

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Évaluation des rétinoïdes dans l'infection par le VIH : impact de
l'infection et du traitement antirétroviral**

Par Maude Loignon

**Département des sciences biomédicales
Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade
Maître es sciences (M.Sc.), sciences biomédicales, option générale.**

Août 2007

©Maude Loignon, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Évaluation des rétinoïdes dans l'infection par le VIH : impact de l'infection et du
traitement antirétroviral**

Présenté par :
Maude Loignon

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur

Directeur de recherche

Codirecteur

Membre du jury

Résumé

Depuis le milieu des années 90, le traitement antirétroviral incluant les médicaments de la classe des inhibiteurs de la protéase a permis une diminution de la mortalité et de la morbidité associée au VIH. Cependant, ces nouveaux traitements sont la cause de complications métaboliques et d'anomalies morphologiques qui affectent une diversité de systèmes et d'organes dont plusieurs ressemblent aux manifestations « retinoid-like ». La pathogenèse de ces complications n'est pas élucidée et constitue un sujet de pointe dans le domaine de recherche sur le VIH et un enjeu majeur pour les cliniciens. En plus d'affecter la qualité de vie des patients atteints, ces complications métaboliques conduisent ultimement à l'échec thérapeutique. Les rétinoïdes sont de puissantes molécules de signalisation intracellulaire dont l'action ultime passe par la liaison aux récepteurs nucléaires RAR et RXR. Le RXR est une molécule versatile qui forme des hétérodimères avec différents récepteurs nucléaires qui pourraient être impliqués dans les effets délétères associés aux traitements antirétroviraux.

Notre étude porte sur l'évaluation du dosage sérique des rétinoïdes et leurs corrélations avec les paramètres immunologiques, métaboliques et virologiques, chez des patients avec une infection chronique par le VIH ainsi que chez des volontaires sains. Les résultats de nos travaux montrent que les niveaux d'acide rétinoïque sont diminués par le traitement antirétroviral. Les concentrations du rétinol sont aussi affectées négativement chez les patients ayant un contrôle sous optimal de la réplication virale. Ces modifications du métabolisme des rétinoïdes peuvent affecter l'expression des gènes contrôlés par ces molécules et être responsables des effets néfastes ou bénéfiques observés chez les patients infectés par le VIH recevant un traitement antirétroviral.

Mots clé

VIH, Antirétroviraux, Complications métaboliques, Troubles hormonaux, Rétinoïdes, Acide rétinoïque, Rétinol, Rétinal, RXR, RAR, RALDH, Récepteurs nucléaires, Vitamine A.

Abstract

Since the mid '90s, the antiretroviral therapy, including drugs from the protease inhibitors class, led to a diminution of HIV-associated mortality and morbidity. However, since new treatments are the cause of metabolic complications and morphologic abnormalities affecting diverse systems and organs. Several of these manifestations resemble “Retinoid-like” adverse events. The pathogenesis of these complications is not fully understood and it is an important issue in HIV research and a major challenge for clinicians. These metabolic complications alter the quality of life of affected patients and will eventually lead to therapeutic failure. Retinoid are strong intracellular signalling molecules and their action is exerted through nuclear receptor RAR and RXR. The RXR are versatile molecule and form heterodimers with different other nuclear receptors and this might be implicated in anti-viral treatment-associated deleterious effects. Our study assessed the serum retinoid levels and their correlation with immunological, metabolic and virologic parameters in patients with a chronic HIV infection and also in healthy volunteers. The results of our work document that the retinoic acid levels are diminish by antiretroviral therapy. Retinol concentrations are also negatively affected in patients with a suboptimal suppression of viral replication. These alterations of retinoid metabolism could influence the expression of genes controlled by these molecules and may be responsible for both deleterious and beneficial effects seen in HIV infected patients receiving antiretroviral treatment.

Key words

HIV, Antiretroviral, Metabolic complications, Hormonal complications, Retinoid, Retinoic acid, Retinol, Retinal, RXR, RAR, RALDH, Nuclear receptor, Vitamin A.

Table des matières

Identification du jury	ii
Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations	ix
Dédicace	xiii
Remerciements	xiv
Avant-propos	xv
Chapitre 1. Le VIH	2
1.1 L'origine et la découverte.....	2
1.2 La phylogénie et l'épidémiologie.....	2
1.3 La pathogenèse.....	4
1.3.1 La morphologie.....	4
1.3.2 L'organisation du génome.....	5
1.3.3 Le cycle de réplication.....	7
1.3.4 La dynamique virale et les mutations.....	9
1.3.5 Le rôle des cellules présentatrices de l'antigène.....	9
1.3.6 Le système lymphatique et les réservoirs.....	10
1.3.7 La réponse cellulaire.....	10
1.3.8 La réponse Th1/Th2.....	11
1.3.9 La réponse humorale.....	12
1.4 Les manifestations cliniques et les complications.....	12
Chapitre 2. Le traitement antirétroviral	16
2.1 Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse.....	17
2.1.1 La pharmacologie.....	17
2.1.2 Le mécanisme d'action.....	18
2.2 Les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse.....	19
2.2.1 La pharmacologie.....	19
2.2.2 Le mécanisme d'action.....	19
2.3 Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.....	19
2.3.1 La pharmacologie.....	19
2.3.2 Le mécanisme d'action.....	20
2.4 Inhibiteurs de la protéase.....	20
2.4.1 La pharmacologie.....	20
2.4.2 Le mécanisme d'action.....	21
2.5 Les inhibiteurs de la fusion.....	21
2.6 Les inhibiteurs de l'intégrase.....	22
2.7 Les inhibiteurs du CCR5.....	22
Chapitre 3. Les complications métaboliques et hormonales de l'infection par le VIH	24

3.1	Le syndrome métabolique.....	24
3.2	Les anomalies lipidiques.....	25
3.3	Les complications osseuses.....	26
3.4	Les complications coronariennes.....	28
3.5	Les complications hormonales.....	29
3.6	La toxicité mitochondriale.....	32
3.7	Les manifestations « retinod-like ».....	32
Chapitre 4.	Les rétinoïdes.....	35
4.1	La structure chimique et la nomenclature.....	35
4.2	Le rôle général.....	36
4.3	Le métabolisme.....	36
4.4	Le mécanisme d'action.....	39
4.5	Les manifestations cliniques.....	40
4.6	Thérapeutique.....	44
Chapitre 5.	Article 1.....	47
	Introduction à l'article.....	48
	Hypothèse.....	48
	Objectif.....	48
	Abstract.....	51
	Introduction.....	52
	Methods.....	53
	Participants.....	53
	Serum retinoid level.....	53
	Plasma viral load.....	54
	Lymphocyte phenotyping.....	54
	Metabolic parameters.....	55
	Statistical analysis.....	55
	Results.....	55
	HPLC profile of serum retinoids.....	56
	Serum RA levels.....	60
	Serum ROL levels.....	60
	Correlation between ROL and RA levels.....	62
	ROL/RA ratio.....	62
	Discussion.....	62
	Acknowledgements.....	67
	References.....	68
Chapitre 6.	Discussion.....	74
6.1	Les implications pathogéniques.....	78
6.2	Les implications thérapeutiques et les projets de recherche futurs.....	82
6.3	Conclusions.....	87
	Bibliographie.....	88

Liste des tableaux**Chapitre 2.**

- I. Inhibiteurs de la transcriptase inverse.....17
- II. Inhibiteurs de la protéase.....20

Chapitre 5.

- I. Baseline demographics and descriptors.....57
- II. Baseline descriptors for two groups of HIV-Infected participants.....58

Liste des figures

Chapitre 1.

1.	Phylogénie du VIH.....	3
2.	Adultes et enfants vivant avec le VIH: Estimations en 2006.....	3
3.	Morphologie du VIH.....	4
4.	Organisation du génome du VIH.....	6
5.	Mécanisme d'attachement et fusion du VIH.....	7
6.	Cycle de réplication du VIH.....	8
7.	Évolution naturelle du VIH.....	13

Chapitre 3.

1.	Lipoatrophie du visage.....	25
2.	Lipoaccumulation intra-abdominale par tomодensitométrie DEXA.....	25
3.	Lipoaccumulation abdominale.....	26

Chapitre 4.

1.	Structure chimique des rétinoïdes.....	35
2.	Métabolisme général de la vitamine A chez l'humain.....	37
3.	Voie enzymatique de la conversion de la vitamine A.....	38
4.	Voie de signalisation intracellulaire de la vitamine A.....	39

Chapitre 5.

1.	Retinoic acid serum levels in different patients.....	59
2.	Longitudinal and cross-sectional assessments of retinoic acid serum levels.....	61

Chapitre 6.

1.	Effets des antirétroviraux sur le métabolisme des rétinoïdes.....	79
----	-------------------------------------------------------------------	----

Liste des sigles et abréviations

ABCA1	ATP binding cassette A1
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondriale
ADNv	Acide désoxyribonucléique proviral
Ac	Anticorps
Ag	Antigène
Anti-TPO	Anti-thyroperoxydase
Apo B	Apolipoprotéine B
AR	Acide rétinoïque
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARV	AIDS associated retrovirus
CD	Cellule dendritique
CDC	Center for disease control and prevention
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellule présentatrices de l'antigène
CRABP-I/II	Protéine cellulaire liant l'acide rétinoïque de type I ou II
CRBP-I/II	Protéine cellulaire liant le rétinol de type I ou II
CTA	Combinaison de thérapie antirétrovirale
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
CV	Charge virale
CYP 450	Cytochrome P450
DVA	Déficiencence en vitamine A
Env	Enveloppe
ER	Esters de rétinol
EVA	Excès en vitamine A
FXR	Farnesoid X receptor
GA	Granulome annulaire
Gag	group antigene

G-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes
GM-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et macrophages
gp	glycoprotéine
HAART	Thérapie antirétrovirale hautement active
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HLA	Human lymphocyte antigene
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
HTLV-III	Human T lymphocyte virus type III
IGF-II	Facteur de croissance à l'insuline de type II
INNTI	Inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse
INTI	Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse
IL-2	Interleukine-2
IL-4	Interleukine-4
IL-5	Interleukine-5
IL-6	Interleukine-6
IL-7	Interleukine-7
IL-10	Interleukine-10
IL-15	Interleukine-15
INF- γ	Interféron γ
IP	Inhibiteur de la protéase
IRIS	Immune reconstitution inflammatory syndrome
kb	kilobase
kd	kilodalton
LAV	Lymphadenopathy associated virus
LCR	Liquide céphalorachidien
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LNTP	Survivant à long terme
LPM	Leucémie promyélocytaire
LPT	Lipoprotéine lipase pancréatique
LRAT	Lécitine :Rétinol transférase
LTCD4+	Lymphocyte T CD4+
LTR	Long terminal repeat
LXR	Liver X receptor

MAC	<i>Mycobactérium avium</i> complex
MIP-1 α	Macrophage inhibitory protein 1 α
MIP-1 β	Macrophage inhibitory protein 1 β
NK	Cellule tueuse
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
Pol	polymérase
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
PPC	Pneumonie à <i>Pneumocystis carinii</i>
PTH	Hormone parathyroïdienne
PVVIH	Personne vivant avec le VIH
PXR	Pregnane X Receptor
RAL	Rétinal
RALDH	Rétinaldéhyde déhydrogénase
RANK	Facteur nucléaire κ B
RANKL	Ligand du facteur nucléaire κ B
RANTE	Regulated upon activation T cell expressed and secreted
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque
RARE	Élément de réponse à l'acide rétinoïque
RBP	Protéine liant le rétinol
REH	Rétinyl ester hydrolase
ROL	Rétinol
ROLDH	Rétinol déhydrogénase
RRE	Élément de réponse de rev
RXR	Récepteur X de rétinoïdes
RXRE	Élément de réponse des rétinoïdes X
SAR	Syndrome à l'acide rétinoïque
SDF-1	Stromal cell derived factor-1
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SNC	Système nerveux central
SREBP-1	Sterol regulated element binding protein 1
T3	Triiodothyronine
T3R	T 3 Receptor
T4	Thyroxine

TAR	Élément de réponse de transactivation
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TI	Transcriptase inverse
TK2	Thymidine kinase II
TNF α	Tumor necrosis factor α
TRH	Thyréolibérine
TSH	Thyréotrophine
VDR	Vitamin D receptor
VIF	Virus de l'immunodéficience féline
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine type 1
VIH-2	Virus de l'immunodéficience humaine type 2
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité

Dédicace

J'aimerais dédier ce travail à tout ceux et celles qui croient que certaines choses sont inatteignables car même si on vient de loin, il est possible de s'accomplir, de réussir et de se dépasser lorsque la passion guide notre vie.

À mes amis, ceux et celles infectées par le VIH, pour les disparus mais surtout ceux qui restent, vous êtes ma motivation et ma détermination à faire avancer la science, même si ce n'est qu'une goutte d'eau dans l'océan.

Remerciements

Je tiens à remercier Isabelle Gagnon qui m'a initiée au monde du laboratoire. Sincères remerciements à Hélène Brodeur qui a eu la patience de m'initier, de me former et de m'accompagner avec respect, valorisation et confiance dans l'univers compétitif de la recherche fondamentale. Merci à Sylvie Oble pour ses précieux conseils et Valérie Baldacchino pour son humour, ainsi que pour leurs soutiens technique, académique et moral. Enfin merci à toute l'équipe des laboratoires des Drs Bhat & Lacroix de m'avoir procuré un environnement de recherche d'exception où s'allient la rigueur et le plaisir. Je ne vous oublierai jamais! Merci aussi aux Drs. Phaneuf et Bhat pour leurs expertises, leurs disponibilités et leurs aides dans l'orientation de mon projet. Merci à Lise Cyr, pour son éternel dévouement, disponibilité, ses nombreuses attentions et son écoute attentive.

Merci à mes amies, Chantale, Eve et Emmanuele pour les nombreuses fois où je vous ai tenues en éveil avec mon charabia scientifique si pointu. Vos encouragements ont été importants dans la poursuite de mes projets.

Merci à ma famille, mon père, Michel, ma mère Nicole ainsi qu'Alain, Sylvie, Sophie, Michel et Anne-Marie de votre écoute attentive, vos conseils judicieux et votre amour mais surtout votre confiance inébranlable en mes capacités. J'aimerais remercier particulièrement ma mère qui m'a patiemment corrigée.

Merci à Arnaud et Tamara pour votre compréhension et patience envers votre maman étudiante, parfois si peu disponible. Vous êtes la source de mon inspiration, vous êtes mon équilibre.

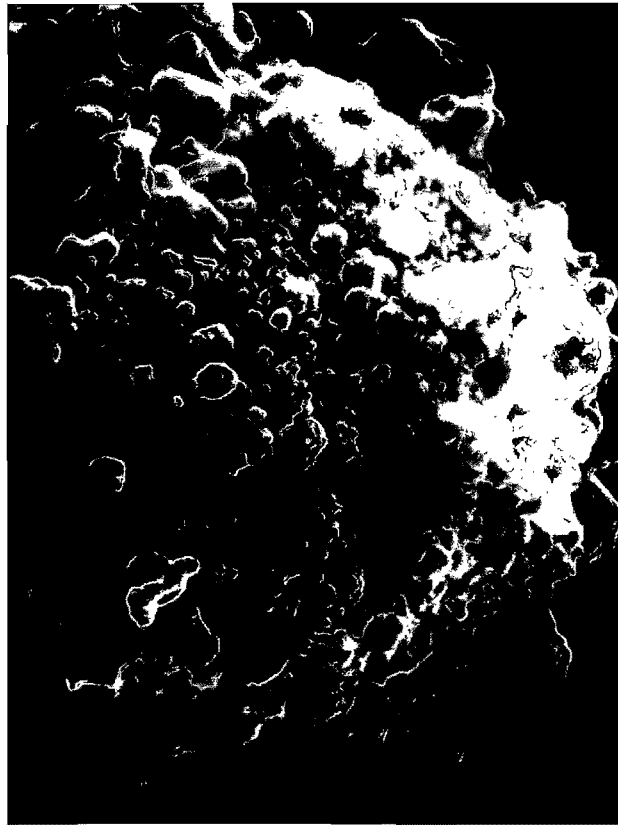
Enfin, cher Emil, je ne saurais jamais être assez reconnaissante pour ta présence à mes côtés. Merci d'avoir pris le temps de me transmettre tes connaissances scientifiques et médicales ainsi que pour ta compréhension des hauts et des bas de mes 30 ans. Merci d'être pour moi le modèle de courage, de persévérance et de détermination qui me permet de cheminer vers la poursuite de mon rêve.

Avant propos

Au cours des 25 dernières années, l'urgence d'intervenir face à l'infection par le VIH a suscité la curiosité de la communauté scientifique et a mobilisé des milliers de chercheurs devant l'ampleur de ce drame humain. Des groupes de recherche, à travers le monde, se sont penchés sur divers aspects tel que l'épidémiologie, la pathogenèse, la pharmacologie et les sciences cliniques pour ne nommer que ceux-ci, afin de trouver et de mettre en oeuvre des moyens de contrer cette infection fatale. L'organisation mondiale de la santé et les nations unies ont même créés des programmes permanents et plusieurs grands instituts de recherche américain et européens on vu le jour. Ceux-ci se sont engagés dans la course à la découverte de technologies diagnostiques et thérapeutiques pour ralentir ou guérir cette infection virale. 25 ans plus tard, des millions de pages ont été écrites, des milliards de dollars ont été dépensé mais le jour de l'éradication est encore hors de portée. Nous constatons à présent que les médicaments développés pour ralentir la progression du VIH ont dramatiquement contribués à la diminution de la morbidité et de la mortalité associée au virus. Par ailleurs, ils sont malheureusement la source d'un grand nombre de réactions indésirables, qui minent la qualité de vie, stigmatisent les personnes vivants avec le VIH et contribuent à l'échec thérapeutique. À cause de préoccupations pécuniaires, de rentabilité et de mise en marché, trop peu de recherches sont menées par l'industrie pharmaceutique afin de comprendre et de minimiser ces aspects moins reluisants des thérapies anti-VIH. Ce projet de recherche vise à comprendre un des aspects, encore non étudié, de la pathogenèse pouvant s'avérer être la pierre angulaire de l'apparition de telles complications. En effet, les rétinoïdes sont d'importantes molécules de signalisations capables d'interagir avec une multitude de cibles biologiques. Elles ont une action directe sur le VIH et sont connues pour causer des troubles métaboliques dans des conditions cliniques variées. L'étude des rétinoïdes chez les personnes infectées par le VIH qui reçoivent ou non un traitement, ainsi qu'à des volontaires sains est certainement le point de départ incontournable de la compréhension de cette problématique.

Chapitre 1

LE VIH



1. Le VIH

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est complexe. En plus d'engendrer des problématiques psychosociales importantes elle implique des liens étroits entre le virus lui-même, sa morphologie et ses mécanismes d'actions, avec d'une part l'organisme humain, sa physiologie, ses fonctions immunitaires ainsi que génétiques et d'autre part la pharmacothérapie. La compréhension de cette triple interaction prend tout son sens dans une étude abordant les rétinoïdes dans le cadre du VIH puisqu'ils agissent à différents niveaux des trois grands points cardinaux de ce triangle interactif, à la base de la pathogenèse des complications métaboliques.

1.1 L'origine et la découverte

Le 5 juin 1981 le *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) d'Atlanta aux Etats-Unis rapportait la présence d'une forme rare de pneumonie à *Pneumocystis carinii* (PPC) chez un groupe d'hommes homosexuels, marquant ainsi le début de l'épidémie de SIDA (syndrome d'immunodéficience humaine). Le sida est une condition médicale grave dans laquelle le système immunitaire se trouve affaibli et permet le développement des infections opportunistes et de certains cancers souvent fatals. L'agent causal de cette infection virale a été identifié en 1983 par le groupe de Dr. Montagnier (1) qui le nomme « lymphadenopathy associated virus » (LAV). La nature virale du sida a été confirmée en 1984, par l'équipe de Dr. Gallo (2) qui a isolé le « Human T Lymphocyte virus type III » (HTLV-III) et de Levy qui a mis en évidence dans des ganglions le « AIDS associated retrovirus » (ARV). Finalement, les chercheurs ont constaté qu'il s'agit du même virus et l'ont appelé le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Un virus similaire, le VIH de type 2 (VIH-2), a été isolé en Afrique en 1986 par Clavel (3). L'infection par le VIH se transmet par la voie sanguine, le sperme, les sécrétions vaginales, le liquide pré-éjaculatoire et le lait maternel. Les modes de transmissions les plus fréquents sont les transfusions sanguines, les relations sexuelles non protégées, l'échange de seringues contaminées et la transmission de la mère à l'enfant lors de la naissance ou par l'allaitement maternel (4).

1.2 La phylogénie et l'épidémiologie

Les types 1 et 2 du VIH, antigéniquement distincts, ne peuvent être identifiés que par leur simple aspect phénotypique externe car ils sont d'apparences similaires. Leurs différences

se situent au niveau cellulaire et résident dans le poids moléculaire des protéines qui les composent ainsi que par les gènes accessoires de leurs génomes respectifs (5). Ainsi, la protéine *vpu* du VIH-1 est remplacée par *vpx* chez le VIH-2 (6). Les gènes qui composent le VIH-2 possèdent beaucoup plus d'homologie avec le virus d'immunodéficience simienne (VIS) qu'avec le VIH-1 (7). Ces deux types de VIH possèdent 42% d'homologie entre eux. Il semble, en effet, de plus en plus évident que le VIH-2 ait été introduit chez l'humain par les singes sootey mangabeys, réservoirs naturels du virus, non pathogène chez cette espèce. Le VIH-1 est le plus répandu dans le monde et il est responsable du plus grand nombre de cas de SIDA dont l'origine phylogénique incertaine semble être due un transfert du chimpanzé vers l'humain (8-11) (Figure 1). Ce mémoire traitera du VIH-1, dénommé ci-après VIH dans ce document, afin de simplifier et d'alléger le texte.

Actuellement, l'infection par le VIH se trouve au stade de pandémie. Elle est responsable de plus de 40 millions d'infections globalement, adultes et enfants confondus, et affecte d'avantage les pays d'Afrique subsaharienne, d'Asie, d'Europe orientale et d'Amérique latine. On dénombre près de 5 millions de nouveaux cas d'infection et 3 millions de décès chaque année (Figure 2.). On estime que le sida a tué près de 25 millions d'individus depuis son apparition en 1981 (12).

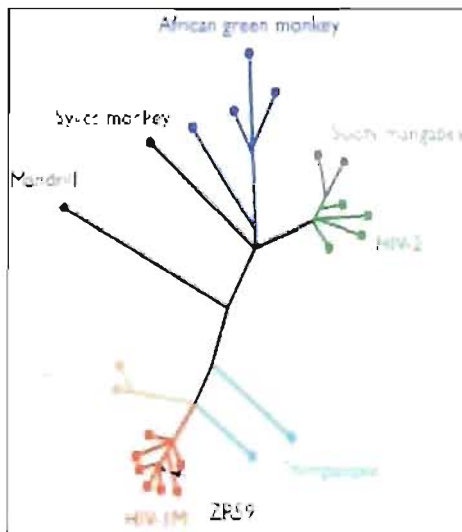
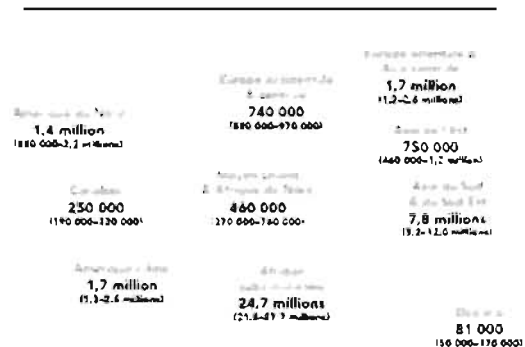


Figure 1. Phylogénie du VIH
© OMS & UNAIDS



Total: 39,5 (34,1–47,1) millions

Figure 2. Adultes et enfants vivant avec le VIH: Estimations en 2006.

1.3 La pathogénèse

Le VIH est un virus du groupe VI, de la famille des *Retroviridae* appartenant au genre *Lentivirinae*. L'évolution d'une infection à lentivirus est habituellement chronique et comporte de longues périodes de latence au cours desquelles les signes cliniques ne sont pas apparents. Ce type d'infection est aussi caractérisé par une réplication virale persistante et une atteinte du système nerveux central (SNC). Les virus appartenant à cette famille sont non transformants, de constitution globulaire, enveloppés et leur génome est composé d'acide ribonucléique (ARN). Ils sont répandus à travers le règne animal et à titre d'exemple mentionnons le VIS et le virus de l'immunodéficience féline (VIF) (13-14).

1.3.1 La morphologie

Les particules virales du VIH ont un diamètre d'environ 100 nm et sont constituées d'une membrane externe formée d'une bi-couche lipidique. Cette enveloppe est issue de la dernière cellule hôte et est acquise lors du processus de bourgeonnement des virions. Elle contient des protéines du complexe « Human Lymphocyte Antigen » (HLA) dont fait parti le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ainsi que des protéines d'adhésion cellulaire qui facilitent l'interaction avec d'autres cellules cibles. Dans cette membrane sont enchâssés 72 complexes de glycoprotéines (gp) qui adoptent une conformation de trimère de gp 120. Celle-ci est liée, par des liens faibles, à une protéine transmembranaire, la gp 41 et ensemble forment la gp 160. La gp 120 interagit avec le récepteur CD4 pour permettre la fixation du VIH sur la cellule à infecter alors que la gp 41 est impliquée dans le phénomène de fusion du virus avec la membrane de la cellule hôte.

Le VIH possède 2 capsides. La capside externe ou matrice, est une coque protéique constituée de la répétition d'une sous-unité protéique la Gag p17 issue de la protéolyse de la Gag p55 et enchâssée du côté interne dans la bi-couche lipidique. La capside interne, polyédrique, est constituée d'une répétition de protéine p24 et protège le génome. Le génome du VIH est constitué de deux copies d'ARN

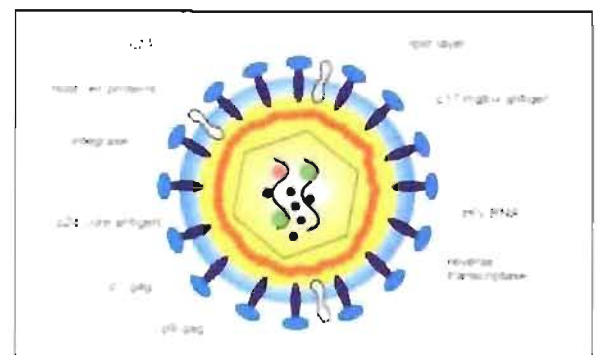


Figure 3. Morphologie du VIH

© HIV Medicine 2006

monocaténaire de 9181 nucléotides, reliées par leur extrémité 5' et font parti d'un complexe

d'acides nucléiques et de protéines. Ce complexe inclus la nucléoprotéine Gag p7 et la transcriptase inverse (TI), une ARN polymérase ADN dépendante, qui transcrit l'ARN viral en ADN proviral (ADNv). Les virions possèdent l'organisation enzymatique nécessaire à la réplication : la TI, l'intégrase p32 et la protéase p11. L'ADNv ainsi synthétisé s'intègre dans l'ADN de la cellule hôte par ses extrémités Long terminal repeat (LTR), des séquences terminales redondantes. L'information génétique virale se retrouve intégrée de façon permanente dans la cellule hôte et sera exprimée pendant toute la vie active de la cellule. Cette transcription cellulaire résulte en de nouveaux génomes et ARN messager (ARNm) viraux qui seront traduits en protéines pour constituer de nouveaux virions (**Figure 3**) (15-19).

1.3.2 L'organisation du génome

La réplication du VIH dépend de trois gènes principaux : Gag (group antigène), Pol (polymérase), Env (enveloppe). La structure habituelle du génome du VIH est 5'LTR-gag-pol-env-LTR3'. Le LTR est une région présente aux deux extrémités du génome viral. Lorsque intégrées dans l'ADN de la cellule hôte, ces régions sont adjacentes à l'ADN hôte. Les régions du LTR ne codent pour aucune protéine virale mais la liaison des facteurs de transcription, par exemple NF-kappa B, rendent les LTR susceptibles à la stimulation par les lymphocytes T CD4+ (LTCD4+) infectés et augmentent la réplication du VIH (18,20). Il est intéressant de noter que les LTR contiennent un élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) et que les rétinoïdes peuvent donc réguler les LTR et augmenter ou diminuer la réplication virale selon les conditions de culture cellulaire (21).

Les gènes gag et env codent respectivement pour des protéines de la nucléocapside (p17, p24 et p7) ainsi que des glycoprotéines de l'enveloppe virale (gp 160). Le gène pol code pour la TI et les enzymes p9 et p32. De plus, le VIH contient dans son ARN, son propre génome de 9 KB, qui code pour 6 gènes accessoires, soit *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vpu*, *vif*. Les protéines *tat*, *rev* et *nef* sont produites rapidement au début du cycle de réplication virale. Les gènes *tat* et *rev* codent pour des protéines régulatrices qui s'accumulent dans la nucléocapside. *Tat* est activé par la cycline T1 qui lie l'élément de réponse de transactivation (TAR) localisé dans le LTR. *Rev* est un facteur d'exportation cellulaire (22-25). Il se lie à l'élément de réponse de *rev* (RRE) situé dans le gène *env* et permet la transition de l'expression précoce de protéine régulatrice vers une expression tardive de

protéine structurale. Les gènes *tat* et *rev* sont essentiels au processus de traduction car ils stimulent la transcription de l'ADNv en ARNm, son élongation et son transport à partir du noyau vers le cytoplasme de la cellule hôte. Il faut mentionner que les rétinoïdes par le biais des récepteurs rétinoïdes et du récepteur de l'hormone thyroïdienne, coopèrent avec la *tat* pour induire une forte transactivation des LTR, ce qui stimule la transcription du VIH (26).

Nef inhibe l'expression des récepteurs CD4 et des molécules du complexe du HLA de classe I et II de la surface des cellules infectées. Cette caractéristique représente un important mécanisme d'échappement immunitaire contre l'attaque des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et évite la reconnaissance par les LTCD4+. *Nef* peut aussi interférer l'activation des lymphocytes T en se liant à des protéines impliquées dans la transduction des signaux intracellulaires. Enfin, *nef* est aussi associé à un haut taux de réplication virale. Un des mécanismes impliqués est le trafic du cholestérol vers les sites d'assemblage des virions près de la membrane plasmique. En effet, *Nef* modifie le récepteur « ATP binding cassette A1 » (ABCA1) responsable de la sortie du cholestérol des macrophages (27-29). Il faut mentionner que les rétinoïdes diminuent cet effet en augmentant l'expression du ABCA1 et aussi de l'hétérodimère LXR-RXR (Liver X receptor) (29b). Le *Vpr* est essentiel à la réplication dans les cellules qui ne se divisent pas tels que les macrophages. Il peut stimuler le LTR et d'autres promoteurs viraux et semble important dans le transport du

complexe de pré-intégration au noyau. Enfin il peut arrêter les cellules en phase G2 du cycle cellulaire (30). *Vpu* est impliqué dans le bourgeonnement de virions et le recyclage de la gp120 par le réticulum endoplasmique (31). *Vif* semble avoir un rôle dans la réplication virale car les virions

déficients pour *Vif* sont incapables de compléter la synthèse de l'ADNv (32). Cette réplication dépend d'un inhibiteur cellulaire APOBEC3G (33-34). *Vif* forme un complexe avec APOBEC3G et bloque ainsi l'activité inhibitrice de cette enzyme (Figure 4) (23,35).

