



HAL
open science

Complications cardiovasculaires liées aux défauts de maturation de la lamine A : Rôle des traitements antirétroviraux et des mutations LMNA

Pauline Afonso

► **To cite this version:**

Pauline Afonso. Complications cardiovasculaires liées aux défauts de maturation de la lamine A : Rôle des traitements antirétroviraux et des mutations LMNA. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066375 . tel-01272576

HAL Id: tel-01272576

<https://theses.hal.science/tel-01272576v1>

Submitted on 11 Feb 2016

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

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

THESE
Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR
de L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité
Physiologie, physiopathologie & thérapeutique

Présentée par
Pauline AFONSO

Complications cardiovasculaires liées aux
défauts de maturation de la lamine A :
Rôle des traitements antirétroviraux et des
mutations *LMNA*.

Directeur de recherche : Dr. Martine CARON-DEBARLE
Co-directeur de recherche : Pr. Corinne VIGOUROUX

Présentée et soutenue publiquement le 23 Septembre 2015

Devant le jury composé du :

Pr. Jean MARIANI
Pr. Catherine BADENS
Pr. Marie-Christine ALESSI
Dr. Antoine MUCHIR
Dr. Maryse GUERIN

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Résumé

Les patients lipodystrophiques porteurs de mutations du gène *LMNA* codant pour les lamines de type A, et les patients infectés par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) traités par des antirétroviraux (ARV) sont à risque de développer une athérosclérose précoce avec calcifications et des comorbidités liées au vieillissement. Pour mieux comprendre la physiopathologie des atteintes vasculaires, j'ai étudié l'impact d'ARV ou de mutations *LMNA* sur des cellules musculaires lisses (CML) ou endothéliales d'artères coronaires humaines *in vitro*.

Ce travail a révélé que certains ARV (les inhibiteurs de protéase lopinavir ou atazanavir associés au ritonavir) induisent une sénescence prématurée et des dysfonctions des cellules endothéliales, alors que d'autres ont peu ou pas de conséquences (maraviroc, dolutégravir, maraviroc/dolutégravir et darunavir/ritonavir). De plus, le lopinavir/ritonavir ou l'atazanavir/ritonavir, ou l'expression des mutations *LMNA* p.R482W, p.D47Y ou p.R133L induisent une sénescence prématurée, une transdifférenciation ostéogénique avec calcification, et un stress oxydant dans les CML. L'accumulation de prélamine A farnésylée (une lamine A immature) et la diminution de l'expression de ZMPSTE24, son enzyme de maturation, sont, au moins en partie, responsables de ces effets.

Ainsi, les ARV étudiés ont des impacts différents et agissent par des mécanismes physiopathologiques pro-athérogéniques en partie communs avec certaines mutations *LMNA* associées aux lipodystrophies. Le rôle majeur de l'accumulation de prélamine A farnésylée liée à une diminution d'expression de ZMPSTE24 ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Mots clés : Athérosclérose - Laminopathies - Prélamine A - ZMPSTE24 - Sénescence - Calcification/transdifférenciation ostéogénique - Dysfonction endothéliale - Traitements antirétroviraux

Summary

Patients with lipodystrophies due to mutation in the *LMNA* gene encoding A-type lamins, or HIV-infected patients (Human Immunodeficiency Virus) receiving antiretroviral therapy (ARV) are prone to develop early atherosclerosis and vascular calcifications associated with comorbidities linked to premature aging. Our study focused on the impact of *LMNA* mutations or antiretroviral treatment *in vitro* on vascular smooth muscle cells (VSMC) or endothelial cells from human coronary arteries.

The results obtained during my thesis showed that some ARV (the protease inhibitors lopinavir or atazanavir associated with ritonavir) induce a cellular premature senescence with associated dysfunctions in endothelial cells, whereas others have little or no consequences (maraviroc, dolutegravir, maraviroc/dolutegravir and darunavir/ritonavir). In addition, some ARV (lopinavir or atazanavir with ritonavir) or the expression of *LMNA* mutations p.R482W, p.D47Y or p.R133L induce premature senescence, osteogenic transdifferentiation with calcification and oxidative stress of VSMC. Our results reveal that the accumulation of farnesylated prelamin A (an immature lamin A) and the decreased expression of its processing enzyme ZMPSTE24 are, at least partly, responsible for these effects.

This work shows the different effects of ARVs and highlights the existence of common pro-atherogenic pathophysiological mechanisms in HIV-infected patients receiving some protease inhibitors and in lipodystrophic patients with *LMNA* mutations, initiated by an accumulation of farnesylated prelamin A related to a decrease expression of ZMPSTE24. These abnormalities could give rise to new therapeutic perspectives.

Key words: Atherosclerosis - Laminopathies - Prelamin A - ZMPSTE24 - Senescence - Calcification/osteogenic transdifferentiation - Endothelial dysfunction - Antiretroviral therapies

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury de ma thèse. Tout d'abord, le Pr Jean Mariani qui me fait l'honneur de la présider. Je remercie également mes rapporteurs, le Pr Catherine Badens et le Pr Marie-Christine Alessi, pour avoir consacré de leur temps à la lecture et à l'évaluation de ce manuscrit. J'adresse mes remerciements à mes examinateurs, le Dr Antoine Muchir et le Dr Maryse Guérin, qui avait déjà accepté d'être tutrice de ma mi-thèse, d'avoir participé à ce jury.

Parce que je suis persuadée qu'une thèse ne se mène pas seule, je tiens à remercier du fond du cœur mes deux encadrantes: le Dr Martine Caron-Debarle et le Pr Corinne Vigouroux.

Merci Martine d'avoir eu confiance en moi, d'avoir vu en moi les qualités qu'il fallait pour entrer dans ce monde scientifique et merci pour le temps que tu continues à me consacrer alors que la vie te porte vers d'autres aventures. Merci Corinne pour ta disponibilité ainsi que pour ta patience et ta gentillesse qui m'ont été d'une grande aide.

Merci à vous deux pour vos conseils, votre présence dans les moments difficiles que sous-entendent une thèse et les discussions tant scientifiques que personnelles. Je vous suis reconnaissante de m'avoir permis de mener à bien ce projet.

Je souhaite remercier chaleureusement le Pr Jacqueline Capeau d'avoir été présente tout au long de ma thèse et de m'avoir permis de découvrir le monde scientifique privé.

Je remercie également le Pr Bruno Fève, directeur de l'unité, pour sa disponibilité malgré son emploi du temps et pour sa bonne humeur.

Un grand merci amical à Martine Auclair, qui m'a appris à manipuler et pipetter. L'art de la manip n'a plus aucun secret pour toi ! Même après ces années à t'observer, je me demande toujours quel est ton secret ! Merci pour nos discussions et rigolades sur des sujets toujours plus improbables !

Merci à mes camarades de bureau, Huong Do et le Dr Véronique Béréziat (il ne m'aura pas fallu tant de temps que ça pour oublier le « Madame Béréziat » finalement ;)). Félicitations pour vos petits bouts ! Je vous souhaite à toutes les deux beaucoup de bonheur ! Et bon courage à Huong, la fin est proche, tu vas assurer, j'en suis sûre !

Merci également au Pr Franck Boccara pour nos échanges scientifiques et amicaux.

Un énorme merci à Betty Jacquin et à notre nouvelle « recrue » Olguine pour avoir répondu à mes questions administratives, commandes, etc. Merci pour votre gentillesse et votre sourire permanent. Je te souhaite une très belle retraite Betty, profite bien de tes petits enfants !

Merci aussi à Emilie Capel et Marie Garcia de gérer la fastidieuse tâche d'organisation du labo. Je reste admirative devant un tel travail ! Emilie, félicitations pour ce nouveau départ en tant que thésarde, tu seras comme un poisson dans l'eau !

Merci également au Dr Carine Beaupère (la classe !). Comme tu l'as dit, jumelle de formation, même Master, même spécialité, même labo, même tâche d'organisation des réunions d'équipe (si, si, je tiens à te remercier pour ça !), mêmes vacances ! Il ne manque plus qu'une expatriation aux Etats-Unis pour compléter le tableau !

Un grand merci à tous les autres membres de l'équipe pour les moments de rigolade et l'ambiance conviviale du labo. Merci à Marthe Moldes et Marion Buyse pour leur bonne humeur quotidienne ! Merci aussi à Bénédicte Antoine, Olivier Lascols, Sabine Herrero, Camille Vatier, Claire Lagathu-Lafon, Anne-Claire Guénantin et Nolwenn Briand. Et bienvenue à Héloïse Dalle !

Un merci particulier à l'équipe du 11^{ème} pour m'avoir accueilli à des pauses-café, déjeuners, raclette et p'tits bacs ! Merci à Marie-Jo, Thomas, Geoffroy, Romain, Michelle, Sarah et Zhe !

Merci aux doctorants du CdR (même ceux venant de Kourilsky !) pour les soirées où nous avons noyé nos galères avec de la bière ou des cocktails aussi souvent que nécessaire !

Je tiens également à remercier toute l'équipe de médiation de la Cité des Sciences, en particulier Graziela (la meilleure tutrice dont un bébé puisse rêver !), Marlène et Valérie. Cette expérience a été énormément enrichissante pour moi aussi bien sur le plan professionnel que sur le plan humain. Longue vie à la Cité !

Enfin, je finirai ces remerciements par ceux qui m'ont soutenue pendant ces années de thésarde mais aussi depuis bien plus longtemps, voir toujours.

Merci à mes amis d'enfance, d'école, de fac, bref à tous ! Une mention spéciale à Agathe, parce qu'on est la preuve que la distance ne peut pas ébranler une véritable amitié ; à Elodie pour ton soutien pendant toutes ces années et pas seulement pour ma condition de thésarde, parce qu'il y a toujours une lumière au bout du tunnel et que les roues ne peuvent pas être carrées ;) ; et enfin à Carmelina pour notre passion commune des « oh j't'ai pas dit !! » et pour avoir entièrement relu ce manuscrit à la recherche des coquilles, merci maîcreeeeeeesse !!

Mes plus grandes pensées vont à toute ma famille qui m'a toujours soutenue : mes oncles, tantes, cousins, cousines et à Sissi. Un énorme méga super MERCI à mes parents et à mon

bro. Je sais que mes « longues études » (tout est relatif hein ;) n'ont pas toujours été faciles à supporter au quotidien (rien à voir avec mon caractère !). Merci à vous trois pour tout, pour votre soutien, pour m'avoir demandé des centaines de fois à ce que je vous ré-explique mon sujet de thèse ! Maintenant que le manuscrit est écrit, vous avez un nouveau livre de chevet (ou un nouveau cale-porte au choix !). Vous êtes mes piliers, je vous aime.

Et parce que l'on garde toujours le meilleur pour la fin, merci à celui qui a été mon meilleur ami et qui est aujourd'hui bien plus que ça. Merci à l'homme qui partage ma vie (je ne vais pas te faire l'affront de t'appeler par ton prénom !). Ta présence au quotidien et ton amour sont une force. A ton tour maintenant, je serai là pour te soutenir, et ensuite, à nous une nouvelle vie !!

Sommaire

Abréviations principales.....	1
Index des illustrations	4
Avant-propos	7
Partie I : Le système vasculaire – physiologie et physiopathologie.....	13
I- La paroi artérielle.....	13
II- L'athérosclérose	15
1- Définition et description anatomique de l'athérosclérose	15
2- Facteurs de risque de l'athérosclérose.....	17
3- Mécanismes de mise en place de l'athérosclérose.....	18
4- Conséquences locales de l'athérosclérose.....	25
III- Rôle de la calcification et de la sénescence dans l'athérosclérose	26
1- Calcification de la paroi artérielle.....	26
2- La sénescence cellulaire	36
IV- Modifications de la paroi artérielle au cours du vieillissement physiologique.....	48
1- Aspects histologiques.....	48
2- Aspects cellulaires et moléculaires.....	49
Partie II : Les lamines de type A et les laminopathies	51
I- Les lamines : gènes et structures.....	51
II- La maturation de la prélamine A en lamine A	52
III- Rôles de la lamine A	53
IV- Les laminopathies génétiques.....	54
1- Les laminopathies du tissu adipeux	55
2- Les laminopathies du nerf périphérique.....	57
3- Les laminopathies du muscle strié.....	57
4- Les laminopathies avec des syndromes de vieillissement accéléré	58
5- Les laminopathies induites par des mutations du gène ZMSPTE24	62
6- Notion de continuum phénotypique dans les laminopathies.....	64
V- Complications cardiovasculaires et laminopathies.....	64

VI- Hypothèses physiopathologiques dans les laminopathies.....	68
1- Morphologie nucléaire et fonction mécanique.....	68
2- Altération de la maturation de la prélamine A.....	69
3- ADN, régulation des gènes et différenciation cellulaire.....	70
4- Stress oxydant et « inflammaging ».....	72
5- Autophagie et apoptose.....	73
VII- Thérapies potentielles pour les laminopathies.....	73
1- Inhibition du processus de farnésylation : Voie du mévalonate.....	74
2- Dégradation de la prélamine A farnésylée par la rapamycine.....	75
3- Inhibition de l'activité de NAT10.....	76
4- Thérapies par ARN.....	76
5- Traitement par remplacement de cellules.....	77
6- Thérapie génique.....	77
Partie III : Le virus de l'immunodéficience humaine et les comorbidités des patients	
infectés.....	79
I- Espérance de vie des patients infectés par le VIH.....	80
II- Structure et génome du VIH-1.....	80
III- Cycle de réplication du VIH-1.....	82
1- Reconnaissance et fixation du virus sur les cellules cibles.....	83
2- Entrée du virus.....	83
3- Transcription inverse.....	83
4- Intégration et expression de l'ADN viral.....	84
5- Fabrication et relargage de nouvelles particules virales.....	84
IV- Traitements de l'infection par le VIH.....	84
1- Objectifs et développement des traitements antirétroviraux.....	84
2- Les inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	86
3- Les inhibiteurs de la protéase virale.....	87
4- Les inhibiteurs de l'intégrase.....	89
5- Les inhibiteurs d'entrée.....	90
6- Pharmacologie des traitements antirétroviraux.....	91
V- Complications.....	91
1- Anomalies de répartition du tissu adipeux : les lipodystrophies.....	92
2- Les dyslipidémies.....	94
3- Le risque cardiovasculaire.....	97
4- Vieillesse au cours de l'infection par le VIH.....	101

5- Accumulation de prélamine A et complications des patients infectés par le VIH et traités : laminopathie acquise	105
Partie IV : Résultats	109
I- Etude 1 : Defective ZMPSTE24 expression plays a role in vascular smooth muscle cell calcification and senescence resulting from LMNA mutations or HIV antiretroviral treatment	109
1- Introduction et objectifs de travail.....	109
2- Article soumis	113
3- Conclusion	140
II- Etude 2 : Impact of darunavir, atazanavir and lopinavir boosted with ritonavir on cultured human endothelial cells : beneficial effect of pravastatin.....	142
1- Introduction et objectifs de travail.....	142
2- Article.....	143
3- Conclusion	153
III- Etude 3 : Etude comparative des effets du maraviroc, dolutégravir, maraviroc/dolutégravir et darunavir/ritonavir sur des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines	154
1- Introduction et objectifs de travail.....	154
2- Rapport scientifique.....	155
3- Discussion.....	164
Partie V : Conclusion générale.....	168
Références bibliographiques	173
Annexe	199

Abréviations principales

3TC	Lamivudine
53BP1	p53-binding protein-1
α -SMA	α -smooth muscle actin
ABC	Abacavir
ADMA	Arginine diméthyle asymétrique
AGE	Produits de glycation avancée
ALP	Phosphatase alcaline
AMPK	Adénosine monophosphate kinase
ARN ^{sh}	Short hairpin RNA
ART	Thérapies antirétrovirales
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudine
BMP	Bone morphogenic protein
CCR5	C-C chemokine receptor type 5
CD4	Cluster de différenciation 4
CDK	Cyclin-dependant kinase
CKI	Inhibiteur des cyclines kinases
CMH-1 & 2	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I & II
CMLV	Cellule musculaire lisse vasculaire
CMT	Neuropathie de Charcot-Marie Tooth
CP450	Cytochromes P450
CRP	Protéine C réactive
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
d4T	Stavudine
DCM1A	Cardiomyopathie dilatée
DDAH	Diméthylarginine diméthylaminohydrolase
DDR	DNA damage response
DR	Dermopathie restrictive
DRV	Darunavir
DSB	Cassure double-brin de l'ADN
DTG	Dolutégravir
EDMD	Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss
EFV	Efavirenz
ENPP1	Ectonucleotide pyrophosphate phosphodiesterase
eNOS	NO synthase endothéliale
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ETR	Etravirine
FGF	Fibroblast growth factors
FPLD	Lipodystrophie familiale partielle de Dunnigan
FTI	Farnesyltransferase inhibitor
Gag	Group specific antigen
GFP	Green fluorescent protein

gp120	Glycoprotein 120
gp41	Glycoprotein 41
H2AX	H2A histone family, member X
HCAEC	Human Coronary Artery Endothelial Cell
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HGPS	Progéria de Hutchinson-Gilford
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IDV	Indinavir
IGF1	Insulin-like growth factor-1
IL	Interleukine
IL-6 & 8	Interleukines 6 & 8
IP	Inhibiteur de la protéase du VIH
iPSCs	Cellules souches pluripotentes induites
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LDLox	Lipoprotéine de faible densité oxydée
LGMD1B	Dystrophie musculaire des ceintures de type 1B
LM	Laminopathie métabolique
LPV	Lopinavir
MAD	Dysplasie acro-mandibulaire
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MGP	Matrix Gla Protein
MMPs	Métalloprotéinases
mtDNA	ADN mitochondrial
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	mTOR complex 1
MVC	Maraviroc
NAC	N-acétyl cystéine
NADPH	Adénine dinucléotide phosphate
NAT10	N-acetyltransferase 10
Nef	Negative regulatory factor
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NFV	Nelfinavir
NNRTI	Analogues non-nucléosidiques de la transcriptase inverse
NO	Oxyde nitrique – Monoxyde d'azote
NRTI	Analogue nucléosidique de la transcriptase inverse
NtRTI	Inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse
NVP	Névirapine
O2.-	Anion superoxide
ONOO-	Ion peroxydinitrite
OPG	Ostéoprotégérine
oxLDL	LDL oxydée
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p53	Tumor suppressor p53
PDGF	Platelet derived growth factor
PG-I2	Prostacycline

PI	Inhibiteurs de l'aspartyl protéase virale
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
Pol	Group specific antigen polymerase
PPi	Pyrophosphate inorganique
pRb	Protéine du rétinoblastome
PXE	Pseudoxanthome élastique
RAL	Raltégravir
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
RE	Réticulum endoplasmique
Rev	Regulator of expression of virions proteins
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPV	Rilpivirine
RTV ou r	Ritonavir
Runx2	Runt-related transcription factor-2
SA- β -galactosidase	Activité β -galactosidase associée à la sénescence
SAHF	Sénescence associée à des foyers d'hétérochromatine
SASP	Phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SDFs	Senescence associated DNA-damage foci
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SIPS	Sénescence induite par un stress
SIRT-1	Sirtuine-1
SOD	Superoxide dismutases
SQV	Saquinavir
SRE	SREBP1 response element
SREBP1	Sterol-regulatory element binding protein 1
T20	Enfuvirtide
Tat	Transactivating Factor
TDF	Ténofovir
TGF- β	Tumor growth factor β
TIMP	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloprotease
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
Vif	Viral infectivity factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité
Vpr	Viral protein R
Vpu	Viral protein unique
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family member
ZMPSTE24	Zinc metalloprotéase STE24

Index des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique des différentes couches de la paroi artérielle.....	13
Figure 2 : Schéma simplifié des principaux remaniements associés à l'athérosclérose.....	15
Figure 3 : Evolution anatomique des différentes lésions d'athérosclérose.....	16
Figure 4 : Schéma de l'aorte et de ses branches avec les principales zones susceptibles de développer des plaques d'athérosclérose (en bleu) chez des souris déficientes pour le récepteur du LDL nourries avec un régime riche en gras	19
Figure 5 : Physiopathologie du développement de l'athérosclérose.....	19
Figure 6 : Synthèse du NO et découplage de la eNOS.....	21
Figure 7 : Mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la calcification artérielle lors de l'athérosclérose	27
Figure 8 : Conséquences phénotypiques de la transdifférenciation ostéoblastique des CMLV.....	29
Figure 9 : Mécanismes impliqués dans la calcification athérosclérotique et facteurs modulant la stabilité de la plaque.....	35
Figure 10 : Caractéristiques morphologiques et facteurs de risque principaux de la sénescence cellulaire.....	37
Figure 11 : Sénescence et arrêt du cycle cellulaire par les voies p53/p21 et p16.....	38
Figure 12 : Réduction de l'oxygène et production d'espèces réactives de l'oxygène.....	40
Figure 13 : Sources et réponses cellulaires aux espèces réactives de l'oxygène.	41
Figure 14 : Voies de signalisation induisant l'expression de NF- κ B et ses conséquences cellulaires.....	42
Figure 15 : Sénescence cellulaire chez une personne jeune versus une personne âgée	46
Figure 16 : Effets bénéfiques versus délétères de la sénescence cellulaire.....	47
Figure 17 : Représentation schématique du gène LMNA et des lamines de type A.....	52
Figure 18 : Modifications post-traductionnelles de la prélamine A en lamine A mature.....	53
Figure 19 : Distribution des mutations le long du gène LMNA responsables des laminopathies	54
Figure 20 : Atteintes tissu-spécifique dans les laminopathies.....	55
Figure 21 : Aspect de lipoatrophie sous-cutanée périphérique et accumulation facio-cervicale de tissu adipeux chez deux patientes FPLD porteuses d'une mutation hétérozygote du gène LMNA de type R482W ..	56
Figure 22 : Altération de la maturation de la lamine A chez les patients atteints de progéria : accumulation de progérine et anomalies de la structure nucléaire.....	59
Figure 23 : Description d'un patient atteint d'une mutation du gène LMNA de type R133L.....	61
Figure 24 : Description d'une patiente atteinte d'une mutation hétérozygote du gène LMNA de type D47Y ...	62
Figure 25 : Différentes hypothèses physiopathologiques pouvant être en jeu dans le développement des laminopathies	68
Figure 26 : Voie du mévalonate conduisant à la biosynthèse du cholestérol et à la production du groupement farnésyl.....	74
Figure 27 : Structure du virion infectieux du VIH-1.....	80

<i>Figure 28 : Génome et protéines du VIH-1</i>	<i>81</i>
<i>Figure 29 : Le cycle de réplication du VIH-1.....</i>	<i>82</i>
<i>Figure 30 : Mode d'action des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTI).....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 31 : Mode d'action des inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTI).....</i>	<i>87</i>
<i>Figure 32 : Mode d'action des inhibiteurs de la protéase virale (IPs).....</i>	<i>88</i>
<i>Figure 33 : Mode d'action des inhibiteurs de l'intégrase.....</i>	<i>89</i>
<i>Figure 34 : Mode d'action d'un inhibiteur d'entrée, le maraviroc.....</i>	<i>90</i>
<i>Figure 35 : Photographies de patients infectés par le VIH présentant une accumulation de tissu adipeux viscéral (à gauche), une lipotrophie faciale (au milieu) et une bosse de bison (à droite)</i>	<i>93</i>
<i>Figure 36 : coupe d'artère calcifiée d'un patient infecté par le VIH.....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 37 : Facteurs de risques prédictifs de la survenue d'infarctus du myocarde dans la cohorte FHDH.....</i>	<i>98</i>
<i>Figure 38 : Facteurs impliqués dans le vieillissement des patients infectés par le VIH.....</i>	<i>102</i>
<i>Figure 39 : Mise en place des dysfonctions des CMLV en présence d'inhibiteurs de la protéase ou de mutations du gène LMNA : Importance de l'accumulation de prélamine A farnésylée et de la diminution de l'expression de la ZMPSTE24</i>	<i>172</i>

Avant-propos

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde (rapport de Janvier 2015). En 2012, 17,5 millions de personnes sont décédées d'une maladie cardiovasculaire, soit environ 31% de la mortalité mondiale totale. Depuis 2002, en France, les maladies cardiovasculaires sont la seconde cause de décès (après les cancers), avec environ 28% de la mortalité. Il est possible de diminuer l'incidence de la plupart des maladies cardiovasculaires en s'attaquant aux facteurs de risque comportementaux tels que le tabagisme, les erreurs diététiques, la sédentarité, l'excès d'alcool, mais aussi l'hypertension, l'obésité, le diabète et la dyslipidémie. D'autres facteurs de risque non modifiables sont aussi à prendre en compte, notamment l'âge et le contexte familial, avec des prédispositions génétiques identifiées ou non. La présence d'un ou de plusieurs de ces facteurs de risque favorise le développement d'une athérosclérose qui est la cause sous-jacente principale de l'ischémie myocardique (angor, infarctus du myocarde), de l'accident vasculaire cérébral et de la mort subite d'origine cardiaque. L'incidence de ces maladies continue à augmenter en raison de l'augmentation de la fréquence de l'obésité et du diabète de type 2 qui sont des facteurs de risque majeurs d'athérosclérose (OMS, 2014).

L'athérosclérose est fréquemment observée chez les patients porteurs de lipodystrophies associées aux mutations du gène *LMNA*, codant pour les lamines de type A, des filaments intermédiaires nucléaires. Ces protéines participent au sein de la lamina nucléaire à de nombreuses fonctions, notamment au maintien de l'intégrité structurale du noyau et à la régulation génique. Depuis la première description, en 1999, d'une mutation du gène *LMNA* identifiée comme responsable de la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, de nombreuses pathologies ont été associées à des mutations de ce gène. Ces pathologies, regroupées sous le terme de « laminopathies », présentent une forte variabilité clinique avec en particulier une atteinte isolée ou combinée des tissus musculaires, adipeux et osseux. Les patients atteints de laminopathies étudiés au laboratoire présentent des syndromes lipodystrophiques et/ou des syndromes de vieillissement accéléré (syndromes progéroïdes), qui s'associent à des troubles métaboliques (insulinorésistance, diabète, hypertriglycémie, baisse du HDL-cholestérol). Chez ces patients, les complications cardiovasculaires, comprenant une athérosclérose et des

calcifications artérielles, sont précoces et sévères, même si les troubles métaboliques sont bien contrôlés, suggérant que la paroi artérielle est également une cible directe de la maladie. Par ailleurs, des études issues du laboratoire et d'autres groupes, ont montré dans plusieurs modèles cellulaires que l'expression des mutations *LMNA* responsables de ces pathologies entraînaient l'accumulation de prélamine A farnésylée, une forme immature de la protéine, toxique pour la cellule. En accord, certaines laminopathies progéroïdes peuvent être liées à une mutation du gène *ZMPSTE24*, codant pour une protéase impliquée dans la maturation de la prélamine farnésylée en lamine A mature non farnésylée.

Certains patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) sous traitement antirétroviral présentent des complications cardiovasculaires voisines de celles des patients atteints de laminopathies d'origine génétique. Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés, traditionnels, comme l'âge, la présence d'une redistribution du tissu adipeux, la dyslipidémie, l'hypertension et le tabagisme, ou liés au retentissement du virus lui-même sur les fonctions immuno-inflammatoires. De plus, des études cliniques et expérimentales ont montré que certains inhibiteurs de la protéase du VIH (IPs) utilisés en thérapeutique clinique inhibent l'activité de la protéase *ZMPSTE24*, interférant ainsi avec la cascade de maturation de la lamine A. La prélamine A s'accumule alors dans la cellule sous sa forme farnésylée. Ainsi, les complications cardiovasculaires des patients infectés par le VIH sous antirétroviraux pourraient résulter de mécanismes physiopathologiques proches de ceux observés chez les patients porteurs de laminopathies lipodystrophiques d'origine génétique, et entrer dans le cadre d'une « laminopathie acquise ».

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement spécifique pour les laminopathies liées à l'accumulation de prélamine A farnésylée. Le développement de molécules thérapeutiques capables de réduire la toxicité de la prélamine A farnésylée ou de stimuler sa maturation est donc une priorité pour les patients. Des molécules sont aujourd'hui testées en clinique telles que des inhibiteurs de farnésylation, des statines, et des bisphosphonates, ayant pour cible le blocage de la farnésylation. Ces traitements spécifiques de la laminopathie pourraient renforcer l'efficacité des molécules thérapeutiques actuelles qui luttent contre les troubles métaboliques et les atteintes cardiovasculaires.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié les relations entre le défaut de maturation de la lamine A et les complications vasculaires observées chez des patients porteurs de mutations du gène *LMNA* ou infectés par le VIH et traités à long terme par certains antirétroviraux. J'ai mené des études expérimentales *in vitro* sur les deux principaux types cellulaires présents dans la paroi des artères humaines, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. De plus, je me suis intéressée à l'effet de plusieurs molécules antirétrovirales, récemment mises sur le marché, sur les fonctions des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines.

Mon sujet principal a concerné l'impact des défauts de maturation de la lamine induits par certaines mutations du gène *LMNA* ou par certaines molécules antirétrovirales, sur les cellules musculaires lisses vasculaires humaines et en particulier, sur leur capacité à se transdifférencier en ostéoblastes et à se calcifier, deux processus majeurs dans le développement de l'athérosclérose. Pour cela, j'ai étudié en parallèle les effets de la surexpression de lamine A mutée (D47Y, R133L ou R482W) et d'une série de combinaisons d'IPs (lopinavir, atazanavir ou darunavir associés au ritonavir - LPV/r, ATV/r et DRV/r) sur le phénotype de ces cellules, abordant aussi les processus de stress oxydant, d'inflammation, et de sénescence. Je me suis focalisée sur les mécanismes mis en cause dans ces altérations en étudiant particulièrement l'implication de la prélamine A farnésylée et de son enzyme de maturation, la ZMPSTE24 (Article soumis).

Dans une autre étude, j'ai étudié les effets à long terme de plusieurs IPs sur des cultures primaires de cellules endothéliales d'artère coronaire humaine. L'impact du DRV ou de l'association DRV/r, LPV/r et ATV/r a été évalué sur les principales fonctions cellulaires, le statut redox, l'état inflammatoire et la sénescence des cellules. Les effets bénéfiques d'une statine, qui a une action inhibitrice sur la farnésylation des protéines, ont permis de mettre en avant les relations entre la toxicité des molécules antirétrovirales et l'altération du processus de maturation de la lamine A. (Auclair et al. 2014)

Enfin, dans une étude en cours de finalisation, j'ai évalué l'impact d'antirétroviraux de dernière génération sur le fonctionnement des cellules endothéliales vasculaires. J'ai ainsi analysé les effets d'un inhibiteur de la protéase virale, le dolutégravir (DTG), d'un antagoniste du corécepteur d'entrée du virus CCR5, le maraviroc (MVC) ainsi que l'association des deux

(MVC+DTG). J'ai comparé leurs effets à ceux d'une combinaison d'antirétroviraux étudiée précédemment (DRV/r).

Ma thèse est structurée en plusieurs parties. Dans l'introduction, je développerai en trois grands chapitres l'état des connaissances actuelles servant de base à ces travaux. La première partie portera sur la physiologie et la physiopathologie du système vasculaire et notamment sur les mécanismes impliqués dans l'athérosclérose et les dysfonctions qui lui sont associées, la sénescence et la calcification artérielle. La seconde partie traitera des lésions de type A et des laminopathies lipodystrophiques et/ou progéroïdes génétiques ainsi que des complications cardiovasculaires observées chez les patients. La troisième partie abordera le rôle de l'infection par le VIH et des traitements antirétroviraux dans les comorbidités cardiovasculaires associées à cette pathologie.

Partie I

Le système vasculaire – physiologie et physiopathologie

I- La paroi artérielle

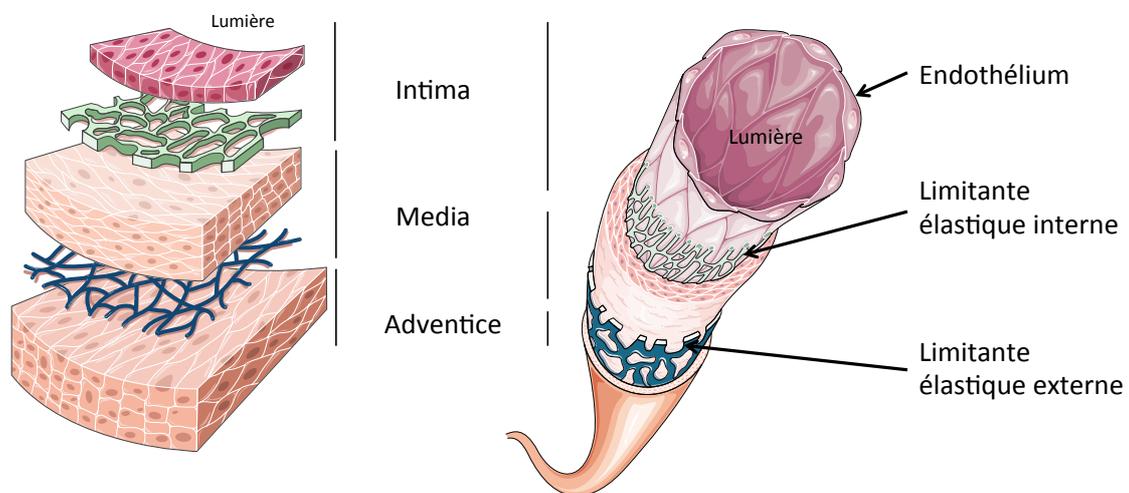


Figure 1 : Représentation schématique des différentes couches de la paroi artérielle

La paroi artérielle est décrite, classiquement, comme formée de trois tuniques concentriques qui sont, de la partie externe à la lumière: l'adventice, la média et l'intima. Cette structure histologique concerne tout l'arbre vasculaire, à l'exception des capillaires. (Cottart et al. 2009) (Figure 1)

L'intima (ou tunique interne) constituée de dedans en dehors de l'endothélium, de la membrane basale, de la couche sous-endothéliale et de la limite élastique interne, a un rôle actif dans l'interface sang-paroi artérielle.

Les cellules endothéliales en monocouche forment un épithélium simple pavimenteux reposant sur une lame basale, qui ne constitue pas uniquement une simple barrière physique inerte mais a plusieurs fonctions physiologiques importantes. En effet, les cellules endothéliales (i) constituent une barrière perméable d'échange et de transport de substances dans la paroi artérielle, (ii) assurent le maintien du tonus vasculaire par le relargage de

monoxyde d'azote (NO), de la prostacycline (PG-I₂) (vasodilatateur) et de l'endothéline (vasoconstricteur), (iii) synthétisent et sécrètent des facteurs de croissance et des cytokines, (iiii) permettent le renouvellement du collagène et des protéoglycanes de la membrane basale sur laquelle elles reposent et (iiiii) constituent une surface non thrombogénique et non adhérente pour les leucocytes.

La média (ou couche moyenne) est principalement composée de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) qui sont organisées en couches appelées unités. Elle est également constituée d'une matrice de fibres élastiques et musculaires disséminées dans un réseau de fibres de collagène. Sa composition varie selon sa position dans l'arbre vasculaire et donc selon le calibre de l'artère. La principale fonction de la média est de maintenir le tonus et la résistance vasculaire. En effet, les cellules musculaires lisses ont un rôle essentiel dans la vasoconstriction. Elles assurent également l'intégrité structurale et fonctionnelle de la paroi artérielle par leur capacité de prolifération et de synthèse de la matrice extracellulaire, comprenant du collagène, des fibres élastiques, de l'élastine soluble et insoluble, et des glycosaminoglycanes (principalement dermatane-sulfates).

L'adventice (ou tunique externe) est constituée de tissu conjonctif (collagène, élastine), de fibroblastes, de macrophages, de terminaisons nerveuses et du vasa vasorum (petits vaisseaux nourriciers). Elle a un rôle dans la régulation de la motricité en libérant des neurotransmetteurs et est responsable de l'apport d'oxygène et de nutriments.

Les artères de gros et moyen calibre ont une position centrale dans l'arbre artériel alors que les artères de petit calibre sont plus distales. Les artères de gros et moyen calibre possèdent une intima développée avec une matrice extracellulaire riche en élastine et en collagène, qui ont un rôle important dans la résistance artérielle aux pressions, alors que celles de petit calibre ont une couche de cellules musculaires lisses plus développée.

II- L'athérosclérose

1- Définition et description anatomique de l'athérosclérose

A- Définition de l'athérosclérose

La définition classique de l'athérosclérose est morphologique. Elle a été adoptée par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en 1957 comme étant l'«association variable de remaniements de l'intima des grosses et moyennes artères consistant en une accumulation focale de lipides, glucides complexes, sang et produits sanguins, tissu fibreux, dépôts calciques, le tout accompagné secondairement d'une atrophie de la média ». (Figure 2) L'athérosclérose comporte des lésions artérielles localisées, accompagnées d'une diminution du calibre artériel. Les principales artères atteintes sont les artères élastiques. (Cottart et al. 2009)

La principale lésion d'athérosclérose est donc un épaissement focal de l'intima des artères, qu'on appelle plaque et qui associe :

- un athérome (du grec athéré « bouillie ») ou cœur lipidique, composé d'un dépôt de graisses (où prédomine le cholestérol) dispersées hors des cellules sous forme de cristaux ou dans les cellules qui sont alors dénommées cellules spumeuses.
- une sclérose (du grec skléros « dur ») qui forme le pourtour de la plaque, entourant le centre athéromateux et de composition complexe (différents types de cellules, des fibres de collagène et des protéoglycanes). Les lésions évoluées peuvent se compliquer de calcifications.

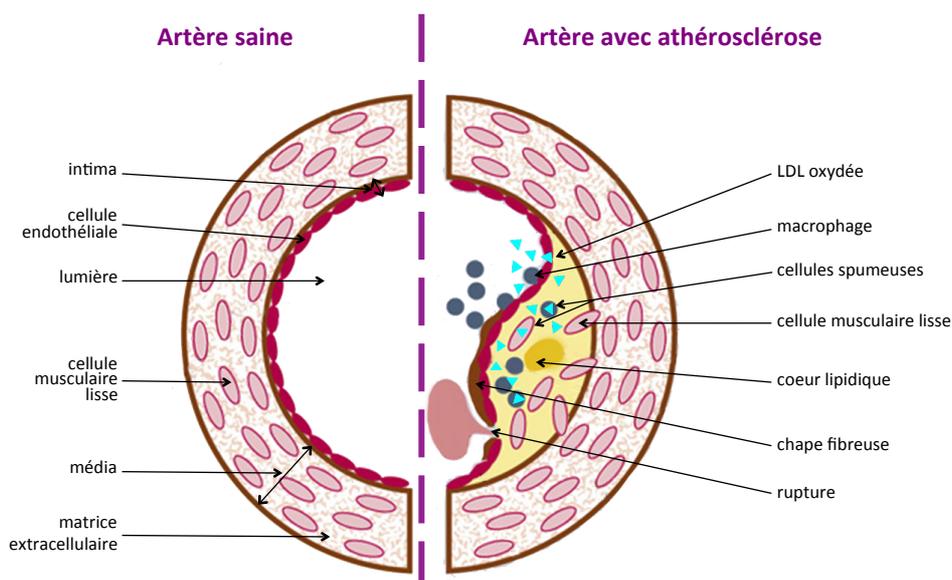


Figure 2 : Schéma simplifié des principaux remaniements associés à l'athérosclérose

B- Description anatomique des lésions athéroscléroseuses

Les lésions athéroscléroseuses sont constituées de plaques nodulaires déposées surtout au niveau de l'intima, de forme et de taille variables, isolées ou confluentes et qui évoluent en plusieurs stades. (Figure 3)

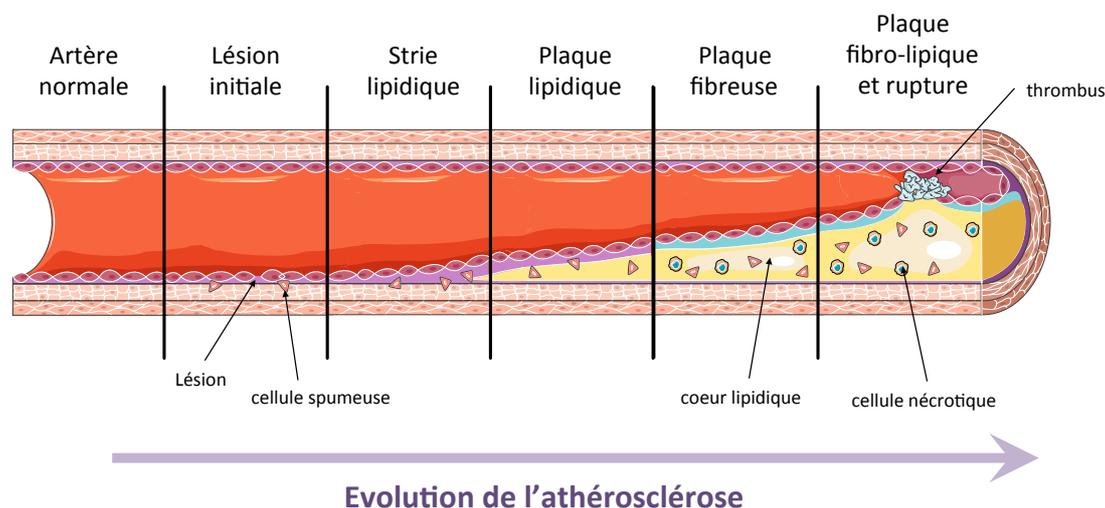


Figure 3 : Evolution anatomique des différentes lésions d'athérosclérose

a- La lésion initiale

Les lésions initiales représentent les premières modifications évoluant vers une maladie clinique et ne sont détectables que par méthode chimique ou microscopique. Elles sont situées au niveau de l'intima et consistent en un dépôt de lipides dans les cellules spumeuses.

b- La strie lipidique

Les stries lipidiques sont visibles à l'oeil nu comme des stries blanchâtres, formées d'une succession de petites taches et alignées dans le sens du courant sanguin. Progressivement, des stries perpendiculaires ou obliques aux stries primaires vont apparaître. Ces stries contiennent de nombreuses cellules musculaires lisses et des cellules spumeuses, ainsi que du tissu fibreux.

Des stries lipidiques sont visibles dans l'aorte et les artères coronaires du très jeune enfant et s'étendent au niveau de l'aorte à la puberté. Le fait que ces lésions progressent ou non vers des lésions évoluées dépend en grande partie des forces hémodynamiques et des taux plasmatiques des lipoprotéines athérogènes.

c- La plaque lipidique

Les plaques lipidiques sont dues à une accumulation de lipides extracellulaires et de débris dans la matrice de protéoglycanes dans les stries. A ce stade de la maladie, il n'existe pas encore de noyau lipidique ni de mort cellulaire et les cristaux de cholestérol sont très peu présents.

d- La plaque fibreuse

Les plaques fibreuses représentent la lésion la plus spécifique de l'athérosclérose évoluée. Elles se caractérisent par des zones épaisses, blanchâtres ou grises, de contours mal délimités et circonscrites à l'intima. Elles apparaissent au niveau de l'aorte abdominale, des artères coronaires, et des artères carotides dans la troisième décennie, et augmentent progressivement avec l'âge. Elles se forment plus précocement chez l'homme que chez la femme.

La plaque fibreuse est ferme, surélevée en dôme et possède une surface opaque bombant dans la lumière vasculaire. Elle est composée d'un noyau central de lipides extracellulaires (avec des cristaux de cholestérol) et des débris de cellules nécrotiques, recouverts d'un manchon fibromusculaire contenant un grand nombre de cellules musculaires lisses ainsi que du collagène. De ce fait la plaque est beaucoup plus épaisse que ne l'est l'intima normale. Le principal lipide accumulé est le linoléate de cholestérol extracellulaire (comme dans les lipoprotéines).

e- La plaque fibro-lipidique et les complications de l'athérosclérose

La lésion la plus évoluée est une plaque fibreuse calcifiée présentant différents degrés de nécrose, de thrombose et d'ulcération. Ces lésions sont le plus souvent symptomatiques, et associées aux maladies ischémiques rencontrées en clinique. L'augmentation de la nécrose conduit à un affaiblissement progressif de la paroi artérielle et une rupture de l'intima peut survenir. La rupture ou la fissuration des plaques favorisent la constitution de la thrombose.

2- Facteurs de risque de l'athérosclérose

Il existe des facteurs de risque génétiques et environnementaux prédisposant à l'athérosclérose.
(Lusis 2000)

Son incidence croît avec l'âge et varie en fonction du sexe, en effet, elle est plus élevée chez l'homme que chez la femme jusqu'à la ménopause, en accord avec l'effet protecteur des œstrogènes.

De plus, certaines familles semblent prédisposées à cette pathologie (indépendamment des facteurs de risque environnementaux), sous-entendant l'implication de facteurs génétiques. Des études épidémiologiques ont mis en évidence une association entre le risque d'athérosclérose et certains polymorphismes génétiques. L'athérosclérose est aussi fortement corrélée à plusieurs facteurs pathologiques tels que l'obésité, le diabète, et le syndrome métabolique regroupant plusieurs facteurs de risque de diabète et de maladie cardiovasculaire : augmentation du tour de taille, hypertension artérielle, hyperglycémie, hypertriglycéridémie et taux bas de HDL-cholestérol. (Alberti et al. 2009) L'inflammation systémique de bas grade et l'insulino-résistance, qui participent à la physiopathologie du syndrome métabolique, sont aussi des facteurs de risque d'athérosclérose. (Schmidt et al. 1999, Yudkin et al. 1999)

De surcroît, l'alimentation riche en graisses saturées, le tabagisme, entraînant une modification de la viscosité plasmatique, une agrégation plaquettaire et une diminution de la vasodilatation, ainsi que la sédentarité et le stress chronique, qui fragilisent le système artériel, favorisent l'athérosclérose. Enfin, certains agents infectieux, comme le cytomégalovirus et le *Chlamydia pneumoniae*, sont des stimuli de la réaction inflammatoire qui caractérise l'athérosclérose. (Libby et al. 1997)

Ces différents facteurs influent sur l'initiation et le développement de la maladie et peuvent être, pour certains d'entre eux, corrigés par une bonne hygiène de vie.

3- Mécanismes de mise en place de l'athérosclérose

Le développement de l'athérosclérose fait intervenir plusieurs stades évolutifs successifs (Stary et al. 1995, Cottart et al. 2009) et a principalement lieu au niveau d'embranchements et de courbures artérielles, où les conditions hémodynamiques sont perturbées. (Chiu et al. 2011) (Figure 4)

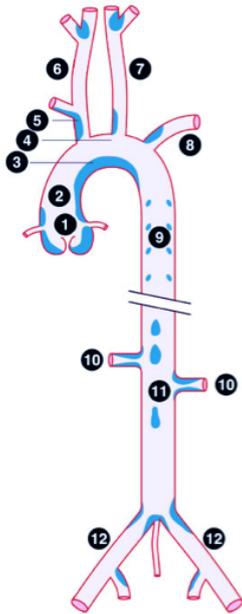


Figure 4 : Schéma de l'aorte et de ses branches avec les principales zones susceptibles de développer des plaques d'athérosclérose (en bleu) chez des souris déficientes pour le récepteur du LDL nourries avec un régime riche en gras

D'après (Chiu et al. 2011)

L'athérosclérose se développe préférentiellement au niveau des embranchements et des courbures des artères de moyen et gros calibre. (1) Sinus aortique (2) Aorte ascendante (3) Courbure interne de l'arc aortique (4) Courbure externe de l'arc aortique (5) Tronc brachio-céphalique (6) Artère carotide commune droite (7) Artère carotide commune gauche (8) Artère subclavière gauche (9) Aorte thoracique (10) Artère rénale (11) Aorte abdominale (12) Artère iliaque

Les différentes étapes du développement de l'athérosclérose sont schématisées dans la Figure 5.

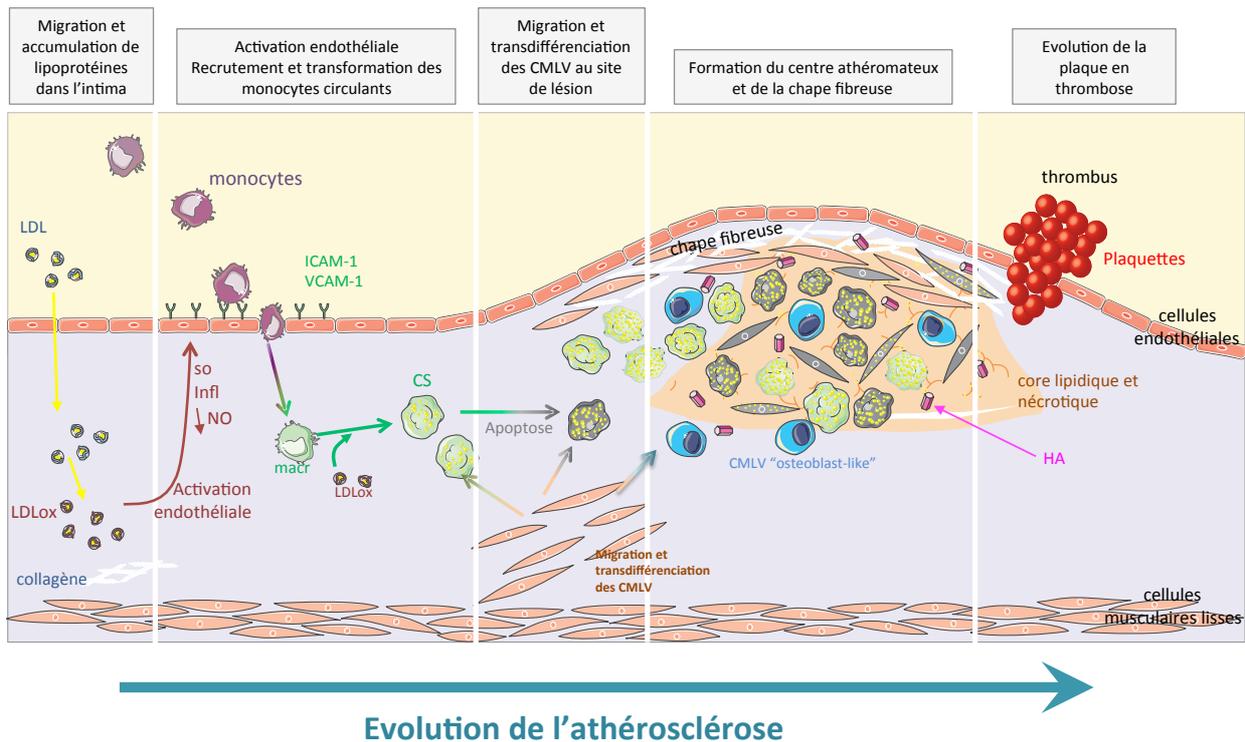


Figure 5 : Physiopathologie du développement de l'athérosclérose

CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires ; CMLV osteoblast-like : CMLV transdifférenciées en ostéoblastes et / ou chondrocytes ; HA : hydroxyapatite ; ICAM-1 et VCAM-1 : molécules d'adhésion cellulaire ; Infl : inflammation ; LDLox ; lipoprotéine de faible densité (LDL) oxydée ; macr : macrophage ; NO : monoxyde d'azote ; so : stress oxydant ; CS : cellules spumeuses

A- Migration et accumulation des lipoprotéines dans l'intima artériel

L'athérosclérose débute avec l'infiltration et l'accumulation de lipoprotéines de basse densité, LDL (transporteur circulant de cholestérol et de molécules liposolubles) dans l'intima. Cette infiltration sous-endothéliale est suivie de modifications oxydatives des LDL (LDLox) par contact avec l'environnement de la paroi artérielle, notamment avec les composants de la matrice extracellulaire et les radicaux libres oxygénés produits par les cellules endothéliales, les CMLV et les macrophages. (Steinberg 1997)

B- Activation endothéliale associée à un statut inflammatoire et oxydant

a- Modifications morphologiques des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales des régions sans athérosclérose ont une morphologie nucléaire et cellulaire ellipsoïdale et un alignement co-axial dans la direction principale du flux. Au contraire, les cellules des régions athérosclérotiques ont une forme cuboïdale.

b- Dysfonction endothéliale

La présence de LDL oxydées dans l'intima induit un phénomène dit d'activation des cellules endothéliales. Ce phénotype dysfonctionnel est caractérisé par un statut pro-inflammatoire, pro-thrombotique, par une altération de leur fonction de barrière et par une diminution de la production de monoxyde d'azote (NO). (Davignon et al. 2004) D'autres facteurs importants sont en jeu dans l'activation pro-athérogénique de l'endothélium artériel dont des cytokines, des produits terminaux de glycation avancée associés à l'hyperglycémie chronique, ainsi que des altérations moléculaires secondaires à des pathogènes comme des bactéries ou des virus. De plus, l'altération du glycocalyx, qui joue un rôle dans la barrière endothéliale, favorise le passage trans-endothélial de particules de lipoprotéines de faible densité. (van den Berg et al. 2009)

Les cellules endothéliales des régions athérosclérotiques présentent aussi un fort taux de turnover et de sénescence cellulaire comparativement à celles localisées dans des régions sans athérosclérose. Ces cellules expriment aussi des marqueurs du stress du réticulum endoplasmique (Civelek et al. 2009), impliqués dans le processus d'athérosclérose en favorisant l'apoptose endothéliale. (Zeng et al. 2009)

c- Altération de la vasorégulation endothéliale : rôle de la eNOS et du NO

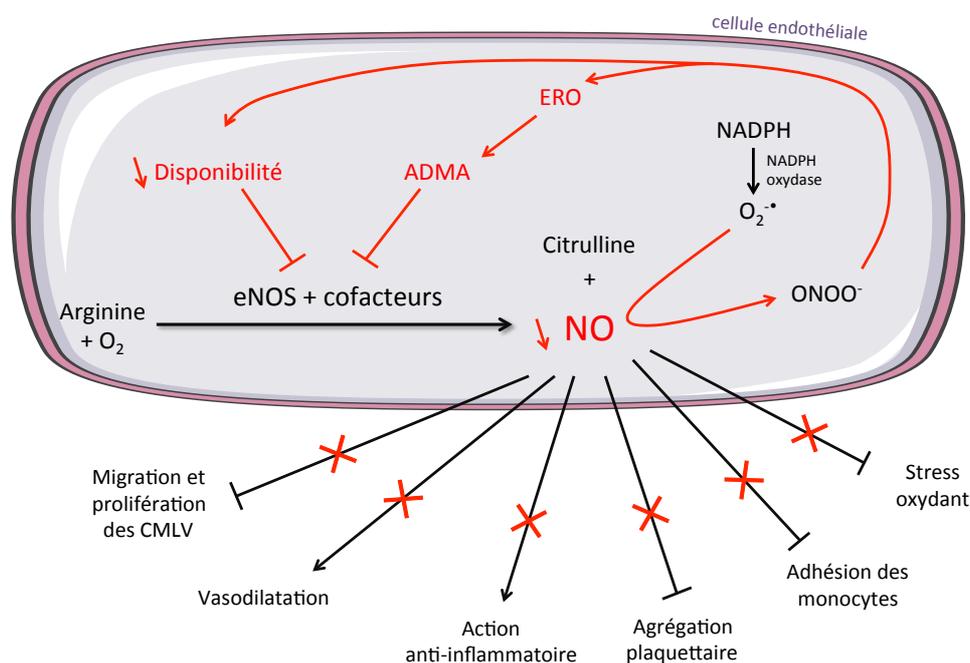


Figure 6 : Synthèse du NO et découplage de la eNOS

En rouge sont représentées les voies conduisant au découplage de la eNOS et au stress oxydant
 ADMA : arginine diméthyle asymétrique ; ERO : espèces réactives de l'oxygène ; eNOS : NO synthase endothéliale ; NO : monoxyde d'azote ; NADPH : adénine dinucléotide phosphate ; O₂^{-•} : anion superoxyde ; ONOO⁻ : ion peroxyntrite

Dans l'endothélium, l'enzyme eNOS (NO synthase endothéliale) génère du NO (monoxyde d'azote) par oxydation de l'arginine en citrulline, réaction nécessitant plusieurs co-facteurs dont le NADPH et le BH₄. (Nathan et al. 1994) (Figure 6) Le NO produit favorise la vasodilatation nécessaire à l'homéostasie vasculaire et inhibe des événements impliqués dans l'athérosclérose, comme l'agrégation plaquettaire, la prolifération et la migration des CMLV, l'adhésion des monocytes et le stress oxydant. (Davignon et al. 2004) Quand la disponibilité de l'arginine et des cofacteurs est réduite, l'eNOS produit moins de NO et de citrulline, tandis que des radicaux libres sont générés, conduisant à un stress oxydant. (Kawashima 2004) Ce processus est appelé le découplage de la eNOS. (Figure 6)

L'athérosclérose est caractérisée précocement par un découplage de la eNOS conduisant à un déséquilibre entre le NO, molécule anti-athérogénique et les ions superoxydes, pro-athérogéniques. (Kawashima 2004) Chez les personnes ayant une athérosclérose, la capacité de vasodilatation est donc réduite. (Boger et al. 1998) Une explication à ce phénomène est la formation d'un analogue endogène de l'arginine, l'arginine diméthyle asymétrique (ADMA) qui se fixe sur le site catalytique de la eNOS et bloque la synthèse de NO. (Cooke 2000) En

effet, l'ADMA est physiologiquement dégradée par la diméthylarginine diméthylaminohydrolase (DDAH), or cette enzyme est particulièrement sensible aux modifications de la balance redox. En accord avec cette hypothèse, une augmentation de la concentration plasmatique d'ADMA a été montrée chez les patients avec une athérosclérose en comparaison à des sujets sains. (Boger 2009)

d- Stress oxydant

Les NADPH oxydases, qui interviennent dans la production de radicaux libres lors du découplage de la eNOS, sont d'importantes sources d'espèces réactives dans la paroi vasculaire. (Griendling et al. 2000) Ces enzymes sont activées dans les cellules endothéliales par les composants de la plaque, comme les lipoprotéines à faible densité oxydées (LDL_{ox}) et génèrent des anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ces anions réagissent avec le NO en formant l'ion peroxy-nitrite (ONOO⁻), ce qui induit un stress oxydant et contribue à la déplétion vasculaire en NO. Le BH₄, cofacteur indispensable de la eNOS, est oxydé par le ONOO⁻. La diminution de la quantité de BH₄ contribue au découplage de la eNOS qui réduit la production de NO au profit de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). (Forstermann et al. 2006) (Figure 6) Cette production d'ERO par les NADPH oxydases a un effet délétère en favorisant l'expression de molécules d'adhésion, la prolifération et la migration des CMLV, l'apoptose des cellules endothéliales et l'oxydation des lipides. De surcroît, les triglycérides et les LDL oxydées causent des dommages mitochondriaux, conduisant aussi à une augmentation de la production des ERO par la chaîne respiratoire mitochondriale. (Tang et al. 2014)

e- Inflammation

Le monoxyde d'azote possède des propriétés anti-inflammatoires via l'inhibition de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription NF- κ B. (Peng et al. 1995) Or, au cours de l'athérosclérose, la disponibilité du NO est diminuée, entraînant l'activation de la voie de signalisation de NF- κ B dans les cellules endothéliales. (Dai et al. 2004, Won et al. 2007) De surcroît, l'endothélium activé au cours de l'athérosclérose secrète de nombreuses cytokines et chemokines pro-inflammatoires, dont TNF- α , IL-1, IL-6 et IL-8. (Thomas et al. 2009, Feaver et al. 2010, Marin et al. 2013, Kumar et al. 2014, Zhou et al. 2014) Les stimuli pro-inflammatoires induisent l'expression de molécules d'adhésion telles que ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) et VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) qui vont permettre le

recrutement et l'adhésion des monocytes à la paroi artérielle. (Mullick et al. 2008) A un stade plus tardif de l'athérosclérose, l'inflammation va aussi induire la production de métalloprotéinases matricielles (MMPs) favorisant alors la déstabilisation de la plaque. (Libby 2012)

C- Recrutement et transformation des monocytes circulants

Physiologiquement, l'endothélium ne permet pas l'adhésion des monocytes circulants. Au cours de l'athérosclérose, l'interaction entre les molécules d'adhésion telles que VCAM-1 et ICAM-1, produites à la surface des cellules endothéliales activées, et leurs récepteurs à la surface des monocytes conduit à l'adhérence des monocytes sur l'endothélium. (Szmitko et al. 2003, Galkina et al. 2009) Les monocytes vont alors s'infiltrer dans l'intima par diapédèse et se différencier en macrophages exprimant des récepteurs pour les LDL oxydées. L'accumulation lipidique dans les macrophages internalisés conduit à la formation de cellules spumeuses.

Les macrophages présents dans l'espace sous-endothélial jouent plusieurs rôles clés dans le développement de l'athérosclérose, notamment dans la production de cytokines pro-inflammatoires, augmentant l'activation endothéliale et le recrutement de nouveaux monocytes. Cette réaction inflammatoire chronique locale conduit, par auto-amplification, à la croissance de la plaque. Cependant, ce phénomène est régulé par un équilibre complexe. Certaines cytokines, telle que l'IL-10, ont au contraire, un effet anti-inflammatoire.

D- Migration et transdifférenciation des cellules musculaires lisses au site de lésion

Le statut inflammatoire de l'endothélium activé entraîne la migration des cellules musculaires lisses à travers la limitante élastique interne vers l'intima, au niveau de la lésion, où elles subissent une transdifférenciation vers un phénotypique ostéogénique. Ces cellules passent alors d'un phénotype différencié et contractile à un phénotype dédifférencié, sécrétoire, migratoire et prolifératif. Elles acquièrent alors les caractéristiques de cellules ostéoblastiques et/ou chondrocytaires et prolifèrent sous l'influence de facteurs de croissance, comme le PDGF (platelet derived growth factor). Les CMLV mobilisées synthétisent une matrice de tissu conjonctif à base de collagène, de fibres élastiques et de protéoglycanes. (Alexander et al. 2012)

La transdifférenciation des CMLV leur confère une capacité à se calcifier en subissant une apoptose avec formation de corps apoptotiques et relargage de vésicules matricielles. Ces vésicules matricielles qui contribuent à la formation physiologique des os, sont des

microparticules liées à la membrane qui concentrent du calcium et du phosphate, et deviennent des sites initiaux de nucléation de l'apatite. (Giachelli 2004) Des dépôts calciques envahissent alors progressivement la paroi des vaisseaux conduisant à une calcification et une rigidification de la paroi artérielle.

Il est important de noter que les cellules musculaires lisses expriment également des récepteurs des lipides permettant l'internalisation et l'oxydation des LDL et leur transformation en cellules spumeuses. Environ 50% des cellules spumeuses intimaux totales seraient dérivées de CMLV. (Allahverdian et al. 2014)

E- Formation du centre athéromateux et de la chape fibreuse

Les lipides de la plaque se regroupent pour former le cœur lipidique ou centre athéromateux. La plaque athéroscléreuse évoluée est caractérisée par la formation d'une chape fibromusculaire qui isole ce cœur lipidique de la lumière de l'artère et réalise donc une barrière de protection entre les plaquettes du sang et le matériel pro-thrombotique de l'intérieur de la plaque. Cette chape fibreuse est composée de cellules musculaires lisses et de protéines de la matrice extracellulaire. Son intégrité est un élément déterminant dans la stabilité des plaques.

F- Agrégation plaquettaire et hypercoagulabilité

Au cours de l'athérosclérose, une hypercoagulabilité et une hypofibrinolyse se développent. (Alessi et al. 2008, Morange et al. 2013)

Le facteur tissulaire, élément déclencheur de la coagulation, a été observé dans des plaques d'athérosclérose et des cœurs athéromateux riches en lipides non cellulaires. Son expression est induite par l'inflammation dans les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules endothéliales, les monocytes et les macrophages. Ce facteur est aussi retrouvé au niveau des microparticules circulantes dérivées de cellules endothéliales, de CMLV et de plaquettes, ayant un potentiel pro-inflammatoire et un rôle dans l'initiation et la progression de la thrombose. De plus, une augmentation de la concentration en PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), un inhibiteur de l'activation du plasminogène, conduit à un défaut de dégradation du thrombus c'est-à-dire à une hypofibrinolyse. (Alessi et al. 2008, Morange et al. 2013)

Les plaquettes sont «armées» de médiateurs inflammatoires (IL-1) et de chémokines (RANTES) leur octroyant un rôle-clé dans l'inflammation. (von Hundelshausen et al. 2007) Une fois activées, elles expriment à leur surface des protéines capables d'interagir avec les

polynucléaires neutrophiles et les monocytes pour former des agrégats et sensibiliser l'endothélium à la liaison de ces agrégats. (Chakrabarti et al. 2005) Les plaquettes constituent donc un élément-clé permettant d'établir un lien entre la thrombose et l'inflammation, deux entités indissociables dans l'athérosclérose ou l'athérombose.

