independent cohorts, the CHACS and the Women Interagency HIV Study (WIHS Cohort), which demonstrated that CVD-associated IL-32 isoforms are differentially expressed in men versus women living with HIV [25,26]. Therefore, future studies are warranted to explore these differences in larger cohorts integrating both men and women.

Another limitation of the current study is that we only tested three IL-32 isoforms at the functional level (IL-32 $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) out of the 10 known IL-32 isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , D,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ , and small/sm) [21,22], as these were the only commercially available isoforms. It thus remains unclear whether the rest of the IL-32 isoforms may complement, counteract, or simply play a redundant role on endothelial functions and carotid artery stiffening. Of note, our recent studies demonstrated that both IL-32 $\alpha$  and  $\beta$  are upregulated in peripheral blood mononuclear cells in women living with HIV and are associated with carotid artery subclinical atherosclerosis [25]. While IL-32 $\alpha$  seems to play an anti-inflammatory function by inducing IL-10 expression, IL-32 $\beta$  is highly inflammatory and induces multiple proinflammatory cytokines such as IL-6, TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$ , and IL-18 in T-cells and monocytes [21,26]. However, IL-32 $\beta$  represented the dominantly expressed isoform in individuals with subclinical atherosclerosis, which suggests that IL-32 $\beta$ -associated functions are the prevalent ones, at least in blood [25,26]. In line with our data, earlier studies also demonstrated that IL-32 is upregulated in the coronary artery endothelium from individuals with coronary artery disease, and that both IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  are the dominantly expressed isoforms in the atherosclerotic arterial vessel wall [19,72]. Therefore, we believe that the functional data on IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  presented in the current study are of clinical relevance and suggests a model in which persistent upregulation of IL-32 isoforms in PLWH is directly linked with vascular endothelial dysfunction and continuous recruitment of monocytes and other



leukocytes, likely through IL-6-mediated mechanisms. Therefore, IL-32 may represent a potential therapeutic target to limit CVD in PLWH.

### **Supplementary Materials**

The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15030700/s1>, Figure S1: Impact of Polymyxin B on CAEC. CXCL-1 expression by CAEC following stimulation with IL-32 isoforms (500 ng/mL) or LPS (500 ng/mL) in the presence or absence of Polymyxin B. Left panel: CXCL-1 levels in pg/mL. Right panel: Percentage of change (increase or decrease) in CXCL-1 expression for each condition (Non-stimulated NS, IL-32 $\alpha$ -, IL-32 $\beta$ -, IL-32 $\gamma$ - and LPS-stimulated cells) from the left panel generated by the ratio between Polymyxin B treated to untreated condition. NS: non stimulated. Figure S2: (A) Association between IL-32 expression and carotid artery wall stiffness in the total PLWH population. (B) Age comparison within the lower (Q1) and upper (Q3) quartiles of CLT-CCA of PLWH (n = 30 per quartile) and controls (n = 27 for Q1 and n = 26 for Q3), Left panels. Right panel: correlations between total IL-32RNA from PLWH (n = 60, left panel) and controls (n = 53, right panel) and age. Q1: First quartile, Q3: Third quartile. CLT: Cumulated lateral translation in common carotid artery.

### **Author Contributions**

R.B. planned and performed the experiments and wrote the manuscript. M.-H.R.-C. planned and performed the ultrasound measures and helped with the data interpretation, H.R. and A.C.-B. helped with the in vitro assays and cell imaging, M.D., C.C.-L. and G.C. provided samples and carotid artery imaging data from the research participants, discussed the data and helped with the interpretation and manuscript revisions, J.-P.R., R.T., B.T., A.L.L. and P.A. provided biosamples and contributed to critical revision of the manuscript, D.B.H. helped with the data analysis and linear regression, C.L.T. and M.E.-F. planned the study, supervised the experiments and data interpretation and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### **Funding**

This work was supported by funds from the National Institutes of Health, NIH [grant number R01AG054324], the Canadian Institutes of Health Research, CIHR grant numbers PJT-364423, TCO-125276, PJT 148482, HAL 398643, and project grant no. 399544. Institutional Review Board Statement: The studies involving human participants were conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Ethical approval # CE.11.063.

### **Informed Consent Statement**

Written informed consent was obtained from all study participants.

### **Data Availability Statement**

All reported data are included in the manuscript.

### **Acknowledgments**

We would like to thank the following CRCHUM platforms for their help with this study: the NC3 lab (Olfa Debbache) and the Flow cytometry platform (Gael Dulude and Philippe St-Onge). We would also like to thank Annie Chamberland, Mohamed Sylla, Marc Messier, Mario Legault and Stéphanie Matte for their help with administrative support and cohort database. J.-P.R. is the holder of the Louis Lowenstein Chair in Hematology and Oncology, McGill University. M.D. holds a clinician-researcher salary award from the Fonds de recherche du Québec-Santé. The Canadian HIV and Aging cohort study is supported by the CIHR HIV Clinical Trial Network (CTN 272). C.T. is the Pfizer/Université de Montréal Chair on HIV translational research.

### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **Disclaimer/Publisher's Note**

The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## References

1. Teeraananchai, S.; Kerr, S.; Amin, J.; Ruxrungtham, K.; Law, M. Life expectancy of HIV-positive people after starting combination antiretroviral therapy: A meta-analysis. *HIV Med.* 2017, 18, 256–266. [CrossRef]
2. Legarth, R.A.; Ahlström, M.G.; Kronborg, G.; Larsen, C.S.; Pedersen, C.; Pedersen, G.; Mohey, R.; Gerstoft, J.; Obel, N. Long-Term Mortality in HIV-Infected Individuals 50 Years or Older: A Nationwide, Population-Based Cohort Study. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2016, 71, 213–218. [CrossRef]
3. Wing, E.J. HIV and aging. *Int. J. Infect. Dis.* 2016, 53, 61–68. [CrossRef]
4. Silverberg, M.J.; Chao, C.; Leyden, W.A.; Xu, L.; Tang, B.; Horberg, M.A.; Klein, D.; Quesenberry, C.P.; Towner, W.J.; Abrams, D.I. HIV infection and the risk of cancers with and without a known infectious cause. *AIDS* 2009, 23, 2337–2345. [CrossRef]
5. Edén, A.; Marcotte, T.D.; Heaton, R.K.; Nilsson, S.; Zetterberg, H.; Fuchs, D.; Franklin, D.; Price, R.W.; Grant, I.; Letendre, S.L.; et al. Increased Intrathecal Immune Activation in Virally Suppressed HIV-1 Infected Patients with Neurocognitive Impairment. *PLoS ONE* 2016, 11, e0157160. [CrossRef] [PubMed]
6. Islam, F.M.; Wu, J.; Jansson, J.; Wilson, D.P. Relative risk of cardiovascular disease among people living with HIV: A systematic review and meta-analysis. *HIV Med.* 2012, 13, 453–468. [CrossRef] [PubMed]
7. Widlansky, M.E.; Gokce, N.; Keaney, J.F., Jr.; Vita, J.A. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003, 42, 1149–1160. [CrossRef]
8. Lakatta, E.G.; Levy, D. Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: Aging arteries: A "set up" for vascular disease. *Circulation* 2003, 107, 139–146. [CrossRef] [PubMed]
9. Vaitkevicius, P.V.; Fleg, J.L.; Engel, J.H.; O'Connor, F.C.; Wright, J.G.; E Lakatta, L.; Yin, F.C.; Lakatta, E.G. Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults. *Circulation* 1993, 88 4 Pt 1, 1456–1462. [CrossRef]

10. Libby, P.; Ridker, P.M.; Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002, 105, 1135–1143. [CrossRef]
11. Grover-Páez, F.; Zavalza-Gómez, A.B. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2009, 84, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
12. Gerszten, R.E.; Garcia-Zepeda, E.A.; Lim, Y.-C.; Yoshida, M.; Ding, H.A.; Gimbrone, M.A., Jr.; Luster, A.D.; Luscinskas, F.W.; Rosenzweig, A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999, 398, 718–723. [CrossRef]
13. Meerschaert, J.; Furie, M.B. The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. *J. Immunol.* 1995, 154, 4099–4112. [CrossRef]
14. Woollard, K.J.; Geissmann, F. Monocytes in atherosclerosis: Subsets and functions. *Nat. Rev. Cardiol.* 2010, 7, 77–86. [CrossRef] [PubMed]
15. Carman, C.V. Teasing out monocyte trafficking mechanisms. *Blood* 2008, 112, 929–930. [CrossRef] [PubMed]
16. Mehta, J.L.; Saldeen, T.G.; Rand, K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998, 31, 1217–1225. [CrossRef] [PubMed]
17. Hansson, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352, 1685–1695. [CrossRef]
18. Mohammad-Rezaei, M.; Ahmadi, R.; Rafiei, A.; Khaledifar, A.; Fattahi, S.; Samiei-Sefat, A.; Emami, S.; Bagheri, N. Serum levels of IL-32 in patients with coronary artery disease and its relationship with the serum levels of IL-6 and TNF-alpha. *Mol. Biol. Rep.* 2021, 48, 4263–4271. [CrossRef]
19. Yang, Z.; Shi, L.; Xue, Y.; Zeng, T.; Shi, Y.; Lin, Y.; Liu, L. Interleukin-32 increases in coronary arteries and plasma from patients with coronary artery disease. *Clin. Chim. Acta* 2019, 497, 104–109. [CrossRef]

20. Dinarello, C.A.; Kim, S.H. IL-32, a novel cytokine with a possible role in disease. *Ann. Rheum. Dis.* 2006, 65 (Suppl. 3), iii61–iii64. [CrossRef]
21. Hong, J.T.; Son, D.J.; Lee, C.K.; Yoon, D.Y.; Lee, D.H.; Park, M.H. Interleukin 32, inflammation and cancer. *Pharmacol. Ther.* 2017, 174, 127–137. [CrossRef]
22. Zaidan, S.M.; Leyre, L.; Bunet, R.; Larouche-Anctil, E.; Turcotte, I.; Sylla, M.; Chamberland, A.; Chartrand-Lefebvre, C.; Ancuta, P.; Routy, J.-P.; et al. Upregulation of IL-32 Isoforms in Virologically Suppressed HIV-Infected Individuals: Potential Role in Persistent Inflammation and Transcription From Stable HIV-1 Reservoirs. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2019, 82, 503–513. [CrossRef]
23. Rasool, S.T.; Tang, H.; Wu, J.; Li, W.; Mukhtar, M.M.; Zhang, J.; Mu, Y.; Xing, H.X.; Wu, J.; Zhu, Y. Increased level of IL-32 during human immunodeficiency virus infection suppresses HIV replication. *Immunol. Lett.* 2008, 117, 161–167. [CrossRef]
24. El-Far, M.; Investigators of the Canadian HIV+ Slow Progressor Cohort; Kouassi, P.; Sylla, M.; Zhang, Y.; Fouda, A.; Fabre, T.; Goulet, J.-P.; van Grevenynghe, J.; Lee, T.; et al. Proinflammatory isoforms of IL-32 as novel and robust biomarkers for control failure in HIV-infected slow progressors. *Sci. Rep.* 2016, 6, 22902. [CrossRef] [PubMed]
25. El-Far, M.; Hanna, D.B.; Durand, M.; Larouche-Anctil, E.; Sylla, M.; Chartrand-Lefebvre, C.; Cloutier, G.; Goulet, J.P.; Kassaye, S.; Karim, R.; et al. Brief Report: Subclinical Carotid Artery Atherosclerosis Is Associated With Increased Expression of Peripheral Blood IL-32 Isoforms Among Women Living With HIV. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2021, 88, 186–191. [CrossRef] [PubMed]
26. El-Far, M.; Durand, M.; Turcotte, I.; Larouche-Anctil, E.; Sylla, M.; Zaidan, S.; Chartrand-Lefebvre, C.; Bunet, R.; Ramani, H.; Sadouni, M.; et al. Upregulated IL-32 Expression And Reduced Gut Short Chain Fatty Acid Caproic Acid in People Living With HIV With Subclinical Atherosclerosis. *Front. Immunol.* 2021, 12, 664371. [CrossRef] [PubMed]

27. Durand, M.; For the investigators of the Canadian HIV and Aging Cohort Study; Chartrand-Lefebvre, C.; Baril, J.-G.; Trottier, S.; Trottier, B.; Harris, M.; Walmsley, S.; Conway, B.; Wong, A.; et al. The Canadian HIV and aging cohort study—Determinants of increased risk of cardio-vascular diseases in HIV-infected individuals: Rationale and study protocol. *BMC Infect. Dis.* 2017, 17, 611. [CrossRef] [PubMed]
28. Lo, H.-M.; Shieh, J.-M.; Chen, C.-L.; Tsou, C.-J.; Wu, W.-B. Vascular endothelial growth factor induces CXCL1 chemokine release via JNK and PI-3K-dependent pathways in human lung carcinoma epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 10090–10106. [CrossRef]
29. Filewod, N.C.; Pistolic, J.; Hancock, R.E. Low concentrations of LL-37 alter IL-8 production by keratinocytes and bronchial epithelial cells in response to proinflammatory stimuli. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* 2009, 56, 233–240. [CrossRef]
30. Li, X.; Wang, S.; Zhu, R.; Li, H.; Han, Q.; Zhao, R.C. Lung tumor exosomes induce a pro-inflammatory phenotype in mesenchymal stem cells via NFkappaB-TLR signaling pathway. *J. Hematol. Oncol.* 2016, 9, 42. [CrossRef]
31. Jang, H.; Kwak, S.-Y.; Park, S.; Kim, K.; Kim, Y.-H.; Na, J.; Kim, H.; Jang, W.-S.; Lee, S.-J.; Kim, M.J.; et al. Pravastatin Alleviates Radiation Proctitis by Regulating Thrombomodulin in Irradiated Endothelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1897. [CrossRef] [PubMed]
32. Cardinal, M.-H.R.; Durand, M.; Chartrand-Lefebvre, C.; Fortin, C.; Baril, J.-G.; Trottier, B.; Routy, J.-P.; Soulez, G.; Tremblay, C.; Cloutier, G. Increased carotid artery wall stiffness and plaque prevalence in HIV infected patients measured with ultrasound elastography. *Eur. Radiol.* 2020, 30, 3178–3187. [CrossRef]
33. Zegeye, M.M.; Lindkvist, M.; Fälker, K.; Kumawat, A.K.; Paramel, G.; Grenegård, M.; Sirsjö, A.; Ljungberg, L.U. Activation of the JAK/STAT3 and PI3K/AKT pathways are crucial for IL-6 trans-signaling-mediated pro-inflammatory response in human vascular endothelial cells. *Cell Commun. Signal.* 2018, 16, 55. [CrossRef] [PubMed]
34. Constans, J.; Conri, C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta* 2006, 368, 33–47.

35. Appay, V.; Rowland-Jones, S.L. RANTES: A versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 2001, 22, 83–87. [CrossRef]
36. Lin, C.I.; Chen, C.-N.; Chen, J.H.; Lee, H. Lysophospholipids increase IL-8 and MCP-1 expressions in human umbilical cord vein endothelial cells through an IL-1-dependent mechanism. *J. Cell. Biochem.* 2006, 99, 1216–1232. [CrossRef]
37. Fox, S.E.; Lu, W.; Maheshwari, A.; Christensen, R.D.; Calhoun, D.A. The effects and comparative differences of neutrophil specific chemokines on neutrophil chemotaxis of the neonate. *Cytokine* 2005, 29, 135–140. [CrossRef]
38. Borne, P.V.D.; Quax, P.H.A.; Hoefler, I.E.; Pasterkamp, G. The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease. *Biomed. Res. Int.* 2014, 2014, 893106.
39. Gouwy, M.; Struyf, S.; Noppen, S.; Schutyser, E.; Springael, J.-Y.; Parmentier, M.; Proost, P.; Van Damme, J. Synergy between coproduced CC and CXC chemokines in monocyte chemotaxis through receptor-mediated events. *Mol. Pharmacol.* 2008, 74, 485–495. [CrossRef]
40. Damen, M.S.; Popa, C.D.; Netea, M.G.; Dinarello, C.A.; Joosten, L.A. Interleukin-32 in chronic inflammatory conditions is associated with a higher risk of cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* 2017, 264, 83–91. [CrossRef]
41. Moschen, A.R.; Fritz, T.; Clouston, A.D.; Rebhan, I.; Bauhofer, O.; Barrie, H.D.; Powell, E.E.; Kim, S.; Dinarello, C.A.; Bartenschlager, R.; et al. Interleukin-32: A new proinflammatory cytokine involved in hepatitis C virus-related liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 2011, 53, 1819–1829. [CrossRef] [PubMed]
42. Fantini, M.C.; Monteleone, G.; MacDonald, T.T. New players in the cytokine orchestra of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2007, 13, 1419–1423. [CrossRef] [PubMed]
43. Calabrese, F.; Baraldo, S.; Bazzan, E.; Lunardi, F.; Rea, F.; Maestrelli, P.; Turato, G.; Lokar-Oliani, K.; Papi, A.; Zuin, R.; et al. IL-32, a novel proinflammatory cytokine in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008, 178, 894–901. [CrossRef] [PubMed]
44. Santinelli, L.; Statzu, M.; Pierangeli, A.; Frasca, F.; Bressan, A.; Pinacchio, C.; Nonne, C.; Turriziani, O.; Antonelli, G.;

D’Ettorre, G.; et al. Increased expression of IL-32 correlates with IFN-gamma, Th1 and Tc1 in virologically suppressed HIV-1-infected patients. *Cytokine* 2019, 120, 273–281. [CrossRef] [PubMed]

45. Sitia, S.; Tomasoni, L.; Atzeni, F.; Ambrosio, G.; Cordiano, C.; Catapano, A.; Tramontana, S.; Perticone, F.; Naccarato, P.; Camici, P.; et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun. Rev.* 2010, 9, 830–834. [CrossRef] [PubMed]

46. Glass, C.K.; Witztum, J.L. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 2001, 104, 503–516. [CrossRef]

47. Yudkin, J.S.; Stehouwer, C.D.; Emeis, J.J.; Coppack, S.W. C-reactive protein in healthy subjects: Associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: A potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999, 19, 972–978. [CrossRef]

48. Fearon, W.F.; Fearon, D.T. Fearon, Inflammation and cardiovascular disease: Role of the interleukin-1 receptor antagonist. *Circulation* 2008, 117, 2577–2579. [CrossRef]

49. Xiao, H.; Li, H.; Wang, J.J.; Zhang, J.S.; Shen, J.; An, X.B.; Zhang, C.C.; Wu, J.M.; Song, Y.; Wang, X.Y. IL-18 cleavage triggers cardiac inflammation and fibrosis upon beta-adrenergic insult. *Eur. Heart J.* 2018, 39, 60–69. [CrossRef]

50. Ridker, P.M. From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream To Identify Novel Targets for Atheroprotection. *Circ. Res.* 2016, 118, 145–156. [CrossRef]

51. Leeuwenberg, J.F.; Smeets, E.F.; Neefjes, J.J.; A Shaffer, M.; Cinek, T.; Jeunhomme, T.M.; Ahern, T.J.; A Buurman, W. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology* 1992, 77, 543–549. [PubMed]

52. Blankenberg, S.; Barbaux, S.; Tiret, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003, 170, 191–203. [CrossRef] [PubMed]

53. Dansky, H.M.; Barlow, C.B.; Lominska, C.; Sikes, J.L.; Kao, C.; Weinsaft, J.; Cybulsky, M.I.; Smith, J.D. Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis



are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21, 1662–1667. [CrossRef] [PubMed]

54. Deshmane, S.L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B.E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *J. Interferon Cytokine Res.* 2009, 29, 313–326. [CrossRef]

55. Mestas, J.; Ley, K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 2008, 18, 228–232. [CrossRef] [PubMed]

56. Johnson, J.; Newby, A.C. Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Curr. Opin. Lipidol.* 2009, 20, 370–378. [CrossRef]

57. Kunjathoor, V.V.; Febbraio, M.; Podrez, E.A.; Moore, K.J.; Andersson, L.; Koehn, S.; Rhee, J.S.; Silverstein, R.; Hoff, H.F.; Freeman, M.W. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 49982–49988. [CrossRef]

58. Packard, T.A.; Schwarzer, R.; Herzig, E.; Rao, D.; Luo, X.; Egedal, J.H.; Hsiao, F.; Widera, M.; Hultquist, J.F.; Grimmatt, Z.W.; et al. CCL2: A Chemokine Potentially Promoting Early Seeding of the Latent HIV Reservoir. *mBio* 2022, 13, e0189122. [CrossRef]

59. Lane, B.R.; Strieter, R.M.; Coffey, M.J.; Markovitz, D.M. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-induced GRO- $\alpha$  production stimulates HIV-1 replication in macrophages and T lymphocytes. *J. Virol.* 2001, 75, 5812–5822. [CrossRef]

60. Haarmann, A.; Schuhmann, M.K.; Silwedel, C.; Monoranu, C.-M.; Stoll, G.; Buttmann, M. Human Brain Endothelial CXCR2 is Inflammation-Inducible and Mediates CXCL5- and CXCL8-Triggered Paraendothelial Barrier Breakdown. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 602. [CrossRef]

61. Choi, J.-D.; Bae, S.-Y.; Hong, J.-W.; Azam, T.; Dinarello, C.A.; Her, E.; Choi, W.-S.; Kim, B.-K.; Lee, C.-K.; Yoon, D.-Y.; et al. Identification of the most active interleukin-32 isoform. *Immunology* 2009, 126, 535–542. [CrossRef]

62. Son, D.J.; Jung, Y.Y.; Seo, Y.S.; Park, H.; Lee, D.H.; Kim, S.; Roh, Y.-S.; Han, S.B.; Yoon, D.Y.; Hong, J.T. Interleukin-32 $\alpha$  Inhibits Endothelial Inflammation, Vascular Smooth

Muscle Cell Activation, and Atherosclerosis by Upregulating Timp3 and Reck through suppressing microRNA-205 Biogenesis. *Theranostics* 2017, 7, 2186–2203. [CrossRef] [PubMed]

63. Nold-Petry, C.A.; Nold, M.F.; Zepp, J.A.; Kim, S.H.; Voelkel, N.F.; Dinarello, C.A. IL-32-dependent effects of IL-1beta on endothelial cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 3883–3888. [CrossRef]

64. Furchgott, R.F.; Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980, 288, 373–376. [CrossRef]

65. Laurent, S.; Boutouyrie, P.; Lacolley, P. Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension* 2005, 45, 1050–1055. [CrossRef]

66. Giraldo-Gruoso, M.; Echeverri, D. From Endothelial Dysfunction to Arterial Stiffness in Diabetes Mellitus. *Curr. Diabetes. Rev.* 2020, 16, 230–237. [CrossRef] [PubMed]

67. Duprez, D.A. Arterial stiffness/elasticity in the contribution to progression of heart failure. *Heart Fail. Clin.* 2012, 8, 135–141. [CrossRef] [PubMed]

68. Xuan, W.; Huang, W.; Wang, R.; Chen, C.; Chen, Y.; Wang, Y.; Tan, X. Elevated circulating IL-32 presents a poor prognostic outcome in patients with heart failure after myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 2017, 243, 367–373. [CrossRef]

69. Neuhaus, J.; Jacobs, D.R., Jr.; Baker, J.V.; Calmy, A.; Duprez, D.; La Rosa, A.; Kuller, L.H.; Pett, S.L.; Ristola, M.; Ross, M.J.; et al. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J. Infect. Dis.* 2010, 201, 1788–1795. [CrossRef]

70. Borges, H.; O'Connor, J.L.; Phillips, A.N.; Rönsholt, F.F.; Pett, S.; Vjecha, M.J.; French, M.; Lundgren, J. Factors Associated with Plasma IL-6 Levels During HIV Infection. *J. Infect. Dis.* 2015, 212, 585–595. [CrossRef]

