

# TRAITEMENT ANTIRÉTROVIRAL DU VIH ET TISSU ADIPEUX

par

M. CARON\*, J.-P. BASTARD\*\* M. AUCLAIR\*,  
C. VIGOUROUX\*\* et J. CAPEAU\*\*

## INTRODUCTION

L'utilisation en pratique clinique des traitements antirétroviraux a énormément diminué la morbidité et la mortalité liées à l'infection VIH. Malgré leur succès thérapeutique, les traitements antirétroviraux se compliquent fréquemment d'effets secondaires comportant une redistribution du tissu adipeux ou lipodystrophie, associée ou non à des troubles métaboliques [1-7]. Ces lipodystrophies ont une origine multifactorielle comprenant des facteurs liés à l'infection, au patient (âge, sexe, habitudes nutritionnelles, sédentarité) et au traitement. Les deux classes de molécules antirétrovirales ont été incriminées : les analogues nucléosidiques inhibiteurs de la reverse transcriptase virale (INTI) [5] et les inhibiteurs de la protéase virale (IP) [2, 8] avec une incidence importante de la durée du traitement et des molécules individuelles. Il semble que l'addition des IPs au traitement INTI accélère et aggrave la lipodystrophie.

Le ou les mécanismes impliqués dans la redistribution tissulaire sont complexes et mal connus. La perte du tissu adipeux périphérique concerne la majorité des patients affectés, alors que l'accumulation viscérale semble être un phénomène secondaire. Le tissu adipeux est la cible de ces traitements et est au moins en partie responsable des troubles métaboliques tels que insulino-résistance, dyslipidémie, intolérance au glucose [1-4]. Il faut noter que les lipodystrophies d'origine génétique sont associées à une insulino-résistance [9-12]. Des anomalies multiples du métabolisme lipidique ont été observées chez les patients traités par les IPs [6-8, 13]. Cependant des différences notables apparaissent selon l'IP

\* Inserm U402, Faculté de Médecine Saint-Antoine, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

\*\* Service de Biochimie, Hôpital Tenon, Paris, France.

utilisé. Le ritonavir est la molécule la plus délétère en terme d'anomalies métaboliques puisqu'un traitement de 2 semaines suffit à induire une hypertriglycéridémie chez les sujets séronégatifs [14], alors que l'indinavir ne modifie pas les paramètres lipidiques des sujets sains [15]. Cependant la majorité des études montre que les patients traités par les IPs ont des profils de lipoprotéines proathérogéniques [2, 6-8]. Il semble que les INTIs n'induisent pas ces anomalies et que les analogues non nucléosidiques inhibiteurs de la reverse transcriptase virale (INNTI) (névirapine) reversent les effets délétères des IPs sur ces paramètres biologiques, dans le cas d'un arrêt de traitement IP [16].

Comme nous le verrons plus loin le tissu adipeux des patients lipodystrophiques traités par IP/INTI présente de nombreuses anomalies au niveau de l'expression des marqueurs adipocytaires et de la réponse à l'insuline [17]. Ces altérations peuvent être rapprochées de celles induites par les IPs *in vitro* sur les lignées adipocytaires 3T3-L1 ou 3T3-F442A. Certains IPs inhibent la différenciation adipocytaire *in vitro* et induisent une insulino-résistance [18-23], alors que les INTIs sont au moins en partie liés à un dysfonctionnement mitochondrial [24]. Sur les cellules 3T3-L1, certains IPs exercent un effet direct et réversible à court terme (30 min) sur le fonctionnement de Glut4, le transporteur majoritairement impliqué dans le transport du glucose insulino-dépendant [25], pouvant ainsi contribuer à l'insulino-résistance liée au traitement IP chez l'homme [26]. En traitement chronique (plusieurs jours) les IPs diminuent l'expression des facteurs de transcription SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding protein-1*), PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ) et C/EBP $\alpha$  (*CAAAT/enhancer binding protein  $\alpha$* ), marqueurs de la différenciation adipocytaire impliqués dans la sensibilité des adipocytes à l'insuline [22]. Néanmoins tous les IPs ne produisent pas les mêmes effets et peu de résultats concernant les associations IP/INTI sur la sensibilité à l'insuline sont disponibles. Les INTIs pourraient prendre part au processus global de l'insulino-résistance en activant la lipolyse [5].

Dans ce contexte de complications multifactorielles induites par des traitements comportant deux ou trois molécules thérapeutiques avec des mécanismes d'action potentiellement différents, notre travail a comporté deux volets principaux. D'une part l'étude de l'impact de chaque molécule (IP ou INTI) sur la différenciation, la réponse à l'insuline et la survie des cellules 3T3-F442A, et d'autre part l'analyse moléculaire et cellulaire du tissu adipeux sous-cutané abdominal des patients VIH-séropositifs traités par les IPs et les INTIs. Ces patients étaient programmés pour une chirurgie reconstructrice faciale en raison de leur lipodystrophie [17].

