



Revue critique
de l'actualité scientifique internationale
sur le VIH
et les virus des hépatites

n°110 - septembre 2003

NOTE DE LECTURE

La dysfonction mitochondriale est-elle en cause dans la lipoatrophie sous analogues nucléosidiques ?

Jacqueline Capeau

Inserm U402, faculté de médecine Saint-Antoine, Hôpital Tenon (Paris)

**Mitochondrial
DNA
depletion and
morphologic
changes in
adipocytes
associated
with
nucleoside
reverse
transcriptase
inhibitor
therapy**
Nolan D.,
Hammond E.,
Martin A.,
Taylor L.,
Herrmann S.,
McKinnon E.,
Metcalf C.,
Latham B.,
Mallal S.
AIDS, 2003,
17, 1329-38

Le tissu adipeux des patients sous analogues de thymidine présente une déplétion de son ADN mitochondrial qui pourrait être en cause dans les anomalies morphologiques et la

lipoatrophie.

La toxicité mitochondriale des analogues nucléosidiques (INTI) est bien connue et peut aboutir à des atteintes sévères, en particulier au niveau du foie, des muscles, des nerfs périphériques et du pancréas. Cette toxicité a été attribuée en priorité au groupe des INTI de type didésoxy ou "d-drug", ddC, ddI et d4T, inhibiteurs puissants de l'ADN polymérase gamma, et à l'AZT.

Plus récemment, plusieurs études de cohortes ont relié de façon convaincante la survenue de lipoatrophie, en particulier périphérique, aux traitements prolongés par les INTI, AZT et surtout d4T. Cette lipoatrophie a été attribuée à une atteinte mitochondriale au niveau du tissu adipeux sans que celle-ci ait été réellement objectivée chez les patients.

Un petit nombre d'études, dont celle de D. Nolan est la plus documentée, ont évalué le taux d'ADN mitochondrial (ADNmt) comme stigmata d'une atteinte mitochondriale dans le tissu adipeux des patients sous INTI. Une baisse de ce taux est constamment retrouvée et a pu être reliée au traitement par d4T et AZT. Cependant, ce taux ne peut être relié directement à la lipoatrophie, ce que suggère que d'autres facteurs interviennent dans son développement.

La toxicité mitochondriale des INTI a été reliée en priorité à leur effet inhibiteur sur l'ADN polymérase gamma, seule ADN polymérase des mitochondries¹. Cette inhibition pourrait abaisser le contenu en ADNmt qui code 13 des sous-unités des protéines de la chaîne respiratoire, et aussi diminuer le taux de ces complexes nécessaires à la phosphorylation oxydative et donc à la plus grande partie de la synthèse d'ATP cellulaire. D'après les données des patients présentant des mitochondriopathies génétiques, cette déplétion seule ne modifierait pas le fonctionnement de la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP si elle reste modérée alors qu'une déplétion sévère (laissant un taux résiduel d'ADNmt de 20% ou moins) serait source d'une dysfonction mitochondriale.

Cependant, les INTI pourraient altérer d'autres voies de la mitochondrie. Une inhibition par l'AZT de l'adénylate kinase, qui participe à la synthèse d'ATP et de l'APT/ADP translocase qui permet aux ATP synthétisés dans la mitochondrie de sortir dans le cytosol, a été montrée. Une augmentation du stress oxydatif pourrait être en cause : les mitochondries produisent lors de la respiration des dérivés

réactifs de l'oxygène, délétères sur les cellules, et les INTI pourraient augmenter cette production².

Enfin, des mutations de l'ADNmt, induites par les INTI et le stress oxydatif, ont été montrées dans certains tissus comme le muscle. Cette toxicité mitochondriale des INTI a ainsi été rendue responsable des atteintes tissulaires classiques des mitochondriopathies (foie, muscle, nerf, coeur, pancréas) mais le tissu adipeux n'a pas été inclus dans cette liste.

Cependant, dans la lipomatose de Madelung ou Launois-Bensaude, caractérisée par des hypertrophies localisées du tissu adipeux, des mutations de l'ADNmt ou une dysfonction mitochondriale ont été montrées chez certains patients³.

Ainsi, l'hypothèse proposée par Brinkman³ que la toxicité mitochondriale jouait un rôle majeur dans la lipodystrophie des patients traités pour le VIH, méritait d'être étudiée.

Quelle étaient les principales questions posées ?