71. Deeks, S.G. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu. Rev. Med.* 2011, 62, 141–155. [CrossRef] [PubMed]

72. Heinhuis, B.; Popa, C.D.; van Tits, B.L.; Kim, S.-H.; Zeeuwen, P.L.; Berg, W.B.V.D.; van der Meer, J.W.; van der Vliet, J.A.; Stalenhoef, A.F.; Dinarello, C.A.; et al. Towards a role of interleukin-32 in atherosclerosis. *Cytokine* 2013, 64, 433–440. [CrossRef] [PubMed]

## Figures

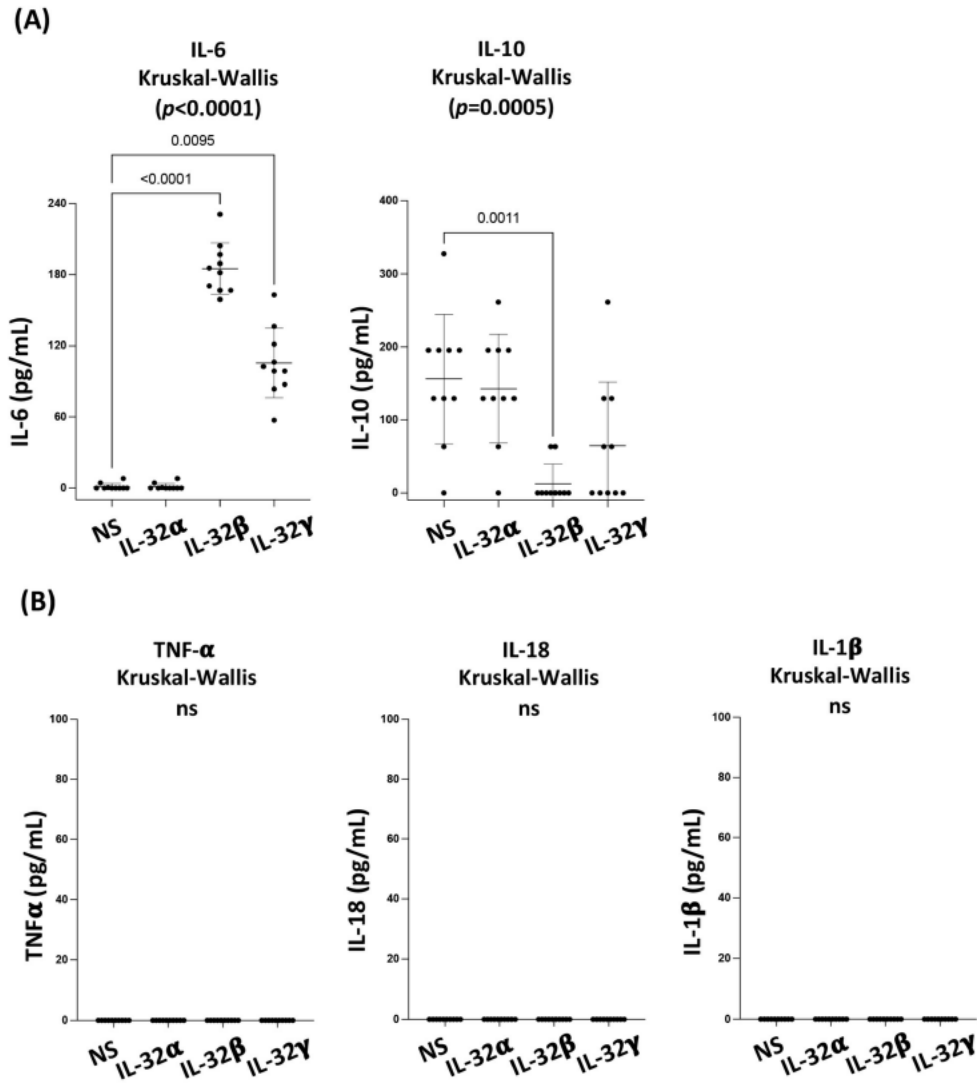


Figure 1: IL-32 isoforms exhibit differential impact on coronary artery endothelial cell's cytokine production. (A) Modulation of IL-6 and IL-10 proteins in supernatants from CAEC following stimulation with IL-32 $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  for 72 h (500 ng/mL, n = 10). (B) TNF- $\alpha$ , IL-18 and IL-1 $\beta$  proteins in supernatants from CAEC following stimulation with IL-32 $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  for 72 h (500 ng/mL, n = 10). Dots on the graphs represent experimental replicates from CAEC. Data analyzed with the nonparametric test Kruskal-Wallis and Dunn's subtest. NS: non-stimulated. ns: non-significant.

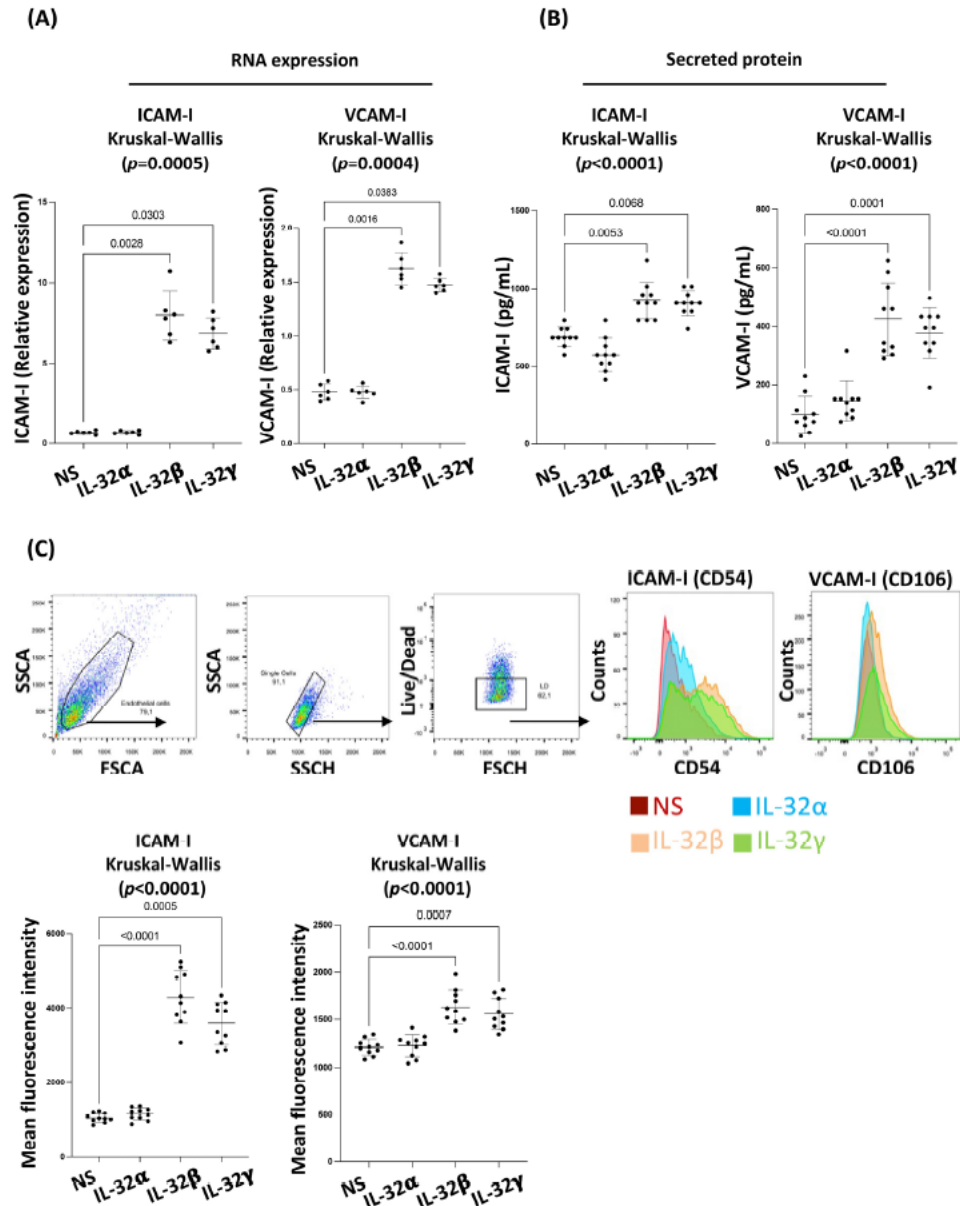


Figure 2: Coronary artery endothelial cell dysfunction markers are upregulated by IL-32 isoforms  $\beta$  and  $\gamma$  but not  $\alpha$ . (A) Analysis of ICAM-I (CD54) and VCAM-I (CD106) RNA expression, normalized to the housekeeping gene  $\beta$ -glucuronidase, in primary CAEC showing their increased relative expression following 12 h stimulation with IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  but not  $\alpha$  (500 ng/mL,  $n = 6$ ). (B) Analysis of ICAM-I and VCAM-I expression in CAEC supernatants following stimulation with IL-32 $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  for 72 h ( $n = 10$ ). (C) Upper panels: Representative Flow cytometry data showing the gating strategy on CAEC live cells and overlapping histograms for ICAM-I and VCAM-I on the cell surface following stimulation with IL-32 $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  for 72 h (500 ng/mL).

Lower panels: Analysis of ICAM-I and VCAM-I surface expression from  $n = 10$  treatments (10 experimental replicates from CAEC). Data analyzed with the nonparametric test Kruskal-Wallis and Dunn's subtest. NS: non-stimulated.

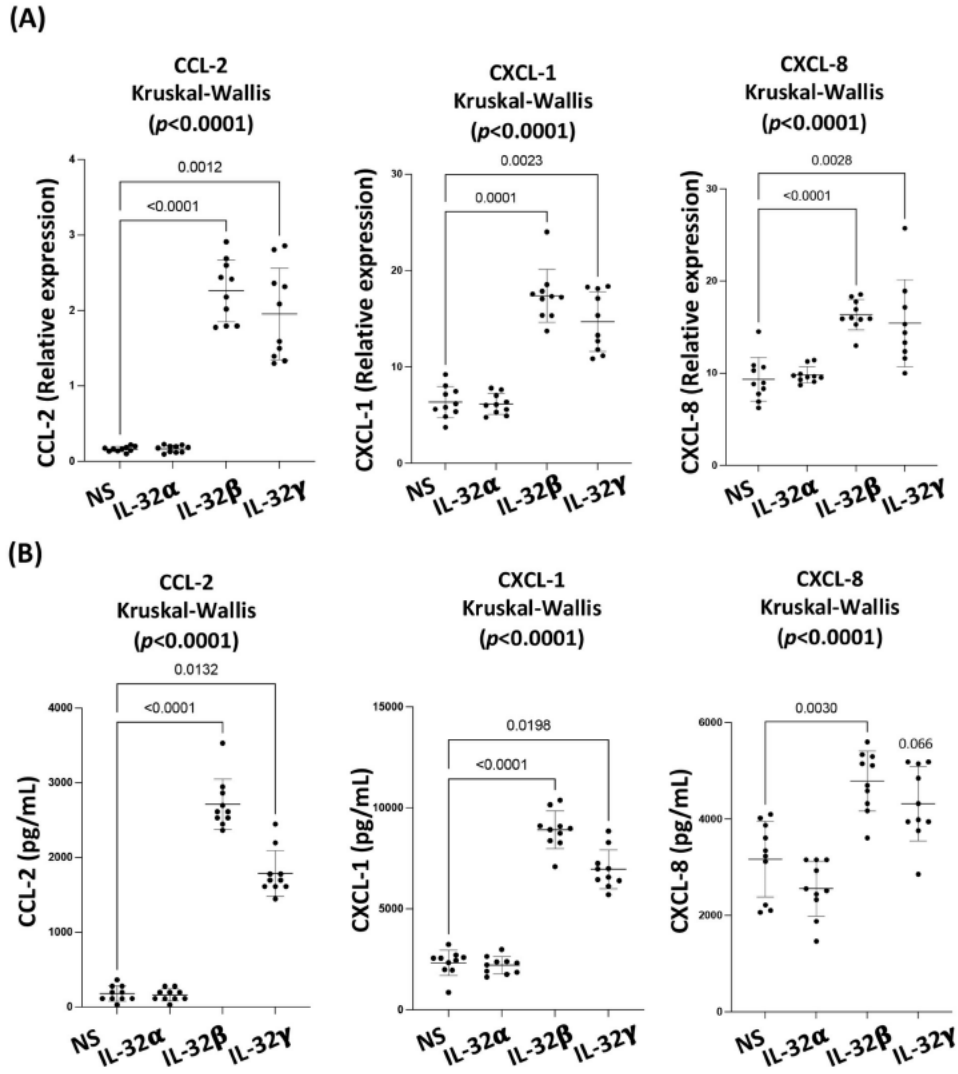


Figure 3: IL-32  $\beta$  and  $\gamma$  increase chemokine production in coronary artery endothelial cells. (A) Analysis of CCL-2, CXCL-1 and CXCL-8 RNA expression, normalized to the housekeeping gene  $\beta$ -glucuronidase, in CAEC following 12 h stimulation with IL-32 $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  (500 ng/mL,  $n = 10$ ). (B) Analysis for the production of CCL-2, CXCL-1 and CXCL-8 proteins in CAEC supernatants following stimulation with IL-32 $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  for 72 h (500 ng/mL,  $n = 10$  experimental replicates from CAEC). Data analyzed with the non-parametric test Kruskal-Wallis and Dunn's subtest. NS: non-stimulated.

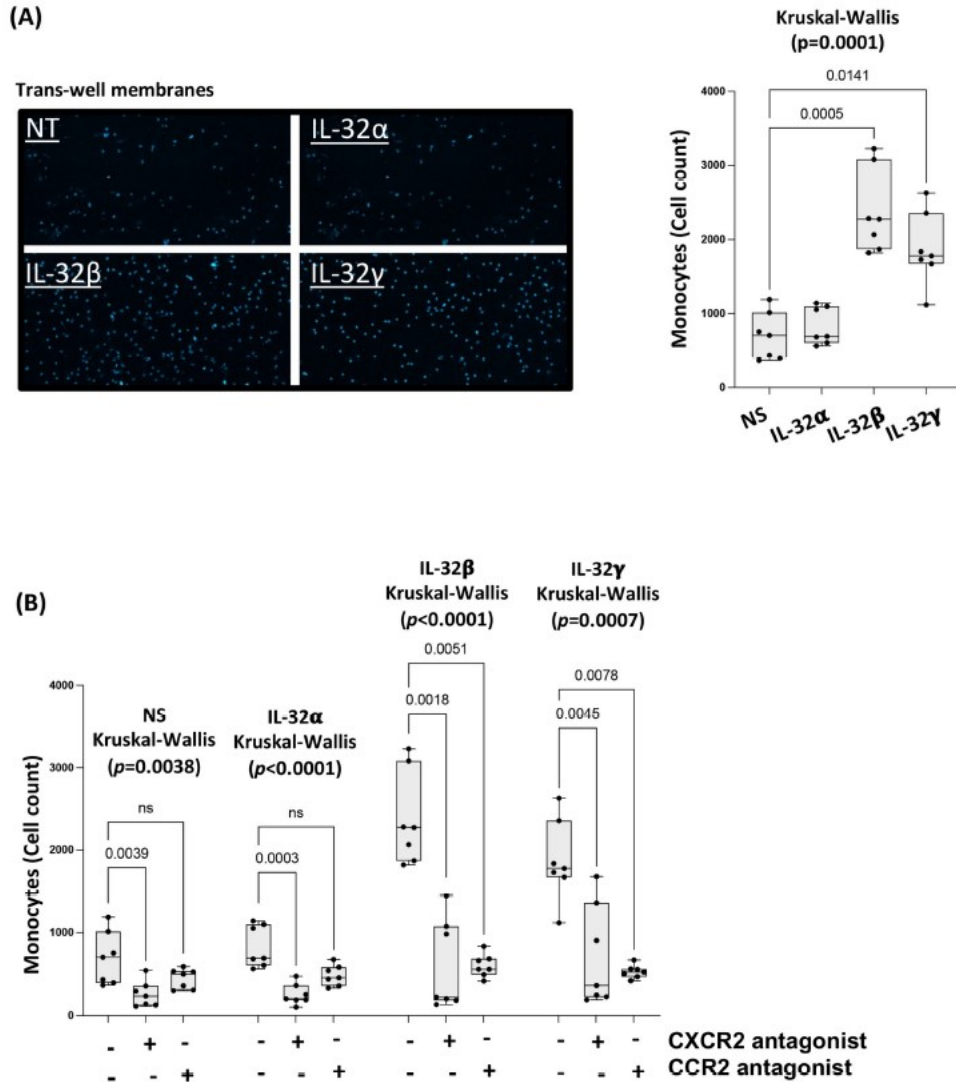


Figure 4: IL-32  $\beta$ - and  $\gamma$ -induced chemokines drive monocyte transmigration toward CAEC supernatants. (A) Left panels: Representative fluorescent microscope images for monocytes attached to the lower side (surface facing the lower chambers) of the transwell membrane. Nuclei stained with DAPI on the transwell membranes. Right panel: Analysis for the numbers of migrated cells towards the CAEC supernatant stimulated with IL-32 $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  ( $n = 7$ ). (B) Analysis for the impact of pre-treating monocytes with the antagonists of either CCR2 or CXCR2 prior to exposure to supernatants from CAEC non-stimulated or stimulated with the IL-32 $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  isoforms ( $n = 7$ ). Dots on the graphs represent experimental replicates from CAEC. NS: non-stimulated. ns: non-significant.



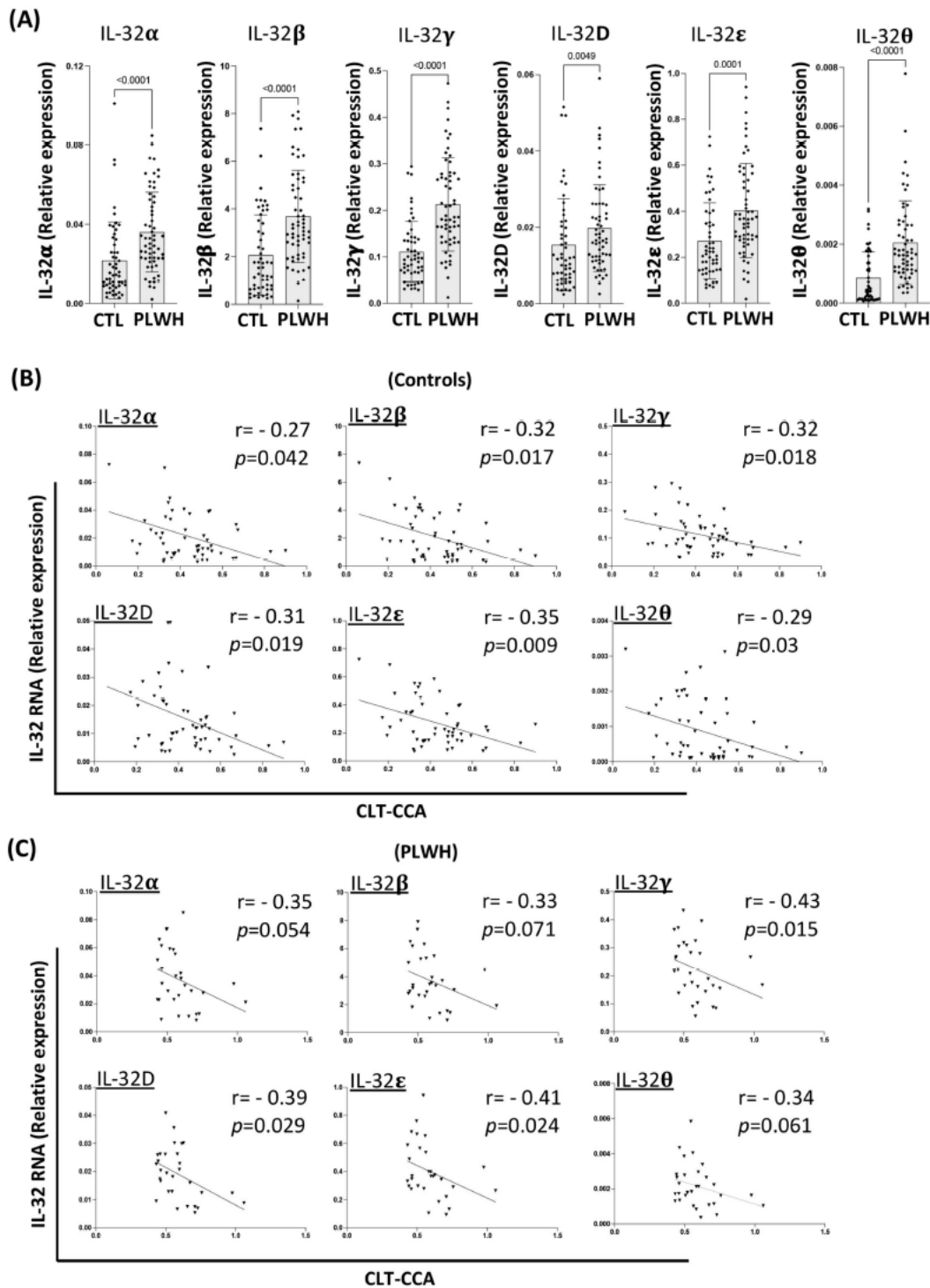
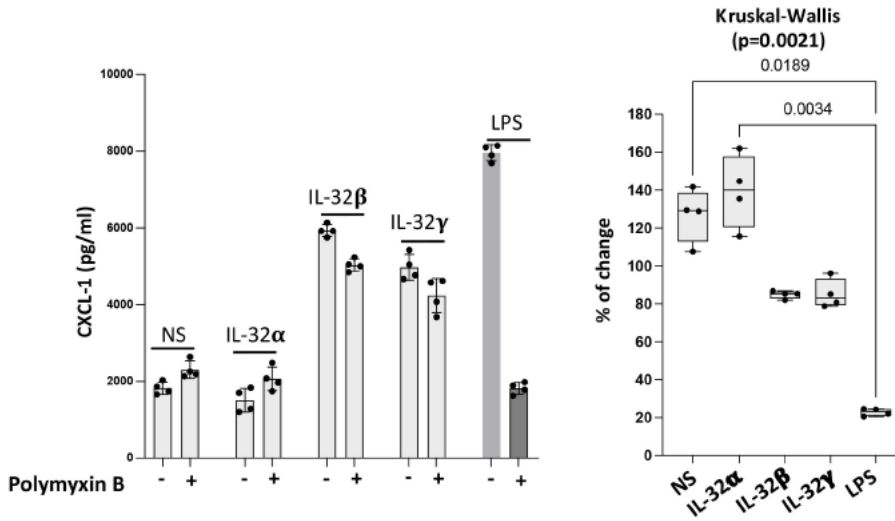


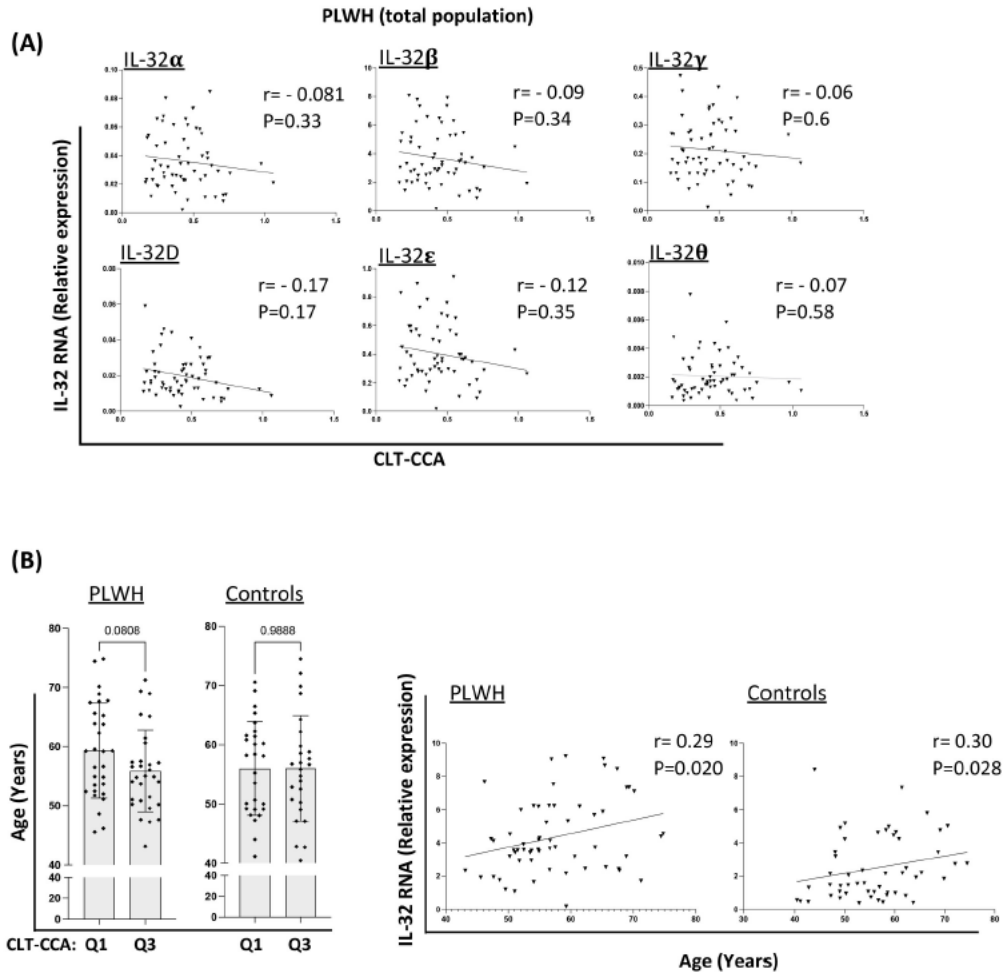
Figure 5: Association between IL-32 expression and carotid artery wall stiffness. (A) Increased expression of IL-32 isoforms in PBMCs from PLWH compared to controls (n = 60 and n = 53, respectively). IL-32 RNA levels were normalized to the housekeeping gene  $\beta$ -glucuronidase. (B) Correlation between IL-32 expression and carotid artery cumulative lateral translation (CLT)

within the common carotid artery (CCA) from controls (n = 53). (C) Same as in B from PLWH participants (shown is association between IL-32 and CLT data from the upper quartiles, n = 30). Dots on the graphs represent data from individual participants in the CHACS cohort. CLT: Cumulated lateral translation in common carotid artery. CTL: Controls.