Nous avons examiné les effets de trois IPs – indinavir (IDV), nelfinavir (NFV) et amprénavir (APV) – et de trois INTIs – zidovudine (AZT), stavudine (d4T) et didanosine (ddI) – sur la différenciation adipocytaire, la réponse à l'insuline et la survie des cellules 3T3-F442A [22]. Nous observons que les molécules ont des effets qui diffèrent en fonction de leur classe (IP et INTI) et de leur nature, et que le facteur de transcription SREBP-1 pourrait être la cible des IPs. L'étude sur le tissu adipeux des patients lipodystrophiques a montré que les principaux marqueurs de la différenciation adipocytaire et de la sensibilité des cellules à l'insuline sont anormalement exprimés au niveau moléculaire (ARNm) et cellulaire (protéine) et en particulier SREBP-1. Sur la base de ces résultats nous proposons des mécanismes par lesquels cette classe de molécule pourrait altérer la différenciation et les fonctions adipocytaires.

## MÉTHODES ET PATIENTS

## Étude sur les cellules 3T3-F442A

Les cellules sont traitées tout au long du processus de différenciation, du jour - 5 (mise en culture) au jour + 6 (à + 11) par des concentrations en IP et INTI voisines du Cmax observé dans le sérum des patients. Les cellules 3T3-F442A sont des préadipocytes qui se différencient en 6-8 jours en adipocytes matures sous l'effet de l'insuline et du sérum de veau fœtal (SVF) (fig. 1). La différenciation se met en place par l'expression séquentielle d'une série de facteurs de transcription adipocytaires dont l'expression protéique est mesurée par Western blot. La différenciation adipocytaire est également mesurée par comptage des cellules sur la base de changements morphologiques (arrondissement et gonflement des cellules) et de l'accumulation des lipides intracellulaires (coloration par le red Oil). La réponse à l'insuline est mesurée par l'activation de certaines étapes clés des voies de signalisation : phosphorylation sur les tyrosines du récepteur de l'insuline et de son substrat majeur IRS-1, activation des enzymes ERK 1/2 et Akt/PKB. Les cellules sont étudiées lorsqu'elles sont différenciées (J+6 à + 11) après 24 heures en milieu dépourvu en SVF et insuline. Elles sont ensuite stimulées par l'insuline (100 nmol/l) pendant 10 min. La répartition intranucléaire des facteurs de transcription adipocytaires SREBP-1, PPAR $\gamma$  et C/EBP  $\alpha$  est évaluée par immunohistochimie en microscopie confocale. Les cellules sont cultivées et différenciées sur lamelle de verre puis fixées et perméabilisées par le méthanol. Les lamelles sont incubées avec les anticorps spécifiques des protéines d'intérêt et les anticorps fluorescents correspondants (anti-souris couplé au Texas Red et anti-lapin couplé à FITC). La survie cellulaire est évaluée par cytométrie de flux. Les cellules en subG1 sont considérées comme des cellules en apoptose et exprimées en pourcentage des cellules totales.

## Étude sur le tissu adipeux des patients VIH lipodystrophiques

Les patients (21 hommes et 5 femmes) ont un âge moyen de 45 ans et un index de masse corporelle de 23,3 kg/m<sup>2</sup>. La durée moyenne de l'infection est de 11 ans.

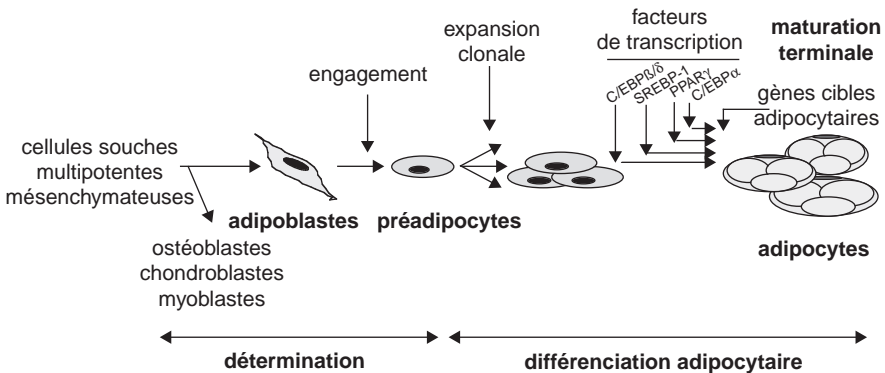


Fig. 1. — Détermination et différenciation adipocytaires.