4- Conséquences locales de l'athérosclérose

L'évolution de la plaque d'athérosclérose se déroule sur de nombreuses années et est le plus souvent asymptomatique, jusqu'à la rupture de la chape fibreuse qui peut résulter de facteurs extrinsèques, comme une poussée d'hypertension artérielle, engendrant des pressions mécaniques. La rupture de plaque est aussi favorisée par des facteurs intrinsèques qui dépendent de sa structure. Le volume du cœur lipidique, sa composition en lipides et en tissu fibreux, et le niveau d'inflammation de la chape fibreuse sont des indicateurs de la vulnérabilité d'une plaque. En effet, les plaques les plus vulnérables sont celles qui ont un centre lipidique important et une chape fibreuse relativement fine. La solidité de la chape, qui est un facteur majeur de protection contre la rupture, dépend de la balance entre dégradation et production (principalement par les CMLV) des protéines de la matrice extracellulaire. La matrice, qui contribue à stabiliser la plaque en formant une chape épaisse et solide, est dégradée par des métalloprotéinases dont l'expression est induite par des cytokines pro-inflammatoires. De plus, l'apoptose des cellules endothéliales, musculaires lisses et des macrophages peut aussi jouer un rôle dans la déstabilisation de la plaque. Ainsi l'apoptose des CMLV conduit à l'amincissement de la chape fibreuse. (Clarke et al. 2006, Falk et al. 2013)

La rupture de la plaque est à l'origine des principales complications de l'athérosclérose et conduit à l'apparition des manifestations cliniques, dont les plus répandues sont les ischémies coronariennes, cérébrales ou des membres inférieurs dues à la diminution du calibre des artères (sténoses) ou à l'interruption totale de la circulation artérielle par thrombose, pouvant être consécutive à la migration d'un thrombus.

a- La sténose

En réponse à l'augmentation de la taille des plaques d'athérome, les vaisseaux peuvent élargir leur diamètre jusqu'à un certain point (phénomène de remodelage artériel). Lorsque celui-ci est dépassé, la plaque entraîne un rétrécissement de la lumière artérielle, c'est la sténose. L'écoulement et le débit du sang sont perturbés, diminuant alors l'apport sanguin vers les organes, et créant une hypoxie tissulaire.

b- La thrombose

La rupture des plaques met le sang circulant et le noyau lipidique en contact. Les plaquettes vont alors s'agréger et sécréter des substances contractant le muscle artériel. Ce phénomène forme un thrombus qui obstrue l'artère et freine l'irrigation de l'organe. C'est l'ischémie aiguë thrombotique, complication la plus fréquente de l'athérosclérose. Le thrombus peut se détacher et former un embole capable d'obturer d'autres artères, provoquant ainsi une ischémie par embolie.

c- L'infarctus

L'infarctus est défini par la mort brutale et massive de cellules suite à un manque d'oxygène. L'infarctus du myocarde survient généralement lors de l'occlusion aiguë d'une artère coronaire consécutive à une thrombose au niveau d'une sténose athéroscléreuse.

III- Rôle de la calcification et de la sénescence dans l'athérosclérose

1- Calcification de la paroi artérielle

A- Définition et localisation de la calcification artérielle

La calcification vasculaire est définie comme un dépôt inapproprié et pathologique de minéral sous forme de sels de calcium et de phosphate dans les tissus vasculaires. Au 19^{ème} siècle, le pathologiste Rudolph Virchow a le premier reconnu son rôle dans la pathologie des maladies cardiovasculaires. Cependant, il la considérait comme un phénomène dégénératif et passif. (Virchow 1989) Il est maintenant reconnu que la calcification est un processus complexe, actif et finement régulé avec des modifications intracellulaires impliquant la différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires en cellules de phénotype ostéogénique.

La calcification artérielle a lieu lors du vieillissement physiologique et est accélérée lors de certaines maladies dont le diabète, les maladies cardiovasculaires, l'insuffisance rénale chronique et certaines maladies génétiques. (Leopold 2013) L'âge est la cause majeure de la calcification vasculaire et, entre 20 et 90 ans, son incidence est augmentée de 30%. (Allison et al. 2004)

Le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite entre les cellules est la phase minérale principale formée dans les artères calcifiées humaines, (Ewence et al. 2008, Schlieper et al. 2010) ainsi que dans les os, l'émail dentaire et la dentine. Dans les os, les ostéoblastes sécrètent une matrice organique appelée tissu ostéoïde, formée de collagène non rigide, sur lequel les cristaux d'hydroxyapatite se déposent, entraînant sa rigidification. (Chen et al. 2008) Cette structure commune aux os et aux vaisseaux suggère que la calcification vasculaire est un processus contrôlé par des cellules qui ont un phénotype proche des ostéoblastes et des chondrocytes et qui sont impliquées dans la formation de ces cristaux d'apatite.

La calcification a lieu dans deux aires de la paroi artérielle, l'intima et la média. Au niveau de l'intima, la calcification est associée à une athérosclérose avec une obstruction luminale. (Giachelli 2004) Au niveau de la média, la calcification est, majoritairement, secondaire au diabète (Lehto et al. 1996) ou à l'insuffisance rénale chronique (Gross et al. 2007) et n'est généralement pas associée à une obstruction luminale.

B- Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la calcification

Le dépôt pathologique minéral dans la paroi artérielle est un processus actif dont l'origine est multifactorielle. (Figure 7)

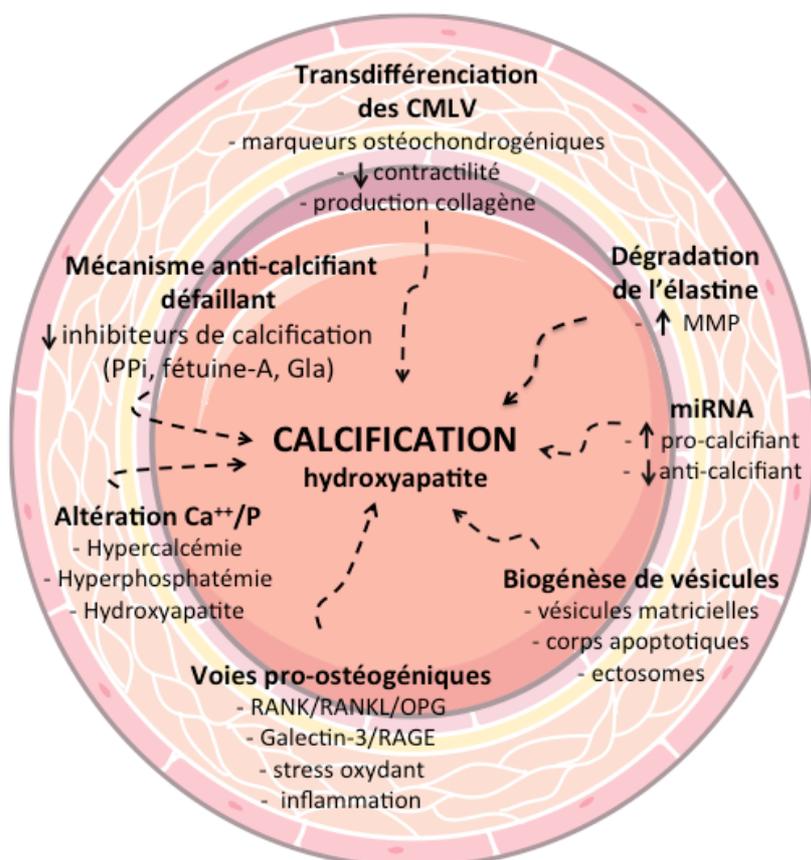


Figure 7 : Mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la calcification artérielle lors de l'athérosclérose

a- Calcium, phosphate et cristaux d'hydroxyapatite

- Le calcium

Bien que stocké en premier lieu dans les os et les dents, le calcium s'accumule dans plusieurs organes tels que la rate, le foie, les reins, et le système circulatoire où il se dépose dans l'intima et la média artérielle et peut, éventuellement, contribuer aux remaniements athérosclérotiques obstructifs.

L'augmentation de la concentration sérique de calcium favorise la différenciation ostéogénique des CMLV de la paroi vasculaire. Kapustin et al. ont montré que la perturbation de l'homéostasie du calcium intracellulaire stimule les CMLV à relarguer des vésicules matricielles, entraînant une diminution de l'inhibiteur de la minéralisation matricielle, la protéine Gla, une augmentation de l'activité de la métalloprotéinase (MMP)-2 et stimulant les processus de mort cellulaire avec libération de corps apoptotiques. (Kapustin et al. 2011) Ces phénomènes potentialisent le processus de calcification. (Shanahan et al. 2011)

- Le phosphate et les transporteurs phosphate sodium-dépendants

La culture des CMLV dans un milieu riche en phosphate augmente de manière dose-dépendante la calcification et l'expression des marqueurs cellulaires de la formation osseuse et de la transdifférenciation. (Giachelli 2009, Shobeiri et al. 2014) L'hyperphosphatémie représente donc un facteur de risque dans la calcification vasculaire qui peut impliquer les transporteurs de phosphate-sodium dépendants. (Li et al. 2007) Les transporteurs de type III, Pit-1 et Pit-2, sont exprimés de façon ubiquitaire dans les ostéoblastes et les CMLV et participent à la calcification pathologique en étant impliqués dans l'homéostasie locale et intracellulaire du phosphate. (Werner et al. 1998, Takeda et al. 1999)

- Les cristaux d'hydroxyapatite

Après endocytose par les cellules vasculaires, les cristaux d'hydroxyapatite induisent leur apoptose, contribuant ainsi à la calcification de la matrice. (Ewence et al. 2008) De plus, des études *in vitro* dans les cellules musculaires lisses d'aorte murine ont montré que les nanocristaux activent le programme ostéochondrogénique en augmentant l'expression des gènes ostéochondrogéniques. (Sage et al. 2011) Cependant, ce mécanisme reste encore à éclaircir. Une hypothèse est que l'internalisation, en augmentant la concentration ionique du phosphate et du calcium intracellulaire, induit une acidification des cellules et module l'expression de gènes. Le passage des nanocristaux, en rendant la membrane plus perméable,

peut aussi entraîner l'entrée d'autres molécules du milieu extracellulaire qui vont aussi modifier l'expression de gènes. (Sun et al. 2003)

b- Cellules ostéochondrogéniques exprimant des marqueurs spécifiques

De façon concomitante au relargage des vésicules, les CMLV subissent une transdifférenciation en cellules ostéochondrogéniques. (Figure 8) Cette modification phénotypique est caractérisée par une expression progressive de marqueurs ostéochondrogéniques dont l'ostéocalcine et l'alkaline phosphatase (ALP) et de facteurs de transcription ostéochondrogéniques dont le Runt-related transcription factor 2 (Runx2). (Iyemere et al. 2006) Simultanément, ces cellules perdent leurs propriétés contractiles comme le montre la diminution d'expression du marqueur de CMLV, l' α -smooth muscle actin (α -SMA) et produisent une matrice de collagène. Cette transition phénotypique apparaît comme une étape essentielle dans la mise en place d'une calcification pathologique. (Lau et al. 2011)

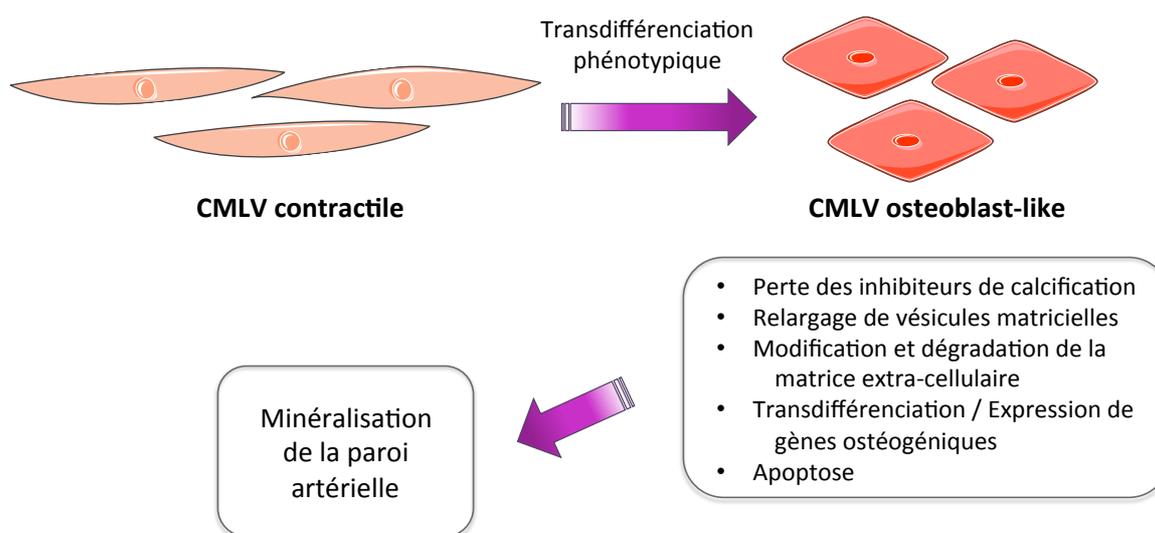


Figure 8 : Conséquences phénotypiques de la transdifférenciation ostéoblastique des CMLV

- L'ostéocalcine

L'ostéocalcine est une hormone protéique, marqueur de l'ostéoblaste mature, d'expression tardive dans la séquence de différenciation ostéoblastique des CMLV. Cette protéine régule le couplage entre la résorption et la formation osseuse. (Kartsogiannis et al. 2008)

- La phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (ALP) est une protéine enzymatique ancrée à la membrane plasmique des ostéoblastes et des chondrocytes. L'ALP hydrolyse le pyrophosphate (un inhibiteur de la

formation d'hydroxyapatite) en phosphate, inducteur de minéralisation. (Orimo 2010) Plus les cellules osseuses progressent vers la phase de minéralisation, plus elles expriment cette protéine. (Kartsogiannis et al. 2008)

- Runt-related transcription factor 2

Runt-related transcription factor 2 (Runx2 ou Cbfa1) est un facteur de transcription régulant l'expression de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire ainsi que la différenciation physiologique des chondrocytes et des ostéoblastes. (Komori 2010) Ce facteur a un rôle clé dans le changement phénotypique des CMLV car un défaut de Runx2 empêche le changement phénotypique et la minéralisation de ces cellules. (Sun et al. 2012)

- Bone morphogenic proteins

Les protéines Bone morphogenic proteins (BMP) ont une activité soit ostéoblastique (comme BMP2 ou BMP4), soit anti-ostéoblastique (BMP7). (Massague et al. 2000) BMP2, supposé être le BMP pro-ostéoblastique le plus important, peut être exprimé par plusieurs types cellulaires de la paroi artérielle et son expression est stimulée par le stress oxydant, la présence de lipides oxydés et les turbulences hémodynamiques. (Cola et al. 2004)

Les différents marqueurs ostéochondrogéniques décrits plus hauts permettent de mettre en évidence la présence de cellules de type ostéochondrogénique dans la paroi vasculaire. La majorité de ces cellules provient d'un changement phénotypique des cellules musculaires lisses vasculaires. Toutefois, leur origine dans les artères peut être multiple. En utilisant une cartographie du lignage cellulaire chez des souris, le groupe de Giachelli (Speer et al. 2009) a montré que 97% des cellules de type chondrocyte associées à une calcification médiale aortique proviennent d'une transdifférenciation de cellules musculaires lisses vasculaires médiales *in situ*. Cependant, la présence de cellules positives pour Sox9, un marqueur chondrocytaire, n'exprimant pas l' α -SMA a été rapportée, suggérant l'existence d'autres types de cellules à l'origine des cellules ostéochondrogéniques dans les vaisseaux calcifiés. Des péricytes présents dans l'adventice sont, par exemple, capables de se différencier en ostéoblastes et chondrocytes (Doherty et al. 1998, Farrington-Rock et al. 2004) et seraient impliqués dans la calcification vasculaire. (Canfield et al. 2000)

c- Relargage de vésicules matricielles

Dans les conditions physiologiques, les CMLV humaines *in vitro* relarguent continuellement des vésicules matricielles depuis la membrane plasmique. Une exposition des cellules au calcium et au phosphate stimule le relargage de ces vésicules. Les composants et les activités des vésicules matricielles vont être modifiés lorsqu'elles seront exposées à des conditions pro-calcifiantes, notamment l'expression de la phosphatase alcaline et l'augmentation du calcium, ce qui augmente fortement la capacité de ces vésicules à calcifier le collagène. En effet les vésicules peuvent concentrer le calcium et le phosphate afin de permettre la nucléation d'hydroxyapatite et agissent donc comme premier nid de minéralisation.

Plus récemment, New et al. ont démontré que les macrophages relâchent aussi des vésicules matricielles facilitant la nucléation d'hydroxyapatite. (New et al. 2013)

De plus, d'autres types de vésicules extracellulaires dont les ectosomes ou les corps apoptotiques peuvent aussi participer à cette calcification.

d- Inhibiteurs de la calcification

Des mécanismes de défense naturelle contre la calcification vasculaire existent dans la paroi des vaisseaux tels que des inhibiteurs circulants et locaux. Les altérations du taux de calcium circulant sont accompagnées d'une diminution significative des inhibiteurs de calcification endogènes des CMLV (comme la protéine matricielle Gla) et des inhibiteurs circulants (comme la fétuine-A).

- La protéine Gla

La protéine Gla de la matrice (MGP) est exprimée dans le cartilage, les os, les reins, les poumons, le cœur et les cellules musculaires lisses et est fortement concentrée dans les vésicules dérivées des CMLV. En liant les ions calcium, MGP diminue le taux de calcium circulant et bloque la croissance des cristaux de calcium. (Price et al. 1983) La liaison du calcium à la protéine MGP est inhibée par le phosphate. (Roy et al. 2002)

- La fétuine-A

La fétuine-A synthétisée dans le foie, est présente en forte quantité dans la circulation, où elle se lie aux ions calcium et aux hydroxyapatites. Chez la souris une déficience en fétuine-A augmente la calcification des tissus mous et dans les CMLV bovines cultivées en milieu calcifiant l'addition de fétuine-A inhibe la calcification d'une façon dose-dépendante. (El-Abadi et al. 2007)

- Le pyrophosphate inorganique

Le pyrophosphate inorganique (PPi), produit par les CMLV, est un inhibiteur naturel de la formation d'hydroxyapatite. Des études cliniques ont permis de montrer que l'étidronate, un analogue pharmacologique du pyrophosphate, prévient la calcification artérielle chez les sujets hémodialysés, confirmant ainsi le rôle du PPi dans la mise en place de la calcification artérielle. (Hashiba et al. 2004)

e- Inflammation

De manière intéressante, l'étude de Aikawa et al. a montré que l'infiltration macrophagique et l'inflammation précèdent la conversion ostéogénique des CMLV ainsi que le relargage des vésicules nécessaires à la génération des premiers nids de calcification. Cette étude met en lumière, pour la première fois *in vivo*, que, lors de l'athérosclérose, l'inflammation est un facteur initiateur de la calcification très important. (Aikawa et al. 2007)

Une étude par microscopie électronique a montré que les macrophages sont attirés sur les sites d'accumulation lipidique où, via la sécrétion de cytokines, ils induisent la mort des CMLV et leur transition phénotypique vers un phénotype ostéogénique. En conséquence les produits libérés lors de l'inflammation et les cytokines sécrétées par les macrophages accélèrent la différenciation ostéogénique et la calcification. (Parhami et al. 2002, Shioi et al. 2002, Tintut et al. 2002)

Il est reconnu à l'heure actuelle que l'état d'activation et les fonctions des macrophages sont profondément influencés par la présence de cytokines dans l'espace environnant. Les cytokines de type Th1 (IFN γ , IL-1 β) induisent un état d'activation dit «classique» ou M1. En revanche, les cytokines Th2 (IL-4, IL-13) induisent une activation «alternative» ou M2. Les macrophages M1 produisent principalement des cytokines pro-inflammatoires. Les macrophages M2, quant à eux, produisent des facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10, le TGF β qui ont des capacités de réparation et de remodelage du tissu endommagé.

Or, les cellules inflammatoires peuvent aussi jouer un rôle dans le processus de calcification en favorisant la conversion de la réponse immune des lymphocytes T et des macrophages de type Th1/M1 en celle de cellules de phénotype Th2/M2. (Hansson et al. 2006) Cette réponse adaptative est caractérisée par l'induction de la fibrose et par l'augmentation de la synthèse de collagène et de MMPs. (Duffield et al. 2013, Lech et al. 2013) Ainsi les macrophages peuvent être impliqués, non seulement dans le développement de la fibrose, mais aussi dans la

différenciation ostéogénique des CMLV, comme dans le tissu osseux, où des cellules « macrophage-like » sont trouvées dans les sites de remodelage.

f- Le stress oxydant

Un stress oxydant exacerbé stimule l'expression de Runx2 et de BMP2 au niveau artériel et promeut donc la transdifférenciation des CMLV et la calcification de la paroi. (Cottart et al. 2009)

Dans un modèle de rats en insuffisance rénale chronique, l'utilisation d'un antioxydant inhibe la calcification vasculaire en diminuant la transdifférenciation ostéogénique des CMLV. (Yamada et al. 2012) De plus, Byon et al. ont montré que le H₂O₂, un puissant oxydant, induit un changement phénotypique des CMLV vers un phénotype ostéogénique associé à une augmentation de l'expression de Runx2 et une calcification des cellules. (Byon et al. 2008) Enfin, il a été montré que la production d'oxydants prédomine autour des foyers calcifiés et induit la progression de la calcification des valves aortiques. (Lieberman et al. 2008)

Le stress oxydant contribue donc de façon importante au développement de la calcification artérielle.

g- Matrice extracellulaire : élastine et métalloprotéases

Dans des conditions pathologiques, une modification de la balance entre les métalloprotéases de la matrice (MMP) et les inhibiteurs de MMP pourrait être responsable d'une activité exacerbée des MMP, qui sont capables de dégrader l'élastine, la protéine la plus abondante dans la paroi aortique. (Pai et al. 2010, Pai et al. 2011) Cette dégradation induit l'expression de marqueurs de différenciation ostéoblastiques et favorise la calcification des CMLV. (Hosaka et al. 2009) La dégradation pathologique de l'élastine conduisant à la génération de peptides d'élastine peut donc participer à l'initiation ou à l'accélération de la calcification.

h- La galectine-3 et RAGE

La signalisation Wnt induit la prolifération et la différenciation ostéoblastique, par activation de la β -caténine qui va stimuler l'expression génique de Runx2. (Gaur et al. 2005) L'émerine et les lamines de type A, deux protéines de la membrane nucléaire interne, régulent cette voie en modulant la distribution nucléocytoplasmique et l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. (Tilgner et al. 2009)

La galectine-3 et RAGE, deux récepteurs de produits de glycation avancée exprimés notamment par les monocytes-macrophages, cellules endothéliales et CMLV, interviennent

dans le processus de calcification. (Boulanger et al. 2002) La galectine-3 est essentielle pour une transdifférenciation complète des CMLV en cellules « osteoblast-like » en modulant directement la signalisation Wnt- β -caténine, entraînant la formation de larges plaques de calcification lamellaires, en couches. Au contraire, RAGE favorise le dépôt d'une calcification granulaire, « à pois », en induisant et maintenant l'inflammation et en empêchant l'effet ostéoblastogénique de la galectine-3, probablement par inhibition de l'activation de la β -caténine. (Li et al. 2012, Menini et al. 2013)

i- Le système RANK/RANKL/OPG

Le récepteur RANK (receptor activator of NF- κ B), exprimé par les cellules ostéoclastiques, en se liant à RANKL (RANK ligand), exprimé par les cellules ostéoblastiques, stimule la différenciation et l'activation des ostéoclastes. L'ostéoprotégerine (OPG), en se liant à RANKL, bloque son interaction avec le récepteur RANK et inhibe la résorption osseuse.

L'OPG est exprimée dans les cellules musculaires lisses d'artère coronaires. Dans les vaisseaux, l'OPG favorise donc la différenciation ostéogénique en prévenant la stimulation de RANK, mimant le système mis en place dans le squelette. (Hsu et al. 1999) Cependant, le lien entre l'augmentation de l'OPG et les atteintes coronaires semble discuté. En effet, il a récemment été mis en lumière que l'OPG contenu dans les plaques carotidiennes est associé à leur stabilité clinique et histologique. (Davaine et al. 2014) Or il semble, au contraire, qu'une élévation plasmatique d'OPG soit associée à l'insuffisance coronarienne et à l'augmentation de la mortalité cardiovasculaire. (Browner et al. 2001)

j- Les micro-ARN

Des études récentes montrent que les microARN (miARN) jouent un rôle essentiel dans la calcification vasculaire en inhibant ou stimulant différentes phases de ce processus. En effet, miR-135a, miR-712, miR-714 et miR-762 modulent la charge de calcium intracellulaire en diminuant l'expression des protéines d'efflux de calcium, ce qui augmente donc leur potentiel de calcification. A l'opposé, miR-30b, miR-30c, miR-133a, et miR-204 inhibent la transdifférenciation des CMLV en diminuant l'expression de Runx2. (Paloian et al. 2014)

C- La calcification : élément protecteur ou délétère de la stabilité d'une plaque ?

Des données indiquent que toutes les plaques d'athérome calcifiées n'ont pas le même risque de rupture. Leurs caractéristiques morphologiques et cliniques jouent un rôle important dans leur instabilité. En effet, les calcifications irrégulières ou granulaires (dites « microcalcifications »), associées à une dégradation importante de la matrice, à une apoptose massive des CMLV et à des infiltrats inflammatoires de macrophages sont plus instables que les calcifications diffuses et homogènes (dites « macrocalcifications ») où l'inflammation est moins sévère et les CMLV toujours présentes. (Nadra et al. 2005, Shanahan 2007) (Figure 9)

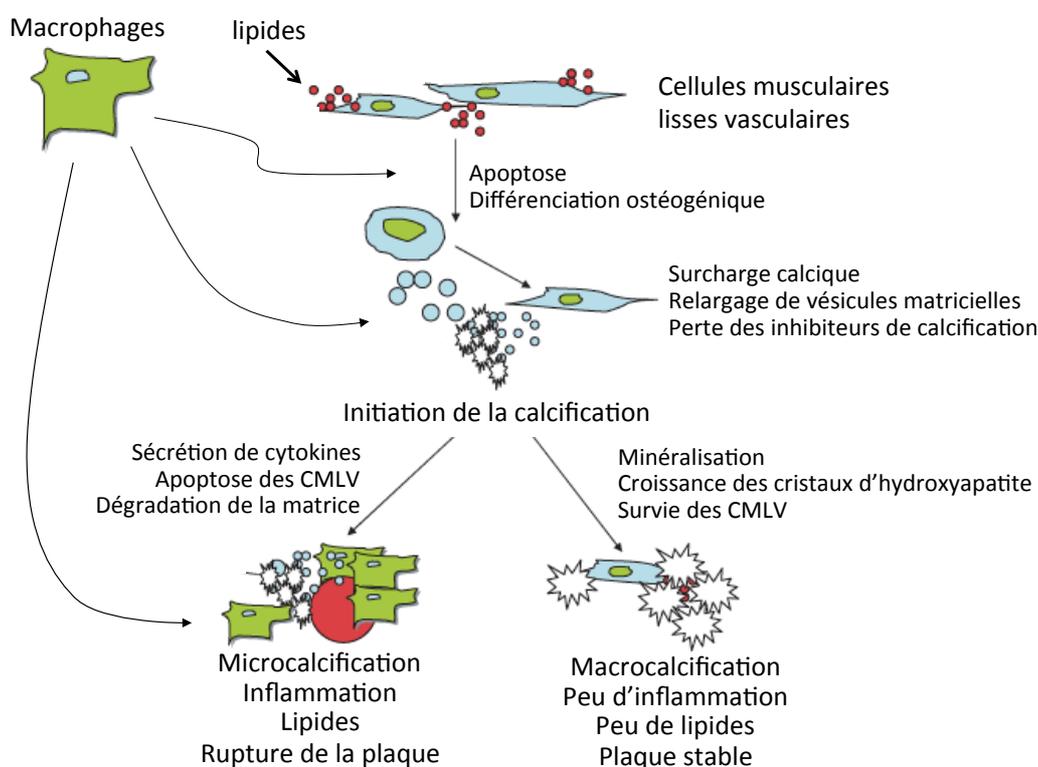


Figure 9 : Mécanismes impliqués dans la calcification athérosclérotique et facteurs modulant la stabilité de la plaque

D'après (Shanahan 2007)

En vert : macrophages ; en rouge : lipides ; en bleu : CMLV ; en étoile blanche : calcification

Ces différences expliquent probablement que le rôle globalement protecteur ou, au contraire délétère, des calcifications soit toujours discuté. En effet, certaines calcifications associées à une inhibition des processus inflammatoires et à une persistance des CMLV au sein de la plaque jouent probablement un rôle majeur pour maintenir l'intégrité de la paroi artérielle.

De même, les vésicules matricielles produites par les CMLV ont d'abord été décrites comme étant protectrices contre la surcharge calcique, et capables d'éviter aux CMLV la mort cellulaire par apoptose. (Fleckenstein-Grun et al. 1992, Reynolds et al. 2004) En accord, ces vésicules

sont riches en inhibiteurs de calcification, dont les protéines Gla et fétuine-A. (Proudfoot et al. 2002, Reynolds et al. 2004, Reynolds et al. 2005)

Néanmoins, il est maintenant reconnu que la calcification vasculaire est un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires et la mortalité. (London et al. 2003) De surcroît, les études cliniques ont montré qu'une calcification discontinue dans la plaque est plus prédictive d'un événement cardiovasculaire qu'une calcification étendue. (Ehara et al. 2004) Au contraire, les plaques avec une calcification avancée sont potentiellement plus bénignes car elles ne sont plus inflammatoires. (Figure 9)

2- La sénescence cellulaire

A- La sénescence cellulaire : généralités

a- Définition

La sénescence cellulaire est définie par un arrêt irréversible du cycle en phase G1, contrairement à la quiescence, qui est un arrêt réversible du cycle cellulaire en phase G0.

Elle a été originellement décrite par L. Hayflick dans les années 60 qui a découvert que les fibroblastes humains en culture cessaient de proliférer après un nombre précis de divisions. (Hayflick 1965) Nous savons aujourd'hui que le raccourcissement des télomères, structures nucléoprotéiques protégeant les extrémités des chromosomes, qui a lieu après chaque cycle de division contribue fortement à ce nombre défini de cycles de réplication. (Harley et al. 1990) En effet, le mécanisme de réplication de l'ADN des cellules eucaryotes ne permet pas de répliquer les nucléotides des extrémités des chromosomes ce qui entraîne leur érosion progressive. (Harley et al. 1990) Ainsi, la cellule atteint une limite, appelée la limite de Hayflick, où elle cesse de se diviser après un certain nombre de cycles de division défini pour chaque type cellulaire (environ cinquante pour les fibroblastes humains normaux en culture). (Hayflick 1965) (Figure 10)

Arrivée à la limite de Hayflick, la cellule s'arrête, de façon irréversible, en phase G1 du cycle cellulaire. Les cellules sénescents ne peuvent pas réintégrer le cycle cellulaire, (Cristofalo et al. 1993) même si elles restent métaboliquement actives. (Matsumura et al. 1979) Cet état de la cellule est appelé sénescence répllicative, du fait qu'elle survient après une série de cycles de réplication. (Campisi et al. 2007) Le nombre de cycles cellulaires d'une cellule en culture diminue avec l'âge du donneur.

En dehors du raccourcissement des télomères, d'autres stress peuvent entraîner l'entrée de la cellule en sénescence, comme le stress oxydatif médié par les dérivés réactifs de l'oxygène (ERO), les dommages à l'ADN, l'activation d'oncogènes ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur. (Campisi et al. 2007) (Figure 10) On parle alors de sénescence prématurée ou de sénescence induite par le stress (SIPS) puisqu'elle survient avant que la cellule n'ait atteint sa sénescence répliative.

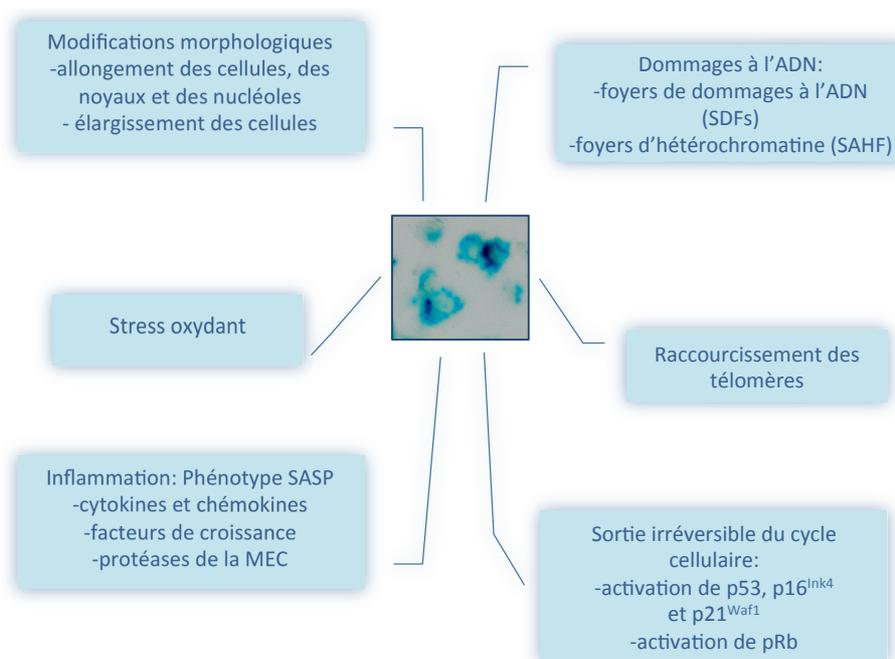


Figure 10 : Caractéristiques morphologiques et facteurs de risque principaux de la sénescence cellulaire

Observation en microscopie à contraste de phase de cellules endothéliales sénescents à passage 5, issues d'un donneur âgé de 89 ans, marquées par β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β galactosidase, coloration bleue)

b- Morphologie et mise en évidence des cellules sénescents

Les cellules sénescents se caractérisent par une morphologie allongée et aplatie, ainsi qu'un allongement des noyaux et des nucléoles. De plus, les cellules sénescents sont caractérisées par une augmentation de l'activité de la β -galactosidase extralysosomiale, ce qui entraîne, en présence de X-galactose et au pH intracytoplasmique (pH 6,0), la formation d'un précipité bleu. (Dimri et al. 1995) Le terme «activité β -galactosidase associée à la sénescence» (SA- β -gal, pour senescence-associated- β -galactosidase activity) est utilisé pour faire référence à cette propriété des cellules sénescents.

B- Régulation du cycle cellulaire et sénescence

a- Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est une succession de quatre phases permettant la division cellulaire. La première est la phase G1 qui sert de préparation à la réplication de l'ADN. La cellule est alors sensible aux signaux mitogéniques qui permettent d'activer l'étape suivante, la S, phase de la réplication de l'ADN. Puis, la phase G2 prépare les cellules à la mitose qui a lieu, ensuite, en phase M, où le matériel génétique est réparti entre les deux cellules filles. En parallèle de la phase G1, les cellules peuvent également être à un stade quiescent de non-division G0. Pour réintégrer le cycle, elles doivent être activées par des signaux mitogéniques. (Coller 2007)

La transition entre les différentes phases du cycle cellulaire se fait sous le contrôle de complexes cycline/kinases dépendantes des cyclines (CDK). L'activation de la phase S est dépendante de la libération du facteur de transcription E2F, ce dernier étant séquestré en phase G1 par la protéine pRb. En réponse aux signaux mitogéniques, les complexes cycline D/CDK4-6 et cycline E/CDK2, en phosphorylant pRb, permettent la libération d'E2F et donc le passage de la phase G1 à la phase S. (Coller 2007) (Figure 11)

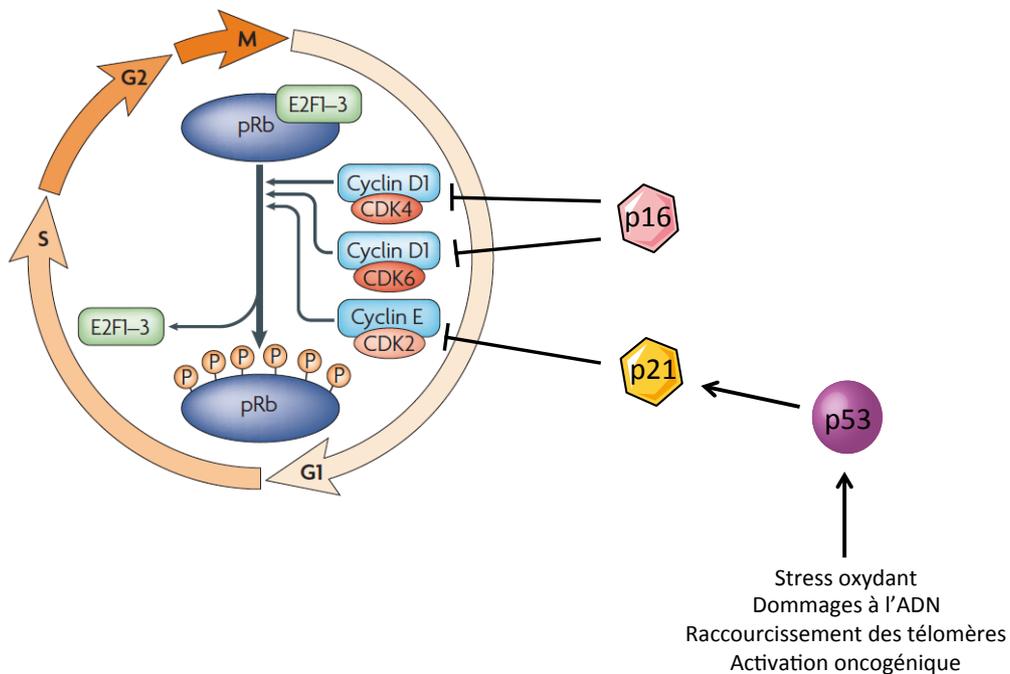


Figure 11 : Sénescence et arrêt du cycle cellulaire par les voies p53/p21 et p16
 CDK : cyclin-dépendant kinase ; pRb : protéine du rétinoblastome
 D'après (Coller 2007)

b- Arrêt du cycle cellulaire lors de la sénescence

Les CDK ont pour fonction d'assurer le bon déroulement de la réplication de l'ADN et de la mitose, mais aussi de maintenir la protéine de rétinoblastome (pRb) dans un état inactif (phosphorylé). Leur activité kinase dépend non seulement de leur association aux cyclines, mais aussi de régulations par phosphorylation/déphosphorylation qui modulent leur localisation subcellulaire, et de la présence d'inhibiteurs ou d'activateurs. Lors de la sénescence, une inhibition des kinases cycline-dépendantes régulant la transition G2/S a lieu, essentiellement par deux voies de signalisation, la voie p53-p21 et la voie p16. (Figure 11) Les protéines p16 et p21 sont des CDKI (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor). La protéine p21 en se liant aux complexes actifs CDK2/cycline E, s'oppose à l'activité CDK. La protéine p16, quant à elle, inhibe l'activité kinase des CDK4 et 6 en empêchant leur association avec la cycline D1. p21 et p16 induisent une hypophosphorylation de pRb, et donc une répression des gènes cible de E2F, pérennisée par l'accumulation de foyers d'hétérochromatine, les SAHF (sénescence associée à des foyers d'hétérochromatine), autour des régions promotrices des gènes cibles d'E2F. (Narita et al. 2003, Lanigan et al. 2011)

L'inactivation de p53-p21 et p16 est souvent nécessaire pour abolir la sénescence cellulaire, ces deux voies agissent donc en parallèle. (Wei et al. 2003)

- La voie p53-p21

Le raccourcissement des télomères, le stress oxydant, un stress oncogénique et des dommages à l'ADN induisent une réponse aux dommages à l'ADN (DDR pour DNA damage response), qui passe par l'activation des sérine/thréonine kinases ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM and Rad-3 related) et Checkpoint kinases (Chk1 et 2), puis par l'activation par phosphorylation de p53. (d'Adda di Fagagna et al. 2003) Le gène p21^{CIP1/WAF1} est un gène cible de p53. En inhibant l'activité des complexes cycline-CDK, p21 entraîne la séquestration d'E2F par pRb et donc l'arrêt du cycle cellulaire. (Stein et al. 1995, Polager et al. 2009)

Jerry Shay et Woodring Wright ont mis en évidence, dès 1991, le rôle essentiel de l'activation de p53 et de pRb hypophosphorylée dans la sénescence. (Shay et al. 1991) Ces deux suppresseurs de tumeur, dont les voies de signalisation sont altérées dans la quasi-totalité des cellules cancéreuses, sont des acteurs clés de la réponse au stress génotoxique et de l'arrêt de la prolifération cellulaire. (Polager et al. 2009)

- La voie p16

Un autre acteur important dans l'activation de pRb lors de la sénescence est p16^{Ink4A} (p16), un autre inhibiteur de kinases CDK, codé par le locus INK4/ARF (situé sur le chromosome 9 en 9p21). (Figure 11) Même si la contribution de p16^{Ink4A} à l'arrêt du cycle cellulaire et les mécanismes de son activation au cours de la sénescence ne sont pas complètement établis, p16^{Ink4A} est considéré comme un marqueur de la sénescence *in vitro* et *in vivo*. (Herbig et al. 2004, Krishnamurthy et al. 2004, Baker et al. 2011) Un mécanisme possible est la réduction de l'expression des répresseurs du locus INK4/ARF, tels que BMI1 et CBX7. En accord avec cette hypothèse, une surexpression de BMI1 ou de CBX7 augmente la durée de vie répllicative des fibroblastes humains et murins. (Campisi et al. 2007)

C- Sénescence prématurée induite par un stress (SIPS)

Plusieurs types de dommages cellulaires contribuent à la SIPS. Nous allons ci-dessous nous intéresser au stress oxydant, à l'inflammation et aux dommages à l'ADN.

a- Stress oxydant et sénescence

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites par la cellule où elles participent à de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération cellulaire, la différenciation et la migration cellulaire ou l'expression génique. (Bartz et al. 2010) Ce sont des molécules chimiquement réactives produites par la perte d'électron lors de la réduction de l'O₂. (Figure 12) Il existe plusieurs sources d'ERO dont l'anion superoxyde O₂⁻ qui est produit au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale et au niveau cytoplasmique par la NADPH-oxydase. L'anion superoxyde, instable et toxique, va être dismuté en peroxyde d'hydrogène H₂O₂ par des superoxydes dismutases (SOD). Il existe plusieurs enzymes antioxydantes dans la cellule, la MnSOD (manganèse SOD) pour la mitochondrie, les Cu et ZnSOD dans le cytosol et en extracellulaire. Moins toxique que l'O₂⁻, le H₂O₂ diffuse facilement à travers les membranes et est dégradé en H₂O par les catalases des peroxysomes (ou peroxydases). Si il n'est pas dégradé en H₂O, il est transformé en radical hydroxyl OH⁻ qui lui aussi dégrade diverses molécules comme les acides nucléiques, les protéines et lipides. (Labunskyy et al. 2013)

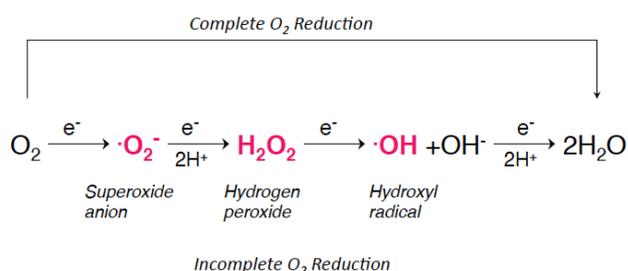


Figure 12 : Réduction de l'oxygène et production d'espèces réactives de l'oxygène
D'après (Bartz et al. 2010)

Il existe des sources endogènes et exogènes des ERO. (Figure 13) Dans la cellule, les principales sources d'ERO sont la mitochondrie et les NADPH oxydases cytosoliques. (Kowaltowski et al. 2009)

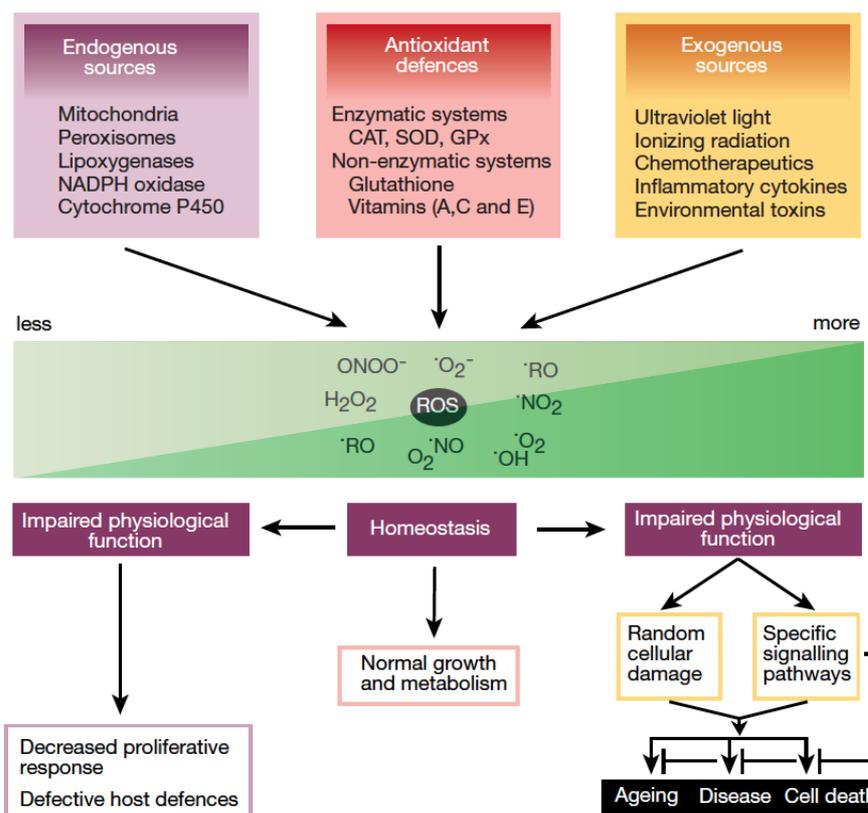


Figure 13 : Sources et réponses cellulaires aux espèces réactives de l'oxygène. D'après (Finkel et al. 2000)

Une accumulation excessive des ERO, ou stress oxydant, entraîne des dommages en oxydant diverses macromolécules et en altérant l'ADN cellulaire et mitochondrial. (Labunsky et al. 2013) Les cellules jeunes sont capables de se défendre contre un stress oxydant, cependant, dans les cellules âgées, les systèmes de défense anti-oxydante sont moins efficaces, conduisant à une accumulation de protéines oxydées. (Jung et al. 2009) (Figure 13)

b- Inflammation et sénescence

Les cellules sénescents sécrètent des cytokines et chémokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, MCP-2), des facteurs de croissance (VEGF, EGF, bFGF) ainsi que des protéases de la matrice extracellulaire. Ce sécrétome spécifique, appelé SASP (senescence-associated secretory phenotype) joue un rôle important dans la réponse inflammatoire, le remodelage de la matrice extracellulaire et dans le maintien de l'état sénescents et entraîne donc une modification de l'environnement cellulaire qui peut influencer le comportement des cellules avoisinantes. (Bischof et al. 2009, Rodier et al. 2011) Le sécrétome des cellules sénescents peut corriger les dysfonctions et dommages cellulaires et donc participer à la réparation tissulaire.

Cependant, le SASP peut aussi avoir des conséquences néfastes en induisant un environnement pro-sénescent et un arrêt de la croissance cellulaire. (Figure 10) De plus, en stimulant la réponse inflammatoire, il pourrait dans certains cas induire la dégénérescence cellulaire en conférant un potentiel tumorigène au microenvironnement tissulaire. (Acosta et al. 2008, Kuilman et al. 2008)

En effet, la cellule en arrêt de croissance va sécréter de l'IL-1 α qui va induire l'activation de NF- κ B. (Orjalo et al. 2009) La voie de signalisation de NF- κ B est un des médiateurs clés du vieillissement. Ce facteur de transcription, activé par les stress génotoxique, oxydatif et inflammatoire, induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation et la réponse cellulaire au stress, codant notamment pour des cytokines et des métalloprotéinases, ce qui conduit au renforcement du stress oxydant et des dysfonctions mitochondriales. (Mariappan et al. 2010) L'expression de ce facteur de transcription va donc entraîner une activation du SASP avec une sénescence et un arrêt de la croissance importants. (Figure 14) Au cours du vieillissement, l'activité transcriptionnelle de NF- κ B est augmentée dans de nombreux tissus et est associée à de nombreuses maladies liées à l'âge. (Tilstra et al. 2011)

Plusieurs voies cellulaires, interconnectées à la signalisation de NF- κ B, sont impliquées dans la régulation de la longévité, dont les voies insuline/IGF-1, mTOR, SIRT et FOXO, ainsi que la restriction calorique. (Tilstra et al. 2011) (Figure 14)

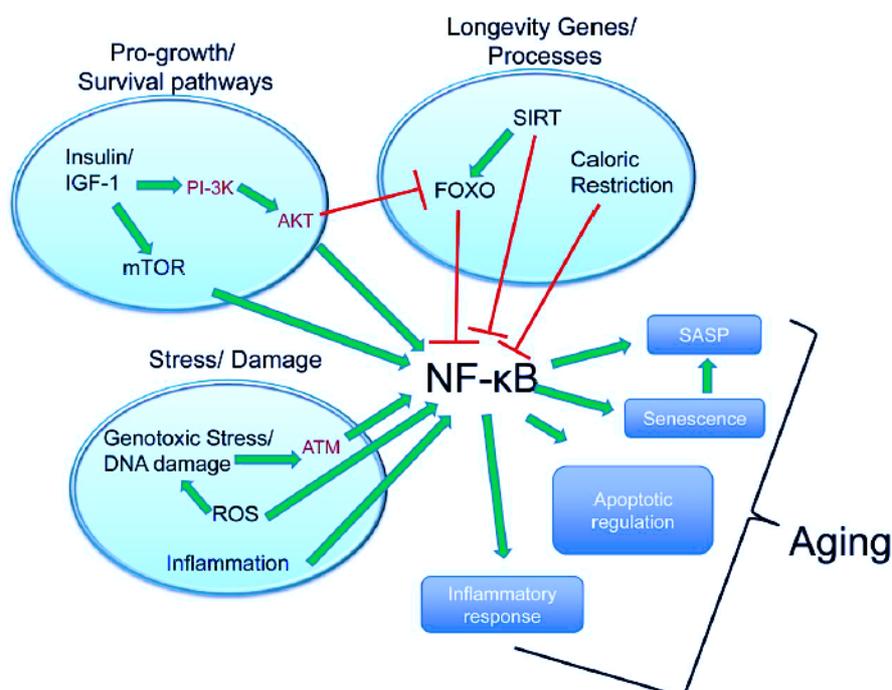


Figure 14 : Voies de signalisation induisant l'expression de NF- κ B et ses conséquences cellulaires
D'après (Tilstra et al. 2011)

IGF-1 (insulin-like growth factor-1), une hormone peptidique sécrétée par le foie en réponse à l'hormone de croissance (ou GH), active la voie PI3K/AKT (PI3K pour phosphoinositide 3-kinase), qui active NF- κ B. Le rôle de l'insuline/IGF-1 dans le vieillissement a été initialement documenté dans *C. elegans* via l'analogue Daf2, codant pour le récepteur à l'insuline. En effet, la longévité de *C. elegans* est multipliée par deux dans la souche mutée en comparaison à la souche non mutée. (Kenyon et al. 1993) En accord, dans le modèle murin muté pour le récepteur d'IGF-1, IGF-1R (insulin-like growth factor-1 receptor), il a été montré un allongement de la durée de vie (de 33% pour les femelles et de 16% pour les mâles). (Holzenberger et al. 2003)

De plus, la voie IGF-1/insuline, via AKT, active la sérine thréonine kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) qui va à son tour activer NF- κ B. Cette kinase a un rôle majeur dans le contrôle de la croissance cellulaire et de l'apoptose et est un médiateur de la réponse au stress. mTOR interagit directement avec IKK α et IKK γ , deux inhibiteurs de NF- κ B, et une suppression de mTOR par siARN diminue la liaison de NF- κ B à l'ADN. (Dan et al. 2008) Une suppression de cette voie de signalisation par la rapamycine augmente la longévité chez la souris, appuyant le rôle de mTOR dans le vieillissement. (Tilstra et al. 2011)

Enfin, la sirtuine-1 (SIRT-1), une histone déacetylase, régule la longévité via la déacétylation de FOXO et/ou par interaction directe avec NF- κ B, inhibant alors l'activité transcriptionnelle de ce facteur de transcription. SIRT-1 interagit directement avec NF- κ B, ce qui conduit à la déacétylation de la lysine 310, entraînant une diminution de la transcription associée à NF- κ B. (Yeung et al. 2004) FOXO régule I κ B, un inhibiteur de NF- κ B, conduisant à la suppression de ce dernier. (Tilstra et al. 2011) SIRT-1 peut aussi inhiber NF- κ B via TLE1, un corépresseur transcriptionnel de NF- κ B. (Ghosh et al. 2007)

La restriction calorique est connue pour améliorer la longévité et les pathologies associées à l'âge, dont le diabète, les maladies cardiovasculaires, la sarcopénie ainsi que les maladies auto-immunes, en inhibant la signalisation NF- κ B, probablement par une activation de la SIRT-1 qui va induire une diminution des ERO. (Tilstra et al. 2011)

Enfin, des dommages à l'ADN induisent l'expression de NF- κ B. Il est suggéré que l'ATM, une kinase PI3K activée en réponse à des cassures double brins de l'ADN et à une irradiation γ , active NF- κ B. (Tilstra et al. 2011)

c- Dommages à l'ADN et sénescence

Les cellules sénescents se caractérisent également par une accumulation de foyers d'ADN dégradé (SDFs, senescence associated DNA-damage foci), (Herbig et al. 2004) lesquels regroupent plusieurs protéines de la réponse aux dommages à l'ADN, telles que la kinase ATM phosphorylée en sérine 1981, le variant 27 d'histone H₂AX (H2A histone family, member X) phosphorylé (γ -H2AX) et la protéine 1 de liaison à p53 (53BP1, p53-binding protein-1). (Campisi et al. 2007) Ces foyers témoignent de l'importance de l'activation de la voie du dommage à l'ADN pour l'établissement et le maintien de la sénescence. (Figure 10)

Contrairement aux cellules quiescentes, des changements importants de la chromatine accompagnent l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence. La structure chromatinienne de certaines cellules sénescents est modifiée de façon très importante, et on observe des foyers nucléaires qui contiennent de l'hétérochromatine appelés SAHF (senescence-associated heterochromatic foci). (Narita et al. 2003) La formation de ces structures résulte du recrutement de protéines associées à l'hétérochromatine, telle la protéine de l'hétérochromatine 1 (HP1), et de modifications d'histones associées à l'hétérochromatine, comme la méthylation en lysine 9 de H3. (Campisi et al. 2007) Les SAHF joueraient un rôle essentiel dans la mise en place et le maintien de l'état sénescents. (Kuilman et al. 2010)

Cependant, les SAHF ne sont pas détectés dans tous les types de cellules en sénescence et donc, pourraient ne pas être associés à toutes les formes de sénescence. Des études montrent que leur formation serait plutôt due à un stress oncogénique et à l'induction de p16.

D- La sénescence *in vivo*

a- Sénescence et âge

Très peu de cellules sénescents sont retrouvées dans les jeunes organismes, alors que leur présence est accrue dans les organismes âgés (Campisi et al. 2007) indiquant leur accumulation lors du vieillissement cellulaire. De plus, des foyers de dommages à l'ADN associés à la sénescence (SDFs), co-localisés avec les télomères, sont retrouvés dans la majorité des cellules de sujets âgés, ce qui tend à démontrer que la sénescence répliquative a lieu aussi *in vivo*. (Campisi et al. 2007) Ainsi, l'apparition des cellules sénescents semble être intimement liée au vieillissement et aux maladies associées.

b- Rôle de la sénescence in vivo

L. Hayflick avait rapproché les notions de sénescence, de cancer et de vieillissement : notion de cancer car, pour échapper à la sénescence, les cellules doivent acquérir certaines caractéristiques des cellules cancéreuses ; notion de vieillissement car l'accumulation de cellules sénescents contribue au vieillissement global de l'organisme. (Hayflick 1965) Ces dogmes sont toujours d'actualité de nos jours mais restent très controversés.

Des cellules sénescents ont été retrouvées dans des lésions précancéreuses et dans des foyers de tumeurs bénignes mélanocytaires (naevus), (Michaloglou et al. 2005) mais elles sont généralement absentes dans les tumeurs malignes, où les voies p53 et pRb sont inactivées. (Collado et al. 2010) De ce fait, la sénescence, peut apparaître comme une barrière à la progression des cellules vers la transformation maligne. Néanmoins, les relations entre cancer et sénescence cellulaire semblent plus complexes puisque les cellules sénescents en acquérant un phénotype sécrétoire SASP peuvent favoriser la transformation tumorale. (Campisi et al. 2007) Un exemple de maladie associant vieillissement et cancer est celui du syndrome de Werner, où une mutation inactivatrice d'une hélicase impliquée dans la réparation de l'ADN conduit à un phénotype clinique associant plusieurs comorbidités liées au vieillissement (troubles trophiques cutanés, maladies cardio-vasculaires, ménopause précoce, cataracte, cheveux blancs, surdité...), mais aussi à une augmentation de la fréquence des cancers. En revanche, nous y reviendrons plus loin, dans la progéria de Hutchinson-Gilford liée à des mutations de la prélamine A, le phénotype de vieillissement accéléré ne s'accompagne habituellement pas de pathologies malignes.

Chez une personne jeune, la sénescence cellulaire empêche la prolifération de cellules endommagées, permettant une homéostasie tissulaire. Toutefois, au cours de vieillissement, un excès de sénescence se met en place, conduisant à un défaut de l'homéostasie tissulaire et à une exacerbation du phénomène de vieillissement. (Lopez-Otin et al. 2013) (Figure 15)

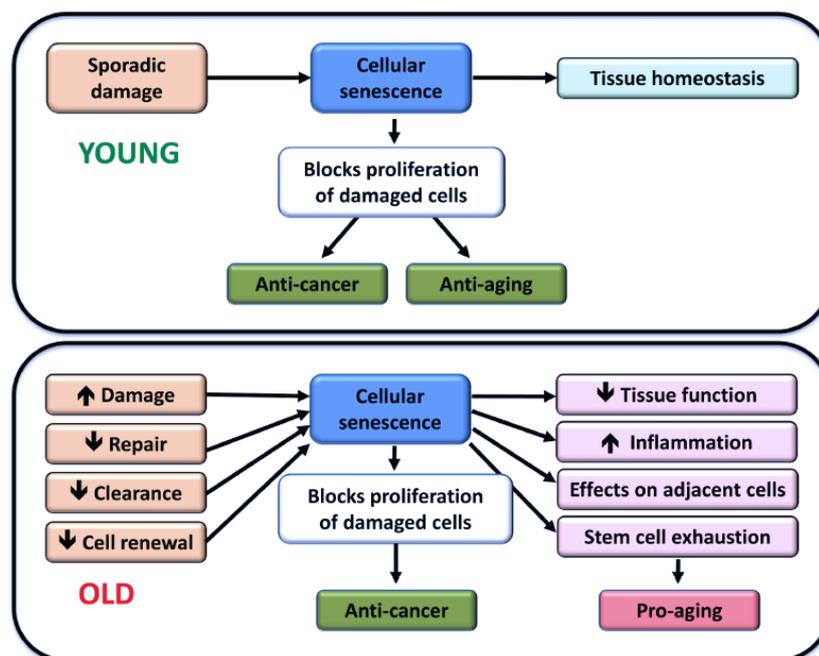


Figure 15 : Sénescence cellulaire chez une personne jeune versus une personne âgée
 D'après (Lopez-Otin et al. 2013)

Le sécrétome des cellules sénescents contribue à la dégénérescence tissulaire *via* le processus inflammatoire, menant aux pathologies liées au vieillissement comme l'arthrose et l'athérosclérose. (Rodier et al. 2009, Rodier et al. 2011)

In vivo, il existe aussi, avec l'âge, une perte des cellules souches conduisant à un défaut de renouvellement des tissus. Divers phénomènes semblent impliqués dans ce processus, notamment une modification de la niche des cellules souches lors du vieillissement avec un environnement pro-inflammatoire et oxydant ainsi que des dommages à l'ADN. Le système immunitaire, du fait de son fort taux de renouvellement est particulièrement touché, on parle d'immunosénescence. Les infections peuvent aussi participer à la perte des cellules souches immunitaires, comme l'infection par le VIH qui augmente le turn-over des cellules immunitaires, induit une inflammation chronique, et comme nous le verrons, est associée à une augmentation de la prévalence des comorbidités liées à l'âge. (Deeks et al. 2012)

c- Sénescence vasculaire et athérosclérose

Il a été mis en évidence que des cellules sénescents s'accumulent dans les tissus vasculaires des patients atteints d'athérosclérose. (Vasile et al. 2001)

Le processus inflammatoire contribue au développement de l'athérosclérose (Rodier et al. 2009, Rodier et al. 2011) par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TGF- β) par les

cellules endothéliales sénescents. Cela entraîne le recrutement des cellules immunitaires comme les macrophages qui vont alors amplifier le signal pro-inflammatoire. (Rodier et al. 2011) D'autre part, l'augmentation des radicaux libres et des dommages à l'ADN contribue à l'activation des voies de la sénescence et donc au vieillissement prématuré des cellules musculaires lisses. De plus, dans les vaisseaux, une sénescence cellulaire induit des altérations dans la structure vasculaire et une dysfonction endothéliale. (Minamino et al. 2007) Cela génère une perte de la fonction de barrière des cellules endothéliales qui est suivie par la formation progressive de la plaque d'athérome.

Ragnauth et al. ont mis en lumière un nouveau marqueur de vieillissement dans les cellules musculaires lisses vasculaires humaines, la prélamine A qui induit des défauts de mitose, une instabilité génomique et une sénescence prématurée. (Ragnauth et al. 2010) Des études antérieures avaient montré que l'accumulation de la prélamine A, en particulier farnésylée, était associée à la progeria de Hutchinson-Gilford (De Sandre-Giovannoli et al. 2003) sous une forme mutée appelée progérine, mais aussi au vieillissement physiologique, dans une forme mutée ou non. (Huang et al. 2005b, Scaffidi et al. 2008, Garg et al. 2009, Le Dour et al. 2011, Bidault et al. 2013) De plus, notre équipe a rapporté que l'accumulation de cette protéine sous forme immature farnésylée induit un stress oxydant et de l'inflammation dans plusieurs modèles cellulaires, dont des cellules endothéliales d'artère coronaire en culture. (Lefevre et al. 2010)

d- Conséquences de la sénescence cellulaire in vivo

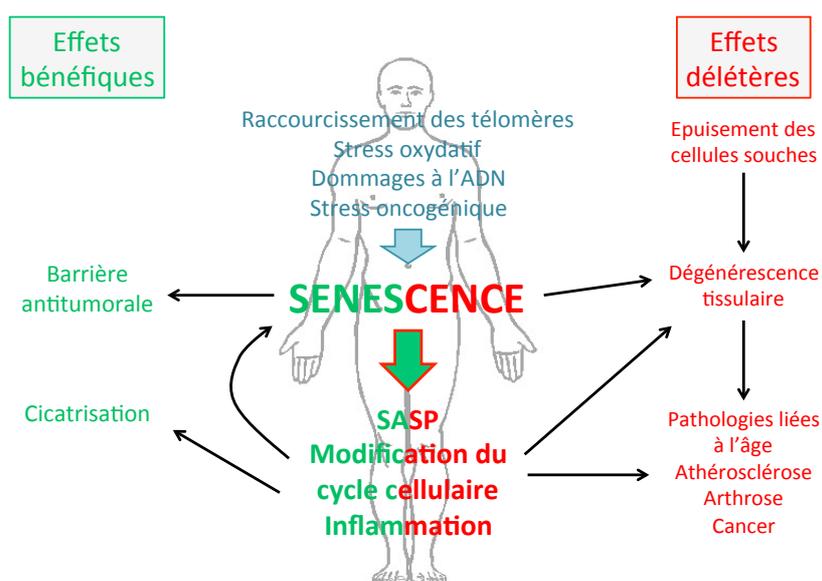


Figure 16 : Effets bénéfiques versus délétères de la sénescence cellulaire
D'après (Brondello et al. 2012)

La sénescence qui a un rôle bénéfique dans un premier temps, notamment comme barrière anti-tumorale ou dans la cicatrisation, a des conséquences néfastes à long terme au niveau tissulaire. En effet, l'augmentation du nombre de cellules sénescents et l'épuisement des cellules souches contribuent à la mise en place d'un statut inflammatoire, délétère pour leur fonctionnement mais aussi pour celui des cellules avoisinantes, et à la dégénération tissulaire typique des pathologies associées à l'âge. (Brondello et al. 2012) (Figure 16)

IV- Modifications de la paroi artérielle au cours du vieillissement physiologique

1- Aspects histologiques

Le vieillissement physiologique s'accompagne de modifications de la structure et des fonctions du système artériel, constituant un des faits les plus marquants du vieillissement de l'appareil cardiovasculaire.