## Supplementary materials



Supplemental Figure S1: Impact of Polymyxin B on CAEC. CXCL-1 expression by CAEC following stimulation with IL-32 isoforms (500ng/ml) or LPS (500ng/ml) in the presence or absence of Polymyxin B. Left panel: CXCL-1 levels in pg/ml. Right panel: Percentage of change (increase or decrease) in CXCL-1 expression for each condition (Non-stimulated NS, IL-32 $\alpha$ -, IL-32 $\beta$ -, IL-32 $\gamma$ - and LPS-stimulated cells) from the left panel generated by the ratio between Polymyxin B treated to untreated condition. NS: non stimulated.



Supplemental Figure S2: A) Association between IL-32 expression and carotid artery wall stiffness in the total PLWH population. B) Age comparison within the lower (Q1) and upper (Q3) quartiles of CLT-CCA of PLWH ( $n=30$  per quartile) and controls ( $n=27$  for Q1 and  $n=26$  for Q3), Left panels. Right panel: correlations between total IL-32RNA from PLWH ( $n=60$ , left panel) and controls ( $n=53$ , right panel) and age. Q1: First quartile, Q3: Third quartile. CLT: Cumulated lateral translation in common carotid artery.

## Tables

Variable	Controls	PLWH	<i>p</i> Value
Number of participants (Female/ Male)	53 (5/48)	60 (1/59)	
Age (Years)	55.9 ± 8.32	57.6 ± 7.63	NS
Predicted 10 years Framingham Risk score (number of individuals with available data)	11.08 ± 4.63 (50/53)	11.12 ± 6.77 (58/60)	NS
D-dimer (mg/L) (number of individuals with available data)	0.301 ± 0.107 (18/53)	0.292 ± 0.155 (39/60)	NS
Body Mass Index (BMI) (number of individuals with available data)	27.11 ± 4.83 (17/53)	24.98 ± 4.49 (48/60)	0.034
LDL-C (mmol/L) (number of individuals with available data)	3.16 ± 0.77 (51/53)	2.86 ± 1.06 (55/60)	0.017
HDL-C (mmol/L) (number of individuals with available data)	1.38 ± 0.39 (53/53)	1.24 ± 0.33 (58/60)	0.056 (NS)
Duration of infection (Years)	N/A	17.68 ± 7.9	
Duration of ART (Years)	N/A	14.36 ± 6.8	
Viral load (Log <sub>10</sub> copies/ mL)	N/A	1.6 ± 0.01	
Nadir CD4 count (cells/mm <sup>3</sup> )	N/A	215 ± 161	
CD4 count (cells/mm <sup>3</sup> )	NA	595 ± 228	
CD4/CD8 ratio	NA	0.9 ± 0.43	

Table 1: Demographic and clinical parameters of study participants. Numbers are shown in Mean ± SD. N/A: non-applicable. NA: Non-available.

# **Manuscrit #3: Short communication: A potential role for caproic acid in reversing inflammation-mediated endothelial cell dysfunction**

Rémi Bunet<sup>1,2</sup>, Hardik Ramani<sup>1,2</sup>, Mohamed Sylla<sup>2</sup>, Madeleine Durand<sup>1,3</sup>, Mohamed El-Far<sup>2\*</sup> and  
Cécile Tremblay<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, QC, Canada, <sup>2</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada, <sup>3</sup>Département de Médecine, Faculté de Médecine, Université de Montréal, QC, Canada.

**En préparation pour soumission à JAIDS en 2024**

## **Author contribution**

Contribution des auteurs : R.B. a planifié et exécuté les expériences, analysé et interprété les données et écrit le manuscrit. H.R. et M.S. ont aidé pour les essais in vitro d'IL-32 et des acides gras à chaîne courte. M.D a aidé à l'interprétation et révisé le manuscrit. C.L.T et M.E.-F. ont planifié et supervisé les expériences, ont analysé et interprété les données et supervisé l'étude. Tous les auteurs ont contribué à l'article et approuvé la version soumise.

## Abstract

**Introduction:** Persistent immune activation and inflammation in people living with HIV (PLWH) receiving antiretroviral therapy (ART) is associated with multiple comorbidities such as cardiovascular disease (CVD). Counteracting these unhindered immune responses represents an unmet medical need. In this regard, we have recently shown that PLWH with CVD have lower levels of the gut metabolites short-chain fatty acids (SCFAs), particularly the less abundant caproic acid, compared to people without CVD. Given the anti-inflammatory potential of these SCFAs we aimed in this study to test the impact of caproic acid on reversing the impact of inflammatory cytokines on the endothelial cells' dysfunction, a phenotype that we recently showed to be associated with arterial stiffness and CVD in PLWH. **Methods:** Primary coronary artery endothelial cells (CEAC) were stimulated with the CVD-associated cytokine IL-32. CEAC dysfunction was monitored by measuring the expression of the inflammatory cytokine IL-6, the leukocyte attracting chemokine CCL-2 as well as by the expression of the adhesion molecules ICAM-I and V-CAM-1 in the presence or absence of the five SCFAs; acetic, propionic, butyric, valeric and caproic acids. **Results:** Our data show that treatment of IL-32-stimulated CEAC with caproic acid, significantly diminishes the expression of IL-6, CCL-2, ICAM-I and VCAM-I. This effect was not mediated by induced cell toxicity or mortality as monitored by the cell plasma membrane damage and release of the Lactate dehydrogenase LDH enzyme. Impact of the four other short-chain fatty acids on CEAC was either negligible or, in contrast to caproic acid, contributed to cell dysfunction by increasing the expression of IL-6 and CCL-2 such with the treatment of butyric acid. **Conclusions:** Caproic acid seems to be consistent in reversing endothelial cell dysfunction by inhibiting the inflammation-mediated expression of chemokines and adhesion molecules. Further studies are thus warranted to investigate the underlined mechanisms of caproic acid protective potential.

Key words: HIV, IL-32, short chain fatty acids, inflammation, endothelial cells.

## **Introduction :**

Short chains fatty acids (SCFA) are the result of bacteria metabolization of the non-digestible fiber. They have two to six carbon atoms corresponding to short-chain fatty acids acetic (C2), propionic (C3), butyric (C4), valeric (C5) and caproic (C6). Studies in mice showed that SCFA play an important role in reduction of inflammation reduction, enhancing intestinal barrier functions and protecting against cardiovascular diseases [1-4]. However, a vast majority of these studies focus mainly on acetic, propionic, and butyric acids that represent the largest amount of SCFA produced in the gut. In the context of HIV, it was recently shown that PLWH have a decrease in the presence of propionic and isobutyric acids in their serum compared to the general population and this decrease was linked with inflammation, morbidity, and mortality [5]. In line with these reports, we have recently observed that caproic acid, the less abundant SCFA, was further decreased in PLWH with subclinical atherosclerosis compared to counterparts without any sign of atherosclerosis [6]. We also observed a negative correlation between caproic acid, in stool, and the isoforms of the inflammatory cytokine IL-32, a measure that we showed to be associated with subclinical atherosclerosis in men and women living with HIV [6, 7] indicating a potential protective role of the caproic acid against IL-32. This observation warranted a study to test the role of SCFA and IL-32 isoforms on the coronary artery endothelial cells (CAEC), a cell type whose dysfunction plays an important role in the development of cardiovascular diseases.



## **Material and methods**

### **Cells**

Primary Human Coronary Artery Endothelial Cells were obtained from Creative Bioarray (Shirley, NY, USA). Cells were maintained in culture in Human Coronary Artery Endothelial Cell Medium (Creative Bioarray, Shirley, NY, USA) and experiments were conducted between passage 5 to 10.

### **Cell stimulation**

Acetic, propionic, butyric, valeric and caproic acids used were all obtained from Sigma Aldrich (Cat# A6283-100ML, 94425-1ML-F, B103500-100ML, 75054-1ML and 21529-5ML) and used at 1mM for 2 hours before stimulation. CAEC were stimulated with 500 ng/mL of IL-32 isoforms  $\beta$  (Cat # 6769-IL-025) and  $\gamma$  (Cat # 4690-IL-025/CF) at 90% cell confluence. Cells were incubated for 48h at 37 °C with 5%CO<sub>2</sub> as appropriate and as described in the Figure legends. All stimulations were done in the presence of Polymyxin B (inhibitor of the lipopolysaccharide LPS) at 1  $\mu$ g/ml.

### **Cytotoxicity assay**

Cytotoxicity was measured with a lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay kit from Abcam (Cat # ab65393) as per the manufacturer's recommendation on the supernatant of the CAEC treated with SCFA and IL-32 isoforms  $\beta$  and  $\gamma$ .

### **ELISA**

IL-6, CCL-2 and VCAM-I were quantified using commercially available ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA Cat # DY406-05, DY279-05 and DY809-05, respectively) as per the manufacturer's recommendations in CAEC supernatant.

### **Statistical Analysis**

Data were analyzed using GraphPad Prism 8 (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Non-parametric Mann-Whitney analysis was used to compare two groups for the same variable. Differences were considered statistically significant at values of  $p < 0.05$  with two-tailed analysis.

## **Results and discussion**

Short-chain fatty acids (SCFAs) contain between 2-6 carbon (acetic (C2), propionic (C3), butyric (C4), valeric (C5) and caproic (C6) [8]. Among these fatty acids, acetic, propionic and butyric acids are the most studied given their significant abundance (>95%), in human intestinal lumen with molar ratios of 60:20:20 [9-11]. While the major role of these SCFAs is to provide energy for the human cells and tissues other key roles were also described as related to the modulation of metabolic health, modulation of immune responses, gut barrier functions and inflammation [12, 13]. For instance, propionic acid attenuates appetite and food intake, while acetic acid plays a role in fat oxidation and improved glucose homeostasis [14] and together with butyric acid, limits the frequency of autoimmune T cells and improve the  $\beta$ -cell functions, which together protects against cardiovascular disease [15]. Meanwhile, less attention was given for the two other SCFAs, valeric and caproic acids. Interestingly, fecal levels of caproic acid inversely correlate with the inflammatory Crohn's disease activity [16], a condition associated with cardiovascular disease. In line with these reports, our recent data showed that fecal levels of caproic acid were inferior in PLWH with subclinical atherosclerosis [6], an observation which warrant further investigation into the function of this less abundant SCFA.

In this study, we aimed to investigate the functions of caproic acid on coronary artery endothelial cells, particularly on counteracting the impact of the inflammatory cytokine IL-32 on these cells. In this regard, our recent work demonstrated that IL-32 has the potential to induce endothelial cell dysfunction by upregulating the expression of inflammatory cytokines (IL-6), chemokines (CCL-2) as well as the leukocytes adhesion proteins ICAM-I and VCAM-I [17]. We first tested the cellular toxicity of the SCFAs used at a 1mM (a concentration that we previously showed to mediate anti-inflammatory functions of caproic acid on human peripheral blood mononuclear cells [6]). Lactate dehydrogenase LDH enzyme activity was tested in supernatants from SCFAs-treated coronary artery endothelial cells. Of note, LDH is mainly an intracellular protein that is released from dying/dead cells upon damage of the plasma membrane by either toxic compounds,

apoptosis or necrosis [18]. As shown in Figure 1, LDH activity (quantified by spectrophotometer colorimetric measures following 30min incubation of supernatants with the LDH substrate lactate) were not significantly different between SCFAs-treated vs non-treated cells for either acetic, propionic, butyric, valeric or caproic acids. The LDH activity were even slightly lower in the treated cells, likely due to the beneficial effect of SCFAs on cells as these acids represent a source of energy.

We further compared the impact of the five SCFAs on the production of inflammatory cytokines and chemokines in response to the two most active isoforms of IL-32 (IL-32 $\beta$  and IL-32 $\gamma$ ) by measuring the production of IL-6 and CCL-2 in the presence or absence of either of the different SCFAs. Interestingly, treatment of CAEC with caproic acid significantly diminished the IL-6 expression in both IL-32-stimulated and non-stimulated cells and also CCL-2 in IL-32 $\gamma$ -stimulated cells (Figure 2A, left and right panels, respectively). In contrast to caproic acid, propionic, valeric and butyric acid showed differential enhancement for the IL-32-mediated upregulation of IL-6 and CCL-2. While earlier studies showed that butyric acid may upregulate IL-6 from a number of carcinoma cell lines [19], other studies in mouse showed the opposite effect where IL-6 is decreased by butyric acid in type 1 diabetic animals [20]. These observations suggest that certain SCFAs may, depending on the pathological condition and/or the responding cell types, show differential impact on cell activation and secretion of chemokine and cytokines. Indeed, this effect of butyric acid seemed to be selective against specific markers, at least under the tested SCFA concentrations, as we observed that butyric acid significantly inhibits the expression of the adhesion molecule VCAM-I but on the opposite enhances ICAM-I in both IL-32-stimulated and non-stimulated cells (Figure 1B, left and right panels, respectively). Interestingly, reports by other groups showed that butyric acid decreases ICAM-I expression in human oral squamous cell Carcinoma cells but at much higher concentrations (10mM)[21]. In contrast to butyric acid as well as to propionic, acetic and valeric acids, the impact of caproic acid was consistent in diminishing the expression of the adhesion molecules VCAM-I and ICAM-I (Figure 1B, left and right panels, respectively). When upregulated, these adhesion molecules together with IL-6 and CCL-2 represent a dysregulation phenotype of CAEC cells. Therefore, caproic acid shows a significant potential to revert the endothelium dysfunction, which is associated with atherosclerosis in PLWH. However, further studies need to investigate the cellular

receptors by which receptor caproic acid mediates its functions. It would also be important to investigate the expression profiles of these potential receptors in HIV infection in people with atherosclerosis and to finally investigate whether combination of caproic acid with other SCFAs may represent a better complement to ART to decrease chronic inflammation and protect against CVD in PLWH.

### **Acknowledgements**

We would like to thank Stéphanie Matte and Annie Chamberland for their help with administrative duties. M.D is supported by a clinician researcher salary award from the Fonds de recherche en Santé- Québec. CT is the Pfizer/Université de Montréal Chair on HIV translational research.

## References

1. Wang J, Wei Z, Zhang X, Wang Y, Yang Z, Fu Y. Propionate Protects against Lipopolysaccharide-Induced Mastitis in Mice by Restoring Blood-Milk Barrier Disruption and Suppressing Inflammatory Response. *Front Immunol* 2017; 8:1108.
2. Li M, van Esch B, Henricks PAJ, Folkerts G, Garssen J. The Anti-inflammatory Effects of Short Chain Fatty Acids on Lipopolysaccharide- or Tumor Necrosis Factor alpha-Stimulated Endothelial Cells via Activation of GPR41/43 and Inhibition of HDACs. *Front Pharmacol* 2018; 9:533.
3. Chun E, Lavoie S, Fonseca-Pereira D, et al. Metabolite-Sensing Receptor Ffar2 Regulates Colonic Group 3 Innate Lymphoid Cells and Gut Immunity. *Immunity* 2019; 51:871-84 e6.
4. Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 2013; 504:451-5.
5. Sereti I, Verburgh ML, Gifford J, et al. Impaired gut microbiota-mediated short-chain fatty acid production precedes morbidity and mortality in people with HIV. *Cell Rep* 2023; 42:113336.
6. El-Far M, Durand M, Turcotte I, et al. Upregulated IL-32 expression and reduced gut short chain fatty acid caproic acid in people living with HIV with subclinical atherosclerosis. *Frontiers in immunology* 2021; 12:664371.
7. El-Far M, Hanna DB, Durand M, et al. Brief report: subclinical carotid artery atherosclerosis is associated with increased expression of peripheral blood IL-32 isoforms among women living with HIV. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2021; 88:186-91.
8. Ohira H, Tsutsui W, Fujioka Y. Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis? *J Atheroscler Thromb* 2017; 24:660-72.
9. Hijova E, Chmelarova A. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy* 2007; 108:354-8.

10. Binder HJ. Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea. *Annu Rev Physiol* 2010; 72:297-313.
11. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 1987; 28:1221-7.
12. Chambers ES, Preston T, Frost G, Morrison DJ. Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Curr Nutr Rep* 2018; 7:198-206.
13. Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* 2017; 52:1-8.
14. van der Beek CM, Canfora EE, Lenaerts K, et al. Distal, not proximal, colonic acetate infusions promote fat oxidation and improve metabolic markers in overweight/obese men. *Clin Sci (Lond)* 2016; 130:2073-82.
15. Marino E, Richards JL, McLeod KH, et al. Erratum: Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2017; 18:1271.
16. Chambers ES, Viardot A, Psichas A, et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 2015; 64:1744-54.
17. Bunet R, Roy-Cardinal M-H, Ramani H, et al. Differential Impact of IL-32 Isoforms on the Functions of Coronary Artery Endothelial Cells: A Potential Link with Arterial Stiffness and Atherosclerosis. *Viruses* 2023; 15:700.
18. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018; 2018.
19. Wang LS, Chow KC, Wu CW. Expression and up-regulation of interleukin-6 in oesophageal carcinoma cells by n-sodium butyrate. *Br J Cancer* 1999; 80:1617-22.

20. Traisaeng S, Batsukh A, Chuang TH, et al. *Leuconostoc mesenteroides* fermentation produces butyric acid and mediates Ffar2 to regulate blood glucose and insulin in type 1 diabetic mice. *Sci Rep* 2020; 10:7928.

21. Magrin GL, Di Summa F, Strauss FJ, et al. Butyrate Decreases ICAM-1 Expression in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci* 2020; 21.

## Figures

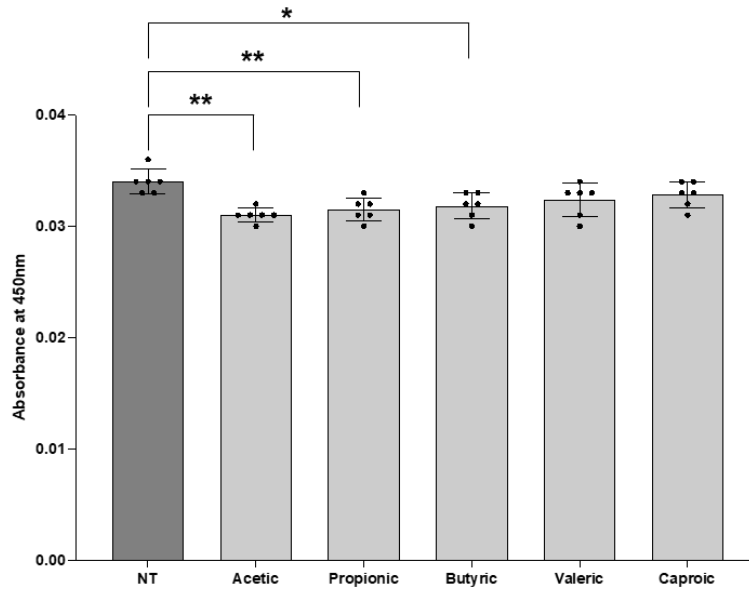


Figure 1: Short chains fatty acids exhibit no toxicity on coronary artery endothelial cells. Quantification of the lactate dehydrogenase activity following treatment with acetic, propionic, butyric, valeric and caproic acids for 48h (1mM). Dots on the graph represent experimental replicates from CAEC (n=6). Data analyzed with the Non-parametric Mann-Whitney analysis. NT: non-treated.



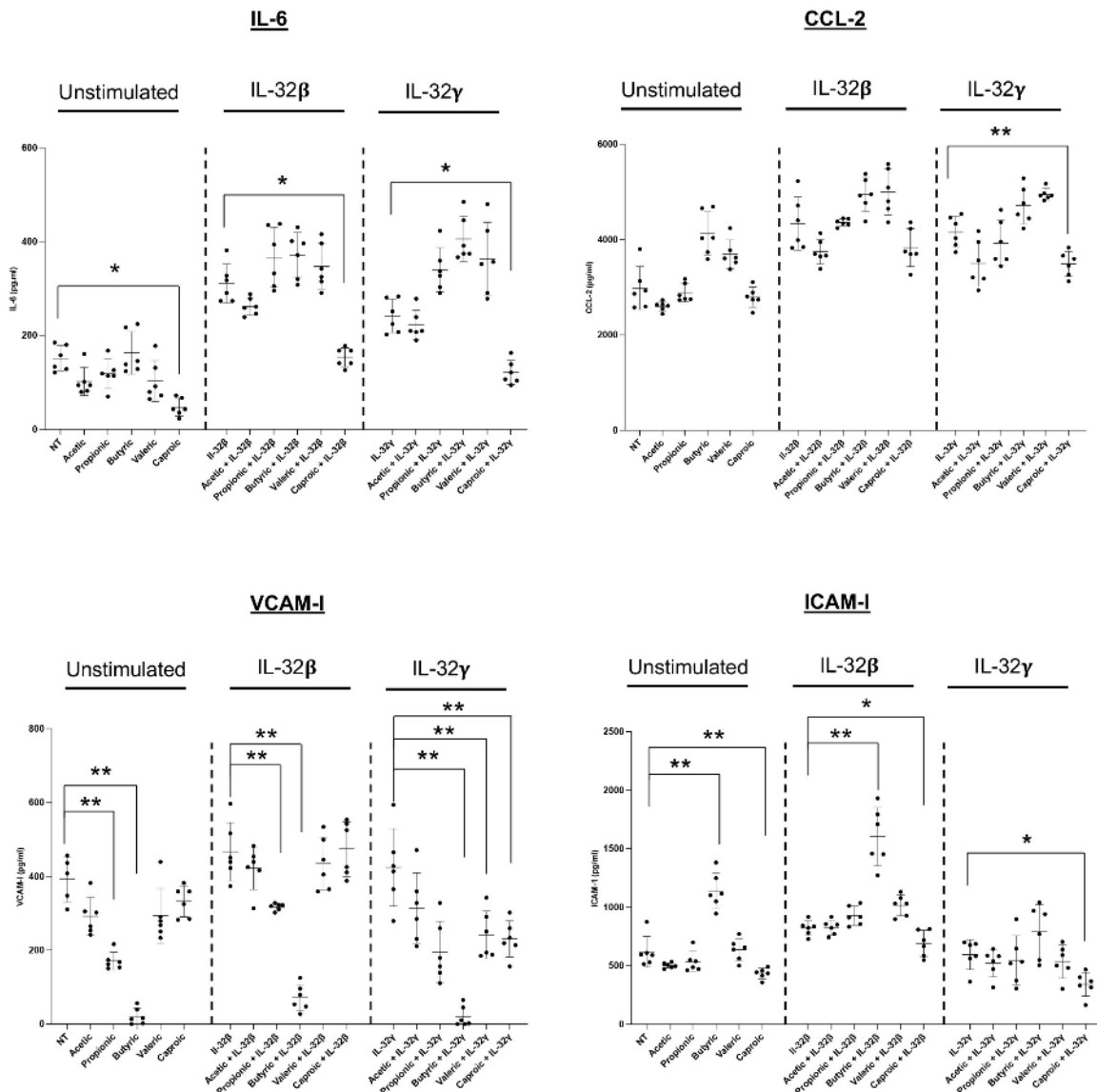


Figure 2: Short chain fatty acids show differential impact on coronary artery endothelial cells IL-32 induced dysfunction markers. Modulation of IL-6, CCL-2, ICAM-1 and VCAM-1 proteins in supernatants from CAEC following treatment with acetic, propionic, butyric, valeric and caproic acids(1nM) and stimulation with IL-32 $\beta$  and  $\gamma$  for 48 h (500 ng/mL). Dots on the graph represent experimental replicates from CAEC (n=6). Data analyzed with the Non-parametric Mann-Whitney analysis. NT: non-treated.