Tous les patients ont reçu un traitement IP/INTI pendant une durée moyenne de 37 mois. Le groupe contrôle est de 18 sujets sains VIH séronégatifs, non diabétiques et non obèses. Leur âge moyen est de 37 ans, leur index de masse corporelle de 24 kg/m<sup>2</sup>. Le tissu adipeux abdominal sous-cutané est prélevé à la seringue, lavé et congelé. Les ARNs sont purifiés par le kit Qiagen RNeasy total et la PCR quantitative est effectuée en utilisant des compétiteurs internes par la technique développée par Hubert Vidal (INSERM U449, Lyon). L'expression des protéines d'intérêt est analysée par Western blot avec les anticorps spécifiques correspondants. Le tissu entier congelé est solubilisé dans le tampon de lyse Laemmli 5X. Un échantillon de tissu est fixé, inclus dans la paraffine, coupé en lamelles de 5 mm et coloré. La taille et la morphologie des adipocytes sont évaluées après fixation et coloration.

## RÉSULTATS

### Études sur lignées cellulaires

#### EFFETS DES MOLÉCULES SUR LA DIFFÉRENCIATION ADIPOCYTAIRE

Le traitement des cellules 3T3-F442A par les IPs pendant toute la durée du processus de différenciation (J-5 à J+11) inhibe la différenciation adipocytaire (tableau I). Par contre les IPs ne modifient pas la prolifération cellulaire (de J-4 à J0) et l'expansion clonale (de J0 à J+2), étape requise dans la mise en place de la différenciation. Les effets de IDV et NFV sont maximaux à J+6 de différenciation et sont stables jusqu'à J+11. Aux doses supérieures à 25 µm (NFV) et 1 µm (AZT) et au delà de J+8, les cellules traitées par NFV et AZT se détachent et meurent en accord avec la toxicité des molécules à ces concentrations [23]. Sur la base de la morphologie et de la réfringence des cellules (due aux lipides intracellulaires) (voir tableau I) IDV et NFV diminuent respectivement de 44 et 30 % le nombre des adipocytes nouvellement formés. De même IDV et NFV diminuent de 62 et 49 % le contenu en lipides intracellulaires mesuré par coloration avec le Red oil, montrant que ces molécules altèrent la différenciation adipocytaire qualitativement et quantitativement. Par contre APV ne diminue pas significativement le nombre des adipocytes formés (-4 %) et leur contenu en lipides (-10 %) par rapport aux cellules contrôles.

L'étude des effets des INTIs sur la différenciation adipocytaire et l'accumulation des lipides intracellulaires montre que AZT, d4T et ddI ne changent pas significativement le pourcentage des cellules différenciées en adipocytes matures (84, 86 et 92 % des cellules totales respectivement, comparé à 95 % dans les cellules contrôles). Par contre AZT et d4T diminuent leur contenu en lipides cellulaires de 42 et 23 %, respectivement. DdI reste sans effet. Ces résultats suggèrent que certains INTIs diminuent la capacité des cellules à stocker les lipides. Des études de morphologie en microscopie à contraste de phase montrent que les adipocytes formés en présence de AZT et d4T sont différents des adipocytes contrôles et de ceux formés en présence de IDV et NFV. En effet les lipides s'accumulent en périphérie des cellules traitées par AZT et d4T sous forme de petites gouttelettes alors que les adipocytes formés en présence des IPs, même s'ils sont moins nombreux, accumulent normalement les lipides en grosses vacuoles périnucléaires et cytoplasmiques.

TABEAU I. — EFFETS DES IPs ET DES INTIS SUR LA DIFFÉRENCIATION, LA RÉPONSE À L'INSULINE ET LA SURVIE DES CELLULES 3T3-F442A.

	TÉMOIN	IP			INTI			IP/INTI D4T/IDV (10 µM)
		IDV (10 µM)	NFV (10 µM)	APV (15 µM)	AZT (0,5 µM)	D4T (10 µM)	DDI (10 µM)	
<b>Différenciation adipocytaire</b>								
Adipocytes <sup>1</sup>	95	54*	68*	90	84	86	92	72*
Contenu en lipides <sup>2</sup>	100	38*	51*	90	58*	77*	89	51*
SREBP-1	↔	↓↓	↓	↔	↔	↔	↔	↓
PPARγ	↔	↓↓	↓	↔	↔	↔	↔	↓
C/EBPα	↔	↓↓↓	↓↓	↔	↓	↓	↔	↓↓
FAS	↔	↓↓↓	↓↓	↔	↓	↓	↔	↓↓
<b>Résistance à l'insuline</b>								
Phosphorylation IR-β, IRS-1	↔	↔	↔	↔	↓	↔	↔	↔
Activation ERK 1/2	↔	↓↓↓	↓↓	↔	↔	↔	↔	↓
Activation Akt/PKB	↔	↓↓	↓	↔	↔	↔	↔	↓
Apoptose (I)	2,2	13,6*	5,0*	2,1	5,3*	6,0*	2,9	28,5*

1. % des cellules totales.

2. % du témoin.

\*  $p < 0,001$ .