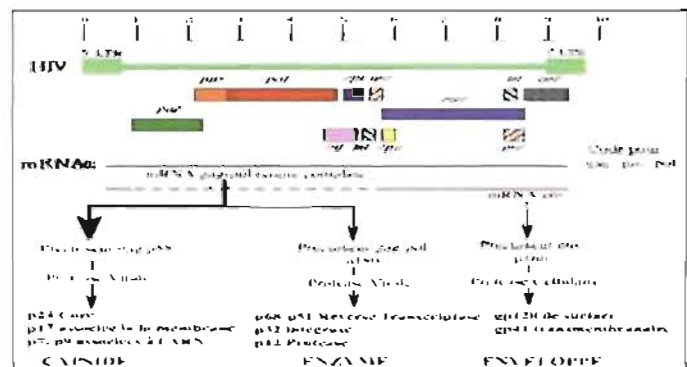


Figure 4. Organisation du génome du VIH (© Benjamin Pavi)

1.3.3 Le cycle de réplication

Le CD4, récepteur primaire du VIH, est une glycoprotéine monomérique de 55 kDa que l'on retrouve sur la surface cellulaire de près de 60% des lymphocytes T, des précurseurs de lymphocytes T de la moelle osseuse et du thymus. On retrouve aussi ce récepteur sur les monocytes, les macrophages, les éosinophiles, les cellules dendritiques et les microglies du SNC. La fonction du CD4 est la reconnaissance du complexe peptide-CMH et la transduction du signal. Les domaines extra-cellulaires du CD4 lient les domaines $\beta 2$ des molécules du CMH de classe II, sur les cellules présentatrices de l'antigène (APC) ou sur les cellules cibles.

Le CD4 est le récepteur primaire de haute affinité du VIH car la région V2 du récepteur lie certains épitopes de la gp 120. Cette liaison induit un changement de conformation de la gp120 qui permet l'interaction de sa boucle V3 avec le corécepteur CXCR4 ou CCR5 essentiels à l'entrée du virus. La gp 41 subit à son tour un changement de conformation qui permet l'insertion de sa partie NH2 terminale hydrophobe dans la cellule cible, rendant possible le rapprochement, l'ouverture et la fusion des membranes virales et cellulaires et la pénétration de la capside dans la cellule hôte (Figure 5).

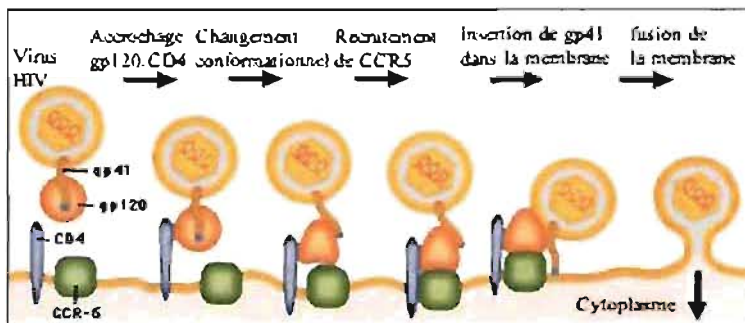


Figure 5. Mécanisme d'attachement et fusion du VIH

Le CXCR4 se trouve principalement sur les cellules T naïves et son ligand naturel est le « stromal cell derived factor 1 » (SDF-1). Le CCR5 est présent sur les cellules dérivées des monocytes ainsi que les cellules T mémoires tandis que ses ligands sont le « Regulated upon activation T cell expressed and secreted » (RANTES), le « macrophage inhibitory protein 1 α and β » (MIP-1 α et β). Les virus à tropisme T infectent principalement les LTCD4 activés du sang périphérique en utilisant le CXCR4 pour entrer dans la cellule cible. Les souches à tropisme M peuvent infecter les monocytes et les macrophages en

utilisant le CCR5. Les individus possédant un défaut génétique dans le CCR5 sont résistants à l'infection par le VIH. Après le processus d'entrée, il y a la décapsidation ce qui permet l'injection de matériel viral tel que l'ARN, la TI, l'intégrase, la ribonucléase et la protéase dans le cytoplasme de la cellule. La TI libère l'ARN simple brin des protéines virales auxquelles il se trouve attaché et le copie d'abord en un ADN complémentaire de 9kb puis en un ADNv intermédiaire double brin. Cet ADNv est transporté au noyau cellulaire où il est circularisé puis intégré dans le génome cellulaire par l'intégrase pour demeurer dans une forme latente sans activité transcriptionnelle. Le VIH cible en effet les lymphocytes T auxiliaires engagés dans la réponse immune contre le virus, et qui, par leur activation, sont les plus susceptibles d'être affectés par le virus. Le provirus intégré dans le génome de la cellule hôte est transcrit en ARNm par l'ARN polymérase II cellulaire et, sous l'action de la protéase, est épissé en fragments qui produiront les protéines *tat* et *rev*. Le processus d'assemblage des nouveaux virions débute avec l'accumulation de *rev* au sein du noyau ce qui inhibe graduellement l'épissage et les protéines *gag* et *env* qui sont produites à partir de l'ARN génomique de pleine longueur. *Gag* se lie à l'ARN viral et est empaqueté dans de nouveaux virions prêts à bourgeonner. Ceux-ci sont libérés pour

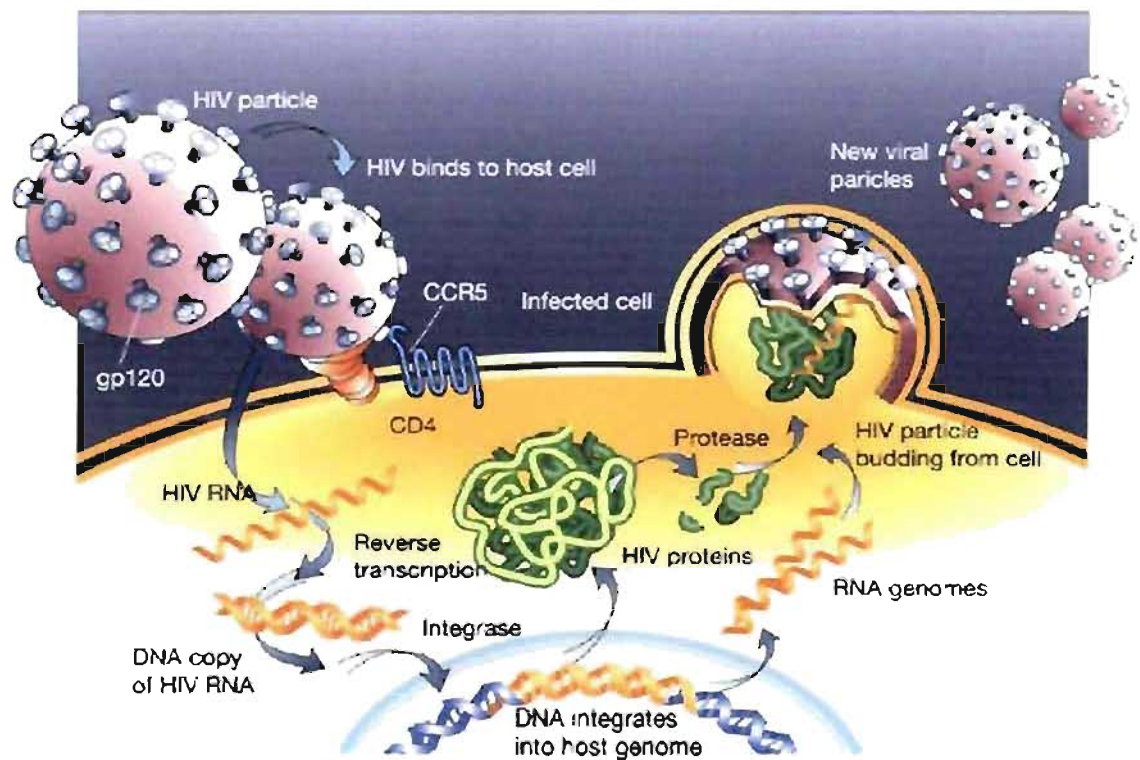


Figure 6. Cycle de la répliation du VIH (© Robin A. Weiss)

infecter d'autres cellules et recommencer le cycle viral (**Figure 6**) (17,19,36,37).

1.3.4 La dynamique virale et les mutations

La réplication du VIH est un processus dynamique et rapide qui mène à une production et une élimination moyenne de 10^9 nouveaux virions par jour. Chez le VIH, le processus de transcription inverse permet beaucoup d'erreurs et d'insertions de mutations spontanées, en moyenne 1-10 mutations par génome et par cycle de réplication. Ce phénomène s'explique par la présence d'un seul brin d'ARN qui ne permet pas l'intervention des mécanismes de réparation par l'utilisation des nucléotides complémentaires. La conséquence est une grande variabilité virale qui peut parfois être la source des virions moins compétents à se répliquer. Par contre, le plus souvent, l'apparition de mutations rend difficile le développement des vaccins et des cibles thérapeutiques efficaces à long terme. Les mutations associées à la résistance aux médicaments peuvent s'accumuler sous la pression de sélection, dont les conséquences sont la dominance de la population de virus mutés, qui échappe à l'action des antirétroviraux et mène à une suppression incomplète de la réplication virale, à l'échec thérapeutique et à la progression de la maladie vers le sida (37-40).

1.3.5 Le rôle des cellules présentatrices de l'antigène

Les CPA sont les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques (CD). Leurs particularités résident dans leur capacité à exprimer, au niveau de leurs membranes, des molécules du CMH de classe II et de délivrer un signal de co-stimulation nécessaire à l'activation des LTCD4+. L'activation des deux branches du système immunitaire, humorale et à médiation cellulaire, requiert des cytokines sécrétées par les LTCD4+. Les CD sont les plus efficaces CPA dans l'induction d'une réponse immunitaire spécifique. À partir de la moelle osseuse où les précurseurs sont produits, elles migrent vers les organes lymphatiques primaires et vers les tissus sous-muqueux des systèmes digestif, urinaire, reproducteur et respiratoire. Les CD sont capables de prendre et d'apprêter les antigènes (Ag) par la voie cytosolique pour les Ag endogènes, présentés sur une molécule de CMH I et la voie endocytaire pour les Ag exogènes, présentés sur une molécule de CMH II. Les CPA migrent dans les organes lymphatiques secondaires où ils deviennent matures et activent les cellules T spécifiques à l'Ag. Les CD constituent une famille diversifiée de cellules ayant des fonctions et un phénotype différent en fonction des tissus et du degré de

maturation. Il faut noter que les rétinoïdes sont impliqués dans le contrôle de l'apoptose et de la présentation de l'antigène par les CD immatures tandis qu'ils confèrent une cytoprotection aux CD matures (41-43).

1.3.6 Le système lymphatique et les réservoirs

L'efficacité de la dissémination virale est déterminée par la disponibilité du substrat cellulaire permissif au VIH, la proximité du virus et des cellules hôtes. Les CPA infectés par le VIH, tel que les macrophages et les CD établissent des contacts étroits via la synapse immunologique/virologique, avec les lymphocytes CD4+ pour leur présenter l'Ag et les infecter. On retrouve les macrophages infectés de façon productive dans différents tissus. Sous l'action de la protéine *nef* virale, ces cellules induisent le relargage de chimiokines afin de recruter les lymphocytes par chimiotactisme. Ces signaux ne permettent pas l'activation des lymphocytes mais seulement leur entrée au tout début du cycle cellulaire, ce qui constitue le mécanisme primordial de l'établissement des réservoirs viraux chez les LTCD4+ latents. Les virus peuvent résider et se multiplier dans les macrophages de façon stable car les antirétroviraux pénètrent mal et sont peu efficaces dans ces cellules. Certaines régions anatomiques telles que le cerveau, les poumons et l'œil, sont des sites sanctuaires peu affectés par le système immunitaire et les médicaments (44-47).

1.3.7 La réponse cellulaire

La réponse à médiation cellulaire dépend des sous-populations de lymphocytes T. Ces cellules doivent être activées par un Ag spécifique ce qui permet l'expansion clonale. Les cytokines sécrétées par les LTCD4+ contribuent à l'activation de différentes cellules T effectrices responsables de cette réponse cellulaire ainsi que des cellules effectrices non spécifiques telles que les cellules tueuses (NK) et les macrophages activés. En effet, l'interleukine-2 (IL-2) sécrétée par les LTCD4+ stimule la prolifération et la différenciation des cellules T cytotoxiques tueuses (CTL). Le CTL lie l'Ag apprêté combiné à des molécules du CMH - I à la surface de la membrane plasmique d'une cellule infectée. Les CTL ont la capacité de reconnaître et d'éliminer par un processus de lyse membranaire, les cellules infectées par un virus. Cette réponse favorise aussi l'expansion des populations de LTCD4+ et CD8+ mémoire. Les CTL et les cellules mémoires sont importantes dans le contrôle du VIH et de la progression de la maladie. Les patients infectés par le VIH montrent habituellement un déclin rapide du nombre de cellules CD4+. Par contre, certains

patients qualifiés de survivants à long terme (LTNP : long term non progressors), ne présentent pas une telle diminution des CD4+, et ne progressent pas vers le sida et ce, même en absence d'un traitement antirétroviral. Cette condition particulière serait la conséquence d'une production accrue de CTL spécifiques à une grande variété de protéines du VIH. Cette forte réponse des CTL semble être causée par une capacité accrue de certains haplotypes du HLA à présenter plus efficacement les particules virales et à induire une réponse immunitaire efficace. En effet, certaines personnes possédant un haplotype HLA, CMH de classe I, B27 et B57 ont un seuil d'équilibre viral (viral set point) plus bas ainsi qu'une progression plus lente de leur infection (19,37,48).

Les CTL des personnes infectées par le VIH (PVVIH) montrent un phénotype immature et une déficience en perforine, important dans le processus de lyse cellulaire. Malgré ces altérations, les CTL conservent tout de même leur profil de sécrétion de chimiokines. Enfin, les capacités des CTL à détruire les cellules infectées par le VIH sont associées à une production concomitante d'interféron- γ (INF- γ) et de facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α). Les lymphocytes CD8+ peuvent aussi devenir infectés par le VIH car une fois activés (CD8+38+) ils peuvent exprimer le CD4 (48b, 48c). Le CD38+ est le marqueur d'activation lymphocytaire le mieux caractérisé et un facteur de pronostic bien établi. Il faut noter que le CD38 possède un RARE et est donc régulé par les rétinoïdes (49, 49b).

1.3.8 La réponse Th1/Th2

Les lymphocytes T peuvent être différenciés en cellules T effectrices Th1 et Th2, en fonction des leurs patrons de sécrétion de cytokines. Ces cellules sont caractérisées par des exigences d'activation moins strictes, leurs expressions accrues de molécules d'adhésion et leur production de molécules effectrices membranaires ou solubles. Les cellules de type Th1 produisent d'avantage d'IL-2 et d'INF- γ . Ces cytokines sont essentielles aux fonctions effectrices des cellules NK, des CTL et des macrophages. Ce profil sécrétoire leur confère un rôle protecteur dans la réponse immune à médiation cellulaire contre le VIH. Les lymphocytes T de type Th2 produisent les IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10 associées à la réponse immunitaire humorale (36,37,41). Les rétinoïdes, par l'intermédiaire de l'hétérodimère PPAR γ -RXR, sont impliqués entre autre dans la production des INF- γ , IL-2 et IL-12 (50).

1.3.9 La réponse humorale

Les lymphocytes B matures activés par l'Ag passent de la moelle osseuse vers la circulation sanguine, lymphatique ou encore les organes lymphoïdes. L'interaction d'une cellule B mature avec l'Ag déclenche son activation, sa prolifération et sa différenciation. Le processus débute avec la fixation de l'Ag sur les molécules d'anticorps (Ac) membranaires de la cellule B. La réponse immunitaire humorale spécifique au VIH et son impact dans la progression de la maladie n'est pas clairement caractérisée. Plusieurs études ont montré que les personnes infectées par le VIH développent, avec le temps, des Ac neutralisants contre la souche virale primaire. Cependant, avant que ces Ac soient produits, de nouvelles souches virales résistantes aux Ac neutralisants font leur apparition. Ce processus est le mécanisme majeur d'échappement à la réponse humorale (37,41,51,52).

1.4 Les manifestations cliniques et les complications

Après une période d'incubation d'une durée variant de quelques jours à quelques semaines, l'exposition au VIH est suivie dans 40-90% des cas, par le syndrome d'infection virale aiguë du VIH ou primo-infection. Ce syndrome se manifeste entre le moment de l'infection et le développement des Ac, particulièrement entre la 2^{ème} et la 4^{ème} semaine post infection et dure normalement entre 7 et 14 jours. Les manifestations de ce syndrome sont hétérogènes et transitoires. Elles peuvent s'apparenter à une mononucléose infectieuse ou une grippe aiguë (37). Ce manque de spécificité clinique rend difficile le diagnostic précoce de l'infection par le VIH. Pendant cette phase aiguë, le virus se réplique intensément et la charge virale (CV) du VIH peut se situer à plus de 100 millions de copies d'ARN viral par ml de plasma. Parallèlement, on observe un déclin rapide des LTCD4+, qui augmenteront par la suite mais à des niveaux inférieurs à ceux établis avant l'infection (**Figure 7.**) Enfin, pendant ces premiers cycles de réplication virale, d'importants processus pathogéniques s'organisent afin d'envahir un certain nombre de tissus réservoirs, notamment le système lymphatique gastro-intestinal.

Après l'infection aiguë, un équilibre entre la CV et la réponse immune de l'hôte est atteint et plusieurs patients ne montrent aucun symptôme clinique pendant des années. La virémie diminue pour atteindre un seuil d'équilibre viral. Ce seuil permet d'établir en partie le pronostic de la progression de la maladie à long terme. Même sans antirétroviraux, cette période d'infection chronique auparavant qualifiée de période de latence clinique, peut

durer entre 8-10 ans. Elle est accompagnée d'une répllication virale persistante au sein du système lymphatique et des réservoirs viraux (Figure 5.). Cette phase d'infection chronique peut aussi être ponctuée de manifestations cliniques associées à des désordres légers au niveau immunologique, dermatologique, hématologique et neurologique. Des symptômes constitutifs tels que la fièvre inexplicquée, la perte de poids, les sueurs nocturnes et la diarrhée peuvent apparaître. Une description non exhaustive de ces symptômes est présentée dans la catégorie B du système de classification du CDC. Pendant cette période et en absence d'un traitement antirétroviral, on observe une chute graduelle des cellules CD4+. Lorsque les CD4+ atteignent un nombre de 350 cellules par mm³ de plasma ou que la CV s'approche de 100 000 copies d'ARN par ml de plasma, un traitement antirétroviral est généralement proposé aux patients (53,54).

Les patients en phase SIDA de l'infection par le VIH présentent une immunodéficience sévère : les LTCD4+ chutent en dessous de 200 cellules par mm³ de plasma (Figure 7) et la CV tend à réaugmenter. Ces patients ont un risque de développer des infections opportunistes. Les microorganismes en cause sont normalement présents chez les individus en bonne santé mais n'ont aucune conséquence pathologique, ce qui n'est pas le cas chez les immunodéficients. Ces infections apparaissent lorsque le nombre de LTCD4+ se situe en dessous d'un certain seuil. Au-delà de 500

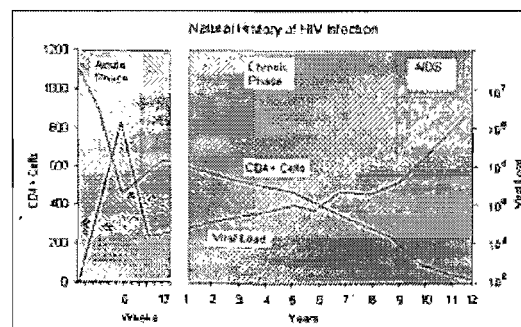


Figure 1: CD4+ T-cell count and viral load during HIV infection.

Figure 7. Évolution naturelle du VIH

(© HIV Medicine 2006)

LTCD4+, le système immunitaire est considéré fonctionnel. Entre 500 et 200 LTCD4+, des infections et des symptômes non associés au SIDA ainsi que des cancers tels que le sarcome de Kaposi peuvent survenir. Entre 200 et 100 LTCD4+ on voit apparaître, en plus, la PPC. Entre 100 et 50 apparaissent les toxoplasmoses et en dessous de 50 le *Mycobacterium avium complex* (MAC) et le cytomégalovirus (CMV). Plus l'immunité diminue, plus le nombre d'infections opportunistes qui peuvent potentiellement se développer augmente. En dessous de 200 cellules CD4+, une prophylaxie primaire est nécessaire contre la PPC et en bas de 100 CD4+ contre le MAC. De plus, après un épisode d'infection opportuniste, une prophylaxie secondaire est administrée au patient afin d'éviter une réactivation de l'infection. Le SIDA demeure une condition médicale grave et souvent

fatale qui doit être prise en charge en centres hospitaliers. Elle nécessite des médicaments spécifiques aux microorganismes pathogènes en cause en plus d'un traitement antirétroviral dont le but ultime est l'obtention d'une reconstitution immunitaire au-delà des 200 cellules par mm^3 de plasma (36,37,55).

Chapitre 2

Le traitement antirétroviral



2. Le traitement antirétroviral

Le développement des molécules antirétrovirales est probablement l'avancée scientifique médicale la plus spectaculaire de tous les temps. En effet, dès 1987, soit 4 ans après l'identification du VIH, était approuvé l'AZT, un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse (INTI) et à présent plus de 25 molécules sont disponibles pour les PVVIH. L'infection par le VIH a bouleversé les processus gouvernementaux d'approbation des médicaments car l'urgence de sauver des vies a permis l'obtention rapide des autorisations de mise en marché. Entre les années 1986 et 1995, quelques molécules antirétrovirales ont été synthétisées. Depuis 1996, l'usage intensif de nouvelles classes d'antirétroviraux telle que les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) et les inhibiteurs de la protéase (IP), a mené à une diminution notoire de la mortalité et de la morbidité, particulièrement chez les individus présentant un SIDA (56). D'autre part, l'espérance de vie a augmenté à tel point que nous constatons à présent les effets à long terme des médicaments (51,57). Le traitement antirétroviral vise des étapes précises du cycle de réplication virale. Les cibles thérapeutiques actuellement disponibles sont orientées vers l'inhibition de la fusion, de la TI, de la protéase, de l'intégrase et des co-récepteurs viraux tel que CCR5. Plusieurs autres cibles sont également à l'étude in vitro ou chez le modèle animal. Bien que les antirétroviraux aient contribué à prolonger la vie des PVVIH, il n'en demeure pas moins que plusieurs défis sont toujours présents. La façon de suivre et de traiter une PVVIH ne peut plus être appliquée de façon systématique au bassin d'individus infectés, elle doit être individualisée en tenant compte de certains facteurs tant médicaux qu'humains. En effet, le choix thérapeutique peut être influencé par des facteurs de résistance virale, d'habitude de vie, d'observance, d'effets secondaires, d'intolérance et surtout de complications métaboliques. Enfin, la médecine doit faire preuve d'ouverture dans les décisions concernant le début d'un traitement, son changement, les molécules à utiliser et l'interruption du traitement. Une chose est certaine, les antirétroviraux s'utilisent désormais en combinaison d'au moins 3 molécules où d'habitude deux médicaments sont des INTI et l'autre un IP ou un INNTI (58,59). Cette combinaison, appelée thérapie antirétrovirale hautement active (HAART) est de plus en plus dénommée combinaison de thérapie antirétrovirale (CTA).

2.1 Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

Les INTI ont été les premiers antirétroviraux approuvés pour le traitement du VIH et du SIDA (60,61). Ils sont des analogues nucléosidiques de la thymidine, de l'adénosine, de la cytosine ou de la guanosine. Ces médicaments inhibent la phase de transcription du cycle viral du VIH (**tableau I**).

Tableau I. Inhibiteurs de la transcriptase inverse

Nucléosidiques	Non nucléosidiques	Nucléotidiques
AZT (zidovudine)	Névirapine	Tenofovir
ddI (didanosine)	Delavirdine	
ddC (zalcitabine)	Efavirenz	
d4T (stavudine)		
3TC (lamivudine)		
abacavir		
emtricitabine		
<u>Combinaison de doses fixes</u>		
AZT+3TC (Combivir)		
AZT+3TC+abacavir (Trizivir)		
Emtricitabine+tenofovir (Truvada)		

2.1.1 La pharmacologie

Les INTI partagent des similarités concernant le mécanisme d'action, l'activation intracellulaire et de la pharmacocinétique. De façon générale, ces médicaments ont une biodisponibilité élevée, habituellement au delà de 80%, avec pour exception l'AZT et la ddI. Ces médicaments sont rapidement absorbés, atteignant des concentrations maximales dans le plasma en une à deux heures après l'administration. Les molécules de cette classe sont non liées ou faiblement liées aux protéines plasmatiques. La conséquence de cette faible liaison aux protéines est une absence d'interaction médicamenteuse associée au déplacement des protéines. La plupart des médicaments de cette classe sont excrétés dans l'urine sous formes inchangées. Cependant, les médicaments qui sont largement excrétés par les reins doivent subir un réajustement de la dose chez les patients qui ont une dysfonction rénale. Les INTI sont des molécules hydrosolubles qui ne nécessitent pas l'intervention de métabolisme oxydatif tel que le cytochrome P450 (CYP450) hépatique, ce

qui élimine les possibilités d'interactions médicamenteuses par induction ou l'inhibition de ce système. En ce qui concerne le métabolisme hépatique, d'autres systèmes peuvent être impliqués, tels que la glucoronidation, les alcools déshydrogénases ou encore les phosphorylases de nucléosides purines. Des interactions médicamenteuses peuvent survenir lorsque d'autres molécules prises par le patient sont métabolisées par un même système (62-64).

2.1.2 Le mécanisme d'action

Les INTI agissent, après avoir subi une triple phosphorylation par les kinases intracellulaires de la cellule infectée et du virus. La première étape de phosphorylation est cruciale. Elle varie en fonction du type de cellule et de la phase du cycle cellulaire. Par exemple, les monocytes et les macrophages en phase de repos mitotique ne peuvent phosphoryler suffisamment les INTI, c'est pourquoi ces médicaments sont moins efficaces dans ces types cellulaires, qui constituent des réservoirs viraux. Les INTI inhibent la TI du VIH par compétition avec le triphosphate du nucléoside endogène, en se liant au site actif de l'enzyme. De plus, ils sont un substrat pour la TI et s'incorporent dans la chaîne d'ADN en formation. En effet, ces analogues synthétiques ne possèdent pas de groupement 3'-hydroxyle nécessaire à l'allongement de la chaîne d'ADN. L'intégration des INTI dans l'ADN met fin à l'élongation de la chaîne d'ADN et inhibe ainsi la synthèse virale. Ces molécules peuvent causer des toxicités cellulaires importantes car elles interagissent de façon similaire avec l'ADN polymérase humaine. Elles se trouvent ainsi incorporées dans l'ADN nucléaire et mitochondriale de l'hôte (58). La réplication de l'ADN nucléaire chez l'humain se fait par l'entremise de l'ADN polymérase α et δ , tandis que les processus de réparation sont effectués par les types β et ϵ . Enfin, la polymérase γ est responsable de la réplication de l'ADN mitochondriale (ADNmt). Les INTI sont tous capables d'inhiber la polymérase β et γ . Bien qu'il ne semble pas y avoir de manifestations cliniques à l'inhibition de la première, l'inhibition de la polymérase γ semble être étroitement associée aux dysfonctions mitochondriales. Parmi ceux-ci, mentionnons des atteintes du système nerveux central et périphérique, des myopathies et cardiomyopathies, des désordres hématologiques (anémie), pancréatite, etc. (65) (voir chapitre 3). Il est intéressant de noter que l'usage des INTI mène aussi à diverses complications métaboliques telles que des hyperlactatémies asymptomatiques, de l'acidose lactique et de la stéatose hépatique. Certaines toxicités comme la neuropathie, apparaîtraient davantage chez des patients avec

une suppression sous-optimale du VIH. D'autre part, plusieurs cas de neuropathies, d'acidose lactique et de myopathies ont été décrits chez des patients n'ayant jamais pris des INTI, attestant la capacité du virus à induire ce genre de toxicité (66-69, 70-73).

2.2 Les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse

2.2.1 La pharmacologie

Le ténofovir, seul médicament de cette classe, possède une demi-vie de 17 heures, ce qui permet un régime thérapeutique d'une dose par jour. Cependant, ce médicament n'est que peu biodisponible (25%). Les repas riches en gras semblent en augmenter la biodisponibilité jusqu'à 40%. Le ténofovir est principalement métabolisé au niveau rénal par la filtration glomérulaire et la sécrétion tubulaire active (Tableau I.) (62-64).

2.2.2 Le mécanisme d'action

Le mécanisme d'action du ténofovir, est similaire à celui des INTI. En tant qu'analogue des nucléotides, il entre en compétition directe avec les nucléotides naturels dans le but d'inhiber l'enzyme TI et de terminer de façon précoce l'élongation de la chaîne d'ADN. Il diffère cependant des INTI car il est composé d'une base nucléique et d'un pentose en plus d'être pré-activé chimiquement par la présence d'un groupement phosphate. Afin d'atteindre sa forme active, il doit subir une double phosphorylation intracellulaire mais puisqu'il ne requiert pas la triple phosphorylation, il peut s'incorporer plus rapidement dans les chaînes d'ADNv en formation (71,74).

2.3 Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

2.3.1 La pharmacologie

La caractéristique principale de ces molécules est leur métabolisme important via le cytochrome P450 3A4, partagé par de nombreux médicaments. Étant inducteurs du CYP 3A4, ils sont à l'origine d'une multitude d'interactions médicamenteuses. De plus, l'efavirenz est aussi un inhibiteur du CYP 3A4, 2C9 et 2C19. Leur biodisponibilité, après administration orale, est très bonne, allant à plus de 90% pour la névirapine, 85% pour la délavirdine tandis qu'elle est moindre et variable pour l'efavirenz. La demi-vie plasmatique est longue pour l'efavirenz (40-55 heures) permettant ainsi l'administration uni quotidienne, intermédiaire pour la névirapine (25-30 heures) et plutôt courte (5-6 heures)

pour la délavirdine. Ces médicaments sont éliminés principalement par voie rénale et ont une forte pénétration dans le liquide céphalorachidien (LCR) (62-64).