- Y a-t-il une atteinte mitochondriale dans le tissu adipeux des patients ?
- Si oui, quelles sont les molécules en cause ?
- Cette atteinte est-elle en cause dans la lipoatrophie ?
- Quels sont les mécanismes de cette lipoatrophie ?
- Y a-t-il possibilité de réversion de l'atteinte mitochondriale ?
- Y a-t-il une possibilité de réversion de la lipoatrophie ?

Les données sur le tissu adipeux des patients publiées antérieurement au travail de D. Nolan ont essentiellement porté sur la mesure du contenu en ADNmt. Quelques travaux ont également concerné sa morphologie.

Une diminution du taux d'ADNmt a été rapportée dans les quelques études publiées mais sans modification de sa structure en général (ni mutations ni délétions)^{4,5,6}.

L'étude de C. Shikuma⁴ a comparé le contenu en ADNmt de trois localisations de tissu adipeux sous-cutané (cou, abdomen, cuisse) chez quatre groupes de sujets : 8 patients infectés par le VIH sous INTI avec lipodystrophie et 7 sans, 5 patients infectés non traités et 7 sujets séronégatifs, en utilisant une technique très globale de PCR avec évaluation grossière de l'intensité des bandes colorées au bromure d'éthidium. Cette étude trouve une déplétion de l'ADNmt dans la quasi-totalité des biopsies chez les patients lipodystrophiques, quelle que soit la localisation du prélèvement, mais seulement chez un patient sous INTI non lipodystrophique et chez aucun des sujets des groupes contrôles. Il faut noter que les patients lipodystrophiques

avaient une durée d'exposition aux INTI et aux IP deux fois supérieure aux patients non-lipodystrophiques.

L'étude de U. Walker⁵ a étudié le contenu en ADNmt évalué par Southern Blot du tissu adipeux sous-cutané des fesses de 19 patients sous INTI comparés à 5 patients infectés par le VIH mais naïfs d'INTI et à 8 sujets séronégatifs. Le taux d'ADNmt était semblable chez les témoins et les patients naïfs d'INTI, mais était diminué de 44% chez les patients sous INTI. Si l'on considère la présence ou non d'une lipodystrophie, le taux d'ADNmt était diminué de 39% chez les sujets lipoatrophiques. Là encore les patients lipoatrophiques avaient une durée de traitement antirétroviral, par stavudine et par IP, significativement plus longue que les patients non lipoatrophiques. Ces réductions sont assez modestes et ne peuvent expliquer à elles seules une toxicité mitochondriale. Ces deux études retrouvent donc une association entre la diminution de l'ADNmt et la lipoatrophie et/ou la durée de traitement par INTI et IP. Les techniques utilisées pour quantifier l'ADNmt sont assez grossières.

Dans l'étude de C. Cherry⁷, le tissu adipeux a été prélevé au niveau de la cuisse et du mollet : 33 patients sous ddN (stavudine, didanosine, ou zalcitabine, présentant pour 64% une lipoatrophie) et 16 patients sans ddN (présentant pour 88% une lipoatrophie) ont été comparés à 11 patients infectés par le VIH mais sans traitement au moment de l'étude. Les patients sous ddN présentaient un taux d'ADNmt, évalué par RT-PCR quantitative, plus bas que celui des patients ayant d'autres INTI qui avaient un taux d'ADNmt semblable à celui des contrôles non traités mais plus bas que des témoins séronégatifs. Aucune relation entre le taux d'ADNmt dans le tissu adipeux et la présence ou non de lipodystrophie n'est trouvée dans ce travail. Le fait que les patients sous ddN qui avaient arrêté ces molécules aient un taux d'ADNmt comparable à celui des patients n'ayant jamais reçu de ddN suggère fortement que cette baisse est réversible.

Dans le travail réalisé par David Nolan dans l'équipe australienne de Simon Mallal et qui vient d'être publiée dans *AIDS*, des biopsies de tissu adipeux sous-cutané supra-iliaque de 21 patients sous INTI (9 sous zidovudine et 12 sous stavudine), de 11 patients infectés par le VIH mais non traités, et de 6 contrôles séronégatifs ont été étudiées et les adipocytes isolés par traitement à la collagénase. Ainsi, la mesure du taux d'ADNmt ne concerne que les adipocytes et non les cellules du stroma, nombreuses chez les patients

lipoatrophiques. La mesure du taux d'ADNmt et d'ADN nucléaire a été réalisée par RT-PCR quantitative.