Les modifications artérielles dues à l'âge et à l'athérosclérose, bien que présentant des points communs et pouvant être associées ou interagir, sont toutefois de nature différente. L'athérosclérose est une maladie localisée, différente du processus physiologique diffus qui modifie progressivement les artères dès la puberté. Au contraire, l'artériosclérose, définie comme l'épaississement et la perte d'élasticité de la paroi des artères de toutes tailles, peut être assimilée au vieillissement artériel. (Levy 2006, Cottart et al. 2009)

Avec l'âge, la morphologie des artères se modifie avec une augmentation du diamètre des artères de gros et moyen calibre. Cependant, le diamètre des artères musculaires (de petit calibre) ne semble pas modifié. (Benetos et al. 1993, O'Rourke et al. 2007) Au niveau de la structure histologique du vaisseau, le vieillissement s'accompagne de modifications des fibres élastiques de la média artérielle qui perdent leur orientation parallèle et deviennent plus fines et fragmentées. Enfin, un épaississement de l'intima est observé avec l'âge. (Guyton et al. 1983) L'intima d'un sujet sans hypertension et sans lésion athéroscléreuse de plus de 60 ans est jusqu'à six fois plus épais que celui d'un sujet sain de 20 ans. (Virmani et al. 1991) Dans l'intima de sujets âgés, il a été observé des fibres de collagène, des glycosaminoglycanes, des fragments de fibres élastiques, des cellules musculaires lisses et des cellules sanguines mononucléées. Sur le plan fonctionnel, ces modifications augmentent progressivement la rigidité de la paroi.

2- Aspects cellulaires et moléculaires

La quantité de collagène dans la média a tendance à augmenter avec l'âge alors que celle de l'élastine reste stable ou diminue. Les fibres de collagène subissent un processus de glycation au cours duquel le glucose se lie, par des liaisons covalentes, aux radicaux NH des protéines pour former des bases de Schiff, des produits d'Amadori et des produits de glycation avancée (AGEs). Ce processus étant très lent, il va prioritairement concerner les protéines à faible taux de renouvellement comme l'élastine et le collagène. (Brownlee et al. 1988) Dans la paroi vasculaire, la glycation des protéines conduit à la formation de ponts moléculaires covalents, stables et difficilement réversibles et entraîne des modifications mécaniques des protéines de la matrice extracellulaire qui deviennent alors plus rigides, plus résistantes aux enzymes protéolytiques et moins solubles. Ce phénomène induit une diminution de la compliance aortique. De plus, d'autres modifications se développent au cours du vieillissement physiologique, dont la migration des cellules musculaires lisses de la média avec une formation de dépôts calciques, conduisant à une calcification de la paroi qui participe à l'augmentation de sa rigidité. (Cottart et al. 2009) Cette rigidité accentuée chez le sujet âgé s'accompagne d'une plus forte charge de travail du ventricule gauche avec une augmentation de la pression pulsée (différence entre les pressions diastolique et systolique). (Levy 2006)

Au cours du vieillissement, la fonction de barrière de ces cellules est altérée et la perméabilité est augmentée, entraînant alors un passage accru des macromolécules plasmatiques avec accumulation dans la paroi. (Levy 2006)

Les mécanismes moléculaires précis des remaniements artériels liés à l'âge restent cependant encore mal connus. L'association avec des maladies métaboliques (diabète, insuffisance rénale chronique, ostéoporose) a été mise en avant. (Cannata-Andia et al. 2006)

Partie II

Les lamines de type A et les laminopathies

I- Les lamines : gènes et structures

Les lamines sont des filaments intermédiaires nucléaires de type V localisés sous la face nucléoplasmique de la membrane nucléaire interne où elles sont les principaux constituants du réseau filamenteux de la lamina nucléaire. Elles sont présentes chez les animaux multicellulaires, les métazoaires mais sont absentes dans les plantes et les organismes unicellulaires.

Les lamines contiennent trois domaines majeurs : un domaine globulaire amino-terminal, une queue carboxy-terminale comprenant un domaine en feuillets bêta et un domaine central en hélices α . Dans le noyau, les lamines se dimérisent grâce à leur domaine central puis s'assemblent tête-bêche en polymères. Ces polymères sont ensuite assemblés en filaments antiparallèles non polaires pour former la lamina nucléaire servant de squelette au noyau.

Les lamines sont divisées en lamines de type A et de type B, codées par trois gènes distincts. Les lamines de type B sont codées par les gènes *LMNB1* situé sur le chromosome 5 (lamine B1) et *LMNB2* situé sur le chromosome 19 (lamine B2 et B3) avec au moins un type de lamine B exprimée dans toutes les cellules somatiques. Les lamines de type A sont codées par un seul gène, le gène *LMNA* situé sur le chromosome 1 (en position 1q21.2) et constitué de 12 exons. L'épissage alternatif de la fin de l'exon 10 entraîne la formation de la lamine C (574 acides aminés) alors que la forme constituée des 12 exons permet la production de prélamine A (forme immature de la lamine A), et deux isoformes moins abondantes, la lamine A Δ 10 et C2. (Figure 17) Les lamines de type A sont absentes dans les cellules embryonnaires et les cellules indifférenciées mais sont présentes dans toutes les cellules différenciées (post mitotiques). (Eckersley-Maslin et al. 2013)

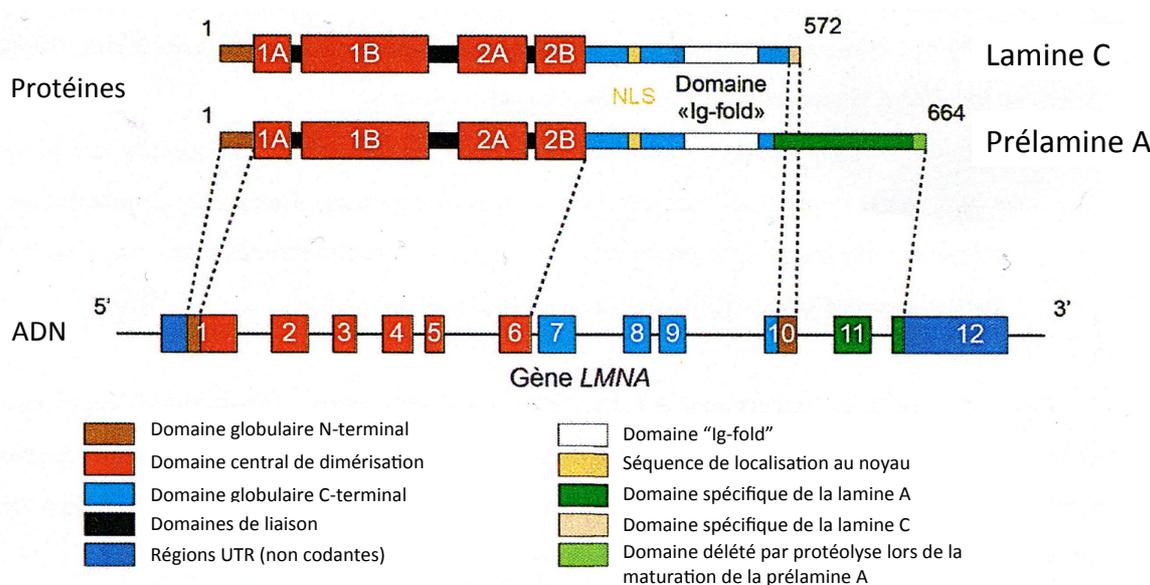


Figure 17 : Représentation schématique du gène LMNA et des lamines de type A
D'après Navarro et al. 2008

De nombreuses études montrent que les deux isoformes de lamine de type A ont des patterns d'expression différents lors du développement. En effet, dans les corps embryonnaires différenciés de souris et durant les premiers jours de développement, la protéine lamine C est détectée avant la lamine A (jour 8 versus jour 10). (Sehgal et al. 2013) De plus, le ratio d'expression des lamines de type A change au cours du développement. Une autre étude suggère que le niveau d'expression de la lamine A régule l'efficacité de reprogrammation des cellules souches pluripotentes induites (iPSC). (Zuo et al. 2012) Ces résultats suggèrent que la lamine A est particulièrement impliquée dans la différenciation cellulaire et que son niveau d'expression sert de marqueur pour la différenciation des cellules souches embryonnaires chez les humains et les animaux.

Au cours de ma thèse, je me suis focalisée sur la lamine A et sa maturation que je vais développer ci-après.

II- La maturation de la prélamine A en lamine A

Toutes les lamines, exceptées les lamines C et C2, possèdent à leur extrémité C-terminale une séquence CaaX (« C » pour cystéine, « a » pour acide aminé aliphatique et « X » pour n'importe quel acide aminé). Tandis que la lamine B est constitutionnellement farnésylée, la prélamine A, constituée de 664 acides aminés, subit une maturation post-traductionnelle

complexe au niveau de sa séquence -aaX afin de former la lamine A mature, constituée de 646 acides aminés.

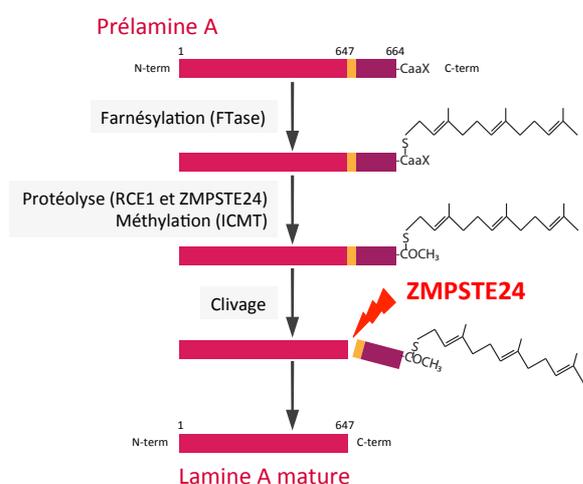


Figure 18 : Modifications post-traductionnelles de la prélamine A en lamine A mature
ZMPSTE24 : Zinc metalloprotéase STE24

La prélamine A est farnésylée sur la cystéine de la séquence CaaX par la farnésyl-transférase, une enzyme hétérodimérique codée par les gènes *FNTA* et *FNTB*. Puis la métalloprotéinase ZMPSTE24 (aussi appelée FACE1) clive les trois derniers acides aminés -aaX. Par la suite, la cystéine farnésylée est méthylée par une carboxyl-méthyltransférase isoprenyl-cystéine (codée par le gène *ICMT*). Après cette modification, la métalloprotéinase ZMPSTE24 clive les quinze derniers acides aminés formant ainsi la lamine A mature. Cette modification entraîne le décrochage de la lamine A mature de la membrane nucléaire et son insertion dans la lamina nucléaire. (Figure 18)

III- Rôles de la lamine A

Les lamines A ont d'abord été reconnues comme des composants structuraux de l'enveloppe nucléaire. En effet, avec la lamine B, elles forment la lamina à la face nucléoplasmique de la membrane nucléaire interne. Cependant, elles participent aussi à de nombreuses autres fonctions allant de rôles structuraux d'architecture du noyau à des rôles dans l'organisation de la chromatine, la régulation des gènes et la réparation de l'ADN. (Dechat et al. 2010, Dittmer et al. 2011)

En effet, les lamines jouent un rôle important dans l'organisation nucléaire, notamment dans la structuration et l'incorporation des pores nucléaires et des protéines de l'enveloppe nucléaire, (Osouda et al. 2005, Al-Haboubi et al. 2011) dans la régulation de la taille du noyau (Levy et al. 2010) et dans les propriétés mécaniques et structurales du noyau, en particulier grâce à leur

participation aux complexes LINC (linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton), qui réalisent des plateformes de connexion entre le cytoplasme et le noyau. (Zwerger et al. 2011, Burke et al. 2013) Les cellules déficientes ou mutées pour la lamine A présentent un noyau déformé, et/ou présentent des anomalies de réponse aux stimuli mécaniques. (Vigouroux et al. 2001, Osmanagic-Myers et al. 2015)

Les lamines jouent aussi un rôle dans la régulation de la transcription en organisant la chromatine sous forme active ou inactive. Des observations par microscopie électronique ont en effet montré une association proche entre l'hétérochromatine périphérique et la lamina nucléaire. (Paddy et al. 1990) Les lamines peuvent interagir directement avec la chromatine, au niveau de domaines appelés LAD (lamina-associated domains) ou indirectement par l'intermédiaire d'histones ou d'autres protéines associées aux lamines. (Stierle et al. 2003, Lund et al. 2013a) Ces propriétés des lamines permettent de moduler l'organisation de la chromatine et donc l'expression de gènes en altérant leur accessibilité. (Bank et al. 2011, Shevelyov et al. 2012)

En plus d'intervenir dans l'organisation des chromosomes, l'expression des gènes et la différenciation cellulaire, (Oldenburg et al. 2014, Vadrot et al. 2015) les mutations de la lamine peuvent entraîner une instabilité génomique en perturbant la réparation de l'ADN (Liu et al. 2013) et en affectant la structure et la fonction des télomères. (Redwood et al. 2011)

IV- Les laminopathies génétiques

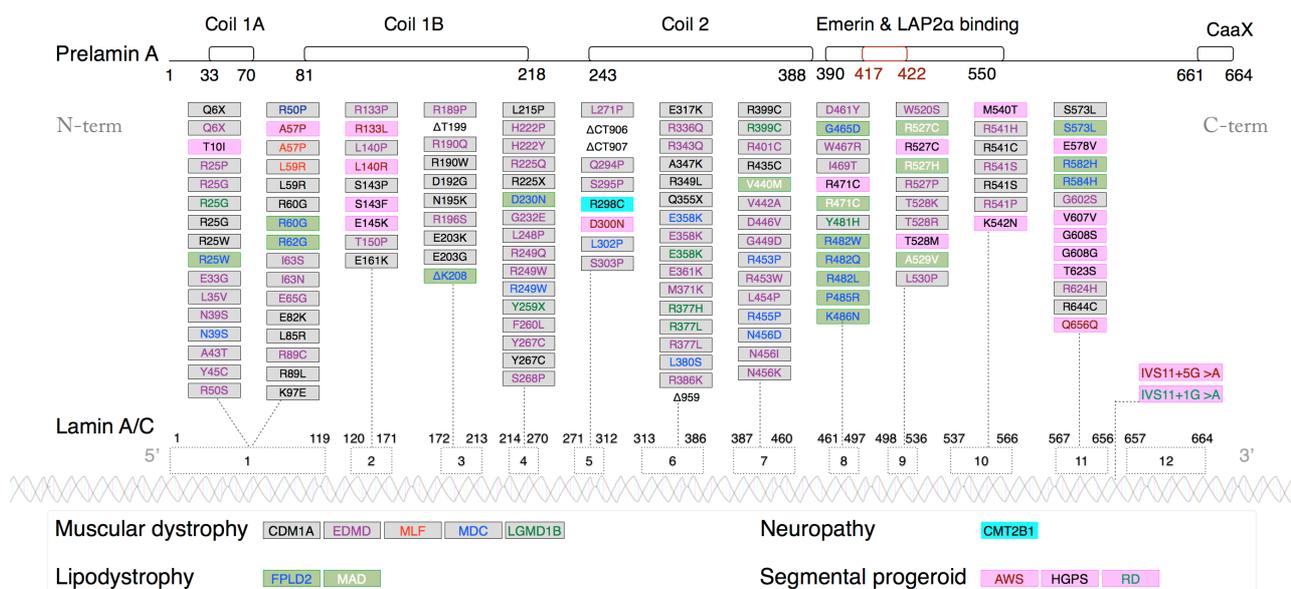


Figure 19 : Distribution des mutations le long du gène LMNA responsables des laminopathies
D'après Laminopathies, Tomás McK, Jean-Ha Baek and Maria Eriksson; INTECH, 2013

En 1999, l'équipe de Gisèle Bonne a identifié pour la première fois une mutation dans le gène *LMNA* responsable de la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss de transmission autosomique dominante. (Bonne et al. 1999) Depuis cette découverte, il a été établi que des mutations dans le même gène *LMNA* étaient responsables de plus d'une douzaine de maladies rares appelés laminopathies, touchant plusieurs tissus. (Figure 19) Les maladies causées par les mutations du gène *LMNA* touchent préférentiellement les tissus d'origine mésenchymateuse et peuvent être regroupées en fonction du/des tissu(s) affecté(s) : les muscles striés, squelettiques et/ou cardiaques, le tissu adipeux (avec des anomalies métaboliques associées), le système nerveux périphérique ou des atteintes multiples de différents tissus présentant des signes de vieillissement accéléré. (Figure 20)

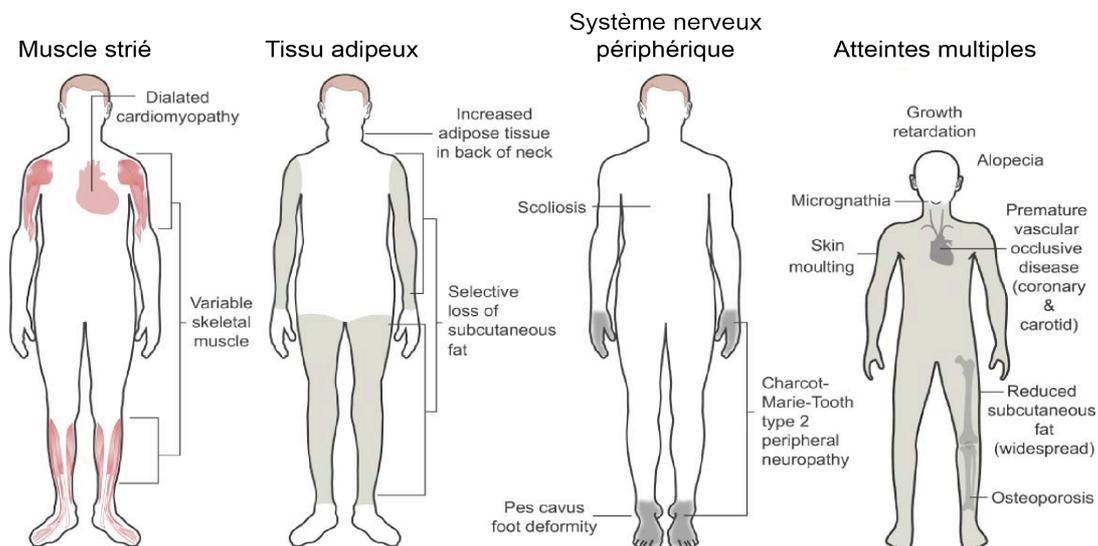


Figure 20 : Atteintes tissu-spécifique dans les laminopathies

D'après (Worman 2012)

Les laminopathies se classent en 4 grandes catégories en fonction des atteintes associées. De gauche à droite : cardiomyopathie dilatée avec des atteintes musculaire variables ; Lipodystrophie associant une lipoatrophie périphérique et une lipohypertrophie au niveau du visage et du cou ; Atteinte du système nerveux périphérique ; Atteintes multiples associées à un syndrome de vieillissement accéléré.

1- Les laminopathies du tissu adipeux

La lipodystrophie partielle familiale de Dunnigan (FPLD) est la forme la plus typique de lipodystrophie génétique partielle, autosomale dominante, liée à une mutation du gène *LMNA*. La principale mutation conduisant à une FPLD est une mutation hétérozygote de type R482W située dans le domaine C-terminal de la lamine de type A (responsable de plus de 80% des cas). Sa prévalence estimée est de l'ordre de 1 pour 100 000. Les anomalies

surviennent chez les patients au moment de la puberté avec l'apparition progressive d'une lipotrophie sous-cutanée des membres et du tronc donnant à ces patients un aspect très musculéux avec un réseau veineux apparent. Une accumulation de tissu adipeux est présente au niveau du cou et du visage. (Figure 21) L'acanthosis nigricans, une lésion hyperkératosique et brunâtre des plis cutanés, est très fréquent. Avec l'éventuel aspect acromégaloïde, il témoigne de la sévérité de l'insulinorésistance. Chez les femmes, après la puberté, il est souvent observé un hirsutisme et des irrégularités des cycles menstruels rapportés à un syndrome des ovaires polykystiques. Ces patients présentent des anomalies métaboliques avec une insulino-résistance évoluant vers un diabète, une hypertriglycéridémie et une stéatose hépatique. (Vigouroux et al. 2001, Bidault et al. 2013, Fardet et al. 2013, Guenantin et al. 2014) Les patients atteints de FPLD ont un risque élevé de développer une athérosclérose. (Hegele 2001, Bidault et al. 2013)

Les études, effectuées par plusieurs équipes dont la nôtre, ont permis de mettre évidence des dysfonctionnements dans les cellules de patients atteints de FPLD, notamment une altération structurale du noyau, mais aussi une altération de la maturation de la prélamine A en lamine A mature. (Vigouroux et al. 2001, Caron et al. 2007a, Bidault et al. 2013)



*Figure 21 : Aspect de lipotrophie sous-cutanée périphérique et accumulation facio-cervicale de tissu adipeux chez deux patientes FPLD porteuses d'une mutation hétérozygote du gène LMNA de type R482W
Patiente (A) cas index, âgée de 20 ans (à gauche); patiente (B) mère, âgée de 50 ans (à droite)*

2- Les laminopathies du nerf périphérique

En 2002, une neuropathie axonale de Charcot-Marie-Tooth (CMT) autosomique récessive a été observée chez plusieurs individus appartenant à des familles consanguines originaires d'Afrique. (De Sandre-Giovannoli et al. 2002) Ces patients portent une mutation *LMNA* R298C homozygote (située dans le domaine de dimérisation). Les symptômes sont une faiblesse et une fonte musculaire, des déformations des pieds et une abolition des réflexes ostéotendineux. Ces patients ont des vitesses de conduction nerveuse normales ou modérément abaissées mais présentent une dégénérescence axonale. (Chaouch et al. 2003, Tazir et al. 2004)

3- Les laminopathies du muscle strié

La dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (ou EDMD) est caractérisée par des rétractions tendineuses précoces au niveau des coudes, des tendons d'Achille et de la colonne vertébrale, une faiblesse et une atrophie musculaires des membres dès l'enfance. Les patients développent une cardiomyopathie, souvent dilatée, à l'âge adulte associée à des troubles du rythme et/ou de la conduction cardiaque pouvant conduire à la mort subite. (Bonne et al. 1999, Emery 2000)

D'autres mutations du gène *LMNA* peuvent induire d'autres formes de myopathie, notamment la dystrophie musculaire des ceintures de type 1B (ou LGMD1B). Cette pathologie se caractérise par une atrophie et une faiblesse des muscles au niveau des ceintures pelvienne et scapulaire. Les rétractions tendineuses sont le plus souvent absentes, cependant, si elles sont présentes, elles restent modérées et apparaissent assez tardivement. A l'âge adulte, les patients développent une atteinte cardiaque avec des troubles de la conduction pouvant conduire à une mort subite. (Muchir et al. 2000)

Des formes congénitales de dystrophie musculaire liées au gène *LMNA* ont aussi été observées. (Quijano-Roy et al. 2008) Cette maladie est caractérisée par une faiblesse et une atrophie musculaire apparaissant avant l'âge d'un an et touchant les muscles axiaux, cervico-axiaux, et les muscles proximaux et distaux des membres inférieurs. Les patients vont rapidement développer des pieds bots et une rigidité de la colonne vertébrale et des rétractions tendineuses. Dans les cas les plus sévères, une absence totale de développement moteur est observée. La perte de contrôle des muscles du cou entraîne un syndrome de tête tombante

(head-dropped syndrome). Ces patients acquièrent la marche mais la perdent vers l'âge de 2-5 ans. Rapidement, une atteinte respiratoire se développe.

4- Les laminopathies avec des syndromes de vieillissement accéléré

Bien qu'au départ les pathologies liées à des mutations du gène *LMNA* aient été identifiées comme touchant de manière spécifique certains tissus, d'autres mutations de ce gène conduisent à des pathologies touchant l'organisme de manière systémique et diffuse, dans différents syndromes dits de vieillissement prématuré ou progéroïdes.

A- Progéria de Hutchinson-Gilford (ou HGPS)

Des mutations du gène *LMNA* ont été identifiées dans un syndrome de vieillissement prématuré, la progéria de Hutchinson-Gilford (ou HGPS), (De Sandre-Giovannoli et al. 2003, Eriksson et al. 2003) une maladie très rare et très sévère liée à des mutations hétérozygotes (1 cas sur 4 à 8 millions de naissance). A la naissance, les enfants ne présentent en général aucun symptôme, cependant, ils vont rapidement développer un retard de croissance sévère avec une insuffisance pondérale, une athérosclérose (notamment au niveau de l'aorte, des artères coronaires et cérébrales), des troubles osseux (ostéoporose, ostéolyse claviculaire, retard de fermeture de la fontanelle) et dentaires, des anomalies cutanées (anomalies de pigmentation, aspect pseudo-sclérodérmiforme, alopecie) ainsi que des rétractions tendineuses. Les patients présentent aussi une lipoatrophie généralisée. Leur phénotype évoque ainsi un vieillissement accéléré. Néanmoins, contrairement à ce que l'on observe dans le vieillissement physiologique, ce syndrome ne s'accompagne pas de déficit cognitif progressif, et les enfants ne développent que très rarement des cancers. Le décès survient précocement, en moyenne vers l'âge de 13 ans et, en général, à cause d'une insuffisance coronarienne. (Hennekam 2006)

Plusieurs mutations conduisant à la progéria ont été décrites, cependant, 90% des cas sont liés à une substitution de novo de C en T à la position 1824 du gène *LMNA*. Cette mutation dominante ne conduit pas à un changement de l'acide aminé concerné (G608G) mais active un site donneur d'épissage alternatif, entraînant la production d'un ARNm plus court de 150 nucléotides qui va être traduit en une protéine délétée de 50 acides aminés, la progérine. (Figure 22) La mutation G608G entraîne ainsi une délétion du second site de clivage de la ZMPSTE24, et la progérine reste donc farnésylée de façon permanente. Certaines formes de progéria sont dues à des mutations inactivatrices du gène *ZMPSTE24*, confirmant

l'importance de l'expression d'une forme constitutivement farnésylée de prélamine A dans la physiologie de cette maladie.

Cette mutation entraîne des dysfonctions cellulaires importantes, avec notamment des noyaux déformés présentant des hernies. (De Sandre-Giovannoli et al. 2003) (Figure 22)

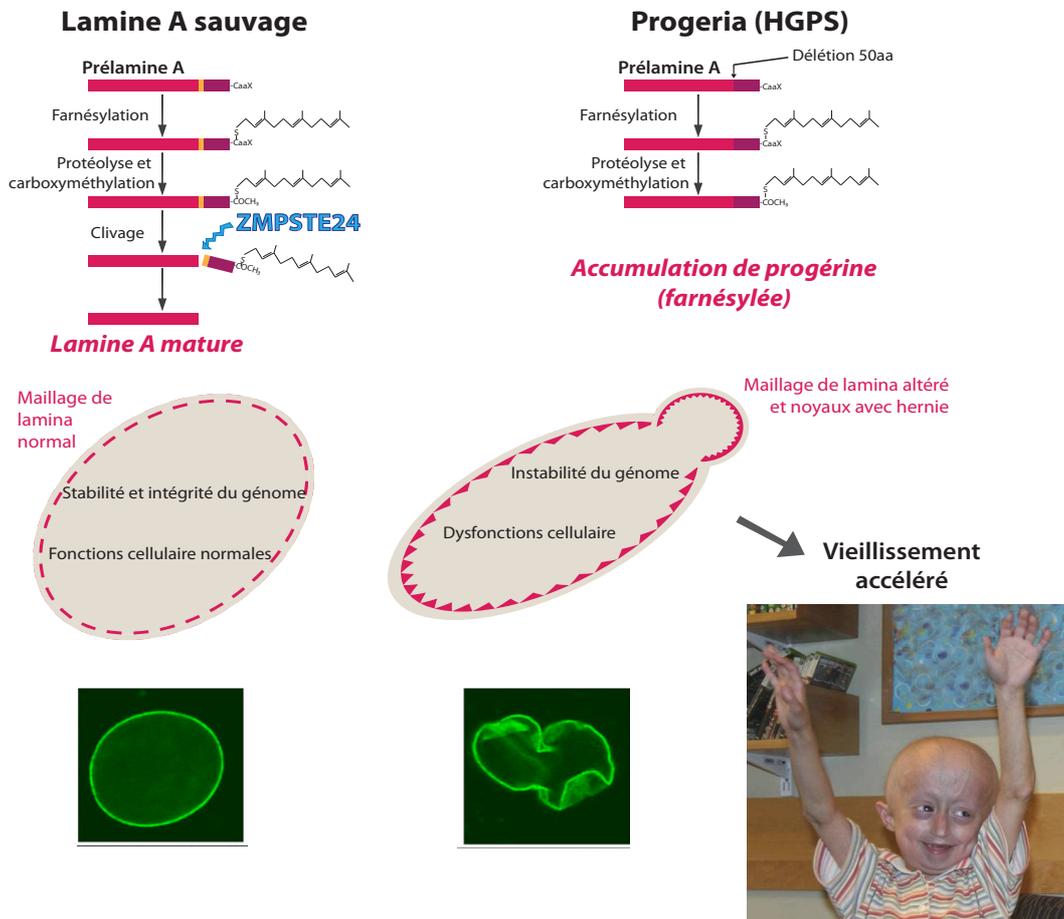


Figure 22 : Altération de la maturation de la lamine A chez les patients atteints de progéria : accumulation de progérine et anomalies de la structure nucléaire

Maturation physiologique de la lamine A (à gauche) versus maturation altérée de la lamine A dans le cas de la progéria de Hutchinson-Gilford (à droite). Photographie d'un patient atteint de progéria âgé de 8 ans (progeriaresearch.org). Images de microscopie d'un noyau cellulaire de fibroblaste sain (gauche) et d'un noyau de cellule d'un patient progéria (droite) marqué pour la lamine A/C d'après (Scaffidi et al. 2005)

B- Autres syndromes progéroïdes

Il existe d'autres syndromes de vieillissement accéléré atypiques, liés à des mutations du gène *LMNA* et regroupés sous le nom de syndromes progéroïdes. (Caux et al. 2003, Chen et al. 2003, Garg et al. 2009) Dans ce groupe de pathologies les signes cliniques de vieillissement accéléré sont moins sévères que dans la progeria de Hutchinson-Gilford, et la lipodystrophie peut être partielle. D'autres signes de laminopathies (musculaires, cardiaques) peuvent aussi s'y associer.

Les signes peuvent commencer précocement (en post-natal pour la dysplasie acro-mandibulaire) ou dans la seconde ou troisième décennie de la vie (pour le syndrome atypique de Werner). Des symptômes rappelant à la fois lipodystrophie et syndrome de vieillissement sont souvent observés tels qu'un diabète sucré, une lipoatrophie, un hypogonadisme, une ostéoporose et ostéosclérose, une athérosclérose précoce, des calcifications des tissus mous. (Broers et al. 2006)

a- La dysplasie acro-mandibulaire

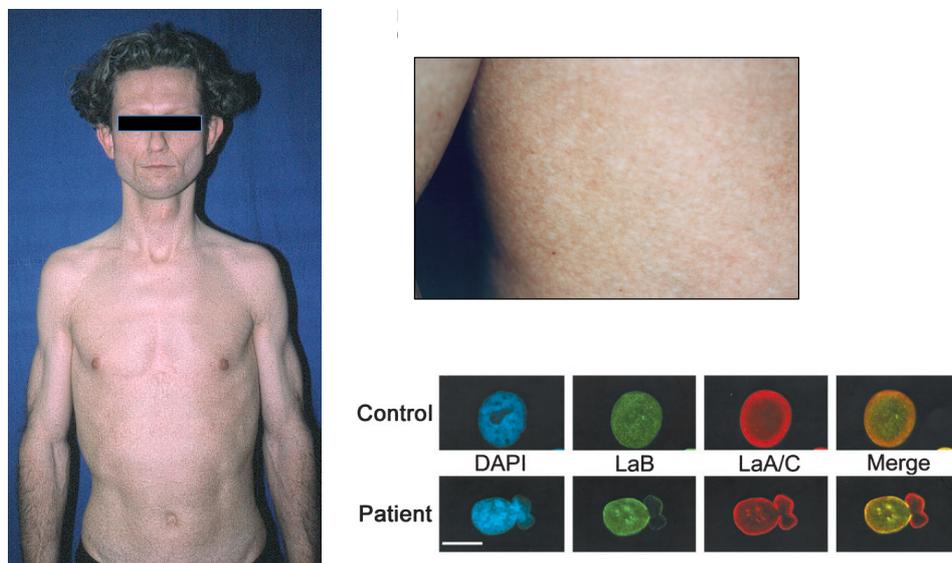
Le syndrome de dysplasie acro-mandibulaire (ou MAD) est caractérisé par un début post-natal avec un retard de croissance, des anomalies cranio-faciales (retard de fermeture des sutures), une ostéolyse au niveau de la clavicule, des orteils et des doigts et des anomalies de pigmentation cutanée. Les patients ont également des troubles métaboliques avec insulino-résistance et lipo-atrophie. Chez certains, des syndromes progéroïdes se développent. (Novelli et al. 2002) Plusieurs mutations du gène *LMNA* mais aussi du gène *ZMPSTE24* (cf Partie II-IV-5) ont été montrées comme responsables de cette maladie.

b- Syndromes progéroïdes atypiques

Plusieurs cas de patients porteurs de mutations *LMNA* avec un syndrome progéroïde atypique ont été décrits. (Caux et al. 2003, Garg et al. 2009) Ces patients présentent un panel de caractéristiques communes incluant des manifestations progéroïdes dont un grisonnement des cheveux prématuré, une alopecie partielle, une atrophie de la peau au niveau des mains et des pieds, une lipodystrophie généralisée ou partielle accompagnée de complications métaboliques, et des anomalies du squelette comme une hypoplasie mandibulaire et une acro-ostéolyse. Des fibroblastes de peau de ces patients ont été analysés et révèlent des anomalies morphologiques nucléaires similaires à celles observées chez les patients HPGS. (Caux et al. 2003, Garg et al. 2009)

Au cours de ma thèse, j'ai étudié les conséquences cellulaires de deux mutations retrouvées chez des patients ayant un syndrome progéroïde atypique : les mutations *LMNA* de type hétérozygote D47Y et R133L, affectant le domaine de dimérisation de la protéine. Je vais donc détailler un peu plus précisément les phénotypes de ces deux patients.

Une nouvelle mutation a été décrite chez un homme âgé de 30 ans porteur d'une mutation hétérozygote R133L du gène *LMNA* appartenant au domaine hélicoïdal en hélice α et conduisant à un syndrome progéroïde. (Caux et al. 2003) Son phénotype est caractérisé par des anomalies cutanées sclérodermiformes avec anomalies de pigmentation, une lipoatrophie généralisée avec des altérations métaboliques dont un diabète insulino-résistant, une dyslipidémie et une stéatose hépatique sévères, et des anomalies cardiaques impliquant l'endocarde et le myocarde réalisant un aspect de cardiomyopathie hypertrophique. De plus, le patient présente un épaissement des valves aortiques avec calcifications étendues et nodules fibrotiques. Le changement d'une arginine chargée positivement par une leucine hydrophobe dans le domaine de dimérisation de la lamine A/C pourrait entraîner un défaut de dimérisation de cette protéine et, donc un mauvais assemblage des filaments. En accord avec cette hypothèse, des anomalies nucléaires ont été retrouvées dans des cultures primaires de fibroblastes du patient, obtenues après biopsie de peau. (Figure 23) Cette mutation a été retrouvée par la suite chez d'autres patients présentant un phénotype proche. (Chen et al. 2003) Des signes de sénescence cellulaire ont été observés dans les fibroblastes cutanés de ce patient (Caron et al. 2007a) et d'autres patients atteints de la même maladie. (Saha et al. 2013)



*Figure 23 : Description d'un patient atteint d'une mutation du gène *LMNA* de type R133L*

D'après (Caux et al. 2003)

Photographie du patient (à gauche) montrant la lipoatrophie sous-cutanée généralisée, et l'aspect de fibrose dermique avec papules mélanodermiques (à droite en haut). Anomalies de structure du noyau d'un fibroblaste du patient comparé à un contrôle sain. Les lamines A/C et B co-localisent dans la partie centrale du noyau, mais pas dans les bourgeons dysmorphiques où la lamine A/C prédomine (à droite en bas)

Une patiente de 10 ans a été diagnostiquée comme atteinte d'une laminopathie progéroïde par mutation hétérozygote D47Y du gène *LMNA*. Cette patiente a développé une lipodystrophie avec lipoatrophie partielle des membres, compliquée d'un diabète insulino-résistant, d'une dyslipidémie, d'un syndrome des ovaires polykystiques avec aménorrhée et d'une stéatose hépatique. De plus, elle présente des signes de vieillissement accéléré avec des atteintes osseuses et cutanées, notamment une atteinte sclérodermiforme de la peau, une alopecie, et des rétractions tendineuses. (Figure 24) Au niveau cardiovasculaire, elle a développé progressivement une cardiopathie avec des troubles de conduction ayant nécessité la pose d'un défibrillateur implantable à l'âge de 19 ans, et des signes d'ischémie cardiaque.



Figure 24 : Description d'une patiente atteinte d'une mutation hétérozygote du gène LMNA de type D47Y. Anomalies de pigmentation de la peau, atteinte sclérodermiforme et acanthosis nigricans (à gauche), accumulation de tissu adipeux au niveau du cou et des creux sus claviculaires (au milieu en haut), rétraction tendineuse et troubles trophiques des mains (au milieu en bas), lipoatrophie des membres, hypoplasie mandibulaire, épaules tombantes (à droite)

5- Les laminopathies induites par des mutations du gène *ZMPSTE24*

Certaines laminopathies sont induites par des mutations du gène *ZMPSTE24*, codant pour la métalloprotéase responsable de la maturation protéolytique de la lamine A. Chez l'homme, la sévérité des laminopathies dépendantes de *ZMPSTE24* corrèle avec le niveau résiduel d'activité de la protéase. (Barrowman et al. 2012)

Ces données sont confirmées par le modèle de souris déficientes en *ZMPSTE24* qui présente des caractéristiques progéroïdes et une durée de vie écourtée, avec des fractures osseuses spontanées, une cardiomyopathie, une importante faiblesse musculaire et une perte des poils.

De plus, les souris déficientes en *ZMPSTE24* ont une altération du métabolisme glucido-lipidique. (Bergo et al. 2002, Pendas et al. 2002, Marino et al. 2008) A l'opposé, les souris *zmpste24*^{-/+} présentent un phénotype normal.

Chez l'homme, la laminopathie dépendante de la *ZMPSTE24* la plus sévère est la dermatopathie restrictive (DR), létale en période néonatale. Des mutations de *ZMPSTE24* homozygotes ou hétérozygotes composites ont été reportées pour la première fois chez 10 nouveaux nés atteints de DR par Navarro et al. (Navarro et al. 2005) Depuis, d'autres cas de DR ont été reportés. Dans la majorité des cas, la DR est causée par une mutation inactivatrice du gène *ZMPSTE24* homozygote ou hétérozygote composite. (Chen et al. 2009, Ahmad et al. 2012, Navarro et al. 2014) En accord avec les résultats observés dans les modèles souris *zmpste24*^{-/-} et ^{-/+}, les parents de patients DR porteurs de mutations hétérozygotes sont asymptomatiques, confirmant la transmission récessive de la maladie. (Navarro et al. 2014) Cette maladie est une génodermatose congénitale extrêmement sévère et rare, caractérisée par des anomalies majeures de la peau, qui réalise une gangue fibreuse tendue et rigide avec des érosions au niveau des sites de flexion, des contractures des articulations, une densité osseuse faible et une insuffisance pulmonaire qui conduit généralement à un décès dans la période périnatale. (Navarro et al. 2014)

Certaines mutations de *ZMPSTE24* sont aussi à l'origine d'une dysplasie acro-mandibulaire autosomale récessive (MAD) sévère. (cf Partie II-IV-4-B-a), le décès survenant à un âge médian de 30 ans. (Ahmad et al. 2012) Dans les MAD induites par des mutations de *ZMPSTE24*, les patients développent une lipodystrophie généralisée, alors que dans les MAD induites par des mutations du gène *LMNA*, la lipodystrophie est partielle, au niveau des extrémités. (Navarro et al. 2014)

D'autres patients porteurs de mutations sur *ZMPSTE24* présentent d'autres formes de syndromes progéroïdes précoces, avec naissance prématurée, micrognathie, petit nez pincé, chevelure absente ou clairsemée, fontanelles larges, dysplasie des clavicules et acro-ostéolyse. (Ahmad et al. 2012)

6- Notion de continuum phénotypique dans les laminopathies

L'existence d'un continuum clinique a été soulignée, en faveur de mécanismes physiopathologiques partiellement communs à l'origine des laminopathies d'expressions cliniques diverses. De manière intéressante, il est fréquent que les porteurs de mutations du gène *LMNA* présentent des signes cliniques appartenant à d'autres sous-groupes de laminopathies. Certains patients ont, par exemple, un phénotype musculaire associé à une lipodystrophie partielle (Garg et al. 2002, van der Kooi et al. 2002) ou à une atteinte des nerfs périphériques. (Goizet et al. 2004)

Cette notion de continuum phénotypique est notamment mise en avant pour les syndromes progéroïdes et les lipodystrophies. Des relations étroites entre ces maladies ont été évoquées suite à l'observation de signes cliniques et d'atteintes cellulaires proches dans les deux cas. (Caux et al. 2003, Caron et al. 2007a, Guenantin et al. 2014) Notre équipe a été la première à montrer que les mutations du gène *LMNA* responsables de lipodystrophie s'accompagnaient d'un phénotype cellulaire caractéristique, avec des anomalies de forme et de résistance des noyaux, liés à une désorganisation du réseau de lamina nucléaire. (Vigouroux et al. 2001) De plus, dans plusieurs modèles cellulaires et tissulaires (fibroblastes, cellules endothéliales, tissus adipeux), nous avons montré que les mutations du gène *LMNA* associées aux lipodystrophies et aux syndromes progéroïdes entraînent des anomalies de la maturation de la prélamine A, associées à une sénescence cellulaire précoce et à une augmentation du stress oxydatif. (Caron et al. 2007a, Bidault et al. 2013) Cependant, le lien entre les mutations du gène *LMNA* associées à un phénotype lipodystrophique et l'apparition de troubles vasculaires observés chez les patients n'est pas encore clairement établi.

V- Complications cardiovasculaires et laminopathies

Dans de nombreuses laminopathies, le système cardiovasculaire est atteint. Par exemple, une maladie cardiaque se développe chez les patients atteints d'une dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD) avec, dans la majorité des cas, une apparition des symptômes à la fin de la 2nde décennie sans relation directe avec la sévérité de l'atteinte des muscles squelettiques. (Chatzifrangkeskou et al. 2015) Le premier signe clinique est, généralement, un défaut de conduction atrio-ventriculaire puis, au cours du temps, une cardiomyopathie dilatée se développe, compliquée par une dysrythmie ventriculaire. (Meune et al. 2006)

En accord avec ces données, les souris *lmna*^{-/-} développent une cardiomyopathie et une atrophie des muscles squelettiques ressemblant fortement aux laminopathies humaines du muscle squelettique. De surcroît, les souris *lmna*^{-/-} développent rapidement une dystrophie musculaire associée à une progressive cardiomyopathie dilatée et à un défaut du système de conduction et décèdent à 8 semaines. Cependant, les souris *lmna*^{+/-} semblent avoir un phénotype normal. (Sullivan et al. 1999) Toutefois, il a récemment été montré que ce modèle ne correspondait pas en réalité à une invalidation totale du gène, car les souris *lmna*^{-/-} expriment un ARNm et une protéine produits à partir du gène *LMNA* tronqué ($\Delta 8-11$). (Jahn et al. 2012)

L'atteinte cardiovasculaire associée aux laminopathies lipodystrophiques, qu'elles soient liées à une progéria, un syndrome progéroïde ou une FPLD, est différente, avec une athérosclérose au premier plan, même si les troubles métaboliques sont modérés. (Al-Shali et al. 2004, Bidault et al. 2013)

Les patients atteints de HGPS décèdent le plus fréquemment de causes cardiovasculaires, avec une athérosclérose comme première pathologie. (Al-Shali et al. 2004) Les artères coronaires de ces patients sont fréquemment sténosées ou occluses par des plaques athérosclérotiques. En effet, de nombreuses nécropsies effectuées sur des patients HGPS ont reporté une athérosclérose aortique allant de petites plaques à des plaques avancées avec des lésions calcifiées. (Makous et al. 1962, Baker et al. 1981) Ces études ont aussi documenté des remaniements importants du myocarde, secondaires à des infarctus du myocarde associés à une athérosclérose coronarienne sévère, avec une fibrose interstitielle diffuse, une hypertrophie et une dilatation ventriculaires. (Dyck et al. 1987) (Al-Shali et al. 2004)

De surcroît, l'équipe de Leslie Gordon a étudié les tissus cardiovasculaires de deux patients atteints de progéria et décédés d'infarctus du myocarde. (Olive et al. 2010) De façon similaire à une maladie cardiovasculaire due à un vieillissement physiologique, de nombreuses plaques de stade avancé ont été retrouvées chez les patients HGPS. Les lésions artérielles de ces patients, tout comme celles retrouvées chez des sujets atteints d'athérosclérose, présentent des zones calcifiées, inflammatoires et des signes d'érosion ou de rupture de plaque. Cependant, les lésions retrouvées chez ces deux patients semblent avoir des cœurs athéromateux plus petits en comparaison aux cas d'athérosclérose classique. Cela peut être attribué à l'absence d'hypercholestérolémie et de dyslipidémie majeures chez les patients HGPS. Cependant, contrairement à la maladie cardiovasculaire adulte typique, l'adventice artériel est plus épais

dans le HGPS. Ce phénomène peut être à l'origine d'une compliance vasculaire diminuée et d'une rigidité accrue des vaisseaux. La rigidité aortique peut d'ailleurs contribuer au développement d'une hypertrophie ventriculaire, comme observé chez l'un des patients HGPS de cette étude. De façon intéressante, la présence de progérine dans des artères coronaires d'individus âgés non-HGPS a été mise en évidence dans cette étude. (Olive et al. 2010) De plus, la quantité de cette protéine augmente avec l'âge. Des similitudes dans les pathologies cardiovasculaires entre les patients HGPS et les sujets âgés ont donc été mises en lumière par cette équipe.

Une étude de Hegele a montré en 2001 (Hegele 2001) que les patients atteints de FPLD ont un risque de maladie coronarienne augmenté, en comparaison à des sujets contrôles sans mutation *LMNA* et sans résistance à l'insuline. En effet, les femmes porteuses d'une mutation *LMNA* ont un taux d'atteintes cardiovasculaires entre 35 et 54 ans beaucoup plus fort que dans la population générale (26,1% contre 0%, $p=0,026$). De même, quel que soit l'âge, les maladies coronariennes sont plus prévalentes chez les patientes atteintes de FPLD en comparaison aux sujets contrôles (34,8% contre 5,9%, $p=0,033$). Les données de cette étude montrent donc clairement une augmentation du risque d'athérosclérose associée à une FPLD. Le risque cardiovasculaire chez les patients FPLD a été associé dans ce travail aux anomalies métaboliques présentes chez ces patients. En effet, les patients avec une FPLD et une atteinte cardiovasculaire précoce ont une hyper-insulinémie, un diabète, une hypertension et une dyslipidémie qui représentent des facteurs de risque d'athérosclérose connus. Néanmoins, les conséquences directes de la mutation du gène *LMNA* sur la paroi vasculaire pourraient aussi expliquer les complications observées chez ces patients. Ainsi dans le travail de Bidault et al. réalisé au sein de notre équipe, (Bidault et al. 2013) le phénotype cardiovasculaire de 19 patientes de plus de 30 ans atteintes de FPLD a été analysé. 68% des patientes présentaient une athérosclérose symptomatique cliniquement, survenant pour la plupart avant 45 ans, même si leur HbA1c, témoin de l'hyperglycémie chronique, et leur LDL-cholestérol plasmatique, deux facteurs de risque majeurs d'athérosclérose, n'étaient pas très augmentés (HbA1c à 7,5% et LDL-cholestérol à 2,5 mmol/L). Ce travail a par ailleurs montré que l'expression de la mutation R482W dans un modèle de cellules endothéliales issues d'artères coronaires humaines entraînait une dysfonction endothéliale avec signes de sénescence cellulaire, diminution de la synthèse de NO, augmentation de l'adhésion des cellules mononuclées, stress

oxydant, inflammation et dommages à l'ADN, associés à l'accumulation d'une forme immature farnésylée de prélamine A à l'enveloppe nucléaire.

De plus, dans plusieurs modèles cellulaires et tissulaires (fibroblastes, cellules endothéliales et tissu adipeux), plusieurs auteurs dont notre équipe ont montré que les mutations *LMNA* associées aux lipodystrophies et aux syndromes progéroïdes entraînent des anomalies de la maturation de la prélamine A, associées à une sénescence cellulaire précoce et à une augmentation du stress oxydatif. Ces modifications cellulaires peuvent, en partie du moins, expliquer les complications cardiovasculaires, dont l'athérosclérose, observées chez les patients. (Capanni et al. 2005, Caron et al. 2007a, Maraldi et al. 2007, Bidault et al. 2013)

En accord avec ces données, la prélamine A a été mise en avant comme marqueur de vieillissement des CMLV car elle est accumulée dans des cellules d'individus âgés et dans des lésions athérosclérotiques. (Ragnauth et al. 2010) La voie de dommages à l'ADN, activée de façon permanente participe au processus de sénescence. (Liu et al. 2013)

De surcroît, une accumulation de prélamine A farnésylée conduit à une adhésion des monocytes à des cellules endothéliales matures *in vitro* qui est décrit comme l'événement initiateur de l'athérosclérose. (Bidault et al. 2013, Bonello-Palot et al. 2014)

Toutefois, aucune étude ne s'est encore penchée sur le lien possible entre mutation du gène *LMNA* et dysfonctions des cellules musculaires lisses vasculaires qui jouent un rôle important dans le processus d'athérosclérose.

Enfin, il a été mis en évidence qu'une proportion de patients avec un syndrome métabolique, facteur de risque de complications cardiovasculaires, présente en fait une laminopathie. En effet, dans l'étude de Dutour et al., 10 patients sur les 87 inclus dans l'étude (soit environ 11%) ont des anomalies de la structure nucléaire et de la distribution de la lamine A/C nucléaire, avec des hernies nucléaires où la lamine B1 est réduite ou absente. Ces défauts sont des caractéristiques typiques des laminopathies. Parmi ces 10 individus, trois ont des variations de séquence significatives fonctionnellement dans le gène *LMNA* ou *ZMPSTE24*. Les laminopathies pourraient donc être fréquentes chez les patients ayant un syndrome métabolique. Cette étude souligne l'importance des défauts liés à la lamine A chez les patients

ayant un syndrome métabolique, même sans lipodystrophie, comme notre équipe l'avait également suggéré. (Decaudain et al. 2007, Dutour et al. 2011)

VI- Hypothèses physiopathologiques dans les laminopathies

De nombreuses hypothèses ont été proposées afin d'expliquer les mécanismes pathophysiologiques impliqués dans les laminopathies. (Figure 25)

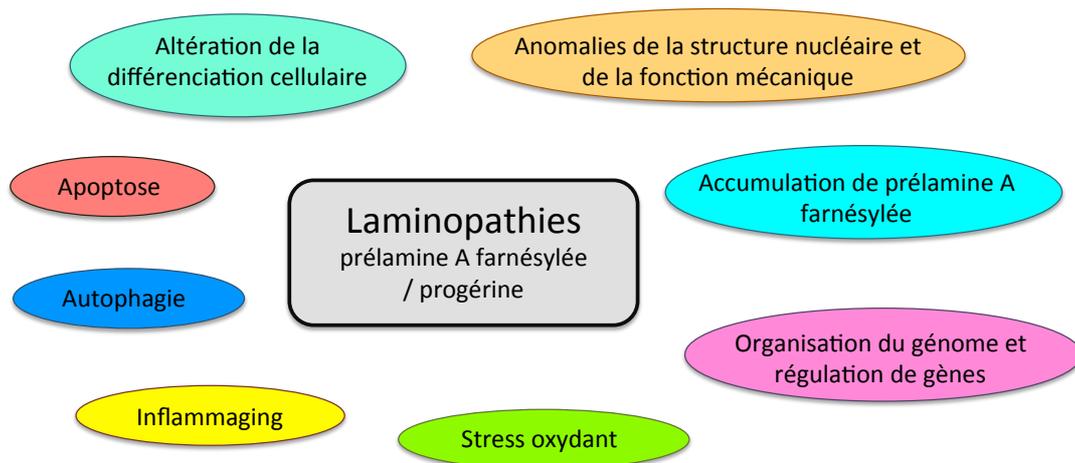


Figure 25 : Différentes hypothèses physiopathologiques pouvant être en jeu dans le développement des laminopathies

1- Morphologie nucléaire et fonction mécanique

La première hypothèse a mis en avant le rôle de la lamine A dans le maintien de l'intégrité structurale du noyau des cellules.

Dans de nombreuses laminopathies, il a été observé, *in vitro*, que les noyaux des cellules en culture étaient déformés avec présence de hernies. (Eriksson et al. 2003, Goldman et al. 2004, Caron et al. 2007a, Bidault et al. 2013) Il est établi que les mutations *LMNA* fragilisent le noyau qui devient instable mécaniquement. En effet, la lamina représente physiologiquement un réseau de protéines extensible, mais limité dans sa compressibilité, qui sert d'« absorbeur de choc ». De plus, la lamine A est présente à la fois à la périphérie du noyau et dans le nucléoplasme. Dans les cellules de patients atteints de progéria, le réseau de lamina est épaissi et très fortement associé à la membrane nucléaire qui devient plus rigide, contribuant à l'apparition des dysmorphies nucléaires, comme discuté plus loin. (Goldman et al. 2004)

De plus, les cellules de souris *lmna*^{-/-} présentent des altérations de la structure nucléaire, une augmentation de la fragilité, une diminution de la rigidité mécanique et une altération des voies de réponse cellulaire aux stress mécaniques (méchanotransduction). (Lammerding et al. 2004) Une altération de l'expression ou de la séquence protéique de la lamine A pourrait donc conduire à une dysfonction du réseau de soutien structural de l'enveloppe nucléaire et donc de la capacité des cellules à répondre au stress. (Chatzifrangkeskou et al. 2015)

Cette hypothèse semble donc être pertinente pour expliquer les laminopathies touchant des tissus particulièrement exposés au stress mécanique, tels que les muscles striés et le système vasculaire. (Gordon et al. 2014b, Chatzifrangkeskou et al. 2015)

2- Altération de la maturation de la prélamine A

Une autre hypothèse dans la physiopathologie des laminopathies est l'implication de l'altération de la maturation de la prélamine A et ses conséquences cellulaires. (Guenantin et al. 2014)

Cette hypothèse a, en premier lieu, été proposée dans la progéria où le défaut génétique entraîne une accumulation de progérine, une forme tronquée de prélamine A constitutivement farnésylée. Par la suite, une accumulation anormale de prélamine A, en périphérie du noyau, a été observée dans les fibroblastes, les cellules vasculaires et le tissu adipeux des patients atteints de laminopathie lipodystrophique. (Capanni et al. 2005, Caron et al. 2007a, Bereziat et al. 2011, Bidault et al. 2013) Cette accumulation anormale pourrait être attribuée à un défaut de reconnaissance de la prélamine A mutée par la protéase ZMPSTE24. En accord avec cette idée, le taux de maturation de la prélamine A mutée p.R482W est diminué dans les cellules endothéliales humaines en culture, en comparaison à la prélamine A sauvage, expliquant, en partie, l'accumulation de la forme farnésylée de cette protéine. (Bidault et al. 2013) Toutefois, il est intéressant de noter que dans certains syndromes progéroïdes dus à des mutations atypiques, aucune accumulation de prélamine A n'a été observée, (Garg et al. 2009) suggérant que d'autres mécanismes sont impliqués dans les dysfonctions cellulaires associées aux laminopathies. Par ailleurs, dans les lipodystrophies liées au gène *LMNA*, certaines mutations (autres que celles affectant le codon 482) induisent un stress oxydant en présence d'une accumulation de prélamine A mutée ne pouvant pas être farnésylée (Le Dour et al. 2011) ou en l'absence d'accumulation de prélamine A. (Verstraeten et al. 2009) Même si l'accumulation de prélamine A farnésylée ou de progérine semble être un des acteurs majeurs dans les syndromes de

vieillissement accéléré, d'autres facteurs sont donc impliqués dans la physiopathologie des laminopathies.

Il a été suggéré que la prélamine A (ou la progérine) retenue de façon permanente sous forme farnésylée dans la cellule lors de différentes laminopathies agirait de façon dominante négative en restant accrochée de manière irréversible à la membrane nucléaire. (Capell et al. 2005) En effet, le groupement farnesyl, hydrophobe et de forte affinité pour les lipides, se fixe à la membrane nucléaire, entraînant l'accrochage de la prélamine A de façon permanente. L'absence de maturation protéolytique de la prélamine A, qui entraîne physiologiquement la perte de cet ancrage, empêche la libération de la prélamine A de la membrane nucléaire et renforce ainsi son insertion dans la lamina nucléaire. (Hennekes et al. 1994) Il a également été montré que la présence de la progérine perturbe l'organisation des polymères de lamines A et B dans la lamina : physiologiquement des homopolymères distincts formés d'une part de lamine A et d'autre part de lamine B, interagissent entre eux, alors qu'en présence de progérine, des hétéropolymères de lamines A et B sont formés, altérant la structure de la lamina. (Delbarre et al. 2006)

Ce phénomène perturbe les fonctions normales de la lamina mais aussi de l'enveloppe nucléaire dans son ensemble, en raison des multiples interactions qui existent entre la lamina et les protéines transmembranaires nucléaires. Ceci induit des défauts cellulaires, notamment un stress oxydant, des dommages à l'ADN et une sénescence dans plusieurs modèles cellulaires, exprimant des mutations liées au phénotype FPLD ou progéroïde. (Capanni et al. 2005, Caron et al. 2007a, Bereziat et al. 2011, Bidault et al. 2013)

En accord avec ces données, l'inhibition de la farnésylation de la prélamine A ou de la progérine améliore partiellement les phénotypes des souris et des patients atteints de syndromes progéroïdes. (Capell et al. 2005, Varela et al. 2008, Gordon et al. 2014a)

3- ADN, régulation des gènes et différenciation cellulaire

Une autre hypothèse physiopathologique est basée sur les altérations des interactions entre la lamine A mutée et l'ADN, la chromatine et diverses protéines qui jouent un rôle dans l'organisation globale du génome ainsi que dans la régulation tissu-spécifique de la transcription et de la traduction des gènes. (McCord et al. 2013)

Les fibroblastes porteurs de mutations du gène *LMNA* présentent une désorganisation des chromosomes avec les chromosomes 13 et 18 situés à distance de la périphérie nucléaire. (Meaburn et al. 2007) De même, les fibroblastes portant les mutations de type p.R482W (FPLD) ou p.G608G (HGPS) du gène *LMNA* ont une perte d'hétérochromatine périphérique. (Vigouroux et al. 2001, Goldman et al. 2004)

Dans la continuité de ces données, une altération de la structure de la chromatine, avec une perte des domaines d'hétérochromatine a été mise en évidence dans des cellules de patients atteints de progéria. (Gordon et al. 2014b) Les cellules de ces patients ont des anomalies de réparation de l'ADN dues à un défaut de recrutement sur les sites endommagés des facteurs de réponse aux dommages de l'ADN (DDR) ainsi qu'à une cinétique de réparation ralentie. (Musich et al. 2009, Benson et al. 2010)

Les lamines A se lient aussi directement à l'ADN, en particulier aux promoteurs de certains gènes, dans des régions spécifiques d'interaction (lamina-associating ou interacting domains), et interviennent dans les régulations épigénétiques de la transcription génique. (Hakelien et al. 2008, Lund et al. 2013b, Collas et al. 2014, Lund et al. 2015)

De manière intéressante, certaines mutations associées à la FPLD ne modifient pas la conformation tridimensionnelle de la protéine mais altèrent les sites d'interaction de la lamine A avec ses partenaires, dont des facteurs de transcription, entraînant une altération de l'expression des gènes. (Oldenburg et al. 2014, Vadrot et al. 2015) De plus, les lamines de type A interagissent normalement avec la protéine du rétinoblastome (pRb) lors de la phase G1 du cycle cellulaire, protégeant cette dernière de la dégradation par le protéasome. Or, il a été démontré que le phénotype des cellules *lmna*^{-/-} était proche de celui des cellules *Rb*^{-/-}, suggérant que les altérations de pRb peuvent contribuer aux laminopathies. De façon intéressante, pRb induit la différenciation adipogénique en activant le facteur de transcription adipogénique C/EBP α et régule les voies de différenciation vers les adipocytes blancs ou bruns. (Guenantin et al. 2014)

La mutation du gène *LMNA* L530P induit une dystrophie musculaire et une cardiomyopathie à l'état hétérozygote chez l'homme et, de façon surprenante, cause un phénotype progéroïde chez la souris porteuse de cette mutation à l'état homozygote. Chez la souris, on observe une forme tronquée de la prélamine A, proche de la progérine, qui reste farnésylée et est donc un modèle valide de la HGPS. Dans ce modèle murin, on observe une diminution de l'expression

de gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire, associée à un défaut de la voie de signalisation Wnt qui régule la composition de la matrice extracellulaire et est importante pour le développement du cartilage et la différenciation des ostéoblastes et des chondrocytes. Le traitement de fibroblastes de ces souris en culture avec un inhibiteur de Gsk-3 β , qui active l'effecteur de Wnt, la β -caténine, améliore la survie et restaure la prolifération. (Muchir et al. 2010) De plus, dans des fibroblastes de souris *zmpste24^{-/-}*, une diminution de la voie Wnt a été montrée. (Muchir et al. 2010)

Enfin, des anomalies dans la différenciation des cellules pourraient être impliquées dans la pathogénèse des laminopathies. (Guenantin et al. 2014) Au cours du développement, la lamine de type A commence à être détectée entre le jour 9 et 11 après la fécondation, suggérant son importance dans le processus de différenciation. (Rober et al. 1989) *In vitro*, les lamines A sont peu (Eckersley-Maslin et al. 2013) ou pas (Stewart et al. 1987) exprimées dans les cellules souches pluripotentes et sont considérées comme un marqueur précoce de différenciation. Au cours du processus de différenciation, plusieurs gènes de pluripotence s'associent avec la lamina nucléaire, laissant penser que les lamines jouent un rôle dans les décisions de destin cellulaire. De façon intéressante, des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) obtenues à partir de cellules de patients HGPS, présentent un défaut sévère de stockage des lipides au cours des étapes terminales de la différenciation adipocytaire. Ces résultats sont en faveur du rôle régulateur de la lamine A dans l'adipogenèse terminale. (Xiong et al. 2013)

Des mutations de la lamine A peuvent aussi perturber la balance entre maintien et prolifération dans les niches de cellules souches adultes, conduisant à une diminution de la régénération tissulaire et à une sénescence. (Gotzmann et al. 2006, Pekovic et al. 2008) La surexpression de progérine dans des cellules souches mésenchymateuses de patients HGPS affecte leur potentiel de différenciation et leur capacité d'auto-renouvellement, résultant en une détérioration tissulaire progressive. (Scaffidi et al. 2008)

4- Stress oxydant et « inflammaging »

De façon intéressante, la lamine A joue un rôle important dans le maintien de la balance redox. L'oxydation des résidus cystéine C-terminaux a un effet tampon sur la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), prévenant les dommages à l'ADN et la sénescence cellulaire, qui peut être perdu lorsque la lamine A est modifiée. (Verstraeten et al. 2009, Pekovic et al. 2011)

Il a été montré par notre équipe que le traitement de cellules endothéliales transfectées avec une lamine mutée de type R482W par un antioxydant, le N-acétyl-cystéine (NAC) réduit les dysfonctions endothéliales initialement présentes dans ces cellules. Ces résultats suggèrent l'importance du stress oxydant dans la mise en place des dysfonctions cellulaires induites par des mutations du gène *LMNA*. (Bidault et al. 2013)

De plus, chez les souris *lmna*^{-/-} une diminution de l'activité du facteur de transcription NF-κB a été rapportée. Ce facteur activé en réponse au stress cellulaire, est impliqué dans l'immunité adaptative et innée, ainsi que dans l'induction de la sénescence cellulaire et l'inflammation. (Lammerding et al. 2004) L'implication de NF-κB dans la mise en place du phénotype progéroïde a été montrée par Osorio et al. dans deux modèles murins de vieillissement accéléré (*zmpste24*^{-/-} et *lmna*^{G609G/G609G}). En effet, l'inhibition génétique et pharmacologique de la signalisation NF-κB prévient les caractéristiques associées au vieillissement dans ces modèles animaux et augmente la survie. NF-κB serait donc un régulateur important du vieillissement accéléré. (Osorio et al. 2012)

5- Autophagie et apoptose

Une hypothèse plus récente est l'implication de l'autophagie et de l'apoptose dans les dysfonctions induites par les mutations du gène *LMNA*.