2.3.2 Le mécanisme d'action

Tout comme les INTI, les médicaments de cette classe visent l'inhibition de l'enzyme TI. Cependant, le mécanisme d'action implique une liaison directe mais non compétitive, de la molécule aux résidus d'acides aminés qui se trouvent près du site catalytique, dans une poche de liaison hydrophobe. Cette liaison induit un changement de conformation du site actif. En conséquence, le nombre de nucléotides pouvant être liés est diminué et la polymérisation de l'ADN est ralentie de façon significative. Les INNTI se trouvent déjà sous leur forme active et ne nécessitent pas une phosphorylation (75-77).

2.4 Les inhibiteurs de la protéase

Tableau II. Inhibiteurs de la protéase

Non amplifiés (« non boosted »)	Amplifiés avec ritonavir (« ritonavir boosted »)
Saquinavir	Saquinavir + ritonavir
Ritonavir	Lopnavir + ritonavir
Indinavir	Fosamprénavir + ritonavir
Nelfinavir	Atazanavir + ritonavir
Atazanavir	Tipranavir + ritonavir
	Darunavir + ritonavir

2.4.1 La pharmacologie

La pharmacocinétique des IP est variable selon le produit mais actuellement, à part le nelfinavir, à présent rarement utilisé, et l'atazanavir, on recommande d'utiliser les IP conjointement à une dose réduite de ritonavir, de l'ordre de 100-200mg, pour l'amplification de l'effet antirétroviral due à l'inhibition de leur principale voie métabolique, le CYP 3A4. À cause du métabolisme par ce complexe et à cause de leurs effets inducteurs ou inhibiteurs sur ce système, une multitude d'interactions médicamenteuses est possible. La biodisponibilité orale se situe autour de 20 à 80%. La demi-vie plasmatique varie de 1.5 à 2 heures pour l'indinavir et le saquinavir non amplifié, de 3,5 à 6 heures pour le ritonavir, le nelfinavir, le lopinavir et le tipranavir. Enfin, le fosamprenavir, l'atazanavir et le darunavir ont une demi-vie variant entre 7 et 15 heures (62-64) (**Tableau II**).

2.4.2 Le mécanisme d'action

L'enzyme protéase du VIH permet le clivage de la polyprotéine Gag-Pol en sous-unités protéiques fonctionnelles. Lorsque la protéase est inhibée, il en résulte la formation de particules virales non infectieuses. Les médicaments de cette classe sont conçus pour se loger parfaitement dans le site actif de l'enzyme protéase du VIH. Dès leur apparition au milieu des années 1990, les IP ont révolutionné le traitement antirétroviral. Ils constituent un élément essentiel des combinaisons thérapeutiques antirétrovirales. Malgré leurs effets bénéfiques virologiques, immunologiques et cliniques ils sont aussi étroitement associés à l'apparition de complications métaboliques telles que la lipodystrophie, les dislipidémies, le diabète, l'ostéopénie et l'augmentation du risque de maladies cardiovasculaire. Enfin, il existe une résistance croisée partielle entre les médicaments de cette classe, ce qui peut causer un épuisement de l'arsenal thérapeutique disponible et mener à l'échec thérapeutique. Les nouvelles molécules développées, telles que le tipranavir et darunavir sont actives contre des virus multi-résistants. Nous devons aussi mentionner que les IP ont d'autres actions en plus de l'activité antirétrovirale, telles que l'inhibition de l'angiogénèse, ce qui explique les effets bénéfique sur le sarcome de Kaposi, immunologiques, hormonaux et métaboliques. Les effets de certains IP sur le métabolisme des rétinoïdes témoignent du rôle clé de l'acide rétinoïque dans la pathogenèse des troubles métaboliques, de certaines manifestations cliniques bénéfiques ou néfastes. Les défis conceptuels futurs portent sur la conception de médicaments encore plus actifs, qui possèdent une barrière génétique élevée, engendrent moins de résistance, ont une meilleure tolérance avec moins d'effets indésirables, moins d'interactions médicamenteuses et une meilleure pharmacocinétique (63,78-83).

2.5 Les inhibiteurs de la fusion

Enfuvirtide est le seul médicament approuvé de la classe des inhibiteurs de l'entrée du VIH dans des cellules cible. Ce médicament est un peptide de 36 acides aminés, semblable à la région HR2 de la gp41 du VIH. La gp41 possède deux régions : la HR1 et la HR2. L'interaction entre ces deux régions constitue une étape nécessaire au processus de fusion du VIH avec la membrane de la cellule cible. En se liant au HR1, l'enfuvirtide empêche cette interaction est ainsi la fusion et l'infection de nouvelles cellules. Cette molécule s'administre par injection sous-cutanée. Sa demi-vie étant courte (environ 4 heures), il doit être administré 2 fois par jour ce qui représente des inconvénients importants pour les

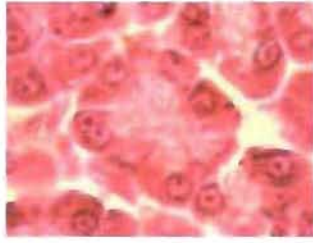
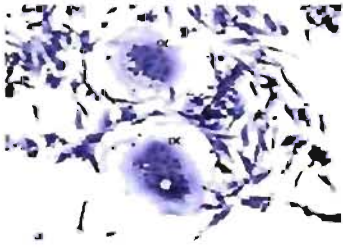
PVVIH. Son métabolisme consiste en la dégradation du peptide en acides aminés correspondants. La résistance peut émerger à cause du développement des anticorps à l'égard du peptide (62-64,84).

2.6 Les inhibiteurs de l'intégrase

Aucun médicament de cette classe n'a été approuvé. Le Raltégravir (MK-5018) est le seul représentant de cette nouvelle classe d'antirétroviraux présentement disponible dans des études cliniques d'accès élargi. Son activité antirétrovirale est puissante et il semble être bien toléré (84b).

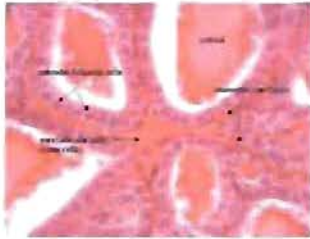
2.7 Les inhibiteurs de CCR5

Ces molécules se lient aux domaines transmembranaires du CCR5, le corécepteur utilisés par le VIH pour s'attacher à la cellule cible, tel que les monocytes et les macrophages, pour ensuite permettre la fusion. La cible de cette classe d'antirétroviraux est la cellule humaine et non le cycle virale. Le seul produit actuellement disponible sous la forme d'étude d'accès élargi est le Maraviroc. Il est un antagoniste sélectif et réversible du CCR5 et sa liaison entraîne une suppression importante du VIH. La résistance du VIH envers cette molécule peut apparaître à la suite du changement de tropisme du VIH pour le corécepteur CCR5 ou par la sélection des variants viraux qui reconnaissent le complexe récepteur inhibiteur. Il s'administre par voie orale et a une demi-vie de dissociation longue procurant ainsi, une occupation prolongée du corécepteur. In vitro il est un substrat pour CYP3A4 et sa pharmacocinétique peut être influencée par les médicaments, comme les IP, qui ont des effets inducteurs ou inhibiteurs sur ces enzymes (84-87).



Chapitre 3

Les complications métaboliques et hormonales de l'infection par le VIH



3. Les complications métaboliques et hormonales de l'infection par le VIH

3.1 Le syndrome métabolique

Bien qu'un groupe important de la population générale soit à risque de développer un syndrome métabolique pour des raisons d'ordre héréditaires, alimentaires et autres, il est particulièrement présent chez les PVVIH traités par un HAART incluant des INTI et des IP et ce depuis le début des années 1990 (88-93). Selon le « Adult Treatment Panel III » le syndrome métabolique se définit par la présence de 3 critères ou plus parmi les suivants : un tour de taille supérieur à 88 cm chez la femme et de 102 cm chez l'homme, des triglycérides supérieurs à 1,7 mmol/L, un cholestérol HDL inférieur à 1,29 mmol/L chez la femme ou 1,04 chez l'homme, un glucose supérieur à 6,1 mmol/L et une pression artérielle supérieure à 130/85 mm Hg. Cette définition a été modifiée pour être adaptée aux différences ethniques. Ainsi, selon l'« International Foundation for Diabetes » un tour de taille supérieur à 80 cm chez la femme et de 94 cm chez l'homme est un des critères. Les conséquences du syndrome métaboliques sont diverses et préoccupantes. En effet on observe un risque de diabète non insulino-dépendant, d'insuffisance coronarienne et d'accident vasculaire cérébrale, une augmentation de la mortalité cardio-vasculaire, de cancer digestif (foie et colon), du cancer du sein et de maladie polykystique ovarienne. D'autres manifestations cliniques sont souvent associées, comme la lipodystrophie, les effets « retinoid-like », la nécrose avasculaire de la hanche, l'ostéopénie et l'ostéoporose. Ces multiples anomalies peuvent compliquer l'évolution d'une infection par le VIH, témoignant des perturbations métaboliques chroniques et profondes chez les PVVIH traités (94). Certains IP, comme l'indinavir, réduisent, in vitro, le transport du glucose par le GLUT4. D'autres IP perturbent la différenciation adypocytaire et conjointement avec les INTI altèrent l'équilibre de la sécrétion des adypocytokines, et des facteurs de transcription, tel que le « Sterol Regulator Element Binding Protein 1 » (SREBP-1), des récepteurs nucléaires comme les « peroxisome proliferator activating receptors » (PPAR), les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) et le rétinoïque X récepteur (RXR). Ces récepteurs nucléaires agissent sous forme des dimers (homo ou hétérodimères) (95). Puisque le RXR est un partenaire commun à plusieurs autres récepteurs nucléaires, une compétition de ces récepteurs peut survenir. Par exemple, une interaction réciproque négative dans la voie de signalisation des PPAR et des hormones thyroïdiennes peut mener à une séquestration des RXR in vitro (96). Les hétérodimères de RXR semble avoir un rôle pathogénique clé dans le syndrome métabolique.

3.2 Les anomalies lipidiques

Le syndrome de lipodystrophie implique des désordres métaboliques associés à une relocalisation des graisses corporelles se traduisant par une lipoaccumulation abdominale, dorsale et viscérale, ou une lipoatrophie du visage et des membres ou les deux. Les mécanismes pathogéniques sont encore peu connus. La lipodystrophie mène à diverses complications médicales, ainsi qu'à une diminution de la qualité de vie, un changement des habitudes de vie et une stigmatisation sociale. Ces conséquences contribuent au manque d'adhérence aux antirétroviraux et à l'échec thérapeutique. Elle survient fréquemment et est associée à l'hypertriglycéridémie et l'hypercholestérolémie (51,57,97).

La lipoatrophie est l'un des signes les plus évident et les plus précoces de la lipodystrophie. Elle se traduit par une perte des graisses sous cutanées du visage, des zones periorbitales, zygomatiques (bulle de Bichat) et temporales mais aussi au niveau des membres et des fesses. La perte adipeuse des membres peut être accompagné par une lipoaccumulation viscérale et causer des symptômes gastro-



Figure 1. Lipoatrophie du visage. E. Toma.

intestinaux. Le médicament le plus associé à la lipoatrophie est le D4T surtout en association avec la ddI. Autant une augmentation de l'apoptose que l'inhibition de la différenciation des adipocytes sont en cause (88,98).

La lipoaccumulation survient la plupart du temps suite à la lipoatrophie. En plus de l'accumulation des graisses intra-abdominale autour des organes et intra-viscérale, on peut observer une lipoaccumulation sous forme de lipomes dans la région dorsocervicale, communément appelée la bosse de bison, ainsi qu'au niveau intramusculaire et hépatique (89, 91). On observe chez la

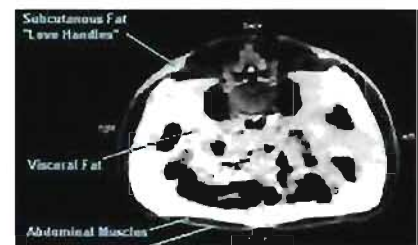


Figure 2. Lipoaccumulation intra-abdominale par tomodensitométrie DEXA.

femme une augmentation du volume des seins et parfois une gynécomastie chez l'homme (90). La distribution anatomique des lipomes associés au HAART est similaire à celle rencontrée dans la lipomatose symétrique multiple qui survient chez des personnes ayant une mutation de *ADNmt*, laissant croire à une étiologie semblable (92,93). Chez ces patients les lipomes sont constitués d'avantage de cellules adipeuses brunes contenant une

ou des multiples vacuoles, normalement peu présentes chez l'adulte. Le D4T, qui réduit le ADNmt augmente l'expression de la UCP-1, seul marqueur des adipocytes bruns, ce qui soutient l'implication d'un désordre mitochondrial et de la voie signalétique de l'acide rétinoïque dans cette complication (99).



Figure 3. Lipoaccumulation abdominale. D.Phaneuf.

L'infection par le VIH elle-même a été associée à une dyslipidémie, particulièrement dans le cadre de la progression de la maladie vers le sida où l'on observe une diminution du cholestérol total, LDL et HDL et une augmentation des triglycérides. Une telle situation fait intervenir des concentrations augmentées de cytokines de type TNF- α et d'INF- α ainsi qu'une augmentation de la lipogenèse. La dyslipidémie est un effet secondaire fréquent des antirétroviraux, particulièrement dans les combinaisons qui impliquent des inhibiteurs de la protéase, dont le ritonavir, l'efavirenz et le D4T. Elle est caractérisée par une élévation des lipoprotéines de faible (LDL) et de très faible densité (VLDL) riches en triglycérides. On observe également une augmentation dans l'apolipoprotéine B, CIII et E. L'hypertriglycéridémie dans le contexte de la lipodystrophie est l'anomalie lipidique la plus fréquente, suivie de près par l'hypercholestérolémie (88,100-102).

3.3 Les complications osseuses

L'ostéoporose est une maladie courante dans la population générale. Elle est caractérisée par une perte de la masse osseuse et une perturbation de la microarchitecture squelettique. Elle est souvent détectée après l'apparition d'une fracture non traumatique, associée à une fragilité osseuse. L'ostéopénie fait référence à une perte de la masse osseuse et précède l'ostéoporose. Les ostéoblastes synthétisent les constituants organiques de l'os et interviennent dans la minéralisation de la substance ostéoïde nouvellement synthétisée. Par la suite, ils s'entourent d'une nouvelle matrice et se différencient en cellules moins actives, les ostéocytes qui forment des contacts cytoplasmique avec les cellules avoisinantes via le système des canaliculis. Ce système constitue une voie d'approvisionnement des ostéocytes et permet l'élimination des produits de catabolisme et la réception des messagers hormonaux. Les ostéoclastes sont multinucléés, de grandes tailles, formés par la fusion de monocytes de la moelle osseuse (103-105). Ils sont localisés en superficie de l'os et leur

fonction est la résorption et le remodelage osseux, stimulée par l'hormone parathyroïdienne (PTH). Ces cellules décomposent la substance organique de l'os par le biais d'une sécrétion d'enzymes lysosomiales. Des facteurs locaux, chimiques, mécaniques et hormonaux interagissent pour réguler le bilan de renouvellement de l'os. La PTH agit sur les ostéoblastes en stimulant entre autre, la production de facteurs croissance de l'insuline (IGF-II). Ceux-ci peuvent s'accumuler dans la matrice osseuse et être relargué ultérieurement dans le processus de résorption. Les ostéoblastes produisent également des facteurs d'activation d'ostéoclastes qui agissent en tant qu'hormones autocrines et paracrine. Ces facteurs sont impliqués dans l'augmentation du risque de développer de l'ostéoporose au même titre que la déficience en œstrogène, la PTH et les traitements par glucocorticoïdes (106). Plusieurs autres facteurs peuvent activer les ostéoclastes, tel que l'IL-1 dont la production est augmentée par la PTH. D'autres facteurs moins connus mais associés à la perte osseuse sont le TNF- α , les IL-11 et IL-17. Les augmentations de cytokines sont connues dans l'infection chronique par le VIH et peuvent contribuer à l'activation des ostéoclastes (107-110). La maturation et l'activation des ostéoclastes sont le résultat d'une interaction entre l'activateur du récepteur du facteur nucléaire κ B (RANK) et son ligand RANKL. RANKL est un ligand transmembranaire exprimé sur les ostéoblastes tandis que RANK est un récepteur transmembranaire exprimé sur les précurseurs d'ostéoclastes. Leurs interactions mènent à l'activation de l'ostéoclaste et à la résorption osseuse. La liaison RANK-RANKL peut être bloquée par l'ostéoprotégérine, une protéine présente naturellement, ayant pour conséquence l'inhibition de l'ostéoclaste et la diminution de la résorption osseuse. Le TNF- α augmente les taux de RANKL tandis que l'activation chronique des lymphocytes T est capable d'activer les ostéoclastes en surexprimant une forme soluble et membranaire de RANKL et par sécrétion du facteur de croissance des colonies de macrophages (GM-CSF). Le mécanisme physiopathologique qui mène au dérèglement du métabolisme osseux dans l'infection par le VIH n'est pas élucidé mais il peut impliquer certains inhibiteurs de la protéase (111-112). Une étude a cependant montré que les niveaux plasmatiques d'ostéoprotégérine étaient significativement diminués chez les PVVIH recevant un traitement antirétroviral tandis que l'ARNm était surexprimé dans les cellules mononucléées du sang périphérique. Le taux de TNF- α et l'activation lymphocytaire étaient élevés dans cette population (113). De plus, certaines études ont observés l'ostéoporose conjointement à l'acidose lactique, une situation dans laquelle le phosphate peut agir comme tampon (111). D'autres groupes de recherche ont mentionnés

que les IP peuvent inhiber l'activité des ostéoblastes et activer les ostéoclastes (112). Un autre mécanisme possible serait l'inhibition par les IP de deux isotypes du complexe du cytochrome P450, associés aux fonctions oxygénases qui permettent l'activation de la vitamine D. Certains IP, tel que indinavir, ritonavir et nelfinavir inhibent la conversion de la 24-hydroxy vitamine D en la forme active 1,25-dihydroxy vitamine D in vitro (114). Toutefois, dans une étude prospective chez les patients recevant des antirétroviraux nous avons trouvé des taux sériques normaux ou même élevés de 1,25-dihydroxy vitamine D (Loignon, Martin, Phaneuf, Bhat & Toma, article en préparation). Nous avons soupçonné une sorte de résistance à la vitamine D, probablement due à une disponibilité réduite des récepteurs hétérodimères des VDR-RXR secondaire aux effets des antirétroviraux sur les rétinoïdes. Il est bien connu que les rétinoïdes sont d'importants morphogènes impliqués dans le développement embryonnaire de l'os. En fait, des expériences en culture cellulaire ont montrées que l'acide rétinoïque (AR) est capable de réguler la prolifération, la différenciation et l'expression des gènes des chondrocytes, des ostéoblastes et des ostéoclastes (115). De plus, l'AR diminue aussi la prolifération et le statut énergétique cellulaire. Enfin, il stimule la formation de cellules ostéoclastique, la résorption osseuse mais diminue la formation de procollagène (116). L'ostéonécrose apparaît lorsqu'il n'y a plus d'apport sanguin nécessaire au métabolisme et catabolisme cellulaire ce qui cause la mort des ostéocytes par nécrose. Le plus souvent impliqués sont les têtes fémorales car les artérioles sont terminales. Les facteurs communément associés à cette condition sont les traumatismes, l'utilisation des corticostéroïdes, l'hyperlipidémie et la consommation d'alcool. En plus de ces facteurs, chez les PVVIH un lien a été établi entre l'apparition de cette maladie, le traitement antirétroviral et le nombre de cellules CD4⁺ supérieur à 50 cellules par mm³ (107,110).

3.4 Les complications coronariennes

Les maladies cardio-vasculaires sont une conséquence clinique majeure du syndrome métabolique à cause surtout de six éléments principaux: dyslipidémie athérogène (hypertriglycéridémie, déficit en cholestérol HDL et particules de LDL de petites tailles), hypertension artérielle, obésité abdominale, insulino-résistance avec ou sans intolérance au glucose, état pro-inflammatoire et état prothrombotique. L'obésité est étroitement associée à tous les facteurs de risque cardiovasculaire car le tissu adipeux est la source de synthèse de molécules comme des cytokines, la résistine, l'adiponectine, la

leptine etc. Du point de vue épidémiologique, l'incidence de l'infarctus du myocarde est plus élevée chez les PVVIH que dans la population générale (97). Il est à présent prouvé que la responsabilité de ce risque cardiovasculaire accru incombe à la durée du traitement antirétroviral incluant un IP. D'autres facteurs de risque cardiovasculaire s'ajoutent chez les PVVIH telle que l'augmentation de l'âge, le tabagisme plus fréquent dans cette population, l'incidence plus élevée d'hypertension artérielle, une dysfonction endothéliale multifactorielle causée par un état inflammatoire chronique et une surcharge pondérale (97, 117). Enfin, un état prothrombogène, favorisé par le cumul des anomalies métaboliques, et les effets du VIH, particulièrement la *nef*, et des rétinoïdes, à leur tour affectés par les antirétroviraux, sur l'efflux du cholestérol au niveau des macrophages contribueront à la formation des thrombi aigus sur l'artère saine (118).

3.5 Les complications hormonales

Le système endocrinien peut être affecté de plusieurs façons par l'infection par le VIH. La destruction directe d'une glande endocrine par le VIH ou par une infection opportuniste résultant en une incapacité fonctionnelle survient rarement. Les personnes en stade sida de la maladie peuvent développer des problèmes métaboliques qui accompagnent souvent les maladies systémiques sévères. Ces problèmes peuvent être médiés par les cytokines et le système immunitaire. Les médicaments utilisés dans le traitement du VIH et des infections associées peuvent altérer les fonctions endocriniennes, la balance minérale et électrolytique ainsi que le métabolisme des substrats (119-121).

La gynécomastie physiologique affecte principalement les nouveaux nés, les adolescents et les personnes âgées. Elle est associée à un ratio œstrogène/androgène élevé. La gynécomastie pathologique apparaît surtout chez l'adulte où l'augmentation du volume des seins est associée à la présence de tissus glandulaires palpables et mobiles. Elle apparaît suite à diverses conditions telle que l'hypogonadisme primaire et secondaire, le syndrome d'insensibilité aux androgènes, lors d'une activité aromatase extraglandulaire excessive, des néoplasies, des maladies hépatiques, surtout la cirrhose, l'utilisation prolongé et abusive d'alcool, l'hyperthyroïdisme et l'utilisation de certains médicaments. Dans l'infection par le VIH, elle a été décrite la première fois en relation avec l'indinavir mais d'autres antirétroviraux et particulièrement l'efavirenz ont été impliqués. Le mécanisme

pathogénique par lequel la gynécomastie associée au traitement antirétroviral se développe demeure inconnue (90, 122-137).

Le contrôle hormonal thyroïdien est le résultat d'une cascade d'évènements qui débute lorsque l'hypothalamus sécrète la thyroïdolibérine (TRH) ce qui stimule l'adénohypophyse à sécréter la thyroïdostimuline (TSH). La TSH stimule la synthèse de thyroglobuline qui sera iodée dans la substance colloïdale des follicules pour former la triiodothyronine (T3) et la thyroxine (T4). La synthèse des hormones thyroïdiennes dépend des quantités d'iode et de thyroglobuline disponibles (138). Une sécrétion insuffisante d'hormones donne lieu au syndrome d'hypothyroïdisme ou myxoedème, caractérisé par un état d'hypométabolisme. Une sécrétion hormonale excessive se traduira par un hypermétabolisme et conduira au syndrome d'hyperthyroïdisme ou de thyrotoxicose. Plusieurs problèmes thyroïdiens sont de nature auto-immune. Enfin, d'autres causes moins fréquentes sont les nodules thyroïdiens, le cancer de la thyroïde, la thyroïdite, la thyroïdite subaiguë ainsi que l'hypothyroïdie primaire (139-141). Les anomalies de la fonction thyroïdienne et l'auto-immunité thyroïdienne ont été observées chez les PVVIH bien avant l'arrivée des inhibiteurs de la protéase. En plus de l'infection par le VIH, plusieurs facteurs ont été associés à la pathogenèse de ces complications, particulièrement dans un contexte de progression de la maladie. Des thyroïdites associées aux infections opportunistes tel que la PPC, le CMV et le sarcome de Kaposi ainsi que certains cancers ont été répertoriées (142-145). Tout comme dans d'autres maladies chroniques ou sévères, les niveaux plasmatiques élevés de cytokines proinflammatoires tel que le TNF- α , IL-1 et IL-6 dans l'infection par le VIH, contribuent à la pathogenèse de la dysfonction thyroïdienne. De plus, les médicaments utilisés dans le traitement du VIH et de ses complications peuvent aussi être la source de telles dysfonctions (146-147). En effet l'utilisation de l'IL-2 et de l'INF- α est associée à des troubles thyroïdiens incluant l'auto-immunité anti-thyroïdienne (148, 150-152). Nous avons rapporté (153) dans une cohorte de 80 PVVIH sous antirétroviraux une incidence de 35% d'anomalies thyroïdiennes. L'atteinte la plus fréquente (39% des cas) était la thyroïdopathie autoimmune transitoire avec une prédominance d'Ac anti-thyroglobuline. Cette manifestation autoimmune est peu fréquente puisque les thyroïdites autoimmunes impliquent presque toujours les Ac anti-TPO (anti-thyroperoxydase). Ces dysfonctions thyroïdiennes étaient indépendantes du nombre de cellules CD4⁺ ou de la charge virale. De plus, deux cas possibles d'hypothyroïdisme central transitoire se sont présentés dans un

contexte de contrôle optimal de la virémie chez des PVVIH sous antirétroviraux. Bien qu'asymptomatique, cette atteinte thyroïdienne rappelait l'hypothyroïdie centrale symptomatique suite à un traitement avec de fortes doses de bexarotène, un ligand sélectif RXR chez des personnes avec des lymphomes cutanés à cellules T. Cette suppression réversible dans la production de TSH a aussi été rapportée chez des patients sous traitement avec INF- α (154). Des altérations dans le métabolisme de l'acide rétinoïque ont été observés chez des PVVIH recevant un traitement antirétroviral incluant des IP (155). Ces résultats nous permettent d'extrapoler sur l'implication possible de la voie métabolique et signalétique de l'acide rétinoïque dans les mécanismes et les facteurs pathogéniques impliqués dans les complications thyroïdiennes associées au traitement antirétroviral. Enfin les hormones thyroïdiennes jouent un rôle dans le développement de l'os (voir chapitre 3.4). L'hyperthyroïdisme mène à une augmentation de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes, ce qui augmente la vitesse de turnover et mène à l'ostéoporose. Les hormones thyroïdiennes agissent sur l'os soit directement en modulant les gènes cibles via les récepteurs nucléaires spécifiques soit indirectement en augmentant la sécrétion de l'hormone de croissance, de l'IGF-1 et des cytokines tel que IL-6 et IL-8 (156).

La prévalence des anomalies de la glycorégulation se traduisant par de la résistance à l'insuline, de l'intolérance au glucose et du diabète chez les PVVIH, a augmenté de façon dramatique depuis l'arrivée des HAART. Même en présence d'une glycémie à jeun normale, il est souvent possible de mettre en évidence un hyperinsulinisme, témoignant d'une insulino-résistance (157-158). Le développement de la résistance à l'insuline dans la population des PVVIH est probablement multifactorielle et reflète d'une part une prédisposition génétique et d'autre part l'effet direct et indirect de la thérapie antirétrovirale particulièrement les molécules de la classe des IP et de INTI et des changements inflammatoires chroniques induits par le VIH. Les effets indirects du HAART sur la résistance à l'insuline peuvent possiblement être engendrés par la lipodystrophie, par la stéatose hépatique et musculaire et la toxicité mitochondriale (159). Le métabolisme du glucose fait intervenir différents transporteurs de la famille des GLUT. L'indinavir est connu pour causer une résistance à l'insuline autant *in vivo* qu'*in vitro*. Son action passe par l'inhibition du GLUT4, le transporteur de glucose prédominant interpellé suite à l'absorption d'un repas. La consommation basale du glucose est plutôt associée au transporteur GLUT1 et n'est pas affecté par l'indinavir. Cependant, les cellules β du

pancréas utilisent plutôt le GLUT2 pour détecter les concentrations de glucose (160). Ce transporteur serait aussi inhibé par l'indinavir (161). De plus, une étude utilisant le rat Zucker-diabétique a montré que l'indinavir accélère le développement du diabète chez ce modèle (162). Il est aussi connu que 50% des PVVIH recevant un IP vont développer une résistance à l'insuline (163) surtout s'ils ont reçu ou reçoivent du D4T.

3.6 La toxicité mitochondriale

Les INTI inhibent aussi la polymérase γ humaine, responsable de la réplication de l'ADNmt ce qui entraîne une diminution du nombre de copies menant à une déficience fonctionnelle dans la chaîne respiratoire, normalement responsable de plusieurs voies enzymatiques, dont la synthèse d'ATP, l'oxydation des acides gras, la synthèse de l'ADN cellulaire. Cette toxicité est en fonction de la classe des INTI, de la molécule et de sa concentration et du temps d'exposition. La toxicité mitochondriale des INTI en ordre décroissante semble être la suivante : D4T > ddC > ddI > AZT > 3TC > abacavir. Le cas de l'AZT est plutôt étrange puisqu'il est un faible inhibiteur de la polymérase γ sauf celle musculaire pour laquelle il a une plus grande affinité. Par ailleurs il inhibe l'enzyme thymidine kinase de type 2 mitochondriale (TK2) ce qui interfère dans la synthèse des nucléotides pyrimidine et ainsi dans la synthèse de l'ADNmt particulièrement dans les tissus musculaires. De plus, il a été démontré récemment que l'AZT peut être transformé de façon non enzymatique en stavudine en perdant sa chaîne azido dans certaines lignées cellulaires. La toxicité mitochondriale est spécifique aux tissus et elle peut être additive ou synergique si plus d'un INTI est utilisé. Les manifestations cliniques de la toxicité mitochondriale dans le VIH sont variées. Au niveau hépatique elle se manifeste sous la forme d'une stéatose, qui peut mener à l'insuffisance hépatique et à l'acidose lactique. Des malformations de mitochondries ont été observées en microscopie. Parmi les autres manifestations, on retrouve l'hyperlactatémie, la myopathie mitochondriale associée à la faiblesse musculaire, la pancréatite, le syndrome de Fanconi et la polyneuropathie distale. La lipodystrophie aurait aussi une composante mitochondriale puisque les tissus affectés montrent des anomalies de l'ultrastructure mitochondriale ainsi qu'une diminution de l'ADNmt (65, 163b, 164).