## **Chapitre 4 : Discussion**

Bien que les traitements antirétroviraux soient très efficaces dans le contrôle de la virémie du VIH-1 et aident à juguler l'infection, ils ne représentent pas une cure et n'empêchent pas la persistance du virus dans l'organisme. Certaines études suggèrent que le VIH-1 continue sa réplication à partir de réservoirs viraux et des sanctuaires immunitaires/tissulaires même sous traitement antirétroviral. Cette persistance de l'infection entraîne une circulation résiduelle d'antigènes viraux engendrant une activation du système immunitaire et son épuisement en conséquence de la persistance de l'inflammation chronique. L'inflammation chronique ainsi que plusieurs autres facteurs de risques directement liés à l'infection engendrent une prévalence des comorbidités et notamment du développement de l'athérosclérose. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la dysfonction cellulaire des cellules T dans le contexte du VIH-1, à la dysfonction des cellules endothéliales de l'artère coronaire provoquée par la cytokine pro inflammatoire IL-32 et enfin à chercher un moyen de réduire cette dysfonction par l'utilisation des acides gras à chaînes courtes.

### **La perte d'expression de CD96 comme biomarqueur de la différenciation et de la dysfonction des cellules T CD8+ dans le contexte de l'infection par le VIH-1**

#### **L'expression de CD96 est réduite chez les PVVIH en perte de contrôle immunologique et est liée à la progression de la maladie**

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la dysfonction des cellules immunitaires dans le contexte de l'infection par le VIH-1. Lors de l'analyse de nos études de transcriptomique, nous avons identifié CD96 comme ayant une expression réduite chez les PVVIH en perte de contrôle immunologique. Le CD96 aussi appelé TACTILE pour : « T cell-activated increased late expression », une immunoglobuline exprimée majoritairement à la surface de cellules NK et des cellules T et d'une manière générale à la surface des cellules issues de la lignée hématopoïétique[409, 410]. Le CD96 est un récepteur transmembranaire à passage unique

fortement glycosylé[409, 411]. Ce récepteur fait partie d'un réseau complexe d'interactions où il est désormais considéré comme une molécule inhibitrice[412] car il est suggéré qu'il signale via un motif d'inhibition des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (ITIM)[413]. Il entre en compétition avec TIGIT (une autre molécule inhibitrice)[414-416] et CD226 (connu pour activer les cellules T)[417-419] pour la liaison avec CD155. Le rôle de cette immunoglobuline est très controversé dans la littérature quant à son impact sur l'activation cellulaire. La majorité des études du CD96 porte sur la biologie des cellules NK et initialement, plusieurs études ont montré une capacité du CD96 à activer les cellules NK. Dans une première étude, il a été montré que l'interaction de CD96 avec le CD155 augmentait les capacités cytotoxiques des cellules NK. Dans cette étude, des cellules NK ont été traitées avec un anticorps monoclonal afin d'engager le récepteur CD96. Cela a eu pour effet d'améliorer leur capacité de lyse sur des cellules de la lignée cellulaire P815(une lignée de cellules de mastocytome) [410]. Ce résultat n'a pas pu être répliqué par une seconde étude qui a seulement observé une contribution modeste du CD96 sur les capacités des NK médiées par 2B4 et NKp30[415]. Différentes études ont tenté de déterminer les capacités du CD96 à activer les NK *in vitro* en utilisant des anticorps monoclonaux anti-CD96 qui n'ont révélé aucun effet sur les capacités des NK à lyser des cellules de myélome[420] ou de cancer ovarien[421]. Dans une étude réalisée chez la souris, il a été démontré que les souris CD96<sup>-/-</sup> étaient plus sensibles à une stimulation par le LPS en comparaison aux souris WT et que cet effet était dû à une production augmentée d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK. Cette observation implique un rôle plutôt suppressif du CD96 et entre en contradiction avec les précédentes études de cette immunoglobuline chez les NK. En outre, les mêmes effets ont été observés *in vivo* chez les souris WT après qu'un anticorps anti-CD96 leurs ait été administré. Chez les souris CD96<sup>-/-</sup>, les effets protecteurs étaient liés à une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$ , ce qui a été prouvé après traitement avec un anticorps neutralisant anti-IFN- $\gamma$  qui a aboli les effets protecteurs. Aucune différence dans les capacités des cellules NK entre les souris CD96<sup>-/-</sup> et les souris WT n'a été démontrée, renforçant l'idée que le CD96 ne joue pas de rôle direct dans les capacités de « kill » des NK[412]. Bien que CD96 ait été identifié chez les cellules T[409], peu de connaissances ont été obtenues depuis sur son rôle dans les populations cellulaires de T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>. Une étude a montré que *la perte* de CD96 était plus prononcée chez des patients avec une forte charge virale du VIH-1, ce qui est en accord avec notre observation que la perte de l'expression de CD96 à la surface des cellules T CD8<sup>+</sup> était liée à la progression du VIH-1. Dans

la même étude, il a été observé que bien que les cellules CD8<sup>+</sup> CD96<sup>hi</sup> et CD96<sup>low</sup> soient toutes deux capables de produire de l'IFN- $\gamma$ , les T CD8<sup>+</sup> CD96<sup>low</sup> produisaient également des perforines [422]. Cette étude ne s'est néanmoins concentrée que sur l'expression de perforine par les T CD8<sup>+</sup> CD96<sup>low</sup> mais n'a pas cherché à identifier une perte de leur polyfonctionnalité ou de leur capacité de prolifération comme nous l'avons fait dans la suite de notre étude.

## **La perte de l'expression de CD96 est associée avec un phénotype mémoire et sénescence**

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'expression de CD96 sur les sous types de cellules T CD8<sup>+</sup> était différente. Nous avons observé qu'une faible expression de CD96 était associée avec un profil mémoire plus différencié (« effector memory » et « terminally differentiated effector memory ») alors qu'une expression plus forte correspondait à un profil de cellules naïves et centrale mémoire. La diminution de l'expression de CD96 correspond avec des populations de cellules T exprimant faiblement CD27 et CD28, deux corécepteurs importants dans la biologie des lymphocytes T. CD28 joue un rôle essentiel au bon fonctionnement des populations de cellules T. Son engagement déclenche des événements biochimiques intracellulaires critiques, notamment des étapes de phosphorylation menant à la signalisation transcriptionnelle, il impacte le métabolisme et la production de cytokines, de chimiokines et de signaux de survie essentiels à l'expansion et à la différenciation à long terme des lymphocytes T[423-426]. CD27 est membre de la famille des récepteurs du TNF jouant un rôle clé dans la costimulation des lymphocytes T et B[427]. Son engagement participe à l'activation cellulaire des cellules T, une amélioration de leur expansion clonale et contribue à la différenciation des cellules T en cellules cytotoxiques et en cellules mémoires[428-432]. La perte commune de l'expression de CD28 et de CD27 est un marqueur de la sénescence des cellules T[433, 434]. Nous avons donc voulu valider que ces cellules étaient sénescences en observant leur expression de CD57. CD57 est exprimé sur les cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> étant dans des stades de différenciation avancée [435]. Il a été montré que les cellules T CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> possédaient des télomères courts, une faible expression de gènes liés au cycle cellulaire en comparaison aux cellules T CD8<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> [436]. Les cellules T CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> peuvent donc être décrites comme sénescences. Dans notre étude nous avons associé la perte d'expression de CD96 avec une diminution de l'expression de CD27<sup>+</sup> et CD28<sup>+</sup> et une augmentation de l'expression de CD57 soit avec un profil sénescence de cellule T. Nous

avons donc défini la perte de CD96 comme un biomarqueur de cette sénescence. L'accumulation de cellules T sénescents a été liée avec le développement de l'athérosclérose dans plusieurs études. Il a été montré qu'une augmentation de la fréquence de cellules T CD4<sup>+</sup> sénescents est associée avec l'athérosclérose subclinique mesurée par la calcification des plaques et l'épaisseur de l'intima de la carotide[437]. Chez les PVVIH, une étude a montré qu'une fréquence augmentée de cellules T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup> était associée avec une plus forte prévalence de maladies cardiovasculaires[438].

### **La perte de l'expression de CD96 modifierait-elle la réponse des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques aux antigènes dans le contexte de l'infection par le VIH ?**

Nous avons ensuite testé la capacité des cellules T CD8<sup>+</sup> à répondre à une stimulation par les peptides du VIH-1 et avons observé que les cellules répondantes possédaient une expression plus importante de CD96 en comparaison aux cellules non-répondantes. Nous avons de plus observé une corrélation négative entre l'expression de CD57 et CD96 à la surface des cellules répondantes. Toujours dans le contexte du VIH-1, il a été montré que les cellules T CD8<sup>+</sup> pouvaient augmenter leur expression de CD57 et devenir sénescents[439]. Cet état de fait peut également être lié à une co-infection par le CMV qui est un agent infectieux particulièrement impactant pour l'immunosénescence[440, 441]. Le CMV engendre une prolifération clonale importante des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques ayant pour effet une réduction de leur expression de CD28, une augmentation de leur expression de CD57 et une attrition de la longueur de leurs télomères[442, 443]. Dans notre étude, l'expression du CD96 à la surface des cellules T semblait jouer un rôle protecteur puisque sa perte était marquée sur les cellules sénescents. Il est néanmoins difficile de savoir si le changement de l'expression du CD96 est une cause ou une conséquence de cette sénescence et notre étude ne répond pas à cette question. Bien que la sénescence et l'épuisement immunitaire soient deux états cellulaires différents, certains points communs peuvent être trouvés. Dans une étude récente, il a été montré que l'utilisation d'anticorps bloquant anti-CD96 associés avec des anticorps bloquant anti-PD-1 avait pour conséquence d'améliorer l'efficacité du blocage de PD-1 et d'améliorer la fonction des T CD8<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs (TILs) dans un contexte de cancer cervical chez la souris et *ex vivo* chez l'humain[444]. Bien que le résultat de cette étude soit très intéressant pour l'étude de la biologie du CD96, il est difficile de savoir si les anticorps bloquants anti-CD96 utilisés n'activent pas la

signalisation du CD96. En effet, certaines études montrent que la réticulation avec CD3 est possible et décrivent le CD96 comme une molécule de costimulation capable de signaler via les voies de signalisation MEK-ERK [445]. Cela étant dit, bien que le cancer et l'infection par le VIH-1 soient deux contextes différents, ils représentent tous deux un milieu fortement épuisant pour les cellules effectrices que ce soit par la forte expression de points de contrôle dans le cadre du cancer ou de la circulation persistante d'antigènes (viraux et bactériens) et de l'inflammation chronique dans le contexte du VIH-1. Si le rôle inhibiteur de CD96 à la surface des cellules T est avéré, il pourrait être intéressant d'étudier l'utilisation d'anticorps monoclonaux afin de partiellement restaurer les capacités effectrices des cellules T CD8<sup>+</sup> épuisées dans le contexte de l'infection chronique par le VIH-1. En plus, des études montrant un lien entre la sénescence des cellules T et le développement de maladies cardiovasculaires décrites dans le paragraphe précédent[438], certaines études ont démontré la présence de T CD8<sup>+</sup> ayant un phénotype d'épuisement chez des patients souffrant de syndromes coronariens aigus[446]. Il serait intéressant de vérifier l'expression et le rôle de CD96 à la surface de ces cellules afin de déterminer s'il pourrait être envisagé comme une cible thérapeutique dans la lutte contre le développement des maladies cardiovasculaires.

## **Le lien entre la cytokine pro-inflammatoire IL-32 et la perte d'expression de CD96**

Dans nos études transcriptomiques, nous avons donc identifié la perte d'expression du CD96 chez les personnes en perte de contrôle immunologique comme une opportunité de recherche intéressante qui nous a menée à l'identifier comme un biomarqueur de la sénescence des cellules T CD8<sup>+</sup>. Dans cette même étude transcriptomique, notre groupe a identifié l'interleukine 32 comme étant digne d'intérêt étant donné l'augmentation de son expression chez les PVVIH en perte de contrôle immunologique et la capacité des isoformes d'IL-32  $\beta$  et  $\gamma$  à réduire l'expression du CD96 à la surface des cellules T CD8<sup>+</sup> *in vitro*. Dans une étude publiée en 2016[76], notre groupe a pu identifier l'IL-32 comme un biomarqueur de la perte de contrôle immunologique en déterminant que les isoformes  $\beta$  et  $\gamma$  corrélaient avec le déclin des cellules T CD4<sup>+</sup>, une augmentation de la charge virale, une diminution du ratio CD4/CD8 et une augmentation de l'expression de marqueurs inflammatoires comme IL-6 et CD14. Cette

observation sur la perte de contrôle après plusieurs années de contrôle efficace du VIH-1 interpelle quant à l'implication du vieillissement dans ce changement. L'interleukine 32 est une cytokine inflammatoire persistante qui n'est pas normalisée par le traitement antirétroviral et qui contribue au développement de maladies cardiovasculaires. Notre groupe a démontré que chez les PVVIH atteintes d'athérosclérose subclinique, les isoformes IL-32D et IL-32 $\theta$  sont significativement plus élevées en comparaison aux PVVIH sans athérosclérose subclinique indépendamment de l'âge, du tabagisme ou de traitement par des statines[308]. Une autre étude de notre groupe s'intéressant aux femmes vivant avec le VIH-1 et étant sous traitement, montre que dans les PBMCs isolés des donneuses ayant de l'athérosclérose subclinique, les niveaux d'expression des isoformes IL-32 $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\epsilon$  sont significativement plus élevés par rapport aux témoins dans la même tranche d'âge sans athérosclérose subclinique[311]. Les mécanismes par lesquels cette cytokine agit sur le développement des comorbidités liées au VIH-1 sont néanmoins mal connus. L'IL-6 et le TNF- $\alpha$  sont directement corrélés avec les maladies coronariennes ainsi que l'IL-32 qui s'est avérée également fortement exprimée dans l'endothélium de l'artère coronaire chez les personnes affectées par des maladies coronariennes[447, 448]. Nous avons donc décidé d'étudier son impact sur les cellules endothéliales afin de mieux comprendre la relation entre cette interleukine et le développement des maladies cardiovasculaires.

## **Impact des isoformes d'IL-32 sur la fonction des CAEC, un lien potentiel avec l'athérosclérose et la rigidité artérielle**

### **Les isoformes d'IL-32 montrent un impact différentiel sur les CAEC**

L'étude de l'impact des isoformes circulante d'IL-32 n'ayant jamais été effectuée sur les cellules endothéliales de l'artère coronaire (CAEC) nous avons choisi de le faire sur des cellules primaires pouvant être gardées en culture. Nous avons commencé par quantifier les cytokines exprimées par les CAEC pour constater que la production d'IL-6 était augmentée et que la production d'IL-10 était diminuée après traitement par les isoformes d'IL-32  $\beta$  et  $\gamma$ . IL-10 est une

cytokine athéro-protectrice de par sa capacité à inhiber la production d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-8 par les macrophages et promouvoir leur polarisation vers le type 2 (M2)[449]. Sa diminution par les isoformes d'IL-32 $\beta$  et  $\gamma$  concomitante avec une augmentation d'IL-6 nous indique le rôle inflammatoire de ses isoformes. IL-6 est considéré comme une cytokine inflammatoire en amont du développement de l'athérosclérose du fait de sa capacité à engendrer la production de multiples médiateurs inflammatoires et l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales[356, 450, 451]. Nous en avons conclu que sa production par les cellules endothéliales après stimulation par les isoformes d'IL-32 $\beta$  et  $\gamma$  représente un des mécanismes par lesquels IL-32 contribue au développement de l'athérosclérose. Il est intéressant de noter qu'IL-6 peut signaler de deux manières en fonctions du type cellulaire impliqué. Il peut signaler par la liaison à son récepteur IL-6R, à la surface de la membrane cellulaire induisant alors la signalisation intracellulaire par le biais de la GP130[452]. Il peut également signaler dans les cellules n'exprimant pas le récepteur IL-6R à la surface de leur membrane cellulaire par « trans-signaling » en se liant à une forme libre du récepteur IL-6R qui lui permet de stimuler des cellules exprimant la gp130[453]. La signalisation par « trans-signaling » est associée avec des fonctions pro-inflammatoires alors que la signalisation classique est liée à des fonctions anti-inflammatoires[454].

### **Les isoformes d'IL-32 $\beta$ et $\gamma$ induisent la dysfonction des CAEC**

Nous avons ensuite voulu savoir si les isoformes  $\beta$  et  $\gamma$  d'IL-32 provoquaient la dysfonction des cellules endothéliales. Pour se faire, nous avons évalué les capacités d'IL-32 à augmenter l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 dans les cellules endothéliales qui sont considérées comme des biomarqueurs de leur dysfonction[455]. Nous avons observé que l'expression du niveau ARNm et de la protéine sécrétée dans le milieu était augmentée. Cette observation renforce notre conviction qu'IL-32 contribue au développement des maladies cardiovasculaires étant donné que de hauts niveaux de circulation des formes solubles d'ICAM-1 et de VCAM-1 corrélaient avec l'athérosclérose[456]. La forme soluble d'ICAM-1 (sICAM-1) peut provoquer des réponses pro et anti inflammatoires en fonction de sa concentration. Si les niveaux circulants sont hauts, il augmente la migration des cellules endothéliales[457] et l'angiogenèse[458] et inhibe les liaisons des lymphocytes avec les cellules endothéliales par compétition[459]. Si les niveaux de



sICAM-1 sont bas, il provoque l'activation des voies de signalisation NF- $\kappa$ B et ERK menant à la sécrétion de CCL-3, de CXCL2, du TNF- $\alpha$ , de l'IFN- $\gamma$  et d'IL-6 par les cellules endothéliales[460] participant ainsi à l'inflammation chronique. La forme soluble de VCAM-1 (sVCAM-1) est produite durant les premières phase du développement de l'athérosclérose, ou son expression augmente l'adhérence des cellules inflammatoires[461, 462]. Les niveaux d'expression de sVCAM-1 sont augmentés chez les patients atteints de cardiomyopathie ischémique[463], des myocardites aiguës[464], de fibrillation atriale[465] et de maladies coronariennes[466]. Son expression a également été identifiée comme un fort prédicteur d'événements cardiaques fatals dans une cohorte de patients ayant des maladies coronariennes[456, 467]. Pris ensemble ces informations nous permettent de penser que l'augmentation des niveaux circulant de sICAM-1 et sVCAM-1 imputable au isoformes  $\beta$  et  $\gamma$  d'IL-32 pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse du développement de l'athérosclérose (pour sICAM-1) et influencer le niveau d'expression que représente le biomarqueur sVCAM-1 dans les maladies cardiovasculaires. Nous avons ensuite développé un protocole de cytométrie en flux permettant d'étudier ses molécules d'adhérence sur les cellules qui nous a permis de voir que ICAM-1 et VCAM-1 étaient significativement plus exprimés à la surface des CAEC après traitement par les isoformes d'IL-32 $\beta$  et  $\gamma$ , confirmant que ces isoformes provoquent la dysfonction des CAEC. ICAM-1 et VCAM-1 jouent également un rôle dans l'adhérence ferme des leucocytes aux cellules endothéliales en formant respectivement des liaisons avec LFA-1 et VLA-4[369]. La liaison LFA-1/ICAM-1 entraîne la phosphorylation de la VE-cadherin et le réarrangement de l'actine dans les cellules endothéliales permettant l'ouverture des jonctions intracellulaires et la migration des leucocytes[372]. À partir de ces informations, nous pouvons supposer que les isoformes d'IL-32 $\beta$  et  $\gamma$  augmentent la capacité des leucocytes à traverser l'endothélium en impactant directement l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 sur les CAEC. Bien que cet effet des isoformes de l'IL-32 puisse être médié par l'IL-6 comme mentionné ci-dessus, nous n'avons pas vérifié l'expression du récepteur IL-6R à la surface des CAECs, nous ne pouvons donc pas conclure sur la signalisation d'IL-6 dans ce type cellulaire dans le contexte de notre étude.