La différenciation adipocytaire est également évaluée par l'expression protéique de divers marqueurs adipocytaires tels que les facteurs de transcription SREBP-1, PPAR $\gamma$  et C/EBP  $\alpha$  et de la FAS (*fatty acyl synthase*) [27]. On observe que les IPs inhibiteurs de la différenciation adipocytaire, IDV et NFV, diminuent l'expression de tous les marqueurs adipocytaires et de la FAS (voir tableau I). APV ne modifie pas ces paramètres. Les INTIs, AZT, d4T, et ddI ne modifient pas l'expression de C/EBP $\beta$ , SREBP-1 et PPAR $\gamma$ , en faveur d'une absence d'altération des étapes précoces de la différenciation. Cependant les cellules traitées par AZT et d4T montrent une expression diminuée de C/EBP $\alpha$  et de FAS, facteurs signant le maintien et la stabilisation du phénotype adipocytaire [27].

#### EFFET DES MOLÉCULES SUR LE MÉTABOLISME ADIPOCYTAIRE

Le traitement chronique (12 jours) par les IPs (IDV, NFV et APV, 10, 10 et 15  $\mu$ m) et les INTIs (AZT, d4T et ddI, 0,5, 10 et 10  $\mu$ m) ne modifie pas l'effet de l'insuline (100 nM) sur la phosphorylation des tyrosines du récepteur de l'insuline et de IRS-1 (voir tableau I). Au delà de 1  $\mu$ m, AZT diminue la phosphorylation du récepteur et de IRS-1. Par contre, IDV, NFV et AZT inhibent fortement l'effet de l'insuline sur l'activation de ERK 1/2 et de Akt/PKB alors que APV, d4T et ddI sont sans effet. Ces résultats indiquent que certains IPs (IDV, NFV) et INTIs (AZT) induisent une insulino-résistance *in vitro* dans les adipocytes mais que d'autres IPs (APV) et INTIs (d4T et ddI) sont dépourvus de toxicité pour ces effets. Ces résultats sont en accord avec les observations cliniques qui montrent que la lipoatrophie sous traitement INTI s'accompagne rarement de troubles métaboliques. L'hypothèse formulée est que les adipocytes diminueraient leur contenu en triglycérides du fait de la diminution de production d'ATP due à l'atteinte mitochondriale induite par les INTIs [24, 28].

#### EFFETS DES MOLÉCULES SUR LA SURVIE CELLULAIRE

La viabilité cellulaire est évaluée sur les cellules traitées par les IPs et les INTIs par l'hydrolyse du substrat MTT. Au jour + 6 de différenciation (11 jours de traitement), IDV, NFV et APV (10, 10 et 15  $\mu$ m) et AZT, d4T et ddI (0,5, 10 et 10  $\mu$ m) ne diminuent pas l'hydrolyse du MTT montrant que la viabilité cellulaire est conservée. Par contre AZT (> 1  $\mu$ m) et NFV (> 25  $\mu$ m) diminuent le taux de substrat formé en accord avec leur cytotoxicité aux fortes doses [18, 23].

Les IPs et les INTIs ont des effets pro-apoptotiques modérés qui varient selon la classe de molécule et la molécule utilisée (voir tableau I). IDV et NFV sont pro-apoptotiques et APV n'a pas d'effet. De même AZT et d4T ont des effets propres mais modérés sur l'apoptose. Cependant les effets des deux classes de molécules sur l'apoptose sont additifs : 29 % des cellules totales (IDV + d4T) comparé à 13 (IDV) et 6 % (d4T), respectivement. Les INTIs (AZT et d4T) contrairement aux IPs modifient le cycle cellulaire en augmentant le pourcentage des cellules en phase G2/S (15 et 17 % pour les cellules contrôles ou traitées par IDV, respectivement ; 40 et 43 % dans les cellules traitées par d4T et d4T/IDV). Ces résultats montrent que les INTIs redirigent des cellules vers la prolifération cellulaire. Est-ce qu'il s'agit d'une dédifférenciation d'adipocytes qui accumulent mal les lipides ou d'une différenciation à partir de préadipocytes qui avaient échappé à la différenciation initiale ? Cependant, pris dans leur ensemble les résultats indiquent que les effets pro-apoptotiques de certains IPs et INTIs peuvent conduire à la destruction cellulaire expliquant au moins en partie la lipoatrophie des patients traités.

L'étude des effets conjoints des deux classes de molécules (d4T et IDV) utilisées aux concentrations du Cmax (10  $\mu$ m) a montré des effets inattendus (voir tableau I). Alors que IDV affecte de façon importante la différenciation, la réponse à l'insuline et la survie des adipocytes, d4T n'est pas, ou est peu efficace sur ces paramètres. Cependant d4T prévient en partie les effets négatifs des IPs sur le fonctionnement adipocytaire alors qu'il les potentialise sur la mort cellulaire. Les mécanismes intervenant dans ces effets ne sont pas connus et les résultats montrent une nouvelle fois la complexité des processus mis en jeu dans les effets de ces molécules.