3.7 Les manifestations « retinoid-like »

Depuis 1998, l'usage de l'indinavir, un antirétroviral de la classe des IP a été associé à l'apparition d'ongles incarnés et à la paronychie des orteils et des doigts. De plus, des

désordres mucocutanés, tel que la xérose cutanée et la chéilite, sont similaires aux effets secondaires des patients recevant une thérapie systémique utilisant des rétinoïdes. On observe l'apparitions de manifestations rétinoïdes chez près de 30% des PVIH utilisant l'indinavir. Il n'y a pas de corrélation entre ces effets et d'autres facteurs de risque tel que le sexe, l'âge ou le statut immunitaire. Il est dépendent de la dose et du temps d'exposition au médicament. Les mécanismes pathogéniques de ces manifestations ne sont pas encore élucidés mais il pourrait s'agir d'une interférence dans le métabolisme de l'acide rétinoïque soit par une activation de la voie signalétique, une augmentation de la synthèse ou encore par une inhibition du métabolisme oxydatif de l'AR médié par le complexe du cytochrome P450 (165). En effet, il a été rapporté que l'indinavir augmente l'expression de la phosphatase alcaline (enzyme ayant une RARE) en présence d'acide rétinoïque tout-*trans* (163b). De plus, on a prouvé que l'indinavir augmente l'activité et l'expression de la rétinaldéhydrogénase (RALDH), l'enzyme clé impliqué dans la synthèse de l'acide rétinoïque (166).

Chapitre 4

Les rétinoïdes



4. Les rétinoïdes

Les effets de la vitamine A sont connus depuis l'époque de l'Égypte ancienne où l'on administrait aux patients souffrant de cécité nocturne, des extraits de foie, aliments riches en vitamine A. La découverte officielle remonte cependant au début du 20^{ème} siècle, d'abord sur des observations faites sur les bovins et ensuite par deux équipes indépendantes de recherche : McCollum (University of Wisconsin) et Lafayette Mendel (Yale University).

4.1 La structure chimique et la nomenclature

Les rétinoïdes sont les dérivés naturels et synthétiques de la vitamine A, une hormone liposoluble hydrophobe apolaire présente dans l'organisme humain. Les formes actives de la vitamine A, également appelée rétinol (ROL) sont le ROL, le rétinol (RAL) et l'acide rétinolique (AR) tandis que les esters de rétinol (ER) sont emmagasinés dans le foie, organe principal d'entreposage. La structure chimique commune de ces molécules est un cycle β -ionone, une queue de 4 groupements isoprénoïdes à 20 carbones, où les liaisons adoptent une configuration tête-queue et un groupement polaire terminal qui varie selon l'état d'oxydation de la molécule. Ainsi le ROL, le RAL et l'AR comportent respectivement les groupements hydroxyle, aldéhyde et carboxyle. Ces molécules existent sous différents isoformes déterminés par l'orientation spatiale *cis* ou *trans* de la chaîne de carbone latérale. Les isomères les mieux connus sont les tout-*trans*, 9-*cis*, 11-*cis* et 13-*cis*. Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés chimiques mais diffèrent par leur degré d'absorbance optique. Cette classe de composés est sensible à l'oxydation de l'air, à la lumière ainsi qu'à la chaleur qui affectent leur stabilité et favorise l'isomérisation vers une forme plus stable (**figure 1**). Il existe aussi une provitamine A, le β -carotène, présente dans des légumes sous forme d'un pigment jaune. Ce dernier est formé de deux molécules de RAL unies par l'extrémité aldéhydique de leur chaîne carbonée. Cependant, le β -carotène n'est pas métabolisé efficacement en vitamine A et ne représente qu'un sixième du rétinol de l'organisme (167). Le terme

vitamine A désigne les substances autres que les caroténoïdes qui montrent une activité

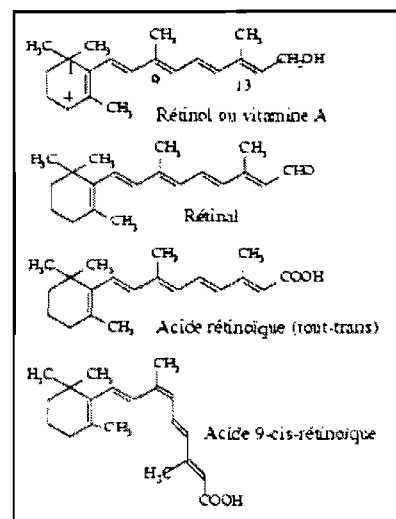


Figure 1. Structure chimique des rétinoïdes (<http://www.pharmacorama.com>)

biologique du rétinol. Le terme rétinoïde désigne plutôt les molécules naturelles ayant une activité de vitamine A ainsi que les analogues synthétiques, avec ou sans activité biologique du rétinol, incluant les caroténoïdes (168).

4.2 Le rôle général

La vitamine A est essentielle et son rôle principal réside dans sa capacité d'être une importante molécule de signalisation dont les implications variées sont probablement encore sous-estimées. Elle est impliquée dans des processus cellulaires diversifiés : la reproduction, le développement embryonnaire, la vision, la croissance, la différenciation et prolifération cellulaire, le maintien de l'intégrité des tissus épithéliaux et muqueux incluant les voies respiratoires, urinaires et digestives, la croissance des os et des cartilages, le développement des lignées hématopoïétiques et le métabolisme des lipides. La vitamine A est aussi essentielle au fonctionnement normal du système immunitaire et à l'activation des lymphocytes T. Sa déficience peut causer une atrophie des muqueuses, une diminution de la résistance aux infections et une augmentation de la sévérité des infections qui résulte d'une immunodéficience nutritionnelle acquise. Les trois molécules dérivées de la vitamine A ont toutes des fonctions biologiques qui leur sont propres (169). Le 11-*cis* RAL est la forme active impliquée dans les mécanismes visuels et dans l'adipogénèse. L'AR tout *trans* exerce ses effets sur la croissance, la différenciation cellulaire; elle est un puissant morphogène embryonnaire qui dicte l'information de position nécessaire au développement de l'axe antéropostérieur du corps et des membres. Enfin, le ROL est la forme de transport de la vitamine A (170).

4.3 Le métabolisme

L'organisme ne peut synthétiser la vitamine A, elle doit donc provenir de source alimentaire. On la retrouve dans l'alimentation d'origine animale, dans les viandes et le foie sous forme de rétinol et d'ER. Dans les aliments d'origine végétale, on retrouve essentiellement les carotènes, précurseurs du rétinol. Dans des conditions normales, les concentrations de vitamine A demeurent élevées en tout temps afin de garantir les besoins cellulaires (171). La vitamine A préformée, ingérée dans l'alimentation, se présente majoritairement sous la forme d'ER avec une prédominance de palmitate de rétinyl. Lorsqu'elle pénètre dans l'organisme, la vitamine A est d'abord hydrolysée par une rétinyl ester hydrolase (REH) pour former du ROL (172). Celui-ci est absorbé par les cellules

cylindriques à bordure en brosse de l'épithélium de l'intestin grêle, par un mécanisme de diffusion facilité impliquant un transporteur. Cette absorption est favorisée par la présence de lipides et de sels biliaires. Dans l'entérocyte, le rétinol tout *trans* se lie à une protéine de liaison du ROL de type II (CRBP-II). Ce complexe sert de substrat à l'enzyme lécitine:rétinol transférase (LRAT) qui réestérifie le ROL en ER. Ce dernier s'associe à l'apolipoprotéine B (apo B). La LRAT permet la transformation de la vitamine A en une forme entreposable et régule sa disponibilité pour les voies l'utilisant. Il faut mentionner que le ROL effectue plusieurs cycles d'hydrolyse et d'estérification entre son absorption et son entreposage dans le foie. De plus, le ROL circulant peut être recyclé de nombreuses fois avant son utilisation finale. Sous la forme d'ER lié à l'apo B, il est incorporé dans les chylomicrons qui entrent dans la circulation lymphatique et ensuite sanguine par le canal thoracique. À l'intérieur des chylomicrons, une lipoprotéine lipase pancréatique (LPT) permet la formation de chylomicrons plus petits appelés fantômes. Les chylomicrons fantômes sont endocytés par l'intermédiaire des récepteurs hépatiques à LDL dans les cellules parenchymateuses du foie. Dans ces cellules, les ER hydrolysés sont transformés en ROL et sont liés à la protéine cellulaire de type I liant le ROL (CRBP-I). Ces molécules de ROL liées subissent une réestérification pour former du ROL tout *trans* qui sera empaqueté dans des

gouttelettes lipidiques. De 50-80% de ceux-ci sont entreposés dans les cellules stellaires, connues aussi sous le nom de cellules de Ito et dans une moindre mesure, dans les tissus adipeux, les poumons et les reins (173). Le ROL peut aussi être transporté dans le sang, lié à la protéine liant le ROL (RBP) qui achemine le ROL à la membrane cellulaire des tissus cibles. La RBP est la protéine transporteuse principale du ROL tout *trans* dans le sérum. On la retrouve associée à un co-transporteur, la transthyrétine, qui empêche l'élimination du complexe ROL-RBP par le filtre

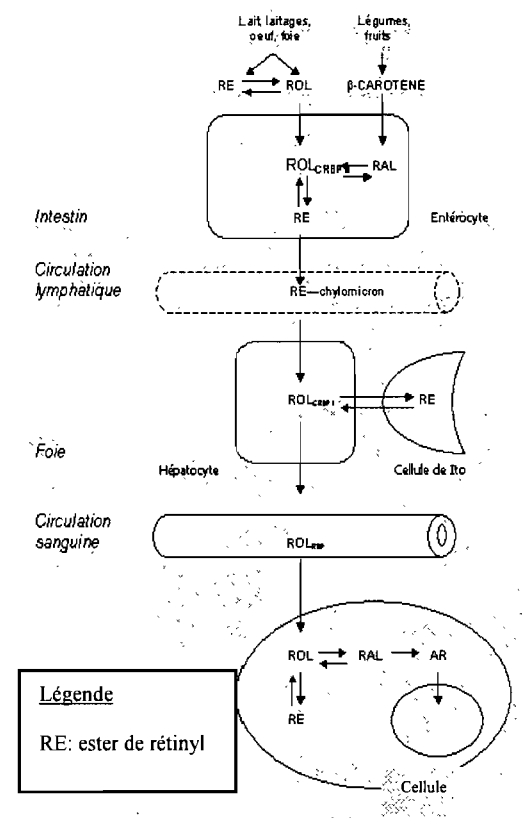


Figure 2. Métabolisme général de la vitamine A chez l'humain.

glomérulaire rénal (174). On ne connaît pas le mécanisme exact par lequel le ROL traverse la membrane plasmique mais un récepteur membranaire spécifique semble être impliqué dans ce processus (175) (**Figure 2**).

Puisque les rétinoïdes sont des molécules à caractère labile, plusieurs protéines de liaisons permettent de les protéger de l'oxydation non enzymatique, des enzymes métaboliques opportunistes et de l'isomérisation. Il y a quatre protéines majeures de liaison des rétinoïdes : CRBP de type 1 et 2, ont une affinité pour le ROL et le RAL. Les protéines cellulaires liant l'AR (CRABP) de type 1 et 2 ont une affinité pour l'AR. Les CRBP isolent complètement leurs ligands du milieu cellulaire tandis que les CRABP laissent une portion de l'anneau β -ionone accessible (174,176).

Le ROL n'exerce pas son action directement sur la cellule cible. Il doit subir des transformations enzymatiques dans le cytoplasme cellulaire afin d'atteindre sa forme active qu'est l'AR. Du point de vue endocrinologique, on considère son activité comme intracrine. En tant que prohormone, le ROL est un précurseur essentiel des rétinoïdes tissulaires qui sont métabolisés par des réactions séquentielles d'oxydation, en 2 classes de molécules biologiquement actives, le RAL et l'AR. Le ROL traverse la membrane cellulaire et se retrouve dans le cytoplasme rapidement lié à la CRBP-I. Il est alors converti de façon réversible en RAL par une enzyme alcool déshydrogénase (ADH) : la rétinol déshydrogénase (ROLDH). Le RAL est à son tour convertit de façon irréversible en AR par une aldéhyde déshydrogénase : la rétinaldéhyde désydogénase (RALDH) (**Figure 3**).

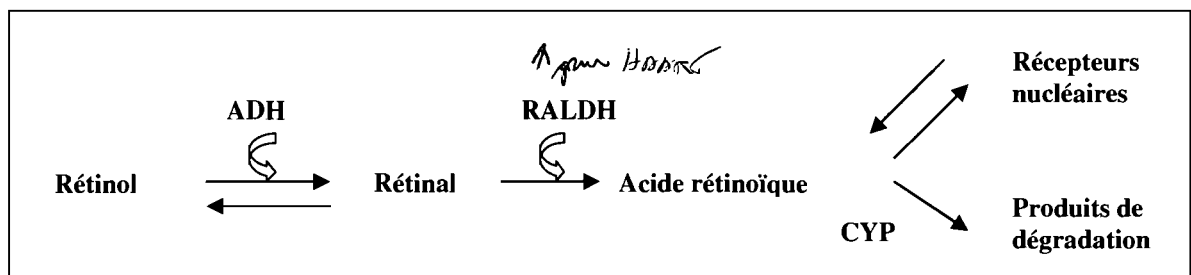


Figure 3. Voie enzymatique de la conversion de la vitamine A.

L'AR sera rapidement liée par la CRABP-II. L'AR sera dirigé vers le noyau afin d'agir sur les récepteurs nucléaires ou encore sera dirigé vers la voie de catabolisme du cytochrome

P450 CYP26 afin d'y être dégradé. Les métabolites de l'AR sont majoritairement excrétés dans les selles et l'urine (174).

4.4 Le mécanisme d'action

L'AR agit par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires, de la famille des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes. Ce sont des facteurs de transcription inductibles par le ligand qui appartiennent à deux familles: les RAR activés par l'AR tout-*trans* et 9-*cis*, hautement spécifiques à leur ligand et les RXR activés uniquement par l'AR 9-*cis* dont la spécificité est plus large et l'affinité pour leur ligand plus faible. Chaque famille se compose de trois isotopes génétiques (RAR ou RXR : α , β et γ). In vitro, la transactivation des gènes cibles de l'AR fait intervenir des hétérodimères RAR/RXR et plus rarement des homodimères RXR/RXR (177). Le RXR est considéré versatile puisqu'il a la capacité de former des hétérodimères avec d'autres membres de la même famille, ce qui n'est pas le cas du RAR. Les hétérodimères formés par le RXR et un partenaire permissif (PPAR, LXR, FXR) peuvent être activés autant par le ligand du RXR que celui du partenaire. Les hétérodimères formés par le RXR et un partenaire non permissif (vitamine D et récepteurs des hormones thyroïdiennes) ne peuvent être activés que par le ligand du partenaire. Cette

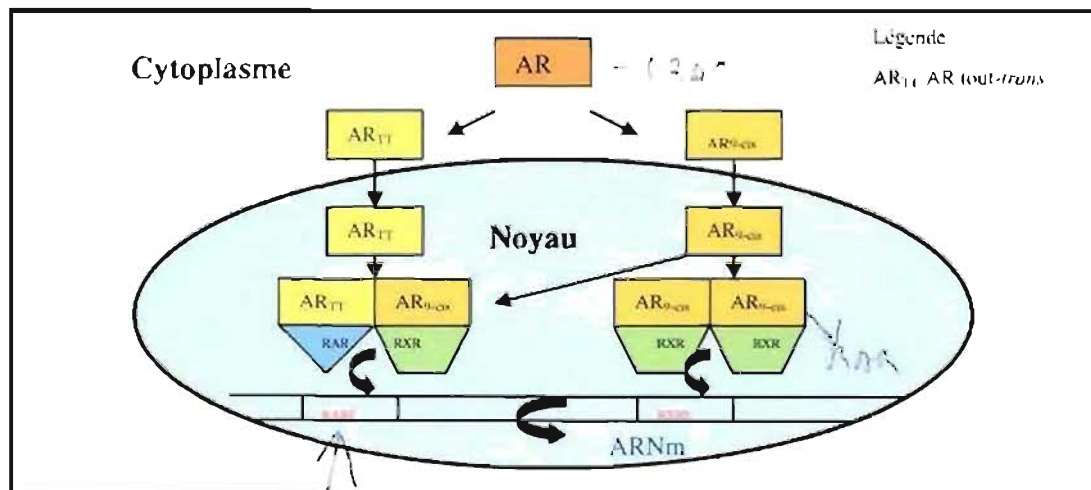


Figure 4. Voie de signalisation intracellulaire de la vitamine A.

notion de non permissivité peut cependant être influencée par des facteurs tel que la spécificité des tissus, l'environnement cellulaire et la capacité de recruter des coactivateurs et des corépresseurs dans la région de l'élément de réponse (177-179). Ces récepteurs dimérisés lient des séquences spécifiques d'ADN appelées éléments de réponse aux rétinoïdes, le RARE ou RXRE (élément de réponse aux rétinoïdes X), localisées dans la région 5' de régulation des gènes de rétinoïdes et plus rarement localisées dans les introns (**Figure 4.**). Un grand nombre de gènes sont potentiellement capables de répondre à l'AR car ils contiennent un ou plusieurs RARE. De plus, puisque le RXR forme des hétérodimères avec différentes familles de récepteurs nucléaires autres que le RAR, il a le potentiel d'influencer une variété de gènes encore plus grande que celle régulée par le RAR. Un groupe de recherche a démontré qu'il serait possible de traiter le syndrome métabolique en modulant l'activité des hétérodimères contenant le RXR, en utilisant des ligands spécifiques aux partenaires (180). Chez le rat, il est aussi connu pour lier l'hormone de croissance (181).

4.5 Les manifestations cliniques

Les quantités normales de vitamine A dans l'organisme se situent entre 1.05 et 2.97 $\mu\text{mol/L}$. Les quantités normales d'AR ne sont pas bien caractérisées et il n'existe aucune méthode standard pour en effectuer leur dosage. Certains ont utilisé la technique de chromatographie liquide et gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et ont obtenu, chez douze volontaires, des valeurs se situant entre 2.8 et 6.6 ng/ml (une moyenne de 4.9 ng/ml) (182). À l'exception des mécanismes impliqués dans la vision, les effets physiologiques de la vitamine A proviennent de la liaison de l'AR aux récepteurs nucléaires RXR et RAR. L'administration de l'AR peut prévenir ou renverser les effets d'une hypovitaminose A. Outre ses effets bénéfiques, il peut s'avérer dangereux en excès. Lorsque le métabolisme de la vitamine A devient disfonctionnel dans une voie, il est très probable que d'autres voies seront affectées pour ainsi causer des symptômes cliniques et des maladies.

La déficience en vitamine A (DVA) peut être secondaire à une diminution de l'ingestion, une malabsorption, un métabolisme altéré ou des exigences augmentées. Les capacités d'emmagasiner du foie adulte procurent un an de réserve tandis que chez l'enfant, les réserves ne suffisent que pour quelques semaines. Les concentrations de ROL peuvent être affectées par la synthèse de la RBP, les infections, le statut nutritionnel et les niveaux de fer

et de zinc qui perturbent les niveaux de RBP. Les maladies du système gastro-intestinal peuvent aussi compromettre l'absorption de cette vitamine. L'alcoolisme perturbe le métabolisme du ROL puisque qu'il empêche le bon fonctionnement de la ROLDH. Les enfants hospitalisés, surtout dans un contexte de rougeole, ont un risque de mortalité diminué lorsqu'ils reçoivent un supplément de vitamine A (183). Les formes subcliniques de la DVA peuvent être asymptomatiques, cependant le risque de développer des infections respiratoires et gastro-intestinales est augmenté. De plus, la courbe de croissance est diminuée et le développement osseux ralenti. L'histoire médicale du patient atteint de DVA peut révéler une présence accrue d'infections, de la fatigue excessive ainsi qu'une infertilité secondaire à la détérioration de la spermatogenèse ou des avortements spontanés. La DVA franche se traduit par des troubles visuels qui se manifestent par la xérose conjonctive et cornéenne, la kératomalacie, la rétinopathie, la nictalopie et la cécité nocturne. Ces problèmes sont particulièrement présents dans les pays moins développés où les sources de vitamines A sont peu nombreuses et constituent un problème de santé mondiale. Chez l'enfant, cette déficience augmente le risque de mortalité de cause infectieuse ou non. La DVA diminue la mobilisation et le transport du fer occasionnant de l'anémie et des troubles de la croissance. Elle cause aussi une instabilité des membranes cellulaires. Les symptômes sont l'apparition de taches de Bitot, la sécheresse cutanée et capillaire, le prurit, les ongles incarnés, la kératinisation des membranes muqueuses ainsi qu'un dépôt excessif de périoste suite à une diminution de l'activité ostéoclastique (184). Des données in vitro ont montré que la DVA est associée à la diminution de la synthèse des stéroïdes, particulièrement la conversion du pregnenolone en progestérone qui est catalysée par une hydroxystéroïde déhydrogénase. La DVA affecte d'autres systèmes enzymatiques de la famille des oxygénases tels que la L- γ -gluconolactone, la codéine déméthylase, la squalène oxidocyclase et la p-hydroxyphényl pyruvate oxydase. Les effets sur les systèmes enzymatiques montrent que ces désordres seraient plutôt des effets secondaires sur le métabolisme des cellules affectées plutôt qu'un effet primaire de la vitamine A (174).

L'hypervitaminose A se produit lorsque le niveau limite d'accumulation dans le foie des rétinoides est atteint. L'excès en vitamine A (EVA) entraîne des conséquences graves sur la santé. Cette condition est sous évaluée car beaucoup de cas sont asymptomatiques, voire subcliniques. Dans les pays occidentaux, la vitamine A est largement ajoutée aux aliments et favorise une consommation qui excède les quantités recommandées. De plus, puisque la

majeure partie du rétinol est entreposée dans le foie, l'évaluation du statut en vitamine A par un dosage des concentrations sériques du rétinol ne constitue pas une méthode appropriée (185). L'EVA est tératogène chez le fœtus humain et il peut causer une malformation de la crête neurale, du cœur, un défaut d'organogenèse et du développement des membres. Un des effets toxiques est associé aux anomalies du squelette par une inhibition de l'activité des ostéoblastes et la stimulation des ostéoclastes. De plus, il a une action antagoniste sur la vitamine D et la régulation des niveaux sériques de Ca^{2+} dont la conséquence est une densité osseuse diminuée, l'ostéoporose et des fractures (186,187). Les principaux symptômes sont les nausées, les vomissements, l'anorexie, l'irritabilité, les étourdissements, la vision embrouillée, l'altération de l'état mental, les douleurs abdominales, les céphalées, les douleurs musculaires et la fatigue. La toxicité chronique peut mener à l'apparition des symptômes additionnels suivants : pertes de cheveux, sécheresse des muqueuses, gerçures des lèvres, prurit, fièvre, perte de poids, anémie, douleurs osseuses et articulaires, fractures, diarrhée et anomalies du cycle menstruel. On observe aussi, *in vitro*, une augmentation de l'activité protéase des lysosomes et une destruction des membranes lysosomiales menant à des changements dégénératifs tissulaires. On remarque une prolifération érythrocytaire, un gonflement des mitochondries, une labilité cellulaire et des membranes intracellulaires. Les hémorragies et l'anémie observées en clinique sont probablement une conséquence de la rupture de la membrane des érythrocytes. Enfin, l'EVA affecte les couches cellulaires germinales (174).

Du point de vue clinique, il est difficile de séparer la DVA de l'EVA. Puisque les besoins en vitamine A débutent dès l'embryogenèse, les études chez l'embryon permettent de mieux caractériser ces états nutritionnels. Une quantité excessive ou insuffisante de rétinoïdes à un stade particulier ou au mauvais moment du développement a des conséquences importantes sur l'embryon (188). Les effets des rétinoïdes sur l'embryogenèse sont dépendants de la dose et du gradient des concentrations, où ils peuvent, en fonction du *momentum*, causer soit une différenciation et une prolifération cellulaire ou inversement une apoptose. Enfin, mentionnons que l'AR est un puissant régulateur des gènes *Homeobox*, des facteurs de transcription impliqués dans la morphogenèse, dont l'axe antéro-postérieur (189). Une DVA chez la mère en gestation résulte en une mort fœtale ou au développement de malformations congénitales sévères, soulignant ainsi l'importance de l'AR dans l'activation de gènes cibles impliqués dans des

processus biologiques diversifiés. Chez différents modèles animaux (caille, souris) et humains, ces anomalies se traduisent par des malformations cardiaques caractérisées par une cavité cardiaque dilatée entourée de parois minces, des défauts ventriculaires et des problèmes d'écoulement du flux sanguin. Ce dernier serait la conséquence de l'absence d'ouverture caudale, lieu de convergence des veines vitellines et du système sanguin embryonnaire. L'AR est aussi impliqué dans l'asymétrie cardiaque. Ces dysfonctions font intervenir des facteurs de transcription régulés par les rétinoïdes dont l'effet est essentiel au développement des structures endodermiques. Lorsque les embryons survivent on peut voir apparaître des malformations du SNC. On observe des anomalies associées au développement du rhombencéphale, de la crête neurale et des arcs pharyngés et branchiaux ainsi que les structures qui en dérivent, dont le système visuel, plus particulièrement la rétine, l'oreille interne, la moelle épinière, les structures craniofaciales, le thymus, la glande thyroïde et les parathyroïdes. Une cause principale de ces anomalies dans la DVA est probablement la conséquence de l'apoptose des cellules migratrices de la crête neurale de l'embryon ainsi qu'une perturbation de l'horloge régissant la somitogenèse (190,191). La DVA cause aussi des anomalies du développement des membres, particulièrement dans le patron de leur développement dorso-ventral. On observe aussi des malformations des reins, des poumons et des voies respiratoires (190). Enfin l'AR semble être essentiel à l'établissement de la symétrie du corps. À cet effet, la scoliose peut être une conséquence d'une DVA puisqu'il s'agit d'une déviation gauche/droite de la colonne vertébrale (191). L'EVA chez la femme enceinte a aussi des conséquences graves sur le développement embryonnaire. Bien que plusieurs malformations soient similaires à celles observées dans la DVA, certaines sont par ailleurs très spécifiques. L'EVA cause chez l'animal et chez l'humain des avortements spontanés, une duplication ou une réduction, une fusion et une taille réduite des doigts. La croissance et la squelettogenèse sont retardées et on peut observer une duplication ou une réduction des membres. Les anomalies du SNC peuvent s'exprimer par une exencéphalie et une hydrocéphalie. Les dimorphismes craniofaciaux sont le bec de lièvre, le palais fendu, les anomalies de la mâchoire tel que la brachygnathie et micrognathie. Le système génito-urinaire présente une absence d'organes génitaux externes, d'ouvertures anale et urétrale. On observe aussi des malformations des appendices préauriculaires ainsi qu'une microtie et une anotie (192). Des anomalies du coeur, de l'efflux sanguin, de l'arc aortique, du thymus, de la rétine et du nerf optique sont également rapportées (193).

4.6 Thérapeutique

En oncologie, les rétinoïdes sont utilisés comme molécules synthétiques dans le traitement de différents types de néoplasies, dont la leucémie promyélocytaire (LPM), le cancer de la prostate, du poumon, du rein, du sein et du pancréas. Le mécanisme d'action permet d'une part une différenciation cellulaire et d'autre part empêche la prolifération des cellules par une inhibition de la mitose et par une activité proapoptotique (194). Le cancer de la prostate est associé à une hyperméthylation de la RALDH2 ce qui empêche la formation de l'AR. Une étude sur des cellules d'adénocarcinome pancréatique a montré *in vitro*, une redifférenciation et une augmentation de l'apoptose suite à l'administration d'AR *tout-trans* (195), ce qui nous permet d'envisager une piste thérapeutique possible pour le traitement du cancer du pancréas. Par contre, le traitement à l'AR dans les cancers à tumeur solide est difficilement toléré et cause des effets indésirables tels que des réactions cutanées, des céphalées, des nausées et vomissements qui semblent être dépendant de la dose. La pertinence de l'utilisation de l'AR *tout-trans* dans ces circonstances doit être réévaluée. D'autres études ont évalué l'usage de rétinoïdes synthétiques, ligands du RAR, dans le traitement des tumeurs solides. Aucune toxicité associée à la dose n'a été rapportée mais un tiers des participants aux études a développé une thromboembolie veineuse. L'usage de l'AR *13-cis* est mieux caractérisé. Les participants aux études cliniques de phase I ont éprouvés des maux de tête, des urétrites et des dermatites. Dans le traitement du carcinome à cellules squameuses du cou et de la tête, en stade avancé ou récurrent, le traitement à l'AR *13-cis* combiné à une chimiothérapie s'est avéré efficace chez 72% des patients. Des résultats similaires, ont été obtenus dans le cancer de la peau à cellules squameuses et le cancer cervical récurrent. L'association de l'AR *13-cis* avec l'interféron et une chimiothérapie, s'est avérée efficace dans le cancer de la prostate, du sein, et du carcinome à cellule rénale en stade avancé. Des études utilisant les rétinoïdes, ligands sélectifs du RXR, dans le cancer du poumon autre que celui à petites cellules, ont été effectuées. Le bexarotène a été bien toléré, ses principaux effets secondaires sont l'hypertriglycémie et l'hypothyroïdisme tandis que les réactions cutanées sont moins fréquentes. Les données préliminaires indiquent un bénéfice pour la survie des patients atteints de ce cancer dont le pronostic est habituellement sombre (196). La LPM est causée par la fusion d'un complexe protéique formé par le produit du gène PML avec celui du RAR α , couplé à des corépresseurs. L'administration conjointe d'AR *tout-trans* et de chimiothérapie conventionnelle a permis une rémission complète de la LPM chez 90% des patients

nouvellement diagnostiqués. Elle est aussi efficace chez les patients dont le cancer est récurrent. Ce traitement présente une faible incidence d'hémorragies et d'infections. Cependant, le syndrome de l'AR (SAR) constitue un effet secondaire grave (197). Il se traduit par une leucocytose associée à l'augmentation rapide du nombre de neutrophiles différenciés qui sécrètent des cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF- α , G-CSF) (198). Le SAR s'accompagne de fièvre, d'une détresse respiratoire, suivi d'une infiltration pulmonaire interstitielle, d'une prise de poids, d'épanchement cardiaque et pleural ainsi que d'une insuffisance rénale (197). Ces résultats sur la LPM montrent l'efficacité de ce premier traitement à cible moléculaire. La thérapie utilisant le bexarotène, un ligand des trois isotypes du RXR, est également utilisée dans le lymphome cutané à cellule T avec une efficacité globale de 48%. Les effets secondaires les plus fréquents sont une augmentation des triglycérides, du cholestérol, une hypothyroïdie et des anomalies des tests des fonctions hépatiques (199). D'autres études qui abordent le traitement du cancer du col de l'utérus ont montré une rémission complète, variant entre 33 et 64 % des patients, lorsqu'un traitement à base d'AR en combinaison avec des radiations et d'INF- α a été utilisé (200). Enfin, l'utilisation de réxinoïdes dans une étude clinique de phase III portant sur la chimioprévention d'un second cancer du sein, a montré une tendance durable de la réduction du risque de développer un deuxième cancer (201). Chez les PVVIH atteints de sarcome de Kaposi, l'usage de l'AR en application topique ou systémique s'est avéré supérieur au placebo et constitue le traitement de première ligne de ce cancer lorsque administré conjointement au traitement antirétroviral (202).