## **Les isoformes d'IL-32 $\beta$ et $\gamma$ augmentent la production de chimiokines des CAEC et leur capacité à recruter des monocytes**

Dans la suite de notre étude, nous avons observé que les isoformes d'IL-32 $\beta$  et  $\gamma$  n'augmentaient pas seulement les molécules d'adhérence des CAEC mais aussi la sécrétion de CXCL-1, CCL-2 et CXCL-8 par les CAEC. Ces chimiokines possèdent la capacité de recruter des cellules immunitaires sur les lieux de l'inflammation. CXCL-1, CCL-2 et CXCL-8 jouent un rôle dans le recrutement des leucocytes et leur adhérence ferme à la surface des cellules endothéliales[468, 469]. CXCL-1 engendre le recrutement de neutrophiles dans les plaques d'athéroscléroses [469]. Les neutrophiles secrètent des cytokines pro-inflammatoires et des protéases qui participent à l'amplification de la réponse inflammatoire dans les plaques[470]. Il a été montré que CXCL-1 augmente l'infiltration des monocytes dans le cœur, un procédé inflammatoire lié avec l'hypertrophie cardiaque et la fibrose[471]. La liaison de CXCL-1 avec son récepteur CXCR2 augmente également l'adhérence des monocytes et participe à leur arrêt à la surface de l'endothélium dans des conditions inflammatoires[472-474]. CXCL-1 impacte aussi directement les macrophages en augmentant l'expression de leur récepteur phagocytaire de macrophage de la classe A (SR-A) et le CD36[475] qui sont tous deux des récepteurs pour le oxLDL[476, 477]. CXCL-1 joue également un rôle dans la sécrétion de métalloprotéinases de matrice par les cellules musculaires lisses vasculaires, engendrant la déstabilisation des plaques d'athérosclérose[475]. L'expression de CXCL-1 par les CAEC en réponse au isoformes  $\beta$  et  $\gamma$  d'IL-32 pourrait donc directement impacter le recrutement des neutrophiles et des monocytes sur les lieux d'inflammation et indirectement contribuer au développement de l'athérosclérose en augmentant l'expression des récepteurs de oxLDL à la surface des macrophages. La liaison de CCL-2 avec son récepteur CCR-2 à la surface des monocytes engendre leur migration vers les lieux de formation des plaques d'athérosclérose[478]. Une étude réalisée sur des tissus obtenus à partir d'autopsie démontre que CCL-2 est détecté dans les premières phases de formation des plaques d'athéroscléroses suggérant qu'il joue un rôle dans l'initiation de la migration des monocytes et donc dans l'initiation de la formation des plaques[479]. De hauts niveaux d'expression de CCL-2 ont été mesurés dans les lésions athérosclerotiques contenant un grand nombre de macrophages[480]. De plus, une expression plus forte de CCL-2 a été détectée dans les zone riches en macrophages autour du noyau nécrotique suggérant que la migration

ininterrompue de monocytes et l'accumulation de lipides pourraient contribuer à la déstabilisation de la plaque[481]. Ces observations suggèrent un mécanisme supplémentaire par lequel les isoformes d'IL-32 $\beta$  et  $\gamma$  pourraient indirectement impacter l'initiation de la formation des plaques d'athérosclérose et leur déstabilisation en augmentant la sécrétion de CCL-2 par les CAEC. CXCL-8 est une chimiokine se liant avec le récepteur CXCR2, et il a été montré que cette liaison engendre l'adhérence ferme des monocytes à l'endothélium[468]. Les concentrations de CXCL-8 sont plus importantes chez les personnes ayant des maladies coronariennes en comparaison à la population générale[482]. Une étude a démontré que les niveaux de CXCL-8 dans le sérum peuvent servir de prédicteur aux évènements cardiovasculaires chez des personnes présentant des maladies coronariennes stables[483]. Il a également été montré que CXCL-8 est un facteur prédictif de mortalité cardiovasculaire pour chez les personnes souffrant de maladie rénale en phase terminale[484]. Une étude récente a montré que CXCL-8 peut induire le relargage de pièges extracellulaires par les neutrophiles, ce qui aggrave le développement de l'athérosclérose[485]. Par ce mécanisme, les neutrophiles peuvent contribuer à la formation de thrombus en exerçant des activités pro-coagulantes et pro-thrombotiques. Dans la suite de notre étude, nous avons vérifié la capacité des CAEC à recruter des monocytes après traitement par les isoformes d'IL-32 $\beta$  et  $\gamma$  et avons déterminé une augmentation de la capacité de recrutement de ces cellules après traitement. Nous avons déterminé que ce recrutement se faisait par les axes CCR-2/CCL-2 et CXCR-2/CXCL-1&8 en utilisant des inhibiteurs, ce qui est en accord avec la littérature comme développé ci-avant. En résumé, en augmentant la sécrétion de CXCL-1, CXCL-8 et CCL-2, les isoformes d'IL-32 $\beta$  et  $\gamma$  jouent un rôle dans la pathogenèse de l'athérosclérose de manière directe en influençant sur le recrutement et l'adhérence ferme des monocytes à la surface des CAEC et potentiellement de manière indirecte en augmentant l'expression des récepteurs de oxLDL à la surface des macrophages *via* CXCL-1, en initiant la formation des plaques d'athérosclérose et leur déstabilisation *via* CCL-2 et en augmentant la sécrétion de pièges extracellulaires par les neutrophiles *via* CXCL-8. Il est intéressant de noter que des niveaux augmentés de CXCL-1, CXCL-8 et CCL-2 sont retrouvés chez les PVVIH[486]. IL-32 pourrait représenter une cible thérapeutique pour réduire l'expression de ces chimiokines dans le contexte de l'infection par le VIH-1.

## **L'expression des isoformes d'IL-32 est associée avec la rigidité artérielle**

L'âge est connu pour être le facteur de risque le plus important pour le développement des maladies cardiovasculaires et de la mortalité[487]. De plus, la rigidité artérielle augmente naturellement avec l'âge[380, 488, 489], rendant sa corrélation difficile avec d'autres médiateurs pouvant l'influencer. Il a déjà été montré que l'inflammation chronique peut jouer un rôle dans le développement de la rigidité artérielle[390, 391]. Les PVVIH sont sujets à l'inflammation chronique, et l'IL-32 est une cytokine qui n'est pas normalisée par la thérapie antirétrovirale combinée chez les PVVIH[76]. Nous avons donc étudié la corrélation entre l'expression des isoformes d'IL-32 et les valeurs de translation latérale cumulée dans l'artère coronaire commune (CLT-CCA) obtenue par élastographie vasculaire par ultrason, un procédé non invasif[490]. La valeur de CLT-CCA représente le mouvement de translation cyclique, pendant la pulsation, de la paroi artérielle le long de l'axe longitudinal du vaisseau. Nous avons observé une corrélation négative entre les isoformes d'IL-32 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , D,  $\epsilon$  et  $\theta$  et les valeurs de CLT-CCA chez les individus du groupe contrôle. Nous avons également retrouvé cette observation chez les PVVIH mais seulement dans le quartile le plus haut donc chez les personnes avec moins de rigidité artérielle. Nous avons également remarqué que ce quartile contient des individus plus jeunes. Par cette observation, nous avons constaté que l'association entre la rigidité artérielle et les isoformes d'IL-32 était seulement observable chez les PVVIH relativement jeunes. Nous en avons déduit que l'âge reste le facteur majeur pour le développement de la rigidité artérielle et empêche de voir la corrélation avec IL-32 dans la population de PVVIH plus âgées. Bien que notre étude ne se soit pas concentrée sur le mécanisme par lequel les isoformes d'IL-32 impactent la rigidité artérielle, il est intéressant de noter qu'il a été montré qu'IL-6 était augmentée dans le plasma des personnes atteintes par des maladies coronariennes[491], de plus IL-6 a directement pu être corrélée avec la rigidité artérielle[492, 493]. Des études ont également fait le lien entre l'expression de CCL-2 et la rigidité artérielle dans un contexte d'hypertension[492] et de maladies rénales chroniques (via l'expression d'« angiotensin-2 »)[494]. Les isoformes d'IL-32  $\beta$  et  $\gamma$  ont la capacité d'augmenter la production d'IL-6 et de CCL-2 dans les CAEC, il est possible qu'IL-32 joue un rôle dans le développement de la rigidité artérielle de manière indirecte *via* ces deux molécules.

## **Les acides gras à chaînes courtes pour contrecarrer IL-32 ?**

L'IL-32 n'est pas normalisée par la thérapie antirétrovirale combinée chez les PVVIH où elle joue donc un rôle pro inflammatoire constant. Dans ce contexte, il est important de trouver des solutions afin de bloquer ou limiter son action sur les cellules immunitaires et non-immunitaires. Malheureusement, aucun récepteur n'a été identifié pour l'IL-32. Quelques études se sont intéressées aux partenaires cellulaires d'IL-32 et l'une d'elles a pu identifier sa capacité à entrer en synergie avec les « Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 et 2 » (NOD1 et NOD2) menant à une augmentation de la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 de 3 à 10 fois dans les PBMC de patients atteints par la maladie de Crohn[306]. Il a également été déterminé que la protéinase 3 (PR3) pouvait se lier à IL-32 $\alpha$  et engendrer son clivage[495]. Une autre étude a déterminé la capacité d'IL-32 $\alpha$  et  $\beta$  à se lier aux intégrines  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  et  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  soit le premier exemple de protéines extracellulaires capables de se lier aux isoformes d'IL-32[276]. Ces études ne permettent néanmoins pas l'identification d'un récepteur pouvant être ciblé afin de contrecarrer la signalisation des isoformes d'IL-32 dans les cellules. Nos études ont montré que l'IL-32 induit d'autres médiateurs athérogènes comme l'IL-6 ou le CCL-2 dans les cellules endothéliales. Bien que des solutions aient été développées pour bloquer certains médiateurs comme des anticorps bloquants contre IL-6, ces anticorps peuvent mener à des effets indésirables comme une augmentation modérée de la sensibilité aux infections[496]. Dans le cas du blocage de CCL-2, des études cliniques sont en cours afin de déterminer si le blocage du récepteur CCR-2 pourrait être bénéfique pour le traitement de maladies inflammatoires[497]. Bien que deux anticorps bloquants aient été développés dans le passé pour contrer les effets de CCL-2 (Carlumab et Plozalizumab), ils se sont avérés inefficaces et leur utilisation a été abandonnée[497]. IL-32 est une cytokine inflammatoire qui agit en amont de la sécrétion de certains de ces médiateurs inflammatoires mais pour laquelle aucun traitement n'a été développé. Nous nous sommes donc intéressés à la possibilité de réduire les effets pro-inflammatoires d'IL-32 grâce aux propriétés anti-inflammatoires des acides gras à chaînes courtes (SCFA) et notamment pour déterminer si ces acides pouvaient réduire les marqueurs de la dysfonction sur les CAEC après stimulation par les isoformes d'IL-32.

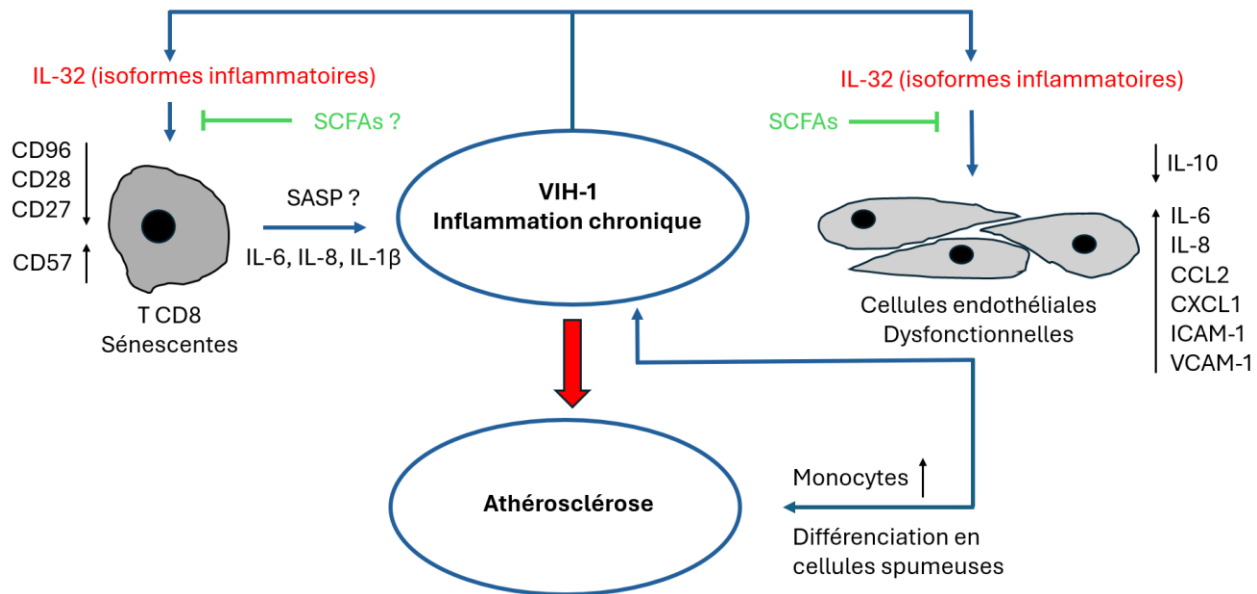
## **Les acides gras à chaînes courtes atténuent la dysfonction des cellules endothéliales.**

La majorité des études concernant les acides gras à chaîne courte ont été concentrées sur les acides acétique, butyrique et propionique qui représentent l'écrasante majorité de la production intestinale avec des ratios de 60/20/20, respectivement. Des études chez la souris ont montré un effet important des SCFA dans la réduction de l'inflammation, l'amélioration des fonctions de la barrière intestinale et la protection contre les maladies cardiovasculaires[328, 498-500]. Dans une étude récente, il a été observé qu'une diminution importante des acides propioniques et isobutyriques était présente dans le sérum des PVVIH en comparaison à la population générale et que cette diminution dans la capacité à produire des SCFA protecteurs est liée à l'inflammation, à la morbidité et à la mortalité. Cette étude suggère également que les variations de concentration des SCFA sont plus intéressantes à quantifier dans le sérum plutôt que dans les matières fécales afin de pouvoir mesurer les SCFA réellement disponibles dans l'organisme[501]. En effet, des études sur les humains consistant en une supplémentation en fibre n'ont pas été capables de montrer une augmentation d'acide butyrique et propionique dans les selles[502]. Dans une étude récente publiée par notre groupe, nous avons montré que l'acide caproïque était significativement diminué chez les PVVIH ayant des maladies cardiovasculaires en comparaison aux PVVIH n'en ayant pas. De la même manière, l'acide caproïque était significativement diminué lorsque nous groupions les PVVIH avec la population générale en les distinguant par la présence de maladies cardiovasculaires. Dans cette même étude, nous avons montré une corrélation négative entre les mesures d'ARNm de l'IL-32 et les concentrations fécales d'acide caproïque[308]. Nous en avons alors déduit que l'acide caproïque pourrait jouer un rôle protecteur contre IL-32. Dans le cadre de l'étude présente, nous avons testé côte à côte l'impact des différents SCFA sur les CAEC (un type cellulaire en contact direct avec la circulation sanguine) et les résultats obtenus nous portent à croire que l'acide caproïque est un candidat de recherche intéressant pour réduire l'inflammation endothéliale. Nous avons été surpris de constater que le traitement par l'acide butyrique conduisait à une augmentation des marqueurs inflammatoires IL-6, CCL-2 et ICAM-1 sur les CAEC après traitement par IL-32 $\beta$  et  $\gamma$ . Le seul SCFA étant constant dans la réduction des marqueurs de dysfonction des CAEC dans notre étude était donc l'acide caproïque. D'autres études ont porté leur attention sur l'acide caproïque, notamment dans le contexte des maladies rénales chroniques où il a été montré que son expression était enrichie dans la population contrôle

mais réduite chez les personnes malades[503]. En prenant en compte que les maladies rénales chroniques et les maladies cardiovasculaires ont une plus forte prévalence chez les PVVIH, nous pensons que l'acide caproïque pourrait être un important modulateur de l'inflammation dans le contexte du VIH-1 et des maladies inflammatoires.

## **Conclusions**

Nos études ont permis de montrer l'importance de l'interleukine 32 dans la dysfonction cellulaire dans le contexte du VIH-1. Nos études sur le CD96 ont permis de révéler qu'IL-32 diminue l'expression du CD96 à la surface des cellules T CD8+, menant potentiellement à une accumulation de cellules sénescents et dysfonctionnelles délétères dans la réponse immunitaire contre le VIH-1 et pour l'inflammation chronique dans cette population. Nous avons également pu déterminer que la diminution de l'expression du CD96 à la surface des cellules T CD8+ est un biomarqueur de leur sénescence. Notre étude sur le rôle de l'IL-32 sur les cellules endothéliales de l'artère coronaire a permis de mieux caractériser son rôle dans le développement des maladies cardiovasculaires. En effet, en montrant qu'il joue un rôle dans la dysfonction des cellules endothéliales de l'artère coronaire, nous avons ajouté aux connaissances sur cette cytokine et les mécanismes par lesquelles elle contribue au développement de l'athérosclérose. Enfin, notre travail sur l'utilisation des acides gras à chaînes courtes a permis d'envisager une première manière de réduire la dysfonction des cellules endothéliales liée aux isoformes d'IL-32 et de montrer l'intérêt de l'acide caproïque dans ce contexte, qui était peu étudié jusqu'ici. A partir de nos études, nous proposons un modèle montrant les effets des isoformes inflammatoires de l'IL-32 sur les cellules endothéliales et les cellules T CD8+ et leur lien avec l'inflammation chronique et le développement de l'athérosclérose et l'utilisation des acides gras à chaîne courtes pour réduire ces effets (figure 12).



**Figure 12.** – Rôle de l'IL-32 dans le dysfonctionnement cellulaire et son effet sur l'inflammation chronique et le développement des maladies cardiovasculaires dans le contexte du VIH-1.

Modèle récapitulant les résultats des études montrant les effets des isoformes inflammatoires d'IL-32 sur les cellules T CD8 et les cellules endothéliales. Le modèle détaille le rôle que ces isoformes d'IL-32 jouent dans l'entretien et le développement de l'inflammation chronique et des maladies cardiovasculaires ainsi que l'utilisation des acides gras à chaîne courte pour réduire leurs effets délétères.

## Perspectives

Nos travaux ouvrent la voie à plusieurs thématiques de recherche notamment sur le lien entre l'IL-32 et le CD96 dont les expressions pourraient être étudiées au sein de cohorte permettant de voir si une corrélation existe entre ces deux marqueurs. De plus, il serait intéressant de définir le lien fonctionnel entre les isoformes d'IL-32 et l'expression du CD96 à la surface des cellules T CD8+ *in vitro* afin de comprendre le mécanisme par lequel cette cytokine impacte la prolifération et les changements phénotypiques de ce type cellulaire clé dans la lutte contre l'infection par le VIH-1. En montrant la perte du CD96 à la surface des cellules T CD8+ ayant un profil sénescent, nos résultats semblent indiquer que le CD96 pourrait être une molécule importante pour l'activation des cellules T, des recherches en ce sens pourraient donner lieu au développement de stratégies pour secourir les cellules T CD8+ épuisées dans le contexte du VIH-1 en combinaison



avec d'autres molécules notamment des anticorps bloquant contre PD-1, Tim-3 ou encore LAG-3 mais aussi en bloquant l'IL-32 afin d'empêcher son impact sur la diminution de l'expression de CD96. Ces recherches seraient extrêmement bénéfiques pour une meilleure compréhension de la signalisation intracellulaire de cette immunoglobuline pour laquelle la littérature est extrêmement contradictoire.

Nos recherches sur l'impact de l'interleukine 32 dans la dysfonction des cellules endothéliales pourraient être poursuivies en s'intéressant à l'IL-6 induite par IL-32 afin de déterminer dans quelle proportion un rôle autocrine de cette interleukine impacte la dysfonction des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales dysfonctionnelles sont également connues pour modifier leur utilisation d'oxyde nitrique (NO). En effet, une diminution de la production et de la disponibilité de NO joue un rôle majeur dans la dysfonction des cellules endothéliales dans le contexte des maladies cardiovasculaires [504]. Il a notamment été montré que les personnes atteintes d'athérosclérose avaient moins d'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) réduisant ainsi la disponibilité de NO[505]. C'est un point que nous n'avons pas développé dans nos recherches mais qui pourrait être crucial pour mieux comprendre l'impact de l'IL-32 sur le métabolisme des cellules endothéliales.

Il serait intéressant d'étudier les effets de l'acide caproïque pour les autres isoformes de l'IL-32 et de comprendre précisément par quel récepteur il signale dans les cellules. Nos études concernant l'utilisation des acides gras à chaîne courte permettent à terme d'envisager l'étude de supplémentation en acide caproïque pour aider à réguler l'inflammation. De telles études sur des modèles animaux pourraient paver la voie vers le développement de traitements innovants étant donné la forte insulte subite par l'immunité mucoale dans le contexte du VIH-1 et la difficulté à revenir à un équilibre homéostatique à ce niveau même sous traitement antirétroviral.

## Références bibliographiques

1. Day, T., N. Mideo, and S. Alizon, *Why is HIV not vector-borne?* *Evol Appl*, 2008. **1**(1): p. 17-27.
2. Kourtis, A.P. and M. Bulterys, *Mother-to-child transmission of HIV: pathogenesis, mechanisms and pathways*. *Clin Perinatol*, 2010. **37**(4): p. 721-37, vii.
3. ONUSIDA, *The Path that Ends AIDS*. 2023, ONUSIDA.
4. Gottlieb, M.S., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. *N Engl J Med*, 1981. **305**(24): p. 1425-31.
5. Brennan, R.O. and D.T. Durack, *Gay compromise syndrome*. *Lancet*, 1981. **2**(8259): p. 1338-9.
6. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. *Science*, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
7. Coffin, J., et al., *Human immunodeficiency viruses*. *Science*, 1986. **232**(4751): p. 697.
8. Huet, T., et al., *Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1*. *Nature*, 1990. **345**(6273): p. 356-9.
9. Hirsch, V.M., et al., *An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2*. *Nature*, 1989. **339**(6223): p. 389-92.
10. Sharp, P.M., et al., *Origins and evolution of AIDS viruses*. *Biol Bull*, 1999. **196**(3): p. 338-42.
11. Hemelaar, J., *The origin and diversity of the HIV-1 pandemic*. *Trends Mol Med*, 2012. **18**(3): p. 182-92.
12. database, H.s., *HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs)*. <https://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/crfd/crfs.comp>, 2017.
13. De Leys, R., et al., *Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin*. *J Virol*, 1990. **64**(3): p. 1207-16.
14. Simon, F., et al., *Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O*. *Nat Med*, 1998. **4**(9): p. 1032-7.
15. Plantier, J.C., et al., *A new human immunodeficiency virus derived from gorillas*. *Nat Med*, 2009. **15**(8): p. 871-2.
16. Harrison, S.C., *Viral membrane fusion*. *Nat Struct Mol Biol*, 2008. **15**(7): p. 690-8.
17. Weissenhorn, W., et al., *Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41*. *Nature*, 1997. **387**(6631): p. 426-30.
18. Zhang, J. and C. Crumpacker, *HIV UTR, LTR, and Epigenetic Immunity*. *Viruses*, 2022. **14**(5).
19. Mbondji-Wonje, C., et al., *Genetic variability of the U5 and downstream sequence of major HIV-1 subtypes and circulating recombinant forms*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 13214.
20. Moore, J.P., *Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy*. *Science*, 1997. **276**(5309): p. 51-2.
21. Brumme, Z.L., et al., *Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals*. *J Infect Dis*, 2005. **192**(3): p. 466-74.
22. Moyle, G.J., et al., *Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection*. *J Infect Dis*, 2005. **191**(6): p. 866-72.

23. Melby, T., et al., *HIV-1 coreceptor use in triple-class treatment-experienced patients: baseline prevalence, correlates, and relationship to enfuvirtide response*. J Infect Dis, 2006. **194**(2): p. 238-46.
24. Lee, B., et al., *Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5215-20.
25. Gallo, S.A., et al., *The HIV Env-mediated fusion reaction*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1614**(1): p. 36-50.
26. McDonald, D., et al., *Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells*. J Cell Biol, 2002. **159**(3): p. 441-52.
27. Arhel, N., et al., *Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes*. Nat Methods, 2006. **3**(10): p. 817-24.
28. Han, Y., et al., *Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes*. J Virol, 2004. **78**(12): p. 6122-33.
29. Freed, E.O., *HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle*. Virology, 1998. **251**(1): p. 1-15.
30. Borrow, P., et al., *Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 1994. **68**(9): p. 6103-10.
31. Massanella, M., R. Fromentin, and N. Chomont, *Residual inflammation and viral reservoirs: alliance against an HIV cure*. Curr Opin HIV AIDS, 2016. **11**(2): p. 234-41.
32. Zevin, A.S., et al., *Microbial translocation and microbiome dysbiosis in HIV-associated immune activation*. Curr Opin HIV AIDS, 2016. **11**(2): p. 182-90.
33. Hunt, P.W., et al., *A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e15924.
34. Freeman, M.L., et al., *CD8 T-Cell Expansion and Inflammation Linked to CMV Coinfection in ART-treated HIV Infection*. Clin Infect Dis, 2016. **62**(3): p. 392-6.
35. Anderson, J., *Infections in HIV disease*. Clin Med (Lond), 2001. **1**(4): p. 292-5.
36. Doitsh, G., et al., *Corrigendum: Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection*. Nature, 2017. **544**(7648): p. 124.
37. Doitsh, G., et al., *Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection*. Nature, 2014. **505**(7484): p. 509-14.
38. Schoggins, J.W., *Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do?* Annu Rev Virol, 2019. **6**(1): p. 567-584.
39. Neil, S.J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu*. Nature, 2008. **451**(7177): p. 425-30.
40. Tokarev, A., et al., *Stimulation of NF-kappaB activity by the HIV restriction factor BST2*. J Virol, 2013. **87**(4): p. 2046-57.
41. Sauter, D., *Counteraction of the multifunctional restriction factor tetherin*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 163.
42. Amanya, S.B., et al., *Variations in Trim5alpha and Cyclophilin A genes among HIV-1 elite controllers and non controllers in Uganda: a laboratory-based cross-sectional study*. Retrovirology, 2020. **17**(1): p. 19.
43. Goldstone, D.C., et al., *HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase*. Nature, 2011. **480**(7377): p. 379-82.