Il a été reporté qu'une mutation de la lamine A conduisait à une modification des voies de signalisation de la MAPK (mitogen-activated protein kinase), (Muchir et al. 2007) de la voie mTOR (Muchir et al. 2012) et de la voie TGF-β (Arimura et al. 2005) dans les muscles squelettiques de plusieurs modèles de souris. Des inhibiteurs pharmacologiques de ces voies se sont avérés efficaces sur les pathologies des muscles striés chez ces souris. (Choi et al. 2012, Muchir et al. 2012, Chatzifrangkeskou et al. 2015)

VII- Thérapies potentielles pour les laminopathies

La découverte du gène responsable des laminopathies et les nombreuses découvertes quant à ses fonctions et implications cellulaires ont permis de développer plusieurs stratégies thérapeutiques.

1- Inhibition du processus de farnésylation : Voie du mévalonate

La prénylation (ou isoprénylation) est une modification post-traductionnelle concernant de nombreuses protéines, qui ajoute un groupement farnesyl ou géranylgeranyl, via une liaison thioether, sur une cystéine en position C-terminale ou proche de cette extrémité. Les groupements farnesyl (15 carbones) et géranylgeranyl (20 carbones) sont des poly-isoprènes insaturés. Ils dérivent du mévalonate à partir duquel ils sont produits par la voie du mévalonate, qui conduit aussi à la production du cholestérol. (Figure 26) La prélamine A, après avoir subi une farnésylation, est ensuite clivée juste après la cystéine modifiée et un groupement méthyl y est ajouté en position C-terminale.

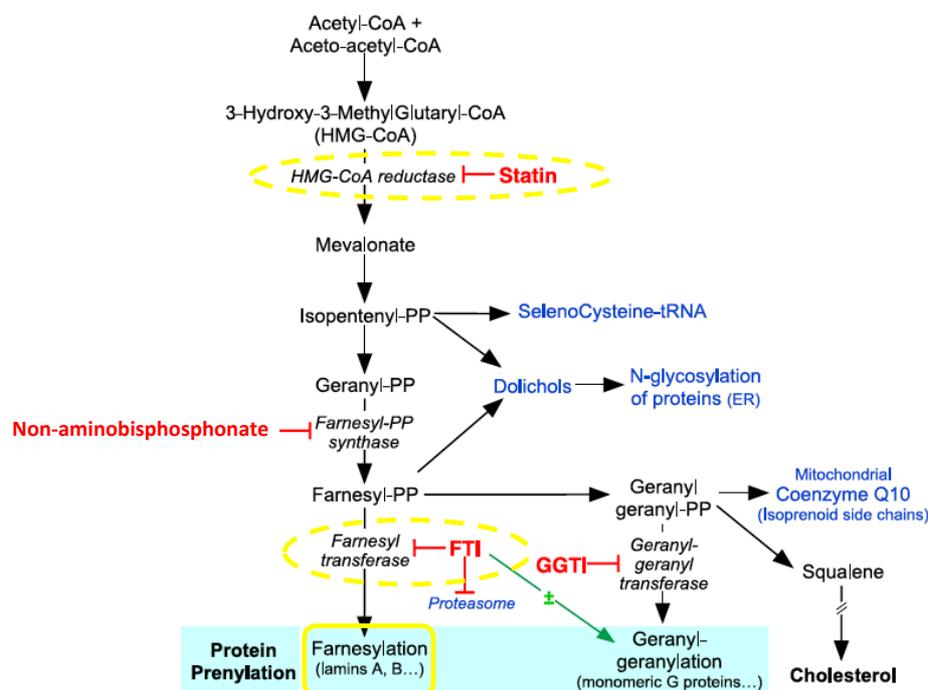


Figure 26 : Voie du mévalonate conduisant à la biosynthèse du cholestérol et à la production du groupement farnésyl.

Des inhibiteurs de farnésylation sont indiqués : FTI : Inhibiteurs de la farnésyl-transférase ; GGTI inhibiteurs de la geranylgeranyl-transférase

D'après (Navarro et al. 2008)

Les premières idées de thérapie spécifique pour les laminopathies ont ciblé l'accumulation de prélamine A mutée farnésylée. Il s'agit d'empêcher la farnésylation et donc d'arrêter la maturation au stade de prélamine A non farnésylée. Cette stratégie est envisageable dans la FPLD et la HGPS qui comportent une accumulation cellulaire de prélamine A. Une étude a montré que, lors de l'inactivation d'un allèle *lmna* dans la souris *zmpste24^{-/-}* (souris *zmpste24^{-/-} lmna^{+/-}*) entraînant la diminution de l'expression de la prélamine A, une réversion partielle du

phénotype mutant est observée avec au niveau cellulaire une réduction du nombre de noyaux déformés. (Fong et al. 2004) Ces résultats sont en faveur d'un effet pathologique dose-dépendant de la prélamine A farnésylée et encouragent donc l'utilisation d'inhibiteurs de la farnésyl-transférase comme stratégie thérapeutique.

Les inhibiteurs de la farnésyl-transférase (FTI) ont été développés au début des années 1990 pour leurs effets antinéoplasiques (grâce à l'inhibition de l'activation de l'oncoprotéine Ras par défaut de farnésylation). Plusieurs laboratoires ont très vite montré les effets bénéfiques de ces inhibiteurs sur les dysmorphies nucléaires des cellules HGPS en culture (Capell et al. 2005, Glynn et al. 2005, Toth et al. 2005, Yang et al. 2005) ainsi que sur des modèles animaux. (Fong et al. 2006, Capell et al. 2008, Yang et al. 2008) Malgré le fait que les FTI inhibent probablement la farnésylation d'autres protéines et que l'étendue des effets cellulaires de ces inhibiteurs n'est pas encore connue, ces inhibiteurs apparaissent sans danger, comme il a été montré dans une étude clinique en oncologie. (Doll et al. 2004) Dans la progeria, le FTI lonafarnib (Sarasar, Schering Plough Corporation) a été bien toléré durant des périodes de plusieurs mois. L'essai clinique a été initié en 2007 avec une cohorte de 26 patients atteints de progéria âgés de 3 à 16 ans. L'administration de lonafarnib pendant au moins 2 ans a permis des améliorations de la rigidité vasculaire et de la structure osseuse, un gain de poids (Gordon et al. 2012) ainsi qu'une diminution du risque d'accident vasculaire cérébral (Ullrich et al. 2013) bien que ces améliorations soient variables d'un patient à l'autre.

Néanmoins, il a été montré que la prélamine A, en présence de FTI, avait la capacité à subir une prénylation alternative sous la forme d'une géranylgéranylation, ce qui pourrait limiter leur efficacité thérapeutique. (Varela et al. 2008, Verstraeten et al. 2008) Ainsi, les essais thérapeutiques actuels dans la progeria, pour contourner ce possible échappement thérapeutique, utilisent une thérapie multiple, associant la pravastatine et le bisphosphonate zoledronate, avec éventuellement du lonafarnib, pour inhiber à plusieurs niveaux la voie du mévalonate (Figure 26). Les premiers résultats de l'essai américain ayant utilisé cette stratégie montrent une amélioration de la survie des patients. (Gordon et al. 2012)

2- Dégradation de la prélamine A farnésylée par la rapamycine

La rapamycine, un antibiotique de la classe des macrolides, interfère avec l'inhibition de l'autophagie par mTOR, activant ainsi ce processus. L'autophagie est un mécanisme de dégradation intracellulaire physiologique, principalement destiné à éliminer les organites

endommagés, mais est également impliqué dans l'élimination des protéines altérées. (Madeo et al. 2010, Mizushima et al. 2011)

Dans des fibroblastes HGPS, la rapamycine augmente l'élimination de la progérine par autophagie, améliorant les défauts de structure nucléaire et retardant la sénescence. (Cao et al. 2011, Cenni et al. 2011) Récemment, une étude de Cenni et al. (Cenni et al. 2014) a montré que le traitement de cellules mutées pour la dysplasie acro-mandibulaire par la rapamycine, qui présentent des niveaux faibles de la sirtuine NAD-dépendante (SIRT-1) dans la matrice nucléaire, permet de restaurer la localisation de SIRT-1 et la distribution de marqueurs de la chromatine et d'induire un raccourcissement de la phase S, prolongée lors de la MAD. Cependant, la rapamycine n'a pas été efficace dans les cellules mutées issues de patients atteints de dermatopathie restrictive (DR), probablement en raison de l'absence totale de lamine A mature, qui contribue probablement majoritairement au phénotype cellulaire dysfonctionnel observé dans la DR. Le traitement médicamenteux des laminopathies présentant un défaut de maturation de la prélamine A doit donc tenir compte de plusieurs facteurs, y compris des niveaux et de la fonctionnalité de la lamine A mature. (Cenni et al. 2014)

3- Inhibition de l'activité de NAT10

Récemment, il a été mis en évidence que l'inhibition de l'activité lysine transférase de NAT10 (N-acetyltransférase 10), liée au complexe SUN, par des petites molécules comme la remodeline, améliore le phénotype de fibroblastes HGPS avec une diminution des dysmorphies nucléaires, du nombre de cassures double brin de l'ADN et de la sénescence cellulaire, ainsi qu'une amélioration de l'organisation de la chromatine. (Larrieu et al. 2014) Ces molécules pourraient donc être des nouvelles stratégies afin de traiter les laminopathies.

4- Thérapies par ARN

La mutation impliquée dans la progéria conduit à la formation d'un site d'épissage alternatif de l'ARN pré-messager. La progéria est donc un candidat intéressant pour une approche thérapeutique par ARN via l'inhibition ou l'élimination de ce site. (Gordon et al. 2014b)

A- Correction de l'épissage de l'ARN pré-messager

L'utilisation de morpholinos, des oligonucléotides anti-sens, en bloquant le site d'épissage de l'ARNm créé par le changement de C en T chez les patients HGPS, semble être une application potentielle. L'utilisation de ces molécules reverse la dysmorphie nucléaire des

fibroblastes HGPS, restaure la localisation nucléaire et le niveau d'expression des protéines associées à la lamina, corrige les modifications des histones spécifiques de l'hétérochromatine et, enfin, rétablit l'expression normale de gènes. (Scaffidi et al. 2005) L'équipe de Nicolas Lévy a appliqué cette stratégie avec succès dans un modèle souris de progéria (*Lmna*^{G609G/G609G}) conduisant à une amélioration de la croissance et de la longévité de ces souris. (Osorio et al. 2011)

B- Elimination de l'ARNm

En utilisant un ARNsh (short hairpin RNA) qui reconnaît spécifiquement l'ARNm mutant responsable de la HGPS, une équipe a montré une diminution du niveau d'expression de la progérine (de 26% ou moins) dans des fibroblastes HGPS, permettant de considérablement réduire les hernies nucléaires et d'améliorer le potentiel réplicatif de ces cellules. (Huang et al. 2005a) Le phénotype mutant de ces cellules n'est pas complètement restauré par l'utilisation de cet ARNsh, probablement à cause de l'impossibilité de maintenir l'expression de cet ARNsh, ce qui constitue donc une limite pour cette thérapie. Une autre difficulté importante est de pouvoir délivrer cette construction génétique aux tissus, comme la paroi artérielle qui est particulièrement touchée chez les patients HGPS.

5- Traitement par remplacement de cellules

L'implication des cellules souches de tissus dans le phénotype des laminopathies fait émerger l'idée de thérapies de remplacement cellulaire en utilisant soit des cellules sauvages soit des cellules souches générées à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) corrigées de patients. Cependant, cette thérapie de remplacement cellulaire fait encore face à de nombreux challenges. (Gordon et al. 2014b)

6- Thérapie génique

La prélamine A farnésylée, agissant de manière dominante négative dans la cellule, l'approche génique visant à corriger le gène de la lamine A est une thérapie qui semble intéressante.

Liu et al. ont montré que l'utilisation des vecteurs adénoviraux HDAdVs (helper-dependent adenoviral vectors) est une méthode efficace pour corriger des mutations dans des iPSC et peut également être efficace dans des cellules souches mésenchymateuses humaines. Cette approche pourrait être utilisée pour générer des lignées cellulaires génétiquement modifiées utilisables en thérapeutique. (Liu et al. 2011)

Partie III

Le virus de l'immunodéficience humaine et les comorbidités des patients infectés

Une nouvelle épidémie qui se transforma rapidement en pandémie dévastatrice est apparue dans les années 1980, caractérisée par une forte augmentation du nombre d'affections opportunistes, notamment chez des personnes immunodéprimées. Des particules virales responsables de ce syndrome ont été isolées et le terme de Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) a été adopté, en 1986, par l'ensemble de la communauté scientifique. Au cours des 30 dernières années, des progrès considérables dans les options thérapeutiques ont été réalisés.

Le VIH est un membre de la famille des rétrovirus du genre lentivirus. Les infections dues à des lentivirus sont cytopathogènes et évoluent typiquement de façon chronique avec une longue période de latence clinique et une réplication virale persistante. L'infection par le VIH conduit au stade évolutif tardif du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). (Rolston et al. 1986) Le VIH existe sous deux formes: le VIH de type 1 (VIH-1) et de type 2 (VIH-2). Le principal agent responsable du SIDA dans le monde est le VIH-1, tandis que le VIH-2 est limité à certaines régions d'Afrique centrale et de l'Ouest. Les deux virus peuvent potentiellement causer le SIDA, cependant, le VIH-2 apparaît comme moins virulent que le VIH-1 et l'évolution de l'infection est plus longue pour arriver au stade du SIDA.

Au cours de ma thèse, je me suis focalisée sur les traitements antirétroviraux utilisés pour limiter la réplication du VIH-1.

Les thérapies de combinaisons d'antirétroviraux ciblant la réplication virale ont été développées à partir de la fin des années 1990 et ont transformé le VIH d'une maladie progressive à issue fatale en une maladie chronique et les patients ont vu leur espérance de vie augmenter. Après l'initiation d'une thérapie antirétrovirale, la charge plasmatique virale

diminue à des concentrations inférieures à la limite de détection des tests biologiques disponibles chez la plupart des patients, habituellement dans les 3 mois.

I- Espérance de vie des patients infectés par le VIH

Le nombre de décès dus au VIH était de 2,3 millions en 2005 contre 1,6 millions en 2012. Les traitements antirétroviraux (ARV) ont permis une augmentation de la durée de vie des patients infectés par le VIH. Une des cause de cette augmentation est la forte diminution du taux de décès observée peu après la mise à disposition de traitements antirétroviraux, (Mocroft et al. 1998, Palella et al. 1998) et cette diminution reste soutenue au cours du temps. (Mocroft et al. 2003) Malgré cela, le risque de développer des comorbidités, telle que des maladies cardiovasculaires, des cancers infectieux ou non infectieux non classant SIDA, une ostéoporose, des maladies du foie, des reins et un possible déclin neurocognitif, est plus élevé que dans la population générale.

Un grand écart entre l'espérance de vie de la population générale et celle d'un individu infecté par le VIH est cependant toujours observé. En effet, un patient commençant une thérapie à l'âge de 20 ans peut s'attendre à vivre environ 43 ans supplémentaires, soit près des deux tiers seulement du temps de vie de la population générale. (Antiretroviral Therapy Cohort 2008)

II- Structure et génome du VIH-1

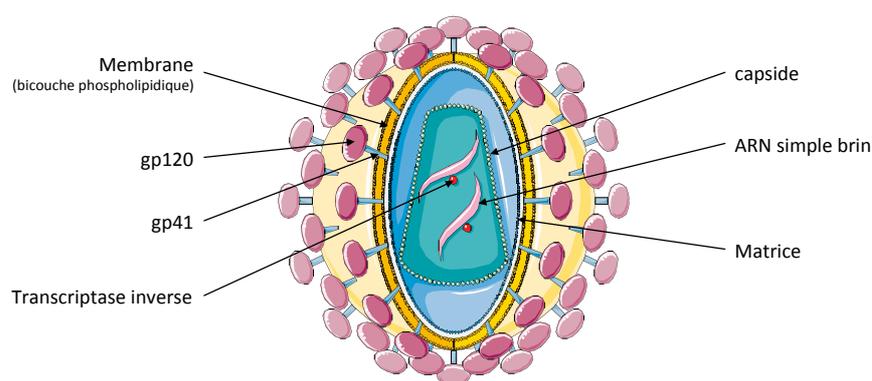


Figure 27 : Structure du virion infectieux du VIH-1

Les particules virales du VIH ont un diamètre de 100 nm et sont entourées par une membrane riche en lipoprotéines. Le génome du rétrovirus a une taille de 9,8 kb et est composé de deux copies identiques d'une molécule d'ARN simple brin. (Figure 27)

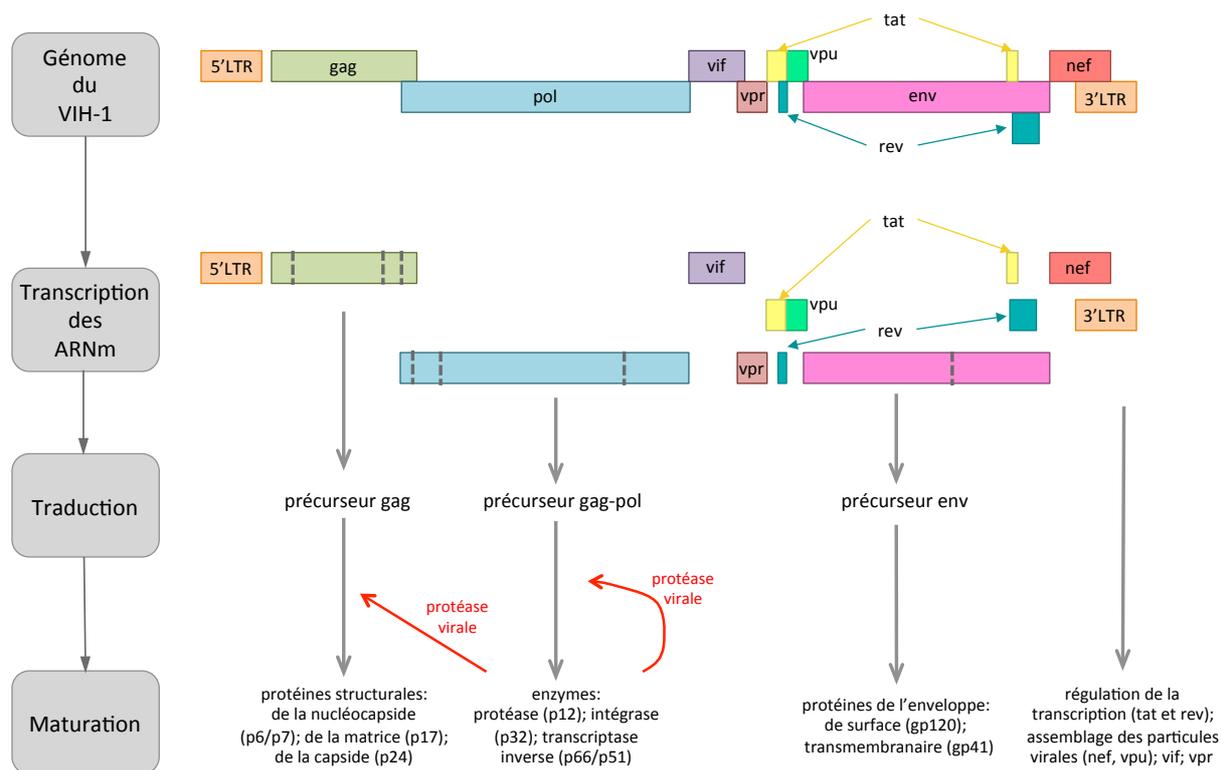


Figure 28 : Génome et protéines du VIH-1
D'après (Nielsen et al. 2005)

Le génome du VIH-1 est composé de neuf gènes dont trois codant pour les protéines structurales : (i) le gène gag codant pour le précurseur peptidique gag, contient quatre domaines impliqués dans la morphogénèse virale : p17 (domaine de liaison à la matrice), p24 (permettant la structuration de la capsid), p6 (impliqué dans le bourgeonnement des nouveaux virions) et p7 (formant la nucléoplasmide) ; (ii) le gène pol, exprimé sous forme d'un précurseur gag-pol, code pour les principales protéines enzymatiques virales qui vont permettre la réplication du virus. Il s'agit de la transcriptase inverse qui assure la rétro-transcription des brins d'ARN en ADN, de l'intégrase qui induit l'intégration de l'ADN viral (provirus) dans le génome cellulaire et de la protéase virale, responsable de la maturation des virions infectieux ; et (iii) le gène env, codant pour le précurseur protéique env, est mûré et clivé pour donner les glycoprotéines de l'enveloppe virale, la gp120 (protéine de surface) et la gp41 (protéine transmembranaire) liées de façon non covalente, qui permettent la reconnaissance des cellules cibles par le virus. (Figure 28)

Le génome du VIH-1 code aussi pour deux protéines régulatrices : (i) la protéine Tat (transactivating factor), qui active la transcription des gènes viraux et jouerait aussi un rôle

dans l'affaiblissement du système immunitaire en induisant la production d'IL-10, une cytokine fortement immunosuppressive (Badou et al. 2000, Bennasser et al. 2001, Bennasser et al. 2002) ; et (ii) la protéine Rev (regulator of expression of virions proteins), impliquée dans l'augmentation de l'expression de gènes viraux ainsi que dans l'encapsidation de l'ARN génomique. (Grewe et al. 2010) (Figure 28)

Enfin, le génome du VIH-1 code pour des protéines accessoires : (i) la protéine Nef (Negative Regulatory Factor) régule négativement l'expression des CMH de classe I et des récepteurs CD4. (Goldsmith et al. 1995) Ce mécanisme facilite la dissémination du virus pour l'infection de nouvelles cellules ; (ii) la protéine Vpu (Viral Protein Unique) interagit avec les CD4, entraînant alors leur dégradation et le relargage des nouveaux virions infectieux. (Strebel 2013) ; (iii) la protéine Vpr (Viral Protein R) serait impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2. (Cui et al. 2006, DeHart et al. 2007) La signification de cet arrêt du cycle cellulaire n'est pas bien connue, cependant, la phase G2/M serait associée à une intense réplication virale ; enfin (iiii) la protéine Vif (Viral infectivity factor) régule l'assemblage et la maturation des virions au moment de la formation de la particule virale et fait partie du complexe de transcription inverse. (Kishi et al. 1992, Potash et al. 1998) (Figure 28)

III- Cycle de réplication du VIH-1

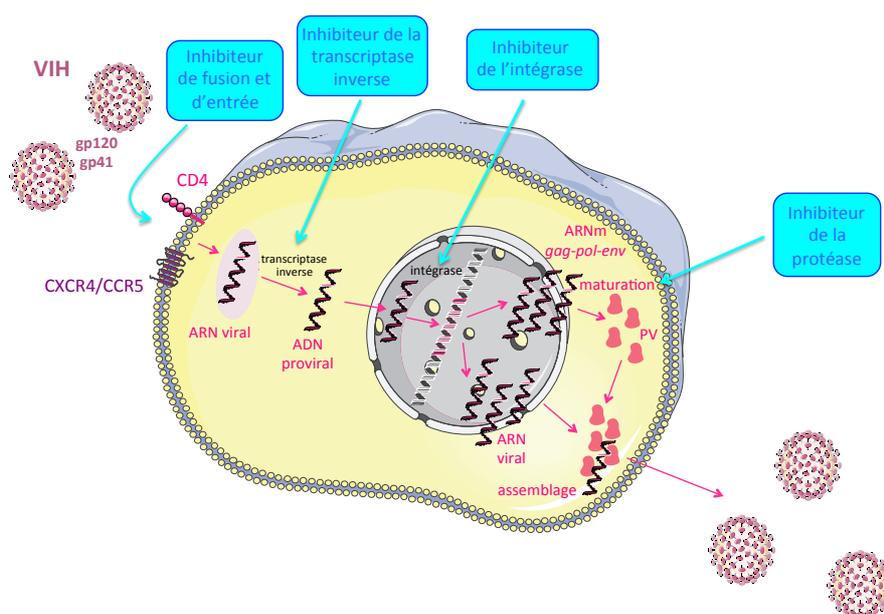


Figure 29 : Le cycle de réplication du VIH-1

Le cycle de réplication comprend plusieurs étapes que je vais vous présenter succinctement, sur lesquelles agissent les antirétroviraux afin de bloquer la prolifération virale. (Figure 29)

1- Reconnaissance et fixation du virus sur les cellules cibles

La reconnaissance de la glycoprotéine virale gp120 par le récepteur monomérique CD4 présent à la surface des cellules cibles est la première étape du cycle de réplication du VIH. (Bour et al. 1996) La molécule CD4 est exprimée à la surface des lymphocytes T, précurseurs des cellules T dans le thymus et la moelle osseuse, monocytes/macrophages, éosinophiles, cellules dendritiques et microgliales du système nerveux central. Elle stabilise l'interaction avec les molécules du CMH de classe II présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Le CD4, bien qu'il soit nécessaire, n'est pas suffisant pour médier l'entrée du virus par fusion.

2- Entrée du virus

Les principaux co-récepteurs de VIH-1 appartiennent à la superfamille des récepteurs à 7 segments transmembranaires couplés aux protéines G. Pour le VIH-1, le co-récepteur CXCR4 est utilisé par les virus à tropisme lymphocytaire et le co-récepteur CCR5, par les virus à tropisme macrophagique.

La liaison entre la gp120 et le CD4 entraîne un changement conformationnel de la glycoprotéine, lui permettant d'interagir avec les co-récepteurs CCR5 ou CXCR4. Cette nouvelle interaction entraîne une modification structurale de la gp41, entraînant un rapprochement des membranes virale et cellulaire. La formation d'un pore de fusion permet alors à la nucléocapside virale de pénétrer dans le cytoplasme de la cellule cible.

3- Transcription inverse

La transcription inverse permet de rétro-transcrire un ARN simple brin viral en ADN simple brin dans un premier temps puis en ADN double brin. (Figure 29) Ces deux étapes sont possibles grâce à la transcriptase inverse virale qui possède à la fois une activité transcriptase inverse et une activité nucléase H. Au cours de cette étape, de nombreuses mutations dans le génome viral ont lieu car la transcriptase inverse n'a pas d'activité correctrice. (Mansky et al. 1995) Ces mutations induisent l'apparition de plusieurs espèces virales chez un même individu infecté contribuant à l'inefficacité de la réponse immune et à l'échappement thérapeutique.

L'étape de décapsidation suit la transcription inverse. (Arhel et al. 2007) Cette étape est encore mal comprise, mais elle semble passer par des modifications de la protéine de la capsid. (Cartier et al. 1999)

4- Intégration et expression de l'ADN viral

L'ADN viral produit va être intégré dans le génome de la cellule hôte par une enzyme, l'intégrase. L'intégration et l'expression de l'ADN proviral requièrent que la cellule cible soit dans un état activé. Les monocytes/macrophages, cellules microgliales et les cellules T CD4+ quiescentes infectées contiennent des provirus intégrés et sont d'importants réservoirs cellulaires du VIH.

Lorsque la cellule est activée, la transcription de l'ADN proviral en ARN messager a lieu. Les ARN messagers viraux migrent dans le cytoplasme où les protéines virales (PV) structurales sont synthétisées afin de créer de nouveaux virions. (Figure 29)

5- Fabrication et relargage de nouvelles particules virales

Le clivage des précurseurs par la protéase du VIH-1 est nécessaire pour la génération de nouvelles particules virales infectieuses. La formation de nouvelles particules virales est un processus comprenant plusieurs étapes : deux brins d'ARN viraux s'associent ensemble avec des enzymes de réplication tandis que des protéines du core s'assemblent autour afin de former la capsid virale. Dans les lymphocytes T, le bourgeonnement a lieu à la surface cellulaire et les virions sont relâchés dans l'espace extracellulaire, alors que dans les monocytes et macrophages, le bourgeonnement résulte d'une accumulation de virions dans des vacuoles intracellulaires qui sont alors libérées.

IV- Traitements de l'infection par le VIH

1- Objectifs et développement des traitements antirétroviraux

L'objectif principal du traitement ARV est d'empêcher la progression vers le SIDA et le décès en maintenant ou en restaurant, si possible, un nombre de CD4 > 500/mm³.

Pour atteindre ce but et diminuer les effets pathogènes du VIH, le traitement ARV doit rendre la charge virale plasmatique indétectable, restaurer l'immunité, limiter le risque de sélection de virus résistants et réduire la morbidité associée au VIH.

Si l'efficacité immunovirologique est l'objectif principal du traitement ARV, d'autres objectifs doivent être recherchés simultanément, notamment (i) la meilleure tolérance possible, clinique et biologique, à court, moyen et long termes du traitement, (ii) l'amélioration ou la préservation de la qualité de vie et (iii) la diminution du risque de transmission du VIH.

Au moment des premières études sur le SIDA, les cliniciens pouvaient uniquement traiter les infections opportunistes associées à la maladie, et cela, avec un succès limité. Lorsque le VIH a été identifié comme particule responsable et que son cycle de réplication a été caractérisé, les chercheurs ont pu commencer à investiguer des approches antirétrovirales.

La première étape dans la thérapie du VIH a été faite en 1987 quand il a été montré que l'azidothymidine, initialement utilisé comme traitement anti-cancéreux, permettait de bloquer l'étape de transcription inverse et diminuait la mortalité et les infections opportunistes des patients atteints du SIDA. Cependant, des résistances virales se sont rapidement développées. (Goldschmidt 1993) De nouvelles molécules thérapeutiques ont donc été développées toujours dans le but de bloquer le cycle de réplication du VIH et, en particulier, la stavudine de plus grande efficacité et mieux tolérée. Une décennie plus tard, une avancée importante a été faite avec l'introduction d'une thérapie combinant plusieurs médicaments afin de limiter le développement de la résistance et de permettre de mieux contrôler le virus. (Aboulker et al. 1993, Weiss et al. 2008)

Il existe aujourd'hui plusieurs classes d'antirétroviraux: les inhibiteurs de la protéase virale (IPs) et les inhibiteurs de la transcriptase inverse de type analogues nucléosidiques (NRTIs) ou non-nucléosidiques (NNRTIs). Plus récemment des inhibiteurs de fusion, des antagonistes de CCR5, et des inhibiteurs de l'intégrase ont été développés. (rapport Morlat, 2014)

Des études ont montré que la combinaison de thérapies antirétrovirales avec par exemple l'introduction d'un IP en parallèle de deux NRTIs permettait de réduire de façon spectaculaire la morbidité et la mortalité des patients. (Ho et al. 1995, Hammer et al. 1997, Palella et al. 1998)

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à plusieurs molécules dont je vais développer ici plus particulièrement le mécanisme d'action.

2- Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Trois types d'inhibiteurs de la transcriptase inverse sont utilisés en clinique: les inhibiteurs nucléosidiques (NRTIs), les inhibiteurs nucléotidiques (NtRTIs), et les inhibiteurs non-nucléosidiques (NNRTIs).

A- Inhibiteurs nucléosidiques (NRTIs) et nucléotidiques (NtRTIs) de la transcriptase inverse

Les NRTIs ont été les premiers antirétroviraux commercialisés, dès 1987, avec la mise sur le marché de l'azidothymidine (AZT) et de la zidovudine (ZDV). Depuis, cette classe continue de s'élargir et demeure une composante primordiale dans les combinaisons antirétrovirales.

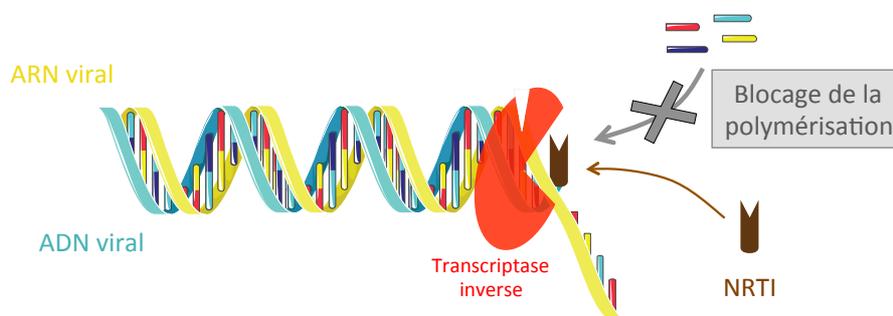


Figure 30 : Mode d'action des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTI)

Le mode d'action des NRTIs et NtRTIs est globalement le même. Ce sont des pro-drogues qui doivent subir une triphosphorylation intracellulaire afin de donner des analogues nucléosidiques actifs (déoxynucléosides triphosphates) qui vont pouvoir moduler la transcriptase inverse. Ce sont des inhibiteurs compétitifs qui, une fois incorporés à la place des nucléosides naturels dans la chaîne d'ADN en cours de formation, vont conduire à l'interruption de son élongation. En effet, l'absence de fonction hydroxyle en 3' dans les NRTIs empêche l'incorporation de nouveaux nucléotides lors de la polymérisation. (Cihlar et al. 2010) Les NRTIs jouent alors le rôle de terminateur de chaîne, l'élongation de la chaîne d'ADN s'arrêtant en leur présence. (Figure 30)

L'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé), ex-AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé) a, à ce jour, approuvé sept NRTIs (Lamivudine 3TC, zidovudine AZT, abacavir ABC, stavudine d4T, zalcitabine ddC, didanosine ddi et Emtricitabine FTC) et un NtRTI (ténofovir TDF).

Deux associations fixes de NRTI sont recommandées préférentiellement en raison de leur efficacité, leur tolérance et leur simplicité d'emploi (un comprimé par jour) : ténofovir /emtricitabine et abacavir/lamivudine. Actuellement, les recommandations privilégient l'utilisation d'une des deux combinaisons de NRTIs nommées ci-dessous, avec une autre molécule, NNRTI ou IP ou inhibiteur d'intégrase.

B- Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTIs)

Contrairement aux NRTIs ou aux NtRTIs, les NNRTIs ne nécessitent pas d'étape de phosphorylation avant d'agir dans la cellule. Ce sont des inhibiteurs non compétitifs qui se fixent directement sur le site catalytique de la transcriptase inverse, entraînant une modification structurale de l'enzyme, la rendant alors inactive. (Joly et al. 2000) Par ce mode d'action, les NNRTIs bloquent l'élongation de la chaîne d'ADN lors de la transcription. (Figure 31)

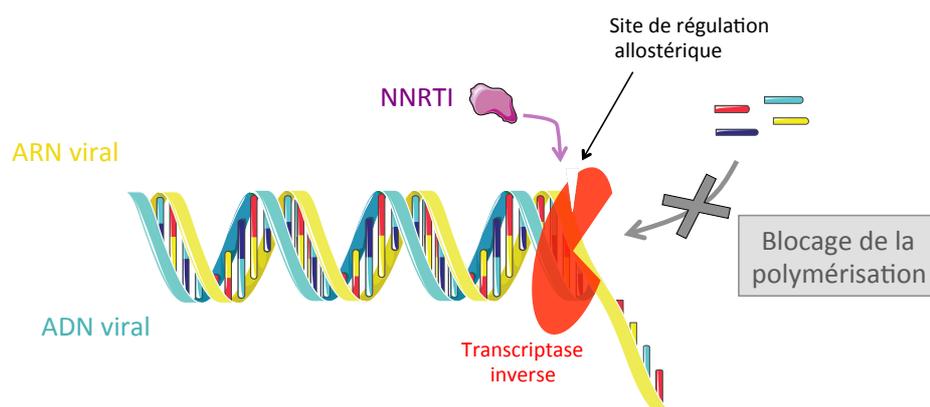


Figure 31 : Mode d'action des inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTI)

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

3- Les inhibiteurs de la protéase virale

Les inhibiteurs de l'aspartyl protéase virale (IPs) agissent en inhibant l'enzyme nécessaire à l'assemblage des protéines virales nouvellement synthétisées et donc, en prévenant la maturation des virions infectieux. Les IPs sont des « peptidomimétiques », c'est-à-dire qu'ils miment les substrats naturels de la protéase, et se lient de manière compétitive sur le site actif de la protéase. (Michaud et al. 2012) Les IPs ne nécessitent aucune étape de

phosphorylation pour être actifs, à la différence des INTIs. (Katlama et al. 2007) (Figure 32)

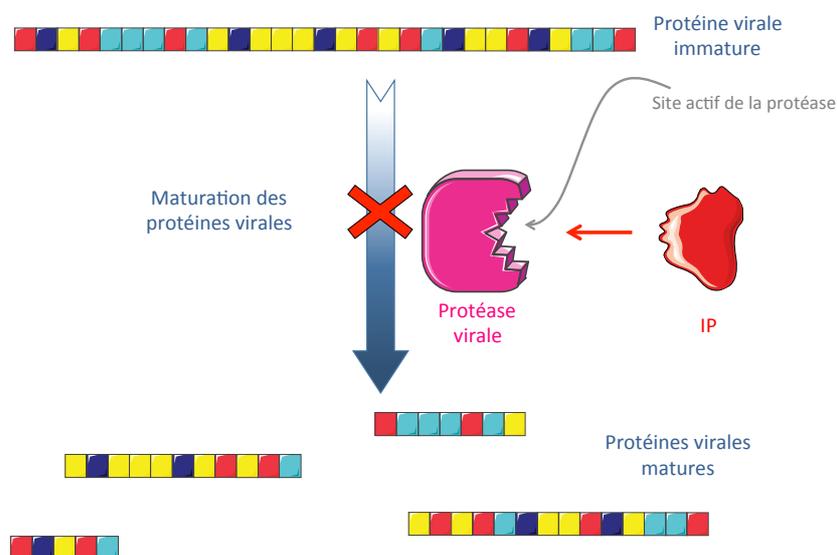


Figure 32 : Mode d'action des inhibiteurs de la protéase virale (IPs)

Actuellement, il existe sept IPs : indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), amprénavir (APV), lopinavir (LPV), ritonavir (RTV), saquinavir (SQV), atazanavir (ATV), darunavir (DRV) et tipranavir (TPV). L'apparition des IPs a permis de réduire la morbidité et la mortalité, néanmoins il existe des interactions médicamenteuses, et des effets indésirables pour cette classe de médicaments. (Winston et al. 2005)

Les IPs, ayant un motif semi-peptidique, ont une demi-vie courte due à leur dégradation par des enzymes protéolytiques et présentent donc une faible biodisponibilité. Ils sont très hydrophobes et sont dégradés, dans le foie, par les cytochromes P450 (CYP3A4) qui les convertissent en produits polaires avant leur élimination. (Moyle et al. 2001, Michaud et al. 2012)

Le ritonavir (RTV) est l'IP qui a la plus forte affinité pour le cytochrome CYP3A4, il est donc utilisé comme « booster » puisque sa co-administration à faible dose (100 à 200mg/jour) permet de conserver la concentration sérique des IPs qui lui sont associés et donc leur efficacité pour diminuer la charge virale. (Condra et al. 2000, Michaud et al. 2012) L'association lopinavir/ritonavir a beaucoup été utilisée en France ; actuellement les associations d'IPs privilégiées comportent atazanavir et ritonavir, ou darunavir et ritonavir. (Morlat 2014)

A- Atazanavir associé au ritonavir *versus* lopinavir associé au ritonavir

L'atazanavir associé au ritonavir (ATV/r) a été comparé au lopinavir associé au ritonavir (LPV/r) dans l'essai CASTLE chez 833 patients naïfs en association avec

ténofovir/emtricitabine. En terme d'efficacité virologique, la non-infériorité d'atazanavir a été démontrée. La réponse immunologique à 48 semaines est identique dans les deux bras, cependant, la tolérance lipidique est un peu meilleure pour l'ATV/r. (Molina et al. 2008 , Molina et al. 2010)

B-Darunavir associé au ritonavir *versus* lopinavir associé au ritonavir

Le darunavir associé au ritonavir (DRV/r) a été comparé au LPV/r dans l'essai randomisé ARTEMIS chez 689 patients naïfs. Sur le plan de l'efficacité virologique, la non-infériorité du darunavir a été démontrée. Une efficacité virologique supérieure a également été montrée dans le sous-groupe des patients ayant une charge virale initiale supérieure à 5log copies/mL. L'efficacité immunologique est identique mais la tolérance clinique, notamment digestive et la tolérance lipidique sont meilleures pour DRV/r. (Ortiz et al. 2008, Mills et al. 2009)

4- Les inhibiteurs de l'intégrase

Ces inhibiteurs agissent en bloquant le site actif de l'intégrase, ce qui empêche l'insertion de l'ADN viral dans le génome cellulaire. (Cocohoba et al. 2008) (Figure 33) Trois inhibiteurs d'intégrase ont une autorisation de mise sur le marché : le raltégravir (RAL), l'elvitegravir (EVG), et le dolutégravir (DTG).

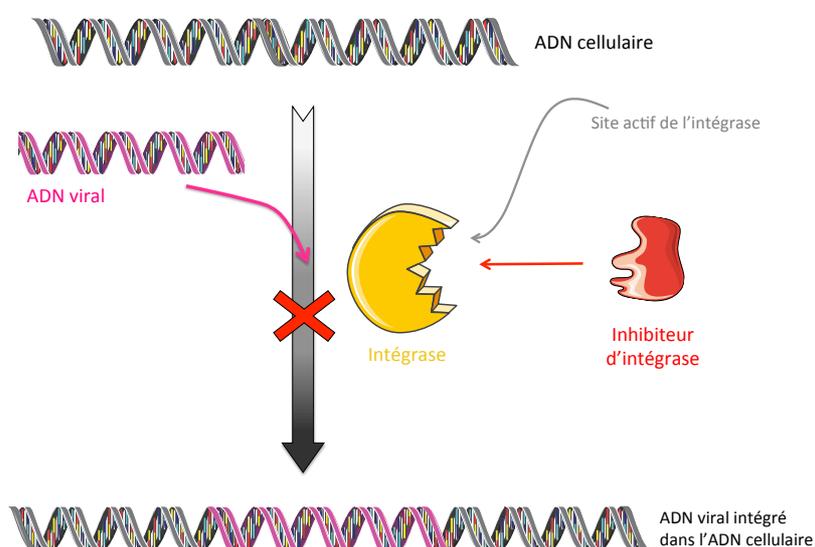


Figure 33 : Mode d'action des inhibiteurs de l'intégrase

L'efficacité et la tolérance du dolutégravir ont été évaluées dans deux essais randomisés en double aveugle contre placebo: SPRING-2 et SINGLE.

SPRING-2 compare le dolutégravir et le raltégravir en association avec le ténofovir/emtricitabine ou l'abacavir/lamivudine chez 822 patients naïfs. (Raffi et al. 2013) La non-infériorité virologique

du dolutégravir à 48 semaines a été démontrée. La fréquence et la nature des effets indésirables n'étaient pas différentes (avec 2 % d'effets indésirables). Le DTG présente une meilleure résistance aux mutations et une demi-vie plus longue que le RAL. (Metifiot et al. 2013) SINGLE comparait dolutégravir associé à l'abacavir/lamivudine avec l'association fixe de référence ténofovir/emtricitabine/efavirenz chez 831 patients naïfs. (Walmsley S., 52nd ICAAC, San Francisco, 2012, abstract H-556b) L'essai a démontré la supériorité virologique à 48 semaines de l'association dolutégravir/abacavir/lamivudine. En terme de tolérance, il y a eu significativement moins d'arrêts de traitement pour effet indésirable ou de décès dans le bras dolutégravir/abacavir/lamivudine (2 % vs 10 %). Dans aucun de ces deux essais, il n'a été observé de sélection de mutations de résistance aux inhibiteurs de l'intégrase ou aux INTIs dans les situations d'échec virologique.

Le dolutégravir entraîne une augmentation de l'ordre de 10 % de la créatininémie. (Koteff et al. 2013) Néanmoins, dans les deux essais, il n'y a pas eu d'arrêt du DTG pour toxicité rénale.

5- Les inhibiteurs d'entrée

Cette classe d'ARV comprend les inhibiteurs de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique et les inhibiteurs d'adhésion de l'enveloppe virale aux corécepteurs cellulaires. Il existe un seul inhibiteur de fusion sur le marché : l'enfuvirtide (T20).

Le Maraviroc (MVC) est un antagoniste sélectif du corécepteur CCR5, qui inhibe la liaison de gp120 à CCR5. (Figure 34) Le MVC n'est donc efficace que contre les lignées virales utilisant le CCR5 comme porte d'entrée. Le tropisme viral des patients doit donc être testé avant l'utilisation du MVC. De plus, une résistance au MVC est induite par un changement de tropisme des virus de CCR5 vers CXCR4 au cours du traitement. (Haqqani et al. 2013)

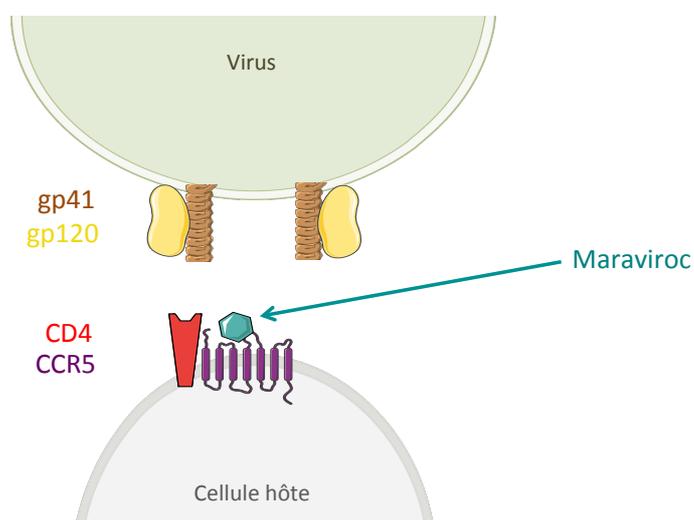


Figure 34 : Mode d'action d'un inhibiteur d'entrée, le maraviroc

6- Pharmacologie des traitements antirétroviraux

Des études pharmacocinétiques ont permis de définir les valeurs thérapeutiques optimales de chaque molécule antirétrovirale. Les concentrations sériques minimales et maximales mesurées entre deux prises chez les patients infectés (C_{min} et C_{max}) ont été mesurées, de même que l'ASC (aire sous la courbe du graphique représentant la concentration plasmatique d'un traitement en fonction du temps). (Bazzoli et al. 2010)

Les concentrations plasmique et tissulaire des traitements sont des facteurs importants de leur efficacité. Pour cela, leur absorption, distribution, métabolisme et excrétion doivent être optimaux. Les transporteurs membranaires et les enzymes responsables de leur métabolisme sont donc des déterminants majeurs de leur biodisponibilité.

Les transporteurs impliqués dans le passage des ARV sont de deux groupes : la superfamille de transporteurs ABC (ATP-binding cassette proteins), et la superfamille de transporteurs SLC (solute carrier proteins). Les transporteurs ABC permettent le passage des molécules contre leur gradient de concentration en utilisant de l'ATP (transport actif), alors que les transporteurs SLC permettent un transport passif dans le sens du gradient de concentration. Les transporteurs ABC sont présents dans les cellules épithéliales et endothéliales, et sont surtout impliqués dans l'efflux et l'élimination des ARV, tandis que les transporteurs SLC sont majoritairement responsables de l'influx. C'est le cas par exemple pour les IPs et les NNRTIs. (Cihlar et al. 2010) Les IPs possèdent une forte affinité pour le transporteur ABCB1, exprimé dans 30 à 80% des lymphocytes T, et responsable de l'efflux des molécules hors de la cellule. (Michaud et al. 2012)

Les enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP450) transforment les molécules liposolubles en molécules plus hydrosolubles. Comme décrit précédemment, les CYP450 sont impliqués dans le métabolisme et la clairance des IPs, mais aussi des NNRTIs, du MVC et de l'EVG.

V- Complications

Dès 1995, les trithérapies de première génération comportant une combinaison de molécules antirétrovirales avec un IP (tel que l'indinavir) et deux INTIs (tels que AZT ou D4T) ont montré leur efficacité pour le contrôle de la charge virale. L'état général des patients s'est

rapidement amélioré mais progressivement, les études cliniques ont montré que ces traitements pouvaient induire d'une part, des résistances et d'autre part, des complications de type lipodystrophie associant un remodelage du tissu adipeux et des troubles métaboliques. Ces nouvelles données ont poussé les chimistes et pharmacologues à générer des molécules de nouvelle génération moins toxiques et induisant moins de résistance. D'autre part, les laboratoires de recherche, dont notre équipe, se sont concentrés sur la toxicité de ces molécules au niveau cellulaire et tissulaire. Ces études qui se poursuivent actuellement sur les dernières molécules thérapeutiques, permettent de donner des arguments aux cliniciens afin d'écartier des traitements les molécules les plus toxiques et, inversement, d'introduire celles dont l'innocuité est avérée.

A l'heure actuelle, grâce au développement de molécules antirétrovirales de plus en plus efficaces, le contrôle de la charge virale est assuré chez la majorité des patients infectés par le VIH. Cependant, l'amélioration de l'état de santé global de ces patients reste incomplète à cause des multiples comorbidités que ces personnes développent, notamment une lipodystrophie, des dyslipidémies, un diabète, des complications rénale, hépatique, osseuse, pulmonaire et/ou un risque cardiovasculaire, ainsi qu'un vieillissement accéléré.

1- Anomalies de répartition du tissu adipeux : les lipodystrophies

A- Apparition et mise en évidence des lipodystrophies

Lors des traitements antirétroviraux de première génération, des modifications de la répartition du tissu adipeux associées à un syndrome métabolique, avec en particulier une résistance à l'insuline et/ou un diabète, et une dyslipidémie, ont été décrits par les cliniciens. (Carr et al. 2000, Grinspoon et al. 2005) Les patients présentaient une perte importante de tissu adipeux au niveau du visage et des membres associée ou non à une accumulation de tissu adipeux viscéral. La redistribution de la masse graisseuse et la progression vers un syndrome métabolique interviennent en général dans les trois années après le début du traitement antirétroviral. (Wand et al. 2007)

Les ART sont clairement impliqués dans les phénotypes lipodystrophiques, en effet, les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTIs) induisent plutôt une lipoatrophie, alors que les inhibiteurs de la protéase (IPs) entraînent une hypertrophie de la

graisse du tronc. (Caron-Debarle et al. 2010b) L'atteinte du tissu adipeux a été confirmée au niveau cellulaire et tissulaire par l'analyse de l'effet des antirétroviraux sur les marqueurs de différenciation adipocytaire sur des préadipocytes murins et humains en culture et en évaluant les mêmes marqueurs sur des biopsies de tissu adipeux de patients infectés par le VIH lipodystrophiques. (Caron et al. 2001, Bastard et al. 2002, Caron et al. 2003, Caron et al. 2004, Caron et al. 2007b) Des études expérimentales du laboratoire ont montré que l'IP indinavir et les INTI, D4T et AZT, altèrent la différenciation adipocytaire et induisent des dysfonctions cellulaires telle qu'une altération de la fonction mitochondriale, un stress oxydatif et une inflammation. (Caron et al. 2001, Caron et al. 2004, Walker et al. 2006, Lagathu et al. 2007) En accord avec ces données, Kim et al. ont analysé le tissu sous-cutané de patients infectés par le VIH avant et six mois après l'arrêt du traitement antirétroviral. Ils ont montré que l'arrêt des IP était associé à une amélioration de la différenciation adipocytaire et des fonctions mitochondriales. (Kim et al. 2007)

B- Différentes formes de lipodystrophies

Sous le terme de lipodystrophie, deux formes cliniques sont à différencier (i) la lipoatrophie qui correspond à une fonte du tissu adipeux principalement au niveau des membres, des fesses et du visage ; et (ii) la lipohypertrophie correspondant à une accumulation de tissu adipeux se retrouvant principalement au niveau du tronc (périviscéral abdominal), des seins, de la partie supérieure du cou et de la région cervicale (bosse de bison). (Figure 35)



Figure 35 : Photographies de patients infectés par le VIH présentant une accumulation de tissu adipeux viscéral (à gauche), une lipoatrophie faciale (au milieu) et une bosse de bison (à droite)

Le patient peut avoir une seule ou les deux présentations cliniques. Par exemple, les patients infectés par le VIH traités par les premières générations de NRTIs (D4T, AZT) ont présenté fréquemment une lipoatrophie des membres et du visage. La lipohypertrophie de l'abdomen caractéristique du syndrome lipodystrophique est le plus souvent attribuée au traitement par les IPs. La prévalence des lipodystrophies a diminué et leur phénotype est passé ces dernières années de formes lipoatrophiques aux formes lipohypertrophiques, représentant un phénotype plus banal associé à un syndrome métabolique. Cependant, les lipohypertrophies, en particulier abdominales, restent fréquentes, conduisant à une augmentation du risque cardiométabolique et du diabète. (Brown et al. 2005, Caron-Debarle et al. 2010b)

De toute évidence, la lipodystrophie, en particulier l'augmentation de la graisse du tronc, est associée à inflammation systémique et constitue un facteur de risque de maladie cardiovasculaire. (Samaras et al. 2009, Guaraldi et al. 2010, Scherzer et al. 2011)

C- Facteurs de risque des lipodystrophies chez les personnes infectées par le VIH

Chez les patients infectés par le VIH sous traitement antirétroviral, les atteintes associées à la lipodystrophie, troubles métaboliques, dyslipidémies, diabète sont la résultante de facteurs génétiques et environnementaux, de l'infection par le VIH et en particulier de l'inflammation chronique et de l'activation immunitaire, mais aussi du traitement ARV. (Caron-Debarle et al. 2010a) En effet, les traitements antirétroviraux peuvent jouer un rôle primordial dans la mise en place de ces anomalies, notamment les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTIs) et les inhibiteurs de la protéase (IPs). En effet, les INTIs inhibent l'ADN-polymérase γ mitochondriale entraînant une déplétion d'ADN mitochondrial et une toxicité mitochondriale conduisant à une production d'espèces réactives de l'oxygène. Dans les adipocytes, ces traitements induisent une lipolyse et une apoptose, ainsi qu'une sénescence prématurée. (Caron et al. 2004, Caron et al. 2008)

2- Les dyslipidémies

A- Développement de dyslipidémies chez les patients infectés par le VIH et traités

Les études cliniques rapportent fréquemment des atteintes du métabolisme lipidique chez les patients infectés par le VIH sous traitement antirétroviral. Le rôle des molécules antirétrovirales et du VIH lui-même a été avancé. El Khoury et al. ont démontré le rôle du VIH dans l'homéostasie du cholestérol plasmatique. En effet, le plasma et les lipoprotéines

HDL de sujets infectés par le VIH naïfs de traitement antirétroviral présentent une altération dans leurs capacités à stimuler l'efflux de cholestérol *via* ABCA1, le principal transporteur d'efflux dans les macrophages humains. Ce phénomène peut contribuer à augmenter les complications cardio-vasculaires observées chez les patients vivants avec le VIH. De façon intéressante, l'équipe montre aussi un rôle bénéfique de la thérapie antirétrovirale pour restaurer la capacité d'efflux de HDL-c depuis les macrophages humains. (El Khoury et al. 2015)

Cependant, les antirétroviraux peuvent avoir, selon la molécule utilisée, un impact direct sur le métabolisme des lipides et du glucose. (Lake et al. 2013, Gundurao Sreekantamurthy et al. 2014) Par exemple, le ritonavir a un effet direct hépatique sur la production de VLDL avec une hyperLDLémie et une hypertriglycéridémie dès les premiers mois du traitement. Son utilisation en « booster » peut suffire à modifier les paramètres lipidiques. Au contraire, l'atazanavir et le darunavir sont les IPs qui entraînent le moins de troubles lipidiques. (Gotti et al. 2012, Overton et al. 2012) Des anomalies lipidiques peuvent aussi être observées avec les INTIs et les INNTIs. L'efavirenz est responsable d'une augmentation des triglycérides et du cholestérol total, alors que la névirapine a un profil lipidique favorable avec une augmentation du cholestérol HDL. L'étravirine et la rilpivirine ont, au contraire, un profil lipidique neutre. (Lennox et al. 2010) Les données de tolérance des inhibiteurs de l'intégrase ou du CCR5 montrent que ces molécules n'ont pas ou peu d'effet sur les lipides. (MacInnes et al. 2011)

Il faut souligner que le virus du VIH est un facteur de risque à part entière. La charge virale doit donc être systématiquement mesurée afin d'évaluer le risque. (Lang et al. 2012)

B- Facteurs de risque et prise en charge d'une dyslipidémie

a- Facteurs de risque

Les recommandations officielles du Conseil National du Sida et de l'ANRS (Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les hépatites virales) (Rapport Morlat 2013, actualisation 2014) indiquent de prendre en compte les facteurs de risque cardiovasculaire suivants pour le choix de l'objectif thérapeutique des concentrations de cholestérol LDL plasmatiques à atteindre :

- L'âge: 50 ans ou plus pour les hommes et 60 ans ou plus pour les femmes ;
- Les antécédents familiaux de maladie coronaire précoce avec (i) infarctus du myocarde ou mort subite avant l'âge de 55 ans chez le père ou chez un parent du premier degré de sexe

masculin, (ii) infarctus du myocarde ou mort subite avant l'âge de 65 ans chez la mère ou chez un parent du premier degré de sexe féminin ;

- Un tabagisme actuel ou arrêté depuis moins de 3 ans ;
- Une hypertension artérielle permanente traitée ou non ;
- Un diabète sucré ;
- Un HDL-cholestérol inférieur à 0,40 g/L (1 mM/L) quel que soit le sexe ;
- Un LDL-cholestérol supérieur à 1,60 g/L ;
- Une infection par le VIH avec (i) ARN VIH non contrôlé, (ii) nadir des CD4 < 200/mm³, (iii) CD8 > 800/mm³, (iiii) exposition cumulée > 10 ans aux inhibiteurs de la protéase ; ainsi que la présence d'un facteur protecteur : un HDL-cholestérol > 0,60 g/l (1,5 mmol/l).

b- Traitements

Tout sujet ayant un LDL-cholestérol > 1,60 g/l (4,1 mmol/l), ainsi que tout sujet ayant au moins un facteur de risque cardiovasculaire, doit bénéficier d'une prise en charge diététique, afin de modifier son mode de vie et son alimentation, associée à une activité physique régulière. De même, une prise en charge des facteurs de risque associés est nécessaire, tels que le tabagisme, le diabète de type 2 et l'hypertension artérielle. Lorsqu'un traitement médicamenteux est nécessaire, plusieurs classes de médicaments peuvent être prescrites, notamment l'utilisation de statines qui ont été montrées efficaces dans la diminution des lipides sanguins et, potentiellement bénéfiques pour diminuer le risque cardiovasculaire chez les patients infectés par le VIH. (Feinstein et al. 2015) Néanmoins, il faut adapter le choix de la statine utilisée en fonction des possibles interactions médicamenteuses avec les antirétroviraux, en particulier ceux dont le catabolisme fait intervenir la voie du CYP3A4.

c- Cas du patient VIH

L'objectif de valeur du cholestérol LDL doit être atteint préférentiellement par les interventions hygiéno-diététiques et la modification du traitement antirétroviral, avant d'envisager un traitement spécifique. L'infection par le VIH et les traitements antirétroviraux favorisant les hyperlipidémies, l'identification d'une combinaison antirétrovirale ayant la même efficacité et un effet dyslipidémiant moindre est nécessaire. En cas d'échec, ces patients doivent être traités comme les patients non infectés par le VIH, en choisissant les hypolipémiants présentant le risque le plus faible d'interactions médicamenteuses avec les traitements du VIH.