L'AR a été aussi utilisé avec succès dans le traitement des maladies de la peau (203) tel que la kératose actinique, les kératodermes, le psoriasis, le lichen planus, l'acné et le carcinome des cellules basales (204-206). L'utilisation d'AR *tout-trans* dans le traitement de l'acné est répandue car il est l'agent kératolytique le plus puissant. Cependant, son utilisation est limitée par l'irritation cutanée, la photosensibilité et l'augmentation de l'acné qu'il cause en début de traitement. L'effet secondaire principal est la sécheresse cutanée qui peut évoluer en dermatite (207). Les rétinoïdes, la vitamine D et les stéroïdes sont les molécules de choix dans le traitement du psoriasis. Le tazarotène, un ligand du RAR, constitue une innovation pour le traitement de cette affection car il régule la prolifération et la différenciation des kératinocytes. Le taux de succès est similaire à celui obtenu avec les deux autres traitements standards et se situe entre 52% et 70% en fonction de la

concentration utilisée. Les effets secondaires rapportés dans cette étude sont l'irritation locale avec prurit, sensation de brûlures et érythème (208). Le traitement du granulome annulaire (GA) avec l'isotrétinoïne topique, a permis une rémission complète des lésions chez 90-100% des patients affectés. Dans les études portant sur le GA, le traitement était généralement bien toléré; les effets secondaires les plus fréquents sont les lèvres sèches ainsi qu'une élévation des triglycérides et des tests des fonctions hépatiques (209). Le mélasme et l'hyperpigmentation inflammatoire associée à diverses affections cutanées, peuvent être traités avec succès par l'AR tout-*trans*. On peut observer les bénéfices cliniques après 24 semaines de traitement. Les effets indésirables de ce traitement sont l'augmentation de la pigmentation, l'érythème et la desquamation (210). L'hydradénite suppurative peut également être traitée avec des rétinoïdes, cependant les résultats sont inégaux entre les patients (211). L'usage thérapeutique de rétinoïdes pourrait servir à améliorer l'inflammation dans les maladies autoimmunes dépendantes de IL-17 (212) et être utile dans le traitement de la dégénérescence maculaire (213). La thérapie à base de ligands sélectifs pour RAR α et β pourrait être utilisée dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde car elle s'est avérée efficace dans le modèle animal de l'encéphalomyélite expérimentale autoimmune (214). Les rétinoïdes sont aussi le traitement de choix de l'ichtyose (215). Enfin, l'usage des rétinoïdes est probablement encore plus large car bien des affections dermatologiques demeurées sans solution médicale concrète peuvent faire l'objet, selon le bon jugement du médecin, de leurs utilisations potentielles.

Dans la diarrhée infantile, l'administration de la vitamine A permet de réduire la mortalité de 23% ainsi que la sévérité de cette affection dans cette population (216). La vitamine A combinée à la vitamine E est le traitement de choix de l'abétalipoprotéïnémie, connue aussi sous le nom de syndrome de Bassen-Kornsweig, un désordre héréditaire autosomique récessif rare qui affecte l'absorption des lipides et qui cause une rétinite pigmentaire secondaire à la DVA (217). Le traitement par la vitamine A protège de la broncoconstriction associée à l'activité physique, mieux connue sous le nom d'asthme à l'effort (218). Une étude chez le rat a montré que l'usage des rétinoïdes peut réguler les blessures des glomérules rénaux en limitant d'une part, la prolifération et les lésions glomérulaires et d'autres part, l'albuminurie (219). Finalement, des études récentes montrent un lien probable entre les désordres affectifs et les rétinoïdes (206).

Chapitre 5

Article 1

Serum Retinoid Levels are Altered during Chronic HIV infection, Combination Antiretroviral Therapy and Treatment Interruptions

Maude Loignon, Hélène Brodeur, Sonia Deschênes, Denis Phaneuf, Pangala V. Bhat and Emil Toma

Soumis   AIDS, 2007

Introduction à l'article: Serum Retinoid Levels are Altered during Chronic HIV infection, Combination Antiretroviral Therapy and Treatment Interruptions.

On observe une incidence croissante d'anomalies métaboliques lipidiques et glucidiques, ainsi que des changements corporels chez les patients infectés par le VIH qui reçoivent des antirétroviraux (HAART). Ces anomalies sont souvent accompagnées des manifestations cliniques suivantes : la chéilite desquamative, la sécheresse des téguments et des muqueuses, la friabilité et la perte des cheveux, la paronychie, les ongles incarnés et les granulomes du lit unguéal. Ces manifestations cliniques et métaboliques ressemblent aux réactions indésirables décrites avec l'usage des traitements systémiques d'acide et sont nommés réactions « retinoid-like ». Des études in vitro, portant sur les antirétroviraux, notamment les inhibiteurs de la protéase, ont montré des altérations dans la synthèse de l'acide rétinoïque et dans la voie signalétique des rétinoïdes.

Hypothèse : Les taux sériques des rétinoïdes sont différents entre les personnes infectées par le VIH et celles non infectées par le VIH.

Afin de tester cette hypothèse nous avons procédé directement à la détermination des rétinoïdes autant chez des patients infectés par le VIH que chez des volontaires sains.

Objectifs :

1. Évaluer l'effet du VIH sur les taux plasmatiques des rétinoïdes;
2. Évaluer les effets du traitement anti-VIH sur les taux plasmatiques des rétinoïdes ;
3. Explorer les corrélations entre le taux des rétinoïdes et la charge virale du VIH, le décompte des CD4+ ainsi qu'avec l'expression des CD38, dont le gène contient un RARE, sur les CD8+ et avec certains paramètres métaboliques : taux du cholestérol, des triglycérides et du peptide C.

Méthodes : Notre étude a un volet d'analyse transversale. Le dosage des rétinoïdes est effectué dans différents groupes de patients. Le groupe 1 (G1) est constitué de 28 volontaires sains. Le groupe 2 (G2), comporte 12 patients infectés par le VIH ayant un contrôle sous optimal de la charge virale. Enfin le groupe 3 (G3) implique 10 participants d'une étude de vaccination thérapeutique et d'interruptions du HAART, qui reçoivent un

HAART optimal et intensifié. Chez ces derniers, des évaluations longitudinales ont été effectuées en 4 occasions : 1) Lors de l'intensification du HAART, 2) au moment de la première interruption du HAART, 3) après de la reprise du traitement et lorsque la charge virale du VIH se situe de nouveau sous le seuil de détection et enfin 4) lors d'une deuxième interruption du HAART.

Résultats : Nous avons constaté que les patients du groupe 3, sous traitement avec un HAART intensifié avaient les taux les plus bas d'AR, les plus élevés de ROL et les rapports ROL/AR les plus élevés. Les patients du groupe 2 avaient les taux le plus bas de ROL et des taux d'AR supérieurs aux volontaires sains du groupe 1 mais inférieurs aux patients du groupe 3. Chez les patients du groupe 3, on observe une corrélation entre les taux plasmatiques de ROL et les concentrations de triglycéride et de cholestérol. Il n'y a pas d'autres corrélations entre le taux plasmatique de rétinoïdes et les autres paramètres mesurés.

Conclusions : Malgré un nombre réduit de volontaires, nous avons démontré des différences significatives dans les taux des rétinoïdes entre les 3 groupes de patients. Nous avons conclu que les taux plasmatiques d'AR sont diminués par le HAART alors que les taux de ROL sont diminués par l'infection au VIH. Ces anomalies métaboliques affectent l'expression d'une multitude de gènes contenant un RARE qui sont impliqués dans des processus métaboliques, hormonaux et immunitaires. Nos données ouvrent des nouvelles pistes de recherche qui méritent d'être explorées pour expliquer l'apparition des certains effets indésirables des antirétroviraux ainsi que les anomalies métaboliques, les changements corporels, de même que des effets bénéfiques du HAART.

Serum Retinoid Levels are Altered during Chronic HIV infection, Combination Antiretroviral Therapy and Treatment Interruptions*

Running head: Serum retinoids in chronic HIV infection

Maude Loignon^a, Hélène Brodeur^a, Sonia Desch  nes^a, Denis Phaneuf^b, Pangala V. Bhat^a and Emil Toma^{a,b}

From the ^aResearch Centre and ^bDepartment of Microbiology & Infectious Diseases, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)- Hôtel-Dieu, Montreal, Quebec, Canada

*Presented in part at the 7th International Workshop on Adverse Drug Reactions and Lipodystrophy in HIV, November 13-16, 2005, Dublin, Ireland. *Antiviral Therapy* 2005; 10: L62

Sponsorship: This work was supported in part by grants from Abbott Laboratories Limited, Boehringer Ingelheim and Hoffmann-LaRoche. The CTN-140 Study was supported by the Canadian HIV Trials Network (CTN).

Correspondence to: Emil Toma, MD, DSc, FRCP(C), Department of Microbiology & Infectious Diseases, CHUM, Hôtel-Dieu, 3840 St. Urbain Street, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada for clinical aspects and Pangala V. Bhat, PhD, Laboratory of Nutrition and Metabolism, CHUM, Research Centre, 3850 St. Urbain Street, Montreal, Quebec H2W 1T7 for laboratory issues.

Requests for reprints to: Emil Toma, MD, DSc, FRCP(C)

Tel.: [information retir  e / information withdrawn] (P.V. Bhat); Fax: [information retir  e / information withdrawn]; e-mail: [information retir  e / information withdrawn] or [information retir  e / information withdrawn]

Word count: Abstract -249; text - 3,492.

Abstract:

Objective: To assess serum retinoid levels and to correlate them with metabolic, immunological and virologic parameters in chronically HIV-infected and healthy volunteers.

Design: a) Cross-sectional assessments of 28 healthy adults (group 1=G1), 12 HIV-infected patients with suboptimal virologic control (G2), and 10 HIV-infected participants in a study on therapeutic vaccination and antiretroviral interruptions (G3). b) Longitudinal measurements at 4 time points in G3. Retinoid levels were correlated with metabolic parameters, CD₄⁺ cell count, HIV viral load, and CD₈⁺₃₈⁺ fluorescence intensity.

Methods: Fasting serum retinoic acid and retinol levels were measured by high performance liquid chromatography.

Results: Retinoic acid levels were lowest ($P<0.01$) in G3 while on therapy (0.5 ± 0.3 µg/dL) and slightly augmented during treatment interruptions; they were lower but not significantly in G2 than those in G1. Retinol levels were highest in G3 during therapy (82 ± 3 µg/dL) and diminished while off antiretrovirals; they were significantly lower ($P<0.01$) in G2 (37.7 ± 3.2) than those in G1 (64.3 ± 4.4) and G3. Retinol/retinoic acid ratios were significantly higher in G3. No correlation was found between retinoid levels and CD₄⁺ cell count, HIV viral load or CD₈⁺₃₈⁺ fluorescence intensity. Retinol levels were correlated with triglyceride and cholesterol levels in G3.

Conclusions: Serum retinoic acid levels are decreased by antiretroviral therapy whereas retinol levels are diminished in uncontrolled HIV infection. These alterations in retinoid metabolism may affect the expression of retinoid-responsive genes which might be responsible for some adverse effects observed in HIV-infected persons treated with antiretrovirals.

Keywords: Chronic HIV infection, retinoic acid, retinol, combination antiretroviral therapy; therapeutic vaccination, treatment interruption.

Introduction

Vitamin A (retinol) is essential for embryonic development and epithelial cell differentiation. It is converted to retinoic acid (RA), the active metabolite of vitamin A [1].

RA is biosynthesized from retinol (ROL) by 2 sequential oxidation steps. In the first step, ROL is reversibly oxidized to retinal by alcohol and short-chain dehydrogenases [1, 2]. In the second step, retinal is irreversibly oxidized to RA by cytosolic retinal aldehyde dehydrogenases (RALDHs) [1, 2]. RA binds and activates nuclear receptors resulting in the activation of RA-dependent gene expression [1-4]. All-trans RA is the physiological ligand for the RA receptors (RARs), whereas 9-cis RA is a high-affinity ligand for retinoid X receptors (RXRs) but also for RARs [1-4]. These nuclear receptors bind to RA response elements (RAREs) in the promoter/enhancer of a multitude of genes involved in lipid and glucose metabolism [1-4].

RXRs also form heterodimers with several other nuclear receptors and, hence, act as transcription factors for multiple genes involved in metabolic, hormonal and immune processes [2, 4-7]. RA responses in gene expression depend on their intracellular levels which are regulated by synthesizing and catabolizing enzymes and by their binding to cytosol RA-binding proteins (CRABPs) [2, 6-10]. RAs, all trans and 9-cis, are also potent therapeutic agents against promyelocytic leukemia, advanced T-cell lymphoma, psoriasis, severe nodular acne, and Kaposi's sarcoma [4, 10]. Several adverse effects have been reported with their use, such as desquamative cheilitis, xerosis, alopecia, paronychia, pyogenic granuloma of nail folds, and hyperlipidemia [10, 11]. Similar clinical features and laboratory abnormalities, called retinoid-like adverse effects, have been observed during combination antiretroviral therapy (cART), especially when certain HIV protease inhibitors (PIs) were included in this regimen [12, 13]. These adverse events are often associated with morphological and metabolic abnormalities [12, 14].

It has been proposed that PIs interfere with retinoid and lipid metabolism [14], and heightened retinoid signaling has been attributed to the PI indinavir [15]. Our group discovered that RA synthesis is altered in vitro by PIs [16]. More precisely, increased

activity and expression of RALDH-1, the enzyme implicated in RA synthesis, were encountered with the PIs ritonavir and indinavir, respectively.

Although vitamin A status has been evaluated in HIV infection [17, 18], no investigation of serum RA has been undertaken so far.

Here, we report on serum RA, ROL and ROL/RA ratios from cross-sectional assessments in healthy adult volunteers, adults with chronic, suboptimally-controlled HIV infection, and patients with optimal HIV suppression; for the last group, participants in a pathogenesis-based trial on cART intensification, therapeutic vaccination and cART interruptions, we also include longitudinal data during cART and cART interruptions. In addition, correlations with metabolic, virologic and immunologic data have been performed.

Methods

Participants

Cross-sectional assessments of fasting serum RA, ROL and RA/ROL ratios were conducted in 28 healthy adult volunteers (group 1 = G1), 12 HIV-infected patients with suboptimal virologic control (G2), and 10 HIV-infected participants from a study (CTN-140 trial) on therapeutic vaccination and antiretroviral interruptions (G3). In this last group of patients (G3), serum retinoids were assessed at 4 time points: during cART intensification (ON 1), during 2 cART interruptions (OFF 1 and OFF 2) and when re-initiated cART (ON 2) was again fully suppressive.

All participants provided written, informed consent after the protocol and the consent forms had been approved by the Research Ethics Committee of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM).

Serum retinoid levels

Blood was collected into 7-ml Vacutainer BD SST tubes containing a silica gel-based clotting activator and wrapped earlier in aluminum foil (to avoid light). Blood was processed immediately in a dark room, centrifuged (21K/BR Marathon-Fisher Scientific centrifuge) at 10,000 rpm at 4°C for 5 minutes. Serum was then separated and transferred

to 5-ml cryotubes, also wrapped earlier in aluminum foil, coded to preserve confidentiality, and kept frozen at -80°C until assayed.

At the time of assay, the serum samples were defrosted on ice. 300 μL serum were then taken, transferred to 1.5-mL Eppendorf centrifuge tubes and centrifuged for 10 minutes at 4°C and 3,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415). To 200 μL of the clear supernatant, 200 μL of extraction solvent, composed of acetonitrile:butanol mixture (ratio 1:1), were added, vortexed and centrifuged for 15 minutes at 3,000 rpm in a Sorvall RC3C Plus centrifuge to obtain a clear supernatant. 100 μL of the supernatant were injected directly for retinoid determination into a reverse-phase Shimadzu LC-10ADVP (Mandel, Guelph, ON, Canada) high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a SIL-HTC autosampler and cooling system [19]. Retinoids were separated on a Phenomenex 10-ODS analytical column (250 x 4.5 mm, Phenomenex, Inc., Torrance, CA), and eluted with a mobile phase of acetonitrile:water (60:40) containing 10 mM ammonium acetate at a flow rate of 1.2 mL/minute. Retinoids were detected in a photodiode array detector (Shimadzu model SPD-M10AVP) which collected spectra between 200 and 500 nm. Calibration curves for RA were obtained with standard, pure solutions of RA. Characteristic ultraviolet (UV) spectra and retention times identified each RA isomer, and peak areas were measured at $\lambda_{\text{max}}=330$ in a Shimadzu SZ-228 data system. The recovery of retinoids was greater than 99%. Plasma ROL measured represents ROL bound to ROL-binding proteins (RBPs). The detection limit for all-trans and 9-cis RA was 2 pg.

Plasma viral load

Plasma viral load was quantified with the Amplicor HIV-1 Monitor Test, version 1.5 (Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ) with the lower limit of detection of 50 (1.7 log₁₀) HIV-1 RNA copies/ml; this was performed according to the manufacturer's instructions.

Lymphocyte phenotyping

Lymphocyte phenotyping was performed on a FACS Calibur flow cytometry system (Becton Dickinson, San Jose, CA) after direct staining with the following monoclonal antibodies: anti-human CD3-FITC, CD8-PE, CD4-APC, CD45-PerCP, anti-human CD3-FITC, CD16-PE, CD56-PE, CD19-APC, CD45-PerCP and anti-human CD8-PE, CD38-

FITC, CD45-PerCP (BD Biosciences, Mississauga, Ontario). CD38 density expression on CD8+ is reported as the median relative fluorescence.

Metabolic parameters

Fasting serum cholesterol and triglyceride levels were measured in all participants by standard techniques. In G3 participants, fasting cholesterol, triglyceride and C-peptide levels were quantified at each of the 4 time-points.

Statistical analysis

Data are presented as medians and ranges, means \pm SEM (and 95% confidence intervals- 95% CI- of means). Correlations (rs) between RA, ROL and ROL/RA ratios in each group of participants along with age, metabolic parameters, immunological and virologic data were analyzed by Spearman's rank non-parametric test. Differences between groups were determined by the Mann-Whitney non-parametric t test when the 2 HIV-infected groups were compared, and by the Kruskal-Wallis test followed (if P values were <0.05) by Dunnett's multiple comparison test when the 3 groups were compared. Changes over time in G3 were assessed by analysis of variance, employing Friedman's non-parametric test, followed by Dunnett's post test for multiple comparisons when the P values were ≤ 0.05 . The data were computed and graphic presentations created by GraphPad Prism version 4.02 for the Windows program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Results

Baseline demographic and descriptors are presented in Table 1. The 28 healthy adult volunteers (G1) were represented by 10 males and 18 females. The HIV group with suboptimal virologic control (G2) included 12 adults (10 males). Their cART consisted of a backbone of 2 nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and ritonavir (r)-boosted PIs in 9 cases: fosamprenavir/r (3), lopinavir/r (3), tipranavir/r (2), atazanavir/r (1). One patient was on nelfinavir, 1 on 3 NRTIs and another without cART. G3 included all 10 participants of the CTN-140 Trial; all of them were males and had an antiretroviral backbone consisting of D4T and 3TC during 6-month cART intensification. The other antiretrovirals included in their regimen were: indinavir (4 participants), ritonavir/saquinavir (4 patients), nelfinavir (1 patient), efavirenz (1 patient). Median

(range) time duration on cART and off cART when the tests were performed in CTN-140 participants was: 37.5 (22-48) months (including the 6-month intensification) for ON 1; 23 (12-14) weeks for OFF 1; 17.5 (13-20) weeks for ON 2 and 15 (2-19) weeks for OFF 2.

The healthy volunteers were younger than HIV-infected persons but not significantly, and had significantly lower triglyceride levels. Cholesterol levels were not statistically different between groups (Dunnett's post test $P > 0.05$). The 2 groups of HIV-infected adults (Table 2) were quite similar in age, duration of HIV infection and of cART. However, they significantly differed in terms of CD4+ count and percentage, CD38 expression on CD8+ T-cells and viral load, illustrating the optimal versus suboptimal therapeutic control of HIV infection.

HPLC profile of serum retinoids

Representative HPLC chromatograms of RA and ROL extracted from serum samples in G1, G2, G3 and G3 after treatment interruption appear in Figure 1. Peaks eluting at ~5 and 11 minutes were confirmed as RA and ROL by co-chromatography with standard retinoids and also by determining their UV spectra, respectively.

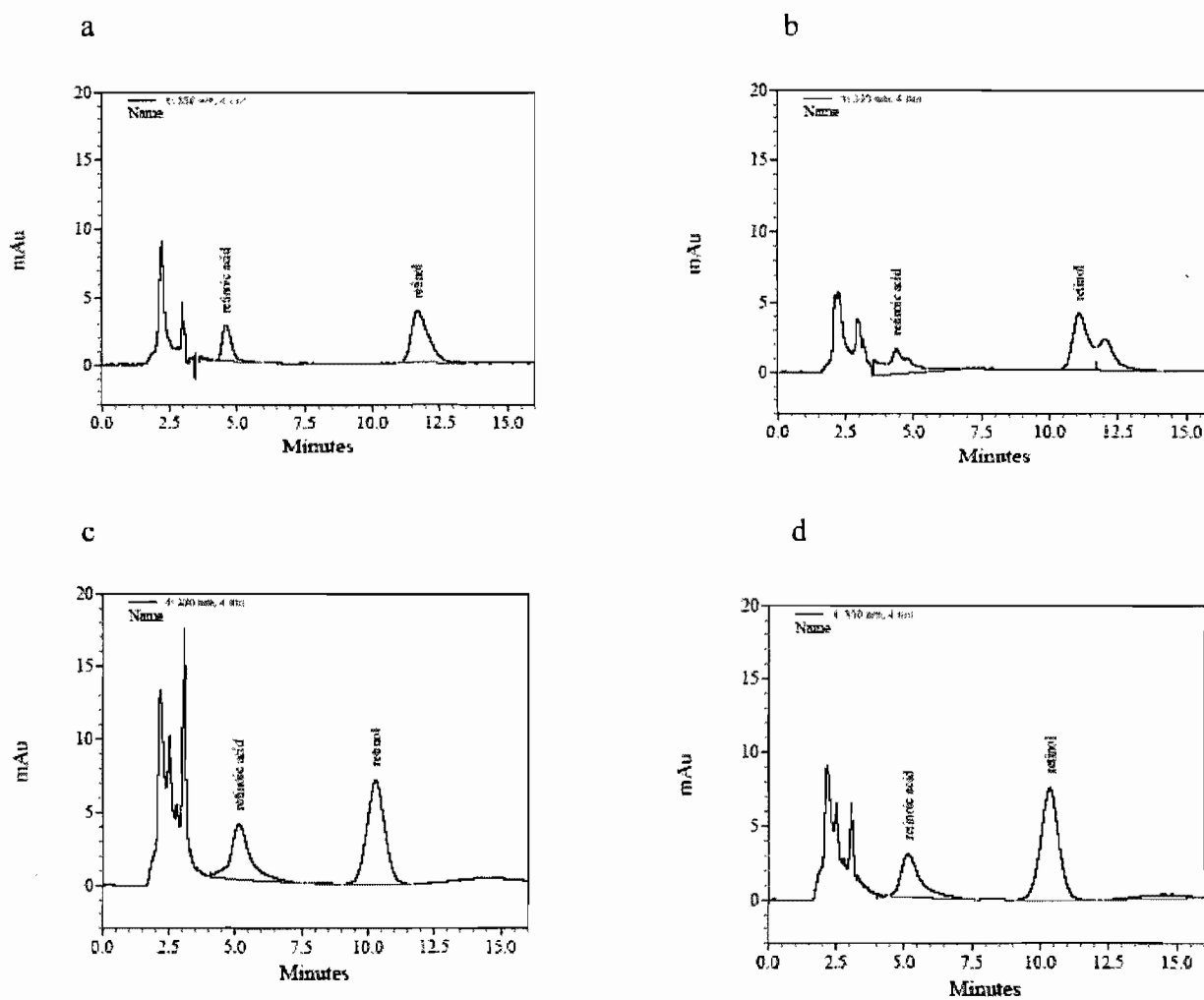
Table 1. Baseline demographics and descriptors

Parameter	Group 1	Group 2	Group3	P value (Kruskal-Wallis)
Age				P=0.06
Median (range)	36.5 (21-63)	48.4 (35.4-53.5)	41.5 (36-51)	
Mean \pm SEM	38.6 \pm 2.4	47.5 \pm 1.4	42.7 \pm 1.78	
95% CI mean	33.6-43.5	44.5-50.6	38.7-46.7	
Triglycerides				P<0.01: G1 vs. G2 G1 vs. G3
Median	0.81 (0.4-	2 (0.7-5.4)	2.3 (1.1-4.6)	
Mean \pm SEM	2.97)	2.5 \pm 0.43	2.4 \pm 0.32	
95% CI mean	1.06 \pm 0.13	1.5-3.4	1.7-3.1	
Cholesterol	0.78-1.3			P=0.04 by Kruskal- Wallis but Dunnett's
Median		4 (1.5-6.4)	5.5 (3.9-7.7)	
Mean \pm SEM	4.8 (3.2-7)	4 \pm 0.35	5.3 \pm 0.38	>0.5
95% CI mean	4.8 \pm 0.17	3.2-4.7	4.5-6.2	
	4.5-5.2			

Table 2. Baseline descriptors for the 2 groups of HIV-infected participants

Parameter	Group 2	Group 3	P value (Mann-Whitney)
HIV duration (years)			P=0.2
Median (range)	12 (2-18)	10.7 (1.5-13)	
Mean \pm SEM	12.3 \pm 1.4	9.9 \pm 1.2	
95% CI mean	9.2-15.4	7-12.7	
ART* duration (years)			P=0.14
Median (range)	10.5 (0-15)	4.6 (1.4-11)	
Mean \pm SEM	8.4 \pm 1.4	5.6 \pm 1.2	
95% CI mean	5.2-11.5	2.8-8.3	
CD₄⁺ count (cells/μL)			P=0.003
Median (range)	55 (10-520)	375 (220-1,050)	
Mean \pm SEM	135 \pm 54	492 \pm 95	
95% CI mean	15.7-254	277-707	
CD₄⁺ %			P=0.002
Median (range)	4 (1-26)	22 (15-43)	
Mean \pm SEM	8.1 \pm 2.6	26.4 \pm 3.3	
95% CI mean	2.3-13.8	18.9-33.9	
CD₈⁺ ₃₈⁺⁺			P=0.001
Median (range)	4.45 (1.5-12.6)	1.4 (0.9-2.5)	
Mean \pm SEM	4.9 \pm 0.9	1.5 \pm 0.17	
95% CI mean	2.9-6.9	1.1-1.9	
HIV viral load			P<0.001
(log ₁₀ RNA copies/mL)			
Median (range)	4.6 (1.7-6.2)	1.7 (1.7-1.7)	
Mean \pm SEM	4.1 \pm 0.4	1.7 \pm 0	
95% CI mean	3.2-5	1.7-1.7	

Figure 1. Retinoic acid serum level in different patients



Legend:

a: HIV-infected participant (G3) on optimal, intensified treatment;

b: HIV patient (G3) off treatment;

c: healthy volunteer (G1)

d: HIV-infected volunteer (G2) with suboptimal treatment

Serum RA levels

The serum RA levels in various groups are shown in Figure 2 a. Serum RA levels were below the quantification limit in 1 out of 28 healthy adults, 4 out of 12 HIV-infected people with suboptimal virologic control, and in 7 out of the 10 participants from G3 while on intensified cART. In the cross-sectional assessment, RA were significantly lower in G3 while on intensified cART in comparison to healthy adults; they were also lower than in G2 but not significantly. In longitudinal assessments of G3 participants, RA levels did not change significantly ($P=0.81$ -Friedman) during off and on cART periods, and remained lower than in the other groups.

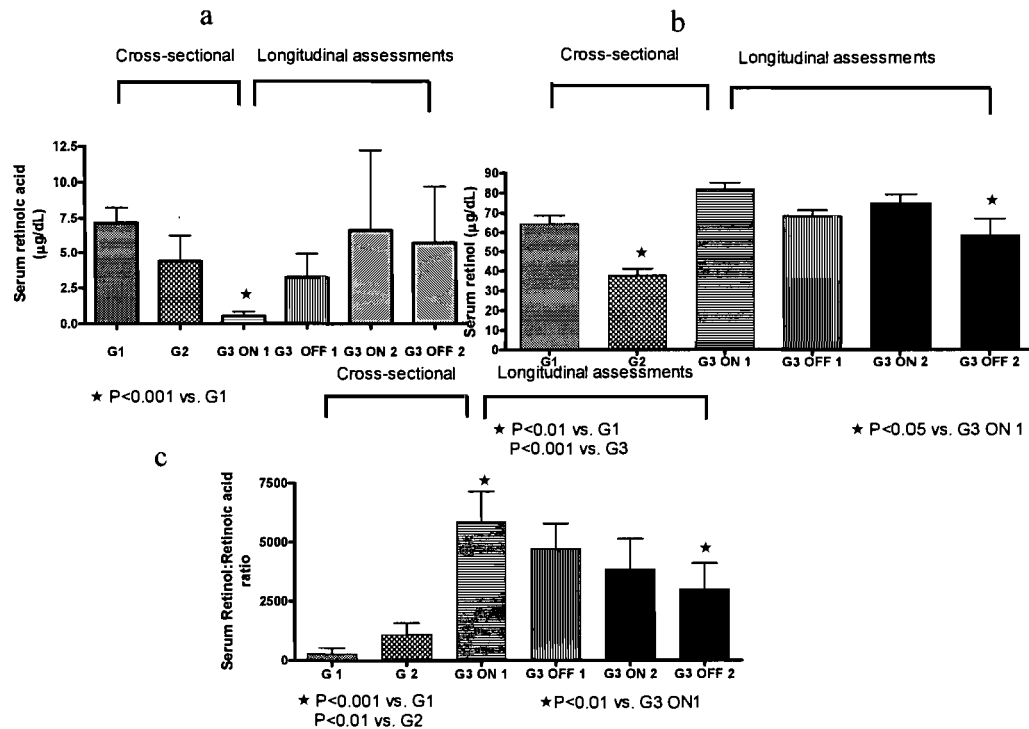
Serum RA levels were positively correlated with age only in G2 ($rs=0.68$, $P=0.01$). No correlation was found between RA levels and viral load, CD4+ cell count and CD8+38+ fluorescence index in both groups of HIV-infected patients nor during longitudinal assessments in G3 at any time point.