Les auteurs trouvent que le taux d'ADNmt est semblable chez les patients infectés non traités à celui des contrôles en accord avec les études de Shikuma⁴ et de Walker⁵ mais non de Cherry⁷. Par contre, les adipocytes des patients sous INTI présentent une déplétion en ADNmt : le nombre moyen de copies/cellule est de 339 chez les patients sous AZT et de 91 chez ceux sous d4T significativement abaissé par rapport aux séropositifs pour le VIH non traités (708) et aux contrôles séronégatifs (851). Pour exclure l'effet de la ddi, les auteurs refont la même analyse en ne prenant que les patients sous d4T et lamivudine⁷ ou AZT et lamivudine⁷ et retrouvent des résultats similaires. Ainsi le rôle des analogues nucléosidiques dans la diminution du taux d'ADNmt est fortement suggéré.

Lors du Workshop sur les lipodystrophies de juillet 2003 à Paris, cette équipe a complété les résultats sur 92 biopsies de 70 patients et retrouvé les mêmes variations⁸. Une diminution de la protéine COX1 codée par le génome mitochondrial est trouvée chez quelques patients ayant un taux d'ADNmt bas. Cependant, la comparaison du taux d'ADNmt entre les patients avec ou sans lipoatrophie ne montre pas de différence en accord avec le résultat de Cherry⁷.

Une étude du groupe de A. Lombès présentée au Workshop de Paris retrouve la baisse de l'ADNmt dans le tissu adipeux lipoatrophique des patients sous INTI mais montre, en outre, une baisse de l'expression du gène COX2 codé par l'ADNmt et du facteur de transcription impliqué dans la biogenèse mitochondriale PGC1 α , ainsi qu'une altération du processus de biogénèse mitochondriale⁶.

Dans l'article de *AIDS*, D. Nolan évalue également le contenu en mitochondries du tissu adipeux en mesurant de façon très globale la masse protéique mitochondriale. Il la trouve augmentée dans les adipocytes des patients sous d4T mais pas sous AZT et négativement corrélée avec le taux d'ADNmt. Enfin, une étude morphologique du tissu adipeux est réalisée sur les biopsies : les patients sous INTI (d4T ou AZT), qu'ils soient ou non sous IP, présentent des anomalies morphologiques avec présence de petits adipocytes et de lipogranulomes, préservation du stroma et nombreux vaisseaux. Ces anomalies étaient présentes chez tous les patients avec lipoatrophie, mais pas chez le patient sans lipoatrophie évidente. La microscopie électronique montre des altérations mitochondriales présentes uniquement chez les

patients sous INTI avec présence de cytosol très riche en mitochondries dans les adipocytes dont la goutte lipidique centrale est diminuée en volume, ces mitochondries ayant parfois une architecture anormale ressemblant à celle trouvée dans les mitochondriopathies génétiques. Des études antérieures ont concerné la morphologie du tissu adipeux lipoatrophique de ces patients et toutes trouvent des altérations semblables. Le groupe de Domingo avait montré en outre la présence d'une apoptose⁹ que nous avons également retrouvée¹⁰. Ainsi, le tissu adipeux lipoatrophique apparaît comme ayant perdu des cellules adipeuses, par apoptose et phagocytose par les macrophages, et présente des lésions de fibrose avec de nombreux vaisseaux^{8,9,10}. En outre, les mitochondries sont augmentées en nombre et parfois anormales^{5,11}.

En ce qui concerne le rôle des IP, dans cette étude les auteurs ne retrouvent pas d'association entre leur utilisation et la déplétion en ADNmt ou la prolifération mitochondriale suggérant qu'ils ne sont pas en cause dans ces altérations mitochondriales.

Quelle réponse peut-on apporter aux questions posées ci-dessus ?

Y a-t-il une atteinte mitochondriale dans le tissu adipeux des patients VIH traités ?

Les résultats de toutes les études morphologiques montrent que le tissu adipeux lipoatrophique des patients présente un nombre augmenté de mitochondries alors que l'ADNmt est abaissé suggérant une réaction de compensation. Des mitochondries anormales semblables à celles des patients présentant des mitochondriopathies génétiques ont été mises en évidence^{5,8,9}. Une diminution des complexes de la chaîne respiratoire codés par l'ADNmt a été objectivée^{6,8} ainsi qu'une altération du processus de biogenèse mitochondriale⁶. Par contre l'ADNmt ne présente pas de mutations ou de délétions. Ainsi, une dysfonction mitochondriale est présente dans le tissu adipeux lipodystrophique des patients sous INTI.

Quelles sont les molécules en cause ?