3- Le risque cardiovasculaire

A- Anomalies cardiovasculaires chez les patients infectés par le VIH et traités

En France, les maladies cardiovasculaires constituent la 3ème cause de décès des patients infectés par le VIH. En effet, les facteurs de risque cardiovasculaire et l'incidence des syndromes coronariens aigus sont augmentés chez les patients infectés par le VIH (versus des sujets contrôles appariés selon l'âge). (Triant et al. 2007) De plus, le risque d'infarctus du myocarde est plus élevé que dans la population générale. (Lang et al. 2010a) Des quantités importantes de protéine C-réactive et d'interleukine-6 (IL-6) circulantes, deux marqueurs inflammatoires, ont été montrées comme significativement associées à une augmentation du risque de mortalité des patients infectés par le VIH sans traitement antirétroviral, et particulièrement au risque de mortalité cardiovasculaire. (Kuller et al. 2008) De surcroît, des dysfonctions diastoliques ventriculaires gauches et une rigidité vasculaire plus importante sont des phénomènes plus fréquents chez les patients infectés par le VIH (versus des sujets contrôles). (Cerrato et al. 2013)

L'athérosclérose est l'atteinte cardiovasculaire la plus communément retrouvée chez les patients infectés par le VIH. (Escarcega et al. 2014) L'étude de Post et al. a d'ailleurs montré une augmentation de la prévalence et de l'étendue des plaques d'artères coronaires chez les patients infectés par le VIH, suggérant un risque d'évènements cardiovasculaires plus élevé. (Post et al. 2014) En accord avec ces données, une augmentation de la vulnérabilité des plaques athérosclérotiques d'artères coronaires humaines a été montrée chez les patients infectés par le VIH en comparaison à des personnes non infectées par le VIH. (Zanni et al. 2013) De surcroît, l'apparition d'une calcification des artères coronaires (CAC) est avancée d'environ 15 ans chez les personnes infectées par le VIH. (Guaraldi et al. 2009, Guaraldi et al. 2011) (Figure 36)

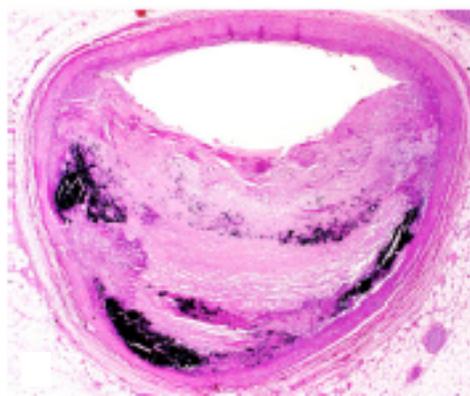


Figure 36 : coupe d'artère calcifiée d'un patient infecté par le VIH-1

D'après (Micheletti et al. 2009)

Les zones calcifiées sont en noires. (Coloration H&E, grossissement x12,5)

B- Facteurs de risque des complications cardiovasculaires

L'augmentation du risque cardiovasculaire des patients infectés par le VIH *versus* la population générale est expliquée par trois facteurs: les facteurs de risque traditionnels, les traitements antirétroviraux et le virus du VIH. (Lang et al. 2012, Boccarda et al. 2013) (Figure 37)

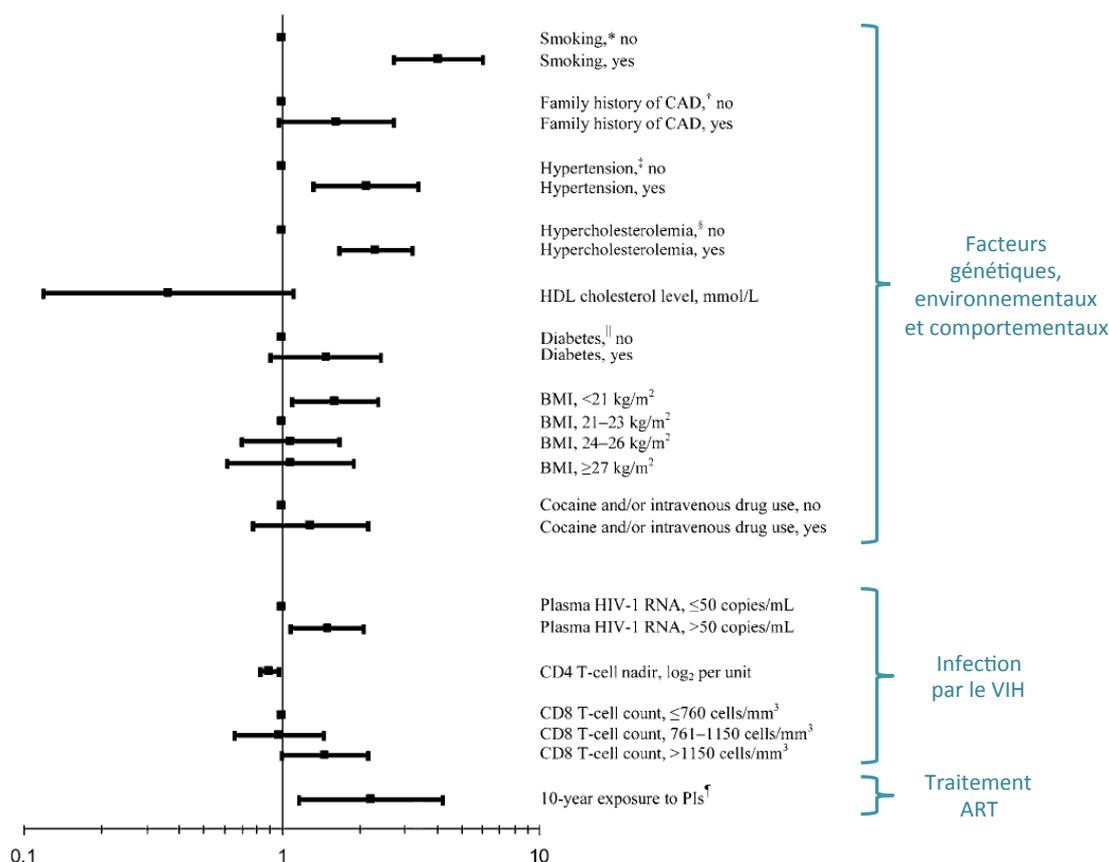


Figure 37 : Facteurs de risques prédictifs de la survenue d'infarctus du myocarde dans la cohorte FHDH
D'après (Lang et al. 2012)

a- Facteurs de risque traditionnels

Une augmentation des facteurs de risque génétiques, environnementaux et comportementaux, principalement le tabagisme, l'hypertension, l'hypercholestérolémie et l'indice de masse corporelle, mais aussi la prise de substances illicites telles que la cocaïne, est observée chez les patients infectés par le VIH. (Bergersen 2006, Kaplan et al. 2007, Tesoriero et al. 2010)

b- Le virus du VIH

Les effets propres du VIH sur les atteintes cardiovasculaires ont été décrits dans l'essai SMART. (Strategies for Management of Antiretroviral Therapy Study et al. 2006) Il a été montré que le VIH est un facteur de risque d'athérosclérose, notamment par son effet sur l'épaisseur de

l'intima-media. Le rôle de la réplication virale et d'un rapport CD4/CD8 bas comme des facteurs favorisant l'athérosclérose ont aussi été mis en évidence. (Grinfeld et al. 2009, Ross et al. 2009) De plus, l'activation immune persistante induite par le VIH lui-même semble être un facteur de risque accru pour développer une athérosclérose et un infarctus du myocarde. (Lang et al. 2012)

Il faut noter que les traitements antirétroviraux ont eu dans un premier temps des effets bénéfiques sur le risque cardiovasculaire lié au virus lui-même. En diminuant la charge virale, ils améliorent les marqueurs d'atteinte cardiovasculaires. Cependant, certains antirétroviraux par leurs effets propres peuvent s'avérer toxiques lors des traitements à long terme. (Deeks et al. 2009)

c- L'exposition aux antirétroviraux :

– Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse

Des données récentes ont montré le risque accru d'événements cardiovasculaires lors d'un traitement avec l'abacavir. Cependant, aucun lien n'a été établi entre cet ARV et le risque d'infarctus du myocarde. (Costagliola et al. 2010, Ding et al. 2012)

Un sur-risque a aussi été mis en évidence lors d'une exposition cumulée aux analogues de la thymidine dans une cohorte Française, cependant, ce risque n'a pas été retrouvé dans l'étude D:A:D. (Lang et al. 2010b, Worm et al. 2010)

– Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse

Aucun effet de l'exposition aux NNRTIs n'a été, à ce jour, mis en évidence sur le risque d'infarctus. (Lang et al. 2010b, Worm et al. 2010)

– Inhibiteurs de la protéase

L'exposition cumulée aux IPs, notamment à l'indinavir, au lopinavir, à l'amprénavir, mais pas au saquinavir, a été associée de façon robuste au risque d'infarctus du myocarde. (Lang et al. 2010b, Worm et al. 2010) Cet effet peut s'expliquer, en partie, par la dyslipidémie, l'insulinorésistance et le diabète de type 2 induits par ces IPs, et les effets ne semblent pas être différents que l'inhibiteur soit utilisé ou non avec le ritonavir. Cependant, tous les IPs n'augmentent pas le risque d'infarctus du myocarde. En effet, dans la cohorte D:A:D, aucun lien n'a été observé entre l'atazanavir et le risque d'infarctus du myocarde. (Monforte et al. 2013)

Des études expérimentales effectuées dans notre laboratoire ont permis de mettre en évidence les effets directs du lopinavir associé au ritonavir et du ritonavir seul sur les cellules

endothéliales vasculaires humaines en culture et les cellules mononucléées circulantes (PBMCs) issues de patients infectés par le VIH et traités par des IP, mettant ainsi en lumière le rôle important joué par ces traitements sur les complications vasculaires observées chez les patients. En effet, les inhibiteurs de la protéase induisent une sénescence, un stress oxydant, une inflammation et une accumulation de prélamine A dans les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines. (Lefevre et al. 2010)

Toutefois, aucune étude expérimentale n'avait jusqu'à ce jour étudié les relations entre les traitements antirétroviraux et les dysfonctions des cellules musculaires lisses vasculaires, et notamment, sur le développement de la calcification.

C- Évaluation et prise en charge du risque cardiovasculaire

D'après ces données, il apparaît donc particulièrement important d'évaluer le risque d'infarctus chez tous les patients en identifiant et en comptabilisant le nombre de facteurs de risque cardiovasculaire sans oublier les antécédents familiaux de maladie coronaire précoce. La recommandation est d'éviter un traitement à long terme par les IP chez un patient ayant un niveau de risque élevé.

Le rapport Morlat (2014) indique que la prise en charge et la prévention du risque cardiovasculaire, doit commencer, en prévention primaire, par un bilan régulier des personnes infectées par le VIH, en particulier après 50 ans. L'objectif principal est d'identifier les patients à haut risque cardiovasculaire et de leur proposer une prise en charge thérapeutique dont l'efficacité sur la réduction de la morbidité cardiovasculaire a été démontrée dans la population générale (aspirine, hypolipémiants, antihypertenseurs).

Une personne est définie à haut risque cardiovasculaire lorsque qu'elle a (i) un score de risque de maladie coronaire à 10 ans supérieure à 20 % (score de Framingham) ; (ii) déjà présenté une maladie coronaire ou vasculaire avérée (accident vasculaire cérébral ou artériopathie des membres inférieurs > au stade 2) ; (iii) un diabète de type 2 avec une atteinte rénale (protéinurie > 300mg/24 heures ou clearance de la créatinine < 60 mL/mn), ou est diabétique avec au moins deux autres facteurs de risque cardiovasculaire incluant une microalbuminurie > 30 mg/24 heures). (Rapport Morlat 2014)

La prise en charge de ces patients à haut risque inclut en priorité un sevrage du tabagisme, mais aussi une éducation hygiéno-diététique. De plus, il est important d'envisager une modification du traitement antirétroviral avec remplacement de l'IP et une prise en charge d'une éventuelle dyslipidémie selon les recommandations spécifiques. Enfin, chez les patients à risque élevé de présenter un événement cardiovasculaire (score de risque à 10 ans supérieur à 20 %), une faible posologie d'aspirine est recommandée (75-325 mg/j) comme dans la population générale en prévention primaire.

4- Vieillesse au cours de l'infection par le VIH

A- Notion de vieillissement chez les patients infectés par le VIH

Grâce à l'efficacité des traitements antirétroviraux, les personnes vivant avec le VIH ont une espérance de vie augmentée. Les données de la cohorte Française FHDH ANRS CO4 montrent qu'en 2011, 40 % des hommes et 26 % des femmes infectés par le VIH avaient plus de 50 ans, et que 13 % des hommes et 8 % des femmes avaient plus de 60 ans. (Mary-Krause et al. 2014)

La notion de vieillissement prématuré ou accentué chez les personnes vivant avec le VIH est discutée. Une question débattue est de savoir si le VIH entraîne un vieillissement accéléré du patient infecté (en utilisant des voies et des mécanismes communs au vieillissement physiologique) et/ou si le VIH est un facteur de risque supplémentaire pour des maladies chroniques conduisant à une augmentation de la prévalence de ces maladies à tous les âges. (High et al. 2012, Pathai et al. 2014)

La notion de vieillissement accentué chez les personnes infectées par le VIH est basée sur l'observation que les patients sont plus fréquemment touchés par des comorbidités classiquement associées au vieillissement à un âge plus jeune que des personnes séronégatives. (Capeau 2011) En effet, ces patients développent plus tôt des maladies telles que des pathologies cardiovasculaires ischémiques dont l'infarctus du myocarde, des troubles métaboliques, une ostéoporose, des troubles neurocognitifs, une sarcopénie, une insuffisance rénale et hépatique, des cancers non classant Sida. (Effros et al. 2008, Deeks et al. 2009) De surcroît, les multi-morbidités, c'est-à-dire l'occurrence simultanée de plusieurs maladies chroniques (deux ou plus) chez un même individu, sont d'apparition précoce chez les patients infectés par le VIH. (Kim et al. 2012) Toutefois, la courbe de répartition des âges des patients infectés par le VIH est

différente de celle de la population générale, avec une plus forte proportion de personnes âgées dans la population générale. Après ajustement de la distribution pour cette différence, les différences d'âge moyen de diagnostic de certaines comorbidités sont modestes. (Costagliola 2014)

B- Mécanismes impliqués dans le vieillissement prématuré des patients infectés par le VIH

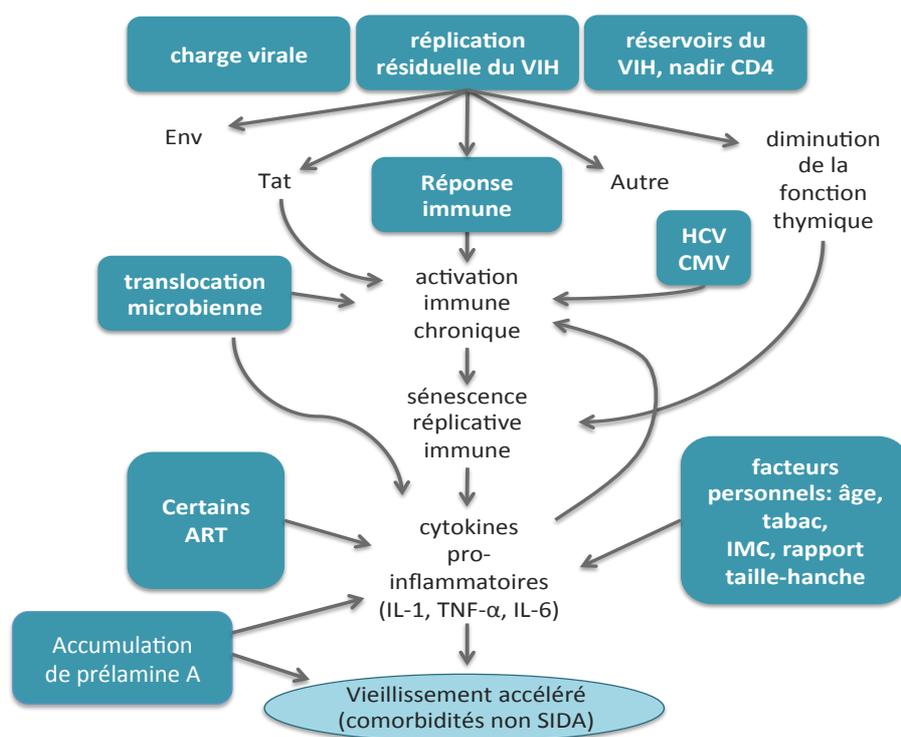


Figure 38 : Facteurs impliqués dans le vieillissement des patients infectés par le VIH

D'après (Deeks et al. 2012)

Plusieurs études ont montré que le VIH lui-même mais aussi les traitements antirétroviraux utilisés sont à l'origine de cette survenue précoce des comorbidités. (Figure 38) En effet, les principaux marqueurs du vieillissement, stress oxydant, dysfonctions mitochondriales, diminution de la longueur des télomères et de l'activité de la télomérase sont observés dans des lymphocytes T de patients infectés par le VIH et traités par des antirétroviraux. (Ballon et al. 2001, Leeansyah et al. 2013, Torres et al. 2014)

Dans des études expérimentales effectuées sur des cellules endothéliales d'artère coronaire humaine (Lefevre et al. 2010) mais aussi sur d'autres types cellulaires (préadipocytes, fibroblastes, cellules souches mésenchymateuses) (Caron et al. 2001, Bastard et al. 2002, Caron et al. 2003, Caron et al. 2004, Caron et al. 2007a, Lagathu et al. 2007, Caron et al. 2008, Boccara et al. 2010, Lefevre et al. 2010) au sein de notre équipe ont montré qu'un traitement chronique par certains IPs et/ou INTIs

induit la mise en place d'une sénescence et des dysfonctions cellulaires associées (dysfonction mitochondriale, stress oxydant, inflammation), associées à l'accumulation de prélamine A dans le cas des IPs, comme nous allons le discuter plus loin. Ces données montrent que certains antirétroviraux exercent des effets toxiques directs sur les cellules conduisant au déclenchement d'une sénescence prématurée.

Des protéines du VIH ont aussi été mises en avant comme facteur déclenchant de stress oxydant, d'autophagie, de dysfonctions mitochondriales dans plusieurs modèles cellulaires. (Torres et al. 2014) Notre équipe a d'ailleurs récemment mis en avant le rôle des protéines Tat et Nef dans la sénescence des cellules souches mésenchymateuses et l'altération de la différenciation ostéoblastique. (Beaupere et al. 2015) (Figure 38)

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer ce vieillissement accentué. L'infection chronique en diminuant progressivement les ressources immunitaires, entraîne un état d'immunosénescence. L'activation immunitaire liée à la présence du VIH même à faible taux dans des réservoirs, et un état inflammatoire chronique de bas grade en réponse à l'infection et aux traitements antirétroviraux, seraient à la base de la survenue précoce des comorbidités et donc du vieillissement prématuré. (Figure 38)

De nombreux facteurs peuvent être impliqués dans les phénomènes d'immunosénescence. En effet, l'activation immunitaire est augmentée chez les patients vivants avec le VIH en raison de la réplication virale chronique et de la présence éventuelle d'une surinfection par d'autres virus, tels que les cytomégalovirus. De plus, la translocation bactérienne intestinale, qui participe à l'inflammation chronique, et les modifications de perméabilité de l'intestin secondaires à l'infection virale sont connues comme des facteurs déclenchants de l'activation immune. (Appay et al. 2008) En accord avec ces hypothèses, des marqueurs de translocation bactérienne (comme le lipopolysaccharide) et de l'activation immune innée (comme les sCD14) ont été liés à des comorbidités neurocognitives et cardiovasculaires ainsi qu'à une surmortalité. (Kaplan et al. 2011, Lyons et al. 2011, Sandler et al. 2011) (Figure 38)

De manière intéressante, les niveaux circulants des sCD14 sont liés à ceux de l'interleukine 6 et de la protéine C réactive, deux marqueurs importants d'inflammation. Une augmentation de la concentration de ces marqueurs a été observée chez les patients infectés par le VIH bien

contrôlés en association avec une augmentation de la sur-mortalité. (Kuller et al. 2008, Neuhaus et al. 2010, Tien et al. 2010, Sandler et al. 2011)

Par conséquent, si l'on considère que l'augmentation de l'activation immune à long terme et l'inflammation chronique sont des acteurs majeurs dans le processus de vieillissement de la population générale, il est évident que, ces processus étant plus fortement activés chez les patients infectés par le VIH que dans la population générale, même lorsque l'infection est bien contrôlée, les patients infectés par le VIH seront donc plus enclins à développer des maladies liées à l'âge.

De plus, la persistance d'une réplication virale dans les réservoirs peut aussi expliquer l'apparition des comorbidités. Les macrophages résident dans un certain nombre de tissus atteints de comorbidités, comme le tissu adipeux, le foie, les os, la paroi vasculaire, et le cerveau. En conséquence, les réservoirs viraux macrophagiques en se répliquant et en libérant des protéines virales délétères et des cytokines pro-inflammatoires peuvent participer à l'activation immune dans ces tissus. (Figure 38)

Cet état va progressivement conduire à un épuisement des ressources immunitaires avec une diminution de la réponse anti-VIH. Une sénescence du système immunitaire va, de surcroît, entraîner la production de cytokines pro-inflammatoires participant alors à l'état pro-inflammatoire et au processus d'inflammaging. (Appay et al. 2010)

C- Syndrome de fragilité

Les personnes vivants avec le VIH ont une prévalence accrue, par rapport à la population générale de même âge, d'un syndrome dit « de fragilité » (« frailty ») représentant une diminution des réserves fonctionnelles, une augmentation de la vulnérabilité aux stress et aux agressions et un risque fortement accru de morbidité et mortalité. Dans la cohorte MACS, cette fragilité affecte 15 % de patients infectés par le VIH de 50-59 ans et 20 % des 60-69 ans, une proportion qui représente le double de celle des sujets de la cohorte non infectés par le VIH. (Desquilbet et al. 2007)

Ce syndrome est défini par la présence d'au moins 3 des 5 signes suivants : (i) diminution de la force de préhension ; (ii) allongement du temps de marche (testé sur 5 mètres) ; (iii) perte involontaire de plus de 5 % du poids corporel ; (iiii) report de fatigue évalué par un questionnaire ; et (iiiii) report de perte d'énergie évalué par un questionnaire.

5- Accumulation de prélamine A et complications des patients infectés par le VIH et traités : laminopathie acquise

L'étude principale de ma thèse porte sur la relation entre prélamine A et complications vasculaires induites par des traitements antirétroviraux. Toutefois, il est important de souligner que l'accumulation de prélamine A n'est pas toujours présente dans les cellules des patients infectés par le VIH et traités, et n'explique donc pas à elle seule, les complications de ces patients. D'autres études cliniques sont nécessaires pour comparer les niveaux cellulaires de prélamine A chez les patients infectés âgés ayant été soumis à un traitement de longue durée.

Des études tissulaires ont été réalisées par notre groupe qui a, en premier, montré la présence de prélamine A dans le tissu adipeux sous-cutané abdominal de patients infectés par le VIH, traités par des antirétroviraux comprenant des IPs et atteints de lipodystrophie. (Caron et al. 2007a) Ces patients peuvent ainsi être considérés comme atteints de laminopathie acquise, induite par les ART. Cette accumulation de prélamine A a aussi été retrouvée dans des cellules mononucléaires du sang périphérique de patients infectés par le VIH et traités par des IPs. (Lefevre et al. 2010)

In vitro, il a été mis en évidence que certains IPs agissent directement sur les cellules endothéliales, les fibroblastes et les adipocytes, notamment en induisant un stress oxydatif, une inflammation et une sénescence cellulaire. (Caron et al. 2007a, Lagathu et al. 2007, Lefevre et al. 2010) L'accumulation de prélamine A induite, au moins en partie, par la capacité de certains IPs à inhiber l'activité de la ZMPSTE24 (Coffinier et al. 2007, Coffinier et al. 2008, Hudon et al. 2008) joue probablement un rôle dans ces dysfonctions cellulaires. Ces IPs sont notamment associés à une augmentation de l'incidence de l'infarctus du myocarde et à une ostéoporose.

En accord avec ces résultats, Bonello-Palot et al. ont récemment montré qu'un traitement par l'atazanavir *in vitro* reproduit la sénescence prématurée liée aux défauts de maturation de la lamine A dans des cellules endothéliales primaires et progénitrices. (Bonello-Palot et al. 2014) Cette étude montre que l'accumulation de prélamine A dans les cellules endothéliales et les précurseurs endothéliaux déclenche leur programme de sénescence suite à un traitement par l'atazanavir *in vitro*. Cela conduit à une augmentation de l'adhésion des monocytes et à un défaut des fonctions angiogéniques des précurseurs.

Une étude comparative a été réalisée dans notre laboratoire entre le tissu adipeux sous-cutané cervical accumulé chez les patients FLPD porteur de mutations *LMNA* et du tissu issu de

« bosse de bison » (accumulation de tissu adipeux au niveau de la région cervicale postérieure) de patients infectés par le VIH. Cette analyse a montré que les deux tissus expriment de la prélamine A et montrent des anomalies cellulaires avec une augmentation du pourcentage de petits adipocytes, une augmentation de la fibrose sans caractéristique inflammatoire, et une diminution du nombre de vaisseaux sanguins en comparaison à des échantillons de sujets contrôles. De plus, le tissu cervical de patients porteurs de mutations *LMNA* et de patients infectés par le VIH montre une altération de l'expression de protéines adipogéniques et un remodelage en faveur d'un phénotype adipeux brun avec une surexpression d'UCP1 et une augmentation du nombre de mitochondries. (Bereziat et al. 2011)

Partie IV

Résultats

I- Etude 1 : Defective ZMPSTE24 expression plays a role in vascular smooth muscle cell calcification and senescence resulting from *LMNA* mutations or HIV antiretroviral treatment

Pauline Afonso, Martine Auclair, Franck Boccard, Marie-Christine Vantyghem, Christine Katlama, Jacqueline Capeau, Corinne Vigouroux, Martine Caron-Debarle

1- Introduction et objectifs de travail

A- Contexte

Comme décrit précédemment, une altération de la maturation de la lamine A peut être impliquée dans des dysfonctions des cellules vasculaires et, donc dans la mise en place précoce et le développement de maladies vasculaires, dont l'athérosclérose, une caractéristique commune du processus de vieillissement. En effet, une athérosclérose et des événements cardiovasculaires précoces sont observés dans la progéria de Hutchinson-Gilford, la lipodystrophie partielle familiale de Dunningan et dans des syndromes progéroïdes suite à différentes mutations du gène *LMNA*. (Capell et al. 2007, Olive et al. 2010, Gordon et al. 2012) De même, les patients infectés par le VIH-1 et traités par des antirétroviraux présentent un risque cardiovasculaire plus élevé, attribué à une augmentation des facteurs de risque traditionnels (tels que dyslipidémie et tabagisme), au virus du VIH-1 mais aussi aux traitements, notamment aux inhibiteurs de la protéase virale (IPs).

Ainsi, plusieurs études ont suggéré que les mutations *LMNA* et les IPs pourraient partager des mécanismes physiopathologiques partiellement similaires en ce qui concerne leurs actions sur les fonctions vasculaires.

Cette hypothèse a déjà été mise en avant dans plusieurs études, *in vivo* dans un modèle murin de progéria, et *in vitro* dans des cellules endothéliales et/ou des cellules musculaires lisses, montrant que les cellules mutées en R482W sur le gène *LMNA* présentent des dysfonctions liées à l'âge et des marqueurs de sénescence. (Varga et al. 2006, Bidault et al. 2013) De surcroît, l'exposition des cellules endothéliales vasculaires humaines à des IPs connus par les études cliniques pour leur toxicité au niveau cardiovasculaire, dérégule de nombreuses fonctions cellulaires, comme la sécrétion du NO et des molécules d'adhésion, la production d'espèces réactives de l'oxygène, le statut inflammatoire et la longévité. (Lefevre et al. 2010, Bonello-Palot et al. 2014)

La rétention de la prélamine A a été suspectée comme médiateur de nombreuses conséquences pathologiques des laminopathies. En effet, une augmentation du niveau cellulaire de prélamine A farnésylée ou de sa forme tronquée, la progérine, est associée à la sénescence cellulaire dans des cellules de patients atteints d'une progéria ou de patients ayant un syndrome progéroïde ou lipodystrophique. (Capanni et al. 2005, Caron et al. 2007a) De même, il a été montré que certains IPs, en inhibant directement l'activité de la ZMPSTE24, (Coffinier et al. 2007, Coffinier et al. 2008, Hudon et al. 2008) l'enzyme de maturation de la prélamine A en lamine A, induisent son accumulation sous forme farnésylée et déclenchent la sénescence et les dysfonctions cellulaires associées dans de nombreux modèles cellulaires. (Caron et al. 2007a, Lefevre et al. 2010, Auclair et al. 2014, Bonello-Palot et al. 2014) En accord avec cette hypothèse, une augmentation de la quantité de prélamine A est observée dans des artères calcifiées de donneurs âgés. De plus, la prélamine A est présente spécifiquement dans les CMLV sénescents des lésions athéroscléreuses. (Ragnauth et al. 2010, Liu et al. 2013) Ces données renforcent l'hypothèse de la participation de la prélamine A aux mécanismes physiologiques du vieillissement vasculaire, processus exacerbé chez certains patients lipodystrophiques porteurs de mutations *LMNA* et chez des patients infectés par le VIH et traités par des IPs.

B- Hypothèse de travail

Au cours de cette étude, nous sommes donc partis de l'hypothèse que les complications vasculaires observées chez les patients porteurs d'une mutations du gène *LMNA* et chez les

patients infectés par le VIH et traités par des IPs pourraient résulter d'un défaut de maturation de la prélamine A.

C- Objectif de travail

L'objectif de cette étude est d'établir un lien entre la prélamine A, son enzyme de maturation, la ZMPSTE24 et la mise en place de dysfonctions dans les cellules musculaires lisses vasculaires humaines, dont la transdifférenciation ostéoblastique suivie d'une calcification, et la sénescence, processus observés lors de l'athérosclérose physiologique.

En effet, aucune étude n'a à l'heure actuelle, analysé l'impact direct des mutations du gène *LMNA* et des traitements par les IPs sur les CMLV et n'a donc établi de lien formel entre ces mutations ou ces traitements et le phénotype de ces cellules, jouant un rôle important dans le développement de l'athérosclérose.

Pour cela, les CMVL humaines de sujets d'âge moyen ont été soit transfectées avec un des vecteurs exprimant le gène *LMNA* muté en D47Y, R133L ou R482W, soit traitées avec une des trois combinaisons d'antirétroviraux de type IP lopinavir/ritonavir (LPV/r), atazanavir/ritonavir (ATV/r), darunavir/ritonavir (DRV/r) aux doses voisines des Cmax.

Nous avons étudié différentes fonctions des CMVL, en évaluant des marqueurs de stress oxydant, d'inflammation, de sénescence et de transdifférenciation ostéoblastique ainsi que la calcification. Nous avons considéré particulièrement le rôle de la prélamine A farnésylée et de la ZMPSTE24 dans la mise en place de ces différentes dysfonctions.

D- Choix des mutations *LMNA* et des traitements antirétroviraux

Il a été observé en clinique que les patients lipodystrophiques porteurs de mutations du gène *LMNA* de type D47Y, R133L ou R482W développent des complications cardiovasculaires, dont une athérosclérose. (Hegele 2001, Caux et al. 2003, Bidault et al. 2013)

Les atteintes cardiovasculaires venant au premier rang des complications chez ces patients, et ne pouvant disposer de leurs cellules musculaires lisses vasculaires, nous avons choisi d'étudier l'impact direct de ces mutations après transfection dans des cellules musculaires lisses vasculaires humaines.

Les combinaisons d'IPs comportant du lopinavir ou de l'atazanavir associés au ritonavir ont été choisies pour le traitement des CMVL sur la base des études antérieures qui ont montré leur toxicité au niveau cellulaire (Lefevre et al. 2010, Auclair et al. 2014, Bonello-Palot et al. 2014) et en clinique. (Barbaro 2008, Lang et al. 2010b, Boccara et al. 2013) Parmi les IPs actuellement utilisés

dans les traitements, le lopinavir boosté par le ritonavir a été associée à un plus grand risque de maladie cardiovasculaire et à des dyslipidémies. (Boccard et al. 2013) Dans l'étude D: A: D, l'atazanavir n'est pas associé à un risque accru d'infarctus du myocarde, cependant, lorsqu'il est boosté par le ritonavir (ATV/r), les patients développent un profil lipidique athérogène. (Worm et al. 2010) La combinaison de darunavir associé au ritonavir (DRV/r) est, quant à elle, peu ou pas associée à des complications cardiovasculaires chez les patients traités et à des dysfonctions cellulaires *in vitro*. Les thérapies à base de darunavir sont considérées comme sûres et bien tolérées au niveau métabolique, la tolérance lipidique pour le DRV/r étant bonne. (Worm et al. 2010, Auclair et al. 2014)

2- Article soumis

*Abstract, Title Page, Manuscript, References, Legends

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

LMNA mutations resulting in lipodystrophy and HIV protease inhibitors trigger vascular smooth muscle cell senescence and calcification: role of ZMPSTE24 downregulation

Pauline Afonso^a, Martine Auclair^b, Franck Boccara^c, Marie-Christine Vantyghem^d, Christine Katlama^e, Jacqueline Capeau^f, Corinne Vigouroux^g, Martine Caron-Debarle^h

From ^{a,b,c,f,g,h} Inserm, UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, F-75012, Paris, France; ^e Inserm UMR_S 1136, F-75013 Paris, France; ^{a,b,c,e,f,g,h} Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, F-75005, Paris, France; ^c AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service de Cardiologie and ^g Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires, F-75012, Paris, France; ^f AP-HP, Hôpital Tenon, Service de Biochimie et Hormonologie, F-75020 Paris, France; ^d Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Service d'Endocrinologie et Métabolisme, F-59037 Lille, France; ^e AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, F-75013 Paris; ^{a,b,f,g,h} ICAN, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, F-75013, Paris, France

Correspondance to Corinne Vigouroux, INSERM UMR_S 938, Faculté de Médecine site Saint Antoine, 27 rue Chaligny, F-75012, Paris, France. corinne.vigouroux@inserm.fr
Tel: +33140011484; Fax: +33140011432

E-mail addresses of all the authors:

Pauline Afonso: pauline.afonso@inserm.fr
Martine Auclair: martine.auclair@inserm.fr
Franck Boccara: franck.boccara@aphp.fr
Marie-Christine Vantyghem: marie-christine.vantyghem@chru-lille.fr
Christine Katlama: christine.katlama@aphp.fr
Jacqueline Capeau: jacqueline.capeau@inserm.fr
Martine Caron-Debarle: martine.debarle@inserm.fr

Abstract

1
2
3
4
5 Background: Patients with lipodystrophies related to mutations in *LMNA* gene encoding A type-
6 lamins or HIV-infected on protease inhibitor (PI)-based therapy present early atherosclerosis.
7

8
9
10 Aim: We studied, in cultured human coronary artery vascular smooth muscle cells (VSMCs),
11 whether altered regulation of the metalloprotease ZMPSTE24, required for lamin-A maturation, and
12 prelamins-A accumulation could contribute to VSCM dysfunction.
13

14
15
16 Methods: VSMCs transfected with the lipodystrophy-associated mutant *LMNA* p.R482W, p.D47Y or
17 p.R133L or treated with several PIs were evaluated for oxidative stress, inflammation, senescence
18 and osteogenic transdifferentiation/calcification.
19
20

21
22
23 Results: Mutant *LMNA*-expressing and PI-treated VSMC presented to different extents increased
24 oxidative stress, inflammation, senescence, resulting in calcification (all $p < 0.05$). These alterations
25 were associated with accumulation of prelamins A and decreased expression of ZMPSTE24, which
26 were also observed in fibroblasts from *LMNA*-mutated lipodystrophic patients and in peripheral
27 blood mononuclear cells from PI-treated-HIV-infected patients. siRNA-mediated ZMPSTE24
28 silencing in native VSMCs recapitulated the mutant *LMNA* and PI-induced accumulation of
29 farnesylated prelamins A, premature senescence and calcification. The expression of miRNA-141-
30 3p, a negative regulator of ZMPSTE24, was enhanced in VSMCs expressing *LMNA* mutations or
31 PI-treated. Pravastatin, which inhibits farnesyl synthesis, or the antioxidant N-acetyl cysteine, partly
32 restored expression of ZMPSTE24, and concomitantly decreased oxidative stress, inflammation and
33 senescence, therefore reducing calcification of PI-treated VSMCs.
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Our results reveal that *LMNA* mutations or PI treatment linked to early atherosclerosis triggered
44 premature senescence and calcification of VSMCs, and that ZMPSTE24 downregulation was a
45 major contributor to these alterations. These novel pathophysiological mechanisms, which could
46 open new therapeutic perspectives, should be explored in cardiovascular aging.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Key Words: Vascular smooth muscle cells, ZMPSTE24, prelamin A, senescence, osteogenic transdifferentiation, atherosclerosis

Abbreviations

ALP	alkaline phosphatase
ART	antiretroviral therapy
ATV	atazanavir
DRV	darunavir
HIV	human immunodeficiency virus
LPV	lopinavir
M/R	maraviroc/raltegravir
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PIs	protease inhibitors
ROS	reactive oxygen species
RTV or r	ritonavir
Runx2	runt-related transcription factor 2
VSMCs	vascular smooth muscle cells

1. Introduction

1 It has been proposed that altered lamin A maturation could be involved in age-related
2 atherosclerotic cardiovascular diseases. Indeed, prelamin A accumulates in the arterial wall during
3 physiological aging, and colocalizes with degenerating and senescent vascular smooth muscle cells
4 (VSMCs) in atherosclerotic lesions [1,2].
5

6
7
8
9 Early atherosclerosis and cardiovascular events are cardinal features of several laminopathies due
10 to different mutations in the *LMNA* gene encoding A-type lamins associated with accumulation of
11 farnesylated prelamin A such as Hutchinson-Gilford progeria (HGPS), progeroid syndromes and
12 Familial Partial Lipodystrophy of the Dunnigan type (FPLD) [3-5]. In addition, mutations in the
13 metalloprotease ZMPSTE24, that releases the non-farnesylated mature lamin A, also result in
14 progeroid syndromes [42,43]. As well, human immunodeficiency virus-1 (HIV)-infected patients
15 display an increased cardiovascular risk, attributed to multiple synergic factors including the
16 frequently used antiretroviral protease inhibitors (PIs) that could induce prelamin A accumulation [6-
17 11]. Therefore, *LMNA* mutations and HIV PI-based therapies could share partially similar
18 pathophysiological mechanisms regarding vascular alterations. Their understanding could give new
19 insights into mechanisms involved in physiological vascular aging.
20
21
22
23
24
25
26
27

28
29 The *LMNA*-encoded prelamin A undergoes several steps of post-translational modifications,
30 including farnesylation and proteolytic cleavage. The toxicity of farnesylated prelamin A or its
31 truncated form progerin has been suspected to be involved in cellular senescence, observed in cells
32 from patients with *ZMPSTE24*- or *LMNA*-linked HGPS [12-14] and from related progeroid or
33 lipodystrophic syndromes [9,15]. As well, some PIs directly inhibit ZMPSTE24 activity [10,11,16],
34 promote farnesylated prelamin A accumulation, and cellular dysfunction and senescence in several
35 cellular models [9,17-19,33].
36
37
38
39
40
41

42 VSMCs contribute to the initiation of atherosclerosis. They transdifferentiate into osteoblast-
43 /chondrocyte-like cells, as a result, amongst other factors, of activation of osteoblastic transcription
44 factors as Runx2 and of oxidative and inflammation pathways [20,21]. Calcification of VSMCs is
45 associated with premature senescence [22,23]. Such biomineralization could lead to arterial
46 calcification and stiffening [24] as observed in patients with HGPS and *LMNA*-linked progeroid
47 syndromes [3,25]. Coronary artery calcium score, a marker of vascular age and subclinical
48 atherosclerosis [26], is increased in HIV-infected patients [27,28], and long-term antiviral therapy
49 including PIs is associated with vascular calcification [28-30].
50
51
52
53
54
55

56
57 In this study, we evaluated the effect of some *LMNA* mutations and HIV PIs on cultured human
58 VSMCs [9,15]. We show, for the first time, that overexpression of FPLD or progeroid syndromes-
59 associated *LMNA* mutations, and long-term treatment with ritonavir (r)-boosted PIs lopinavir (LPV),
60
61
62

1 atazanavir (ATV) or darunavir (DRV), triggered senescence and associated dysfunctions to different
2 extents in VSMCs, resulting in their osteoblastic conversion. We show that *LMNA*-mutated or PI-
3 treated VSMCs, as well as cells from patients harboring these mutations or treated with long-term
4 PI-based HIV antiretrovirals, display ZMPSTE24 downregulation resulting in persistent farnesylated
5 prelamin A accumulation, which played a major role in the observed pro-atherosclerotic alterations
6 of VSMCs. Our results suggest that downregulation of ZMPSTE24 could be a critical step during
7
8
9
10 pathological vascular aging.

11 12 13 14 **2. Material and methods**

15 **2.1. Cell culture and treatment**

16 Human coronary artery vascular smooth muscle cells (or VSMCs) were obtained from middle-aged
17 healthy donors (PromoCell, Heidelberg, Germany) and cultured from passages 2 to 8. The cells
18 were either transfected with void, wild-type or mutant *LMNA* expression vectors, or exposed for 21
19 days to clinically relevant concentrations (Cmax) of protease inhibitor (PI) combinations (LPV/r,
20 15.9/1.4; ATV/r, 7.4/1.3 or DRV/r 11.8/0.8 $\mu\text{mole/L}$, respectively) (Santa Cruz Biotechnology, CA)
21 [19], or to the solvent (0.1% dimethyl sulfoxide, DMSO). Pravastatin (25 $\mu\text{mol/L}$), etidronate
22 disodium hydrate (4 $\mu\text{mole/L}$) or N-acetyl cysteine (NAC, 1 mmol/L) were added along the PI
23 exposure (21 days) or for the last 10- or 4-days, respectively.
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **2.2. Patients with *LMNA* mutations or HIV infection**

34 We studied different heterozygous *LMNA* mutations, R482W responsible for Familial Partial
35 Lipodystrophy of Dunnigan (FPLD), and D47Y and R133L leading to atypical progeroid syndromes
36 [9,25]. These patients presented lipodystrophy, insulin resistance, dyslipidemia, liver steatosis and
37 premature atherosclerosis [5,25]. Fibroblasts were obtained from two healthy controls and from
38 patients with *LMNA* R482W (n=2) [31] D47Y (n=1) [9] or R133L (n=1) [25] mutations.
39
40
41
42

43 HIV-infected patients participated to the ANRS157 ROCnRAL study, [32]. At inclusion, five patients
44 (median age: 57 +/- 9 years) on long-term antiretroviral therapy with suppressed viremia were
45 switched to a regimen combining a CCR5-receptor antagonist (maraviroc) and an integrase inhibitor
46 (raltegravir). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected at enrollment and after 4
47 months of maraviroc/raltegravir therapy. Proteins were extracted as described [18] and the level of
48 prelamin A and ZMPSTE24 were quantified by Western blotting.
49
50
51
52
53

54 **2.3. Transfection assays of *LMNA* mutants**

55 Flag-tagged wild-type (WT) and D47Y-, R133L- and R482W-mutated prelamin A cDNA were cloned
56 in pSVK3 to yield WT or mutant lamin A expression vectors (GeneCust, Dudelange, Luxembourg).
57 VSMCs were transfected with WT or mutant *LMNA* vectors using PolyFect transfection reagent
58
59
60
61
62
63
64
65

(Qiagen, Courtaboeuf, France), and studied 7 days later. Transfection efficiency was evaluated by using anti-Flag M5 antibodies (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France).

2.4. Cell morphology and immunofluorescence microscopy

VSMCs were fixed in methanol and incubated with antibodies against alpha-smooth muscle (α -SM)-actin (A5228, Sigma-Aldrich), phospho-histone γ -H2AX (Ser 139) (05-636, Merck Millipore, Billerica MA), and prelamin A (sc-6214, Santa Cruz Biotechnology) and visualized by immunofluorescence microscopy [9]. Cell nuclei were stained with DAPI. For each condition, 100 to 150 cells were examined.

2.5. Western blotting

Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and Western blotting. Antibodies previously described [9, 19] or directed against osteocalcin (sc-18319, Santa Cruz Biotechnology), ZMPSTE24 (AP24156, Abgent, Inc, San Diego, CA), Runt-related transcription factor-2 (Runx2, AF-2006, R&D Systems, Minneapolis, MN), α -tubulin (T5168) or β -actin (A5441) (Sigma-Aldrich) were detected with a chemoluminescence detection kit (ThermoFischer Scientific, Villebon sur Yvette, France).

The antibodies sc-7292 recognize lamin A/C and prelamin A, and sc-6214 recognize prelamin A (Santa Cruz Biotechnology).

2.6. Senescence

Senescence was evaluated by the senescence-associated (SA)- β -galactosidase activity (X-gal staining at pH-6/pH-4), the presence of γ -H2AX-associated foci, and the protein expression of the senescence markers p16^{INK4}, p21^{WAF}, phospho-p53, prelamin A, and ZMPSTE24 as described [1,9,18,19].

2.7. Oxidative stress and inflammation

ROS production was measured by nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma-Aldrich) reduction and by CM-H₂DCFDA derivatives (C6827, Molecular Probes) oxidation as described [18]. Inflammation was determined by the protein expression of the phosphorylated form (serine 536) of NF- κ B p65/RelA subunit.

2.8. Transdifferentiation and calcification

Osteoblastic transdifferentiation was evaluated by the protein expression of the osteogenic markers osteocalcin and Runx2, and the enzymatic activity of alkaline phosphatase (ALP, kit B5655, Sigma Aldrich). Calcium deposition was evaluated by Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) staining observed by phase contrast microscopy and at 415 nm.

2.9. mRNA silencing

VSMCs were incubated 6 hours with 100 pmoles of a pool of three target-specific human siRNA for ZMPSTE24 (FACE1, SC-45524, Santa Cruz Biotechnology) or Runx2 (SC-37145) in transfection reagent. Cells markers were evaluated 7-days later. Controls with scrambled siRNA (SC-37007, Santa Cruz Biotechnology) were performed in parallel.

2.10. Reverse-Transcription and Real-Time quantitative PCR

Total RNA was extracted using the RNeasy mini kit (74104, Qiagen). The miScript PCR system was used for detection of the miR-141-3p (miScript II RT and miScript SYBR Green PCR kits). RT-qPCR assays were performed in triplicate on the *LightCycler*[®] 480 System (Roche). The cycle number at which the amount of amplified target reaches a fixed threshold (CT) was determined. Results were quantified relative to miScript PCR controls (Qiagen).

2.11. Statistical analysis

All experiments were performed at least four times on triplicate samples. Quantitative results were expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism version 5.0c (GraphPad Software, La Jolla, CA). Comparison between groups used the non-parametric Mann-Whitney test. P values were considered significant when less than 0.05.

3. Results

3.1. LMNA mutations and PI treatments induce premature senescence of VSMCs with increased oxidative stress and inflammation

We ectopically expressed in cultured human VSMCs Flag-tagged wild-type prelamin A (WT) or mutants of prelamin A, D47Y, R133L, or R482W. These heterozygous *LMNA* mutations, which lead to cellular accumulation of farnesylated prelamin A [9,15,25], are clinically associated with premature atherosclerotic diseases and vascular calcifications (Fig. S1) [5, 25].

By using anti-Flag antibodies we observed that 40-60% of VSMCs were efficiently transfected with WT or mutant lamin A. They expressed similar levels of WT and/or mutant lamin A (Fig. 1A, and immunofluorescence microscopy, data not shown), thus reproducing the heterozygous state of patients' cells.

Mutant, but not WT, *LMNA*-transfected VSMCs showed increased percentage of prelamin A positive cells (55-70% *versus* 9%, data not shown, 100-150 cells for each condition), with increased prelamin A and decreased ZMPSTE24 protein levels, and also increased SA- β -galactosidase activity (2.2-2.5-fold increase *versus* WT) and level of the senescence markers, p16^{INK4}, p21^{WAF}, p53 and phospho-p53 (Fig. 1A). *LMNA* mutant cells displayed the typical morphology of senescent cells, i.e., cell enlargement and flattening (data not shown).

Similarly, a 21-day treatment with LPV/r and ATV/r, but not DRV/r, induced prelamins A accumulation, and decreased ZMPSTE24 expression, and gave rise to a senescent phenotype with increased SA- β -galactosidase activity, and overexpression of the cell cycle arrest markers p16^{INK4}, p21^{WAF}, p53 and phospho-p53 (Fig. 1B). LPV/r had a stronger effect than ATV/r and DRV/r (4-fold versus 3-fold and 1.5-fold increase in SA- β -galactosidase activity, respectively as compared to control). LPV/r-treated VSMCs harbored the typical morphology of senescent cells, with an increased number of prelamins A-stained nuclei showing dysmorphies, and of foci containing phosphorylated histone γ -H2AX indicating DNA damages (Fig. 1C).

Expression of *LMNA* mutations also markedly increased ROS production (NBT reduction, 2.6-2.8-fold increase), and inflammation (increased level of phosphorylated-p65RelA NF- κ B subunit) (Fig. 1D). PI-treated VSMCs also displayed, to different extents, an increased level of oxidative stress and inflammation. Indeed, NBT reduction was enhanced by 4.8-, 2.5- and 1.7-fold in response to LPV/r, ATV/r and DRV/r (Fig. 1D) and, oxidation of CM-H₂DCFDA derivatives increased by 9.6-, 5.5- and 2-fold respectively (Fig. S2). LPV/r and ATV/r, and to a lesser extent DRV/r, also increased the level of phosphorylated-p65/RelA NF- κ B subunit (Fig. 1D).

Thus, naturally-occurring *LMNA* mutations and PIs induced persistent accumulation of prelamins A, downregulation of ZMPSTE24, with premature senescence, oxidative stress and inflammation in VSMCs.

3.2. *LMNA* mutations and PI treatments induce osteogenic transdifferentiation of VSMCs

Mutated but not WT *LMNA*, enhanced the osteoblastic markers, osteocalcin, Runx2, and alkaline phosphatase (ALP) activity (1.9- to 2.3-fold increase), as well as cell mineralization (2.9- to 3.6-fold increase in alizarin red staining) (Fig. 2A). PI-treated VSMCs also exhibited similar features of osteogenic transdifferentiation leading to calcification (Fig. 2B,C). The effects of LPV/r and ATV/r were more pronounced than that of DRV/r (only significant for alizarin staining). Osteoblastic transition was also shown by the disorganization of the α -smooth muscle (SM)-actin network in prelamins-A positive LPV/r-treated VSMCs, contrasting with well-organized fibers of control cells (Fig. 2D).

3.3. ZMPSTE24 downregulation is observed in cells from patients with *LMNA* mutations or under PI treatment.

In fibroblasts from patients bearing the D47Y, R133L or R482W *LMNA* mutations, the protein expression of prelamins A was markedly increased (Fig. 3A). Prelamins A accumulation was also observed in PBMC samples from PI-treated HIV-infected patients (Fig. 3B). Importantly, in patients'

cells, prelamin A accumulation was associated with a concomitant ZMPSTE24 downregulation (Fig. 3). In PBMC lysates, ZMPSTE24 expression was minimal in patient 1 receiving LPV/r, intermediate in patients 2 and 3 receiving DRV/r, and maximal in patient 4 on DRV/r and in patient 5 treated without PI. Interestingly, when the HIV-infected patients 1 to 3 were switched to maraviroc/raltegravir, the levels of prelamin A and ZMPSTE24 returned to values similar to those observed in patients 4 and 5 (Fig. 3B).

3.4. ZMPSTE24 downregulation plays a major role in VSMC senescence and calcification

We then knocked-down ZMPSTE24 in native VSMCs using specific siRNA.

As expected, ZMPSTE24 silencing induced prelamin A accumulation in control VSMCs and increased the senescence markers, SA- β -galactosidase activity (2.7-fold increase as compared to scramble-transfected cells), p16^{INK4} and p21^{WAF} (Fig. 4A). It also increased oxidative stress (4.1-fold increase in NBT reduction) and inflammation (increased expression of phosphorylated-p65/RelA NF- κ B subunit) (Fig. 4B) and triggered osteogenic transdifferentiation, as shown by increased osteocalcin and Runx2 levels, ALP activity (2.6-fold) and alizarin red staining (3.1-fold) (Fig. 4C).

We thus searched for the factors that contribute to ZMPSTE24 downregulation in VSMCs expressing *LMNA* mutations or under PI treatment. The expression of miR-141-3p, known to regulate ZMPSTE24 protein expression [34], was increased by 1.5-fold in D47Y and R482W *LMNA* mutant VSMCs and by 2-fold in LPV/r treated cells, as compared to control cells (Fig. 4D). As ZMPSTE24 mRNA level did not vary in VSMCs expressing *LMNA* mutations or treated with LPV/r (data not shown, n=5), miR-141-3p probably altered ZPMSTE24 translation rather than transcript stability, as shown for other miRNAs [35].

3.5. Pravastatin and N-acetyl cysteine rescue ZMPSTE24 downregulation in PI-treated cells

The cellular toxicity of prelamin A results, at least in part, from its retention in a constitutively farnesylated form [36-38]. To impair the farnesylation process in VSMCs, we submitted LPV-treated cells to pravastatin. The farnesyl synthesis inhibitor pravastatin globally inhibited protein farnesylation [17] (as shown by the altered electrophoretic mobility of the farnesylation indicator HDJ-2), leading to the accumulation of unfarnesylated prelamin A in control and LPV/r-exposed cells (Fig. 5A). Importantly, pravastatin prevented ZMPSTE24 downregulation induced by LPV/r (Fig. 5A), decreased the effect of LPV/r on oxidative stress (2-fold) and inflammation (Fig. 5B), and prevented LPV/r effects on the senescence markers, SA- β -galactosidase activity (1.2- versus 2.9-fold), p16^{INK4} and p21^{WAF} (Fig. 5A). Finally, pravastatin prevented LPV/r-induced osteogenic transdifferentiation, as assessed by osteocalcin and Runx2 expression, ALP activity and calcium deposition (Fig. 5C).

1 The antioxidant N-acetyl cysteine (NAC) partially decreased oxidative stress (Fig. S2), markers of
2 senescence (p16^{INK4} and p21^{WAF} and SA-galactosidase activity by 50%), and calcification (alizarin
3 red staining by 70 %) in LPV/r treated VSMCs. Importantly, NAC almost normalized the protein
4 levels of ZMPSTE24 and prelamin A (Fig. 5D).
5
6

7
8 Taken together, these results indicated that accumulation of farnesylated prelamin A and associated
9 ZMPSTE24 downregulation led to oxidative stress, inflammation and vascular calcification.
10 Increased oxidative stress could aggravate senescence through enhanced ZMPSTE24
11 downregulation as suggested by Ragnauth et al. [1].
12
13

14 15 **3.6. Inhibition of calcification does not affect the LPV/r-induced senescence program and** 16 **ZMPSTE24 expression** 17

18 We studied the consequences of a direct inhibition of calcification in PI-treated VSMCs, by using
19 Runx2 siRNA-mediated silencing or the anti-calcifying agent etidronate. Importantly, etidronate,
20 unlike other bisphosphonates, suppresses osteoclastic activity without impacting the mevalonate
21 pathway [39], and thus does not interfere by itself with the farnesylation processes including
22 prelamin A maturation.
23
24

25 Runx2 silencing or co-treatment with etidronate decreased osteogenic markers and calcium
26 deposition in LPV/r-treated VSMCs, as assessed by osteocalcin and Runx2 levels, ALP activity
27 (1.2- versus 3-fold), and alizarin red staining (2.3- versus 10-fold) (Fig. S3A). When etidronate was
28 added after the initiation of the calcification process (from day 11 to day 21 of LPV/r treatment), a
29 two-fold decrease in osteogenic markers was observed at day 21 (data not shown), consistent with
30 an arrest of the mineralization process.
31
32

33 Runx2 knockdown or co-treatment with etidronate partially inhibited LPV/r-induced ROS production
34 (by 50-60%) and weakly altered the inflammation status (Fig. S3B). Moreover, they failed to affect
35 the senescence markers (p16^{INK4}, p21^{WAF} and SA-β-galactosidase activity) and did not modify the
36 level of prelamin A and ZMPSTE24 (Fig. S3C).
37
38

39 Therefore, an efficient inhibition of VSCM calcification was unable to prevent PI-induced
40 senescence, further pointing to the major role of ZMPSTE24 downregulation and prelamin A
41 accumulation in the activation of the senescence program finally resulting in vascular calcification.
42
43

44 45 46 **4. Discussion** 47

48 Our study demonstrated for the first time that ectopic expression of mutant *LMNA* or long-term
49 treatment with some PI combinations directly damaged cultured human VSMCs. ZMPSTE24
50 downregulation and farnesylated prelamin A accumulation played a central role in the occurrence of
51
52

VSMC dysfunctions. This could provide a pathophysiological basis for the early atherosclerotic plaques observed in patients bearing lipodystrophy-related *LMNA* mutations [3,5,25] and in those with HIV infection receiving PI-based therapy [6,8,28-30].

We showed that *LMNA* mutations (D47Y, R133L or R482W) and PI combinations at clinical Cmax concentrations (LPV/r, ATV/r and DRV/r), all (except DRV/r) previously associated with farnesylated prelamins A accumulation [5,9,18,19,40,41], induced senescence, oxidative stress, inflammation and calcification in VSMCs. These related alterations [22,23] are associated with the setup of cardiovascular disease at the clinical level.

Although PIs exerted a direct toxicity on VSMCs, the impact differed according to their combination, LPV/r being more deleterious than ATV/r, and DRV/r having minor consequences. Our results are in accordance with clinical data that documented the association between the use of LPV/r and cardiovascular complications in HIV-infected patients [6,29]. Our results do not exclude that metabolic disorders or lipodystrophy could also contribute to the risk of atherosclerosis observed in patients with *LMNA* mutations [5] or under PI treatment [6].

The toxicity of farnesylated prelamins A is considered as an important pathogenic determinant of genetic or acquired laminopathies [9,17] because of its major role in premature senescence induced by *LMNA* mutations or PI treatment in various cell types [5,9,18,19,40,41]. Farnesylated prelamins A is also suspected to play a role in physiological vascular aging, since it accumulates in calcified arteries of aged individuals [1,2].

ZMPSTE24 expression was found to be decreased in fibroblasts or VSMCs from aged persons, consistent with its downregulation in senescent cells [1,44].

Otherwise, LPV/r and ATV/r can directly inhibit the enzymatic activity of ZMPSTE24 [10,11], thus impairing prelamins A processing. In this study, we observed a markedly downregulation of ZMPSTE24 in VSMCs expressing mutant *LMNA* or treated with LPV/r or ATV/r, which was associated with senescence, oxidative stress, inflammation and calcification. In fibroblasts from patients naturally bearing the studied *LMNA* mutations and in PBMCs from HIV-infected patients under LPV/r treatment, increased prelamins A was associated with a ZMPSTE24 downregulation. In PBMCs, prelamins A and ZMPSTE24 levels returned to normal values when the patients were switched to a PI-sparing regimen. In contrast, Perrin et al. [45] failed to detect any prelamins A accumulation in PBMCs from HIV-infected patients under PI therapy. In view of the present results, it would be important to evaluate ZMPSTE24 level in their samples.

We reveal here the primary role of ZMPSTE24 in the dysfunction of *LMNA*-mutated or PI-treated VSMCs, since ZMPSTE24 silencing in native VSMCs could rapidly mimic all the effects produced by *LMNA* mutations or PI treatment. Moreover, pravastatin reduced LPV/r-induced accumulation of farnesylated prelamins A and ZMPSTE24 downregulation thereby preserving the functional

parameters of VSMCs. In agreement, farnesyl synthesis or transferase inhibitors could improve cellular functions and, vascular stiffness in patients with progeria [18,36,37]. Besides the inhibition of HMG-CoA reductase in the mevalonate pathway, pravastatin also exerts antioxidant and anti-inflammatory effects [46], suggesting that ROS generated by the accumulation of the toxic form of prelamin A might reinforce ZMPSTE24 downregulation. This is supported by the beneficial effect of NAC on PI-induced VSMC dysfunctions and ZMPSTE24 level. Finally, we observed that miRNA-141-3p was significantly increased in *LMNA*-mutant cells and in LPV/r treated VSMCs. Interestingly, Yu et al. have shown that miRNA-141-3p, by directly targeting ZMPSTE24, could be involved in human mesenchymal stem cell aging [34].

Thus, ZMPSTE24 could be negatively modulated via several pathways that probably concurred to a global dysfunction of VSMCs. It is possible that once farnesylated, prelamin A continued to accumulate leading to enhanced toxicity, which, through oxidative stress and inflammation, could reinforce the inhibition/downregulation of ZMPSTE24.

We also showed that the calcification process was not a major initiating factor of premature senescence in VSMCs. Indeed, LPV/r-induced senescence, including dysregulation of ZMPSTE24 and prelamin A, was not modified when osteogenesis/calcification was blocked by either Runx2 silencing, or a co-treatment with etidronate. This suggests that the senescence features resulting from PI treatment preceded and controlled the calcification process.

Our study has some limitations, since we had no access to arterial samples from patients with HIV infection or bearing *LMNA* mutations. It was thus not possible to directly address the association between prelamin A accumulation, ZMPSTE24 depletion and calcification in patients' cells.

In conclusion, we propose that arterial calcified atheromatous plaques prematurely observed in patients with *LMNA* mutations, and in HIV-infected patients treated with some PIs, share common pathophysiological mechanisms initiated by ZMPSTE24 downregulation and farnesylated prelamin A persistent accumulation, leading to premature cellular senescence and calcification of vascular cells. Our results suggest that statins or etidronate may prevent vascular calcifications in these patients, and that therapies aiming to increase ZMPSTE24 should provide promising options. Further investigations are required regarding the role of ZMPSTE24 in physiological vascular ageing.

Funding

1
2 This work was supported by Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM),
3
4 Université Pierre et Marie Curie (UPMC) and Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les
5
6 hépatites virales (ANRS).
7
8 P. Afonso is a recipient of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
9
10 Recherche.

Acknowledgments

11
12
13
14 The authors thank Thomas Aranias and Yoann Schumacher who participated in the initiation of this
15
16 study.

Disclosures

17
18
19
20
21
22 None
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Legends

Figure 1: Alteration of ZMPSTE24 and prelamin A expression and associated senescence, oxidative stress and inflammation in VSMCs overexpressing mutant LMNA or treated with PIs. VSMCs were transfected with Flag-tagged wild-type (WT), D47Y-, R133L- or R482W-mutated prelamin A cDNA, or with empty pSVK3 (void) vectors and studied at day 7, or cultured for 21 days with the indicated PIs. **(A,B)** Protein expression of lamin A, prelamin A and ZMPSTE24, and SA- β -galactosidase activity (X-gal staining pH6/pH4) (n=7) and protein expression of the markers of senescence as described in Methods. **(C)** SA- β -galactosidase activity by phase contrast microscopy (pH6) (left) and cells stained with DAPI (blue), anti-prelamin A (green) and anti- γ H2AX (red) antibodies and visualized by immunofluorescence microscopy (right). **(D)** Oxidative stress (NBT reduction) and inflammation (p-p65RelA NF-kB) in control, transfected, or PI-treated VSMCs. n=9. Representative blots (performed in triplicate) are shown. α -tubulin was used as a loading control. Results are means \pm SEM. * p<0.05 versus WT LMNA-transfected cells or DMSO-incubated cells. Scale bar represent 10 μ m.

Figure 2: LMNA mutations and PIs induce osteogenic transdifferentiation of VSMCs. In VSMCs transfected with flag-tagged wild-type (WT), D47Y-, R133L- or R482W-mutated prelamin A cDNA, or with empty pSVK3 (void) vectors, **(A)** protein expression of osteocalcin and Runx2, ALP activity and Alizarin red staining, n=5. In VSMCs cultured for 21 days with the indicated PIs, **(B)** protein expression of osteocalcin, Runx2 and α -SM-actin, ALP activity and Alizarin red staining (n=7), and **(C)** phase contrast microscopy of alizarin red stained cells. **(D)** Immunofluorescence microscopy of cells labelled with prelamin A (red) and α -SM-actin (green). Representative blots (performed in triplicate) are shown. α -tubulin was used as a loading control. Scale bars represent 10 μ m. Results are expressed as means \pm SEM and normalized to the protein content. * p<0.05 versus WT LMNA-transfected cells or versus DMSO-incubated cells.

Figure 3: Protein expression of prelamin A and ZMPSTE24 in fibroblasts from patients with LMNA mutations and in PBMCs from HIV-infected patients receiving antiretroviral treatments. Expression of prelamin A, ZMPSTE24 and β -actin (loading control) was evaluated **(A)** in fibroblasts from 2 controls (control 1 and 2) and 4 patients with LMNA mutations (D47Y, R133L, or R482W) and **(B)** in PBMCs from 5 HIV-infected patients, during their long-term ART including or not PIs, and after 4 months of maraviroc/raltegravir (M/R) PI-sparing treatment, as indicated. Relative quantification was expressed as arbitrary units (AU). n=1 sample per patient.

Figure 4: Role of ZMPSTE24 in VSMC dysfunctions. Control VSMCs transfected with ZMPSTE24 siRNA were analyzed for the markers of **(A)** senescence, **(B)** oxidative stress and

inflammation, and **(C)** osteogenesis/calcification, n=5. **(D)** miRNA-141-3p was quantified in *LMNA*-mutant and LPV/r-treated cells, n=5. Representative blots (performed in triplicate) are shown. α -tubulin was used as a loading control. Results are expressed as means \pm SEM and normalized to the protein content. * $p < 0.05$ versus scramble- or DMSO- or WT *LMNA*-transfected cells.

Figure 5: Beneficial effect of pravastatin and NAC on PI-induced VSMC dysfunctions. VSMCs were cultured for 21 days with LPV/r. **(A-C)** Pravastatin (prava, 25 μ mole/L) or **(D)** NAC (1 mmol/L) were added all along the PI treatment or for the last 4 days, respectively. The markers of **(A)** senescence (n=5), **(B)** oxidative stress (n=7) and inflammation, and **(C)** osteogenesis/calcification (n=5) were evaluated. **(D)** Effect of NAC on senescence and calcification markers, n=4. Representative blots (performed in triplicate) are shown. α -tubulin was used as a loading control. Results are expressed as means \pm SEM and normalized to the protein content. ns for no significant. * $p < 0.05$ versus DMSO-incubated cells. § $p < 0.05$ versus LPV/r-only incubated cells. # $p < 0.05$ versus prava- or NAC- and DMSO-incubated cells.