#### EFFETS DES IPs SUR LA LOCALISATION NUCLÉAIRE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

Pour aborder le mécanisme par lequel les molécules modifient les fonctions adipocytaires, nous avons étudié la répartition intranucléaire des facteurs de transcription adipocytaires, SREBP-1, PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$ . Dans les cellules contrôles ou traitées par APV, les 3 facteurs sont intranucléaires en accord avec leur action sur les gènes adipocytaires. Par contre, dans 50-60 % et 30-40 % des cellules traitées par IDV et NFV les trois facteurs sont absents du noyau. Dans ces cellules, la distribution de SREBP-1 est cytoplasmique (au niveau du RE) ou périnucléaire montrant que les IPs induisent des défauts de maturation et/ou de pénétration de SREBP-1 dans le noyau [29,30] Il faut noter que 20 % des noyaux négatifs pour SREBP-1 présentent des altérations de distribution de la lamine A/C et des anomalies de colocalisation avec la lamine B, un partenaire de la lamine A/C pour la formation de la lamina [31, 32]. Les noyaux des cellules traitées par IDV sont fragilisés puisque les protéines de la lamina, lamine A et C, lamine B, et émerine qui ne sont normalement pas extractibles par un détergent neutre et les sels sont facilement dissociées dans les cellules traitées par IDV. Il est intéressant de noter que des altérations semblables de la lamina ont été observées dans les noyaux des fibroblastes des patients présentant des mutations hétérozygotes du gène de la lamine A/C, patients présentant cliniquement une lipodystrophie avec troubles métaboliques [9-12, 33].

Par ailleurs, les cellules traitées par IDV et NFV (mais pas APV) contiennent un taux anormalement élevé de prélamine A en faveur d'une anomalie de maturation de la lamine A/C. Une accumulation de prélamine A a été observée chez des souris transgéniques lipodystrophiques déficientes pour le gène *ZmpSte24* [34] montrant que le phénotype lipodystrophique peut être lié à des anomalies de maturation de la lamine A/C. On peut faire l'hypothèse que les IPs inhibent la maturation de la lamine A, protéine impliquée dans le trafic des facteurs de transcription et récemment identifiée comme partenaire potentiel de SREBP-1 [35], et empêchent la localisation correcte dans le noyau de SREBP-1, protéine clé de la différenciation adipocytaire et de la réponse cellulaire à l'insuline. D'autres études sont nécessaires pour identifier l'enzyme cible des IPs dans les anomalies de maturation des lamines.

#### Effets protecteurs des thiazolidinediones

Dans un objectif thérapeutique nous avons évalué si les thiazolidinediones, des agonistes puissants de PPAR $\gamma$ , utilisés dans le traitement de l'insulinorésistance (voir la revue de C. Vigouroux) étaient capables de reverser *in vitro* les effets

délétères des molécules antirétrovirales. La rosiglitazone, utilisée à J0 comme inducteur de différenciation, bloque les effets de IDV sur la différenciation adipocytaire, la réponse à l'insuline et la survie des cellules 3T3-F442A. Ces résultats confirment que la cible des IPs se situe en amont de PPAR $\gamma$  probablement au niveau de SREBP-1.

### Études sur le tissu des patients VIH lipodystrophiques

L'analyse morphologique montre que le tissu adipeux des patients VIH lipodystrophiques présente des adipocytes de petite taille qui sont organisés en amas. Ils pourraient représenter des adipocytes en régénération destinés à remplacer ceux qui sont éliminés par apoptose. L'analyse par RT/PCR quantitative (tableau II) montre une forte diminution de l'expression des ARNm des facteurs de transcription adipocytaires C/EBP  $\alpha$  et PPAR  $\gamma$  (– 76 et – 80 %), et SREBP-1 (– 94 %). Les taux d'ARNm sont corrélés entre eux, la plus forte corrélation est observée entre SREBP-1 et C/EBP  $\alpha$  ( $r = 0,73$ ,  $p < 0,0001$ ). L'analyse en Western blot montre que l'expression protéique de PPAR  $\gamma$  est très diminuée alors que celle de SREBP-1 est augmentée de 2,6 fois suggérant que cette étape serait altérée en priorité. On peut émettre l'hypothèse que sous l'effet du traitement antirétroviral SREBP-1 n'est pas correctement localisé dans le noyau prévenant ainsi l'expression de son gène (par boucle de régulation positive [36]) et sa dégradation (par le protéasome [37]).