La classe des analogues de thymidine est retrouvée dans la majorité des études comme associée à la baisse de l'ADNmt et la stavudine ressort nettement comme étant la molécule qui "déplète" le plus cet ADN, notamment dans l'étude présentée ici. Ces auteurs ont présenté à Paris des résultats sur le suivi longitudinal des patients chez lesquels la d4T avait été

remplacée par l'AZT : ils observent une remontée significative du taux de l'ADNmt⁸.

Cette atteinte est-elle en cause dans la lipoatrophie ?

Le rôle délétère de la stavudine surtout, mais aussi de l'AZT en termes de lipoatrophie périphérique a été souligné par plusieurs études¹². Cependant, dans l'étude de Nolan comme dans celle de Cherry⁶, le taux d'ADNmt n'est pas plus abaissé chez les patients avec lipoatrophie que chez ceux qui n'en présentent pas. Dans les études de Walker⁵ et Shikuma⁴, cette baisse est observée mais pourrait être rapportée à la plus longue durée de traitement des patients lipoatrophiques. L'absence de relation entre le taux d'ADNmt et la lipoatrophie montre qu'il est difficile d'établir une relation directe entre les deux : l'hypothèse qui peut être faite est que le taux de ADNmt abaissé pourrait prédire la survenue d'une lipoatrophie ultérieure.

Quels sont les mécanismes de cette lipoatrophie ?

Ce phénotype résulte clairement de la conjonction de plusieurs facteurs. Le taux d'ADNmt ne reflète que très partiellement la dysfonction mitochondriale et d'autres éléments doivent être pris en compte : biogenèse, activité des complexes, synthèse d'ATP. Seules des mesures de ces paramètres sur les biopsies de tissu adipeux des patients permettront d'appréhender cette dysfonction dans sa globalité. Outre un effet direct sur les mitochondries, les INTI pourraient altérer l'adipocyte par d'autres mécanismes : les études *in vitro* réalisées avec des modèles d'adipocytes en culture montrent que la d4T et l'AZT diminuent le contenu en lipides cellulaires¹³ et sont capables d'induire l'expression de cytokines proinflammatoires et apoptotiques comme le TFNalpha et l'IL6¹⁴ qui altèrent le tissu adipeux. Ces effets pourraient expliquer pourquoi la présence des altérations morphologiques qui prend en compte ces différents effets des INTI est mieux corrélée à la lipoatrophie que le taux d'ADNmt qui ne reflète qu'un des aspects de leurs effets. D. Nolan suggère qu'une dysfonction mitochondriale chronique puisse entraîner une baisse de la capacité des adipocytes à stocker des triglycérides et, à l'inverse, une augmentation d'oxydation des substrats énergétiques et une prolifération mitochondriale.

Dans l'étude de Nolan, environ la moitié des patients étaient sous IP. Bien qu'ils observent des modifications morphologiques chez les patients sous INTI seuls comme

chez ceux sous IP et INTI, les auteurs n'ont pas comparé la sévérité des lésions dans ces deux groupes pour évaluer le rôle des IP. Les études cliniques ont confirmé que la prise concomitante de d4T et d'IP aggrave la lipoatrophie périphérique montrant le rôle synergique de ces deux classes thérapeutiques¹².

Y a-t-il possibilité de réversion de l'atteinte mitochondriale et de la lipoatrophie ?

Le travail présenté par D. Nolan à Paris montre que lorsque la d4T est remplacée par l'AZT, on assiste à une remontée rapide du taux d'ADNmt. Cependant, chez ces patients, les anomalies morphologiques persistent et il n'y a pas de réversion de la lipoatrophie cliniquement. Ces résultats montrent encore une fois une disjonction entre la lipoatrophie et le taux d'ADNmt. Cependant, il est possible d'espérer une récupération lente de la lipoatrophie largement postérieure à celle de l'ADNmt. Des résultats encourageants ont été obtenus dans l'étude Mitox de Andrew Carr¹⁵ qui montre que les patients sous d4T ou AZT mis sous ABC récupéraient lentement leur tissu adipeux périphérique avec 34% de récupération au niveau des jambes à 2 ans.

Ainsi, les analogues de thymidine induisent une baisse du taux de ADNmt dans le tissu adipeux des patients qui semble réversible et qui pourrait précéder la lipoatrophie clinique et être un des éléments qui l'induisent. Ces molécules sont également en cause dans les anomalies morphologiques majeures trouvées dans le tissu adipeux des patients dont la réversibilité n'a pas été montrée. Si le rôle des IP dans la baisse de l'ADNmt semble peu probable, leur rôle dans la sévérité des altérations morphologiques peut être envisagé d'après des études récentes. La dysfonction mitochondriale induite par les INTI apparaît comme un élément important mais non unique dans la genèse de la lipoatrophie des patients VIH traités.