References

- 1
2
3 [1] Ragnauth CD, Warren DT, Liu Y, McNair R, Tajsic T, Figg N, et al. Prelamin A acts to accelerate
4 smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation*.
5 2010;121:2200-10.
6
7 [2] Liu Y, Drozdov I, Shroff R, Beltran LE, Shanahan CM. Prelamin a accelerates vascular
8 calcification via activation of the DNA damage response and senescence-associated secretory
9 phenotype in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2013;112:e99-e109.
10
11 [3] Olive M, Harten I, Mitchell R, Beers JK, Djabali K, Cao K, et al. Cardiovascular pathology in
12 Hutchinson-Gilford progeria: correlation with the vascular pathology of aging. *Arteriosclerosis,*
13 *thrombosis, and vascular biology*. 2010;30:2301-9.
14
15 [4] Capell BC, Collins FS, Nabel EG. Mechanisms of cardiovascular disease in accelerated aging
16 syndromes. *Circ Res*. 2007;101:13-26.
17
18 [5] Bidault G, Garcia M, Vantuyghem MC, Ducluzeau PH, Morichon R, Thiyagarajah K, et al.
19 Lipodystrophy-linked LMNA p.R482W mutation induces clinical early atherosclerosis and in vitro
20 endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:2162-71.
21
22 [6] Boccarda F, Lang S, Meuleman C, Ederhy S, Mary-Krause M, Costagliola D, et al. HIV and
23 coronary heart disease: time for a better understanding. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61:511-23.
24
25 [7] Guaraldi G, Orlando G, Zona S, Menozzi M, Carli F, Garlassi E, et al. Premature age-related
26 comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. *Clinical infectious*
27 *diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;53:1120-6.
28
29 [8] Micheletti RG, Fishbein GA, Fishbein MC, Singer EJ, Weiss RE, Jeffries RA, et al. Coronary
30 atherosclerotic lesions in human immunodeficiency virus-infected patients: a histopathologic study.
31 *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*.
32 2009;18:28-36.
33
34 [9] Caron M, Auclair M, Donadille B, Bereziat V, Guerci B, Laville M, et al. Human lipodystrophies
35 linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with
36 prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ*.
37 2007;14:1759-67.
38
39 [10] Coffinier C, Hudon SE, Farber EA, Chang SY, Hrycyna CA, Young SG, et al. HIV protease
40 inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in
41 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
42 2007;104:13432-7.
43
44 [11] Hudon SE, Coffinier C, Michaelis S, Fong LG, Young SG, Hrycyna CA. HIV-protease inhibitors
45 block the enzymatic activity of purified Ste24p. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374:365-8.
46
47 [12] Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, et al. Recurrent de novo
48 point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*. 2003;423:293-8.
49
50 [13] Cadinanos J, Varela I, Lopez-Otin C, Freije JM. From immature lamin to premature aging:
51 molecular pathways and therapeutic opportunities. *Cell Cycle*. 2005;4:1732-5.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 [14] De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, et al. Lamin a
2 truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*. 2003;300:2055.
- 3 [15] Capanni C, Mattioli E, Columbaro M, Lucarelli E, Parnaik VK, Novelli G, et al. Altered pre-lamin
4 A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum Mol Genet*. 2005;14:1489-
5 502.
- 6
7 [16] Coffinier C, Hudon SE, Lee R, Farber EA, Nobumori C, Miner JH, et al. A potent HIV protease
8 inhibitor, darunavir, does not inhibit ZMPSTE24 or lead to an accumulation of farnesyl-prelamin A in
9 cells. *J Biol Chem*. 2008;283:9797-804.
- 10
11 [17] Bonello-Palot N, Simoncini S, Robert S, Bourgeois P, Sabatier F, Levy N, et al. Prelamin A
12 accumulation in endothelial cells induces premature senescence and functional impairment.
13 *Atherosclerosis*. 2014;237:45-52.
- 14
15 [18] Lefevre C, Auclair M, Boccara F, Bastard JP, Capeau J, Vigouroux C, et al. Premature
16 senescence of vascular cells is induced by HIV protease inhibitors: implication of prelamin A and
17 reversion by statin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:2611-20.
- 18
19 [19] Auclair M, Afonso P, Capel E, Caron-Debarle M, Capeau J. Impact of darunavir, atazanavir and
20 lopinavir boosted with ritonavir on cultured human endothelial cells: beneficial effect of pravastatin.
21 *Antivir Ther*. 2014.
- 22
23 [20] Kalra SS, Shanahan CM. Vascular calcification and hypertension: cause and effect. *Ann Med*.
24 2012;44 Suppl 1:S85-92.
- 25
26 [21] Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification.
27 *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:715-23.
- 28
29 [22] Burton DG, Giles PJ, Sheerin AN, Smith SK, Lawton JJ, Ostler EL, et al. Microarray analysis of
30 senescent vascular smooth muscle cells: A link to atherosclerosis and vascular calcification. *Exp*
31 *Gerontol*. 2009;44:659-65.
- 32
33 [23] Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, et al. Oxidative stress
34 induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by
35 AKT signaling. *J Biol Chem*. 2008;283:15319-27.
- 36
37 [24] Burton DG, Matsubara H, Ikeda K. Pathophysiology of vascular calcification: Pivotal role of
38 cellular senescence in vascular smooth muscle cells. *Exp Gerontol*. 2010;45:819-24.
- 39
40 [25] Caux F, Dubosclard E, Lascols O, Buendia B, Chazouilleres O, Cohen A, et al. A new clinical
41 condition linked to a novel mutation in lamins A and C with generalized lipoatrophy, insulin-resistant
42 diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy. *J Clin*
43 *Endocrinol Metab*. 2003;88:1006-13.
- 44
45 [26] Kramer CK, Zinman B, Gross JL, Canani LH, Rodrigues TC, Azevedo MJ, et al. Coronary
46 artery calcium score prediction of all cause mortality and cardiovascular events in people with type
47 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2013;346:f1654.
- 48
49 [27] Post WS, Budoff M, Kingsley L, Palella FJ, Jr., Witt MD, Li X, et al. Associations between HIV
50 infection and subclinical coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med*. 2014;160:458-67.
- 51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 [28] Guaraldi G, Zona S, Alexopoulos N, Orlando G, Carli F, Ligabue G, et al. Coronary aging in
2 HIV-infected patients. *Clin Infect Dis*. 2009;49:1756-62.
- 3 [29] Worm SW, Sabin C, Weber R, Reiss P, El-Sadr W, Dabis F, et al. Risk of myocardial infarction
4 in patients with HIV infection exposed to specific individual antiretroviral drugs from the 3 major drug
5 classes: the data collection on adverse events of anti-HIV drugs (D:A:D) study. *J Infect Dis*.
6 2010;201:318-30.
- 7
8 [30] Lang S, Mary-Krause M, Cotte L, Gilquin J, Partisani M, Simon A, et al. Impact of individual
9 antiretroviral drugs on the risk of myocardial infarction in human immunodeficiency virus-infected
10 patients: a case-control study nested within the French Hospital Database on HIV ANRS cohort
11 CO4. *Arch Intern Med*. 2010;170:1228-38.
- 12
13 [31] Decaudoain A, Vantyghem MC, Guerci B, Hecart AC, Auclair M, Reznik Y, et al. New metabolic
14 phenotypes in laminopathies: LMNA mutations in patients with severe metabolic syndrome. *J Clin*
15 *Endocrinol Metab*. 2007;92:4835-44.
- 16
17 [32] Katlama C, Assoumou L, Valantin MA, Soulie C, Duvivier C, Chablais L, et al. Maraviroc plus
18 raltegravir failed to maintain virological suppression in HIV-infected patients with lipohypertrophy:
19 results from the ROCnRAL ANRS 157 study. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:1648-52.
- 20
21 [33] Caron M, Auclair M, Sterlingot H, Kornprobst M, Capeau J. Some HIV protease inhibitors alter
22 lamin A/C maturation and stability, SREBP-1 nuclear localization and adipocyte differentiation.
23 *AIDS*. 2003;17:2437-44.
- 24
25 [34] Yu KR, Lee S, Jung JW, Hong IS, Kim HS, Seo Y, et al. MicroRNA-141-3p plays a role in
26 human mesenchymal stem cell aging by directly targeting ZMPSTE24. *Journal of cell science*.
27 2013;126:5422-31.
- 28
29 [35] Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in
30 *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation.
31 *Developmental biology*. 1999;216:671-80.
- 32
33 [36] Gordon LB, Kleinman ME, Miller DT, Neuberger DS, Giobbie-Hurder A, Gerhard-Herman M, et al.
34 Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome.
35 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
36 2012;109:16666-71.
- 37
38 [37] Young SG, Yang SH, Davies BS, Jung HJ, Fong LG. Targeting protein prenylation in progeria.
39 *Sci Transl Med*. 2013;5:171ps3.
- 40
41 [38] Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*.
42 2006;312:1059-63.
- 43
44 [39] Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011;49:2-19.
- 45
46 [40] Caron M, Vigouroux C, Bastard J-P, Capeau J. Adipocyte dysfunction in response to
47 antiretroviral therapy : clinical, tissue and in-vitro studies. *Curr Opin HIV AIDS*. 2007;2:268-73.
- 48
49 [41] Bereziat V, Cervera P, Le Dour C, Verpont MC, Dumont S, Vantyghem MC, et al. LMNA
50 mutations induce a non-inflammatory fibrosis and a brown fat-like dystrophy of enlarged cervical
51 adipose tissue. *Am J Pathol*. 2011;179:2443-53.
- 52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

[42] Varela I, Cadinanos J, Pendas AM, Gutierrez-Fernandez A, Folgueras AR, Sanchez LM, et al. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature*. 2005;437:564-8.

[43] Barrowman J, Michaelis S. ZMPSTE24, an integral membrane zinc metalloprotease with a connection to progeroid disorders. *Biol Chem*. 2009;390:761-73.

[44] Lattanzi G, Ortolani M, Columbaro M, Prencipe S, Mattioli E, Lanzarini C, et al. Lamins are rapamycin targets that impact human longevity: a study in centenarians. *Journal of cell science*. 2014;127:147-57.

[45] Perrin S, Cremer J, Faucher O, Reynes J, Dellamonica P, Micallef J, et al. HIV protease inhibitors do not cause the accumulation of prelamin A in PBMCs from patients receiving first line therapy: the ANRS EP45 "aging" study. *PLoS One*. 2012;7:e53035.

[46] Bauer AJ, Banek CT, Needham K, Gillham H, Capoccia S, Regal JF, et al. Pravastatin attenuates hypertension, oxidative stress, and angiogenic imbalance in rat model of placental ischemia-induced hypertension. *Hypertension*. 2013;61:1103-10.

Figure 1

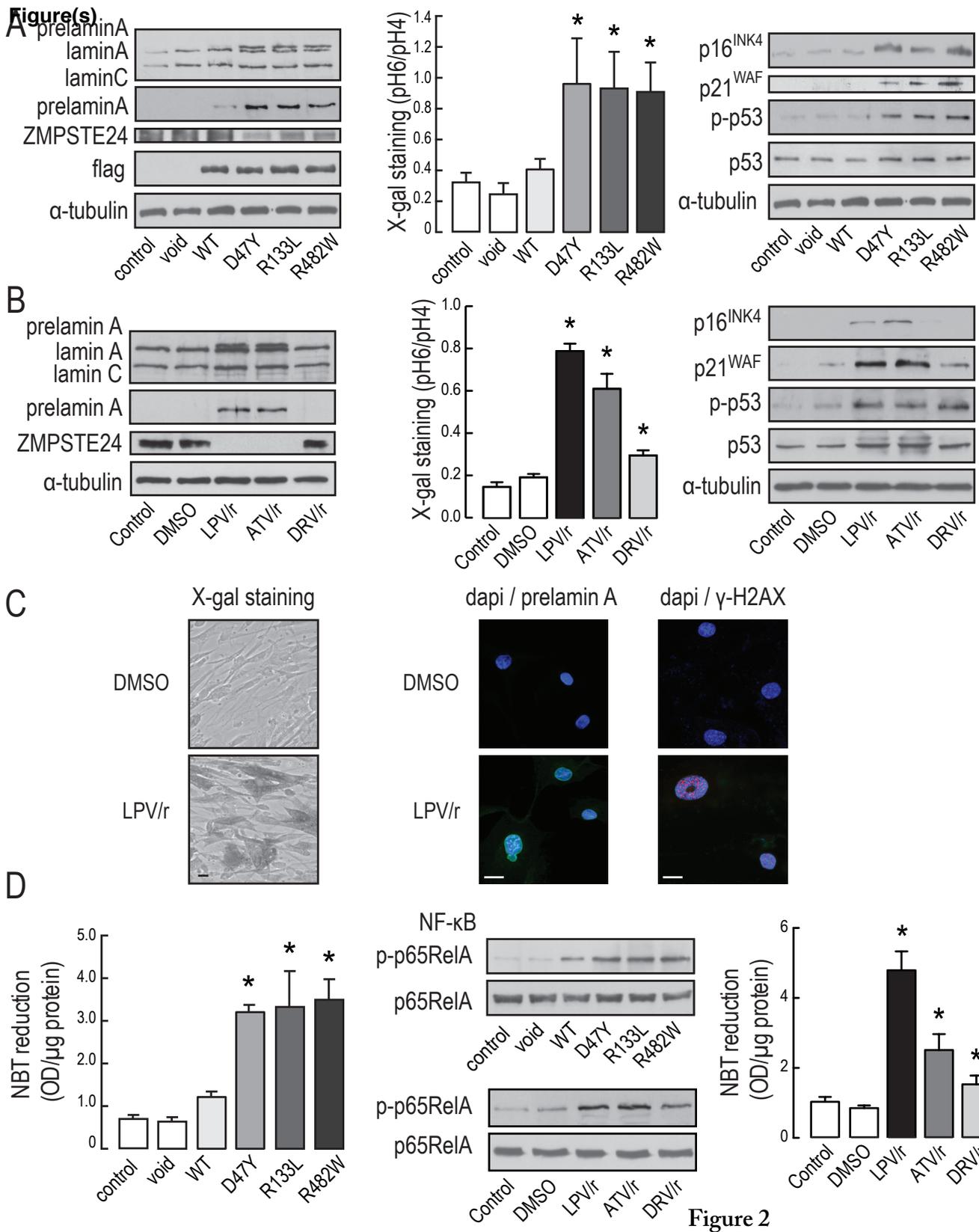


Figure 2

Figure(s)

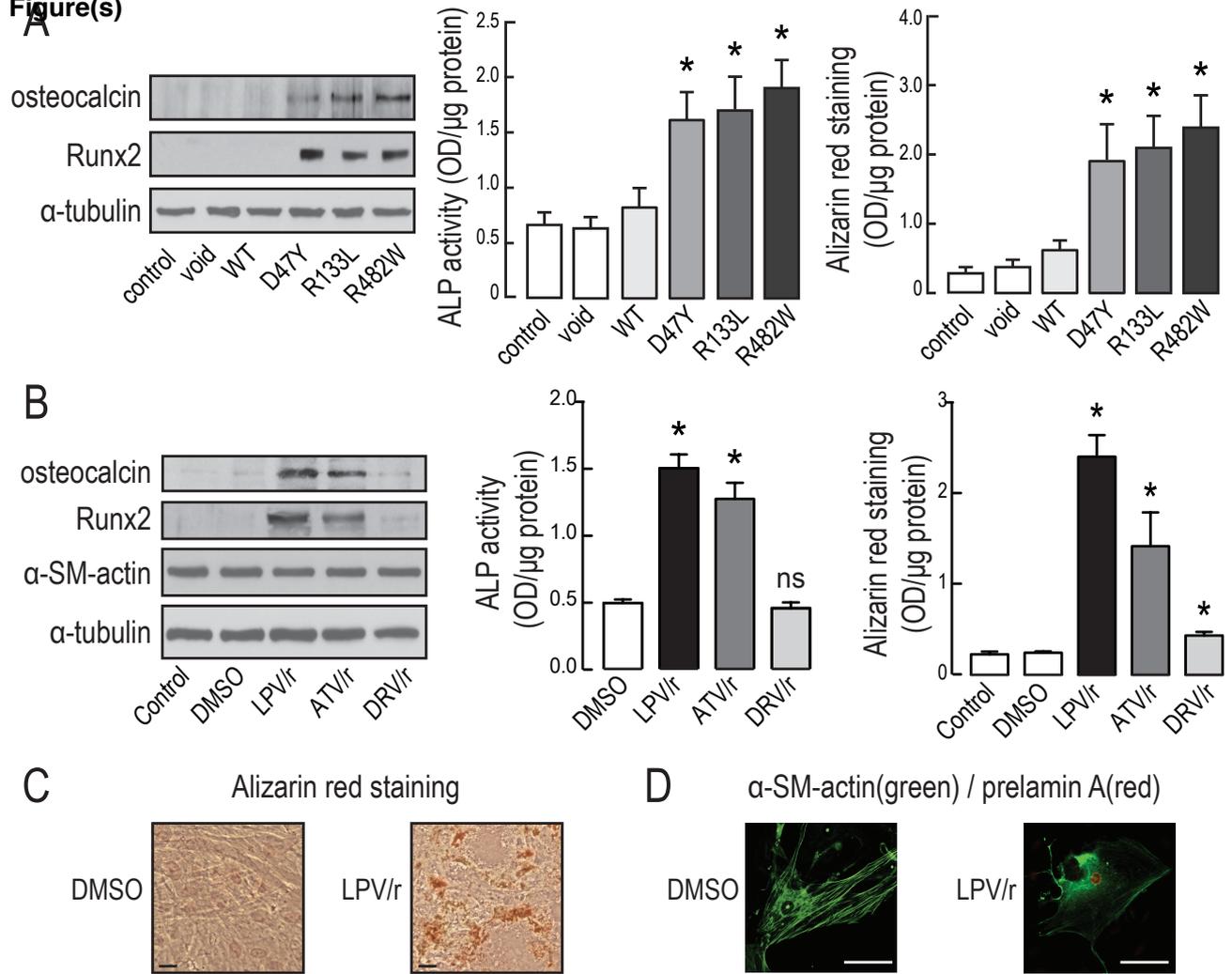
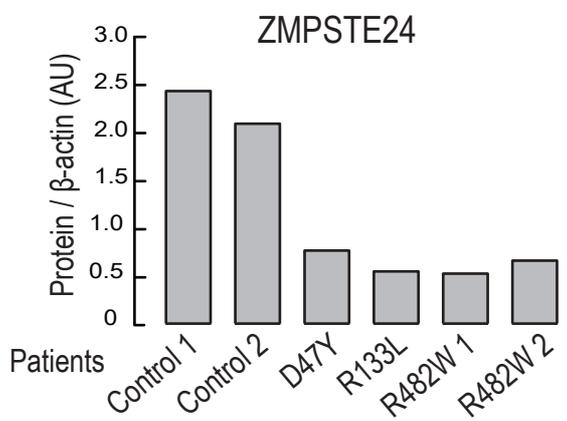
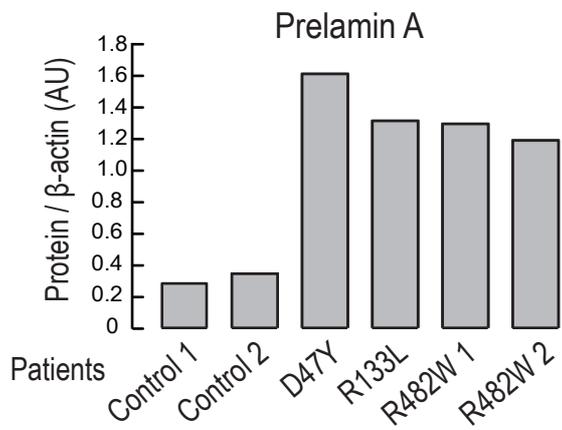
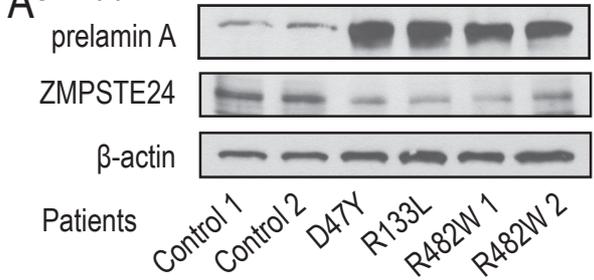


Figure 3

Figure(s)



B

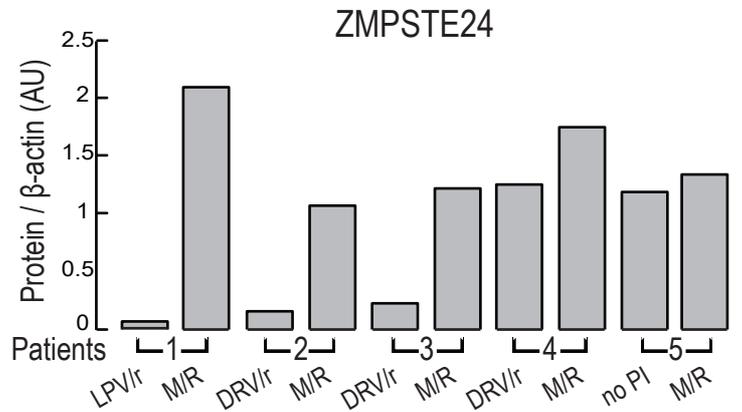
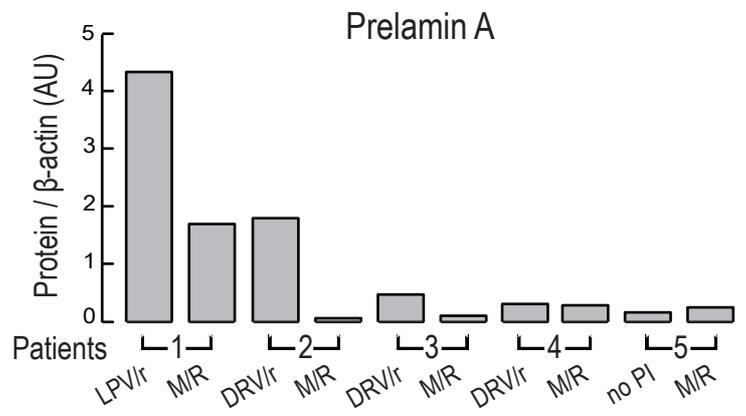
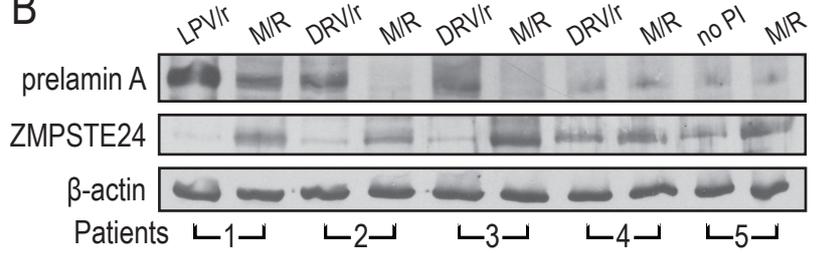


Figure 4

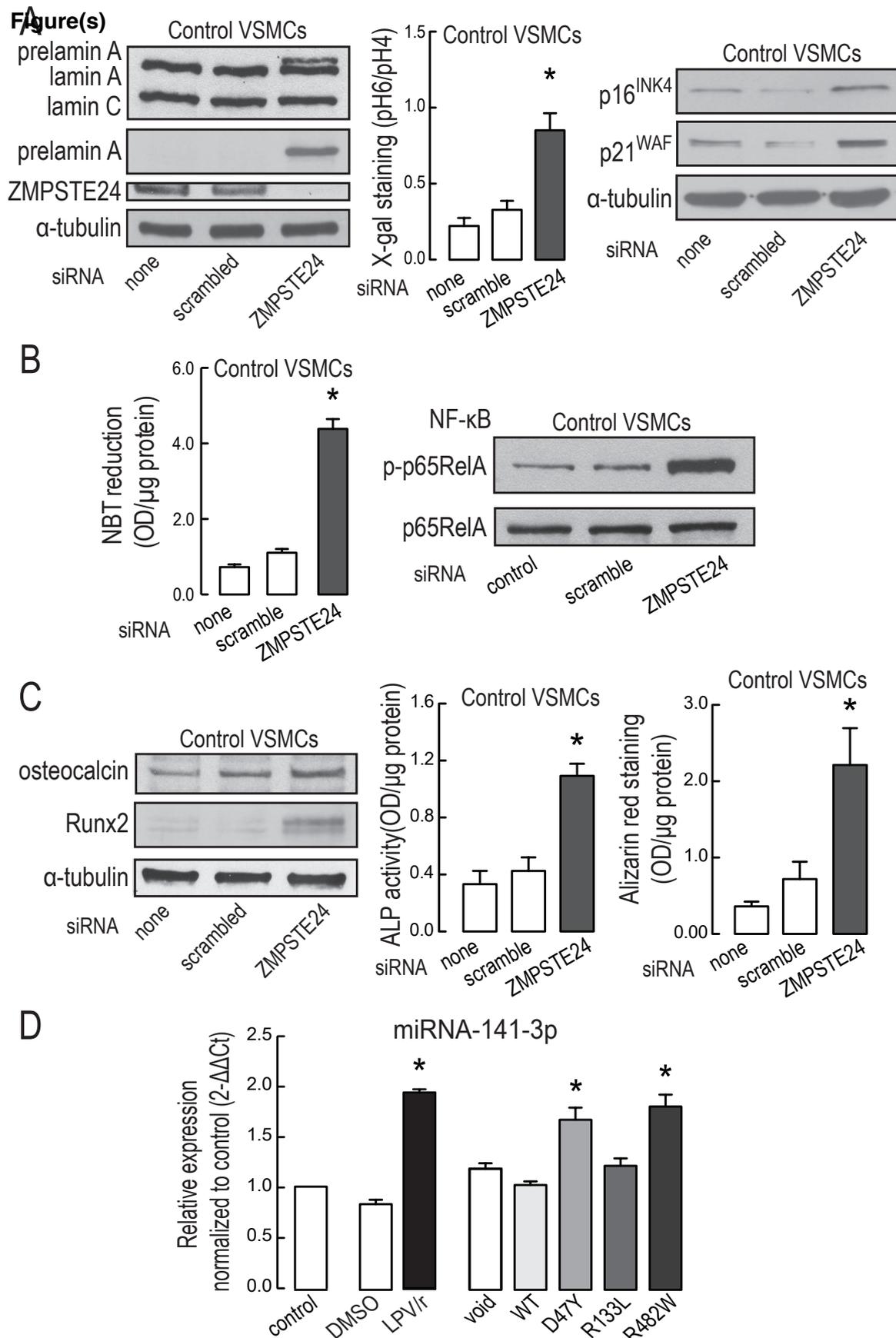
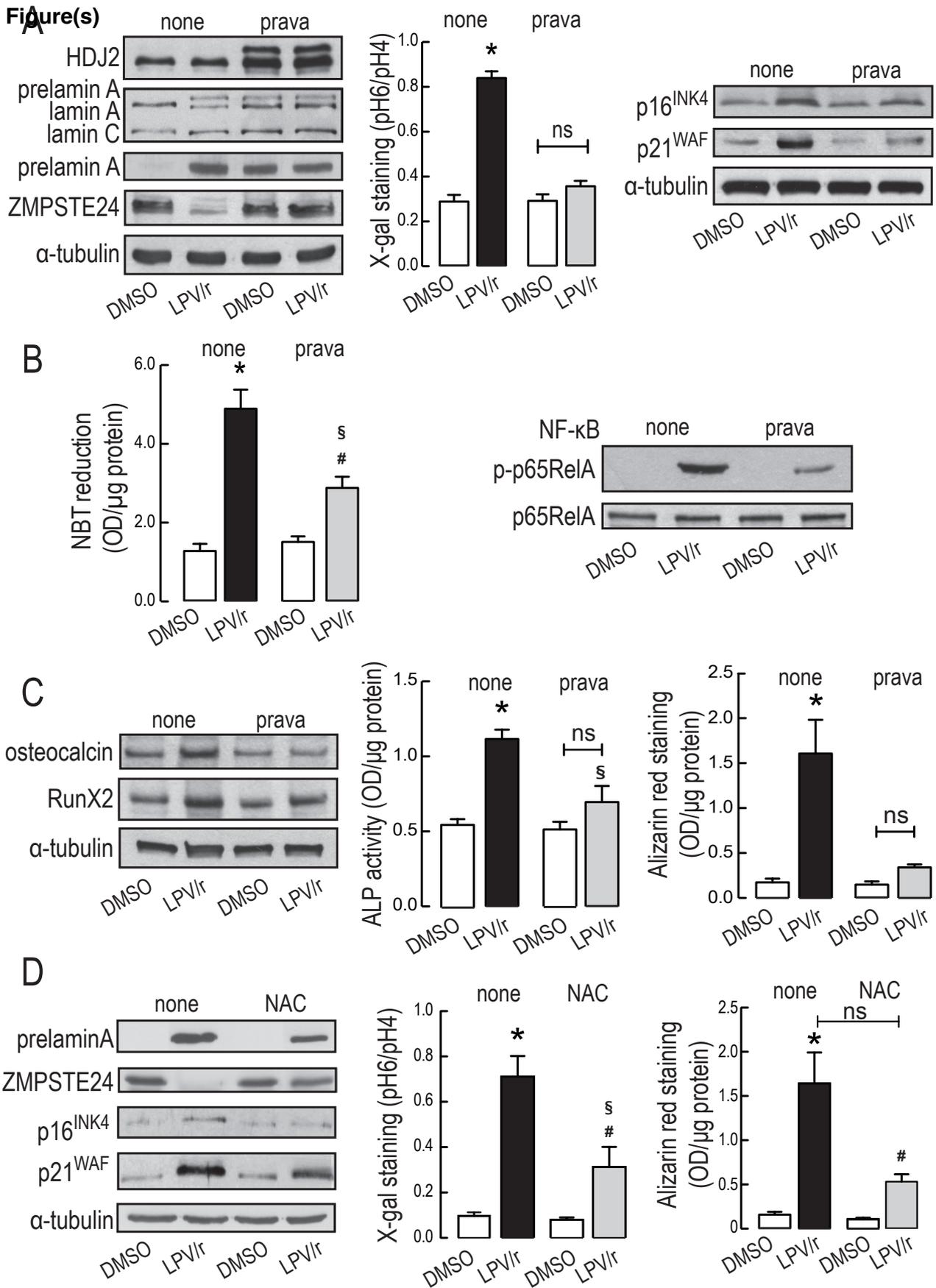


Figure 5



Supplemental legends

Figure S1: Volume-rendered 3D carotid computed tomography angiography in a 42 year-old patient harboring a p.R133L LMNA heterozygous mutation. Extensive plaque calcifications are shown by arrows at right and left carotid bifurcations. The patient was non-smoker, physically active with early-screened diabetes and dyslipidemia, which were always well-controlled. n= 1 patient.

Figure S2: Evaluation of oxidative stress. CM-H2DCFDA oxidation and NBT reduction in VSMCs cultured for 21 days with the indicated PIs, and incubated or not for the last 4 days with NAC, as indicated. n=5. Results are means \pm SEM. *p<0.05 versus DMSO-incubated cells. § p<0.05 versus LPV/r only-incubated cells.

Figure S3: Impact of Runx2 silencing or etidronate on LPV/r-induced VSMC dysfunctions. LPV/r-treated VSMCs were transfected with Runx2 siRNA at day 15, or co-cultured with etidronate for 21 days. Impact of Runx2 silencing and etidronate on markers of **(A)** osteogenesis/calcification, **(B)** oxidative stress and inflammation and **(C)** senescence. Representative blots (performed in triplicate) are shown. α -tubulin was used as a loading control. n=4. Results are means \pm SEM. ns for no significant. * p<0.05 versus scramble- or DMSO-incubated cells. § p<0.05 versus LPV/r only-incubated cells. # p<0.05 versus DMSO- and etidronate-incubated cells.

Figure S1

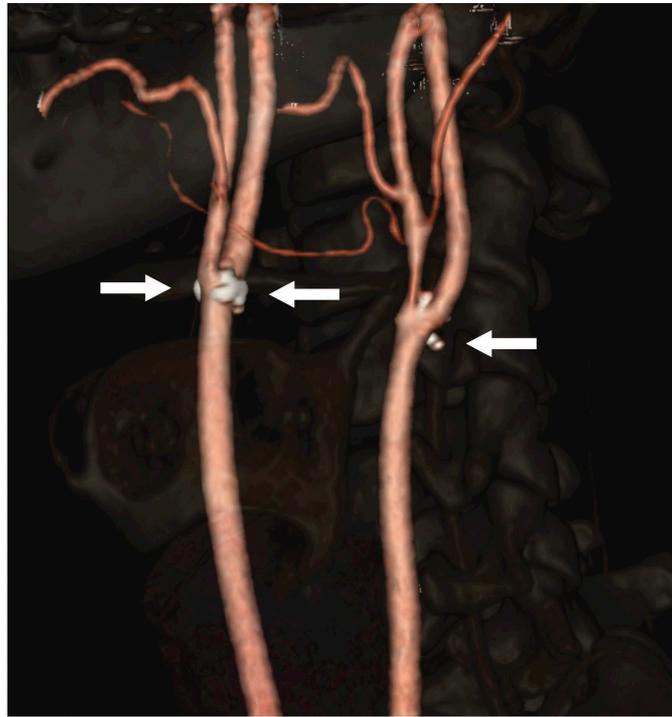


Figure S2

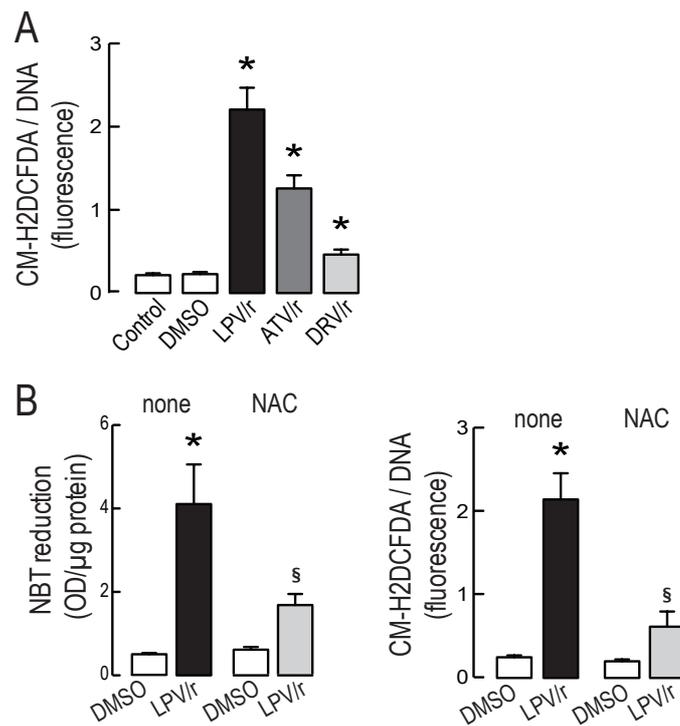
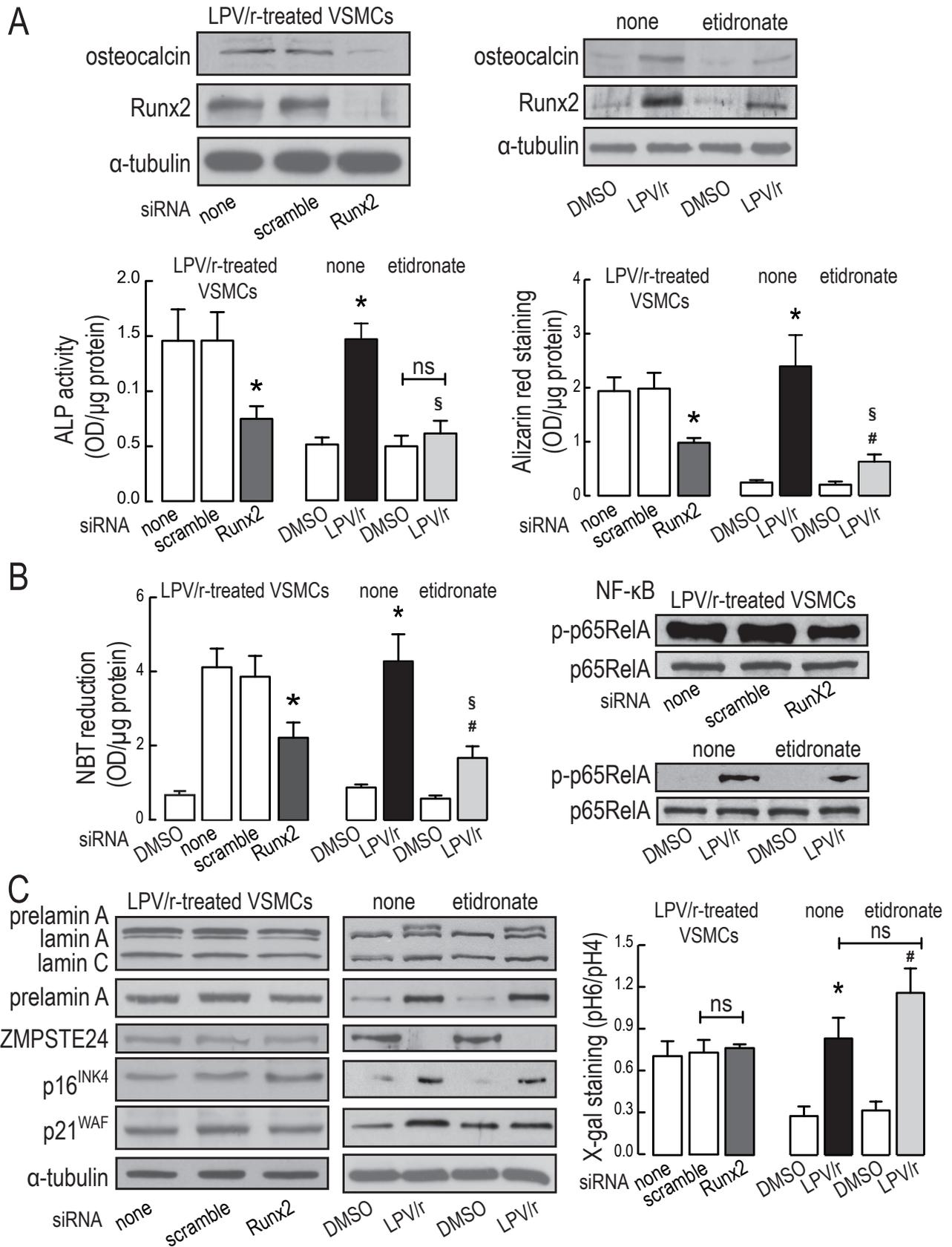


Figure S3



3- Conclusion

En conclusion, dans cette étude, nous avons démontré que l'expression ectopique d'un gène *LMNA* muté ou le traitement à long terme avec certaines combinaisons d'IPs ont un effet direct sur les CMLV humaines en culture en induisant un stress oxydant, une inflammation, et une sénescence, ainsi qu'une calcification associée à une transdifférenciation ostéoblastique. Cependant, l'impact diffère selon la combinaison d'IPs, le LPV/r étant plus nocif que l'ATV/r et le DRV/r ayant un effet mineur. Ces altérations sont associées à une accumulation de prélamine A farnésylée et à une diminution d'expression protéique de la ZMPSTE24. L'importance de cette enzyme est soulignée dans l'étude par l'observation que le silencing de ZMPSTE24 par des siARN dans des cellules contrôles mime les effets des IPs ou des mutations *LMNA* sur les dysfonctions des CMLV. L'augmentation du miARN-141-3p, un régulateur négatif de l'expression de la ZMPSTE24, dans les CMLV transfectées avec des mutants *LMNA* et dans celles traitées par le LPV/r, serait, au moins en partie, responsable de la diminution de l'expression de cette enzyme.

En conclusion, nous montrons ici pour la première fois que l'expression de la ZMPSTE24 est modulée négativement par les mutations *LMNA* ou par certains IPs, entraînant une accumulation de prélamine A farnésylée et des conséquences pro-athérogéniques sur les CMLV. De plus, nous avons montré que le traitement par la pravastatine ou par un anti-oxydant (la N-acétyl cystéine ou NAC), empêchent ou reversent la down-régulation de ZMPSTE24. Nos résultats nous ont permis de mettre en avant plusieurs hypothèses sur la mécanistique conduisant à la diminution de l'expression de ZMPSTE24 sous l'effet des mutations du gène *LMNA* ou des IPs. En particulier, la diminution de l'expression de ZMPSTE24 pourrait résulter du rôle de la production d'espèces réactives de l'oxygène, car son inhibition par le NAC reverse les dysfonctions et le niveau d'expression de la ZMPSTE24. Cet effet du stress oxydant a été confirmé par l'amélioration des dysfonctions et du taux de l'enzyme en présence de pravastatine, un antioxydant et anti-inflammatoire. Ce résultat est en accord avec les données antérieures publiées par Ragnauth et al, montrant qu'un traitement par l'eau oxygénée diminue l'expression de ZMPSTE24 dans des CMLV humaines en culture. (Ragnauth et al. 2010) De plus, l'effet du traitement par la pravastatine, qui inhibe la production du groupement farnésyl, suggère que la prélamine A sous forme farnésylée pourrait aussi avoir un rôle dans la down régulation de ZMPSTE24.

Enfin, l'importance du processus de sénescence dans la modulation de l'expression de ZMPSTE24 a été soulignée dans la littérature. (Ukekawa et al. 2007, Ragnauth et al. 2010, Lattanzi et al. 2014)

Ces mécanismes ne seraient pas exclusifs et convergeraient vers un dysfonctionnement global des CMLV.

Ces résultats apportent une base physiopathologique afin d'expliquer les troubles vasculaires des patients, et notamment, le développement de plaques d'athérosclérose précoce chez les patients porteurs de mutations *LMNA* et chez ceux infectés par le VIH et traités par des IP.

II- Etude 2 : Impact of darunavir, atazanavir and lopinavir boosted with ritonavir on cultured human endothelial cells : beneficial effect of pravastatin

Martine Auclair, Pauline Afonso, Emilie Capel, Martine Caron-Debarle, Jacqueline Capeau

1- Introduction et objectifs de travail

A- Contexte

Comme nous l'avons vu précédemment, les patients infectés par le VIH et traités à long terme par des inhibiteurs de la protéase virale (IPs) ont un plus grand risque de développer des maladies cardiovasculaires en dépit de leur charge virale indétectable. Il est donc apparu important de tester les effets directs des IPs sur des cellules endothéliales en culture, la dysfonction endothéliale étant un événement déclencheur dans l'athérosclérose.

B- Objectifs de travail

Les cellules endothéliales humaines en culture sont utilisées comme modèle pour tester la toxicité de différentes combinaisons d'IPs, et en particulier celle d'un IP de dernière génération, le darunavir. Nous avons étudié les effets à long terme du darunavir (DRV), du darunavir associé au ritonavir (DRV/r), du lopinavir associé au ritonavir (LPV/r) et de l'atazanavir associé au ritonavir (ATV/r), utilisés aux concentrations sériques maximales mesurées en clinique (C_{max}), sur la fonction des cellules endothéliales d'artère coronaire humaine (HCAECs), notamment sur le stress oxydatif, l'inflammation et la sénescence. De plus, nous avons étudié l'effet de la pravastatine, un inhibiteur de la voie de synthèse du groupement farnésyl, sur les altérations induites par ces IPs.

C- Choix des antirétroviraux

Les antirétroviraux étudiés sont les mêmes que dans l'étude 1. Ils ont donc aussi été choisis dans cette étude pour le lien établi, ou non, entre ces ARV et les complications cardiovasculaires observées en clinique chez les patients traités par ces molécules.

2- Article

Antiviral Therapy 2014; 19:773–782 (doi: 10.3851/IMP2752)

Original article

Impact of darunavir, atazanavir and lopinavir boosted with ritonavir on cultured human endothelial cells: beneficial effect of pravastatin

Martine Auclair^{1,2,3}, Pauline Afonso^{1,2,3}, Emilie Capel^{1,2,3}, Martine Caron-Debarle^{1,2,3}, Jacqueline Capeau^{1,2,3,4*}¹INSERM, UMR_S 938, CDR Saint Antoine, F-75012, Paris, France²Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, UMR_S 938, F-75012, Paris, France³ICAN, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris, France⁴AP-HP, Hopital Tenon, Department of Biochemistry, F-75020, Paris, France

*Corresponding author e-mail: jacqueline.capeau@inserm.fr

Background: HIV-infected patients administered long-term ritonavir-boosted protease inhibitors (PIs) are at a greater risk for developing cardiovascular diseases. Endothelial dysfunction is an initiating event in HIV-associated atherosclerosis. Cultured endothelial cells can be used as a model to compare the endothelial toxicity of different PIs.

Methods: We compared the effect of darunavir (DRV), darunavir/ritonavir (DRV/r), lopinavir/ritonavir (LPV/r) and atazanavir/ritonavir (ATV/r), used at clinically relevant concentrations, on human coronary artery endothelial cell vascular function, oxidative stress, inflammation and senescence, and studied the effect of pravastatin on PI-induced alterations.

Results: Vascular endothelial cell function, evaluated by the expression of endothelial nitric oxide synthase and the production of nitric oxide and endothelin-1, was unaffected by DRV or DRV/r, but altered by LPV/r or ATV/r. DRV

or DRV/r did not alter, or mildly induced oxidative stress and inflammation (phosphorylation of p65/RelA-NFκB, secretion of IL-6 and IL-8), while ATV/r and LPV/r induced a marked increase. Secretion of sICAM or sVCAM, indicative of altered cell integrity, was not or weakly altered by DRV or DRV/r, but increased by 2–3-fold by LPV/r or ATV/r. Similar results were observed regarding senescence markers: SA-β-galactosidase activation and overexpression of phospho-p53, p16^{ink4}, p21^{WAF-1} and prelamin A. Pravastatin could, in part, reverse PI-induced adverse effects.

Conclusions: Ritonavir-boosted PIs differentially induced vascular endothelial cell dysfunction, reactive oxygen species production, inflammation and senescence with no effect or a mild effect of DRV/r, an intermediate effect of ATV/r, and a stronger effect of LPV/r. Statins could, in part, protect the cells from PI-induced endothelial dysfunction.

Introduction

Protease inhibitors (PIs) are widely used to control HIV infection; however, PI-based therapies are known to increase cardiovascular risk in HIV-infected patients [1–4]. Among currently used PIs, lopinavir (LPV) boosted with ritonavir (LPV/r) has been associated with a greater risk of cardiovascular disease [4,5]. Atazanavir (ATV) has not been associated with an increased risk of myocardial infarction in the D:A:D study [6] but, boosted with ritonavir (ATV/r), it exerted a more atherogenic lipid profile than nevirapine in treatment-naïve patients [7]. Up to now, no data are available on a potential cardiovascular risk exerted by darunavir (DRV). DRV-based therapies are considered as safe and well-tolerated at the metabolic level [8–10].

In addition to PI-based therapies, the increased risk of premature myocardial infarction has been attributed to HIV infection-related factors (CD4 nadir, CD8 level, HIV viral load) and to other classic cardiovascular risk factors [3–5,11–13].

Antiretroviral therapy may promote premature cardiovascular disease through endothelial dysfunction either indirectly, via PI-induced metabolic disturbances [5,14–17] or directly, via alterations of vascular endothelial cells [18–22]. The endothelium normally exerts a number of vasoprotective effects such as vasodilation, suppression of smooth muscle cell growth and inhibition of inflammatory responses. Many of these effects are largely mediated by nitric

oxide (NO), the most potent endogenous vasodilator that opposes the effect of endothelium-derived vasoconstrictors such as endothelin-1. A defect in the production or activity of NO leads to endothelial dysfunction, which is an early marker for atherosclerosis and can be detected *in vivo* before structural changes to the vessel are apparent [23]. *In vitro*, a number of endothelial functions can also be evaluated as the production of NO and endothelin-1, oxidative stress and the release of proinflammatory cytokines. Regarding PIs, it has been previously shown that a short-term treatment with ritonavir (RTV; 24–72 h), alone or in association with LPV, directly altered endothelial cell function [22,24] by triggering oxidative stress in human [25] and porcine endothelial cells [26–28]. Otherwise, long-term treatment with RTV or LPV/r induced inflammation and premature senescence in cultured human endothelial cells together with oxidative stress [29]. The treatment with the combination ATV/r brought controversial data: a 4-week treatment of healthy subjects with ATV/r or LPV/r did not impair endothelial function [30,31], whereas switching to ATV/r treatment did not improve endothelial dysfunction in HIV-infected patients [32]. To our knowledge, the impact of ATV/r or DRV/r on cultured human endothelial cells has never been evaluated.

The risk of premature cardiovascular events might also result from the accelerated biological ageing imposed by antiretroviral therapy and/or HIV itself [33–35]. Indeed, vascular endothelial cell dysfunction is a feature of the human physiological ageing process [36,37], and syndromes of premature ageing are associated with precocious cardiovascular disease. The most striking findings are observed in progeroid syndromes linked to molecular alterations in the prelamin A maturation process [38–41], in which alteration of vascular cells is obvious. Importantly, some PIs, but not all, can induce the accumulation of farnesylated prelamin A by inhibiting the metalloprotease ZPM-STE24, involved in the prelamin A maturation process. The ability of the different PIs to inhibit this enzyme decreased from LPV, to RTV and then to ATV, DRV being devoid of any effect even at high concentrations [42,43].

Our objective was to compare the long-term effect of DRV (used alone or in combination with boosting concentration of RTV), LPV/r or ATV/r on cultured human endothelial cells. We evaluated the possible role of farnesylated prelamin A accumulation, by treating the PI-treated cells with pravastatin, since statins inhibit the synthesis of the farnesyl anchor and therefore decrease the accumulation of farnesylated prelamin A [44], as previously shown in endothelial cells treated with LPV/r or RTV [29].

Methods

Cell culture and treatment

Human coronary artery endothelial cells (HCAECs; PromoCell, Heidelberg, Germany) were cultured as previously described [29]. They were exposed during 20 days to clinically relevant concentrations of DRV (11.8 $\mu\text{mol/l}$), DRV/r (11.8/0.8 $\mu\text{mol/l}$) [45], LPV/r (15.9/1.4 $\mu\text{mol/l}$) [46], ATV/r (7.4/1.3 $\mu\text{mol/l}$) [47] or to the solvent (0.1% dimethyl sulfoxide [DMSO]). The treatment with pravastatin (25 $\mu\text{mol/l}$) was performed during the last 3 days. DRV was obtained from Janssen-Cilag (Issy-les-Moulineaux, France) and the other PIs purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

Western blotting

Whole cell lysates were subjected to SDS/PAGE and western blotting. We used antibodies against endothelial nitric oxide synthase (e-NOS; SC-653), endothelin-1 (ET-1, SC-21625) and prelamin A (SC-6214) from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Antibodies against NF- κ B p65/RelA (#3987) and phospho-NF- κ B p65/RelA (ser 536; 3033) were from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA). Antibodies against p53 (clone DO-1, ab80645) and anti-phospho(S15)-p53 (ab38497) were from Abcam (Cambridge, UK). Antibodies against p16^{INK4} (551144) and p21^{WAF-1} (556431) were from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Beta-actin (A-5441; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was used as an index of the cellular protein content.

NO production

NO production was assessed with the cell-permeant NO indicator 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM; D23844; Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cells were cultured in 96-well plates, washed and incubated with DAF-FM (12.5 $\mu\text{mol/l}$) or Hoechst 33258 (0.01 mg/ml) in DMEM without FBS for 30 min at 37°C in the dark. Quantification was performed with a plate fluorescence reader (Infinite M200; Tecan-France, Trappes, France) at 515 nm (DAF-FM) and 460 nm (Hoechst 33258), respectively. NO production was also indirectly determined by e-NOS protein expression.

Oxidative stress and inflammation

The production of reactive oxygen species was indirectly measured by the oxidation of CM-H₂DCFDA derivatives (5-[and 6]-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester) and the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) as described [29]. Secretion of interleukin (IL)-6 and IL-8 was analysed in 24-h culture supernatants by Luminesx®

technology [29]. Inflammation was also determined by the protein expression of the phosphorylated form (serine 536) of the p65/RelA subunit of NF- κ B.

Senescence

Cell senescence was evaluated by the senescence-associated (SA)- β -galactosidase activity, the protein expression of the senescence markers phospho-p53, p21^{WAF-1} and p16^{INK4}, and the accumulation of prelamin A, as described previously [29,34].

Statistical analysis

The experiments were repeated 3–8 \times . Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was determined using ANOVA and the Kruskal–Wallis non-parametric test, followed by a Fisher protected least significant difference test for pair-wise differences. *P*-values were calculated relative to cells cultured with 0.1% DMSO. *P*-values of less than 0.05 were considered significant.

Results

Endothelial cell dysfunction

DRV used alone or in combination with zidovudine (DRV/r) did not decrease the protein expression of e-NOS (Figure 1A) or the production of NO by endothelial cells, measured by the fluorescent NO indicator DAF-FM diacetate (Figure 1B). In addition, DRV or DRV/r did not alter the basal level of cellular or secreted ET-1 (Figure 1A).

LPV/r activated all markers of endothelial cell vascular dysfunction. It decreased e-NOS protein expression (by 3-fold) and increased cellular and secreted ET-1 by 2–3-fold (Figure 1A and 1B). ATV/r also adversely modified vascular endothelial cell functions: its effect was consistently lower than that of LPV/r and higher than that of DRV/r (1.5–2-fold).

Regarding the release of the adhesion molecules sICAM and sVCAM (Figure 1C), which are markers of altered endothelial cell integrity, DRV had no effect on the secretion of sICAM or sVCAM, whereas DRV/r moderately increased their secretion (1.5-fold increase), compared with the effect of LPV/r (4–6-fold increase) or ATV/r (3–4-fold increase).

Regarding oxidative stress evaluated by CM-H₂DCFDA oxidation and NBT reduction, DRV did not alter the oxidative stress markers (Figure 2A), while DRV/r moderately increased CM-H₂DCFDA oxidation (by 2-fold), and had no effect on NBT reduction. By contrast, LPV/r or ATV/r increased the two markers of oxidative stress by, respectively, 6.5- and 5-fold (CM-H₂DCFDA) and 3-fold (NBT).

With regard to inflammation, DRV or DRV/r did not modify the phosphorylation state of the p-65/

RelA subunit of NF- κ B as compared with control or DMSO-treated cells (Figure 2B). In addition, DRV or DRV/r had a low, or had no effect on the secretion of IL-6 and IL-8 (Figure 2C). LPV/r markedly increased p65/RelA NF- κ B phosphorylation (by 3-fold) and cytokine secretion (by 3–4-fold). ATV/r also increased inflammation but in most cases at a lower level than LPV/r (Figure 2B and 2C).

Endothelial cell senescence

DRV or DRV/r had no effect on the cell cycle arrest markers phospho-p53, p21^{WAF-1} and p16^{INK4}, and did not induce prelamin A accumulation (Figure 3A). The combination DRV/r moderately increased SA- β -galactosidase activity (by 1.6-fold), whereas LPV/r or ATV/r had a stronger effect (3.2- and 2.8-fold increase; Figure 3B), consistent with the LPV/r- and ATV/r-increased protein expression of cell cycle arrest markers and prelamin A (Figure 3A).

Effect of pravastatin on PI-induced endothelial cell dysfunction and senescence

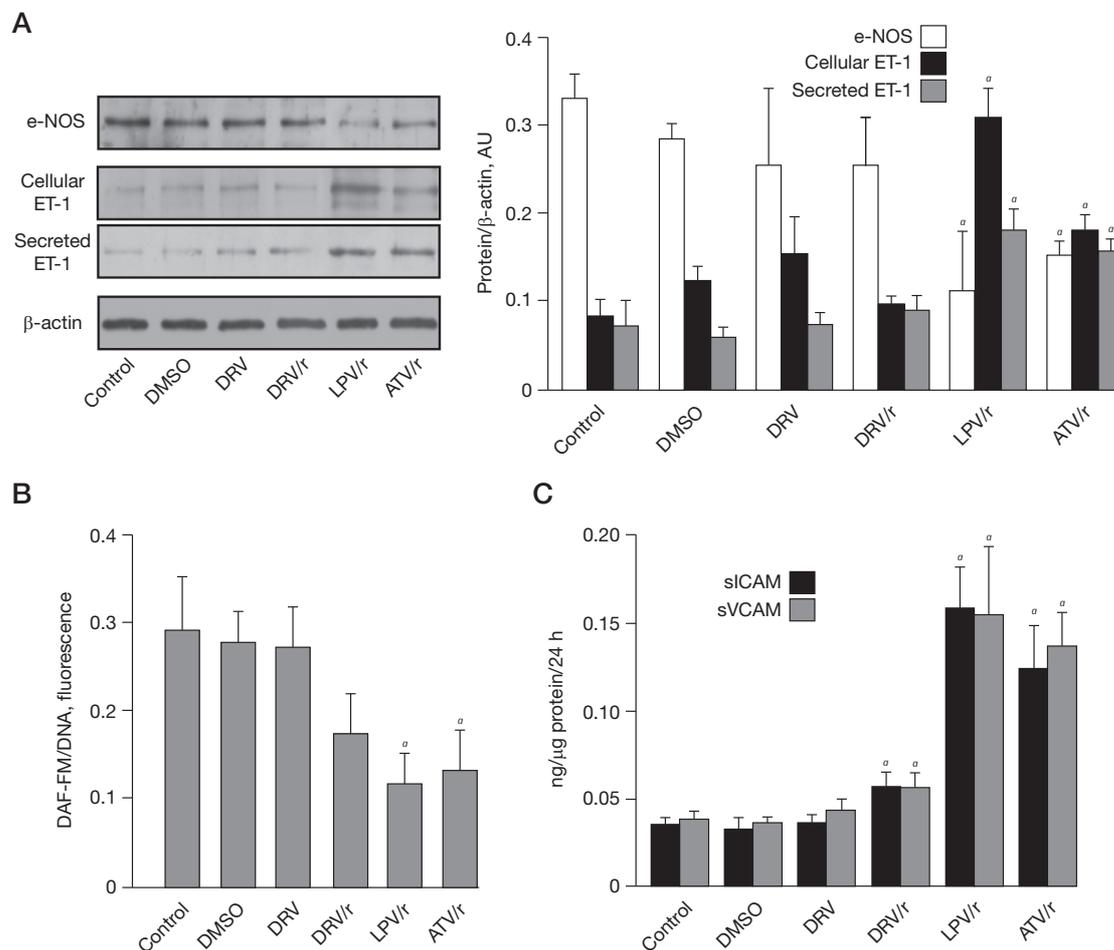
We then studied the effect of pravastatin on PI-induced endothelial cell dysfunctions. PI-induced HCAEC dysfunction was improved by pravastatin, as shown by the normalized production of NO, sICAM or sVCAM in LPV/r- or ATV/r-treated cells (Figure 4A). In addition, pravastatin decreased the effect of LPV/r and ATV/r on oxidative stress markers by 1.8–2-fold, and on inflammation and senescence markers by 1.6–3-fold (Figure 4B and 4C).

Discussion

We compared the effect of DRV, DRV/r, LPV/r and ATV/r on cultured human endothelial cells. All drug combinations were used at concentrations near to the maximum concentration measured in the patients' serum [45–47]. The PI combinations differentially affected endothelial functions and induced senescence. A continuous incubation of HCAECs for 20 days with LPV/r or ATV/r decreased e-NOS protein expression and NO production, caused the secretion of ET-1, and induced oxidative stress and inflammation. The ability of PIs to enhance the secretion of IL-6 and IL-8 led us to evaluate their ability to increase the phosphorylation of the NF- κ B subunit, p65/Rel A on serine 536. The phosphorylation of p65/Rel A, though mediated independently of I κ B α , is important for the expression of IL-6 and IL-8 [48,49]. LPV/r and ATV/r also altered endothelial cell integrity, as shown by the increased release of sICAM-1 and sVCAM-1, and induced senescence. PI-induced endothelial cell dysfunction and senescence could regress in the presence of pravastatin.

M Auclair *et al.*

Figure 1. PI effect on endothelial cell functions

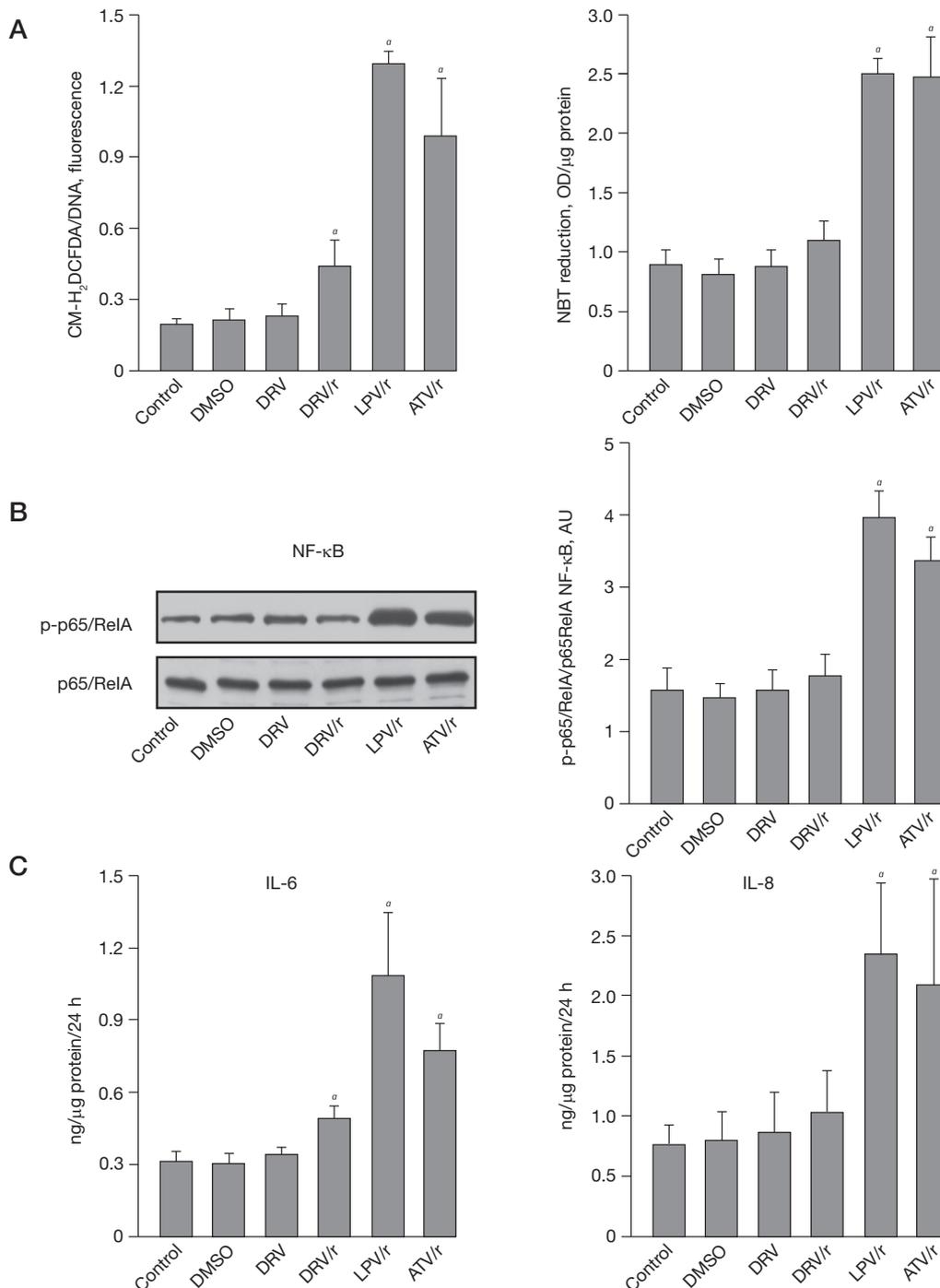


Human coronary artery endothelial cells were cultured for 20 days with the indicated protease inhibitors (PIs). (A) Protein expression of cellular and/or secreted endothelial nitric oxide synthase (e-NOS), endothelin-1 (ET-1) and β -actin. Representative blots (performed in triplicate) are shown. Quantification was performed relative to β -actin and expressed as arbitrary units (AU). (B) Nitric oxide (NO) production was evaluated by the fluorescence of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM) normalized to DNA (Hoechst 33258 fluorescence). (C) Soluble ICAM and VCAM was evaluated in 24 h culture supernatant by Luminex[®] technology and expressed as ng/ μ g protein/24 h. Results are the mean \pm SEM of 3–5 experiments. ^a P <0.05 versus dimethyl sulfoxide (DMSO)-incubated cells. ATV/r, ritonavir-boosted atazanavir; DRV/r, ritonavir-boosted darunavir; LPV/r, ritonavir-boosted lopinavir.