While on intensified cART, RA in G3 did not correlate with fasting blood levels of cholesterol, triglycerides or C-peptide. When cART was resumed after the first cART interruption, a significantly positive correlation ($rs=0.79$, $P=0.009$) was apparent between RA and fasting serum C-peptide levels.

Serum ROL levels

Serum ROL levels are presented in Figure 2b. In healthy adults (G1), serum ROL levels (64.3 ± 4.4 $\mu\text{g/dL}$) were within normal limits for North Americans; however, 3 individuals had low ROL levels (< 30.1 $\mu\text{g/dL}$ or < 1.05 $\mu\text{mol/L}$). G3 participants had the highest ROL values (82 ± 3 $\mu\text{g/dL}$) but were not statistically different from healthy controls. ROL levels were significantly decreased in G2 compared to the other 2 groups, and 3 out of the 12 participants had lower than normal ROL levels.

Figure 2. Longitudinal and cross-sectional assessments of retinoic acid serum level



Legend:

Serum RA (a), ROL (b), and ROL/RA ratios (c). Bars represent means \pm SEM.

G1=healthy controls; G2=HIV-infected persons with suboptimal virologic control;

G3=patients enrolled in the CTN-140 trial: ON 1=during cART intensification; OFF

1=during first cART interruption; ON 2=after first cART resumption when viral load was

again below the detection limit; OFF 2=during second cART interruption.

* Statistically significant differences in comparison with the other groups as mentioned. P values for cross-sectional assessment are from the Kruskal-Wallis test, followed by Dunnett's post hoc test for multiple comparisons. P values for longitudinal assessments in G3 are from Friedman's test, followed by Dunnett's post hoc test for multiple comparisons.

Longitudinal ROL assessments in G3 revealed a decline during cART interruptions. Although ROL levels rose during cART resumption, they did not reach initial values, and decreased further during the second cART interruption.

ROL levels correlated negatively with age in healthy adults ($r_s = -0.45$, $P = 0.017$) but not in the 2 groups of HIV-infected persons whether on or off cART. They were correlated with triglyceride and cholesterol levels in G3 while on cART. In both groups of HIV-infected patients, no correlation was evident between ROL levels and HIV viral load, CD4+ cell count and the fluorescence index of CD8+ bearing CD38 T-cells. Also, during the longitudinal assessments in G3, no correlation was noted at any time-point with the virologic or immunologic results.

Correlation between ROL and RA levels.

No significant correlation was found between serum ROL and concomitant RA levels in the study participants.

ROL/RA ratio

ROL/RA acid ratios (log₁₀ transformed) are presented in Figure 2c. In cross-sectional evaluation, the ROL/RA ratios were statistically significantly higher in G3 compared to the other 2 groups. In these participants, ROL/RA ratio values decreased from the first measurement to the second cART ($P < 0.01$ Dunnett's post test). The ROL/RA ratio was negatively correlated with age only in G2 ($r_s = -0.63$, $P = 0.03$). No correlation was apparent between the ROL/RA ratio and HIV viral load, CD4+ cell count, and the CD8+38+ fluorescence index while on or off cART.

ROL/RA ratios significantly correlated ($r_s = 0.76$, $P = 0.01$) with fasting serum cholesterol levels in G3 during the second cART resumption.

Discussion

This work provides evidence that retinoid metabolism is altered in HIV-infected adults and that both HIV infection and cART are contributing factors.

Firstly, we report serum RA levels in HIV-infected adults both on cART and off cART in comparison to healthy volunteers. The RA assay we developed has a higher sensitivity

than those used by others for the assessment of serum RA levels in healthy controls, or patients with lung or human papilloma virus cervical cancers [19-24]. As different techniques have been employed we can not compare our data in healthy controls with those already reported. We found that serum RA levels are drastically decreased in patients with prolonged, intensified cART but much less so in individuals with suboptimally-controlled HIV-infection than in healthy adults. RA levels rose during cART interruptions in patients followed longitudinally, indicating that cART is the contributing factor for diminished serum RA levels in HIV-infected adults. This effect is more pronounced when cART is intensified and prolonged. The differences between the 2 groups of HIV-infected patients are probably also due to different cART regimens. In our previous in vitro work, we have shown that antiretrovirals such as indinavir, ritonavir and saquinavir increase the activity of RALDH-1 and, consequently, RA synthesis; in addition, indinavir also augmented the expression of RALDH-1 mRNA [16]. These findings apparently are in contrast with the current results in humans. However, here, we report serum RA levels whereas RA synthesis occurs intracellularly where it could be enhanced by PIs as we established in vitro. PIs such as indinavir, ritonavir and saquinavir might affect RALDH-1, especially in adipose tissues which can store them. However, not all PIs have the same effect since they enter and accumulate differently in different tissues and have different intracellular localizations [25,26]. The tissue distribution of RA is also uneven because of tight control by enzymes involved in localized synthesis, such as RALDH-1, which are differentially expressed in tissues having higher levels of RA and correspondingly greater transcription of RA-regulated genes [27,28]. In addition, RA catabolism by CYP26 enzymes, leading to oxidative degradation and metabolism to polar, excretable forms, should be considered in vivo. Therefore, circulating RA levels do not reflect tissue concentrations, nor do they parallel the effects which depend on receptor and postreceptor mechanisms. It is well-known that RA metabolism is tightly controlled. Heightened RA levels in different tissues enhance the expression of various P450 enzymes (having a RARE in their gene promoter) such as CYP26A1 and, to a lesser degree, CYP 26B1 and 26C1, leading to exaggerated RA catabolism [9, 28]. Antiretrovirals, beyond their potential effects on RALDH-1, may induce, inhibit or be a substrate for several P450 CYP enzymes but not those involved in RA metabolism. In addition, elevated intracellular RA levels have a negative feedback action and will reduce or inhibit their own synthesis by lowering RALDH-1 expression [29]. Furthermore, heightened RA levels dose-dependently and positively regulate

lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) transcription and activity, resulting in an increased rate of ROL-ester formation for readily-reversible storage [9].

We think that the very low serum RA levels in patients with intensified cART reflect their higher intracellular concentrations. Augmented tissue levels of RA would evoke feedback inhibition of their synthesis and increased metabolism by enhanced expression of specific CYP enzymes. Also, the induction by RA of CRABP1 and 2 will fine-tune intracellular RA concentrations by either facilitating their catabolism or by sequestering them [6].

Secondly, we showed that HIV-infected adults with suboptimal virologic control have significantly lower ROL levels than normal healthy adults and persons with optimal, prolonged HIV suppression. ROL levels in our healthy controls are within the limits for North Americans and are similar to those reported recently [17,20]. However, it is well-known that serum ROL levels in healthy adults are homeostatically controlled and begin to decline only when liver reserves are very low [30,31].

In individuals with optimal HIV suppression, serum ROL levels decreased when cART was interrupted and HIV load rebounded. These data confirm our previous results [16] and are in keeping with earlier and recently disclosed lower ROL levels (<30 µg/dL) in 5% of men and 14% of women on cART [17,18]. Decreased serum ROL levels have been noted in HIV-infected individuals since the beginning of the AIDS epidemic, and they have been correlated with HIV-related morbidity and mortality as well as mother-to-child HIV transmission [18,32,33]. Nonetheless, hyporetinemia is quite common in HIV infection when the treatment is not optimal, and this also has been confirmed by our data.

Vitamin A supplementation has been shown to be beneficial in children, women and people in resource-poor countries [32-34]. Also, low serum carotene concentration is common in AIDS patients and predicts death [32,35].

Supplementation with micronutrients (including vitamin A) and natural mixed carotenoids improved survival in a randomized study [35]. The design of our CTN-140 trial enabled us to assess the effects of both HIV infection and cART on serum ROL in the same individuals longitudinally. We saw that ROL levels are highest during intensified,

prolonged cART, that they decrease during cART interruptions, and then increase slightly when cART is resumed and HIV infection is again suppressed. This observation clearly underlines the beneficial effects of cART on serum ROL levels. However, no correlation was evident between serum ROL levels and HIV viral load, CD4+ count and CD38 expression (a well- characterized marker of immune activation controlled by a RA-responsive gene) on CD8+ T-cells. Unlike healthy adults in whom ROL levels were negatively correlated with age, in HIV-infected patients, no such correlation was apparent, suggesting that ROL levels were influenced much more by HIV infection and its treatment than by age.

As we have mentioned above, ROL levels are higher in optimally-suppressed HIV-infected adults. We may speculate that there is probably increased intestinal ROL absorption due to heightened cellular ROL-binding protein (CRBP) II expression in intestinal mucosa as a consequence of cART-induced elevated intraepithelial RA levels [6,9,27,36]. On the other hand, decreased ROL utilization is also possible, as a consequence of feedback inhibition of the activity and expression of RALDH-1, the key enzyme involved in RA synthesis, by augmented RA levels in different tissues in patients treated with indinavir or ritonavir. This important feedback control of RA synthesis was shown to be mediated by RAR α , which inhibits RALDH-1 gene expression by antagonizing the enhancer action of CCAAT/enhancer-binding protein β [29]. The hypothesis is supported by our findings of lower RA levels in optimally-suppressed HIV-infected patients. Increased serum ROL levels with concomitantly reduced serum RA values have also been reported in patients with liver cirrhosis [37]. In this case, the authors postulated a reciprocal transfer of retinoid metabolites between the circulation and the liver. Moreover, the opposing actions of CRBP1, LRAT and alcohol dehydrogenase control the balance between ROL storage and degradation in the liver under any dietary vitamin A conditions [9,31].

The relatively-elevated ROL levels in G3 while on cART correlated with serum triglycerides and cholesterol indicating that both ROL levels and these metabolic abnormalities are probably induced or favoured by cART.

Furthermore, increased serum RBP levels, as found in HIV-infected patients receiving certain PIs [Toma et al. unpublished data], might eventually contribute to relatively-elevated ROL in these patients.

It was shown previously that retinoids can modulate HIV-1 long terminal repeat-directed expression and either augment or reduce HIV replication according to cell line and culture conditions [34,38]. In both our groups of HIV-infected persons, serum RA levels were not correlated with HIV viral load, CD4+ T-cell count or CD38 expression on CD8+ T-cells. On the other hand, RA levels in the study participants did not correlate with the fasting blood levels of cholesterol, triglycerides or C-peptide. The only exception was noted in G3 patients whose RA levels were significantly correlated with fasting serum C-peptide levels ($r_s=0.79$, $P=0.009$) when they resumed cART for a short period of time after the first cART interruption. This is in keeping with the reported correlation between RA levels and hemoglobin A1c in diabetes mellitus patients [39].

Thirdly, we observed, also for the first time, that ROL/RA ratios are much higher during cART, especially during its intensification. They were significantly higher than in the healthy controls and people with suboptimally-controlled HIV infection. Both increased ROL and diminished RA levels in G1 are responsible for such high ratios.

Collectively, our findings demonstrate that serum retinoids are altered in adults with chronic HIV infection and the contributing factors are both HIV infection and its treatment. They document, for the first time, the serum RA in HIV-infected persons, both cross-sectionally and longitudinally, during cART and cART interruptions. This study was not designed to assess the effects of specific cART regimens. Our results, together with previous work in vitro, may explain some of the retinoid-like side-effects seen in HIV-infected persons on PI-containing cART regimens. Elevated serum ROL levels and/or heightened RA levels in tissue might be responsible for drug-related adverse events.

The complexity of RA functions and the retinoid signaling system in the intricate web of transcriptional control arises from diverse combinations of RA isoforms, binding proteins, nuclear receptors, co-activators, co-repressors, inhibitors or silencing mediators [3,6,9]. This is under intensive study in many research centres including ours.

Acknowledgements

We express our deep gratitude to all trial participants. We thank Lise Cyr, study coordinator and research nurse, the Canadian HIV Trials Network (for support of the CTN-140 trial) and granting companies: Abbott Laboratories Limited, Boehringer Ingelheim and Hoffmann-LaRoche. We also thank Mr. Ovid Da Silva for editing this manuscript.

References

1. Napoli JL. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Progr Nucleic Acid Res Mol Biol* 2000; **63**: 139-188.
2. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 2001; **81**: 1269-1304.
3. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999; **20**: 321-344.
4. Shulman AI, Mangelsdorf DJ. Retinoid X receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med* 2005; **353**: 604-615.
5. Giguère V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 1999; **20**: 689-725.
6. Leid M, Kastner P, Chambon P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci* 1992; **17**: 427-433.
7. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, et al. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 2006; **58**: 760-762.
8. Chambon P. The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol Endocrinol* 2005; **19**: 1418-1428.
9. Ross AC. Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic acid oxidation. *J Nutr* 2003; **133**: 291 S-2896S.
10. Sardana K, Sehgal N. Retinoids: fascinating up-and-coming scenario. *J Dermatol* 2003; **30**: 355-380.
11. Saurat JH. Side effects of systemic retinoids and their clinical management. *J Am Acad Dermatol* 1992; **27**: S23-S28.

12. Garcia-Silva J, Almagro M, Juega J, Pena C, Lopez-Calvo S, del Pozo, J *et al.* Protease inhibitor-related paronychia, ingrown toenails, desquamative cheilitis and cutaneous xerosis. *AIDS* 2000; **14**: 1289-1291.
13. Garcia-Silva J, Almagro M, Pena-Penabad C, Fonseca E. Indinavir-induced retinoid-like effects: incidence, clinical features and management. *Drug Safety* 2002; **25**: 993-1003.
14. Carr A, Saamaras K, Chisholm DJ, Cooper DA. Pathogenesis of HIV-1 protease inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidemia, and insulin resistance. *Lancet* 1998; **351**: 1881-1883.
15. Lenhard JM, Weiel JE, Paulik MA, Furfine ES. Stimulation of vitamin A (1) acid signalling by the protease inhibitor indinavir. *Biochem Pharmacol* 2000; **59**: 1063-1068.
16. Toma E, Devost D, Lan NC, Bhat PV. HIV-protease inhibitors alter retinoic acid synthesis. *AIDS* 2001; **15**: 1979-1984.
17. Jones CY, Tang AM, Forrester JE, Huang J, Hendricks KM, Knox TA, et al. Micronutrient levels and HIV disease status in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy in the nutrition for healthy living cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; **43**: 475-482.
18. Nimmagadda A, O'Brien WA, Goetz MB. The significance of vitamin A and carotenoid status in persons infected by the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1998; **26**: 711-718.
19. Brodeur H. Études du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque. PhD Thesis. Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. April 2006.

20. Moulas AN, Gerogianni IC, Papadopoulos D, Gourgoulialis KI. Serum retinoic acid, retinol and retinyl palmitate levels in patients with lung cancer. *Respirology* 2006; **11**: 169-174.
21. De Leenheer AP, Lambert WE, Claeys I. All-*trans*-retinoic acid: measurement of reference values in human serum by high performance liquid chromatography. *J Lipid Res* 1982; **23**: 1362-1367.
22. Napoli JL, Pramanik BC, Williams JB, Dawson MI, Hobbs PD. Quantification of retinoic acid by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: total versus all-*trans*-retinoic acid in human plasma. *J Lipid Res* 1985; **26**: 387-392.
23. Meyer E, Lambert WE, De Leenheer AP. Simultaneous determination of endogenous retinoic acid isomers and retinol in human plasma by isocratic normal-phase HPLC with ultraviolet detection. *Clin Chem* 1995; **40**: 48-50.
24. Berlin VMG, Niranjali SN, Radhakrishnan MP, Devaraj H. HPV-induced carcinogenesis of the uterine cervix is associated with reduced serum ATRA level. *Gynecol Oncol* 2006; **103**: 113-119.
25. Vernochet C, Azoulay S, Duval D, Guedj R, Ailhaud G, Dani C. Differential effect of HIV protease inhibitors on adipogenesis: intracellular ritonavir is not sufficient to inhibit differentiation. *AIDS* 2003; **17**: 2177-2180.
26. Vernochet C, Azoulay S, Duval D, Guedj R, Cottrez F, Vidal H, et al. Human immunodeficiency virus protease inhibitors accumulate into cultured human adipocytes and alter expression of adipocytokines. *J Biol Chem* 2005; **280**: 2238-2243.
27. Bhat PV. Tissue concentrations of retinol, retinyl esters, and retinoic acid in vitamin A deficient rats administered a single dose of radioactive retinol. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; **75**: 74-77.

28. Taimi M, Helvig C, Wisniewski J, Ramshaw H, White J, Amad M, et al. A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-*cis* and all-*trans* isomers of retinoic acid. *J Biol Chem* 2004; **279**: 77-85.
29. Elizondo G, Corchero J, Sterneck E, Gonzales FJ. Feedback inhibition of the retinaldehyde dehydrogenase gene *ALDH1* by retinoic acid through retinoic acid receptor α and CCAAT/enhancer-binding protein β . *J Biol Chem* 2000; **275**: 39747-39753.
30. Tanumihardjo SA: Assessing vitamin A status: past, present and future. *J Nutr* 2004; **134**: 290S-293S.
31. Molotkov A, Ghyselinck NB, Chambon P, Duyster G. Opposing actions of cellular retinol-binding protein and alcohol dehydrogenase control the balance between retinol storage and degradation. *Biochem J* 2004; **383**: 295-302.
32. Nimmagadda A, Burri BJ, Neidlinger T, O'Brien WA, Goetz MB. Effect of oral β -carotene supplementation on plasma human immunodeficiency virus (HIV) RNA levels and Cd4+ cell counts in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis* 1998; **27**: 1311-1313.
33. Fawzi WW, Msamanga GI, Spiegelman D, Urassa E, McGarh N, Mwakagile D, et al. Randomized trial of effects of vitamin supplements on pregnancy outcomes and T cell counts in HIV-1-infected women in Tanzania. *Lancet* 1998; **351**: 1477-1482.
34. Semba RD, Lyles CM, Margolick JB, Caiaffa WT, Farzadegan H, Cohn S, et al. Vitamin A supplementation and human immunodeficiency virus load in injection drug users. *J Infect Dis* 1998; **177**: 611-616.
35. Austin J, Singhal N, Voigt R, Smaill F, Gill MJ, Walmsley S, et al. A community randomized controlled trial of mixed carotenoids and micronutrient supplementation of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Eur J Clin Nutr* 2006; **60**: 1266-1276.

36. Kurlandsky SB, Gamble MV, Ramakrishnan R, Blaner WS. Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J Biol Chem* 1995; **270**: 17850-17857.
37. Natarajan SK, Thomas S, Ramachandran A, Pulimood AB, Balasubramanian KA. Retinoid metabolism during development of liver cirrhosis. *Arch Biochem Biophys* 2005; **443**: 93-100.
38. Orchard K, Lang G, Harris J, Collins M, Latchman D. A palindromic element in the human immunodeficiency virus long terminal repeat binds retinoic acid receptors and can confer retinoic acid responsiveness on a heterologous promotor. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; **6**: 440-445.
39. Yamakoshi Y, Fukasawa H, Yamauchi T, Waki H, Kadowaki T, Shudo K, et al. Determination of endogenous levels of retinoic acid isomers in type II diabetes mellitus patients. Possible correlation with HbA1c values. *Biol Pharm Bull* 2002; **25**: 1268-1271.

Chapitre 6

Discussion

6. Discussion

Dès l'introduction des IP dans le traitement du VIH on a observé une incidence accrue des manifestations cliniques suivantes : la chéilite desquamative, la sécheresse des téguments et des muqueuses dont la bouche, les effets sur l'épithélium capillaire et le follicule pileux se traduisant par de la sécheresse, de la friabilité et la perte des cheveux. Des effets sur les ongles tels que la paronychie, les ongles incarnés et les granulomes du lit unguéal sont aussi répertoriés. Ces manifestations sont souvent accompagnées d'anomalies du métabolisme lipidique ou glucidique. Avant l'ère des HAART, ce type de manifestations était rarement rapporté et constituait des cas isolés chez les patients infectés recevant ou non un traitement antirétroviral. Ces manifestations cliniques et métaboliques ressemblent aux réactions indésirables décrites avec l'usage des traitements systémiques d'acide rétinoïque, chez les patients atteints de leucémie promyélocytaire, de lymphome à cellule T, d'acné nodulaire sévère ou de sarcome de Kaposi. De façon générale, ces effets indésirables sont décrits et nommés, réactions « retinoid-like ».

En 1998, Carr (88) a suggéré que les IP interfèrent avec le métabolisme de l'AR et deux mécanismes d'action potentiels ont été suggérés. Le premier implique un effet direct sur le CYP 3A du cytochrome P450. Le deuxième est plutôt associé à un effet sur la CRABP-1 car cette protéine possède une certaine homologie avec la structure primaire de la protéase du VIH-1 (88). Selon ces hypothèses, ces effets peuvent se traduire par une synthèse diminuée d'AR *9-cis* qui conséquemment cause une réduction de l'activité des RXR ainsi que des anomalies des voies métaboliques et signalétique des lipides. Toutefois, le CYP3A et la CRABP-1 ne sont pas impliqués dans la synthèse de l'AR. En effet, les isoformes du complexe P450 affectés par les IP sont différents de ceux impliqués dans le métabolisme de l'AR et la CRABP-1 dont l'action se situe d'avantage dans le catabolisme de l'AR (176). Par la suite, Lenhard a montré *in vitro*, qu'en présence d'AR tout-*trans*, l'indinavir augmente la production de la phosphatase alcaline, une enzyme qui possède un RARE dans son promoteur (163b). Suite à ces résultats, il a suggéré que la voie signalétique des rétinoïdes est affectée par les IP. Bien que cette supposition tente d'expliquer l'incidence accrue des effets indésirables « retinoid-like » chez les patients recevant de l'indinavir, les résultats sont basés sur des méthodes d'évaluation indirecte de la fonction des rétinoïdes.

L'hypothèse que nous proposons afin d'expliquer le mécanisme pathogénique du développement des réactions « retinoid-like » qui accompagne les changements corporels et les anomalies métaboliques chez des patients recevant des antirétroviraux est la suivante : Les antirétroviraux affectent une enzyme clé de la voie métabolique des rétinoïdes qui permet la conversion du RAL en AR, la RALDH-I, ce qui mène à des perturbations dans les concentrations de ROL, de RBP et de l'AR.

Notre groupe de recherche a d'abord évalué l'effet de sept antirétroviraux, de la classe des INTI, des INNTI et des IP, sur l'activité de la RALDH in vitro et sur l'expression des niveaux de l'ARNm, dans la lignée cellulaire d'épithélium de rein de porc, LLCPK, connue pour exprimer la RALDH (155). L'activité de la RALDH, telle que mesurée par la production d'AR à partir du rétinol tout-*trans*, en présence d'une RALDH recombinante a été augmentée de façon significative en présence d'antirétroviraux. Cette activité est augmentée de 24 % par le ritonavir, de 17 % par l'indinavir et le saquinavir, de 14% par la ddC, de 12% par la délavirdine et de 10% par le nelfinavir. L'expression du gène de la RALDH, telle que mesurée suite à la normalisation du rapport entre l'ARNm de RALDH et l'actine, s'est avérée augmentée uniquement par l'indinavir (125.3%). Ces données préliminaires indiquent que les antirétroviraux, particulièrement les IP, affectent la synthèse d'AR. D'autre part, on peut imaginer que l'activation des récepteurs nucléaires, facteurs de transcription activés par des ligands et donc par les taux élevés d'AR, affecte l'expression des gènes contenant un RARE. Ces gènes codent pour de multiples produits peptidiques impliqués dans le métabolisme lipidique, glucidique, ainsi que dans des processus hormonaux et immunitaires. L'AR peut donc avoir un rôle clé dans la pathogenèse des troubles métaboliques et des changements corporels chez les PVVIH qui reçoivent une thérapie antirétrovirale.

L'hypothèse de notre travail implique que les adultes infectés par le VIH ont des taux plasmatiques anormaux des rétinoïdes due à l'infection avec le VIH et à la thérapie antirétrovirale. Afin de confirmer notre hypothèses, nous avons élaboré les objectifs suivants : 1. Évaluer l'effet du VIH ainsi que du traitement antirétroviral sur les rétinoïdes 2. Explorer les corrélations avec la charge virale du VIH, le décompte des CD4+ ainsi qu'avec l'expression des CD38, dont le gène contient un RARE (49b), sur les CD8+ et avec certains paramètres métaboliques.

Nous avons trouvé que les taux plasmatiques d'AR sont drastiquement diminués chez les patients utilisant un HAART intensifié et optimal, comparativement aux résultats obtenus chez les volontaires sains. Chez ces mêmes patients, les taux d'AR ont augmentés pendant les interruptions du HAART, ce qui nous indique que le traitement antirétroviral est en cause. Toujours en comparaison avec les volontaires sains, les individus recevant un HAART, dont le contrôle de leur infection est suboptimal, ont présenté des taux d'AR diminués, mais de façon moindre que chez les patients utilisant un HAART intensifié ayant une suppression optimale du VIH. Bien qu'en apparence ces données soient totalement opposées aux trouvailles antérieures *in vitro*, il faut bien comprendre que ce travail nous a permis de déterminer les taux plasmatiques et non les taux intracellulaires où l'AR est produit, agit et est métabolisée. Les IP, comme le ritonavir, l'indinavir et le saquinavir que nos patients reçoivent, pénètrent et s'accumulent dans le tissu adipeux ainsi que dans d'autres tissus (220) où ils peuvent affecter la RALDH et ainsi augmenter la production intracellulaire d'AR. Les taux intracellulaires élevés d'AR ont une influence sur la rétroaction négative, ce qui leur permet d'inhiber ou de réduire leur propre synthèse par une inhibition de l'activité de la RALDH-1(221) ou par une diminution de l'expression de l'ARNm. De plus, les taux élevés d'AR affectent de façon positive la transcription et l'activité de l'enzyme LRAT (222). La conséquence de cet effet est une formation accrue d'ER, ce qui laisse moins de ROL disponible pour la synthèse d'AR par la voie oxydative impliquant la RALDH. D'autre part, les taux intracellulaires élevés d'AR augmentent l'expression d'enzymes spécifiques telles que les CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1 et CYP2C39, ce qui a pour conséquence d'accélérer le métabolisme de l'AR (223, 224). Finalement, en induisant les CRABP- I et II, l'AR permet le contrôle de ses propres concentrations intracellulaires soit par une facilitation de son catabolisme ou encore par sa séquestration.

Dans cette étude, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre d'une part, les taux plasmatiques d'AR et d'autre part, la charge virale du VIH, le décompte de cellules CD4+ et l'expression du CD38 sur le CD8+. Aucun lien n'a pu être établi entre les concentrations d'AR et les paramètres métaboliques, tel que les triglycérides, le cholestérol et le peptide C. Il demeure toutefois une exception. En effet, nous avons observé une corrélation positive entre les concentrations de l'AR et le taux du peptide C, chez les patients qui ont un contrôle optimal du VIH lors de la reprise du HAART et après une

première interruption du traitement. Nous avons aussi trouvé que chez les patients qui reçoivent un HAART intensifié et dont la suppression du VIH est optimale et prolongée, les taux plasmatiques de ROL sont plus élevés mais de façon statistiquement non significative comparativement aux volontaires sains. Ces derniers présentent des concentrations de ROL dans les limites acceptables pour la population nord-américaine. Par contre, les patients ayant un contrôle sous optimal de leur infection par le VIH ont des taux plasmatiques de ROL diminués de façon significative en comparaison avec les volontaires sains et les patients qui ont une suppression optimale du VIH. De plus, chez ces derniers, les taux de ROL ont été diminués de façon significative lors de l'interruption du HAART et de la ré-augmentation importante de la charge virale VIH. Ces données suggèrent que l'infection non- contrôlée par le VIH est en cause et entraîne une baisse du ROL plasmatique confirmant ainsi autant les données publiées antérieurement que récemment (155, 225).

Bien que chez les volontaires sains les taux de ROL soient en corrélation avec l'âge, cette corroboration ne se trouve pas chez les patients infectés par le VIH, ce qui suggère encore une fois, que l'infection par le VIH affecte les concentrations de ROL chez ces patients. Mentionnons aussi qu'aucune corrélation n'a été trouvée entre les taux de ROL et la charge virale du VIH, le décompte de CD4+ et l'expression des CD38 sur les cellules CD8+. Les taux élevés de ROL chez les patients qui présentent une suppression optimale du VIH sont en corrélation avec les concentrations sériques des triglycérides et du cholestérol. Ces données suggèrent que l'élévation des taux plasmatiques du ROL et les anomalies lipidiques sont plutôt causées par un HAART intensifié.

D'autre part nous avons aussi mis en évidence que le rapport ROL:AR est significativement plus élevé chez les patients qui reçoivent un HAART intensifié et qui présentent une suppression optimale du VIH. Ces résultats ne sont pas surprenants car ces patients ont les taux les plus élevés de ROL et les plus bas d'AR.

En somme, nos données suggèrent que les rétinoïdes sont affectés chez des adultes ayant une infection chronique par le VIH. Autant l'infection par le VIH que les antirétroviraux sont en cause dans ce mécanisme pathogénique.

Dans les chapitres précédents nous avons souligné l'implication des rétinoides sur le plan virologique, immunologique, antirétroviral ainsi que dans les complications métaboliques. Ces différents aspects permettent une compréhension plus détaillée des voies métaboliques complexes des rétinoides afin d'interpréter de façon plus juste, les résultats et leurs implications diverses.

6.1 Les implications pathogéniques

Étant donné qu'une multitude de gènes impliqués dans les processus métaboliques, hormonaux et immunitaires contiennent un RARE dans leur promoteur, nous pouvons supposer que l'expression de ces gènes peut être affectée par des changements dans les concentrations d'AR. Enfin, les rétinoides jouent un rôle clé dans l'évolution de l'infection par le VIH, la réponse immune, les anomalies métaboliques et les changements corporels. Toutefois, la voie signalétique et les fonctions biologiques de l'AR sont complexes et se situent dans le contexte d'un réseau de transcription encore plus complexe, ce qui rend l'interprétation de la variation des effets des rétinoides laborieuse. Les différentes combinaisons d'isoformes d'AR, des protéines de liaison et de transport, des récepteurs nucléaires ainsi que des coactivateurs et des corépresseurs assurent un contrôle étroit du métabolisme des rétinoides. De plus, les récepteurs nucléaires RXR sont versatiles et se lient à différents partenaires sous la forme d'hétérodimères. Ils jouent ainsi un rôle clé dans la pathogenèse du syndrome métabolique. En conséquence les rétinoides, ligands des RXR, sont des facteurs clé dans la pathogenèse de ce syndrome.