Dans le tissu des patients les marqueurs des fonctions adipocytaires et de la réponse à l'insuline sont également diminués avec un effondrement de l'ARNm

TABLEAU II. — EXPRESSION DES MARQUEURS DE LA DIFFÉRENCIATION ET DE LA RÉPONSE À L'INSULINE DANS LE TISSU ABDOMINAL SOUS-CUTANÉ DES PATIENTS VIH LIPODYSTROPHIQUES

MARQUEURS ADIPOCYTAIRES	ARNm	PROTÉINES
SREBP-1	↓↓↓↓	↑↑↑
PPAR $\gamma$	↓↓↓	↓↓
C/EBP $\alpha$	↓↓↓	
C/EBP $\beta$	↓↓	
HSL	↓↓	
RÉSISTANCE À L'INSULINE		
Akt/PKB		↓↓
IR- $\beta$		↓↓
Glut4	↓↓↓	
TNF $\alpha$	↑↑↑	

Les ARNm sont évalués par RT/PCR quantitative en prenant la  $\beta$ 2-microglobuline comme référence.

Les marqueurs adipocytaires sont évalués par Western blot en prenant ERK1/2 comme référence.

de la leptine et une diminution de Glut4. Au niveau protéique, l'expression du récepteur de l'insuline et de l'enzyme de signalisation Akt/PKB est abaissée en accord avec la présence de tissu adipeux mal différencié et résistant à l'insuline. Les patients testés sont insulino-résistants et SREBP-1 est corrélé avec tous les paramètres de la résistance à l'insuline : glycémie ( $r = -0,48$ ,  $p = 0,006$ ), insulino-némie ( $r = -0,53$ ,  $p = 0,04$ ) et index HOMA ( $r = 0,60$ ,  $p = 0,001$ ). Le TNF $\alpha$ , cytokine pro-apoptotique potentiellement impliquée dans l'insulino-résistance (38), voit son ARNm augmenté de 3 fois et est corrélé négativement avec SREBP-1 ( $r = -0,53$ ,  $p = 0,0005$ ) et positivement avec la glycémie ( $r = 0,53$ ,  $p = 0,003$ ), l'insulino-némie ( $r = 0,44$ ,  $p = 0,015$ ) et l'index HOMA ( $r = 0,52$ ,  $p = 0,005$ ).

Ces données montrent que SREBP-1, la cible des IPs identifiée *in vitro*, pourrait jouer un rôle important dans les dysfonctionnements adipocytaires *in vivo*. L'excès de TNF $\alpha$  produit pourrait aggraver les troubles métaboliques des patients et favoriser l'élimination des cellules mal différenciées par apoptose.

## CONCLUSION ET HYPOTHÈSES SUR LES MÉCANISMES D'ACTION DES MOLÉCULES

Par une étude approfondie de la différenciation et du fonctionnement adipocytaire *in vitro* nous avons montré que les deux classes de molécules antirétrovirales, IP et INTI, ont des effets délétères sur le fonctionnement adipocytaire. Cependant les effets diffèrent selon la classe de molécule et selon la molécule. Alors que les IPs agissent au niveau de la différenciation adipocytaire, de la sensibilité des adipocytes à l'insuline et de leur survie conduisant à des adipocytes mal différenciés qui répondent anormalement à l'insuline et qui sont rapidement dirigés vers l'apoptose, les INTIs n'affectent pas la différenciation et la réponse des cellules à l'insuline mais conduisent à des adipocytes plus pauvres en lipides et plus facilement éliminés par apoptose (fig. 2). Les IPs affectent l'intégrité du noyau cellulaire et en particulier la maturation de la lamine A/C. Ces anomalies conduisent à des dysmorphies nucléaires qui pourraient être responsables d'une mauvaise pénétration de SREBP-1 à l'intérieur du noyau, étape requise pour la mise en place de la différenciation adipocytaire et de la sensibilité à l'insuline.

Les études sur le tissu adipeux des patients traités par les deux classes de molécules (IPs et INTIs) montrent des anomalies dans l'expression (ARNm et protéines) des facteurs de transcription adipocytaires et de certains acteurs des voies de la signalisation par l'insuline. SREBP-1 est une cible majeure de l'effet de ces traitements et son dysfonctionnement retentit sur l'expression de PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  qui contrôlent la différenciation terminale et les fonctions de l'adipocyte mature. Le tissu adipeux des patients produit un excès de TNF $\alpha$ , une cytokine pro-apoptotique potentiellement impliquée dans la résistance à l'insuline [38] et qui aggrave les dysfonctionnements adipocytaires.

Ces études *in vitro* et *ex vivo* ont permis de montrer que les traitements antirétroviraux affectent le tissu adipeux dans sa différenciation (requis pour la régénération des adipocytes à partir des cellules souches), dans son fonctionnement vis-à-vis des régulations hormonales, et dans sa survie. L'atteinte du facteur de transcription SREBP-1 pourrait au moins en partie expliquer les lipodystrophies induites chez ces patients. Un rôle délétère du TNF $\alpha$  apparaît comme probable.