A 20-day treatment of HCAECs with DRV had no incidence on endothelial cell function. When DRV was associated with a low concentration of RTV (DRV/r), it exerted no, or little effect on endothelial function (1.5–2-fold change of some, but not all, markers). This low-grade toxicity could probably result from the toxicity of the booster, even at this low concentration [50]. Even if we have not directly tested the toxicity of RTV used alone at low concentrations, it can be expected that its toxicity will increase with increasing concentrations, becoming important at 7.5 μ mol/l, as

previously reported [29]. The higher toxicity of ATV/r compared with DRV/r on endothelial cell function may be explained in part by a higher impact of the booster, which was used at a 1.6-fold higher concentration in ATV/r versus DRV/r (1.3 versus 0.8 μ mol/l). Indeed, RTV used alone in porcine and human coronary artery endothelial cells (24 h, 15–30 μ mol/l) can decrease e-NOS expression [27], and increase oxidative stress [21,24,28]. Increased ET-1 release and decreased NO production was suspected to mediate the adverse effects of HIV drugs on endothelial cell function [20,25,51,52].

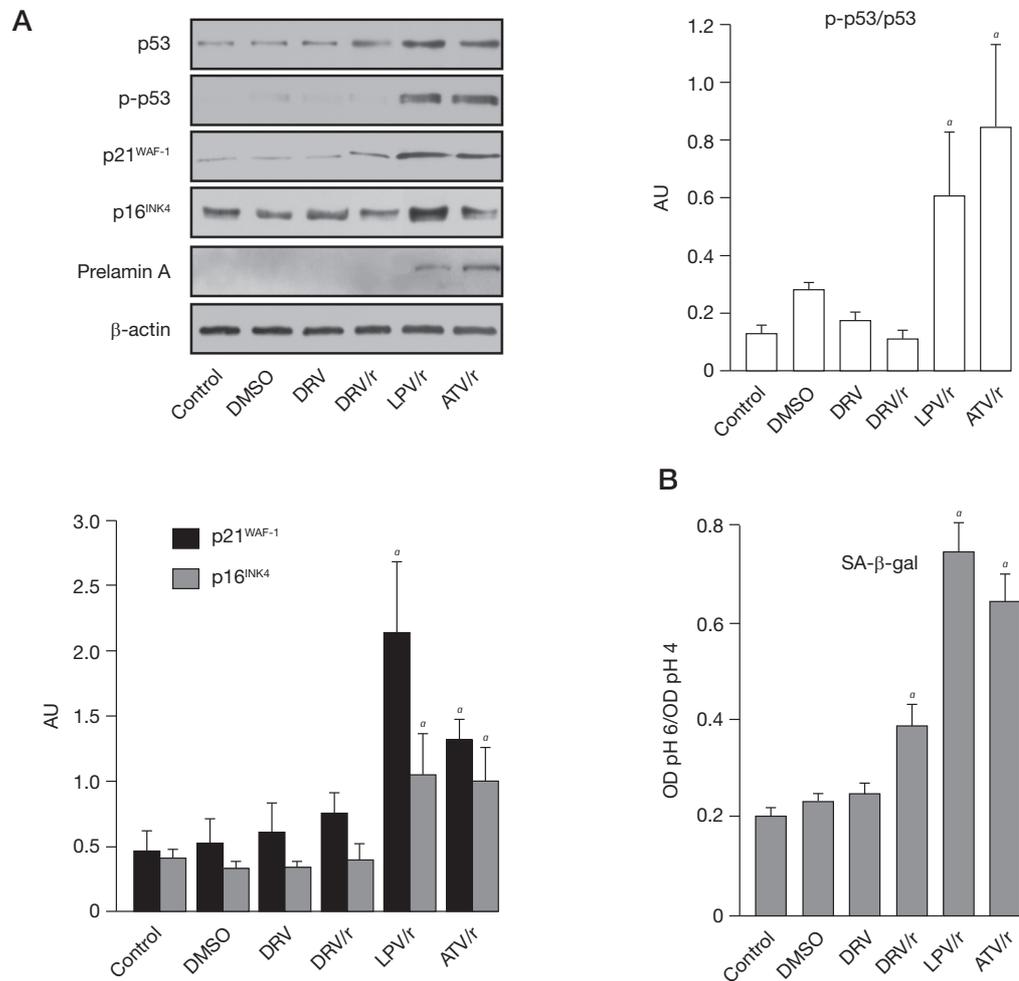
Figure 2. PI effect on markers of oxidative stress and inflammation



Human coronary artery endothelial cells were cultured for 20 days with the indicated protease inhibitors (PIs). (A) Reactive oxygen species production was assessed by the oxidation of CM-H₂DCFDA derivatives or the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT). Results are normalized to the DNA or protein content, respectively, and expressed as mean \pm SEM of 3–10 experiments. (B) The activation of NF-κB was evaluated by the phosphorylation of the p65/RelA subunit. Quantification was performed versus total p65/RelA NF-κB and expressed as arbitrary units (AU). Representative blots (performed in triplicate) are shown. (C) The secretion of interleukin (IL)-6 and IL-8 in 24 h culture supernatants was measured by Luminex® technology. Results are normalized to the cell protein content and are the mean \pm SEM of 3–8 experiments performed in triplicate. **P*<0.05 versus dimethyl sulfoxide (DMSO)-incubated cells. ATV/r, ritonavir-boosted atazanavir; DRV/r, ritonavir-boosted darunavir; LPV/r, ritonavir-boosted lopinavir.

M Auclair *et al.*

Figure 3. PI effect on senescence markers



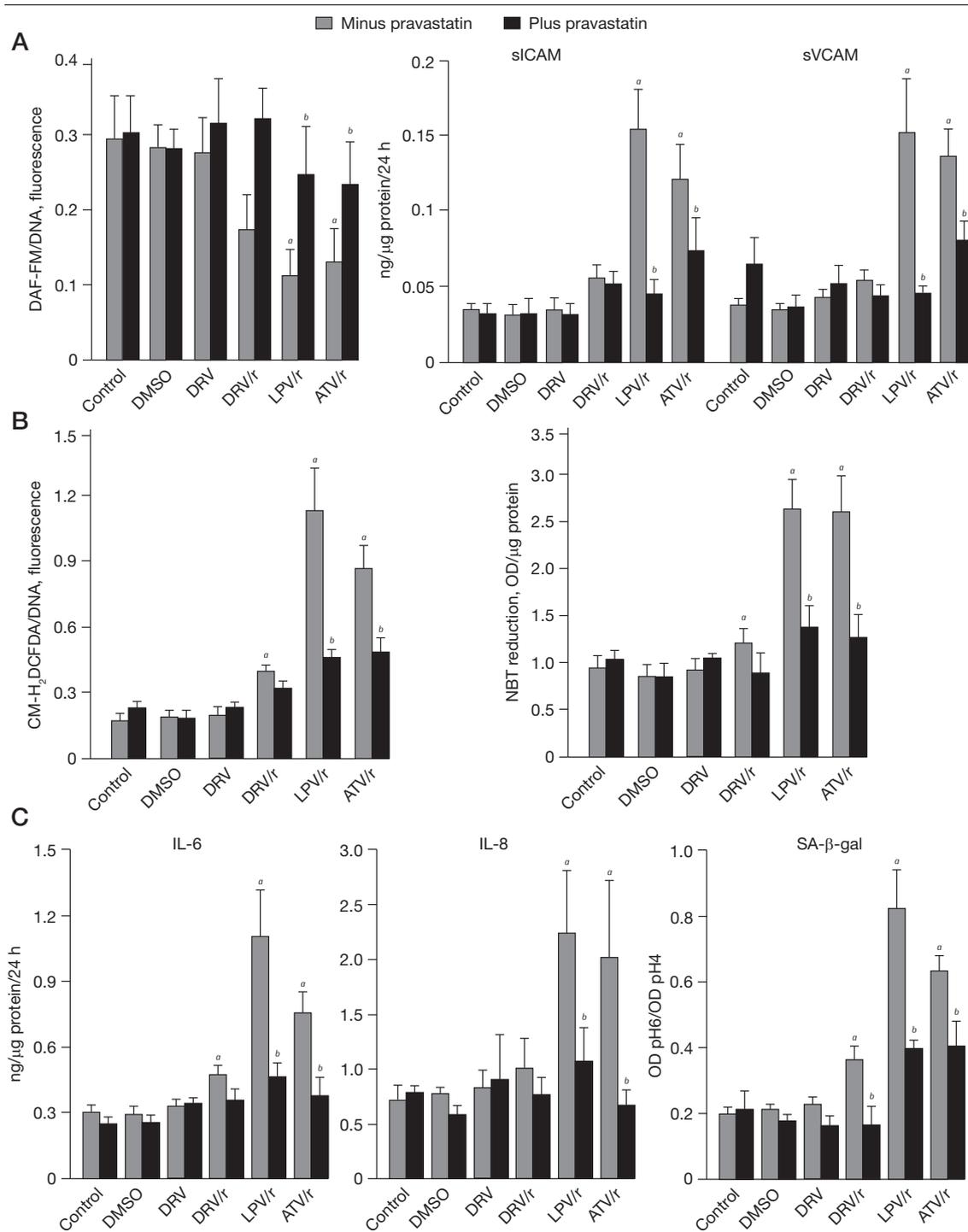
Human coronary artery endothelial cells were cultured for 20 days with the indicated protease inhibitors (PIs). (A) Senescence was evaluated by the phosphorylation state of p53 (p-p53/p53) and the expression of p21^{WAF-1}, p16^{INK4} and prelamin A. Quantification was performed relative to β-actin. Results are expressed as arbitrary units (AU) and are the mean ± SEM of 3–8 experiments. Representative blots (performed in triplicate) are shown. (B) Senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) activity. Blue X-gal staining was evaluated at 630 nm. Results are the mean ± SEM of 3–8 experiments performed in triplicate. ^a*P* < 0.05 versus dimethyl sulfoxide (DMSO)-incubated cells. ATV/r, ritonavir-boosted atazanavir; DRV/r, ritonavir-boosted darunavir; LPV/r, ritonavir-boosted lopinavir.

However, an effect linked to ATV is also possible, since in the absence of RTV it can promote senescence of human mesenchymal stem cells [53]. Moreover, ATV, as LPV and RTV, could inhibit ZMPSTE24, even if the level of inhibition was lower than observed with the two other PIs, while DRV was devoid of any inhibitory effect [54]. This *in vitro* toxicity contrasts with the *in vivo* clinical data since treatment with ATV or ATV/r was not associated with an increased risk of myocardial infarction in HIV-infected patients [6]. It could be proposed that the increased level of free bilirubin generally observed in patients receiving ATV might exert

beneficial anti-oxidant effects. Indeed, diabetic patients with Gilbert syndrome and increased bilirubin level presented with a lower prevalence of vascular complications as well as reduced levels of markers of oxidative stress and inflammation as compared to diabetic patients without Gilbert syndrome [55].

Otherwise, LPV/r markedly altered endothelial cell function: it impaired NO production, increased the secretion of ET-1 and adhesion molecules, and induced oxidative stress and inflammation. It also induced premature senescence. These results agree with our previous studies [29], even if a shorter incubation time (20- versus 30-day)

Figure 4. Effect of pravastatin on PI-induced endothelial cell dysfunctions



Human coronary artery endothelial cells were cultured for 20 days with the indicated protease inhibitors (PIs). Pravastatin (25 μmol/l) was added for the last 3 days of incubation. (A) Nitric oxide (NO) production was evaluated with the fluorescent indicator 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM), and sICAM and sVCAM secretion by Luminex® technology. (B) Oxidative stress was evaluated as in the footnote of Figure 2A. (C) Inflammation (interleukin [IL]-6 and IL-8) and senescence (SA-β-galactosidase [SA-β-gal] activity) markers were evaluated as in the footnotes of Figures 2 and 3, respectively. The results are the mean ± SEM of four separate experiments performed in triplicate. *P<0.05 versus dimethyl sulfoxide (DMSO)-incubated cells. †P<0.05 versus the respective control or PI-treated cells.

M Auclair *et al.*

and other concentrations of LPV (15.9 versus 10.0 $\mu\text{mol/l}$) and RTV (1.4 versus 2.0 $\mu\text{mol/l}$) have been tested.

Statins are lipid-lowering drugs widely used for the treatment and prevention of cardiovascular disease. They display additional cholesterol-independent or pleiotropic effects on various aspects of cardiovascular disease, including improving endothelial function, decreasing vascular inflammation and enhancing plaque stability [56]. Statins have also been shown to decrease oxidative stress [57]. In the present study, a beneficial effect of pravastatin was observed on all PI-induced endothelial cell dysfunctions; vascular dysfunction, inflammation, oxidative stress and also on PI-induced senescence. This effect could be related to the ability of statins to decrease the PI-induced accumulation of farnesylated prelamins A, by impeding the synthesis of the farnesyl anchor, and therefore decreasing prelamins A toxicity and ability to induce cell senescence [29,58]. In our previous study we also reported the beneficial effect of an anti-oxidant treatment [29]. These data led us to propose that the PI-induced farnesylated prelamins A accumulation is the initial toxic event leading to increased oxidative stress, inflammation and to senescence. The ability of the different PI combinations to alter endothelial cell functions, as shown here, correlated with their efficiency to inhibit ZMPSTE24 [54].

This study has limitations. We have not evaluated human endothelial cell samples from HIV-infected patients treated with these PI combinations. However, in our previous study senescence markers have been detected in peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected patients under ritonavir-boosted PIs, and their level was lower when the patients were co-treated with statins [29].

In conclusion, we report here that DRV/r, ATV/r and LPV/r differentially affected vascular endothelial cell function, cell integrity and induced senescence. The effect of each PI combination on endothelial cells might in part result from the concentration of the ritonavir boost and from their ability to inhibit ZMPSTE24. Even if these *in vitro* studies cannot be translated directly to the clinics, they suggest that even at boosting concentrations, RTV could adversely affect endothelium. Whether another CYP3A4 inhibitor, such as cobicistat, structurally related but devoid of any inhibitory effect on the HIV protease, will exert or not an effect on ZMPSTE24 is difficult to infer and requires additional experiments. Importantly, adding a statin to long-term PI-treated cells could diminish endothelial cell dysfunction and delay senescence, which is important in the clinical use.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Janssen-Cilag and by INSERM. We thank N Brunel and B Lescure,

Institut de Recherche en Santé Saint-Antoine-IFR 65, for their expertise in Technology (Luminex).

Disclosure statement

This work was supported by a grant from Janssen-Cilag. JC received honoraria for lectures or travel grants from ViiV Healthcare, Merck, Gilead, BMS and Janssen-Tibotec. All other authors declare no competing interests.

References

- Islam FM, Wu J, Jansson J, Wilson DP. Relative risk of cardiovascular disease among people living with HIV: a systematic review and meta-analysis. *HIV Med* 2012; **13**:453–468.
- Bavinger C, Bendavid E, Niehaus K, *et al.* Risk of cardiovascular disease from antiretroviral therapy for HIV: a systematic review. *PLoS ONE* 2013; **8**:e59551.
- Boccard F, Lang S, Meuleman C, *et al.* HIV and coronary heart disease: time for a better understanding. *J Am Coll Cardiol* 2013; **61**:511–523.
- Lang S, Mary-Krause M, Cotte L, *et al.* Increased risk of myocardial infarction in HIV-infected patients in France, relative to the general population. *AIDS* 2010; **24**:1228–1230.
- Worm SW, Sabin C, Weber R, *et al.* Risk of myocardial infarction in patients with HIV infection exposed to specific individual antiretroviral drugs from the 3 major drug classes: the data collection on adverse events of anti-HIV drugs (D:A:D) study. *J Infect Dis* 2010; **201**:318–330.
- Monforte A, Reiss P, Ryom L, *et al.* Atazanavir is not associated with an increased risk of cardio or cerebrovascular disease events. *AIDS* 2013; **27**:407–415.
- Podzamczak D, Andrade-Villanueva J, Clotet B, *et al.* Lipid profiles for nevirapine vs. atazanavir/ritonavir, both combined with tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine over 48 weeks, in treatment-naïve HIV-1-infected patients (the ARTEN study). *HIV Med* 2011; **12**:374–382.
- Menzaghi B, Ricci E, Carezzi L, *et al.* Safety and durability in a cohort of HIV-1 positive patients treated with once and twice daily darunavir-based therapy (SCOLTA Project). *Biomed Pharmacother* 2013; **67**:293–298.
- Arathoon E, Schneider S, Baraldi E, *et al.* Effects of once-daily darunavir/ritonavir versus lopinavir/ritonavir on metabolic parameters in treatment-naïve HIV-1-infected patients at week 96: ARTEMIS. *Int J STD AIDS* 2013; **24**:12–17.
- Orkin C, DeJesus E, Khanlou H, *et al.* Final 192-week efficacy and safety of once-daily darunavir/ritonavir compared with lopinavir/ritonavir in HIV-1-infected treatment-naïve patients in the ARTEMIS trial. *HIV Med* 2013; **14**:49–59.
- Oliviero U, Bonadies G, Apuzzi V, *et al.* Human immunodeficiency virus per se exerts atherogenic effects. *Atherosclerosis* 2009; **204**:586–589.
- Fiala M, Murphy T, MacDougall J, *et al.* HAART drugs induce mitochondrial damage and intercellular gaps and gp120 causes apoptosis. *Cardiovasc Toxicol* 2004; **4**:327–337.
- Baliga RS, Liu C, Hoyt DG, Chaves AA, Bauer JA. Vascular endothelial toxicity induced by HIV protease inhibitor: evidence of oxidant-related dysfunction and apoptosis. *Cardiovasc Toxicol* 2004; **4**:199–206.
- Lang S, Mary-Krause M, Cotte L, *et al.* Impact of individual antiretroviral drugs on the risk of myocardial infarction in human immunodeficiency virus-infected patients: a case-control study nested within the French Hospital Database on HIV ANRS cohort CO4. *Arch Intern Med* 2010; **170**:1228–1238.

15. Aberg JA. Cardiovascular complications in HIV management: past, present, and future. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 50:54–64.
16. Tomaka F, Lefebyre E, Sekar V, *et al.* Effects of ritonavir-boosted darunavir vs. ritonavir-boosted atazanavir on lipid and glucose parameters in HIV-negative, healthy volunteers. *HIV Med* 2009; 10:318–327.
17. Mallon PW. Antiretroviral therapy-induced lipid alterations: *in-vitro*, animal and human studies. *Curr Opin HIV AIDS* 2007; 2:282–292.
18. Thomas CM, Smart EJ. How HIV protease inhibitors promote atherosclerotic lesion formation. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18:561–565.
19. Wang X, Chai H, Yao Q, Chen C. Molecular mechanisms of HIV protease inhibitor-induced endothelial dysfunction. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 44:493–499.
20. Jiang B, Hebert VY, Zavec JH, Dugas TR. Antiretrovirals induce direct endothelial dysfunction *in vivo*. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42:391–395.
21. Chai H, Yang H, Yan S, *et al.* Effects of 5 HIV protease inhibitors on vasomotor function and superoxide anion production in porcine coronary arteries. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40:12–19.
22. Zhong DS, Lu XH, Conklin BS, *et al.* HIV protease inhibitor ritonavir induces cytotoxicity of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1560–1566.
23. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109:III27–III32.
24. Chen C, Lu XH, Yan S, Chai H, Yao Q. HIV protease inhibitor ritonavir increases endothelial monolayer permeability. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335:874–882.
25. Mondal D, Pradhan L, Ali M, Agrawal KC. HAART drugs induce oxidative stress in human endothelial cells and increase endothelial recruitment of mononuclear cells: exacerbation by inflammatory cytokines and amelioration by antioxidants. *Cardiovasc Toxicol* 2004; 4:287–302.
26. Wang X, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C. Roles and mechanisms of human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir and other anti-human immunodeficiency virus drugs in endothelial dysfunction of porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *Am J Pathol* 2009; 174:771–781.
27. Fu W, Chai H, Yao Q, Chen C. Effects of HIV protease inhibitor ritonavir on vasomotor function and endothelial nitric oxide synthase expression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 39:152–158.
28. Conklin BS, Fu W, Lin PH, *et al.* HIV protease inhibitor ritonavir decreases endothelium-dependent vasorelaxation and increases superoxide in porcine arteries. *Cardiovasc Res* 2004; 63:168–175.
29. Lefèvre C, Auclair M, Boccarda F, *et al.* Premature senescence of vascular cells is induced by HIV protease inhibitors: implication of prelamin A and reversion by statin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:2611–2620.
30. Dubé MP, Shen C, Greenwald M, Mather KJ. No impairment of endothelial function or insulin sensitivity with 4 weeks of the HIV protease inhibitors atazanavir or lopinavir-ritonavir in healthy subjects without HIV infection: a placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* 2008; 47:567–574.
31. Grubb JR, Dejam A, Voell J, *et al.* Lopinavir-ritonavir: effects on endothelial cell function in healthy subjects. *J Infect Dis* 2006; 193:1516–1519.
32. Murphy RL, Berzins B, Zala C, *et al.* Change to atazanavir/ritonavir treatment improves lipids but not endothelial function in patients on stable antiretroviral therapy. *AIDS* 2010; 24:885–890.
33. Guaraldi G, Zona S, Alexopoulos N, *et al.* Coronary aging in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis* 2009; 49:1756–1762.
34. Caron M, Auclair M, Donadille B, *et al.* Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ* 2007; 14:1759–1767.
35. Stoff DM, Khalsa JH, Monjan A, Portegies P. Introduction: HIV/AIDS and aging. *AIDS* 2004; 18 Suppl 1:S1–S2.
36. Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, *et al.* Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res* 2007; 100:1659–1666.
37. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Tateno K, Komuro I. The role of vascular cell senescence in atherosclerosis: antisenesescence as a novel therapeutic strategy for vascular aging. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; 2:141–148.
38. Ragnauth CD, Warren DT, Liu Y, *et al.* Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation* 2010; 121:2200–2210.
39. Capell BC, Collins FS, Nabel EG. Mechanisms of cardiovascular disease in accelerated aging syndromes. *Circ Res* 2007; 101:13–26.
40. Varga R, Eriksson M, Erdos MR, *et al.* Progressive vascular smooth muscle cell defects in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:3250–3255.
41. McClintock D, Gordon LB, Djabali K. Hutchinson-Gilford progeria mutant lamin A primarily targets human vascular cells as detected by an anti-Lamin A G608G antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:2154–2159.
42. Caron M, Auclair M, Sterlingot H, Kornprobst M, Capeau J. Some HIV protease inhibitors alter lamin A/C maturation and stability, SREBP-1 nuclear localization and adipocyte differentiation. *AIDS* 2003; 17:2437–2444.
43. Coffinier C, Hudon SE, Farber EA, *et al.* HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:13432–13437.
44. Sinensky M, Fantle K, Trujillo M, *et al.* The processing pathway of prelamin A. *J Cell Sci* 1994; 107:61–67.
45. De Jesus E, Ortiz AM, Khanlou U. Efficacy and safety of darunavir/ritonavir versus lopinavir/ritonavir in ARV-treatment-naïve HIV-1-infected patients at week 48: ARTEMIS (TMC114-C211). *47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 17–20 September 2007, Chicago, IL, USA. Abstract H718B.
46. Taburet AM, Raguin G, Le Tiec C, *et al.* Interactions between amprevir and the lopinavir-ritonavir combination in heavily pretreated patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75:310–323.
47. Taburet AM, Piketty C, Chazallon C, *et al.* Interactions between atazanavir-ritonavir and tenofovir in heavily pretreated human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:2091–2096.
48. Sasaki CY, Barberi TJ, Ghosh P, Longo DL. Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I[κ]B[α]-independent NF- κ B pathway. *J Biol Chem* 2005; 280:34538–34547.
49. Brasier AR. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res* 2010; 86:211–218.
50. Capel E, Auclair M, Caron-Debarle M, Capeau J. Effects of ritonavir-boosted darunavir, atazanavir and lopinavir on adipose functions and insulin sensitivity in murine and human adipocytes. *Antivir Ther* 2012; 17:549–556.
51. Hebert VY, Crenshaw BL, Romanoff RL, Ekshyan VP, Dugas TR. Effects of HIV drug combinations on endothelin-1 and vascular cell proliferation. *Cardiovasc Toxicol* 2004; 4:117–131.
52. Jamaluddin MS, Lin PH, Yao Q, Chen C. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis* 2010; 208:104–111.

M Auclair *et al.*

53. Hernandez-Vallejo SJ, Beaupere C, Larghero J, Capeau J, Lagathu C. HIV protease inhibitors induce senescence and alter osteoblastic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells: beneficial effect of pravastatin. *Aging Cell* 2013; **12**:955–965.
54. Coffinier C, Hudon SE, Lee R, *et al.* A potent HIV protease inhibitor, darunavir, does not inhibit ZMPSTE24 or lead to an accumulation of farnesyl-prelamin A in cells. *J Biol Chem* 2008; **283**:9797–9804.
55. Inoguchi T, Sasaki S, Kobayashi K, Takayanagi R, Yamada T. Relationship between Gilbert syndrome and prevalence of vascular complications in patients with diabetes. *JAMA* 2007; **298**:1398–1400.
56. Liao JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol* 2002; **86**:5–18.
57. Patel TN, Shishehbor MH, Bhatt DL. A review of high-dose statin therapy: targeting cholesterol and inflammation in atherosclerosis. *Eur Heart J* 2007; **28**:664–672.
58. Caron-Debarle M, Lagathu C, Boccard F, Vigouroux C, Capeau J. HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol Med* 2010; **16**:218–229.

Accepted 4 February 2014; published online 17 February 2014

3- Conclusion

Chacune des combinaisons d'IPs utilisées a des effets différents sur la fonction endothéliale et la longévité des HCAECs. L'incubation continue des cellules pendant 20 jours avec le LPV/r ou l'ATV/r diminue l'expression protéique de la NO synthase endothéliale (e-NOS) et la production de NO, augmente la sécrétion de l'endothéline-1 et des molécules d'adhésion solubles, et induit un stress oxydant, une inflammation et une sénescence. Au contraire, un traitement de 20 jours des HCAECs par le DRV n'a pas d'effet sur la fonction des cellules endothéliales. Lorsque le DRV est associé au ritonavir (DRV/r), il exerce peu ou pas d'effet sur la fonction endothéliale (en fonction des marqueurs étudiés). Un effet bénéfique de la pravastatine est observé sur tous les dysfonctionnements endothéliaux cellulaires testés, à savoir, l'inflammation, le stress oxydant et la sénescence. Cet effet est probablement lié à la capacité des statines à diminuer le niveau de farnésylation de la prélamine A, en empêchant la synthèse de l'ancre de farnésyl, et donc de diminuer la toxicité de la prélamine A. Il faut noter que ce traitement par la pravastatine n'empêche pas l'accumulation de prélamine A mais diminue de façon importante sa toxicité, confirmant l'importance des inhibiteurs de farnésylation pour le traitement des patients. La prélamine A farnésylée serait donc à l'origine des dysfonctions cellulaires induites par les IPs.

III- Etude 3 : Etude comparative des effets du maraviroc, dolutégravir, maraviroc/dolutégravir et darunavir/ritonavir sur des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines

1- Introduction et objectifs de travail

Le maraviroc (MVC), un antagoniste du récepteur CCR5 et le dolutégravir (DTG), un inhibiteur de l'intégrase sont des antirétroviraux récemment mis sur le marché avec peu de recul sur leurs effets d'un point de vue clinique et avec peu de données *in vitro*. C'est pourquoi à la demande du laboratoire ViiV, nous avons étudié leurs effets sur des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines. Pour cela, nous avons comparé ces molécules aux combinaisons atazanavir/ritonavir et darunavir/ritonavir, déjà étudiées dans des cellules musculaires lisses et endothéliales d'artères coronaires humaines dans les deux premières études de ma thèse.

Ce travail s'est divisé en deux objectifs principaux :

- Evaluer l'impact du MVC, DTG, MVC+DTG et DRV/r sur les fonctions endothéliales *in vitro*. Pour cela, j'ai étudié l'effet de ces antirétroviraux sur la production de monoxyde d'azote (NO), l'expression de la NO synthase endothéliale (eNOS), la sécrétion de molécules d'adhésion (sICAM-1 et sVCAM-1) et de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) ainsi que sur la production d'espèce réactive de l'oxygène et l'expression de marqueurs de la sénescence (prélamine A, p16^{INK4}, p21^{WAF}, p-p53/p53 et l'activité SA-β-galactosidase). Cette étude est réalisée sur des cellules endothéliales d'un donneur adulte de 27 ans.
- Evaluer la capacité potentielle du MVC, DTG et MVC+DTG à moduler des voies impliquées dans le processus de sénescence. Pour cela, des cellules endothéliales d'un donneur de 89 ans (old control) sont traitées ou non par du MVC ou du DTG ou du MVC+DTG. Ces conditions sont comparées à une condition contrôle adulte « jeune » avec des cellules endothéliales d'un donneur de 27 ans non traitées (young control).

2- Rapport scientifique

Final report on the study

Comparative *in vitro* studies of the effect of Maraviroc, Dolutegravir and Darunavir/ritonavir on endothelial functions in human coronary artery endothelial cells (HCAEC).

JACQUELINE CAPEAU, MD, PHD
MARTINE CARON-DEBARLE, PHD
MARTINE AUCLAIR ENGINEER
PAULINE AFONSO PHD STUDENT
INSERM UMRS938, Faculté de Médecine site Saint-Antoine
27 rue Chaligny, 75571 Paris cedex 12, France
Tel : 33 1 4001 1484, 1352,1332
Fax : 33 1 4001 1432
email : jacqueline.capeau@inserm.fr

Final report May 2015

By Jacqueline Capeau, Martine Caron-Debarle, Martine Auclair, Pauline Afonso

Inserm UMRS 938, Centre de recherche Saint-Antoine, Faculté de Médecine site Saint-Antoine,
27 rue chaligny 75571 Paris cedex 12
Jacqueline.capeau@inserm.fr
martine.debarle@inserm.fr

Objectives

Primary objective: To evaluate whether maraviroc, dolutegravir, the association maraviroc plus dolutegravir and the PI darunavir in association with ritonavir, all used at therapeutically relevant concentrations (C_{max} levels observed in PK studies), can modify endothelial cell functions *in vitro*. The impact of the drugs on the production of nitric oxide (NO), the expression of NO synthase (e-NOS), the secretion of adhesion molecules, the secretion of inflammatory cytokines, the cellular "redox status" (production of reactive oxygen species) and cellular senescence markers was investigated.

Secondary objective: To evaluate the potential ability of maraviroc or dolutegravir to reverse age-related replicative senescence.

Experimental design

Human endothelial cells in primary culture

The human primary endothelial cells used in the assay are HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cells, obtained from PromoCell, GmbH). These cells are isolated from the coronary arteries (the right and the left coronary artery inclusive the anterior descending and the circumflex branches) from a donor. They are crucially involved in the regulation of coronary blood flow, cardiac functions, and also ideal for endothelial cell metabolism studies.

To perform the study we used endothelial cells from two different donors: one young donor (27 year-old) to study the cells from an young adult subject, and one old donor (89 year-old), whose cultured endothelial cells have been previously evaluated in our laboratory as presenting features of senescence at the basal level.

Cell treatment

Human endothelial cells were treated in the absence of the drugs, with DMSO alone (the drug solvent) and with the drugs dissolved in DMSO at clinically relevant concentrations (C_{max}) for 15 days. These concentrations were determined according to the literature: for maraviroc 0.9 $\mu\text{g/ml}$, for dolutegravir 3.7 $\mu\text{g/ml}$, for darunavir/ritonavir 7 and 0.6 $\mu\text{g/ml}$. All experiments were repeated 3 times.

Endothelial cell function

The effects of therapeutically relevant concentrations of the drugs were tested on endothelial NOS (e-NOS) protein expression and NO production. The level of the enzyme was measured by western blot and NO production by a fluorimetric method with the non-fluorescent cell permeable reagent, diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2DA).

Secretion of adhesion molecules

The effects of therapeutically relevant concentrations of the drugs were checked on the secretion of soluble intracellular cell adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) in 24-h culture supernatants by ELISA assays.

Secretion of pro-inflammatory cytokines

The effects of therapeutically relevant concentrations of the drugs were checked on the secretion of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) in 24-h culture supernatant by ELISA assays.

Reactive oxygen species production

The effects of therapeutically relevant concentrations of the drugs were tested on ROS production by a fluorimetric method that measures the oxidation of the permeant derivative CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester). ROS production was also tested by the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT). Results were normalized either to the DNA content (ROS) or the protein level (NBT).

Cellular senescence

Senescence of endothelial cells were evaluated by measuring the ratio of the β -galactosidase activity at pH 6 and pH 4. The level of the senescence proteins p16^{INK4}, p21^{WAF}, p53 and phospho-p53 and the ratio phospho-p53/p53 was evaluated by Western blot. All the levels were related to that of tubulin used as a depot marker in each case.

Reversion of age-related replicative senescence

The ability of maraviroc or dolutegravir to reverse senescence was evaluated in endothelial cells from a subject aged 89 years by measuring the ratio of the senescence-associated β -galactosidase activity and the level of the senescence markers prelamin A, p16^{INK4}, p21^{WAF}, p53, phosphor-p53 and the ratio phospho-p53/p53. We also evaluated the ROS production.

Statistics

Comparison of the different variables with or without drug treatment was performed with parametric tests, the control value being set at 100%. Significant difference was considered if $p < 0.05$ (*).

Results

First objective: analysis of endothelial function, secretion of adhesion molecules, of inflammation markers, oxidative stress and senescence in human endothelial cells issued from a young control: effect of MVC, DTG, their association and DRV/r on these functions

Endothelial cell function

Maraviroc (MVC), Dolutegravir (DTG) used alone or in association did not (or minimally for MVC) alter the expression of e-NOS as evaluated by western blot, by comparison with control cells or cells treated with DMSO alone. DRV/r decreased the expression of the enzyme.

As well MVC, DTG and the association MVC+DTG did not decrease NO production by endothelial cells, as measured by the fluorescent NO indicator DAF-FM diacetate. Conversely, the association MRV+DOL increased NO production. Regarding DRV/r, the production of NO was significantly decreased.

Therefore MVC, DTG and the association MVC+DTV did not impair endothelial function while DRV/r induced a mild endothelial dysfunction.

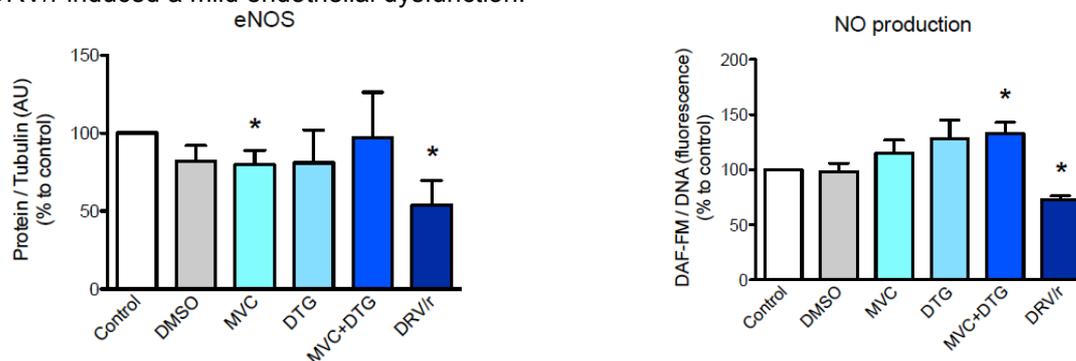


Figure 1: HCAEC were cultured for 15 days with the indicated drugs. Protein expression of e-NOS was evaluated by Western blot. The results were quantified and expressed as arbitrary units (AU) relative to β -actin. NO production was evaluated by the DAF fluorescence normalized to the DNA level. (* $p < 0.05$, $n = 3$)

Secretion of adhesion molecules

Regarding the secretion of adhesion molecules, MVC, DTG and the association MVC+DTG significantly decreased the secretion of the adhesion molecules s-ICAM1 by half or s-VCAM1 by 60%. By contrast DRV/r increased the secretion of these two molecules by 2-fold. This result suggests an improved endothelial function in the presence of MVC, DTG and the association MVC+DTV by contrast to DRV/r.

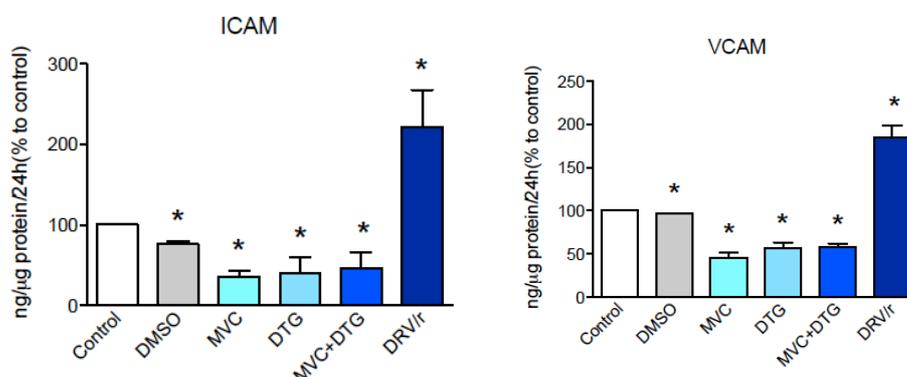


Figure 2: Soluble ICAM-1 and VCAM-1 levels were evaluated in 24h-culture supernatant by ELISA. (* $p < 0.05$, $n = 3$).

Secretion of pro-inflammatory cytokines

Regarding the secretion of the cytokine IL-6, MVC, DTG and the association MVC+DTV significantly decreased its secretion as compared to the control.

Regarding IL8, MVC, mildly decreased the secretion of the chemokine, the effect was not significant for DTG and the association MVC+DTG, and DRV/r increased it.

Therefore, MVC, DTG and the association MVC+DTG exerted an anti-inflammatory effect on endothelial cells while DRV/r mildly increased the inflammatory status of these cells.

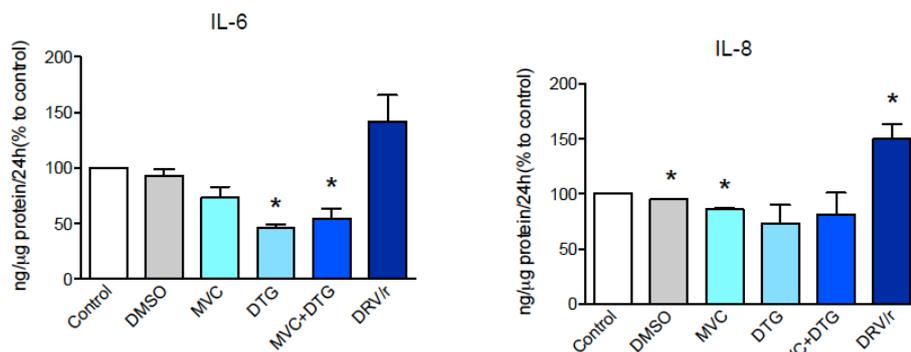


Figure 3: HCAEC were cultured for 15 days with the indicated drugs. IL-6 and IL-8 secretion was evaluated in 24h-culture supernatant by ELISA. (* $p < 0.05$, $n = 3$)

Endothelial cell oxidative status and production of reactive oxygen species

MVC, DTG and the association MVC+DTV did not alter the oxidative stress markers, CM-H₂DCFDA oxidation and NBT reduction. DRV/r increased ROS production as evaluated by NBT reduction and CM-H₂DCFDA oxidation.

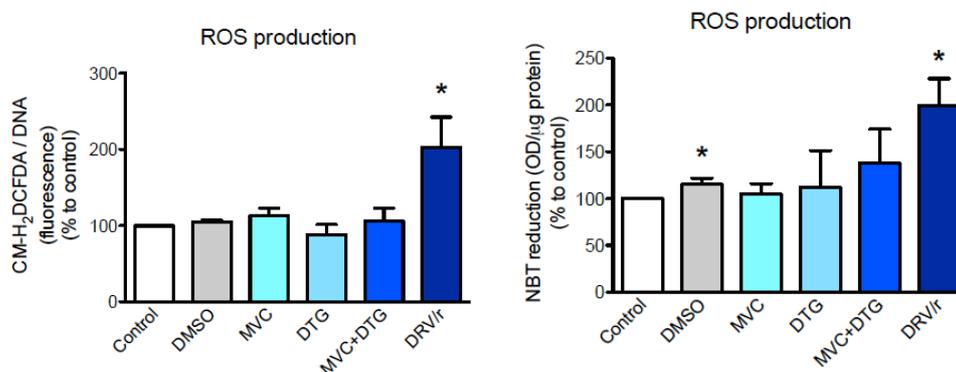


Figure 4: HCAEC were cultured for 15 days with the indicated drugs. ROS production was indirectly determined by the oxidation of CM-H₂DCFDA and the reduction of NBT. (* $p < 0.05$, $n = 4-6$).

Endothelial cell senescence

Since some PIs are known to trigger premature senescence in endothelial cells (Auclair et al, Antiviral Ther 2014), we tested senescence markers in HCAEC treated or not for 15 days with the drugs. We observed that MVC, had no effect on the level of senescence as evaluated by SA-beta galactosidase activity while DTG and the association MVC+DTV decreased the basal level of senescence. By contrast, DRV/r increased the level of senescence.

Regarding prelamin A, MVC, DTG and the association MVC+DTV did not induce prelamin A accumulation as expected while DRV/r increased the level of the protein. Regarding the markers of cell cycle arrest, p16 and p21, MVC, DTG and the association MVC+DTV did not increase the level of p16 and even markedly decreased the level of p21 for DTV and MVC+DTG. DRV/r increased the level of p21 and p16.

Regarding phospho-p53 and p53, the level of p53 was reduced by DTG ($p=0.07$) and this decrease was significant for the association MVC+DTG ($p=0.04$). However the level of pp53/p53 was not modified whatever the drug used, possibly due to inter-experimental variations.

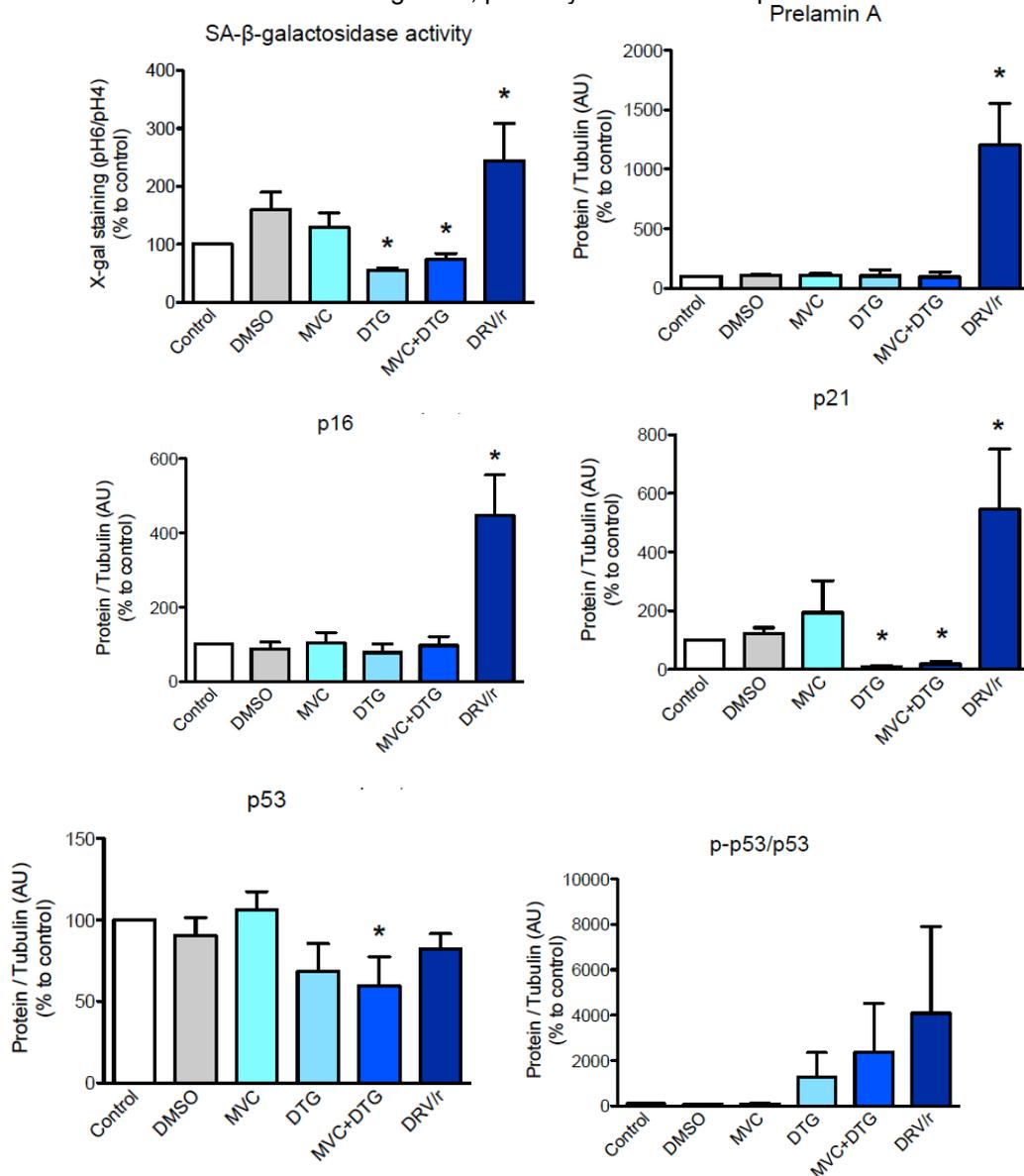


Figure 5: HCAEC were cultured for 15 days with the indicated drugs. Senescence markers were evaluated by Western blot. SA-β-galactosidase activity was evaluated by the ratio of the enzyme activity at pH6/pH4. (* $p < 0.05$, $n=3$)

Thus DTG (and the association DTG+MVC) was able to decrease the basal level of senescence observed in normal endothelial cells from a young subject. This decrease was associated with a decreased level of the cell-cycle inhibitor p21, and a trend for a decrease in p53 but not of the other senescence pathway, p16. The level of prelamin A was not modified arguing against a role for this protein in the basal senescence level.

Second objective: reversion of age-related senescence and increased oxidative stress in human endothelial cells from an aged control: effect of MVC, DTG, their association and DRV/R

Effect on oxidative stress

MVC, DTG and their association decreased the basal production of ROS in endothelial cells from a 89 years-old control

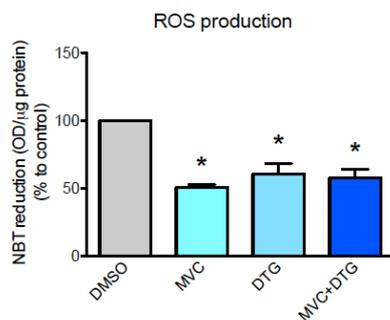


Figure 6: HCAEC were cultured for 15 days with the indicated drugs. ROS production was indirectly determined by the reduction of NBT. (* $p < 0.05$, $n=4-6$).

Effect on inflammation

MVC, DTG and their association decreased the basal level of inflammation as evaluated by the level of the activation factor phosphorylated-NF κ B related to total NF κ B.

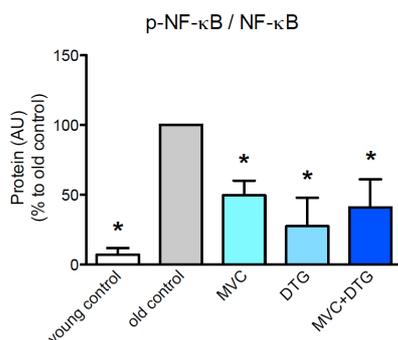


Figure 7: HCAEC from the young and the old control were cultured for 15 days in the absence of drug or with MVC, DTG or MVC+DTG for the old control cells. The levels of phospho-NF- κ B and total NF- κ B were evaluated by Western blot.

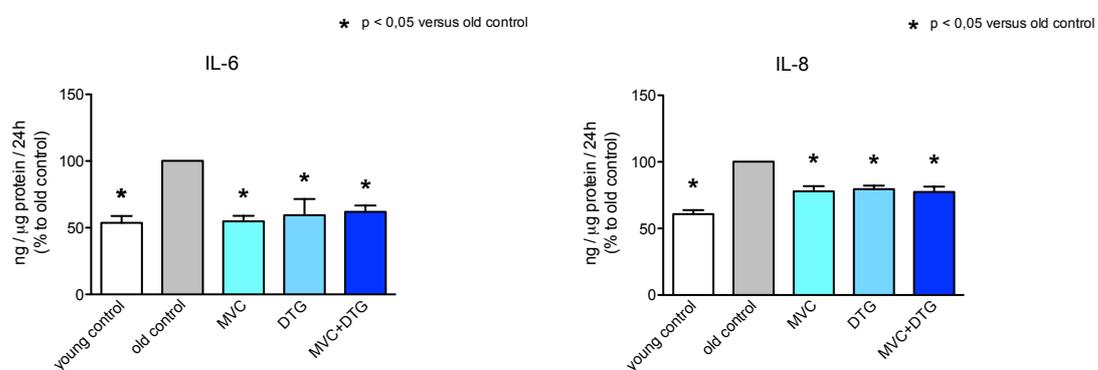


Figure 8: HCAEC from the young and the old control were cultured for 15 days in the absence of drug or with MVC, DTG or MVC+DTG for the old control cells. The level of IL-6 and IL-8 were evaluated in the cell supernatant by ELISA.

Effect on senescence

The ability of MVC, DTG and the association MVC+DTG to decrease senescence present in endothelial cells from an aged individual (80 years old) was evaluated. MVC, DTG and the association MVC+DTG were able to decrease by half the SA-beta galactosidase level present in the cells at the basal level. We also evaluated the percentage of senescent cells in each case. This level was 3.2% in the young control and 16.6% in the old one. MVC decreased senescence to 5.9%, DTG to 6.0% and the association to 5.6%.

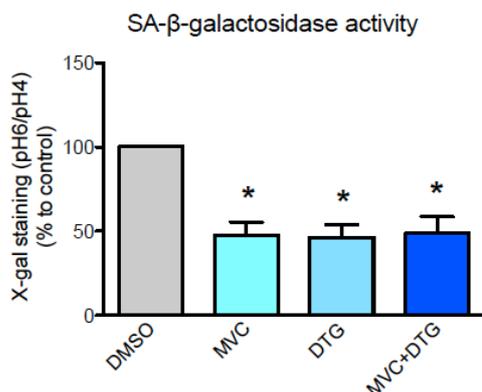
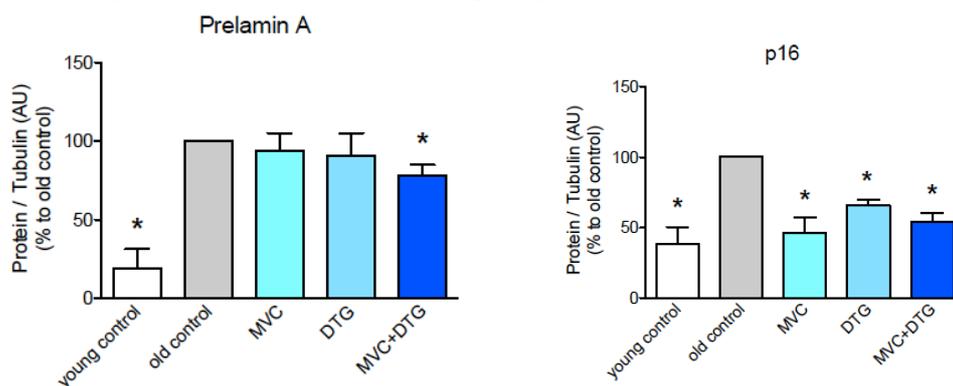


Figure 9: HCAEC were cultured for 15 days with the indicated drugs. SA- β -galactosidase activity was evaluated by the ratio of the enzyme activity at pH6/pH4. (* $p < 0.05$, $n = 3$)

Regarding prelamin-A, we observed a high level of the protein at the basal level in the old as compared to the young control and, as expected, the drugs did not modify this level. The association MVC+DTG mildly decreased the level of prelamin A.

Regarding the senescence proteins p16, p21 and p-p53, the level was high in the old as compared to the young control. In each case, MVC, DTG and the association MVC+DTG markedly reduced their level. For p16 and p-p53 the level in the presence of the drugs was not different from the level observed in the young control. For p21, MVC and DTG decreased its level which remained higher than in the young control, but their association further decreased the p21 level of the protein to that observed in the young control.



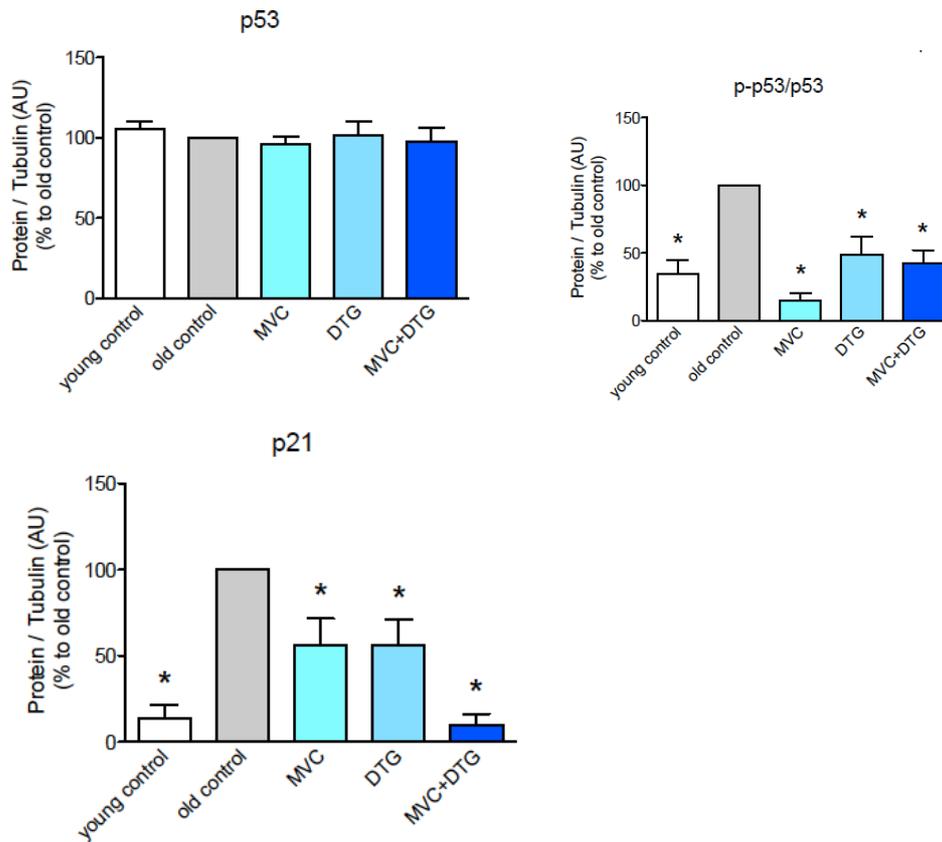


Figure 10: HCAEC were cultured for 15 days with the indicated drugs. Cells from the young control and cells from the old control treated or not with the drugs were evaluated. Senescence markers were evaluated by Western blot. SA- β -galactosidase activity was evaluated by the ratio of the enzyme activity at pH6/pH4. (* $p < 0.05$, $n = 3-4$).

Conclusion

Regarding endothelial functions in a young control, under our experimental conditions, MVC, DTG and their association did not exert any deleterious effect and even improved some functions as shown by the decreased production of the two adhesion molecules s-ICAM-1 and s-VCAM-1 as compared to the control. By contrast DRV/r mildly worsened endothelial functions.

This beneficial effect of MVC and DTG could result from their improved inflammatory status shown by the decreased production of IL-6 while the ROS production was similar to the control. Importantly, decreased inflammation was associated with decreased senescence for DTG and the association DTG+MVC and with decreased expression of the cell-cycle arrest markers p21 and p53. In the presence of MVC alone, the levels of senescence and of the cell-cycle arrest proteins was similar to the control. Thus in cells from a young adult, DTG improved the p21/p53 senescence pathway but not the p16 or p16^{INK4} pathways.

Darunavir associated with boosting concentrations of ritonavir mildly increased the level of p16 and accordingly of senescence and of the cell-cycle arrest proteins p16 and p21.

Endothelial cells from an old control presented markers of senescence at the basal state including high levels of p16 and SA-beta galactosidase as compared to the young control. MVC, DTG decreased senescence but not p16 level as expected. This was associated with a decreased ROS production and a decreased level of basal inflammation which could participate to decreased senescence. Accordingly, the level of the cell-cycle arrest proteins involved in the two senescence pathways, p16 and p21/p53 was also decreased.

In conclusion, regarding endothelial cells, we observed that DTG was able to improve endothelial function, inflammatory status and senescence in the situation of a young control. Moreover, in the situation of an aged control, the beneficial capacity of DTG to reverse senescence, inflammation and oxidative stress was clearly enhanced.

Regarding MVC, this drug exerted no deleterious effect on the different endothelial functions evaluated in the young control. Moreover MVC improved endothelial function as shown by the decreased secretion of adhesion molecules but not oxidative stress or senescence. In the situation of an aged control, MVC decreased by half senescence and oxidative stress.

Thus the beneficial effect of the two drugs, which was present but moderate in the situation of a young control, was clearly enhanced in the aged situation.

3- Discussion

Au cours de la première partie de cette étude, nous avons confirmé que le DRV/r, dans une moindre mesure, avaient des effets nocifs sur les cellules endothéliales du sujet adulte jeune, entraînant notamment une dysfonction endothéliale, un stress oxydant et une sénescence. Au contraire, le MVC, le DTG et l'association MVC+DTG, des molécules thérapeutiques récemment mises sur le marché et dont l'impact *in vitro* n'avait pas encore été évalué, induisent peu ou pas d'effet sur les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines adultes jeunes.

En effet, le MVC n'induit ni la production d'espèces réactives de l'oxygène ni le processus de sénescence cellulaire. De plus, cet antagoniste de CCR5 améliore le statut inflammatoire et ne modifie pas, voir améliore, la fonction endothéliale dans les cellules d'un sujet adulte jeune.

De même, le DTG et l'association MRV+DTG n'induisent pas de stress oxydant et ne modifient pas, voir améliorent la sénescence (notamment en inhibant la voie p21^{WAF}), le statut inflammatoire et la fonction endothéliale.

Dans la seconde partie de l'étude, nous avons évalué l'effet de ces drogues sur des cellules endothéliales d'artère coronaires humaines prélevées chez un donneur de 89 ans. Les cellules endothéliales de ce donneur âgé, en comparaison à des cellules endothéliales d'un donneur adulte jeune (27 ans) présentent, en absence de traitement, une dysfonction endothéliale (montré par la diminution de l'expression d'eNOS), une inflammation (montrée par une augmentation du rapport p-NF- κ B / NF- κ B) et une sénescence (montrée par une augmentation de l'expression de la prélamine A, de p16^{INK4}, p21^{WAF} et de p-p53/p53).

Le MVC, le DTG et l'association MVC+DTG, en inhibant certaines voies du programme de sénescence (p21^{WAF}, p-p53/p53 et p16^{INK4}), améliorent le niveau de base présent dans les cellules endothéliales du donneur âgé. De surcroît, ces drogues diminuent la production d'espèces réactives de l'oxygène et améliorent le statut inflammatoire (en diminuant p-NF- κ B / NF- κ B), ce qui participe aussi probablement à atténuer l'état de sénescence.

Enfin, le MVC et le DTG, en augmentant l'expression de l'eNOS, semblent améliorer la dysfonction endothéliale installée dans les cellules âgées, confirmant donc aussi notre hypothèse. Toutefois, l'association MVC+DTG ne modifie pas l'expression de l'eNOS et n'a pas d'impact sur la dysfonction endothéliale initialement présente dans les cellules âgées.

En conclusion, le MVC, le DGT et le MVC+DTG inhibent certaines voies impliquées dans la sénescence, particulièrement la voie p21^{WAF}. Ces drogues semblent donc améliorer le niveau de base de la sénescence dans des cellules endothéliales de donneur âgé, conduisant à une amélioration du statut sénescence de ces cellules.

De plus, ces drogues améliorent le statut anti-inflammatoire et oxydant, mis en évidence par une diminution du rapport p-NF-κB/NF-κB et une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Ces nouvelles drogues, récemment mises sur le marché, semblent donc avoir moins d'effets toxiques *in vitro* sur les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines, en comparaison à la combinaison d'inhibiteurs de la protéase, DRV/r.

Grâce à cette étude, nous avons montré que le MVC, le DTG, le MVC+DTG ont peu ou pas d'effets délétères sur les cellules endothéliales coronaires d'artères humaines, et, au contraire, semblent avoir des conséquences positives, notamment sur le stress oxydant et l'inflammation et en inhibant certaines voies impliquées dans la sénescence.

Nous pouvons donc supposer que ces molécules thérapeutiques induiront moins de conséquences cardio-métaboliques chez les patients infectés par le VIH.

Partie V

Conclusion générale

Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse s'inscrivent dans la thématique du laboratoire concernant les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans les atteintes vasculaires chez les patients lipodystrophiques porteurs d'une mutation du gène *LMNA* ou infectés par le VIH et traités par des antirétroviraux, atteints d'une laminopathie avec défaut de maturation de la lamine A. J'ai effectué des études expérimentales sur les deux principaux types de cellules vasculaires, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. J'ai étudié d'une part l'impact de la surexpression de gènes *LMNA* mutés, comportant trois mutations naturelles ayant des conséquences cardiovasculaires cliniques chez les patients. D'autres part, j'ai reproduit au niveau cellulaire les traitements antirétroviraux à base d'IPs connus pour induire des atteintes cardiovasculaires chez les patients infectés par le VIH et une altération de la cascade de maturation de la lamine A dans leurs cellules. J'ai évalué l'impact des mutations *LMNA* ou des combinaisons d'IPs sur les cellules endothéliales et musculaires lisses en me focalisant soit sur la fonction endothéliale soit sur la transdifférenciation ostéogénique/calcification des cellules musculaires lisses, ces événements étant impliqués, tout comme la sénescence, dans la mise en place de l'athérosclérose.

Les données obtenues dans les deux modèles cellulaires sont en accord avec l'hypothèse d'un rôle toxique majeur de l'accumulation de prélamine A sous sa forme farnésylée. Ils apportent des hypothèses supplémentaires dans la compréhension des maladies vasculaires liées au vieillissement.

Une des limites de l'étude concerne le temps de traitement en culture cellulaire. Il est impossible de reproduire les conditions présentes *in vivo* chez les patients infectés par le VIH ou porteurs d'une mutation *LMNA*. Nos cellules étant des cultures primaires, le nombre de passages est limité à environ 6. C'est pourquoi nous avons traité les cellules par des antirétroviraux pendant 15 ou 21 jours avec les concentrations sériques maximales observées chez les patients. Par ailleurs, en utilisant des méthodes de transfection transitoire du gène

LMNA muté, nous évaluons les dysfonctions cellulaires des CMLV après 7 jours de transfection, ce qui peut éventuellement diminuer leur incidence au niveau cellulaire

Par ces expériences, j'ai pu mettre en évidence, pour la première fois, le rôle direct des mutations du gène *LMNA* et de certaines combinaisons d'IPs sur les fonctions et le phénotype des CMLV. Qu'elles soient transfectées par de la lamine A mutée ou traitées à long-terme par certains IPs, les cellules développent une sénescence, un stress oxydant, une inflammation ainsi qu'une calcification associée à une transdifférenciation vers un phénotype ostéoblastique. Nous avons donc mis en lumière, *in vitro*, une des causes de l'origine des complications vasculaires observées chez ces patients, ce qui n'avait pas encore été étudiée.