44. Fregoso, O.I., et al., *Evolutionary toggling of Vpx/Vpr specificity results in divergent recognition of the restriction factor SAMHD1*. PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003496.
45. Lim, E.S., et al., *The ability of primate lentiviruses to degrade the monocyte restriction factor SAMHD1 preceded the birth of the viral accessory protein Vpx*. Cell Host Microbe, 2012. **11**(2): p. 194-204.
46. Zhang, H., et al., *The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA*. Nature, 2003. **424**(6944): p. 94-8.
47. Bishop, K.N., et al., *APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts*. PLoS Pathog, 2008. **4**(12): p. e1000231.
48. Yu, X., et al., *Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex*. Science, 2003. **302**(5647): p. 1056-60.
49. Manches, O., D. Frleta, and N. Bhardwaj, *Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection*. Trends Immunol, 2014. **35**(3): p. 114-22.
50. Blanco, P., et al., *Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(1): p. 41-52.
51. van Stigt Thans, T., et al., *Primary HIV-1 Strains Use Nef To Downmodulate HLA-E Surface Expression*. J Virol, 2019. **93**(20).
52. Schwartz, O., et al., *Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein*. Nat Med, 1996. **2**(3): p. 338-42.
53. Zipeto, D. and A. Beretta, *HLA-C and HIV-1: friends or foes?* Retrovirology, 2012. **9**: p. 39.
54. Donninelli, G., S. Gessani, and M. Del Corno, *Interplay between HIV-1 and Toll-like receptors in human myeloid cells: friend or foe in HIV-1 pathogenesis?* J Leukoc Biol, 2016. **99**(1): p. 97-105.
55. Hendricks, C.M., et al., *The Interplay of HIV-1 and Macrophages in Viral Persistence*. Front Microbiol, 2021. **12**: p. 646447.
56. Honeycutt, J.B., et al., *HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy*. Nat Med, 2017. **23**(5): p. 638-643.
57. Collins, K.L., et al., *HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 397-401.
58. Schoenberger, S.P., et al., *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions*. Nature, 1998. **393**(6684): p. 480-3.
59. Tomaras, G.D., et al., *Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia*. J Virol, 2008. **82**(24): p. 12449-63.
60. Frost, S.D., et al., *Antibody responses in primary HIV-1 infection*. Curr Opin HIV AIDS, 2008. **3**(1): p. 45-51.
61. Richman, D.D., et al., *Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4144-9.
62. Ding, S., et al., *Piperidine CD4-Mimetic Compounds Expose Vulnerable Env Epitopes Sensitizing HIV-1-Infected Cells to ADCC*. Viruses, 2023. **15**(5).
63. Lane, H.C., et al., *Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome*. N Engl J Med, 1983. **309**(8): p. 453-8.
64. De Milito, A., *B lymphocyte dysfunctions in HIV infection*. Curr HIV Res, 2004. **2**(1): p. 11-21.

65. Burton, D.R., et al., *HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem*. Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 233-6.
66. Julg, B., et al., *Safety and antiviral activity of triple combination broadly neutralizing monoclonal antibody therapy against HIV-1: a phase 1 clinical trial*. Nat Med, 2022. **28**(6): p. 1288-1296.
67. Yang, O.O., et al., *Demographics and natural history of HIV-1-infected spontaneous controllers of viremia*. AIDS, 2017. **31**(8): p. 1091-1098.
68. Jiang, C., et al., *Distinct viral reservoirs in individuals with spontaneous control of HIV-1*. Nature, 2020. **585**(7824): p. 261-267.
69. Li, J., et al., *SAMHD1 expression is associated with low immune activation but not correlated with HIV-1 DNA levels in CD4+ T cells of patients with HIV-1*. Mol Med Rep, 2020. **22**(2): p. 879-885.
70. Morou, A., et al., *Altered differentiation is central to HIV-specific CD4(+) T cell dysfunction in progressive disease*. Nat Immunol, 2019. **20**(8): p. 1059-1070.
71. Betts, M.R., et al., *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4781-9.
72. Gaiha, G.D., et al., *Structural topology defines protective CD8(+) T cell epitopes in the HIV proteome*. Science, 2019. **364**(6439): p. 480-484.
73. International, H.I.V.C.S., et al., *The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation*. Science, 2010. **330**(6010): p. 1551-7.
74. Andrade, A., et al., *CD4+ T cell depletion in an untreated HIV type 1-infected human leukocyte antigen-B\*5801-positive patient with an undetectable viral load*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(8): p. e78-82.
75. Sedaghat, A.R., et al., *T cell dynamics and the response to HAART in a cohort of HIV-1-infected elite suppressors*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(11): p. 1763-6.
76. El-Far, M., et al., *Proinflammatory isoforms of IL-32 as novel and robust biomarkers for control failure in HIV-infected slow progressors*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22902.
77. Chun, T.W., et al., *Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8869-73.
78. Roche, M., et al., *CXCR4-Using HIV Strains Predominate in Naive and Central Memory CD4(+) T Cells in People Living with HIV on Antiretroviral Therapy: Implications for How Latency Is Established and Maintained*. J Virol, 2020. **94**(6).
79. Venanzi Rullo, E., et al., *Genetic Evidence That Naive T Cells Can Contribute Significantly to the Human Immunodeficiency Virus Intact Reservoir: Time to Re-evaluate Their Role*. Clin Infect Dis, 2019. **69**(12): p. 2236-2237.
80. Fletcher, C.V., et al., *Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(6): p. 2307-12.
81. Kim, Y., J.L. Anderson, and S.R. Lewin, *Getting the "Kill" into "Shock and Kill": Strategies to Eliminate Latent HIV*. Cell Host Microbe, 2018. **23**(1): p. 14-26.
82. Darcis, G., B. Van Driessche, and C. Van Lint, *HIV Latency: Should We Shock or Lock?* Trends Immunol, 2017. **38**(3): p. 217-228.
83. Richman, D.D., et al., *The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial*. N Engl J Med, 1987. **317**(4): p. 192-7.

84. Hammer, S.M., et al., *A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team.* N Engl J Med, 1996. **335**(15): p. 1081-90.
85. De Clercq, E., *The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection.* Antiviral Res, 1998. **38**(3): p. 153-79.
86. Dorr, P., et al., *Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity.* Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(11): p. 4721-32.
87. Thompson, M., et al., *Safety and efficacy of the HIV-1 attachment inhibitor prodrug fostemsavir in antiretroviral-experienced subjects: week 48 analysis of AI438011, a Phase IIb, randomized controlled trial.* Antivir Ther, 2017. **22**(3): p. 215-223.
88. Lv, Z., Y. Chu, and Y. Wang, *HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity.* HIV AIDS (Auckl), 2015. **7**: p. 95-104.
89. Pendri, A., et al., *New first and second generation inhibitors of human immunodeficiency virus-1 integrase.* Expert Opin Ther Pat, 2011. **21**(8): p. 1173-89.
90. Link, J.O., et al., *Clinical targeting of HIV capsid protein with a long-acting small molecule.* Nature, 2020. **584**(7822): p. 614-618.
91. Bester, S.M., et al., *Structural and mechanistic bases for a potent HIV-1 capsid inhibitor.* Science, 2020. **370**(6514): p. 360-364.
92. Baggaley, R., et al., *Young key populations and HIV: a special emphasis and consideration in the new WHO Consolidated Guidelines on HIV Prevention, Diagnosis, Treatment and Care for Key Populations.* J Int AIDS Soc, 2015. **18**(2 Suppl 1): p. 19438.
93. Patterson, K.B., et al., *Penetration of tenofovir and emtricitabine in mucosal tissues: implications for prevention of HIV-1 transmission.* Sci Transl Med, 2011. **3**(112): p. 112re4.
94. Roux, P., et al., *Is on-Demand HIV Pre-exposure Prophylaxis a Suitable Tool for Men Who Have Sex With Men Who Practice Chemsex? Results From a Substudy of the ANRS-IPERGAY Trial.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2018. **79**(2): p. e69-e75.
95. Mehandru, S., et al., *Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract.* J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 761-70.
96. Aujla, S.J., P.J. Dubin, and J.K. Kolls, *Th17 cells and mucosal host defense.* Semin Immunol, 2007. **19**(6): p. 377-82.
97. Maek, A.N.W., et al., *Increased interleukin-17 production both in helper T cell subset Th17 and CD4-negative T cells in human immunodeficiency virus infection.* Viral Immunol, 2007. **20**(1): p. 66-75.
98. El Hed, A., et al., *Susceptibility of human Th17 cells to human immunodeficiency virus and their perturbation during infection.* J Infect Dis, 2010. **201**(6): p. 843-54.
99. Ancuta, P., et al., *Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients.* PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2516.
100. Sandler, N.G. and D.C. Douek, *Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities.* Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(9): p. 655-66.
101. Chege, D., et al., *Sigmoid Th17 populations, the HIV latent reservoir, and microbial translocation in men on long-term antiretroviral therapy.* AIDS, 2011. **25**(6): p. 741-9.

102. Villar-Garcia, J., et al., *Effect of probiotics (Saccharomyces boulardii) on microbial translocation and inflammation in HIV-treated patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2015. **68**(3): p. 256-63.
103. Gori, A., et al., *Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naive HIV-infected adults: results of the "COPA" pilot randomized trial.* Mucosal Immunol, 2011. **4**(5): p. 554-63.
104. d'Ettorre, G., et al., *Probiotics Reduce Inflammation in Antiretroviral Treated, HIV-Infected Individuals: Results of the "Probio-HIV" Clinical Trial.* PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0137200.
105. Wong, J.M., et al., *Colonic health: fermentation and short chain fatty acids.* J Clin Gastroenterol, 2006. **40**(3): p. 235-43.
106. Dillon, S.M., et al., *An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia.* Mucosal Immunol, 2014. **7**(4): p. 983-94.
107. Jie, Z., et al., *The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease.* Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 845.
108. Karlsson, F.H., et al., *Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome.* Nat Commun, 2012. **3**: p. 1245.
109. Turner, M.D., et al., *Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(11): p. 2563-2582.
110. Akdis, M., et al., *Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: Receptors, functions, and roles in diseases.* J Allergy Clin Immunol, 2016. **138**(4): p. 984-1010.
111. Aggarwal, B.B., S.C. Gupta, and J.H. Kim, *Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey.* Blood, 2012. **119**(3): p. 651-65.
112. Kumar, A., W. Abbas, and G. Herbein, *TNF and TNF receptor superfamily members in HIV infection: new cellular targets for therapy?* Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 484378.
113. Thorne, S.A., et al., *Modified low density lipoprotein and cytokines mediate monocyte adhesion to smooth muscle cells.* Atherosclerosis, 1996. **127**(2): p. 167-76.
114. Warne, J.P., *Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass.* J Endocrinol, 2003. **177**(3): p. 351-5.
115. Aker, S., et al., *Influence of interleukin-6 G-174C gene polymorphism on coronary artery disease, cardiovascular complications and mortality in dialysis patients.* Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(9): p. 2847-51.
116. Jones, S.A., *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6.* J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3463-8.
117. Aoyagi, T. and T. Matsui, *The Cardiomyocyte as a Source of Cytokines in Cardiac Injury.* J Cell Sci Ther, 2011. **2012**(S5).
118. Tosato, G. and K.D. Jones, *Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes.* Blood, 1990. **75**(6): p. 1305-10.
119. Held, C., et al., *Inflammatory Biomarkers Interleukin-6 and C-Reactive Protein and Outcomes in Stable Coronary Heart Disease: Experiences From the STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy) Trial.* J Am Heart Assoc, 2017. **6**(10).

120. Tyrrell, D.J., et al., *Age-Associated Mitochondrial Dysfunction Accelerates Atherogenesis*. *Circ Res*, 2020. **126**(3): p. 298-314.
121. Neuhaus, J., et al., *Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection*. *J Infect Dis*, 2010. **201**(12): p. 1788-95.
122. Armah, K.A., et al., *HIV status, burden of comorbid disease, and biomarkers of inflammation, altered coagulation, and monocyte activation*. *Clin Infect Dis*, 2012. **55**(1): p. 126-36.
123. Sims, J.E. and D.E. Smith, *The IL-1 family: regulators of immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(2): p. 89-102.
124. Dinarello, C.A., *The biology of interleukin-1*. *Chem Immunol*, 1992. **51**: p. 1-32.
125. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 519-50.
126. Lembas, A., et al., *VCAM-1 as a Biomarker of Endothelial Function among HIV-Infected Patients Receiving and Not Receiving Antiretroviral Therapy*. *Viruses*, 2022. **14**(3).
127. Galea, J., et al., *Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(8): p. 1000-6.
128. Yaseen, M.M., N.M. Abuharfeil, and H. Darmani, *The role of IL-1beta during human immunodeficiency virus type 1 infection*. *Rev Med Virol*, 2023. **33**(1): p. e2400.
129. Voloshyna, I., M.J. Littlefield, and A.B. Reiss, *Atherosclerosis and interferon-gamma: new insights and therapeutic targets*. *Trends Cardiovasc Med*, 2014. **24**(1): p. 45-51.
130. Ketelhuth, D.F. and G.K. Hansson, *Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: break of tolerance in the artery wall*. *Thromb Haemost*, 2011. **106**(5): p. 779-86.
131. Golia, E., et al., *Inflammation and cardiovascular disease: from pathogenesis to therapeutic target*. *Curr Atheroscler Rep*, 2014. **16**(9): p. 435.
132. Grewal, T., et al., *Identification of a gamma-interferon-responsive element in the promoter of the human macrophage scavenger receptor A gene*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(5): p. 825-31.
133. Reiss, A.B., et al., *Interferon-gamma impedes reverse cholesterol transport and promotes foam cell transformation in THP-1 human monocytes/macrophages*. *Med Sci Monit*, 2004. **10**(11): p. BR420-5.
134. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. *Nature*, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
135. Frostegard, J., et al., *Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines*. *Atherosclerosis*, 1999. **145**(1): p. 33-43.
136. Ammirati, E., et al., *The role of T and B cells in human atherosclerosis and atherothrombosis*. *Clin Exp Immunol*, 2015. **179**(2): p. 173-87.
137. Sikorski, K., et al., *STAT1-mediated signal integration between IFNgamma and LPS leads to increased EC and SMC activation and monocyte adhesion*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011. **300**(6): p. C1337-44.
138. Sikorski, K., et al., *STAT1 as a central mediator of IFNgamma and TLR4 signal integration in vascular dysfunction*. *JAKSTAT*, 2012. **1**(4): p. 241-9.
139. Franceschi, C., et al., *Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **908**: p. 244-54.
140. Liu, D., et al., *Inflammageing in the cardiovascular system: mechanisms, emerging targets, and novel therapeutic strategies*. *Clin Sci (Lond)*, 2020. **134**(17): p. 2243-2262.



141. Ferrucci, L. and E. Fabbri, *Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty*. Nat Rev Cardiol, 2018. **15**(9): p. 505-522.
142. Calder, P.C., et al., *Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition*. Ageing Res Rev, 2017. **40**: p. 95-119.
143. Bruunsgaard, H., et al., *Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians*. Am J Med, 2003. **115**(4): p. 278-83.
144. Bruunsgaard, H., et al., *Predicting death from tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in 80-year-old people*. Clin Exp Immunol, 2003. **132**(1): p. 24-31.
145. Harris, T.B., et al., *Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly*. Am J Med, 1999. **106**(5): p. 506-12.
146. Furman, D., et al., *Expression of specific inflammasome gene modules stratifies older individuals into two extreme clinical and immunological states*. Nat Med, 2017. **23**(2): p. 174-184.
147. Triant, V.A., J.B. Meigs, and S.K. Grinspoon, *Association of C-reactive protein and HIV infection with acute myocardial infarction*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2009. **51**(3): p. 268-73.
148. Robbins, H.A., et al., *Excess cancers among HIV-infected people in the United States*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(4).
149. Erlandson, K.M., et al., *Association of functional impairment with inflammation and immune activation in HIV type 1-infected adults receiving effective antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2013. **208**(2): p. 249-59.
150. Betene, A.D.C., et al., *Interleukin-6, high sensitivity C-reactive protein, and the development of type 2 diabetes among HIV-positive patients taking antiretroviral therapy*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2014. **67**(5): p. 538-46.
151. Morrisette-Thomas, V., et al., *Inflamm-aging does not simply reflect increases in pro-inflammatory markers*. Mech Ageing Dev, 2014. **139**: p. 49-57.
152. Bodnar, A.G., et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. Science, 1998. **279**(5349): p. 349-52.
153. Blackburn, E.H., E.S. Epel, and J. Lin, *Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection*. Science, 2015. **350**(6265): p. 1193-8.
154. Lin, Y., et al., *Age-associated telomere attrition of lymphocytes in vivo is co-ordinated with changes in telomerase activity, composition of lymphocyte subsets and health conditions*. Clin Sci (Lond), 2015. **128**(6): p. 367-77.
155. Bitto, A., et al., *Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes*. Exp Cell Res, 2010. **316**(17): p. 2961-8.
156. Lee, S., C.A. Schmitt, and M. Reimann, *The Myc/macrophage tango: oncogene-induced senescence, Myc style*. Semin Cancer Biol, 2011. **21**(6): p. 377-84.
157. Rodier, F. and J. Campisi, *Four faces of cellular senescence*. J Cell Biol, 2011. **192**(4): p. 547-56.
158. Lee, S.A., et al., *Impact of HIV on CD8+ T cell CD57 expression is distinct from that of CMV and aging*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89444.
159. Kestens, L., et al., *Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection*. Clin Exp Immunol, 1994. **95**(3): p. 436-41.
160. Stahl, E.C. and B.N. Brown, *Cell Therapy Strategies to Combat Immunosenescence*. Organogenesis, 2015. **11**(4): p. 159-72.

161. Barbe-Tuana, F., et al., *The interplay between immunosenescence and age-related diseases*. Semin Immunopathol, 2020. **42**(5): p. 545-557.
162. Leon, M.L. and S.H. Zuckerman, *Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis*. Inflamm Res, 2005. **54**(10): p. 395-411.
163. Johnson, J.L., *Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2007. **5**(2): p. 265-82.
164. Greisen, S.R., M. Aspari, and B. Deleuran, *Co-Inhibitory Molecules - Their Role in Health and Autoimmunity; Highlighted by Immune Related Adverse Events*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 883733.
165. Attanasio, J. and E.J. Wherry, *Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 1052-68.
166. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 492-9.
167. Marcus, J.L., et al., *Comparison of Overall and Comorbidity-Free Life Expectancy Between Insured Adults With and Without HIV Infection, 2000-2016*. JAMA Netw Open, 2020. **3**(6): p. e207954.
168. CDC, *Estimated HIV incidence and prevalence in the United States 2017–2021*. HIV Surveillance Supplemental Report 2023, 2023. **28**(3).
169. Smit, M., et al., *Future challenges for clinical care of an ageing population infected with HIV: a modelling study*. Lancet Infect Dis, 2015. **15**(7): p. 810-8.
170. Freiberg, M.S., et al., *HIV infection and the risk of acute myocardial infarction*. JAMA Intern Med, 2013. **173**(8): p. 614-22.
171. Sico, J.J., et al., *HIV status and the risk of ischemic stroke among men*. Neurology, 2015. **84**(19): p. 1933-40.
172. Rasmussen, L.D., et al., *Risk of cerebrovascular events in persons with and without HIV: a Danish nationwide population-based cohort study*. AIDS, 2011. **25**(13): p. 1637-46.
173. Butt, A.A., et al., *Risk of heart failure with human immunodeficiency virus in the absence of prior diagnosis of coronary heart disease*. Arch Intern Med, 2011. **171**(8): p. 737-43.
174. Al-Kindi, S.G., et al., *Heart failure in patients with human immunodeficiency virus infection: Epidemiology and management disparities*. Int J Cardiol, 2016. **218**: p. 43-46.
175. Pinto, D.S.M. and M. da Silva, *Cardiovascular Disease in the Setting of Human Immunodeficiency Virus Infection*. Curr Cardiol Rev, 2018. **14**(1): p. 25-41.
176. Triant, V.A., et al., *Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(7): p. 2506-12.
177. Currier, J.S., et al., *Coronary heart disease in HIV-infected individuals*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2003. **33**(4): p. 506-12.
178. Durand, M., et al., *Association between HIV infection, antiretroviral therapy, and risk of acute myocardial infarction: a cohort and nested case-control study using Quebec's public health insurance database*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2011. **57**(3): p. 245-53.
179. Skalen, K., et al., *Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis*. Nature, 2002. **417**(6890): p. 750-4.
180. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
181. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
182. Geer, J.C., G.H. Mc, Jr., and J.P. Strong, *The fine structure of human atherosclerotic lesions*. Am J Pathol, 1961. **38**(3): p. 263-87.

183. Alencar, G.F., et al., *Stem Cell Pluripotency Genes Klf4 and Oct4 Regulate Complex SMC Phenotypic Changes Critical in Late-Stage Atherosclerotic Lesion Pathogenesis*. *Circulation*, 2020. **142**(21): p. 2045-2059.
184. Pan, H., et al., *Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human*. *Circulation*, 2020. **142**(21): p. 2060-2075.
185. Gistera, A. and G.K. Hansson, *The immunology of atherosclerosis*. *Nat Rev Nephrol*, 2017. **13**(6): p. 368-380.
186. Zougari, Y., et al., *B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction*. *Nat Med*, 2013. **19**(10): p. 1273-80.
187. Galis, Z.S., et al., *Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(2): p. 402-6.
188. Libby, P., *Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2001. **104**(3): p. 365-72.
189. Drechsler, M., et al., *Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis*. *Circulation*, 2010. **122**(18): p. 1837-45.
190. Park, I., et al., *Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury*. *Eur Respir J*, 2019. **53**(3).
191. Sreejit, G., et al., *Neutrophils in cardiovascular disease: warmongers, peacemakers, or both?* *Cardiovasc Res*, 2022. **118**(12): p. 2596-2609.
192. Chapman, E.A., et al., *Caught in a Trap? Proteomic Analysis of Neutrophil Extracellular Traps in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 423.
193. Petretto, A., et al., *Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis*. *PLoS One*, 2019. **14**(7): p. e0218946.
194. Castanheira, F.V.S. and P. Kuberski, *Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation*. *Blood*, 2019. **133**(20): p. 2178-2185.
195. Fuchs, T.A., A. Brill, and D.D. Wagner, *Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(8): p. 1777-83.
196. Doring, Y., P. Libby, and O. Soehnlein, *Neutrophil Extracellular Traps Participate in Cardiovascular Diseases: Recent Experimental and Clinical Insights*. *Circ Res*, 2020. **126**(9): p. 1228-1241.
197. Gould, T.J., et al., *Extracellular Histones Increase Tissue Factor Activity and Enhance Thrombin Generation by Human Blood Monocytes*. *Shock*, 2016. **46**(6): p. 655-662.
198. Folco, E.J., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Induce Endothelial Cell Activation and Tissue Factor Production Through Interleukin-1 $\alpha$  and Cathepsin G*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. **38**(8): p. 1901-1912.
199. Jonasson, L., et al., *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque*. *Arteriosclerosis*, 1986. **6**(2): p. 131-8.
200. Mallat, Z., et al., *The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis*. *J Lipid Res*, 2009. **50** Suppl(Suppl): p. S364-9.
201. Kyaw, T., et al., *Cytotoxic and proinflammatory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes promote development of vulnerable atherosclerotic plaques in apoE-deficient mice*. *Circulation*, 2013. **127**(9): p. 1028-39.
202. Stemme, S., J. Holm, and G.K. Hansson, *T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1*. *Arterioscler Thromb*, 1992. **12**(2): p. 206-11.