Les points clés

Les INTI induisent très probablement une dysfonction mitochondriale dans le tissu adipeux qui se traduit non seulement par une baisse de l'ADNmt mais aussi par d'autres anomalies encore peu étudiées. Les INTI agissent également sur le tissu adipeux par d'autres mécanismes.

Les analogues de thymidine, AZT et surtout d4T, ont été associés à une baisse du taux d'ADNmt dans le tissu adipeux qui serait réversible en cas de remplacement par un autre INTI.

Alors que les analogues de thymidine ont été impliqués dans la survenue de lipoatrophie en clinique, le taux d'ADNmt n'est pas associé à la présence d'une lipoatrophie.

La physiopathologie de la lipoatrophie est complexe et fait intervenir de nombreux facteurs parmi lesquels la dysfonction mitochondriale.

Le tissu adipeux lipoatrophique présente des modifications morphologiques importantes dont la sévérité pourrait être corrélée à la lipoatrophie.

1 - Fromenty B

"Atteintes mitochondriales au cours des thérapies antirétrovirales"
Transcriptases, 2003, 107, 17-9

2 - Lewis W

"Mitochondrial dysfunction and nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy : experimental clarifications and persistent clinical questions"

Antiviral Res, 2003, 58, 189-97

3 - Brinkman K, Smeitink JA, Romijn JA, Reiss P

"Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy"

Lancet, 1999, 354, 1112-5

4 - Shikuma CM, Hu N, Milne C et al.

"Mitochondrial DNA decrease in subcutaneous adipose tissue of HIV-infected individuals with peripheral lipoatrophy"

AIDS, 2001, 15, 1801-9

5 - Walker UA, Bickel M, Lutke Volksbeck SI et al.

"Evidence of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor-associated genetic and structural defects of mitochondria in adipose tissue of HIV-infected patients"

J Acquir Immune Defic Syndr, 2002, 29, 117-21

6 - Jardel C, Barthélémy C, Jan V et al.

"Defective mitochondrial biogenesis with altered adipose tissue differentiation in patients with HIV-related lipodystrophy"

Antiviral Therapy, 2003, 8, L40

7 - Cherry CL, Gahan ME, McArthur JC et al.

"Exposure to dideoxynucleosides is reflected in lowered mitochondrial DNA in subcutaneous fat"

J Acquir Immune Defic Syndr, 2002, 30, 271-7

8 - Hammond E, Nolan D, McKinnon E et al.

"Subcutaneous fat tissue mitochondrial DNA déplétion and adipose toxicity are strongly associated with nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) therapy in HIV-infected patients"

Antiviral Therapy, 2003, 8, L16

9 - Domingo P, Matias-Guiu X, Pujol RM et al.

"Subcutaneous adipocyte apoptosis in HIV-1 protease inhibitor-associated lipodystrophy"

AIDS, 1999, 13, 2261-7

10 - Bastard JP, Cervera P, Jan V et al.

"Increased IL-6 and TNF- α expression is related to increased apoptosis and decrescendo differentiation in adipose tissue from patients with HIV-related lipotrope"

Antiviral Therapy, 2003, 8, L10

11 - Lloreta J, Domingo P, Pujol RM et al.

"Ultrastructural features of highly active antiretroviral therapy-associated partial lipodystrophy"

Virchows Arch, 2002, 441, 599-604

12 - Viard J-P

"d4T et risque de lipoatrophie"

Transcriptases, 2003, 1079-11

13 - Caron M, Auclair M, Kornprobst M, Capeau J

"Stavudine and didanosine partly reversed the adverse effects of innavigable on cell differentiation and response to insulin but enhanced apoptosis of cultured adipocytes"

Antiviral Therapy, 2002, 7, L6

14 - Jones SP, Janneh O, Back DJ, Pirmohamed M

"Altered adipocytokine gene expression in murine 3T3-F442A adipocytes treated with protease inhibitors and nucleoside reverse transcriptase inhibitors"

Antiviral Therapy, 2003, 8, L11

15 - Martin A, Carr A, Ringland C et al.

"Long-term changes in lipodystrophy after switcher from thymidine nucleoside analogues to abacavir"

Antiviral Therapy, 2003, 8, L15