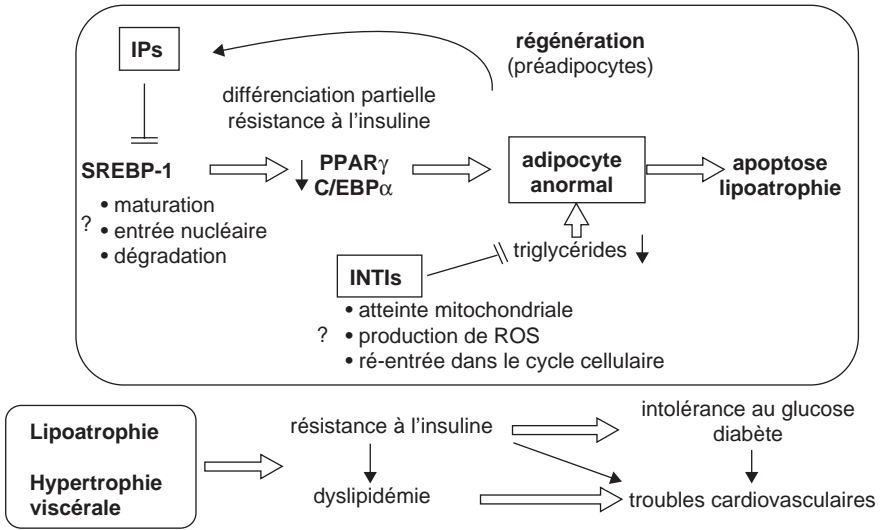


Fig. 2. — Mécanismes hypothétiques des effets des molécules antirétrovirales sur la différenciation et les fonctions adipocytaires.

*Remerciements* : Les cellules 3T3-F442A et la rosiglitazone nous ont été fournies par Claude Forest (INSERM U530, Paris). Les molécules thérapeutiques nous ont été fournies sous forme de poudre base : IDV : Merk Sharp & Dohme (MSD), d4T : Bristol Meyer Squibb (BMS), APV : Vertex et NFV : Agouron Pharmaceuticals. L'étude des effets des molécules sur les cellules 3T3-F442A a été effectuée à l'Unité INSERM 402 par Martine Auclair et Michel Kornprobst. L'analyse au niveau protéique des tissus des patients a été effectuée par Véronique Jan et Martine Auclair. L'étude du tissu des patients (Jean Philippe Bastard) est une étude collaborative entre les services des Maladies Infectieuses (Willy Rozenbaum, Pierre Marie Girard), de Chirurgie Plastique (Philippe Levan) et d'Anatomie Pathologique (Jacqueline Luboinski) de l'Hôpital Rotschild et Tenon (Corinne Vigouroux, Véronique Jan, Mustapha Maachi) et l'équipe de Hubert Vidal et Martine Laville à l'Unité 449 de Lyon.

Ce travail a été réalisé avec des financements publics de l'ANRS et de l'INSERM. Nous avons également reçu des financements privés (Grants) de MSD, BMS, Vertex et de Agouron Pharmaceuticals.

## BIBLIOGRAPHIE

1. NOLAN D, JOHN M, MALLAL S. Antiretroviral therapy and the lipodystrophy syndrome, part 2 : concepts in aetiopathogenesis. *Antivir Ther*, 2001, 6 : 145-160.
2. HRUZ PW, MURATA H, MUECKLER M. Adverse metabolic consequences of HIV protease inhibitor therapy : the search for a central mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 280 : E549-E553.
3. CHEN D, MISRA A, GARG A. Lipodystrophy in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87 : 4845-4856.