203. Panigrahi, S., et al., *CX3CL1 and IL-15 Promote CD8 T cell chemoattraction in HIV and in atherosclerosis*. PLoS Pathog, 2020. **16**(9): p. e1008885.
204. Cochain, C., et al., *CD8+ T Cells Regulate Monopoiesis and Circulating Ly6C-high Monocyte Levels in Atherosclerosis in Mice*. Circ Res, 2015. **117**(3): p. 244-53.
205. Ivanov, A.V., et al., *Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 8910396.
206. Porter, K.M. and R.L. Sutliff, *HIV-1, reactive oxygen species, and vascular complications*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(1): p. 143-59.
207. Forouzanfar, M.H., et al., *Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015*. JAMA, 2017. **317**(2): p. 165-182.
208. Hypertension, E.E.T.F.f.t.M.o.A., *2013 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC): ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension*. J Hypertens, 2013. **31**(10): p. 1925-38.
209. Brunstrom, M. and B. Carlberg, *Association of Blood Pressure Lowering With Mortality and Cardiovascular Disease Across Blood Pressure Levels: A Systematic Review and Meta-analysis*. JAMA Intern Med, 2018. **178**(1): p. 28-36.
210. Rodriguez-Arboli, E., et al., *Incidence and risk factors for hypertension among HIV patients in rural Tanzania - A prospective cohort study*. PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0172089.
211. Mordi, I., et al., *Endothelial dysfunction in human essential hypertension*. J Hypertens, 2016. **34**(8): p. 1464-72.
212. Prospective Studies, C., et al., *Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths*. Lancet, 2007. **370**(9602): p. 1829-39.
213. Koethe, J.R., *Adipose Tissue in HIV Infection*. Compr Physiol, 2017. **7**(4): p. 1339-1357.
214. Zidar, D.A., et al., *Oxidized LDL Levels Are Increased in HIV Infection and May Drive Monocyte Activation*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2015. **69**(2): p. 154-60.
215. Doll, R., et al., *Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors*. BMJ, 1994. **309**(6959): p. 901-11.
216. Willett, W.C., et al., *Relative and absolute excess risks of coronary heart disease among women who smoke cigarettes*. N Engl J Med, 1987. **317**(21): p. 1303-9.
217. Tesoriero, J.M., et al., *Smoking among HIV positive New Yorkers: prevalence, frequency, and opportunities for cessation*. AIDS Behav, 2010. **14**(4): p. 824-35.
218. Gritz, E.R., et al., *Smoking behavior in a low-income multiethnic HIV/AIDS population*. Nicotine Tob Res, 2004. **6**(1): p. 71-7.
219. Clifford, G.M., et al., *Lung cancer in the Swiss HIV Cohort Study: role of smoking, immunodeficiency and pulmonary infection*. Br J Cancer, 2012. **106**(3): p. 447-52.
220. Crothers, K., et al., *The impact of cigarette smoking on mortality, quality of life, and comorbid illness among HIV-positive veterans*. J Gen Intern Med, 2005. **20**(12): p. 1142-5.
221. Triant, V.A., *HIV infection and coronary heart disease: an intersection of epidemics*. J Infect Dis, 2012. **205** Suppl 3(Suppl 3): p. S355-61.
222. Mandviwala, T., U. Khalid, and A. Deswal, *Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker?* Curr Atheroscler Rep, 2016. **18**(5): p. 21.

223. Mauro, C., et al., *Obesity-Induced Metabolic Stress Leads to Biased Effector Memory CD4(+) T Cell Differentiation via PI3K p110delta-Akt-Mediated Signals*. *Cell Metab*, 2017. **25**(3): p. 593-609.
224. Vandanmagsar, B., et al., *The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance*. *Nat Med*, 2011. **17**(2): p. 179-88.
225. Tedgui, A. and Z. Mallat, *Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(2): p. 515-81.
226. Palella, F.J., Jr., et al., *Anatomic Fat Depots and Coronary Plaque Among Human Immunodeficiency Virus-Infected and Uninfected Men in the Multicenter AIDS Cohort Study*. *Open Forum Infect Dis*, 2016. **3**(2): p. ofw098.
227. Lake, J.E., et al., *Associations between subcutaneous fat density and systemic inflammation differ by HIV serostatus and are independent of fat quantity*. *Eur J Endocrinol*, 2019. **181**(4): p. 451-459.
228. Grundy, S.M., et al., *Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association*. *Circulation*, 1999. **100**(10): p. 1134-46.
229. Rawshani, A., et al., *Risk Factors, Mortality, and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes*. *N Engl J Med*, 2018. **379**(7): p. 633-644.
230. International Hypoglycaemia Study, G., *Hypoglycaemia, cardiovascular disease, and mortality in diabetes: epidemiology, pathogenesis, and management*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019. **7**(5): p. 385-396.
231. Pepin, M.E., et al., *Antiretroviral therapy potentiates high-fat diet induced obesity and glucose intolerance*. *Mol Metab*, 2018. **12**: p. 48-61.
232. Hernandez-Romieu, A.C., et al., *Is diabetes prevalence higher among HIV-infected individuals compared with the general population? Evidence from MMP and NHANES 2009-2010*. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2017. **5**(1): p. e000304.
233. Briasoulis, A. and G.L. Bakris, *Chronic kidney disease as a coronary artery disease risk equivalent*. *Curr Cardiol Rep*, 2013. **15**(3): p. 340.
234. Perk, J., et al., *European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012) : the fifth joint task force of the European society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts)*. *Int J Behav Med*, 2012. **19**(4): p. 403-88.
235. Fabian, J. and S. Naicker, *HIV and kidney disease in sub-Saharan Africa*. *Nat Rev Nephrol*, 2009. **5**(10): p. 591-8.
236. Choi, A.I., et al., *Association between kidney function and albuminuria with cardiovascular events in HIV-infected persons*. *Circulation*, 2010. **121**(5): p. 651-8.
237. Jotwani, V., et al., *Reduced kidney function and preclinical atherosclerosis in HIV-infected individuals: the study of fat redistribution and metabolic change in HIV infection (FRAM)*. *Am J Nephrol*, 2011. **33**(5): p. 453-60.
238. Brinkman, K., et al., *Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy*. *Lancet*, 1999. **354**(9184): p. 1112-5.
239. Eastone, J.A. and C.F. Decker, *New-onset diabetes mellitus associated with use of protease inhibitor*. *Ann Intern Med*, 1997. **127**(10): p. 948.
240. Visnegarwala, F., K.L. Krause, and D.M. Musher, *Severe diabetes associated with protease inhibitor therapy*. *Ann Intern Med*, 1997. **127**(10): p. 947.

241. Walli, R., et al., *Treatment with protease inhibitors associated with peripheral insulin resistance and impaired oral glucose tolerance in HIV-1-infected patients*. AIDS, 1998. **12**(15): p. F167-73.
242. Behrens, G., et al., *Impaired glucose tolerance, beta cell function and lipid metabolism in HIV patients under treatment with protease inhibitors*. AIDS, 1999. **13**(10): p. F63-70.
243. Carr, A., et al., *Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance*. Lancet, 1998. **351**(9119): p. 1881-3.
244. Polo, R., et al., *Lipoatrophy, fat accumulation, and mixed syndrome in protease inhibitor-naive HIV-infected patients*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2000. **25**(3): p. 284-6.
245. Saint-Marc, T., et al., *Fat distribution evaluated by computed tomography and metabolic abnormalities in patients undergoing antiretroviral therapy: preliminary results of the LIPOCO study*. AIDS, 2000. **14**(1): p. 37-49.
246. Boccara, F., et al., *HIV and coronary heart disease: time for a better understanding*. J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(5): p. 511-23.
247. Degenhardt, L., et al., *Global prevalence of injecting drug use and sociodemographic characteristics and prevalence of HIV, HBV, and HCV in people who inject drugs: a multistage systematic review*. Lancet Glob Health, 2017. **5**(12): p. e1192-e1207.
248. Phillips, K.T. and M.D. Stein, *Risk practices associated with bacterial infections among injection drug users in Denver, Colorado*. Am J Drug Alcohol Abuse, 2010. **36**(2): p. 92-7.
249. Smith, M.E., et al., *High rates of abscesses and chronic wounds in community-recruited injection drug users and associated risk factors*. J Addict Med, 2015. **9**(2): p. 87-93.
250. Salter, M.L., et al., *Correlates of elevated interleukin-6 and C-reactive protein in persons with or at high risk for HCV and HIV infections*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2013. **64**(5): p. 488-95.
251. Williams, D.W., et al., *Monocyte maturation, HIV susceptibility, and transmigration across the blood brain barrier are critical in HIV neuropathogenesis*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(3): p. 401-15.
252. Gega, A., et al., *Deep sequencing of HIV-1 variants from paired plasma and cerebrospinal fluid during primary HIV infection*. J Virus Erad, 2015. **1**(4): p. 264-268.
253. Grant, I., et al., *Evidence for early central nervous system involvement in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and other human immunodeficiency virus (HIV) infections. Studies with neuropsychologic testing and magnetic resonance imaging*. Ann Intern Med, 1987. **107**(6): p. 828-36.
254. Maschke, M., et al., *Incidence and prevalence of neurological disorders associated with HIV since the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART)*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2000. **69**(3): p. 376-80.
255. Valcour, V.G., et al., *Cognitive impairment in older HIV-1-seropositive individuals: prevalence and potential mechanisms*. AIDS, 2004. **18 Suppl 1**(Suppl 1): p. S79-86.
256. Bergonzini, V., et al., *Nef and cell signaling transduction: a possible involvement in the pathogenesis of human immunodeficiency virus-associated dementia*. J Neurovirol, 2009. **15**(3): p. 238-48.
257. Dunfee, R.L., et al., *Loss of the N-linked glycosylation site at position 386 in the HIV envelope V4 region enhances macrophage tropism and is associated with dementia*. Virology, 2007. **367**(1): p. 222-34.

258. Kim, H.J., K.A. Martemyanov, and S.A. Thayer, *Human immunodeficiency virus protein Tat induces synapse loss via a reversible process that is distinct from cell death*. J Neurosci, 2008. **28**(48): p. 12604-13.
259. Thomas, E.R., et al., *High frequency of defective vpu compared with tat and rev genes in brain from patients with HIV type 1-associated dementia*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2007. **23**(4): p. 575-80.
260. De Francesco, D., et al., *Cognitive function and drivers of cognitive impairment in a European and a Korean cohort of people living with HIV*. Int J STD AIDS, 2020. **31**(1): p. 30-37.
261. Yoshioka, M., et al., *Role of immune activation and cytokine expression in HIV-1-associated neurologic diseases*. Adv Neuroimmunol, 1995. **5**(3): p. 335-58.
262. Griffin, D.E., *Cytokines in the brain during viral infection: clues to HIV-associated dementia*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 2948-51.
263. Do, A.N., et al., *Excess burden of depression among HIV-infected persons receiving medical care in the united states: data from the medical monitoring project and the behavioral risk factor surveillance system*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e92842.
264. Grov, C., et al., *Loneliness and HIV-related stigma explain depression among older HIV-positive adults*. AIDS Care, 2010. **22**(5): p. 630-9.
265. Nanni, M.G., et al., *Depression in HIV infected patients: a review*. Curr Psychiatry Rep, 2015. **17**(1): p. 530.
266. Park, L.S., et al., *Time trends in cancer incidence in persons living with HIV/AIDS in the antiretroviral therapy era: 1997-2012*. AIDS, 2016. **30**(11): p. 1795-806.
267. Hernandez-Ramirez, R.U., et al., *Cancer risk in HIV-infected people in the USA from 1996 to 2012: a population-based, registry-linkage study*. Lancet HIV, 2017. **4**(11): p. e495-e504.
268. Yarchoan, R. and T.S. Uldrick, *HIV-Associated Cancers and Related Diseases*. N Engl J Med, 2018. **378**(11): p. 1029-1041.
269. Dubrow, R., et al., *Association of CD4+ T-cell Count, HIV-1 RNA Viral Load, and Antiretroviral Therapy With Kaposi Sarcoma Risk Among HIV-infected Persons in the United States and Canada*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2017. **75**(4): p. 382-390.
270. Guiguet, M., et al., *Effect of immunodeficiency, HIV viral load, and antiretroviral therapy on the risk of individual malignancies (FHDH-ANRS CO4): a prospective cohort study*. Lancet Oncol, 2009. **10**(12): p. 1152-9.
271. Berretta, M., et al., *New treatment strategies for HIV-positive cancer patients undergoing antineoplastic chemotherapy*. Expert Opin Pharmacother, 2016. **17**(18): p. 2391-2403.
272. Dahl, C.A., et al., *Identification of a novel gene expressed in activated natural killer cells and T cells*. J Immunol, 1992. **148**(2): p. 597-603.
273. Ruoslahti, E. and M.D. Pierschbacher, *Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal*. Cell, 1986. **44**(4): p. 517-8.
274. Kim, S.H., et al., *Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha*. Immunity, 2005. **22**(1): p. 131-42.
275. Dinarello, C.A. and S.H. Kim, *IL-32, a novel cytokine with a possible role in disease*. Ann Rheum Dis, 2006. **65 Suppl 3**(Suppl 3): p. iii61-4.
276. Heinhuis, B., et al., *Interleukin 32 (IL-32) contains a typical alpha-helix bundle structure that resembles focal adhesion targeting region of focal adhesion kinase-1*. J Biol Chem, 2012. **287**(8): p. 5733-43.

277. Choi, K.Y., S. Napper, and N. Mookherjee, *Human cathelicidin LL-37 and its derivative IG-19 regulate interleukin-32-induced inflammation*. Immunology, 2014. **143**(1): p. 68-80.
278. Nam, S.Y., et al., *Inhibition of IL-32 signaling by bamboo salt decreases pro-inflammatory responses in cellular models of allergic rhinitis*. J Med Food, 2014. **17**(9): p. 939-48.
279. Wong, C.K., J. Dong, and C.W. Lam, *Molecular mechanisms regulating the synergism between IL-32gamma and NOD for the activation of eosinophils*. J Leukoc Biol, 2014. **95**(4): p. 631-42.
280. Nold-Petry, C.A., et al., *IL-32-dependent effects of IL-1beta on endothelial cell functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3883-8.
281. Kobayashi, H., et al., *Interleukin-32beta propagates vascular inflammation and exacerbates sepsis in a mouse model*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9458.
282. Kang, J.W., et al., *A proinflammatory cytokine interleukin-32beta promotes the production of an anti-inflammatory cytokine interleukin-10*. Immunology, 2009. **128**(1 Suppl): p. e532-40.
283. Kang, J.W., et al., *Interleukin-32delta interacts with IL-32beta and inhibits IL-32beta-mediated IL-10 production*. FEBS Lett, 2013.
284. Kim, M.S., et al., *IL-32theta gene expression in acute myeloid leukemia suppresses TNF-alpha production*. Oncotarget, 2015. **6**(38): p. 40747-61.
285. Shim, S., et al., *Comparison of the Seven Interleukin-32 Isoforms' Biological Activities: IL-32theta Possesses the Most Dominant Biological Activity*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 837588.
286. Kobayashi, H. and P.C. Lin, *Molecular characterization of IL-32 in human endothelial cells*. Cytokine, 2009. **46**(3): p. 351-8.
287. Shoda, H., et al., *Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(6): p. R166.
288. Jeong, H.J., et al., *IL-32 up-regulation is associated with inflammatory cytokine production in allergic rhinitis*. J Pathol, 2011. **224**(4): p. 553-63.
289. Moschen, A.R., et al., *Interleukin-32: a new proinflammatory cytokine involved in hepatitis C virus-related liver inflammation and fibrosis*. Hepatology, 2011. **53**(6): p. 1819-29.
290. Mun, S.H., et al., *Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-32 is positively regulated via the Syk/protein kinase Cdelta/JNK pathway in rheumatoid synovial fibroblasts*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(3): p. 678-85.
291. Li, W., et al., *Negative feedback regulation of IL-32 production by iNOS activation in response to dsRNA or influenza virus infection*. Eur J Immunol, 2009. **39**(4): p. 1019-24.
292. Li, W., et al., *Activation of interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response to influenza A virus infection*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1985.
293. Ota, K., et al., *Synthetic double-stranded RNA induces interleukin-32 in bronchial epithelial cells*. Exp Lung Res, 2015. **41**(6): p. 335-43.
294. Peng, T., et al., *An effector phenotype of CD8+ T cells at the junction epithelium during clinical quiescence of herpes simplex virus 2 infection*. J Virol, 2012. **86**(19): p. 10587-96.
295. Rasool, S.T., et al., *Increased level of IL-32 during human immunodeficiency virus infection suppresses HIV replication*. Immunol Lett, 2008. **117**(2): p. 161-7.



296. Smith, A.J., et al., *The immunosuppressive role of IL-32 in lymphatic tissue during HIV-1 infection*. J Immunol, 2011. **186**(11): p. 6576-84.
297. Zaidan, S.M., et al., *Upregulation of IL-32 Isoforms in Virologically Suppressed HIV-Infected Individuals: Potential Role in Persistent Inflammation and Transcription From Stable HIV-1 Reservoirs*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2019. **82**(5): p. 503-513.
298. Palstra, R.J., et al., *Allele-specific long-distance regulation dictates IL-32 isoform switching and mediates susceptibility to HIV-1*. Sci Adv, 2018. **4**(2): p. e1701729.
299. Nold, M.F., et al., *Endogenous IL-32 controls cytokine and HIV-1 production*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 557-65.
300. Li, W., et al., *IL-32: a host proinflammatory factor against influenza viral replication is upregulated by aberrant epigenetic modifications during influenza A virus infection*. J Immunol, 2010. **185**(9): p. 5056-65.
301. Zepp, J.A., et al., *Protection from RNA and DNA viruses by IL-32*. J Immunol, 2011. **186**(7): p. 4110-8.
302. Netea, M.G., et al., *Mycobacterium tuberculosis induces interleukin-32 production through a caspase-1/IL-18/interferon-gamma-dependent mechanism*. PLoS Med, 2006. **3**(8): p. e277.
303. Bai, X., et al., *IL-32 is a host protective cytokine against Mycobacterium tuberculosis in differentiated THP-1 human macrophages*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3830-40.
304. Montoya, D., et al., *IL-32 is a molecular marker of a host defense network in human tuberculosis*. Sci Transl Med, 2014. **6**(250): p. 250ra114.
305. Bai, X., et al., *Human IL-32 expression protects mice against a hypervirulent strain of Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(16): p. 5111-6.
306. Netea, M.G., et al., *IL-32 synergizes with nucleotide oligomerization domain (NOD) 1 and NOD2 ligands for IL-1beta and IL-6 production through a caspase 1-dependent mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(45): p. 16309-14.
307. Barksby, H.E., et al., *Differential expression of immunoregulatory genes in monocytes in response to Porphyromonas gingivalis and Escherichia coli lipopolysaccharide*. Clin Exp Immunol, 2009. **156**(3): p. 479-87.
308. El-Far, M., et al., *Upregulated IL-32 Expression And Reduced Gut Short Chain Fatty Acid Caproic Acid in People Living With HIV With Subclinical Atherosclerosis*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 664371.
309. Christgen, S., D.E. Place, and T.D. Kanneganti, *Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation*. Cell Res, 2020. **30**(4): p. 315-327.
310. Zhou, W., et al., *NLRP3: A Novel Mediator in Cardiovascular Disease*. J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 5702103.
311. El-Far, M., et al., *Brief Report: Subclinical Carotid Artery Atherosclerosis Is Associated With Increased Expression of Peripheral Blood IL-32 Isoforms Among Women Living With HIV*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2021. **88**(2): p. 186-191.
312. Heinhuis, B., et al., *Towards a role of interleukin-32 in atherosclerosis*. Cytokine, 2013. **64**(1): p. 433-40.
313. Jin, S., et al., *Effects of IL-32 polymorphisms and IL-32 levels on the susceptibility and severity of coronary artery disease*. J Clin Lab Anal, 2022. **36**(1): p. e24114.
314. Xuan, W., et al., *Elevated circulating IL-32 presents a poor prognostic outcome in patients with heart failure after myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2017. **243**: p. 367-373.

315. Shioya, M., et al., *Epithelial overexpression of interleukin-32alpha in inflammatory bowel disease*. Clin Exp Immunol, 2007. **149**(3): p. 480-6.
316. Andoh, A., et al., *Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(33): p. 5154-61.
317. Hasegawa, H., et al., *Native IL-32 is released from intestinal epithelial cells via a non-classical secretory pathway as a membrane-associated protein*. Cytokine, 2011. **53**(1): p. 74-83.
318. Moreira Gabriel, E., et al., *Overt IL-32 isoform expression at intestinal level during HIV-1 infection is negatively regulated by IL-17A*. AIDS, 2021. **35**(12): p. 1881-1894.
319. Miller, T.L. and M.J. Wolin, *Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(5): p. 1589-92.
320. Cummings, J.H. and G.T. Macfarlane, *The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon*. J Appl Bacteriol, 1991. **70**(6): p. 443-59.
321. Tazoe, H., et al., *Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions*. J Physiol Pharmacol, 2008. **59 Suppl 2**: p. 251-62.
322. Purohit, A., et al., *Gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2022. **191**(1): p. 187-206.
323. Qin, N., et al., *Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis*. Nature, 2014. **513**(7516): p. 59-64.
324. Pozuelo, M., et al., *Reduction of butyrate- and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12693.
325. Vatanen, T., et al., *The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study*. Nature, 2018. **562**(7728): p. 589-594.
326. Lamas, B., et al., *CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands*. Nat Med, 2016. **22**(6): p. 598-605.
327. D'Angelo, C., M. Reale, and E. Costantini, *Microbiota and Probiotics in Health and HIV Infection*. Nutrients, 2017. **9**(6).
328. Arpaia, N., et al., *Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation*. Nature, 2013. **504**(7480): p. 451-5.
329. Perez-Santiago, J., et al., *Gut Lactobacillales are associated with higher CD4 and less microbial translocation during HIV infection*. AIDS, 2013. **27**(12): p. 1921-31.
330. Qing, Y., et al., *Gut Microbiome, Short-Chain Fatty Acids, and Mucosa Injury in Young Adults with Human Immunodeficiency Virus Infection*. Dig Dis Sci, 2019. **64**(7): p. 1830-1843.
331. Johnson-Leger, C., M. Aurrand-Lions, and B.A. Imhof, *The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair?* J Cell Sci, 2000. **113 ( Pt 6)**: p. 921-33.
332. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 327-34.
333. Bazzoni, G. and E. Dejana, *Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis*. Physiol Rev, 2004. **84**(3): p. 869-901.
334. Minshall, R.D. and A.B. Malik, *Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability*. Handb Exp Pharmacol, 2006(176 Pt 1): p. 107-44.
335. Arnout, J., M.F. Hoylaerts, and H.R. Lijnen, *Haemostasis*. Handb Exp Pharmacol, 2006(176 Pt 2): p. 1-41.
336. Siragusa, M. and I. Fleming, *The eNOS signalsome and its link to endothelial dysfunction*. Pflugers Arch, 2016. **468**(7): p. 1125-1137.
337. Davenport, A.P., et al., *Endothelin*. Pharmacol Rev, 2016. **68**(2): p. 357-418.