Le schéma suivant illustre notre hypothèse selon laquelle, les antirétroviraux perturbent les voies métaboliques des rétinoides en affectant la RALDH, les concentrations de certains isomères de l'AR, les récepteurs nucléaires et la régulation d'une multitude de gènes possédant un RARE ou d'autres hétérodimères impliquant le RXR. Par la même occasion, elle permet d'expliquer et d'interpréter les données de notre travail de recherche (**Figure 1**).

D'abord nous supposons que certains antirétroviraux ont le même effet *in vivo* que *in vitro*. De ce fait, ils pénètrent et s'accumulent dans les tissus qui expriment la RALDH-1 et en augmentent l'activité ou/et l'expression. Une des premières conséquences de cet effet se traduit par un excès d'AR intracellulaire. L'isoforme prédominant de l'AR est le tout-*trans*, le ligand des RAR tandis que la forme *9-cis* peut lier autant les RAR que les RXR. Il en résulte un excès de RAR qui forme des hétérodimères avec les RXR. Le résultat final est une disponibilité accrue des hétérodimères RAR-RXR. Les conséquences de cet excès sont multiples et causent : a) une diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase ce qui entraîne une diminution de la clairance de VLDL et une hypertriglycémie (180); b) une disponibilité réduite de RXR pour former des hétérodimères avec d'autres récepteurs nucléaires. Cet effet est causé par une affinité plus grande pour le RAR et par la formation plus rapide des hétérodimères RAR-RXR; c) une diminution de C/EBP- β (226), un activateur de la transcription de différents gènes donc les PPAR- γ et C/EBP- α ; et d) une augmentation de l'expression de gènes contenant un RARE, tel que les RBP, les CRBP, les CRABP, les CD38, les CD36, etc. (48b, 227,228). La diminution consécutive de la formation des hétérodimères de RXR avec PPAR (α , β , γ), T3R, VDR, LXR, FXR, PXR, CAR, etc., entraînent une expression réduite des gènes ayant un élément de réponse pour ces récepteurs nucléaires. Les conséquences sont multiples car une multitude de gènes impliqués dans les processus métaboliques, hormonaux et immunitaires sont affectés, favorisant l'apparition des troubles métaboliques et hormonaux ainsi que la diminution de la différenciation des adipocytes pour causer ultimement la lipodystrophie.

L'inhibition de l'expression de C/EBP- β a des répercussions négatives sur les hétérodimères PPAR γ -RXR ainsi que sur la C/EBP- α . Dans des conditions normales, cette dernière agit positivement sur l'hétérodimère sur PPAR γ -RXR. La conséquence de cet effet est particulièrement prédominante sur les PPAR- γ -RXR ainsi que sur la différenciation adipocytaire et le métabolisme des glucides. Finalement, la diminution de C/EBP- β réduit de façon importante l'expression de RALDH-1 et de ce fait, la synthèse d'AR, ce qui entraîne une augmentation du RAL. Tel que rapporté récemment, (229, 230) le RAL inhibe la réponse spécifique aux récepteurs nucléaires PPAR- γ -RXR causant ainsi des conséquences métaboliques. De plus, le RAL diminue, de façon directe et indépendante des RXR, la différenciation adipocytaire et la production d'adiponectine.

L'excès intracellulaire d'AR favorise l'augmentation de l'expression de plusieurs protéines dont les RBP (239). Ces effets ont un impact autant sur les RPB du tissu adipeux (RBP4) que celles présentes dans d'autres tissus (227, 231). Cette augmentation de RBP influence d'une part, les concentrations plasmatiques de ROL, d'autre part, la LRAT qui augmente la production d'esters de ROL et leur stockage dans le foie et finalement la CRBP-II dans les entérocytes, ce qui augmente l'absorption intestinale de ROL (222). Enfin, l'excès d'AR intracellulaire a pour effet d'accélérer son propre catabolisme en augmentant l'expression de la CRABP-I, des enzymes du CYP26A1, B1, C1 et CYP2C39 (223, 224). De plus, il augmente aussi la dégradation des RXR et des RAR par le système d'ubiquitine/protéasome (232). Ce dernier mécanisme diminue l'effet de l'AR et l'expose plus rapidement au catabolisme. Ce catabolisme intracellulaire excessif de l'AR induit par ses concentrations élevées peut expliquer pourquoi les taux plasmatiques de l'AR sont diminués chez les patients infectés par le VIH qui reçoivent un HAART intensifié et optimal, tel que le montre nos résultats.

En résumé, nous pouvons interpréter nos données de la façon suivante : Les patients ayant un contrôle optimal de leur infection par le VIH qui reçoivent un HAART intensifié et prolongé, ont les taux plasmatiques les plus faibles d'AR. Cet effet est causé par leurs traitements qui ont entraînés initialement une augmentation excessive d'AR intracellulaire induisant ainsi un catabolisme accéléré et important, laissant peu d'AR libre dans la cellule pour son transport vers le sang périphérique. De plus, ces patients ont les taux plasmatiques les plus élevés de ROL. Ce phénomène s'explique par une absorption intestinale augmentée de ROL suite à l'augmentation de la CRBP II et à l'amélioration de la muqueuse intestinale affectée par le VIH. Aussi, l'inhibition de RALDH par l'excès intracellulaire d'AR entraîne une augmentation de RAL qui a pour conséquences, une réduction du passage intracellulaire et un taux plasmatique plus élevé du ROL, particulièrement dans le contexte où la synthèse de RBP est augmentée. Chez les patients qui ont un contrôle suboptimal de leur infection par le VIH, le système ubiquitine/protéasome est affecté de façon négative par le virus, ayant pour conséquences, une diminution du catabolisme de l'AR. Ainsi l'AR reste plus longtemps dans les tissus et peut passer dans la circulation sanguine. Enfin chez ces patients, l'absorption intestinale de ROL est probablement réduite car la muqueuse intestinale est souvent affectée par le VIH.

Les volontaires sains ne présentent pas de concentrations excessives intracellulaires d'AR et par conséquent le catabolisme de l'AR n'est pas accéléré. Par contre, une quantité plus grande d'AR peut se trouver dans le sang. Le taux plasmatique de ROL peut être légèrement inférieur à celui de patients qui reçoivent un HAART optimal et intensifié car l'expression de la CRBP-II dans les entérocytes n'est pas augmentée.

6.2 Les implications thérapeutiques et projets de recherche futurs

Les données scientifiques recueillies suite à cette étude et dans les études antérieures ainsi que les hypothèses proposées, nous permettent non seulement d'expliquer les effets indésirables mais aussi plusieurs effets bénéfiques des rétinoïdes.

L'amélioration des troubles digestifs de type colite chez des patients infectés par le VIH, après le début d'un traitement antirétroviral s'explique par la disponibilité accrue d'AR de l'hétérodimère RAR-RXR. La stimulation de RAR-RXR par l'AR a amélioré de façon significative la dysfonction de la barrière épithéliale des souris atteinte de colite expérimentale (233). En effet, l'AR est le régulateur de la protection de cette barrière en présence de lésions de la muqueuse (233). La néphropathie associée au VIH est la cause la plus fréquente d'atteintes rénales dans cette infection. La prolifération et le manque de différenciation des podocytes caractérisent cette complication (234). Le gène Nef du VIH induit la MAPK1 dépendante de Src ainsi que l'activation de 2/Stat3 et semble être le facteur pathogénique (234). L'initiation d'un HAART améliore souvent cette complication, probablement par l'augmentation des taux intracellulaires de l'AR. En effet, il a été rapporté que l'AR *tout-trans* inhibe la prolifération des podocytes et est responsable du manque de différenciation (234). Cet effet passe par l'activation de la voie de cAMP/PKA médiée par RAR α -RXR (234). Il a été démontré antérieurement que l'AR *9-cis* a un effet anti-fibrotique sur les cellules mésangiales glomérulaires (235). Cette action est antagoniste à celle du TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) car elle permet l'augmentation de l'expression du HGF (hepatocyte growth factor) (253). La neuropathie liée au VIH est souvent améliorée par l'initiation des antirétroviraux. Il a été rapporté que l'AR augmente le contenu tissulaire et plasmatique en NGF (nerve growth factor), dont la production est diminuée dans la neuropathie diabétique (236). En effet, l'administration d'AR semble plus efficace que l'utilisation du NGF dans cette neuropathie.

L'augmentation des taux intracellulaires d'AR par certains antirétroviraux, tel que nous le supposons, explique ce fait et permet d'entrevoir des implications thérapeutiques potentielles. La démence cortico-souscorticale associée au VIH est similaire à la maladie d'Alzheimer. Dans des spécimens de neurones provenant d'autopsie de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, une diminution de l'expression RALDH-2 et des récepteurs nucléaires RAR et RXR a été mise en évidence (237). Des études effectuées sur les neurones du cerveau antérieur de rats ayant une DVA, ont montrées une diminution cérébrale des RAR α et ce bien avant l'apparition des dépôts bêta amyloïde (237). L'augmentation de l'expression des RAR chez des souris âgées a amélioré le déficit de performance lié à l'âge (238). Ces données permettent d'extrapoler la présence d'un déficit de synthèse, du transport et de la fonction des rétinoïdes dans la maladie d'Alzheimer. L'initiation d'un HAART chez des patients atteints de démence associée au VIH améliore les fonctions cognitives. En nous basant sur nos données, nous pouvons soupçonner que le responsable de l'augmentation des taux d'AR et des RAR α -RXR α ou RAR α -RXR γ est le HAART incluant un IP.

L'initiation d'un HAART peut parfois s'associer à un syndrome inflammatoire, appelé syndrome d'immuno-reconstitution (IRIS), chez des patients qui ont de bonnes réponses virologiques et immunologiques au traitement. En effet, après la reconstitution des cellules T mémoire, il peut y avoir des signes de détérioration passagère ou d'une réactivation de certaines infections (239). Un exemple est l'apparition des pneumonies interstitielles qui ressemblent radiologiquement à une pneumonie à *Pneumocystis jiroveci*. Elle est caractérisée par la présence de fièvre, d'une détresse respiratoire, d'infiltrats pulmonaires bilatéraux, d'absence de *Pneumocystis* mais la présence d'une leucocytose dans le lavage broncho alvéolaire. Ces manifestations cliniques s'améliorent lorsqu'un traitement à base de stéroïdes est utilisé (240). Un tableau clinique similaire a été décrit chez des patients atteints de LPM, traitées avec des rétinoïdes dont l'AR tout-*trans* et a été désigné syndrome d'acide rétinoïque (241). Nous considérons que cette atteinte pulmonaire est causée par un excès d'AR intra-pulmonaire induit par le traitement contenant des molécules de la classe des IP. Il est prouvé que l'AR peut être synthétisée au niveau pulmonaire, dans les cellules interstitielles lipidiques dénommées aussi cellules de Ito, ou lipocytes, équivalentes aux cellules stellaires hépatiques, reconnues pour leur capacité de synthèse et

de stockage des rétinoïdes (242). Une autre manifestation clinique décrite dans le IRIS est la réactivation de l'hépatite B, qui se manifeste par un retour à la séroconversion pour l'antigène HBs, une augmentation de la réplication du virus de l'hépatite B (HBV) indépendamment de la résistance ou l'arrêt de la lamivudine et malgré une augmentation du décompte de LTCD4+ (243). Or, il est connu que la transcription du HBV est contrôlée par des récepteurs nucléaires hormonaux tel que le HNF3 α (hepatocyte nuclear factor 3 α), le HNF4, le RXR, le PPAR α (244) et le HNF3 α (hepatocyte nuclear factor 3 α) contiennent un RARE (245). En conséquence, des modifications dans l'abondance de l'AR et de ses récepteurs RAR et RXR ainsi que leur rapport avec les HNF, autant au niveau hépatique que dans d'autres tissus, peuvent être une cause de la réactivation du HBV en début de traitement par HAART. Finalement, mentionnons que le syndrome du Kaposi s'améliore de façon importante chez la majorité des patients qui commencent une thérapie avec HAART contenant des IP. Cette amélioration est semblable à celle décrite en utilisant un traitement à base d'AR (202) prouvant ainsi notre hypothèse et nos résultats.

Nos résultats actuels et antérieurs permettent d'ouvrir la voie de cet axe de recherche pointu en appuyant la pertinence de développement et de la conduite d'études fondamentales et cliniques. Ces études aborderont un sujet complexe qui fait intervenir plusieurs spécialités médicales et scientifiques telles que les maladies infectieuses, l'endocrinologie moléculaire, l'immunologie et la pharmacologie.

D'abord, il serait intéressant d'évaluer *in vitro*, l'effet des tous les antirétroviraux en monothérapie et en combinaison, sur l'activité et l'expression du RALDH-1 recombinante ainsi que sur des RALDH ayant des polymorphismes. Il faudrait aussi quantifier la production de RAL, en présence d'antirétroviraux, au sein de lignées cellulaires exprimant la RALDH. Une étude d'envergure serait l'évaluation simultanée de l'effet des antirétroviraux sur la production de RAL et d'AR ainsi que sur l'expression des récepteurs nucléaires, des leurs dimers, des facteurs de transcriptions tel que les C/EBPs, les gènes contenant un RARE, un PPRE ou d'autres éléments de réponse ainsi que la quantification de l'expression de RBP, de la LRAT, de la CRBP I et II, de la CRABP-1 et 2, des CYP26 et 2C39 dans des lignées cellulaires exprimant ou non la RALDH. Une telle étude

impliquerait l'utilisation de plusieurs techniques de pointe telles que le HPLC couplé à un détecteur aux ultraviolets ou à un spectromètre de masse, l'immunohistochimie et la microscopie confocale, le PCR et la technologie de ARN interférence (246) pour ne nommer que ceux là. Cette étude pourrait confirmer, détailler ou infirmer nos données, hypothèses ou suppositions. D'autre part, dans une étude antérieure effectuée par notre groupe de recherche, nous avons identifié un IP qui diminue l'expression de RALDH-1 (155). Cette molécule devrait être utilisée comme contrôle négatif dans les expériences.

Chez l'humain, l'évaluation des taux plasmatiques des rétinoïdes devrait être effectuée avant même de débiter une thérapie antirétrovirale, lors d'un changement de médicaments et pendant le traitement, lorsqu'une ou une suppression optimale du VIH est présente, déterminée par une CV indétectable, ou en présence d'un échec virologique ou immunologique. Des études complexes, effectuées sur des tissus prélevés par biopsies, tel que le tissu adipeux, sous-cutané, mésentérique, adipocytaire brun en provenance de la bosse de bison, épithéliale de la peau, pulmonaire, hépatique et ganglionnaire ainsi que sur des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) sont nécessaires afin de mieux comprendre la pathogenèse des troubles métaboliques et de la lipodystrophie chez les PVVIH qui reçoivent ou non un traitement. Ces études devraient évaluer simultanément les paramètres suivants : les concentrations plasmatiques et intracellulaires d'antirétroviraux; du ROL, du RAL, et de l'AR, l'expression de RALDH-1, des RBP, de la LRAT, des CRBP et des CRABP, du CYP 26, du CYP2C39 et du CYP 27. De plus, l'expression et l'abondance évaluée par de multiples marquages, l'immunohistochimie et la microscopie confocale devraient être effectuées. Aussi, il serait pertinent d'utiliser le RT-PCR afin de quantifier l'abondance des RAR, des RXR et de leurs dimères ainsi que les associations dimériques suivantes : Les hétérodimères de RXR avec l'un de ses partenaires tel que PPAR α , PPAR γ , TR, VDR, LXR, FXR et PXR. Les gènes contenant des éléments de réponse spécifiques pour ces récepteurs nucléaires ainsi que d'autres facteurs de transcription tels que C/EBP et SREBP de même que les cytokines et les adipocytokines pourraient être analysés par la technique de micropuces à ADN (microarray). Bien qu'elles semblent extrêmement ambitieuses, laborieuses, longues et dispendieuses, ce type d'études permettra une avancée scientifique de haut niveau, une compréhension rapide des

processus pathogéniques et aidera au développement des stratégies de prévention et thérapeutiques pour venir en aide aux patients affectés par ces conditions.

Les approches thérapeutiques actuelles utilisent déjà avec succès des molécules agonistes des PPAR α tel que le fénofibrate, pour le traitement de l'hypertriglycéridémie associée au VIH et au HAART (247). Les agonistes des PPAR γ , tel que le rosiglitazone ou le pioglitazone, sont utilisées non seulement pour le traitement du diabète mais aussi pour la lipodystrophie, avec toutefois, des résultats thérapeutiques mitigés (248, 249). La combinaison des 2 agonistes a aussi été testée chez les patients infectés par le VIH mais une diminution du cholestérol HDL (lipoprotéine de haute densité) a mis fin à ce type de traitement, bien qu'il soit théoriquement fondé (250). Des agonistes plus spécifiques et de haute affinité pour les hétérodimères de RXR sont à l'étude (251). Cependant, l'idée d'utiliser des agonistes des RXR semble mieux fondée pour les PVVIH car selon notre compréhension, il y a une disponibilité relativement réduite de ce récepteur nucléaire, conséquemment à sa séquestration par les RAR. Ces agonistes pourraient être efficaces dans le traitement de plusieurs conditions cliniques reliées au VIH tel que les neuropathies périphériques, la néphropathie, la démence, le syndrome de Kaposi et la colite chronique. Ils pourraient être utilisés en combinaison avec des IP et ainsi améliorer les paramètres virologiques et immunologiques obtenus avec le HAART, tel que nous avons déjà mentionné.

Des nouvelles approches thérapeutiques peuvent être envisagées en se basant sur les données chez les modèles animaux. Par exemple le LSN862 ou le tesaglitazar, des agonistes doubles de PPAR α et γ , se sont avérés très efficaces dans le contrôle du glucose et des lipides dans des modèles animaux (252). Des agonistes spécifiques des RXR, les réxinoïdes, comme le LG100268, a amélioré le contrôle de la glycémie et a diminué le risque cardiovasculaire et la cachexie chez des souris diabétiques (253). Une autre approche future serait l'utilisation d'inhibiteurs du CYP 26 impliqués dans le catabolisme de l'AR comme le liarazole ou ses nouveaux dérivés (254). L'inhibition de la synthèse d'AR peut aussi constituer une mesure thérapeutique, par exemple dans le traitement du SAR. Bien que des inhibiteurs soient développés, tel que le disulfiram et l'homocystéine, leur utilisation chez le PVVIH est risquée. Par contre, l'inclusion d'un antirétroviral dans le cadre du HAART, capable de réduire la synthèse d'AR en inhibant la RALDH-1 nous

semble faisable. En effet, le DMP-450, une molécule de la classe des IP, dérivé cyclique de l'urée cause cette inhibition (155).

L'emploi future des ARNi afin de modifier les récepteurs nucléaires hormonaux, leurs agonistes naturels ou synthétiques, les co-répresseurs ou les co-activateurs et même la liaison du récepteur avec son ligand sont envisageables.

6.3 Conclusions

Les progrès thérapeutiques ne seront possibles qu'après une meilleure compréhension de ce réseau complexe des voies signalétiques impliquant les rétinoïdes, ce qui rend légitimes et nécessaires les études fondamentales et cliniques avant-gardistes et complexes. La recherche de translation des données fondamentales vers la clinique, doit être priorisée afin d'assurer le progrès thérapeutique et l'amélioration du pronostic des maladies telles que l'infection par le VIH et ses complications.

Bibliographie

1. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220 (4599): 868-871.
2. Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E. and Gallo, R. C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. 1984;224 (4648): 497-500.
3. Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. 1986 Jul 18;233(4761):343–346.
4. Robert D. Harrington, MD; David H. Spach, MD. Transmission of HIV. *ACP Medicine Online*. 2002; ©2002 WebMD Inc. <http://www.medscape.com/viewarticle/534929>
5. Sekigawa I; Kaneko H; Neoh LP; Takeda-Hirokawa N; Akimoto H; Hishikawa T; Hashimoto H; Hirose S; Yamamoto N; Kaneko Y. Differences of HIV envelope protein between HIV-1 and HIV-2: possible relation to the lower virulence of HIV-2. *Viral Immunol*. 1998; 11(1):1-8.
6. Khamsri B; Murao F; Yoshida A; Sakurai A; Uchiyama T; Shirai H; Matsuo Y; Fujita M; Adachi A. Comparative study on the structure and cytopathogenic activity of HIV Vpr/Vpx proteins. *Microbes Infect*. 2006; 8(1):10-5.
7. Collette Y; Arold S; Picard C; Janvier K; Benichou S; Benarous R; Olive D; Dumas C. HIV-2 and SIV nef proteins target different Src family SH3 domains than does HIV-1 Nef because of a triple amino acid substitution. *J Biol Chem*. 2000; 275(6):4171-6.
8. Clewley JP. Enigmas and paradoxes: the genetic diversity and prevalence of the primate lentiviruses. *Curr HIV Res*. 2004 Apr;2(2):113-25.
9. Sarah L Rowland-Jones & Hilton C Whittle. Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nature Immunology*. 2007; 8:329 – 331.
10. Butler IF, Pandrea I, Marx PA, Apetrei C HIV genetic diversity: biological and public health consequences. *Curr HIV Res*. 2007 Jan;5(1):23-45.
11. Rambault A, Robertson DL, Pybus OG, Peeters M, Holmes PC. Phylogeny and the origin of HIV-1. *Nature*. 2001 April 26; 410:1047-8.
12. Le point sur l'épidémie de SIDA. ONUSIDA, décembre 2006.
13. ICTVdb virus description. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.061.1.06.001.htm>
14. Microbiologie. Prescott, Harley, Klein. 2nd Ed. De Boeck & Larcier S.A., 1995, Bruxelles.
15. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol*. 1999; 285(1):1-32.
16. Burton DR. Structural biology: images from the surface of HIV. *Nature*. 2006; 441(7095):817-8.
17. Greene WC, Peterlin BM. Molecular Insights Into HIV Biology. HIV InSite Knowledge Base Chapter February 2003; <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-02-01-01>

18. NCBI Genome.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=12171
19. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol.* 2005 Dec;34(4):233-44.
20. Bukrinsky M, A Hard Way to the Nucleus *Mol Med.* 2004 Jan–Jun; 10(1-6): 1–5.
21. Orchard K, Lang G, Harris J, Collins M, Latchman D. A palindromic element in the human immunodeficiency virus long terminal repeat binds retinoic acid receptors and can confer retinoic acid responsiveness on a heterologous promoter. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1993 May;6(5):440-5
22. Brady J, Kashanchi F. Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology.* 2005 Nov 9;2:69.
23. Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. Nef induces CD4 endocytosis: Requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell.* 1994; 76: 853-64. <http://amedeo.com/lit.php?id=8124721>
24. Collins KL, Chen BK, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 397-401.
<http://amedeo.com/lit.php?id=9450757>
25. Peter F. HIV nef: The mother of all evil? *Immunity,* 1998; 9: 433-7.
26. Desai-Yajnik V, Hadzic E, Modlinger P & al. Interactions of thyroid hormone receptor with the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) long terminal repeat and the HIV-1 tat transactivator. *J Virol.* 1995 August;69(8):5103-12.
27. Das SR, Jameel S. Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med Res.* 2005 Apr;121(4):315-32.
28. Roeth JF, Collins KL. Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006 Jun;70(2):548-63.
29. Lindwasser OW, Chaudhuri R, Bonifacino JS. Mechanisms of CD4 downregulation by the Nef and Vpu proteins of primate immunodeficiency viruses. *Curr Mol Med.* 2007 Mar;7(2):171-84.
- 29b. Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M & al. Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Molecular and cellular biology.* 2001 May;21 (9):2991-3000.
30. Le Rouzic E, Benichou S. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology.* 2005 Feb 22;2:11.
31. Binette J, Cohen EA. Recent advances in the understanding of HIV-1 Vpu accessory protein functions. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2004 Dec;4(4):297-307.
32. Bovolenta C. Blocking HIV-1 Vif restores a natural mechanism of intracellular antiviral defense *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2004 Dec;4(4):257-63.
33. Daniel R. DNA repair in HIV-1 infection: a case for inhibitors of cellular co-factors? *Curr HIV Res.* 2006 Oct;4(4):411-21.
34. Holmes RK, Malim MH, Bishop KN. APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci.* 2007 Mar;32(3):118-28.

35. Carr JM, Davis AJ, Feng F, Burrell CJ, Li P. Cellular interactions of virion infectivity factor (Vif) as potential therapeutic targets: APOBEC3G and more? *Curr Drug Targets*. 2006 Dec;7(12):1583-93.
36. Focus on HIV. Neu HC, Levy JA, Weiss RA. Glaxo Group Research Limited 1993, New York.
37. HIV Medicine 2006. Hoffman, Rockstoh, Kamps. Flying Publisher, 2006 Paris, Cagliari, Wuppertal.
38. The role of viral dynamics in the pathogenesis of HIV disease and implications for antiviral therapy Diane V. Havlir , Douglas D. RichmanSpringer Berlin / HeidelbergVolume 18, Number 3 / septembre 1997.
39. Havlir DV, Richman DD. Viral dynamics of HIV: implications for drug development and therapeutic strategies. *Ann Intern Med*. 1996 Jun 1;124(11):984-94.
40. Bucy RP. Viral and cellular dynamics in HIV disease. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2004 Apr;1(1):40-6.
41. Immunologie, le cours de Janis Kuby. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. 4ième Ed. Dunod, New York, 2000.
42. Essential Immunology. Roitt I. 7th Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1991.
43. Immunology. Male D. 3rd Ed. Gower Medical Publishing, 1998, London, New York.
44. Ciborowski P, Gendelman HE. Human immunodeficiency virus-mononuclear phagocyte interactions: emerging avenues of biomarker discovery, modes of viral persistence and disease pathogenesis. *Curr HIV Res*. 2006 Jul;4(3):279-91.
45. Siliciano JD, Siliciano RF. A long-term latent reservoir for HIV-1: discovery and clinical implications. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Jul;54(1):6-9.
46. Pomerantz RJ. Reservoirs, sanctuaries, and residual disease: the hiding spots of HIV-1. *HIV Clin Trials*. 2003 Mar-Apr;4(2):137-43.
47. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med*. 2002;53:557-93.
48. Ostrowski MA, Yu Q, Yue FY, Liu J, Jones B, Gu XX, Loutfy M, Kovacs CM, Halpenny R. Why can't the immune system control HIV-1? Defining HIV-1-specific CD4+ T cell immunity in order to develop strategies to enhance viral immunity. *Immunol Res*. 2006;35(1-2):89-102.
- 48b. Brown SA, Hurwitz JL, Zhan X, Doherty PC, Slobod KS. CD8+ T-cells: are they sufficient to prevent, contain or eradicate HIV-1 infection? *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2005 Jun;5(2):113-9.
- 48c. Benito JM, López M, Soriano V. The role of CD8+ T-cell response in HIV infection. *AIDS Rev*. 2004 Apr-Jun;6(2):79-88.
49. Benito JM, Lopez M, Lozano S, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, Sorioano V. CD38 expression on CD8 T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004 February;20(2):227-33.
- 49b. Kishimoto H, Hoshino S, Ohori M & al. Molecular mechanism of human CD38 gene expression by retinoic acid. *The Journal of biological chemistry*. 1998 June;273 (25);15429-34.
50. Cunard R, Eto Y, Muljadi T, Glass CK, Kelly CK, Ricote M. Repression of INF- γ Expression by peroxisome proliferators activated receptor γ . *Journal of Immunology*. 2004;172:7530-36.

51. Powderly WG: Long-term exposure to lifelong therapies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29 (1):S28-40.
52. Huber M, Trkola A. Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. *J Intern Med.* 2007 Jul;262(1):5-25.
53. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition among adolescent and adults. *MMWR.* 1992 December; 41 RR17. NIH.
54. Leow MKS, Addy CL, Mantzoros CS. Human immunodeficiency virus/highly active antiretroviral therapy associated metabolic syndrome: clinical presentation, pathophysiology and therapeutic strategies. *J Clin Endocr Metabol.* 2003;88 (5) 1961-76
55. Medical Management of HIV infection. Bartlett JG, Gallant JE. *Jhon Hopkin Medicine.* 2005, Baltimore.
56. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD, for The HIV Outpatient Study Investigators. Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *NEJM.* 1998; 338 (13):853-860.
57. Garcia-Viejo MA, Ruiz M, Martinez E: Strategies for treating HIV-related lipodystrophy. *Expert Opin Investig Drugs* 2001, 10:1443-1456.
58. Olivero O. Mechanism of genotoxicity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Interscience Wiley,* 2006, 48 (3-4):215-223.
59. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. NIH. October 10, 2006. <http://aidsinfo.nih.gov>.
60. Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW, and Broder S. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 October; 82(20): 7096-7100.
61. Young FE. The role of the FDA in the effort against AIDS. *Public Health Rep.* 1988 May-Jun; 103(3):242-5.
62. Samuel R, Bettiker R, Suh B. Antiretroviral therapy 2006: pharmacology, applications, and special situations. *Arch Pharm Res.* 2006 Jun;29(6):431-58.
63. Compendium des produits et spécialités pharmaceutiques. Association des pharmaciens du Canada, 2006, Ottawa, Canada.
64. Monographie de produit Emtriva. Gilead Science, 2007.
65. Cherry CL & Wesselingh SL. Nucleoside analogues and HIV: the combined cost to mitochondria. *JAC.* 2003; 51:1091-1093.
66. Monographie de produit Ziagen GlaxoSmithKline 2006.
67. Monographie de produit Rétrovir GlaxoSmithKline 2007.
68. Monographie de produit Videx. Bristol Myers Squibb, 2007.
69. Monographie de produit Zerit. Bristol Myers Squibb, 2006.
70. Monographie de produit 3TC. GlaxoSmithKline 2006.
71. Monographie de produit Truvada. Gilead Science, 2006.