4. CARR A, COOPER DA. Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet*, 2000, *356* : 1423-1430.
5. MALLAL SA, JOHN M, MOORE CB et al. Contribution of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors to subcutaneous fat wasting in patients with HIV infection. *AIDS*, 2000, *14* : 1309-1316.
6. SCHAMBELAN M, BENSON CA, CARR A et al. Management of metabolic complications associated with antiretroviral therapy for HIV-1 infection : recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2002, *31* : 257-275.
7. GRINSPOON S. Insulin resistance in the HIV-lipodystrophy syndrome. *Trends Endocrinol Metab*, 2001, *12* : 413-419.
8. WALLI R, HERFORT O, MICHL GM et al. Treatment with protease inhibitors associated with peripheral insulin resistance and impaired oral glucose tolerance in HIV-1-infected patients. *AIDS*, 1998, *12* : F167-F173.
9. GARG A, VINAITHEERTHAN M, WEATHERALL PT et al. Phenotypic heterogeneity in patients with familial partial lipodystrophy (dunnigan variety) related to the site of missense mutations in lamin A/c gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, *86* : 59-65.
10. CAO H, HEGELE RA. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet*, 2000, *9* : 109-112.
11. SHACKLETON S, LLOYD DJ, JACKSON SN et al. LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet*, 2000, *24* : 153-156.
12. VIGOUROUX C, MAGRE J, VANTYGHM MC et al. Lamin A/C gene : sex-determined expression of mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy and absence of coding mutations in congenital and acquired generalized lipodystrophy. *Diabetes*, 2000, *49* : 1958-1962.
13. BEHRENS G, DEJAM A, SCHMIDT H et al. Impaired glucose tolerance, beta cell function and lipid metabolism in HIV patients under treatment with protease inhibitors. *AIDS*, 1999, *13* : F63-F70.
14. PURNELL JQ, ZAMBON A, KNOPP RH et al. Effect of ritonavir on lipids and post-heparin lipase activities in normal subjects. *AIDS*, 2000, *14* : 51-57.
15. NOOR MA, LO JC, MULLIGAN K et al. Metabolic effects of indinavir in healthy HIV-seronegative men. *AIDS*, 2001, *15* : F11-F18.
16. MARTINEZ E, CONGET I, LOZANO L et al. Reversion of metabolic abnormalities after switching from HIV-1 protease inhibitors to nevirapine. *AIDS*, 1999, *13* : 805-810.
17. BASTARD JP, CARON M, VIDAL H et al. Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipotrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet*, 2002, *359* : 1026-1031.
18. DOWELL P, FLEXNER C, KWITEROVICH PO et al. Suppression of preadipocyte differentiation and promotion of adipocyte death by HIV protease inhibitors. *J Biol Chem*, 2000, *275* : 41325-41332.
19. LENHARD JM, FURFINE ES, JAIN RG et al. HIV protease inhibitors block adipogenesis and increase lipolysis in vitro. *Antiviral Res*, 2000, *47* : 121-129.
20. WENTWORTH JM, BURRIS TP, CHATTERJEE VK. HIV protease inhibitors block human preadipocyte differentiation, but not via the PPAR  $\gamma$ /RXR heterodimer. *J Endocrinol*, 2000, *164* : R7-R10.
21. ZHANG B, MACNAUL K, SZALKOWSKI D et al. Inhibition of adipocyte differentiation by HIV protease inhibitors. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, *84* : 4274-4277.
22. CARON M, AUCLAIR M, VIGOUROUX C et al. The HIV protease inhibitor indinavir impairs sterol regulatory element- binding protein-1 intranuclear localization, inhibits preadipocyte differentiation, and induces insulin resistance. *Diabetes*, 2001, *50* : 1378-1388.
23. ROCHE R, POIZOT-MARTIN I, YAZIDI CM et al. Effects of antiretroviral drug combinations on the differentiation of adipocytes. *AIDS*, 2002, *16* : 13-20.
24. BRINKMAN K, TER HOFSTED E HJ, BURGER DM et al. Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors : mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS*, 1998, *12* : 1735-1744.
25. MURATA H, HRUZ PW, MUECKLER M. The mechanism of insulin resistance caused by HIV protease inhibitor therapy. *J Biol Chem*, 2000, *275* : 20251-20254.
26. BEHRENS GM, BOERNER AR, WEBER K et al. Impaired glucose phosphorylation and transport in skeletal muscle cause insulin resistance in HIV-1-infected patients with lipodystrophy. *J Clin Invest*, 2002, *110* : 1319-1327.
27. FAJAS L, FRUCHART JC, AUWERX J. Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, *10* : 165-173.

28. COSSARIZZA A, MUSSINI C, VIGANO A. Mitochondria in the pathogenesis of lipodystrophy induced by anti-HIV antiretroviral drugs : actors or bystanders ? *Bioessays*, 2001, 23 : 1070-1080.
29. HORTON JD, GOLDSTEIN JL, BROWN MS. SREBPs : activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 2002, 109 : 1125-1131.
30. TONTOZ P, KIM JB, GRAVES RA et al. ADD1 : a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol*, 1993, 13 : 4753-4759.
31. GOLDMAN RD, GRUENBAUM Y, MOIR RD et al. Nuclear lamins : building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev*, 2002, 16 : 533-547.
32. WORMAN HJ, COURVALIN JC. The inner nuclear membrane. *J Membr Biol*, 2000, 177 : 1-11.
33. VIGOUROUX C, AUCLAIR M, DUBOSCLARD E et al. Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J Cell Sci*, 2001, 114 : 4459-4468.
34. PENDAS AM, ZHOU Z, CADINANOS J et al. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in *Zmpste24* metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet*, 2002, 31 : 94-99.
35. LLOYD DJ, TREMBATH RC, SHACKLETON S. A novel interaction between lamin A and SREBP1 : implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet*, 2002, 11 : 769-777.
36. AMEMIYA-KUDO M, SHIMANO H, YOSHIKAWA T et al. *J Biol Chem*, 2000, 275 : 31078-31085.
37. HIRANO Y, YOSHIDA M, SHIMIZU M et al. Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, 2001, 276 : 36431-36437.
38. HOTAMISLIGIL GS, ARNER P, CARO JF et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 1995, 95 : 2409-2415.