338. Busse, R. and I. Fleming, *Vascular endothelium and blood flow*. Handb Exp Pharmacol, 2006(176 Pt 2): p. 43-78.
339. Ley, K. and J. Reutershan, *Leucocyte-endothelial interactions in health and disease*. Handb Exp Pharmacol, 2006(176 Pt 2): p. 97-133.
340. Xu, Q., *The impact of progenitor cells in atherosclerosis*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006. **3**(2): p. 94-101.
341. Pober, J.S. and R.S. Cotran, *The role of endothelial cells in inflammation*. Transplantation, 1990. **50**(4): p. 537-44.
342. Pober, J.S. and R.S. Cotran, *Cytokines and endothelial cell biology*. Physiol Rev, 1990. **70**(2): p. 427-51.
343. Rollins, B.J., et al., *Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE*. Am J Pathol, 1990. **136**(6): p. 1229-33.
344. Gimbrone, M.A., Jr., et al., *Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions*. Science, 1989. **246**(4937): p. 1601-3.
345. Bevilacqua, M.P., et al., *Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9238-42.
346. Libby, P., et al., *Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells*. Am J Pathol, 1986. **124**(2): p. 179-85.
347. Barbaro, G., *Highly active antiretroviral therapy and the cardiovascular system: the heart of the matter*. Pharmacology, 2003. **69**(4): p. 177-9.
348. Maartens, G., C. Celum, and S.R. Lewin, *HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention*. Lancet, 2014. **384**(9939): p. 258-71.
349. Kline, E.R. and R.L. Sutliff, *The roles of HIV-1 proteins and antiretroviral drug therapy in HIV-1-associated endothelial dysfunction*. J Investig Med, 2008. **56**(5): p. 752-69.
350. Chelvanambi, S., et al., *HIV-Nef Protein Transfer to Endothelial Cells Requires Rac1 Activation and Leads to Endothelial Dysfunction Implications for Statin Treatment in HIV Patients*. Circ Res, 2019. **125**(9): p. 805-820.
351. Liu, K., et al., *HIV-1 Tat protein-induced VCAM-1 expression in human pulmonary artery endothelial cells and its signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(2): p. L252-60.
352. Wang, T., et al., *Transfer of intracellular HIV Nef to endothelium causes endothelial dysfunction*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91063.
353. Acheampong, E., et al., *Ethanol strongly potentiates apoptosis induced by HIV-1 proteins in primary human brain microvascular endothelial cells*. Virology, 2002. **304**(2): p. 222-34.
354. Madge, L.A. and J.S. Pober, *TNF signaling in vascular endothelial cells*. Exp Mol Pathol, 2001. **70**(3): p. 317-25.
355. O'Carroll, S.J., et al., *Pro-inflammatory TNFalpha and IL-1beta differentially regulate the inflammatory phenotype of brain microvascular endothelial cells*. J Neuroinflammation, 2015. **12**: p. 131.
356. Ridker, P.M., *From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream To Identify Novel Targets for Atheroprotection*. Circ Res, 2016. **118**(1): p. 145-56.
357. Jamaluddin, M.S., et al., *Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells*. Atherosclerosis, 2010. **208**(1): p. 104-11.

358. Fish, J.E. and P.A. Marsden, *Endothelial nitric oxide synthase: insight into cell-specific gene regulation in the vascular endothelium*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(2): p. 144-62.
359. Wang, X., et al., *Roles and mechanisms of human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir and other anti-human immunodeficiency virus drugs in endothelial dysfunction of porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells*. Am J Pathol, 2009. **174**(3): p. 771-81.
360. Parks, E., et al., *Chemokine expression in endothelial cells and monocytes is differentially regulated*. Pathobiology, 1998. **66**(2): p. 64-70.
361. Zhou, Z., et al., *Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium*. Cell Metab, 2011. **13**(5): p. 592-600.
362. Oynebraten, I., et al., *Rapid chemokine secretion from endothelial cells originates from 2 distinct compartments*. Blood, 2004. **104**(2): p. 314-20.
363. Weber, K.S., et al., *Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow*. Eur J Immunol, 1999. **29**(2): p. 700-12.
364. Huo, Y., et al., *The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium*. J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1307-14.
365. Fuentes, M.E., et al., *Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5769-76.
366. Gunn, M.D., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation*. J Immunol, 1997. **158**(1): p. 376-83.
367. Soehnlein, O., et al., *Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(3): p. 471-81.
368. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
369. Galkina, E. and K. Ley, *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2292-301.
370. van Wetering, S., et al., *VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(2): p. C343-52.
371. Corada, M., et al., *Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9815-20.
372. Saito, H., et al., *Endothelial Rho and Rho kinase regulate neutrophil migration via endothelial myosin light chain phosphorylation*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(4): p. 829-36.
373. Schenkel, A.R., et al., *CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 143-50.
374. Schillaci, G., et al., *Aortic stiffness in untreated adult patients with human immunodeficiency virus infection*. Hypertension, 2008. **52**(2): p. 308-13.
375. Rider, O.J., et al., *HIV is an independent predictor of aortic stiffness*. J Cardiovasc Magn Reson, 2014. **16**(1): p. 57.
376. Echeverria, P., et al., *Pulse wave velocity as index of arterial stiffness in HIV-infected patients compared with a healthy population*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2014. **65**(1): p. 50-6.

377. Monteiro, P., et al., *Is arterial stiffness in HIV-infected individuals associated with HIV-related factors?* Braz J Med Biol Res, 2012. **45**(9): p. 818-26.
378. London, G.M. and A.P. Guerin, *Influence of arterial pulse and reflected waves on blood pressure and cardiac function.* Am Heart J, 1999. **138**(3 Pt 2): p. 220-4.
379. Quinn, U., L.A. Tomlinson, and J.R. Cockcroft, *Arterial stiffness.* JRSM Cardiovasc Dis, 2012. **1**(6).
380. Sun, Z., *Aging, arterial stiffness, and hypertension.* Hypertension, 2015. **65**(2): p. 252-6.
381. Kochova, P., et al., *The contribution of vascular smooth muscle, elastin and collagen on the passive mechanics of porcine carotid arteries.* Physiol Meas, 2012. **33**(8): p. 1335-51.
382. Sell, D.R. and V.M. Monnier, *Molecular basis of arterial stiffening: role of glycation - a mini-review.* Gerontology, 2012. **58**(3): p. 227-37.
383. Mitchell, G.F., et al., *Local shear stress and brachial artery flow-mediated dilation: the Framingham Heart Study.* Hypertension, 2004. **44**(2): p. 134-9.
384. Franklin, S.S., et al., *Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study.* Circulation, 1997. **96**(1): p. 308-15.
385. Widlansky, M.E., et al., *The clinical implications of endothelial dysfunction.* J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(7): p. 1149-60.
386. Donato, A.J., et al., *Aging is associated with greater nuclear NF kappa B, reduced I kappa B alpha, and increased expression of proinflammatory cytokines in vascular endothelial cells of healthy humans.* Aging Cell, 2008. **7**(6): p. 805-12.
387. Gunnett, C.A., et al., *Mechanisms of inducible nitric oxide synthase-mediated vascular dysfunction.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(8): p. 1617-22.
388. Yoshizumi, M., et al., *Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life.* Circ Res, 1993. **73**(1): p. 205-9.
389. Islam, R.K., E. Donnelly, and K.N. Islam, *Circulating Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S) and Nitric Oxide (NO) Levels Are Significantly Reduced in HIV Patients Concomitant with Increased Oxidative Stress Biomarkers.* J Clin Med, 2021. **10**(19).
390. Schnabel, R., et al., *Relations of inflammatory biomarkers and common genetic variants with arterial stiffness and wave reflection.* Hypertension, 2008. **51**(6): p. 1651-7.
391. Csiszar, A., et al., *Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB.* J Appl Physiol (1985), 2008. **105**(4): p. 1333-41.
392. Marchand, A., et al., *The Wnt/beta-catenin pathway is activated during advanced arterial aging in humans.* Aging Cell, 2011. **10**(2): p. 220-32.
393. Morgan, R.G., et al., *Age-related telomere uncapping is associated with cellular senescence and inflammation independent of telomere shortening in human arteries.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(2): p. H251-8.
394. Rippe, C., et al., *MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, eNOS and inflammation.* Exp Gerontol, 2012. **47**(1): p. 45-51.
395. Gardner, S.E., et al., *Senescent Vascular Smooth Muscle Cells Drive Inflammation Through an Interleukin-1alpha-Dependent Senescence-Associated Secretory Phenotype.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(9): p. 1963-74.
396. Katsuomi, G., et al., *Vascular Senescence in Cardiovascular and Metabolic Diseases.* Front Cardiovasc Med, 2018. **5**: p. 18.
397. Salminen, A., A. Kauppinen, and K. Kaarniranta, *Emerging role of NF-kappaB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP).* Cell Signal, 2012. **24**(4): p. 835-45.

398. Chien, Y., et al., *Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity*. Genes Dev, 2011. **25**(20): p. 2125-36.
399. Konior, A., et al., *NADPH oxidases in vascular pathology*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(17): p. 2794-814.
400. Karin, M. and M. Delhase, *The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling*. Semin Immunol, 2000. **12**(1): p. 85-98.
401. Khan, S.Y., et al., *Premature senescence of endothelial cells upon chronic exposure to TNFalpha can be prevented by N-acetyl cysteine and plumericin*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 39501.
402. Coleman, P.R., et al., *Age-associated stresses induce an anti-inflammatory senescent phenotype in endothelial cells*. Aging (Albany NY), 2013. **5**(12): p. 913-24.
403. Chang, E. and C.B. Harley, *Telomere length and replicative aging in human vascular tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(24): p. 11190-4.
404. Okuda, K., et al., *Telomere attrition of the human abdominal aorta: relationships with age and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2000. **152**(2): p. 391-8.
405. Minamino, T., et al., *Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction*. Circulation, 2002. **105**(13): p. 1541-4.
406. Erusalimsky, J.D., *Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology*. J Appl Physiol (1985), 2009. **106**(1): p. 326-32.
407. Vasile, E., et al., *Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis*. FASEB J, 2001. **15**(2): p. 458-66.
408. Hijmans, J.G., et al., *Effects of HIV-1 gp120 and tat on endothelial cell senescence and senescence-associated microRNAs*. Physiol Rep, 2018. **6**(6): p. e13647.
409. Wang, P.L., et al., *Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily*. J Immunol, 1992. **148**(8): p. 2600-8.
410. Fuchs, A., et al., *Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155)*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 3994-8.
411. Seth, S., et al., *The murine pan T cell marker CD96 is an adhesion receptor for CD155 and nectin-1*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **364**(4): p. 959-65.
412. Chan, C.J., et al., *The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions*. Nat Immunol, 2014. **15**(5): p. 431-8.
413. Bernhardt, G., *TACTILE becomes tangible: CD96 discloses its inhibitory peculiarities*. Nat Immunol, 2014. **15**(5): p. 406-8.
414. Yu, X., et al., *The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 48-57.
415. Stanietsky, N., et al., *The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17858-63.
416. Joller, N., et al., *Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions*. J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1338-42.
417. Shibuya, A., et al., *DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes*. Immunity, 1996. **4**(6): p. 573-81.
418. Iguchi-Manaka, A., et al., *Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor*. J Exp Med, 2008. **205**(13): p. 2959-64.

419. Gilfillan, S., et al., *DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors*. J Exp Med, 2008. **205**(13): p. 2965-73.
420. El-Sherbiny, Y.M., et al., *The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8444-9.
421. Carlsten, M., et al., *DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1317-25.
422. Eriksson, E.M., et al., *Differential expression of CD96 surface molecule represents CD8(+) T cells with dissimilar effector function during HIV-1 infection*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51696.
423. Weiss, A., B. Manger, and J. Imboden, *Synergy between the T3/antigen receptor complex and Tp44 in the activation of human T cells*. J Immunol, 1986. **137**(3): p. 819-25.
424. Martin, P.J., et al., *A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes*. J Immunol, 1986. **136**(9): p. 3282-7.
425. Bour-Jordan, H., et al., *Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 180-205.
426. Bluestone, J.A., E.W. St Clair, and L.A. Turka, *CTLA4Ig: bridging the basic immunology with clinical application*. Immunity, 2006. **24**(3): p. 233-8.
427. Borst, J., J. Hendriks, and Y. Xiao, *CD27 and CD70 in T cell and B cell activation*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 275-81.
428. Agematsu, K., et al., *CD27: a memory B-cell marker*. Immunol Today, 2000. **21**(5): p. 204-6.
429. Arens, R., et al., *Tumor rejection induced by CD70-mediated quantitative and qualitative effects on effector CD8+ T cell formation*. J Exp Med, 2004. **199**(11): p. 1595-605.
430. Hendriks, J., et al., *CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 433-40.
431. Yamada, S., K. Shinozaki, and K. Agematsu, *Involvement of CD27/CD70 interactions in antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte (CTL) activity by perforin-mediated cytotoxicity*. Clin Exp Immunol, 2002. **130**(3): p. 424-30.
432. Hintzen, R.Q., et al., *Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation*. J Immunol, 1995. **154**(6): p. 2612-23.
433. Xu, W. and A. Larbi, *Markers of T Cell Senescence in Humans*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(8).
434. Harding, F.A., et al., *CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones*. Nature, 1992. **356**(6370): p. 607-9.
435. Brenchley, J.M., et al., *Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2711-20.
436. Focosi, D., et al., *CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(1): p. 107-16.
437. Olson, N.C., et al., *Decreased naive and increased memory CD4(+) T cells are associated with subclinical atherosclerosis: the multi-ethnic study of atherosclerosis*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71498.
438. Kaplan, R.C., et al., *T cell activation and senescence predict subclinical carotid artery disease in HIV-infected women*. J Infect Dis, 2011. **203**(4): p. 452-63.
439. Papagno, L., et al., *Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection*. PLoS Biol, 2004. **2**(2): p. E20.

440. Ballegaard, V., et al., *Cytomegalovirus-specific T-cells are associated with immune senescence, but not with systemic inflammation, in people living with HIV*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3778.
441. Pawelec, G., *Immunosenescence: role of cytomegalovirus*. Exp Gerontol, 2014. **54**: p. 1-5.
442. Chiu, Y.L., et al., *Cytotoxic polyfunctionality maturation of cytomegalovirus-pp65-specific CD4 + and CD8 + T-cell responses in older adults positively correlates with response size*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19227.
443. Hassouneh, F., et al., *Functional Changes of T-Cell Subsets with Age and CMV Infection*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(18).
444. Wang, Y., et al., *Targeting CD96 overcomes PD-1 blockade resistance by enhancing CD8+ TIL function in cervical cancer*. J Immunother Cancer, 2022. **10**(3).
445. Chiang, E.Y., et al., *CD96 functions as a co-stimulatory receptor to enhance CD8(+) T cell activation and effector responses*. Eur J Immunol, 2020. **50**(6): p. 891-902.
446. Zidar, D.A., et al., *Altered Maturation Status and Possible Immune Exhaustion of CD8 T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Patients Presenting With Acute Coronary Syndromes*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. **36**(2): p. 389-97.
447. Mohammad-Rezaei, M., et al., *Serum levels of IL-32 in patients with coronary artery disease and its relationship with the serum levels of IL-6 and TNF-alpha*. Mol Biol Rep, 2021. **48**(5): p. 4263-4271.
448. Yang, Z., et al., *Interleukin-32 increases in coronary arteries and plasma from patients with coronary artery disease*. Clin Chim Acta, 2019. **497**: p. 104-109.
449. Han, X. and W.A. Boisvert, *Interleukin-10 protects against atherosclerosis by modulating multiple atherogenic macrophage function*. Thromb Haemost, 2015. **113**(3): p. 505-12.
450. Suzuki, M., et al., *Anti-inflammatory mechanism of tocilizumab, a humanized anti-IL-6R antibody: effect on the expression of chemokine and adhesion molecule*. Rheumatol Int, 2010. **30**(3): p. 309-15.
451. Wung, B.S., C.W. Ni, and D.L. Wang, *ICAM-1 induction by TNFalpha and IL-6 is mediated by distinct pathways via Rac in endothelial cells*. J Biomed Sci, 2005. **12**(1): p. 91-101.
452. Schaper, F. and S. Rose-John, *Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade*. Cytokine Growth Factor Rev, 2015. **26**(5): p. 475-87.
453. Mackiewicz, A., et al., *Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins*. J Immunol, 1992. **149**(6): p. 2021-7.
454. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
455. Constans, J. and C. Conri, *Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease*. Clin Chim Acta, 2006. **368**(1-2): p. 33-47.
456. Blankenberg, S., S. Barbaux, and L. Tiret, *Adhesion molecules and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2003. **170**(2): p. 191-203.
457. Kevil, C.G., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) regulates endothelial cell motility through a nitric oxide-dependent pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19230-8.
458. Gho, Y.S., H.K. Kleinman, and G. Sosne, *Angiogenic activity of human soluble intercellular adhesion molecule-1*. Cancer Res, 1999. **59**(20): p. 5128-32.



459. Rieckmann, P., et al., *Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) block lymphocyte attachment to cerebral endothelial cells*. J Neuroimmunol, 1995. **60**(1-2): p. 9-15.
460. Lawson, C. and S. Wolf, *ICAM-1 signaling in endothelial cells*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 22-32.
461. Nakashima, Y., et al., *Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(5): p. 842-51.
462. Cybulsky, M.I., et al., *A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis*. J Clin Invest, 2001. **107**(10): p. 1255-62.
463. Wilhelmi, M.H., et al., *Upregulation of endothelial adhesion molecules in hearts with congestive and ischemic cardiomyopathy: immunohistochemical evaluation of inflammatory endothelial cell activation*. Eur J Cardiothorac Surg, 2005. **27**(1): p. 122-7.
464. Grabmaier, U., et al., *Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) as a Biomarker in the Mouse Model of Experimental Autoimmune Myocarditis (EAM)*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0158299.
465. Willeit, K., et al., *Association Between Vascular Cell Adhesion Molecule 1 and Atrial Fibrillation*. JAMA Cardiol, 2017. **2**(5): p. 516-523.
466. Hayek, A., et al., *Kinetics and prognostic value of soluble VCAM-1 in ST-segment elevation myocardial infarction patients*. Immun Inflamm Dis, 2021. **9**(2): p. 493-501.
467. Blankenberg, S., et al., *Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease*. Circulation, 2001. **104**(12): p. 1336-42.
468. Gerszten, R.E., et al., *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 718-23.
469. Wezel, A., et al., *Mast cells mediate neutrophil recruitment during atherosclerotic plaque progression*. Atherosclerosis, 2015. **241**(2): p. 289-96.
470. Hartwig, H., et al., *Neutrophils in atherosclerosis. A brief overview*. Hamostaseologie, 2015. **35**(2): p. 121-7.
471. Wang, L., et al., *CXCL1-CXCR2 axis mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodelling through regulation of monocyte infiltration*. Eur Heart J, 2018. **39**(20): p. 1818-1831.
472. Papadopoulou, C., et al., *The role of the chemokines MCP-1, GRO-alpha, IL-8 and their receptors in the adhesion of monocytic cells to human atherosclerotic plaques*. Cytokine, 2008. **43**(2): p. 181-6.
473. Schwartz, D., et al., *Role of the GRO family of chemokines in monocyte adhesion to MM-LDL-stimulated endothelium*. J Clin Invest, 1994. **94**(5): p. 1968-73.
474. Smith, D.F., et al., *GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(5): p. H1976-84.
475. Breland, U.M., et al., *A potential role of the CXC chemokine GROalpha in atherosclerosis and plaque destabilization: downregulatory effects of statins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(5): p. 1005-11.
476. Jay, A.G., et al., *CD36 binds oxidized low density lipoprotein (LDL) in a mechanism dependent upon fatty acid binding*. J Biol Chem, 2015. **290**(8): p. 4590-4603.
477. Lin, H.C., et al., *Andrographolide Inhibits Oxidized LDL-Induced Cholesterol Accumulation and Foam Cell Formation in Macrophages*. Am J Chin Med, 2018. **46**(1): p. 87-106.

478. Franca, C.N., et al., *Monocyte subtypes and the CCR2 chemokine receptor in cardiovascular disease*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(12): p. 1215-1224.
479. Takeya, M., et al., *Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody*. Hum Pathol, 1993. **24**(5): p. 534-9.
480. Yla-Herttuala, S., et al., *Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(12): p. 5252-6.
481. Nelken, N.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques*. J Clin Invest, 1991. **88**(4): p. 1121-7.
482. Herder, C., et al., *Chemokines and incident coronary heart disease: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(9): p. 2147-52.
483. Inoue, T., et al., *Interleukin-8 as an independent predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease*. Int J Cardiol, 2008. **124**(3): p. 319-25.
484. Panichi, V., et al., *Interleukin-8 is a powerful prognostic predictor of all-cause and cardiovascular mortality in dialytic patients*. Nephron Clin Pract, 2006. **102**(2): p. c51-8.
485. An, Z., et al., *Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF-kappaB signaling in macrophages*. Cell Cycle, 2019. **18**(21): p. 2928-2938.
486. Kedzierska, K. and S.M. Crowe, *Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications*. Antivir Chem Chemother, 2001. **12**(3): p. 133-50.
487. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2017. **135**(10): p. e146-e603.
488. McEniery, C.M., et al., *The impact of cardiovascular risk factors on aortic stiffness and wave reflections depends on age: the Anglo-Cardiff Collaborative Trial (ACCT III)*. Hypertension, 2010. **56**(4): p. 591-7.
489. Mitchell, G.F., et al., *Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and women: the Framingham Heart Study*. Hypertension, 2004. **43**(6): p. 1239-45.
490. Roy Cardinal, M.H., et al., *Increased carotid artery wall stiffness and plaque prevalence in HIV infected patients measured with ultrasound elastography*. Eur Radiol, 2020. **30**(6): p. 3178-3187.
491. Maniatis, K., et al., *Osteoprotegerin and Osteopontin Serum Levels are Associated with Vascular Function and Inflammation in Coronary Artery Disease Patients*. Curr Vasc Pharmacol, 2020. **18**(5): p. 523-530.
492. Gokaslan, S., et al., *Role of aortic stiffness and inflammation in the etiology of young-onset hypertension*. Turk J Med Sci, 2019. **49**(6): p. 1748-1753.
493. Peyster, E., et al., *Inflammation and Arterial Stiffness in Chronic Kidney Disease: Findings From the CRIC Study*. Am J Hypertens, 2017. **30**(4): p. 400-408.
494. Chang, F.C., et al., *Angiopietin-2-induced arterial stiffness in CKD*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(6): p. 1198-209.
495. Novick, D., et al., *Proteinase 3 is an IL-32 binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3316-21.
496. Rueda Gotor, J. and R. Blanco Alonso, *[Tocilizumab in rheumatoid arthritis]*. Reumatol Clin, 2011. **6S3**: p. S29-32.

497. Fei, L., et al., *Targeting the CCL2/CCR2 Axis in Cancer Immunotherapy: One Stone, Three Birds?* Front Immunol, 2021. **12**: p. 771210.
498. Li, M., et al., *The Anti-inflammatory Effects of Short Chain Fatty Acids on Lipopolysaccharide- or Tumor Necrosis Factor alpha-Stimulated Endothelial Cells via Activation of GPR41/43 and Inhibition of HDACs.* Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 533.
499. Chun, E., et al., *Metabolite-Sensing Receptor Ffar2 Regulates Colonic Group 3 Innate Lymphoid Cells and Gut Immunity.* Immunity, 2019. **51**(5): p. 871-884 e6.
500. Wang, J., et al., *Propionate Protects against Lipopolysaccharide-Induced Mastitis in Mice by Restoring Blood-Milk Barrier Disruption and Suppressing Inflammatory Response.* Front Immunol, 2017. **8**: p. 1108.
501. Sereti, I., et al., *Impaired gut microbiota-mediated short-chain fatty acid production precedes morbidity and mortality in people with HIV.* Cell Rep, 2023: p. 113336.
502. So, D., et al., *Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: a systematic review and meta-analysis.* Am J Clin Nutr, 2018. **107**(6): p. 965-983.
503. Wu, I.W., et al., *Integrative metagenomic and metabolomic analyses reveal severity-specific signatures of gut microbiota in chronic kidney disease.* Theranostics, 2020. **10**(12): p. 5398-5411.
504. Kahveci, A.S., et al., *Oxidative Stress and Mitochondrial Abnormalities Contribute to Decreased Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Renal Disease Progression in Early Experimental Polycystic Kidney Disease.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(6).
505. Domagala, T.B., et al., *Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation ameliorated by NI-methylnicotinamide in human blood vessels.* Hypertension, 2012. **59**(4): p. 825-32.