72. Monographie de produit Combivir. GlaxoSmithKline 2006.
73. Monographie de produit Trizivir. GlaxoSmithKline 2007.
74. Monographie de produit Viread. Gilead Science 2005.
75. Monographie de produit Viramune. Boehringer Ingelheim 2005
76. Monographie de produit Sustiva. Bristol Myers Squibb, 2007.
77. Monographie de produit Rescriptor. Pfizer Canada, 2003.
78. Moyle GJ, Gazzard B. Principles guiding rational antiretroviral therapy. Hoffman-La-Roche 2005.
79. Monographie de produit Viracept. Pfizer Canada, 2006.
80. Monographie de produit Reyataz. Bristol Myers Squibb, 2007.
81. Monographie de produit Kaletra. FDA, 2000.
82. Monographie de produit Aptivus. Boehringer Ingelheim 2007.
83. Monographie de produit Prezista. Janssen-Ortho Inc. 2006.
84. Judith S. Currier, MD, and Diane V. Havlir, MD Complications of HIV Disease and Therapy IAS. 2007 April/May;15 (2).
- 84b. Chen LF, Hoy J, Lewin SR. Ten years of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. MJA. 2007 February;186(3);146-51.
85. Dorr P; Westby M; Dobbs S; Griffin P; Irvine B; Macartney M; Mori J; Rickett G; Smith-Burchnell C; Napier C; Webster R; Armour D; Price D; Stammen B; Wood A; Perros MMaraviroc (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):4721-32.
86. Rosario MC; Poland B; Sullivan J; Westby M; van der Ryst EA. Pharmacokinetic-pharmacodynamic model to optimize the phase IIa development program of maraviroc. J Acquir Immune Defic Syndr. 2006; 42(2):183-91.
87. Meanwell NA, Kadow JF. Maraviroc, a chemokine CCR5 receptor antagonist for the treatment of HIV infection and AIDS. Curr Opin Investig Drugs. 2007 Aug;8(8):669-81.
88. Carr A, Samaras K, Burton S, Law M, Freund J, Chisholm DJ, Cooper DA: A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. Aids 1998; 12:F51-58.
89. Engelson ES, Kotler DP, Tan Y, Agin D, Wang J, Pierson RN, Jr., Heymsfield SB: Fat distribution in HIV-infected patients reporting truncal enlargement quantified by whole-body magnetic resonance imaging. Am J Clin Nutr 1999; 69:1162-1169.
90. Herry I, Bernand L, de Truchis P, C P: Hypertrophy of the breasts in a patient treated with indinavir. Clin Infect Dis 1997; 25:937-938.
91. Lo JC, Mulligan K, Tai VW, Algren H, Schambelan M: "Buffalo hump" in men with HIV-1 infection. Lancet 1998; 351:867-870.
92. Massip P, Marchou B, Bonnet E, Cuzin L, Montastruc JL: Lipodystrophia with protease inhibitors in HIV patients. Therapie 1997; 52:615.

93. Miller KD, Jones E, Yanovski JA, Shankar R, Feuerstein I, Falloon J: Visceral abdominal-fat accumulation associated with use of indinavir. *Lancet* 1998; 351: 871-875.
94. Joyce Jones, MD, Barbara Taylor, MD, Timothy J. Wilkin, MD, MPH, and Scott M. Hammer, *Advances in Antiretroviral Therapy*. IAS. 2007 April/May;15 (2).
95. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53:409-35.
96. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferators-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Review*. 1999;20(5):649-688.
97. Troubles métaboliques et risque cardiovasculaire chez le patient infecté par le VIH. Vigouroux C, Boccara F. *Bristol-Myers Squibb Virologie*. Avril 2006.
98. Mallon PW Pathogenesis of lipodystrophy and lipid abnormalities in patients taking antiretroviral therapy. *AIDS Rev*. 2007 Jan-Mar;9(1):3-15.
99. Rodriguez de la Concepcion ML, Domingo JC, Domingo P, Giralt M, Villarroya F. Uncoupling protein 1 gene expression implicates brown adipocytes in highly active antiretroviral therapy associated lipomatosis. *AIDS* 2004;18:959-68.
100. Clinical Care Option for HIV. Symposium Syllabus. Northwestern University, 2005. Laguna Niguel California, USA.
101. Hofman P, Nelson AM The pathology induced by highly active antiretroviral therapy against human immunodeficiency virus: an update. *Curr Med Chem*. 2006;13(26):3121-32.
102. Capeau J, Caron M, Vigouroux C, Cervera P, Kim M, Maachi M, Lagathu C, Bastard JP. Lipodystrophies related to antiretroviral treatment of HIV infection. *Med Sci (Paris)*. 2006 May;22(5):531-6.
103. Le corps humain : De l'organisation à la régulation. Jean-Marc Grandbois et Coll. Avec la participation de Yves Jean. Télé-université, Québec, Canada, 2000.
104. Anatomie et physiologie humaine, Elaine N. Marieb, 2ième édition, édition du renouveau pédagogique, Québec, Canada, 1999.
105. Principles of Internal Medicine, Ninth Edition, Harrison's & Coll. International Student Edition, 1980.
106. En bref...Endocrinologie. C.G.D. Brook & N.J. Marshall. 3ième Éd. De Boeck Université, 1998, Bruxelles.
107. Fauci AS. Host factors and pathogenesis of HIV induced disease. *Nature* 1996; 384:529-34.
108. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling: emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995; 332:305-11.
109. Fakruddin JM, Laurence J. HIV-1 modulates TRANCE expression in vitro and in vivo: potential mechanism for the osteopenia of HIV disease. Presented at the 9th conference on retroviruses and opportunistic infections, Seattle, February 24-28, 2002.
110. Roula B. Qaqish, Keri A. Sims. Bone Disorders Associated With the Human Immunodeficiency Virus: Pathogenesis and Management . *Pharmacotherapy*. 2004; 24 (10): 1331-1346.

111. Carr A, Eisman JA, Miller J, Cooper DA. Lactic acidemia is associated with spinal osteopenia in HIV-infected men (abstract 631). 8th conference on retroviruses and opportunistic infection: 2001, Feb 4-8;Chicago.
112. Wang M, Teitelbaum SL, Tebas P Powderly WG, Ross FP. Indinavir inhibit bone formation while ritonavir inhibits osteoclast differentiation and function (abstract 541) 8th conference on retroviruses and opportunistic infection:2001, Feb 4-8;Chicago.
113. Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JMW, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT. Activated T cells support osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265:144-50.
114. Dusso A, Vidal M, Powderly WG, Yarasheski KE, Tebas P. Protease Inhibitors inhibit in vitro conversion on 25(OH)-vitamine D to 1,25(OH)₂-vitamine D. (Abstract 030). 2nd International workshop on adverse drug reaction and lipodystrophy: 2000 sept13-15;Toronto.
115. R. WILLIAMS, ROSEMARY BLAND, AND MICHAEL C. SHEPPARD. Retinoids Modify Regulation of Endogenous Gene Expression by Vitamin D, and Thyroid Hormone in Three Osteosarcoma Cell Lines. *GRAHAM Endocrinology*. 1995;Vol. 136, No. 10.
116. Rosemary BLAND. Steroid hormone receptor expression and action in bone *Clinical Science* (2000) 98, 217–240.
117. Clinical Care Option for HIV. Symposium Syllabus. Northwestern Univerity, 2004, Miami, Florida, USA.
118. Mujawar Z, Rose H, Morrow MP & al. Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. *Plos Biology*. 2006 November;4 (11).
119. Dobs AS, Dempsey MA, Landenson PW, Polk BF: Endocrine disorders in men infected with human immunodeficiency virus. *Am J Med*. 1988; 84:611-616.
120. Marks JB: Endocrine manifestations of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Am J Med Sci*. 1991; 302:110-117.
121. Masharani U, Schambelan M: The endocrine complications of acquired immunodeficiency syndrome. In: *Advances in Internal Medicine*. Edited by Siperstein MD. St. Louis, MO: Mosby-Year Book, Inc.; 1993; 38:323-336.
122. Rahim S, Ortiz O, Maslow M, Holzman R, A Case-Control Study of Gynecomastia in HIV-1-Infected Patients Receiving HAART *AIDS Read*. 2004;14(1):23-40.
123. Caeiro JP, Visnegarwala F, Rodriguez-Barradas MC. Gynecomastia associated with indinavir therapy. *Clin Infect Dis*. 1998;27:1539-1540.
124. Melbourne KM, Brown SL, Silverblatt FJ. Gynecomastia with stavudine treatment in an HIV-positive patient. *Ann Pharmacother*. 1998;32:1108.
125. Toma E, Therrien R. Gynecomastia during indinavir antiretroviral therapy in HIV infection. *AIDS*. 1998;12:681-682.
126. Schurmann D, Bergmann F, Ehrenstein T, Padberg J. Gynaecomastia in a male patient during protease inhibitor treatment for acute HIV disease. *AIDS*. 1998;12:2232-2233.
127. Peyriere H, Mauboussin JM, Rouanet I, et al. Report of gynecomastia in five male patients during antiretroviral therapy for HIV infection. *AIDS*. 1999;13: 2167-2169.

128. Donovan B, Bodsworth NJ, Mulhall BP, Allen D. Gynecomastia associated with saquinavir therapy. *Int J STD AIDS*. 1999;10:49-50.
129. Caso J, Prieto Jde M, Casas E, Sanz J. Gynecomastia without lipodystrophy syndrome in HIV-infected men treated with efavirenz. *AIDS*. 2001;15: 1447-1452.
130. Mercie P, Viallard JF, Thiebaut R, et al. Efavirenz-associated breast hypertrophy in HIV-infected patients. *AIDS*. 2001;15:126-129.
131. Manfredi R, Calza L, Chiodo F. Gynecomastia associated with highly active antiretroviral therapy. *Ann Pharmacother*. 2001;35:438-439.
132. Aquilina C, Viraben R. Gynecomastia in a male patient during stavudine and didanosine treatment for HIV infection. *Int J STD AIDS*. 2001;12:481-482.
133. Qazi NA, Morlese JF, King DM, et al. True gynecomastia, another manifestation of immune reconstitution disease? *Int J STD AIDS*. 2002;13:59-65.
134. Qazi NA, Morlese JF, King DM, et al. Gynecomastia without lipodystrophy in HIV-1 seropositive patients on efavirenz: an alternative hypothesis. *AIDS*. 2002;16:506-507.
135. Benveniste O, Simon A, Herson S. Successful percutaneous dihydrotestosterone treatment of gynecomastia occurring during highly active antiretroviral therapy: four cases and a review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2001;33:891-893.
136. Evans DL, Pantanowitz L, Dezube BJ, Aboulafia DM. Breast enlargement in 13 men who were seropositive for human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 2002; 35:1113-1119.
137. Piroth L, Grappin M, Petit JM, et al. Incidence of gynecomastia in men infected with HIV and treated with highly active antiretroviral therapy. *Scand J Infect Dis*. 2001; 33:559-560.
138. *Endocrinology*, third edition, Leslie J DeGroot & al, Saunders Company, USA, 1995.
139. Dayan CM: Interpretation of thyroid function tests. *Lancet* 2001; 357:619-624.
140. McIver B, Gorman CA: Euthyroid sick syndrome: an overview. *Thyroid* 1997; 7:125-132.
141. Bartalena L, Bogazzi F, Brogioni S, Grasso L, Martino E: Role of cytokines in the pathogenesis of the euthyroid sick syndrome. *Eur J Endocrinol* 1998; 138:603-614.
142. Bourdoux PP, De Wit SA, Servais GM, Clumeck N, Bonnyns MA: Biochemical thyroid profile in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Thyroid* 1991; 1:147-149.
143. Raffi F, Brisseau JM, Planchon B, Rémi JP, Barrier J, Grolleau JY: Endocrine function in 98 HIV-infected patients: a prospective study. *AIDS* 1991; 5:729-733.
144. Sellmeyer DE, Grunfeld C: Endocrine and metabolic disturbances in human immunodeficiency virus infection and the acquired immune deficiency syndrome. *Endocr Rev* 1996; 17:518-532.
145. Friedman ND, Spelman DW: Subacute thyroiditis presenting as pyrexia of unknown origin in a patient with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1999; 29:1352-1353.
146. Sereti I, Sarlis NJ, Arioglu E, Turner MA, Mican JM: Alopecia universalis and Graves' disease in the setting of immune restoration after highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2001; 15:138-140.
147. Grappin M, Piroth L, Verges B et al.: Increased prevalence of subclinical hypothyroidism in HIV patients treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2000; 14:1070-1072.

148. Carella C, Mazziotti G, Morisco F et al.: Long-term outcome of interferon- α -induced thyroid autoimmunity and prognostic influence of thyroid autoantibody pattern at the end of treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1925-1929.
149. Shuppert F, Rambusch E, Kirchner H, Atzpodien J, Kohn LD, von zur Muhlen A: Patients treated with interferon α , interferon β , and interleukin-2 have a different thyroid autoantibody pattern than patients suffering from endogenous autoimmune thyroid disease. *Thyroid*. 1997; 7:837-842.
150. Jubault V, Penformis A, Schillo F et al.: Sequential occurrence of thyroid autoantibodies and Graves' disease after immune restoration in severely immunocompromised human immunodeficiency virus-1-infected patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:4254-4257.
151. Saravanan P, Dayan CM: Thyroid autoantibodies. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2001; 30:315-337.
152. Fundaro C, Olivieri A, Rendeli C et al.: Occurrence of anti-thyroid autoantibodies in children vertically infected with HIV-1. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1998; 11:745-750.
153. Loignon M, Martin M, Toma E. High rate of thyroid autoimmunity and dysfunction in HIV-infected adults receiving HAART. *Antiviral Therapy* 2001;6 (4):55.
154. Sherman SI, Gopal J, Haugen BR et al.: Central hypothyroidism associated with retinoid X receptor-selective ligands. *N Engl J Med* 1999; 340:1075-1079.
155. Toma E, Devost D, Chow LN, Bhat PV: HIV-protease inhibitors alter retinoic acid synthesis. *AIDS* 2001; 15.
156. Gouveia CH. The molecular and structural effects of thyroid hormone in bones. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004 February; 48 (1):183-95. Epub 2004 Jun 1.
157. Yarasheski KE, Breda E, Hoffman M, et al. Both insulin resistance and relative [beta]-cell insensitivity are characteristics of HIV-associated glucose intolerance. Program and abstracts of the 3rd International Workshop on Adverse Drug Reactions and Lipodystrophy in HIV; October 23-26, 2001; Athens, Greece. *Antiviral Therapy*. 2001;6(suppl 4):5-6. Abstract 6.
158. Basdevant A. Anomalies Métaboliques sous traitements Antirétroviraux: Flammarion Medecine-Science-Journées de Diabétologie 2000, 167,177.
159. Shikuma, C. M.; Day, L. J.; Gerschenson, M. Insulin Resistance in the HIV-Infected Population: The Potential Role of Mitochondrial Dysfunction. *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, 2005 September ; 5 (3): 255-262 (8).
160. Dubé MP, Edmondson-Melancon H, Qian D, Aqeel R, Johnson D, Buchanan TA. Prospective evaluation of the effect of initiating indinavir-based therapy on insulin sensitivity and B-cell function in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001;27:130-134.
161. Murata H, Hruz P, Mueckler M. Inhibition of cellular glucose uptake by indinavir. Program and abstracts of the 3rd International Workshop on Adverse Drug Reactions and Lipodystrophy in HIV; October 23-26, 2001; Athens, Greece. *Antiviral Therapy*. 2001;6 (suppl 4):3. Abstract 1.
162. Yarasheski KE, Zinna E, Claxton S, Chen X, Becker A, Smith S. Indinavir with and without nucleosides accelerate the diabetes phenotype in male Zucker diabetic fatty (zdf fa/fa) rats. *Antiviral Ther*. 2002;7:L4-5. Abstract 7.

163. Koster JC, Remedi M, Qiu H, Nichols CG, Hruz PW. Indinavir acutely inhibits glucose-induced insulin release from pancreatic [beta]-cells through block of glucose uptake. *Antiviral Ther.* 2002;7:L4. Abstract 6.
- 163b. Lenhard JM, Weiel JE, Paulik MA, Furfine ES. Stimulation of vitamin A(1) acid signaling by the HIV protease inhibitor indinavir. *Biochem Pharmacol.* 2000 May 1;59(9):1063-8.
164. Pinti M, Salomoni P, Cossarizza A. Anti-HIV drugs and the mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2006 May-Jun;1757(5-6):700-7.
165. Garcia-Silva J, Almagro M, Peña-Penabad C, Fonseca E. Indinavir-induced retinoid-like effects: incidence, clinical features and management. *Drug Saf.* 2002;25(14):993-1003.
166. Toma E, Devost D, Chow Lan N, Bhat PV. HIV-protease inhibitors alter retinoic acid synthesis. *AIDS.* 2001 Oct 19;15(15):1979-84.
167. Précis de biochimie de Harper. 8ième Éd. Les presses de l'université Laval, 1995.
168. The retinoids. Vol 1. Sporn MB, Robet AB, Goodman DS. Academic press inc. 1984 New York.
169. Hélène Brodeur. Études du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinolique. Thèse de Doctorat, Université de Montréal. 2006.
170. Pijnappel WWM, Hendriks HFJ, Folkers GE, Van den Brink CE, Dekker EJ, Edelenbosch C, Van der Saag PT & Durston AJ. The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification. *Nature* 1993 Décembre; 366, 340 – 344.
171. Bloomoff R. Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr. Rev.* 1994;52 (2) S13-23.
172. Labrecque J, Bhat PV, Lacroix A. Régulation de la synthèse des acides rétinoïques tout-trans et 9-cis : rôle d'une nouvelle rétinol déshydrogénase. *Médecine/Science.* 13 :345-52.
173. Ong DE. Retinoid metabolism during intestinal absorption. *J Nutr* 1993;123:351-5.
174. Olson JA. The metabolism of vitamine A. *Pharmacological review.* 1967;19 (4):559-96.
175. Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science.* 2007 Feb 9;315(5813):820-5.
176. Napoli JL. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996 Sep;80(3 Pt 2):S52-62.
177. Desvergne B, Michalik L, and Wahli W, Transcriptional regulation of metabolism, *Physiological Reviews,* 2006; 86, (2):465–514.
178. Li D, Li T, Wang F, Tian H, and Samuels HH, Functional evidence for retinoid X receptor (RXR) as a nonsilent partner in the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. *Molecular and Cellular Biology,* 2002;22 (16):5782–5792.
179. Li D, Yamada T, Wang F, Vulin AI, and Samuels HH. Novel roles of retinoid X receptor (RXR) and RXR ligand in dynamically modulating the activity of the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. *Journal of Biological Chemistry.* 2004; 279 (9):7427–7437.
180. Shulman AI and Mangelsdorf DJ. Retinoid X receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *New England Journal of Medicine.* 2005; 353 (6):604–615.

181. Sanno N, Sugawara A, Teramoto A, Abe Y, Yen PM, Chin WW, Osamura RY. Immunohistochemical expression of retinoid X receptor isoforms in human pituitaries and pituitary adenomas. *Clinical Neuroendocrinology*. 1997;65:299-306.
182. Napoli JL, Pramanik BC, Williams JB, Dawson MI and Hobbs PD. Quantification of retinoic acid by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: total versus all-trans-retinoic acid in human plasma. *Journal of Lipid Research*. 1985; 26:387-392.
183. Vitamin A Deficiency Among Children ---Federated States of Micronesia, 2000 *MMWR* 50(24), 2001 <http://www.medscape.com/viewarticle/414618102>.
184. Takhore J. Vitamin A deficiency. 2006 May 12. *eMedicine*. <http://www.emedicine.com/med/topic2381.htm>
185. Penniston KL, Tanumihardjo SA The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am J Clin Nutr*. 2006 Feb;83 (2):191-201.
186. M. Joshi. Vitamin A intake and Hip fractures among postmenopausal women. *University of Toronto medical journal*.
187. Villamor E, Fawzi WW. Effect of vitamin A supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. *Clin Microbio*. 2005 July;18 (3):446-64.
188. Marceau G, Gallot D, Lemery D, Sapin V. Metabolism of retinol during mammalian placental and embryonic development. *Vitam Horm*. 2007;75:97-115.
189. Daftary GS, Taylor HS. Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev*. 2006 Jun;27(4):331-55.
190. Zile MH. Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *J Nutr*. 2001 Mar;131(3):705-8.
191. Duester G. Retinoic acid regulation of the somitogenesis clock *Birth Defects. Res C Embryo Today*. 2007 Jun;81(2):84-92.
192. Huang FJ, Hsuw YD, Lan KC, Kang HY, Chang SY, Hsu YC, Huang KE. Adverse effects of retinoic acid on embryo development and the selective expression of retinoic acid receptors in mouse blastocysts. *Hum Reprod*. 2006 Jan;21(1):202-9.
193. Ross SA, McCarry PJ, Drager UC, De Luca LM. Retinoids in Embryonal Development. *Physiological Rev*. 2000 July; 80 (3).
194. Garattini E, Gianni M, Terao M. Retinoids as differentiating agents in oncology: a network of interactions with intracellular pathways as the basis for rational therapeutic combinations. *Curr Pharm Des*. 2007;13 (13):1375-400.
195. El-Metwally TH, Pour PM.. The retinoid induced pancreatic cancer redifferentiation-apoptosis sequence and the mitochondria: a suggested obligatory sequence of events. *JOP*. 2007 May 9;8(3):268-78.
196. Rigas JR, Dragnev KH. Emerging role of rexinoids in non-small cell lung cancer: focus on bexarotène. *Oncologist*. 2005 Jan;10(1):22-33.
197. Asou N. All-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Intern Med*. 2007;46(2):91-3.

198. Bi KH, Jiang GS. Relationship between cytokines and leukocytosis in patients with APL induced by all-trans retinoic acid or arsenic trioxide. *Cell Mol Immunol.* 2006 Dec;3(6):421-7.
199. Apisarnthanarax N, Talpur R, Duvic M. Treatment of cutaneous T cell lymphoma: current status and future directions. *Am J Clin Dermatol.* 2002;3(3):193-215.
200. Basu P, Biswas J, Mandal R, Choudhury P. Is interferon-alpha and retinoic acid combination along with radiation superior to chemo-radiation in the treatment of advanced carcinoma of cervix? *Indian J Cancer.* 2006 Apr-Jun;43(2):54-9.
201. Zanardi S, Serrano D, Argusti A, Barile M, Puntoni M, Decensi A. Clinical trials with retinoids for breast cancer chemoprevention. *Endocr Relat Cancer.* 2006 Mar;13(1):51-68.
202. Bill Valenti. Topical or Systemic Retinoids for AIDS-Related Kaposi's Sarcoma when HAART Alone is Not Enough. <http://www.medscape.com/viewarticle/428182>
203. Desai A, Kartono F, Del Rosso JQ. Systemic retinoid therapy: a status report on optimal use and safety of long-term therapy. *Dermatol Clin.* 2007 Apr;25(2):185-93.
204. Newman MD, Weinberg JM. Topical therapy in the treatment of actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Cutis.* 2007 Apr;79(4):18-28.
205. Patel S, Zirwas M, English JC 3rd. Acquired palmoplantar keratoderma. *Am J Clin Dermatol.* 2007;8(1):1-11.
206. Bremner JD, McCaffery P. The neurobiology of retinoic acid in affective disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007 Jul 10.
207. Goodman G. Managing acne vulgaris effectively. *Aust Fam Physician.* 2006 Sep;35(9):705-9.
208. Afifi T, de Gannes G, Huang C, Zhou Y Topical therapies for psoriasis: evidence-based review. *Can Fam Physician.* 2005 Apr;51:519-25.
209. Cyr PR. Diagnosis and management of granuloma annulare. *Am Fam Physician.* 2006 Nov 15;74(10):1729-34. 210. Lynde CB, Kraft JN, Lynde CW. Topical treatments for melasma and postinflammatory hyperpigmentation. *Skin Therapy Lett.* 2006 Nov;11(9):1-6.
211. Shah N. Hidradenitis suppurativa: a treatment challenge. *Am Fam Physician.* 2005 Oct 15;72(8):1547-52.
212. Huang Z, Xie H, Wang R, Sun Z. Retinoid-related orphan receptor gamma t is a potential therapeutic target for controlling inflammatory autoimmunity. *Expert Opin Ther Targets.* 2007 Jun;11(6):737-43.
213. Tamaki Y. Novel approach for management of age-related macular degeneration--antiangiogenic therapy and retinal regenerative therapy. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 2007 Mar;111(3):232-68; discussion 269.
214. Fukasawa H, Kagechika H, Shudo K. Retinoid therapy for autoimmune diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 2006 Jun;29(3):114-26.
215. Fleckman P. Management of the ichthyoses. *Skin Therapy Lett.* 2003 Sep;8(6):3-7.
216. Fischer Walker CL, Black RE. Micronutrients and diarrheal disease. *Clin Infect Dis.* 2007 Jul 15;45 Suppl 1:S73-7.

217. Segal S, Sharma S. Ophthalmic problem. Vitamin A and vitamin E. *Can Fam Physician*. 2005 Aug;51:1079, 1085-6.
218. McKeever TM, Britton J. Diet and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Oct 1;170(7):725-9.
219. Wagner J. Nuclear (receptor) power: retinoids in rat mesangioproliferative disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 9:81-3.
220. Vernochet C, Azoulay S, Duval D et al. Human immunodeficiency virus protease inhibitors accumulate into cultured human adipocytes and alter expression of adipocytokines. *J Biol Chem* 2005;280,3, January 21:2238-43.
221. Elizondo G, Corchero J, Sterneck E, Gonzales FJ. Feedback inhibition of the retinaldehyde dehydrogenase gene ALDH1 by retinoic acid through retinoic acid receptor α and CCAAT/enhancer-binding protein β . *J Biol Chem* 2000; 275: 39747-39753.
222. Ross AC. Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic acid oxidation. *J Nutr*. 2003;133:291S-96S.
223. Taimi M, Helvig C, Wisniewski J, Ramshaw H, White J, Amad M, et al. A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J Biol Chem* 2004; 279: 77-85.
224. Andreola F, Hayhurst GP, Luo G et al. Mouse liver CYP2C39 is a novel retinoic acid 4-hydroxylase. *J Biol Chem*. 2004,279,5,January 30: 3434-38.
225. Jones CY, Tang AM, Forrester JE, Huang J, Hendricks KM, Knox TA, et al. Micronutrient levels and HIV disease status in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy in the nutrition for healthy living cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 43: 475-482.
226. Schwarz EY, Reginato M, Shao D, Krakow SL, Lazar MA. Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBP β -mediated transcription. *Molec Cell Biol*. 1997,17: 1552-61.
227. Noy N. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J*. 2000;348: 481-95.
228. Dressman J, Kincer J, Matveev SV, & al. HIV protease inhibitors promote atherosclerotic lesion formation independent of dyslipidemia by increasing CD36-dependent cholesteryl ester accumulation in macrophages. *J Clin Invest*. 2003 February;111(3): 389-97.
229. Ziouzenkova O, Orasanu G, Sharlach M, & al. Retinaldehyde represses adipogenesis and diet induce-obesity. *Nature Medicine*. 2007 June;13 (6):695-702.
230. Desvergne B. Retinaldehyde: more than meets the eye. *Nature Med* 2007 June;13 (6): 671-3.
231. Graham TE, Yang Q, Bluher M & al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects, *New Eng J Med*. 2006;354:2552-63.
232. Kopf E, Plassat JL, Vivat V, de The H, Chambon P, Rochette-Elgy C. Dimerization with retinoid X receptor and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 2000 October;275 (43):33280-8.
233. Osanai M, Nishikiori N, Murata M & al. Cellular retinoic acid bioavailability determines epithelial integrity: Role of retinoic acid receptor α agonist in colitis. *Mol Pharmacol*. 2007;71:250-8.

234. He JC, Lu TC, Fleet M, Sunamoto M, Husain M, Fang W, Neves S, Chen Y, Shankland S, Iyengar R, Klotman PE. Retinoic acid inhibits HIV-1-induced podocyte proliferation through the cAMP pathway *J Am Soc Nephrol*. 2007 Jan;18(1):93-102.
235. Wen X, Li Y, Hu K, Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor receptor signaling mediates the anti-fibrotic action of 9-cis-retinoic acid in glomerular mesangial cell. *Am J Pathol* 2005 Oct;167(4):947-57.
236. Arrieta O, Garcia-Navarrete R, Zuniga S, Ordonez G, Ortiz A, Palencia G, Morales-Espinosa D, Hernandez-Pedro N, Sotela J. Retinoic acid increase tissue and plasma content of nerve growth factor and prevent neuropathy in diabetic mice. *Eur J Clin Invest*. 2005 March;35(3):201-7.
237. Corcoran JP, So PL, Maden M. Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid beta in the adult brain. *Eur J Neurosci*. 2004 August;20 (4):896-902.
238. Goodman AB, Pardee AB. Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer 's disease. *PNAS*. 2003 March;100(5):2901-5.
239. Feldman C. Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS): review of common infectious manifestations and treatment options. *AIDS Reserch and Therapy*. 2007;4:1-10.
240. Ingiliz P, Apenrodt B, Gruenhage F & al. Lymphoid pneumonitis as an immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient with CD4 cell recovery after HAART initiation. *HIV Med*. 2006 September;7 (6):411-4.
241. Spedini P. Retinoic acid syndrome: a case of massive lung consolidation. *Haematologica*. 2002;87 (02).
242. Ross CA. On the sources of the retinoic acid in the lung: understanding the local conversion of retinol to retinoic acid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 286:L247-8.
243. Manegold C, Hannoun C, Wywiol A, & al. Reactivation of hepatitis B virus replication accompanied by acute hepatitis in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *CID*. 2001 January;32:144-8.
244. Tang H, McLachlan A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism. *PNAS*. 2001 February;98(4):1841-5.
245. Jacob A, Budhiraja S, Reichel RR. The HNF-3alpha transcription factor is a primary target for retinoic acid action. *Exp Cell Res*. 1999 July;250 (1):1-9.
246. Zhou HJ, Tsai SY, Tsai MJ. RNAi technology and its use in studying the function of nuclear receptors and coregulators. *Nuclear Receptor Signaling*. 2003;1:1-3.
247. Toma E, Loignon M, Yu E et al. A randomized open-label, multicentre trial comparing the effects of fenofibrate and the combination of fenofibrate with L-carnitina on antiretroviral-related hypertriglyceridemia. 8th International Workshop on adverse drug reactions and lipodystrophie. San Francisco, CA. 2006, September 24-26.
248. Carr A, Workman C, Carey D et al. No effect of rosiglitazone for treatment of HIV-1 lipodystrophy: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004, February 7, 7; 363 (7): 429-3.

249. Hadigan C, Yawetz S, Thomas S, Havers F, Sax PE, Grinspon S. Metabolic effects of rosiglitazone in HIV lipodystrophie: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2004, May 18; 140 (10):786-94.
250. Ebcioğlu Z, Morgan J, Carey C, & al. Paradoxical lowering of high-density lipoprotein cholesterol level in 2 patients receiving fenofibrate and a thiazolidinedione. *Ann Intern Med*. 2006.E-797
www.annals.org
251. Pinaire JA, Reifel-Miller A. Therapeutic potential of retinoid X receptor modulators for the treatment of the metabolic syndrome. *PPAR Res*. 2007: article ID 94156:1-12.
252. Reifel-Miller A, Otto K, Hawkins E & al. A peroxisome proliferator-activated receptor α/γ dual agonist with a unique in vitro profile and potent glucose and lipid effects in rodent models of type 2 diabetes and dyslipidemia. *Mol Endocrin*. 2005;19(6):1593-1605.
253. Lenhard JM, Lancaster ME, Paulik MA, & al. The rxr agonist LG100268 causes hepatomegaly, improves glycaemic control and decrease cardiovascular risk and cachexia in diabetic mice suffering from pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetologia*. 1999 May;42 (5):545-54.
254. Bovenschen HJ, Otero ME, Langewouters AMG, & al. Oral retinoic acid metabolism blocking agent Rambazole for plaque psoriasis: an immunohistochemical study. *British J Dermat*. 2007;156:263-70.