De surcroît, nos résultats apportent un nouveau facteur important à prendre en compte dans la mise en place des dysfonctions cellulaires : le rôle de la ZMPSTE24, l'enzyme de maturation de la prélamine A farnésylée en lamine A mature, dont l'expression est diminuée lors de la surexpression de lamine A mutée ou lors du traitement par une combinaison d'IPs. Le taux d'enzyme diminuant, la prélamine A s'accumule dans la cellule sous sa forme toxique farnésylée. Nous avons montré que cette down-régulation de ZMPSTE24 a un rôle clé dans la mise en place des dysfonctions cellulaires. En effet, le silencing de ZMPSTE24 par des siRNA mime tous les effets des mutations et des traitements d'IPs sur les CMLV contrôles, en particulier la transdifférenciation ostéogénique, la calcification, la sénescence et l'accumulation de prélamine A, confirmant l'importance du niveau d'expression de cette enzyme dans le déclenchement de ces événements. L'importance de la ZMPSTE24 dans le fonctionnement cellulaire avait, en effet, été montrée par la sévérité des atteintes des patients mutés sur cette enzyme.

Le miARN-141-3p, un inhibiteur connu de l'expression de la ZMPSTE24, (Yu et al. 2013) augmente significativement dans les CMLV mutées *LMNA* D47Y et R482W, ou traitées par les antirétroviraux (LPV/r), apportant un premier élément permettant d'expliquer le défaut d'expression de l'enzyme.

Il faut noter que l'expression de l'enzyme ZMPSTE24 est maintenue à son niveau basal lorsque les CMLV sont cotraitées par les IPs et la pravastatine, un inhibiteur de farnésylation, ou cotraitées par les IPs et un antioxydant, la N-acétyl cystéine, qui reversent partiellement les dysfonctions cellulaires. Ces données soulignent l'importance pour la cellule musculaire lisse vasculaire de maintenir au plus haut son taux de ZMPSTE24 et au plus bas son statut redox

et son niveau de prélamine A farnésylée. Par ailleurs, ces résultats montrent le rôle important du stress oxydant dans la régulation négative de ZMPSTE24.

Au contraire, le processus d'ostéogenèse/calcification n'est pas impliqué dans la diminution d'expression de ZMPSTE24. En effet, lors du « silencing » du facteur de transcription Runx2 par siRNA dans des cellules prétraitées par le LPV/r, l'expression de la ZMPSTE24 ne remonte pas à son niveau basal, montrant que le blocage de la calcification ne suffit pas pour reverser les effets des IPs.

Nos résultats n'excluent pas une diminution coïncidente de l'activité de la ZMPSTE24 dans des cellules en réponse aux IPs, comme il a été montré *in vitro* sur l'enzyme purifiée. (Coffinier et al. 2007, Coffinier et al. 2008, Hudon et al. 2008) L'effet combiné de diminution de l'expression et de diminution de l'activité de l'enzyme ZMPSTE24 conduit probablement à l'accumulation de la prélamine A farnésylée et à ses conséquences cellulaires.

Ces données nous ont permis de mettre en avant de nouvelles hypothèses sur la mécanistique conduisant à la sur-expression de prélamine A farnésylée et sur sa toxicité, mettant en lumière de nouvelles pistes sur la physiopathologie du processus athérosclérotique chez les patients infectés par le VIH ou porteurs de mutations *LMNA*, mais aussi lors du vieillissement physiologique.

Si nos résultats appuient l'hypothèse de la toxicité cellulaire de la forme farnésylée de la prélamine A, notamment par la diminution de l'expression de son enzyme de maturation, il a été montré par Ibrahim et al. (Ibrahim et al. 2013) que le résidu farnésyl en lui-même n'était pas toujours un vecteur de la toxicité. Chez la souris *zmpste24^{-/-}*, l'inhibition de l'ICMT, qui ajoute un groupement méthyl à l'extrémité C-terminale de la prélamine A farnésylée, permet une réversion du phénotype de vieillissement accéléré chez ces souris. La farnésylation de la prélamine A ne serait donc pas le seul mécanisme intrinsèque à sa toxicité. D'ailleurs, cette hypothèse est confirmée par l'existence de laminopathies où les patients présentent des dysfonctions cellulaires et un vieillissement accéléré sans accumulation de prélamine A farnésylée. (Garg et al. 2009, Le Dour et al. 2011)

Dans les deux études des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines traitées par différentes classes d'antirétroviraux, nous avons mis en avant les effets différentiels de ces traitements. En effet, les combinaisons d'IPs, LPV/r, ATV/r, DRV/r, mais pas le DRV seul conduisent à une dysfonction endothéliale, un stress oxydant et une sénescence. Ces données permettent de faire des hypothèses quant à l'apparition de complications vasculaires, notamment de l'athérosclérose chez les patients infectés par le VIH et traités par ces molécules. Cette étude confirme que certains IPs peuvent être considérés comme un facteur de risque de complications vasculaires chez les patients traités.

Toutefois, de façon intéressante, le MVC, le DTG et la combinaison MVC+DTG n'ont pas d'effet sur les fonctions des cellules endothéliales en culture. D'après nos données, ces molécules seraient moins toxiques que les IPs pour les patients, d'un point de vue vasculaire tout du moins. Nos études *in vitro* sont à confirmer en clinique par des études à long terme.

Au contraire, dans les cellules endothéliales, ces traitements inhibent certaines voies impliquées dans le processus de sénescence, permettant d'améliorer, ou du moins de retarder la mise en place de ce programme. Toutefois, les mécanismes d'action restent à déterminer. Il serait donc intéressant de tester l'interaction probable entre ces traitements thérapeutiques et des molécules impliqués dans le processus de sénescence, en particulier dans la voie p21. En effet, une interaction directe pourrait induire une inhibition de l'activité de la molécule impliquée dans la sénescence, entraînant alors un affaiblissement de ce processus.

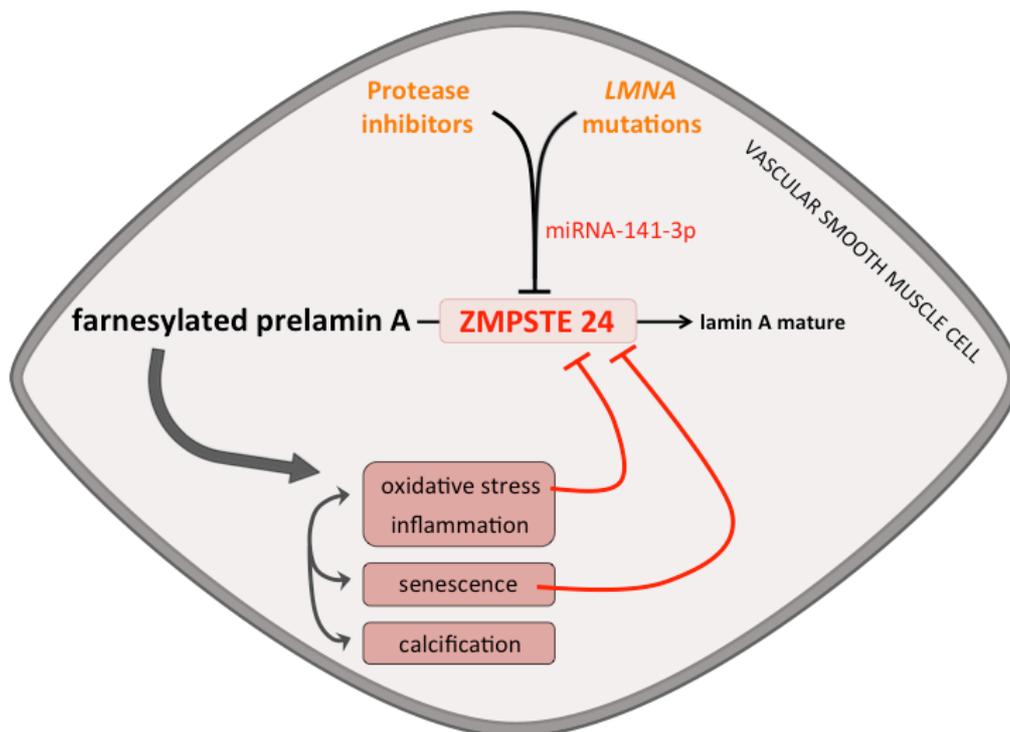
En conclusion, nos études *in vitro* montrent clairement que les traitements par des inhibiteurs de la protéase induisent une sénescence, une calcification et les dysfonctions associées dans des cellules musculaires d'artères coronaires humaines. De même, les IPs (sauf le DRV seul), mais pas le MVC, le DTG et le MVC+DTG, induisent une dysfonction endothéliale et une sénescence dans des cellules endothéliales d'artère coronaire humaine. Ces résultats indiquent donc une entrée plus précoce des cellules traitées par des IPs en sénescence. Bien que le lien formel entre sénescence cellulaire et vieillissement de l'individu soit difficile à établir, nos données apportent des explications et des hypothèses sur la mise en place des complications vasculaires, notamment de l'athérosclérose, chez les patients infectés par le VIH et traités.

Cette relation est aussi mise en avant, grâce à notre étude dans les cellules musculaires lisses vasculaires, chez les patients porteurs de mutations du gène *LMNA*, montrant que les

mécanismes mis en cause dans les laminopathies acquises et génétiques sont, au moins partiellement, communs. (Figure 39)

Ce travail de thèse a permis d'avancer dans les connaissances sur la toxicité des antirétroviraux et de montrer le rôle joué par la dérégulation de l'expression de l'enzyme ZMPSTE24, induite par une mutation du gène *LMNA* ou par traitements avec des inhibiteurs de la protéase, soulignant l'importance de cette down-regulation dans la mise en place des dysfonctions des CMLV. Au vu de ces résultats, la régulation de cette enzyme apparaît donc une cible thérapeutique potentielle afin de traiter les laminopathies.

Figure 39 : Mise en place des dysfonctions des CMLV en présence d'inhibiteurs de la protéase ou de mutations du gène LMNA : Importance de l'accumulation de prélamine A farnésylée et de la diminution de l'expression de la ZMPSTE24



Références bibliographiques

- Aboulker, J. P. and A. M. Swart (1993). "Preliminary analysis of the Concorde trial. Concorde Coordinating Committee." *Lancet* **341**(8849): 889-90.
- Acosta, J. C., A. O'Loghlen, A. Banito, M. V. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, et al. (2008). "Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence." *Cell* **133**(6): 1006-18.
- Ahmad, Z., S. R. Phadke, E. Arch, J. Glass, A. K. Agarwal and A. Garg (2012). "Homozygous null mutations in ZMPSTE24 in restrictive dermopathy: evidence of genetic heterogeneity." *Clinical genetics* **81**(2): 158-64.
- Aikawa, E., M. Nahrendorf, J. L. Figueiredo, F. K. Swirski, T. Shtatland, R. H. Kohler, F. A. Jaffer, M. Aikawa, et al. (2007). "Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo." *Circulation* **116**(24): 2841-50.
- Al-Haboubi, T., D. K. Shumaker, J. Koser, M. Wehnert and B. Fahrenkrog (2011). "Distinct association of the nuclear pore protein Nup153 with A- and B-type lamins." *Nucleus* **2**(5): 500-9.
- Al-Shali, K. Z. and R. A. Hegele (2004). "Laminopathies and atherosclerosis." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**(9): 1591-5.
- Alberti, K. G., R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman, K. A. Donato, J. C. Fruchart, W. P. James, et al. (2009). "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." *Circulation* **120**(16): 1640-5.
- Alessi, M. C. and I. Juhan-Vague (2008). "Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis." *Thrombosis and haemostasis* **99**(6): 995-1000.
- Alexander, M. R. and G. K. Owens (2012). "Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease." *Annual review of physiology* **74**: 13-40.
- Allahverdian, S., A. C. Chehroudi, B. M. McManus, T. Abraham and G. A. Francis (2014). "Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis." *Circulation* **129**(15): 1551-9.
- Allison, M. A., M. H. Criqui and C. M. Wright (2004). "Patterns and risk factors for systemic calcified atherosclerosis." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**(2): 331-6.
- Antiretroviral Therapy Cohort, C. (2008). "Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies." *Lancet* **372**(9635): 293-9.
- Appay, V. and D. Sauce (2008). "Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences." *The Journal of pathology* **214**(2): 231-41.
- Appay, V., D. Sauce and M. Prelog (2010). "The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals." *Aging* **2**(2): 78-81.
- Arhel, N. J., S. Souquere-Besse, S. Munier, P. Souque, S. Guadagnini, S. Rutherford, M. C. Prevost, T. D. Allen, et al. (2007). "HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore." *The EMBO journal* **26**(12): 3025-37.

- Arimura, T., A. Helbling-Leclerc, C. Massart, S. Varnous, F. Niel, E. Lacene, Y. Fromes, M. Toussaint, et al. (2005). "Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies." Human molecular genetics **14**(1): 155-69.
- Auclair, M., P. Afonso, E. Capel, M. Caron-Debarle and J. Capeau (2014). "Impact of darunavir, atazanavir and lopinavir boosted with ritonavir on cultured human endothelial cells: beneficial effect of pravastatin." Antiviral therapy **19**(8): 773-82.
- Badou, A., Y. Bennasser, M. Moreau, C. Leclerc, M. Benkirane and E. Bahraoui (2000). "Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway." Journal of virology **74**(22): 10551-62.
- Baker, D. J., T. Wijshake, T. Tchkonina, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, J. L. Kirkland and J. M. van Deursen (2011). "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders." Nature **479**(7372): 232-6.
- Baker, P. B., N. Baba and C. P. Boesel (1981). "Cardiovascular abnormalities in progeria. Case report and review of the literature." Archives of pathology & laboratory medicine **105**(7): 384-6.
- Ballon, G., L. Ometto, E. Righetti, A. M. Cattelan, S. Masiero, M. Zanchetta, L. Chieco-Bianchi and A. De Rossi (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 modulates telomerase activity in peripheral blood lymphocytes." The Journal of infectious diseases **183**(3): 417-24.
- Bank, E. M. and Y. Gruenbaum (2011). "The nuclear lamina and heterochromatin: a complex relationship." Biochemical Society transactions **39**(6): 1705-9.
- Barbaro, G. (2008). "Vascular injury, hypertension and coronary artery disease in human immunodeficiency virus infection." La Clinica terapeutica **159**(1): 51-5.
- Barrowman, J., P. A. Wiley, S. E. Hudon-Miller, C. A. Hrycyna and S. Michaelis (2012). "Human ZMPSTE24 disease mutations: residual proteolytic activity correlates with disease severity." Human molecular genetics **21**(18): 4084-93.
- Bartz, R. R. and C. A. Piantadosi (2010). "Clinical review: oxygen as a signaling molecule." Critical care **14**(5): 234.
- Bastard, J. P., M. Caron, H. Vidal, V. Jan, M. Auclair, C. Vigouroux, J. Luboinski, M. Laville, et al. (2002). "Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipotrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance." Lancet **359**(9311): 1026-31.
- Bazzoli, C., V. Jullien, C. Le Tiec, E. Rey, F. Mentre and A. M. Taburet (2010). "Intracellular Pharmacokinetics of Antiretroviral Drugs in HIV-Infected Patients, and their Correlation with Drug Action." Clinical pharmacokinetics **49**(1): 17-45.
- Beaupere, C., M. Garcia, J. Larghero, B. Feve, J. Capeau and C. Lagathu (2015). "The HIV proteins Tat and Nef promote human bone marrow mesenchymal stem cell senescence and alter osteoblastic differentiation." Aging cell.
- Benetos, A., S. Laurent, A. P. Hoeks, P. H. Boutouyrie and M. E. Safar (1993). "Arterial alterations with aging and high blood pressure. A noninvasive study of carotid and femoral arteries." Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association **13**(1): 90-7.
- Bennasser, Y. and E. Bahraoui (2002). "HIV-1 Tat protein induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: involvement of protein kinase C-betaII and -delta." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **16**(6): 546-54.

- Bennasser, Y., X. Contreras, M. Moreau, C. Le Clerc, A. Badou and E. Bahraoui (2001). "[HIV-1 Tat protein induces IL-10 production by human monocytes: implications of the PKC and calcium pathway]." Journal de la Societe de biologie 195(3): 319-26.
- Benson, E. K., S. W. Lee and S. A. Aaronson (2010). "Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence." Journal of cell science 123(Pt 15): 2605-12.
- Bereziat, V., P. Cervera, C. Le Dour, M. C. Verpont, S. Dumont, M. C. Vantyghem, J. Capeau, C. Vigouroux, et al. (2011). "LMNA mutations induce a non-inflammatory fibrosis and a brown fat-like dystrophy of enlarged cervical adipose tissue." The American journal of pathology 179(5): 2443-53.
- Bergersen, B. M. (2006). "Cardiovascular risk in patients with HIV Infection: impact of antiretroviral therapy." Drugs 66(15): 1971-87.
- Bergo, M. O., B. Gavino, J. Ross, W. K. Schmidt, C. Hong, L. V. Kendall, A. Mohr, M. Meta, et al. (2002). "Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(20): 13049-54.
- Bidault, G., M. Garcia, M. C. Vantyghem, P. H. Ducluzeau, R. Morichon, K. Thiyagarajah, S. Moritz, J. Capeau, et al. (2013). "Lipodystrophy-linked LMNA p.R482W mutation induces clinical early atherosclerosis and in vitro endothelial dysfunction." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 33(9): 2162-71.
- Bischof, O., A. Dejean and P. Pineau (2009). "[A review of cellular senescence: friend or foe of tumorigenesis?]." Medecine sciences : M/S 25(2): 153-60.
- Boccarda, F., M. Auclair, A. Cohen, C. Lefevre, M. Prot, J. P. Bastard, J. Capeau and M. Caron-Debarle (2010). "HIV protease inhibitors activate the adipocyte renin angiotensin system." Antiviral therapy 15(3): 363-75.
- Boccarda, F., S. Lang, C. Meuleman, S. Ederhy, M. Mary-Krause, D. Costagliola, J. Capeau and A. Cohen (2013). "HIV and coronary heart disease: time for a better understanding." Journal of the American College of Cardiology 61(5): 511-23.
- Boger, R. H. (2009). "Asymmetric dimethylarginine: understanding the physiology, genetics, and clinical relevance of this novel biomarker. Proceedings of the 4th International Symposium on ADMA." Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society 60(6): 447.
- Boger, R. H., S. M. Bode-Boger, A. Szuba, P. S. Tsao, J. R. Chan, O. Tangphao, T. F. Blaschke and J. P. Cooke (1998). "Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia." Circulation 98(18): 1842-7.
- Bonello-Palot, N., S. Simoncini, S. Robert, P. Bourgeois, F. Sabatier, N. Levy, F. Dignat-George and C. Badens (2014). "Prelamin A accumulation in endothelial cells induces premature senescence and functional impairment." Atherosclerosis 237(1): 45-52.
- Bonne, G., M. R. Di Barletta, S. Varnous, H. M. Becane, E. H. Hammouda, L. Merlini, F. Muntoni, C. R. Greenberg, et al. (1999). "Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy." Nature genetics 21(3): 285-8.
- Boulangier, E., P. Dequiedt and J. L. Wautier (2002). "[Advanced glycosylation end products (AGE): new toxins?]." Nephrologie 23(7): 351-9.
- Bour, S., U. Schubert, K. Peden and K. Strebel (1996). "The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor?" Journal of virology 70(2): 820-9.
- Broers, J. L., F. C. Ramaekers, G. Bonne, R. B. Yaou and C. J. Hutchison (2006). "Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing." Physiological reviews 86(3): 967-1008.

- Brondello, J. M., A. Prieur, D. Philipot, J. M. Lemaitre, G. Lenaers, J. Piette and V. Dulic (2012). "[Cellular senescence and the myth of Janus]." Medecine sciences : M/S 28(3): 288-96.
- Brown, T. T., S. R. Cole, X. Li, L. A. Kingsley, F. J. Palella, S. A. Riddler, B. R. Visscher, J. B. Margolick, et al. (2005). "Antiretroviral therapy and the prevalence and incidence of diabetes mellitus in the multicenter AIDS cohort study." Archives of internal medicine 165(10): 1179-84.
- Browner, W. S., L. Y. Lui and S. R. Cummings (2001). "Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 86(2): 631-7.
- Brownlee, M., A. Cerami and H. Vlassara (1988). "Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications." The New England journal of medicine 318(20): 1315-21.
- Burke, B. and C. L. Stewart (2013). "The nuclear lamins: flexibility in function." Nature reviews. Molecular cell biology 14(1): 13-24.
- Byon, C. H., A. Javed, Q. Dai, J. C. Kappes, T. L. Clemens, V. M. Darley-Usmar, J. M. McDonald and Y. Chen (2008). "Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling." The Journal of biological chemistry 283(22): 15319-27.
- Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nature reviews. Molecular cell biology 8(9): 729-40.
- Canfield, A. E., M. J. Doherty, A. C. Wood, C. Farrington, B. Ashton, N. Begum, B. Harvey, A. Poole, et al. (2000). "Role of pericytes in vascular calcification: a review." Zeitschrift fur Kardiologie 89 Suppl 2: 20-7.
- Cannata-Andia, J. B., M. Rodriguez-Garcia, N. Carrillo-Lopez, M. Naves-Diaz and B. Diaz-Lopez (2006). "Vascular calcifications: pathogenesis, management, and impact on clinical outcomes." Journal of the American Society of Nephrology : JASN 17(12 Suppl 3): S267-73.
- Cao, K., J. J. Graziotto, C. D. Blair, J. R. Mazzulli, M. R. Erdos, D. Krainc and F. S. Collins (2011). "Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells." Science translational medicine 3(89): 89ra58.
- Capanni, C., E. Mattioli, M. Columbaro, E. Lucarelli, V. K. Parnaik, G. Novelli, M. Wehnert, V. Cenni, et al. (2005). "Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy." Human molecular genetics 14(11): 1489-502.
- Capeau, J. (2011). "Premature Aging and Premature Age-Related Comorbidities in HIV-Infected Patients: Facts and Hypotheses." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 53(11): 1127-9.
- Capell, B. C., F. S. Collins and E. G. Nabel (2007). "Mechanisms of cardiovascular disease in accelerated aging syndromes." Circulation research 101(1): 13-26.
- Capell, B. C., M. R. Erdos, J. P. Madigan, J. J. Fiordalisi, R. Varga, K. N. Conneely, L. B. Gordon, C. J. Der, et al. (2005). "Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(36): 12879-84.
- Capell, B. C., M. Olive, M. R. Erdos, K. Cao, D. A. Faddah, U. L. Tavaréz, K. N. Conneely, X. Qu, et al. (2008). "A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105(41): 15902-7.
- Caron, M., M. Auclair, B. Donadille, V. Bereziat, B. Guerci, M. Laville, H. Narbonne, C. Bodemer, et al. (2007a). "Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy

- are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence." Cell death and differentiation **14**(10): 1759-67.
- Caron, M., M. Auclair, C. Lagathu, A. Lombes, U. A. Walker, M. Kornprobst and J. Capeau (2004). "The HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors stavudine and zidovudine alter adipocyte functions in vitro." Aids **18**(16): 2127-36.
- Caron, M., M. Auclair, H. Sterlingot, M. Kornprobst and J. Capeau (2003). "Some HIV protease inhibitors alter lamin A/C maturation and stability, SREBP-1 nuclear localization and adipocyte differentiation." Aids **17**(17): 2437-44.
- Caron, M., M. Auclair, C. Vigouroux, M. Glorian, C. Forest and J. Capeau (2001). "The HIV protease inhibitor indinavir impairs sterol regulatory element-binding protein-1 intranuclear localization, inhibits preadipocyte differentiation, and induces insulin resistance." Diabetes **50**(6): 1378-88.
- Caron, M., M. Auclair, A. Vissian, C. Vigouroux and J. Capeau (2008). "Contribution of mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cellular premature senescence induced by antiretroviral thymidine analogues." Antiviral therapy **13**(1): 27-38.
- Caron, M., C. Vigouroux, J. P. Bastard and J. Capeau (2007b). "Adipocyte dysfunction in response to antiretroviral therapy: clinical, tissue and in-vitro studies." Current opinion in HIV and AIDS **2**(4): 268-73.
- Caron-Debarle, M., F. Boccara, C. Lagathu, B. Antoine, P. Cervera, J. P. Bastard, C. Vigouroux and J. Capeau (2010a). "Adipose tissue as a target of HIV-1 antiretroviral drugs. Potential consequences on metabolic regulations." Current pharmaceutical design **16**(30): 3352-60.
- Caron-Debarle, M., C. Lagathu, F. Boccara, C. Vigouroux and J. Capeau (2010b). "HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging." Trends in molecular medicine **16**(5): 218-29.
- Carr, A., J. Miller, M. Law and D. A. Cooper (2000). "A syndrome of lipoatrophy, lactic acidemia and liver dysfunction associated with HIV nucleoside analogue therapy: contribution to protease inhibitor-related lipodystrophy syndrome." Aids **14**(3): F25-32.
- Cartier, C., P. Sivad, C. Tranchat, D. Decimo, C. Desgranges and V. Boyer (1999). "Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection." The Journal of biological chemistry **274**(27): 19434-40.
- Caux, F., E. Dubosclard, O. Lascols, B. Buendia, O. Chazouilleres, A. Cohen, J. C. Courvalin, L. Laroche, et al. (2003). "A new clinical condition linked to a novel mutation in lamins A and C with generalized lipoatrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **88**(3): 1006-13.
- Cenni, V., C. Capanni, M. Columbaro, M. Ortolani, M. R. D'Apice, G. Novelli, M. Fini, S. Marmioli, et al. (2011). "Autophagic degradation of farnesylated prelamin A as a therapeutic approach to lamin-linked progeria." European journal of histochemistry : EJH **55**(4): e36.
- Cenni, V., C. Capanni, E. Mattioli, M. Columbaro, M. Wehnert, M. Ortolani, M. Fini, G. Novelli, et al. (2014). "Rapamycin treatment of Mandibuloacral dysplasia cells rescues localization of chromatin-associated proteins and cell cycle dynamics." Aging **6**(9): 755-70.
- Cerrato, E., F. D'Ascenzo, G. Biondi-Zoccai, A. Calcagno, S. Frea, W. Grosso Marra, D. Castagno, P. Omede, et al. (2013). "Cardiac dysfunction in pauci symptomatic human immunodeficiency virus patients: a meta-analysis in the highly active antiretroviral therapy era." European heart journal **34**(19): 1432-6.
- Chakrabarti, S., S. Varghese, O. Vitseva, K. Tanriverdi and J. E. Freedman (2005). "CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **25**(11): 2428-34.

- Chaouch, M., Y. Allal, A. De Sandre-Giovannoli, J. M. Vallat, A. Amer-el-Khedoud, N. Kassouri, A. Chaouch, P. Sindou, et al. (2003). "The phenotypic manifestations of autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth due to a mutation in Lamin A/C gene." Neuromuscular disorders : NMD 13(1): 60-7.
- Chatzifrangkeskou, M., G. Bonne and A. Muchir (2015). "Nuclear envelope and striated muscle diseases." Current opinion in cell biology 32: 1-6.
- Chen, L., L. Lee, B. A. Kudlow, H. G. Dos Santos, O. Sletvold, Y. Shafeghati, E. G. Botha, A. Garg, et al. (2003). "LMNA mutations in atypical Werner's syndrome." Lancet 362(9382): 440-5.
- Chen, M., H. H. Kuo, Y. C. Huang, Y. Y. Ke, S. P. Chang, C. P. Chen, D. J. Lee, M. L. Lee, et al. (2009). "A case of restrictive dermopathy with complete chorioamniotic membrane separation caused by a novel homozygous nonsense mutation in the ZMPSTE24 gene." American journal of medical genetics. Part A 149A(7): 1550-4.
- Chen, N. X., K. D. O'Neill, X. Chen and S. M. Moe (2008). "Annexin-mediated matrix vesicle calcification in vascular smooth muscle cells." Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 23(11): 1798-805.
- Chiu, J. J. and S. Chien (2011). "Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives." Physiological reviews 91(1): 327-87.
- Choi, J. C., A. Muchir, W. Wu, S. Iwata, S. Homma, J. P. Morrow and H. J. Worman (2012). "Temsirolimus activates autophagy and ameliorates cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation." Science translational medicine 4(144): 144ra02.
- Cihlar, T. and A. S. Ray (2010). "Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine." Antiviral research 85(1): 39-58.
- Civelek, M., E. Manduchi, R. J. Riley, C. J. Stoeckert, Jr. and P. F. Davies (2009). "Chronic endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response in arterial endothelium in regions of susceptibility to atherosclerosis." Circulation research 105(5): 453-61.
- Clarke, M. C., N. Figg, J. J. Maguire, A. P. Davenport, M. Goddard, T. D. Littlewood and M. R. Bennett (2006). "Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis." Nature medicine 12(9): 1075-80.
- Cocohoba, J. and B. J. Dong (2008). "Raltegravir: the first HIV integrase inhibitor." Clinical therapeutics 30(10): 1747-65.
- Coffinier, C., S. E. Hudon, E. A. Farber, S. Y. Chang, C. A. Hrycyna, S. G. Young and L. G. Fong (2007). "HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(33): 13432-7.
- Coffinier, C., S. E. Hudon, R. Lee, E. A. Farber, C. Nobumori, J. H. Miner, D. A. Andres, H. P. Spielmann, et al. (2008). "A potent HIV protease inhibitor, darunavir, does not inhibit ZMPSTE24 or lead to an accumulation of farnesyl-prelamin A in cells." The Journal of biological chemistry 283(15): 9797-804.
- Cola, C., M. Almeida, D. Li, F. Romeo and J. L. Mehta (2004). "Regulatory role of endothelium in the expression of genes affecting arterial calcification." Biochemical and biophysical research communications 320(2): 424-7.
- Collado, M. and M. Serrano (2010). "Senescence in tumours: evidence from mice and humans." Nature reviews. Cancer 10(1): 51-7.
- Collas, P., E. G. Lund and A. R. Oldenburg (2014). "Closing the (nuclear) envelope on the genome: how nuclear lamins interact with promoters and modulate gene expression." BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology 36(1): 75-83.

- Coller, H. A. (2007). "What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation." Nature reviews. Molecular cell biology 8(8): 667-70.
- Condra, J. H., C. J. Petropoulos, R. Ziermann, W. A. Schleif, M. Shivaprakash and E. A. Emini (2000). "Drug resistance and predicted virologic responses to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor therapy." The Journal of infectious diseases 182(3): 758-65.
- Cooke, J. P. (2000). "Does ADMA cause endothelial dysfunction?" Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 20(9): 2032-7.
- Costagliola, D. (2014). "Demographics of HIV and aging." Current opinion in HIV and AIDS 9(4): 294-301.
- Costagliola, D., S. Lang, M. Mary-Krause and F. Boccarda (2010). "Abacavir and cardiovascular risk: reviewing the evidence." Current HIV/AIDS reports 7(3): 127-33.
- Cottart, C. H., C. Laguillier, V. Nivet-Antoine, C. Klimczak, C. Sebban and J. L. Beaudoux (2009). "[Biology of arterial ageing and arteriosclerosis]." Comptes rendus biologies 332(5): 433-47.
- Cristofalo, V. J. and R. J. Pignolo (1993). "Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture." Physiological reviews 73(3): 617-38.
- Cui, J., P. K. Tungaturthi, V. Ayyavoo, M. Ghafouri, H. Ariga, K. Khalili, A. Srinivasan, S. Amini, et al. (2006). "The role of Vpr in the regulation of HIV-1 gene expression." Cell cycle 5(22): 2626-38.
- d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter, et al. (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." Nature 426(6963): 194-8.
- Dai, G., M. R. Kaazempur-Mofrad, S. Natarajan, Y. Zhang, S. Vaughn, B. R. Blackman, R. D. Kamm, G. Garcia-Cardena, et al. (2004). "Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(41): 14871-6.
- Dan, H. C., M. J. Cooper, P. C. Cogswell, J. A. Duncan, J. P. Ting and A. S. Baldwin (2008). "Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK." Genes & development 22(11): 1490-500.
- Davaine, J. M., T. Quillard, R. Brion, O. Laperine, B. Guyomarch, T. Merlini, M. Chatelais, F. Guilbaud, et al. (2014). "Osteoprotegerin, pericytes and bone-like vascular calcification are associated with carotid plaque stability." PloS one 9(9): e107642.
- Davignon, J. and P. Ganz (2004). "Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis." Circulation 109(23 Suppl 1): III27-32.
- De Sandre-Giovannoli, A., R. Bernard, P. Cau, C. Navarro, J. Amiel, I. Boccaccio, S. Lyonnet, C. L. Stewart, et al. (2003). "Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria." Science 300(5628): 2055.
- De Sandre-Giovannoli, A., M. Chaouch, S. Kozlov, J. M. Vallat, M. Tazir, N. Kassouri, P. Szepietowski, T. Hammadouche, et al. (2002). "Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse." American journal of human genetics 70(3): 726-36.
- Decaudain, A., M. C. Vantyghem, B. Guerci, A. C. Hecart, M. Auclair, Y. Reznik, H. Narbonne, P. H. Ducluzeau, et al. (2007). "New metabolic phenotypes in laminopathies: LMNA mutations in patients with severe metabolic syndrome." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 92(12): 4835-44.
- Dechat, T., S. A. Adam, P. Taimen, T. Shimi and R. D. Goldman (2010). "Nuclear lamins." Cold Spring Harbor perspectives in biology 2(11): a000547.

- Deeks, S. G. and A. N. Phillips (2009). "HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity." Bmj 338: a3172.
- Deeks, S. G., E. Verdin and J. M. McCune (2012). "Immunosenescence and HIV." Current opinion in immunology 24(4): 501-6.
- DeHart, J. L., E. S. Zimmerman, O. Ardon, C. M. Monteiro-Filho, E. R. Arganaraz and V. Planelles (2007). "HIV-1 Vpr activates the G2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system." Virology journal 4: 57.
- Delbarre, E., M. Tramier, M. Coppey-Moisan, C. Gaillard, J. C. Courvalin and B. Buendia (2006). "The truncated prelamin A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters segregation of A-type and B-type lamin homopolymers." Human molecular genetics 15(7): 1113-22.
- Desquilbet, L., L. P. Jacobson, L. P. Fried, J. P. Phair, B. D. Jamieson, M. Holloway, J. B. Margolick and A. C. S. Multicenter (2007). "HIV-1 infection is associated with an earlier occurrence of a phenotype related to frailty." The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences 62(11): 1279-86.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(20): 9363-7.
- Ding, X., E. Andraca-Carrera, C. Cooper, P. Miele, C. Kornegay, M. Soukup and K. A. Marcus (2012). "No association of abacavir use with myocardial infarction: findings of an FDA meta-analysis." Journal of acquired immune deficiency syndromes 61(4): 441-7.
- Dittmer, T. A. and T. Misteli (2011). "The lamin protein family." Genome biology 12(5): 222.
- Doherty, M. J., B. A. Ashton, S. Walsh, J. N. Beresford, M. E. Grant and A. E. Canfield (1998). "Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo." Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 13(5): 828-38.
- Doll, R. J., P. Kirschmeier and W. R. Bishop (2004). "Farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents: critical crossroads." Current opinion in drug discovery & development 7(4): 478-86.
- Duffield, J. S., M. Lupher, V. J. Thannickal and T. A. Wynn (2013). "Host responses in tissue repair and fibrosis." Annual review of pathology 8: 241-76.
- Dutour, A., P. Roll, B. Gaborit, S. Courrier, M. C. Alessi, D. A. Tregouet, F. Angelis, A. Robaglia-Schlupp, et al. (2011). "High prevalence of laminopathies among patients with metabolic syndrome." Human molecular genetics 20(19): 3779-86.
- Dyck, J. D., T. E. David, B. Burke, G. D. Webb, M. A. Henderson and R. S. Fowler (1987). "Management of coronary artery disease in Hutchinson-Gilford syndrome." The Journal of pediatrics 111(3): 407-10.
- Eckersley-Maslin, M. A., J. H. Bergmann, Z. Lazar and D. L. Spector (2013). "Lamin A/C is expressed in pluripotent mouse embryonic stem cells." Nucleus 4(1): 53-60.
- Effros, R. B., C. V. Fletcher, K. Gebo, J. B. Halter, W. R. Hazzard, F. M. Horne, R. E. Huebner, E. N. Janoff, et al. (2008). "Aging and infectious diseases: workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 47(4): 542-53.
- Ehara, S., Y. Kobayashi, M. Yoshiyama, K. Shimada, Y. Shimada, D. Fukuda, Y. Nakamura, H. Yamashita, et al. (2004). "Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study." Circulation 110(22): 3424-9.

- El Khoury, P., M. Ghislain, E. F. Villard, W. Le Goff, C. Lascoux-Combe, P. Yeni, L. Meyer, C. Vigouroux, et al. (2015). "Plasma cholesterol efflux capacity from human THP-1 macrophages is reduced in HIV-infected patients: impact of HAART." Journal of lipid research 56(3): 692-702.
- El-Abbadi, M. and C. M. Giachelli (2007). "Mechanisms of vascular calcification." Advances in chronic kidney disease 14(1): 54-66.
- Emery, A. E. (2000). "Emery-Dreifuss muscular dystrophy - a 40 year retrospective." Neuromuscular disorders : NMD 10(4-5): 228-32.
- Eriksson, M., W. T. Brown, L. B. Gordon, M. W. Glynn, J. Singer, L. Scott, M. R. Erdos, C. M. Robbins, et al. (2003). "Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Nature 423(6937): 293-8.
- Escarcega, R. O., J. J. Franco, B. C. Mani, A. Vyas, E. M. Tedaldi and A. A. Bove (2014). "Cardiovascular disease in patients with chronic human immunodeficiency virus infection." International journal of cardiology 175(1): 1-7.
- Ewence, A. E., M. Bootman, H. L. Roderick, J. N. Skepper, G. McCarthy, M. Epple, M. Neumann, C. M. Shanahan, et al. (2008). "Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization." Circulation research 103(5): e28-34.
- Falk, E., M. Nakano, J. F. Bentzon, A. V. Finn and R. Virmani (2013). "Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view." European heart journal 34(10): 719-28.
- Fardet, L., B. Antuna-Puente, C. Vazier, P. Cervera, A. Touati, T. Simon, J. Capeau, B. Feve, et al. (2013). "Adipokine profile in glucocorticoid-treated patients: baseline plasma leptin level predicts occurrence of lipodystrophy." Clinical endocrinology 78(1): 43-51.
- Farrington-Rock, C., N. J. Crofts, M. J. Doherty, B. A. Ashton, C. Griffin-Jones and A. E. Canfield (2004). "Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes." Circulation 110(15): 2226-32.
- Feaver, R. E., B. D. Gelfand, C. Wang, M. A. Schwartz and B. R. Blackman (2010). "Atheroprone hemodynamics regulate fibronectin deposition to create positive feedback that sustains endothelial inflammation." Circulation research 106(11): 1703-11.
- Feinstein, M. J., C. J. Achenbach, N. J. Stone and D. M. Lloyd-Jones (2015). "A Systematic Review of the Usefulness of Statin Therapy in HIV-Infected Patients." The American journal of cardiology 115(12): 1760-66.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature 408(6809): 239-47.
- Fleckenstein-Grun, G., M. Frey, F. Thimm, W. Hofgartner and A. Fleckenstein (1992). "Calcium overload--an important cellular mechanism in hypertension and arteriosclerosis." Drugs 44 Suppl 1: 23-30.
- Fong, L. G., D. Frost, M. Meta, X. Qiao, S. H. Yang, C. Coffinier and S. G. Young (2006). "A protein farnesyltransferase inhibitor ameliorates disease in a mouse model of progeria." Science 311(5767): 1621-3.
- Fong, L. G., J. K. Ng, M. Meta, N. Cote, S. H. Yang, C. L. Stewart, T. Sullivan, A. Burghardt, et al. (2004). "Heterozygosity for Lmna deficiency eliminates the progeria-like phenotypes in Zmpste24-deficient mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(52): 18111-6.
- Forstermann, U. and T. Munzel (2006). "Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace." Circulation 113(13): 1708-14.
- Galkina, E. and K. Ley (2009). "Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*)." Annual review of immunology 27: 165-97.

Garg, A., R. A. Speckman and A. M. Bowcock (2002). "Multisystem dystrophy syndrome due to novel missense mutations in the amino-terminal head and alpha-helical rod domains of the lamin A/C gene." The American journal of medicine **112**(7): 549-55.

Garg, A., L. Subramanyam, A. K. Agarwal, V. Simha, B. Levine, M. R. D'Apice, G. Novelli and Y. Crow (2009). "Atypical progeroid syndrome due to heterozygous missense LMNA mutations." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **94**(12): 4971-83.

Gaur, T., C. J. Lengner, H. Hovhannisyan, R. A. Bhat, P. V. Bodine, B. S. Komm, A. Javed, A. J. van Wijnen, et al. (2005). "Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression." The Journal of biological chemistry **280**(39): 33132-40.

Ghosh, H. S., J. V. Spencer, B. Ng, M. W. McBurney and P. D. Robbins (2007). "Sirt1 interacts with transducin-like enhancer of split-1 to inhibit nuclear factor kappaB-mediated transcription." The Biochemical journal **408**(1): 105-11.

Giachelli, C. M. (2004). "Vascular calcification mechanisms." Journal of the American Society of Nephrology : JASN **15**(12): 2959-64.

Giachelli, C. M. (2009). "The emerging role of phosphate in vascular calcification." Kidney international **75**(9): 890-7.

Glynn, M. W. and T. W. Glover (2005). "Incomplete processing of mutant lamin A in Hutchinson-Gilford progeria leads to nuclear abnormalities, which are reversed by farnesyltransferase inhibition." Human molecular genetics **14**(20): 2959-69.

Goizet, C., R. B. Yaou, L. Demay, P. Richard, S. Bouillot, M. Rouanet, E. Hermosilla, G. Le Masson, et al. (2004). "A new mutation of the lamin A/C gene leading to autosomal dominant axonal neuropathy, muscular dystrophy, cardiac disease, and leuconychia." Journal of medical genetics **41**(3): e29.

Goldman, R. D., D. K. Shumaker, M. R. Erdos, M. Eriksson, A. E. Goldman, L. B. Gordon, Y. Gruenbaum, S. Khuon, et al. (2004). "Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(24): 8963-8.

Goldschmidt, R. H. (1993). "The Concorde zidovudine trial and antiretroviral strategies for asymptomatic patients." The Journal of the American Board of Family Practice / American Board of Family Practice **6**(6): 604-6.

Goldsmith, M. A., M. T. Warmerdam, R. E. Atchison, M. D. Miller and W. C. Greene (1995). "Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef." Journal of virology **69**(7): 4112-21.

Gordon, L. B., M. E. Kleinman, D. T. Miller, D. S. Neuberger, A. Giobbie-Hurder, M. Gerhard-Herman, L. B. Smoot, C. M. Gordon, et al. (2012). "Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(41): 16666-71.

Gordon, L. B., J. Massaro, R. B. D'Agostino, Sr., S. E. Campbell, J. Brazier, W. T. Brown, M. E. Kleinman, M. W. Kieran, et al. (2014a). "Impact of farnesylation inhibitors on survival in Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Circulation **130**(1): 27-34.

Gordon, L. B., F. G. Rothman, C. Lopez-Otin and T. Misteli (2014b). "Progeria: a paradigm for translational medicine." Cell **156**(3): 400-7.

Gotti, D., B. M. Cesana, L. Albin, A. Calabresi, I. Izzo, E. Foca, D. Motta, R. Bellagamba, et al. (2012). "Increase in standard cholesterol and large HDL particle subclasses in antiretroviral-naïve patients prescribed efavirenz compared to atazanavir/ritonavir." HIV clinical trials **13**(5): 245-55.

- Gotzmann, J. and R. Foisner (2006). "A-type lamin complexes and regenerative potential: a step towards understanding laminopathic diseases?" Histochemistry and cell biology **125**(1-2): 33-41.
- Grewe, B. and K. Uberla (2010). "The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: manage a trois during the early phase of the lentiviral replication cycle." The Journal of general virology **91**(Pt 8): 1893-7.
- Griendling, K. K., D. Sorescu and M. Ushio-Fukai (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circulation research **86**(5): 494-501.
- Grinspoon, S. and A. Carr (2005). "Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults." The New England journal of medicine **352**(1): 48-62.
- Gross, M. L., H. P. Meyer, H. Ziebart, P. Rieger, U. Wenzel, K. Amann, I. Berger, M. Adamczak, et al. (2007). "Calcification of coronary intima and media: immunohistochemistry, backscatter imaging, and x-ray analysis in renal and nonrenal patients." Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN **2**(1): 121-34.
- Grunfeld, C., J. A. Delaney, C. Wanke, J. S. Currier, R. Scherzer, M. L. Biggs, P. C. Tien, M. G. Shlipak, et al. (2009). "Preclinical atherosclerosis due to HIV infection: carotid intima-medial thickness measurements from the FRAM study." Aids **23**(14): 1841-9.
- Guaraldi, G., G. Orlando, S. Zona, M. Menozzi, F. Carli, E. Garlassi, A. Berti, E. Rossi, et al. (2011). "Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **53**(11): 1120-6.
- Guaraldi, G., C. Stentarelli, S. Zona, G. Orlando, F. Carli, G. Ligabue, A. Lattanzi, G. Zaccherini, et al. (2010). "Lipodystrophy and anti-retroviral therapy as predictors of sub-clinical atherosclerosis in human immunodeficiency virus infected subjects." Atherosclerosis **208**(1): 222-7.
- Guaraldi, G., S. Zona, N. Alexopoulos, G. Orlando, F. Carli, G. Ligabue, F. Fiocchi, A. Lattanzi, et al. (2009). "Coronary aging in HIV-infected patients." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **49**(11): 1756-62.
- Guenantin, A. C., N. Briand, G. Bidault, P. Afonso, V. Bereziat, C. Vazier, O. Lascols, M. Caron-Debarle, et al. (2014). "Nuclear envelope-related lipodystrophies." Seminars in cell & developmental biology **29**: 148-57.
- Gundurao Sreekantamurthy, G., N. B. Singh, T. B. Singh, T. S. Singh and K. R. Singh (2014). "Study of Body Composition and Metabolic Parameters in HIV-1 Male Patients." Journal of nutrition and metabolism **2014**: 498497.
- Guyton, J. R., K. L. Lindsay and D. T. Dao (1983). "Comparison of aortic intima and inner media in young adult versus aging rats. Stereology in a polarized system." The American journal of pathology **111**(2): 234-46.
- Hakelien, A. M., E. Delbarre, K. G. Gaustad, B. Buendia and P. Collas (2008). "Expression of the myodystrophic R453W mutation of lamin A in C2C12 myoblasts causes promoter-specific and global epigenetic defects." Experimental cell research **314**(8): 1869-80.
- Hammer, S. M., K. E. Squires, M. D. Hughes, J. M. Grimes, L. M. Demeter, J. S. Currier, J. J. Eron, Jr., J. E. Feinberg, et al. (1997). "A controlled trial of two nucleoside analogues plus zidovudine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team." The New England journal of medicine **337**(11): 725-33.
- Hansson, G. K., A. K. Robertson and C. Soderberg-Naucler (2006). "Inflammation and atherosclerosis." Annual review of pathology **1**: 297-329.
- Haqqani, A. A. and J. C. Tilton (2013). "Entry inhibitors and their use in the treatment of HIV-1 infection." Antiviral research **98**(2): 158-70.

- Harley, C. B., A. B. Futcher and C. W. Greider (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." Nature 345(6274): 458-60.
- Hashiba, H., S. Aizawa, K. Tamura, T. Shigematsu and H. Kogo (2004). "Inhibitory effects of etidronate on the progression of vascular calcification in hemodialysis patients." Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy 8(3): 241-7.
- Hayflick, L. (1965). "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." Experimental cell research 37: 614-36.
- Hegele, R. A. (2001). "Premature atherosclerosis associated with monogenic insulin resistance." Circulation 103(18): 2225-9.
- Hennekam, R. C. (2006). "Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype." American journal of medical genetics. Part A 140(23): 2603-24.
- Hennekes, H. and E. A. Nigg (1994). "The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins. A single point mutation prevents proteolytic cleavage of the lamin A precursor and confers membrane binding properties." Journal of cell science 107 (Pt 4): 1019-29.
- Herbig, U., W. A. Jobling, B. P. Chen, D. J. Chen and J. M. Sedivy (2004). "Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a)." Molecular cell 14(4): 501-13.
- High, K. P., M. Brennan-Ing, D. B. Clifford, M. H. Cohen, J. Currier, S. G. Deeks, S. Deren, R. B. Effros, et al. (2012). "HIV and aging: state of knowledge and areas of critical need for research. A report to the NIH Office of AIDS Research by the HIV and Aging Working Group." Journal of acquired immune deficiency syndromes 60 Suppl 1: S1-18.
- Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard and M. Markowitz (1995). "Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection." Nature 373(6510): 123-6.
- Holzenberger, M., J. Dupont, B. Ducos, P. Leneuve, A. Geloën, P. C. Even, P. Cervera and Y. Le Bouc (2003). "IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice." Nature 421(6919): 182-7.
- Hosaka, N., M. Mizobuchi, H. Ogata, C. Kumata, F. Kondo, F. Koiwa, E. Kinugasa and T. Akizawa (2009). "Elastin degradation accelerates phosphate-induced mineralization of vascular smooth muscle cells." Calcified tissue international 85(6): 523-9.
- Hsu, H., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H. L. Tan, G. Elliott, et al. (1999). "Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(7): 3540-5.
- Huang, S., L. Chen, N. Libina, J. Janes, G. M. Martin, J. Campisi and J. Oshima (2005a). "Correction of cellular phenotypes of Hutchinson-Gilford Progeria cells by RNA interference." Human genetics 118(3-4): 444-50.
- Huang, S., B. K. Kennedy and J. Oshima (2005b). "LMNA mutations in progeroid syndromes." Novartis Foundation symposium 264: 197-202; discussion 02-7, 27-30.
- Hudon, S. E., C. Coffinier, S. Michaelis, L. G. Fong, S. G. Young and C. A. Hrycyna (2008). "HIV-protease inhibitors block the enzymatic activity of purified Ste24p." Biochemical and biophysical research communications 374(2): 365-8.

- Ibrahim, M. X., V. I. Sayin, M. K. Akula, M. Liu, L. G. Fong, S. G. Young and M. O. Bergo (2013). "Targeting isoprenylcysteine methylation ameliorates disease in a mouse model of progeria." Science **340**(6138): 1330-3.
- Iyemere, V. P., D. Proudfoot, P. L. Weissberg and C. M. Shanahan (2006). "Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification." Journal of internal medicine **260**(3): 192-210.
- Jahn, D., S. Schramm, M. Schnolzer, C. J. Heilmann, C. G. de Koster, W. Schutz, R. Benavente and M. Alsheimer (2012). "A truncated lamin A in the Lmna ^{-/-} mouse line: implications for the understanding of laminopathies." Nucleus **3**(5): 463-74.
- Joly, V. and P. Yeni (2000). "[Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors]." Annales de medecine interne **151**(4): 260-7.
- Jung, T., A. Hohn, B. Catalgol and T. Grune (2009). "Age-related differences in oxidative protein-damage in young and senescent fibroblasts." Archives of biochemistry and biophysics **483**(1): 127-35.
- Kaplan, R. C., L. A. Kingsley, A. R. Sharrett, X. Li, J. Lazar, P. C. Tien, W. J. Mack, M. H. Cohen, et al. (2007). "Ten-year predicted coronary heart disease risk in HIV-infected men and women." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **45**(8): 1074-81.
- Kaplan, R. C., E. Sinclair, A. L. Landay, N. Lurain, A. R. Sharrett, S. J. Gange, X. Xue, P. Hunt, et al. (2011). "T cell activation and senescence predict subclinical carotid artery disease in HIV-infected women." The Journal of infectious diseases **203**(4): 452-63.
- Kapustin, A. N., J. D. Davies, J. L. Reynolds, R. McNair, G. T. Jones, A. Sidibe, L. J. Schurgers, J. N. Skepper, et al. (2011). "Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization." Circulation research **109**(1): e1-12.
- Kartsogiannis, V., N. A. Sims, J. M. Quinn, C. Ly, M. Cipetic, I. J. Poulton, E. C. Walker, H. Saleh, et al. (2008). "Osteoclast inhibitory lectin, an immune cell product that is required for normal bone physiology in vivo." The Journal of biological chemistry **283**(45): 30850-60.
- Katlama, C., R. Esposito, J. M. Gatell, J. C. Goffard, B. Grinsztejn, A. Pozniak, J. Rockstroh, A. Stoehr, et al. (2007). "Efficacy and safety of TMC114/ritonavir in treatment-experienced HIV patients: 24-week results of POWER 1." Aids **21**(4): 395-402.
- Kawashima, S. (2004). "Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: endothelial nitric oxide (NO) synthase/NO system in atherosclerosis." Journal of pharmacological sciences **96**(4): 411-9.
- Kenyon, C., J. Chang, E. Gensch, A. Rudner and R. Tabtiang (1993). "A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type." Nature **366**(6454): 461-4.
- Kim, D. J., A. O. Westfall, E. Chamot, A. L. Willig, M. J. Mugavero, C. Ritchie, G. A. Burkholder, H. M. Crane, et al. (2012). "Multimorbidity patterns in HIV-infected patients: the role of obesity in chronic disease clustering." Journal of acquired immune deficiency syndromes **61**(5): 600-5.
- Kim, M. J., P. Leclercq, E. Lanoy, P. Cervera, B. Antuna-Puente, M. Maachi, E. Dorofeev, L. Slama, et al. (2007). "A 6-month interruption of antiretroviral therapy improves adipose tissue function in HIV-infected patients: the ANRS EP29 Lipostop Study." Antiviral therapy **12**(8): 1273-83.
- Kishi, M., Y. Nishino, M. Sumiya, K. Ohki, T. Kimura, T. Goto, M. Nakai, M. Kakinuma, et al. (1992). "Cells surviving infection by human immunodeficiency virus type 1: vif or vpu mutants produce non-infectious or markedly less cytopathic viruses." The Journal of general virology **73** (Pt 1): 77-87.
- Komori, T. (2010). "Regulation of osteoblast differentiation by Runx2." Advances in experimental medicine and biology **658**: 43-9.

- Koteff, J., J. Borland, S. Chen, I. Song, A. Peppercorn, T. Koshiba, C. Cannon, H. Muster, et al. (2013). "A phase 1 study to evaluate the effect of dolutegravir on renal function via measurement of iohexol and para-aminohippurate clearance in healthy subjects." British journal of clinical pharmacology 75(4): 990-6.
- Kowaltowski, A. J., N. C. de Souza-Pinto, R. F. Castilho and A. E. Vercesi (2009). "Mitochondria and reactive oxygen species." Free radical biology & medicine 47(4): 333-43.
- Krishnamurthy, J., C. Torrice, M. R. Ramsey, G. I. Kovalev, K. Al-Regaiey, L. Su and N. E. Sharpless (2004). "Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging." The Journal of clinical investigation 114(9): 1299-307.
- Kuilman, T., C. Michaloglou, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2010). "The essence of senescence." Genes & development 24(22): 2463-79.
- Kuilman, T., C. Michaloglou, L. C. Vredeveld, S. Douma, R. van Doorn, C. J. Desmet, L. A. Aarden, W. J. Mooi, et al. (2008). "Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network." Cell 133(6): 1019-31.
- Kuller, L. H., R. Tracy, W. Belloso, S. De Wit, F. Drummond, H. C. Lane, B. Ledergerber, J. Lundgren, et al. (2008). "Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection." PLoS medicine 5(10): e203.
- Kumar, S., C. W. Kim, R. D. Simmons and H. Jo (2014). "Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive athero-miRs." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 34(10): 2206-16.
- Labunskyy, V. M. and V. N. Gladyshev (2013). "Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging." Antioxidants & redox signaling 19(12): 1362-72.
- Lagathu, C., B. Eustace, M. Prot, D. Frantz, Y. Gu, J. P. Bastard, M. Maachi, S. Azoulay, et al. (2007). "Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages." Antiviral therapy 12(4): 489-500.
- Lake, J. E. and J. S. Currier (2013). "Metabolic disease in HIV infection." The Lancet. Infectious diseases 13(11): 964-75.
- Lammerding, J., P. C. Schulze, T. Takahashi, S. Kozlov, T. Sullivan, R. D. Kamm, C. L. Stewart and R. T. Lee (2004). "Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction." The Journal of clinical investigation 113(3): 370-8.
- Lang, S., M. Mary-Krause, L. Cotte, J. Gilquin, M. Partisani, A. Simon, F. Boccard, A. Bingham, et al. (2010a). "Increased risk of myocardial infarction in HIV-infected patients in France, relative to the general population." Aids 24(8): 1228-30.
- Lang, S., M. Mary-Krause, L. Cotte, J. Gilquin, M. Partisani, A. Simon, F. Boccard, D. Costagliola, et al. (2010b). "Impact of individual antiretroviral drugs on the risk of myocardial infarction in human immunodeficiency virus-infected patients: a case-control study nested within the French Hospital Database on HIV ANRS cohort CO4." Archives of internal medicine 170(14): 1228-38.
- Lang, S., M. Mary-Krause, A. Simon, M. Partisani, J. Gilquin, L. Cotte, F. Boccard, D. Costagliola, et al. (2012). "HIV replication and immune status are independent predictors of the risk of myocardial infarction in HIV-infected individuals." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 55(4): 600-7.
- Lanigan, F., J. G. Geraghty and A. P. Bracken (2011). "Transcriptional regulation of cellular senescence." Oncogene 30(26): 2901-11.
- Larrieu, D., S. Britton, M. Demir, R. Rodriguez and S. P. Jackson (2014). "Chemical inhibition of NAT10 corrects defects of laminopathic cells." Science 344(6183): 527-32.

- Lattanzi, G., M. Ortolani, M. Columbaro, S. Prencipe, E. Mattioli, C. Lanzarini, N. M. Maraldi, V. Cenni, et al. (2014). "Lamins are rapamycin targets that impact human longevity: a study in centenarians." Journal of cell science **127**(Pt 1): 147-57.
- Lau, W. L., A. Pai, S. M. Moe and C. M. Giachelli (2011). "Direct effects of phosphate on vascular cell function." Advances in chronic kidney disease **18**(2): 105-12.
- Le Dour, C., S. Schneebeli, F. Bakiri, F. Darcel, M. L. Jacquemont, M. A. Maubert, M. Auclair, D. Jeziorowska, et al. (2011). "A homozygous mutation of prelamin-A preventing its farnesylation and maturation leads to a severe lipodystrophic phenotype: new insights into the pathogenicity of nonfarnesylated prelamin-A." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **96**(5): E856-62.
- Lech, M. and H. J. Anders (2013). "Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair." Biochimica et biophysica acta **1832**(7): 989-97.
- Leeansyah, E., P. U. Cameron, A. Solomon, S. Tennakoon, P. Velayudham, M. Gouillou, T. Spelman, A. Hearps, et al. (2013). "Inhibition of telomerase activity by human immunodeficiency virus (HIV) nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors: a potential factor contributing to HIV-associated accelerated aging." The Journal of infectious diseases **207**(7): 1157-65.
- Lefevre, C., M. Auclair, F. Boccaro, J. P. Bastard, J. Capeau, C. Vigouroux and M. Caron-Debarle (2010). "Premature senescence of vascular cells is induced by HIV protease inhibitors: implication of prelamin A and reversion by statin." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **30**(12): 2611-20.
- Lehto, S., L. Niskanen, M. Suhonen, T. Ronnema and M. Laakso (1996). "Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **16**(8): 978-83.
- Lennox, J. L., E. Dejesus, D. S. Berger, A. Lazzarin, R. B. Pollard, J. V. Ramalho Madruga, J. Zhao, H. Wan, et al. (2010). "Raltegravir versus Efavirenz regimens in treatment-naive HIV-1-infected patients: 96-week efficacy, durability, subgroup, safety, and metabolic analyses." Journal of acquired immune deficiency syndromes **55**(1): 39-48.
- Leopold, J. A. (2013). "Vascular calcification: an age-old problem of old age." Circulation **127**(24): 2380-2.
- Levy, B. (2006). "[Changes in the arterial wall in aging]." La Revue de medecine interne / fondee ... par la Societe nationale francaise de medecine interne **27 Suppl 2**: S40-2.
- Levy, D. L. and R. Heald (2010). "Nuclear size is regulated by importin alpha and Ntf2 in *Xenopus*." Cell **143**(2): 288-98.
- Li, G., J. Xu and Z. Li (2012). "Receptor for advanced glycation end products inhibits proliferation in osteoblast through suppression of Wnt, PI3K and ERK signaling." Biochemical and biophysical research communications **423**(4): 684-9.
- Li, X. and C. M. Giachelli (2007). "Sodium-dependent phosphate cotransporters and vascular calcification." Current opinion in nephrology and hypertension **16**(4): 325-8.
- Libby, P. (2012). "Inflammation in atherosclerosis." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **32**(9): 2045-51.
- Libby, P., D. Egan and S. Skarlatos (1997). "Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research." Circulation **96**(11): 4095-103.
- Lieberman, M., E. Bassi, M. K. Martinatti, F. C. Lario, J. Wosniak, Jr., P. M. Pomerantzeff and F. R. Laurindo (2008). "Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **28**(3): 463-70.

- Liu, G. H., K. Suzuki, J. Qu, I. Sancho-Martinez, F. Yi, M. Li, S. Kumar, E. Nivet, et al. (2011). "Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs." Cell stem cell 8(6): 688-94.
- Liu, Y., I. Drozdov, R. Shroff, L. E. Beltran and C. M. Shanahan (2013). "Prelamin A accelerates vascular calcification via activation of the DNA damage response and senescence-associated secretory phenotype in vascular smooth muscle cells." Circulation research 112(10): e99-109.
- London, G. M., A. P. Guerin, S. J. Marchais, F. Metivier, B. Pannier and H. Adda (2003). "Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality." Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association 18(9): 1731-40.
- Lopez-Otin, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano and G. Kroemer (2013). "The hallmarks of aging." Cell 153(6): 1194-217.
- Lund, E. and P. Collas (2013a). "Nuclear lamins: making contacts with promoters." Nucleus 4(6): 424-30.
- Lund, E., A. R. Oldenburg, E. Delbarre, C. T. Freberg, I. Duband-Goulet, R. Eskeland, B. Buendia and P. Collas (2013b). "Lamin A/C-promoter interactions specify chromatin state-dependent transcription outcomes." Genome research 23(10): 1580-9.
- Lund, E. G., I. Duband-Goulet, A. Oldenburg, B. Buendia and P. Collas (2015). "Distinct features of lamin A-interacting chromatin domains mapped by ChIP-sequencing from sonicated or micrococcal nuclease-digested chromatin." Nucleus 6(1): 30-9.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature 407(6801): 233-41.
- Lyons, J. L., H. Uno, P. Ancuta, A. Kamat, D. J. Moore, E. J. Singer, S. Morgello and D. Gabuzda (2011). "Plasma sCD14 is a biomarker associated with impaired neurocognitive test performance in attention and learning domains in HIV infection." Journal of acquired immune deficiency syndromes 57(5): 371-9.
- MacInnes, A., A. Lazzarin, G. Di Perri, J. G. Sierra-Madero, J. Aberg, J. Heera, N. Rajcic, J. Goodrich, et al. (2011). "Maraviroc can improve lipid profiles in dyslipidemic patients with HIV: results from the MERIT trial." HIV clinical trials 12(1): 24-36.
- Madeo, F., N. Tavernarakis and G. Kroemer (2010). "Can autophagy promote longevity?" Nature cell biology 12(9): 842-6.
- Makous, N., S. Friedman, W. Yakovac and E. P. Maris (1962). "Cardiovascular manifestations in progeria. Report of clinical and pathologic findings in a patient with severe arteriosclerotic heart disease and aortic stenosis." American heart journal 64: 334-46.
- Mansky, L. M. and H. M. Temin (1995). "Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase." Journal of virology 69(8): 5087-94.
- Maraldi, N. M. and G. Lattanzi (2007). "Involvement of prelamin A in laminopathies." Critical reviews in eukaryotic gene expression 17(4): 317-34.
- Mariappan, N., C. M. Elks, S. Sriramula, A. Guggilam, Z. Liu, O. Borkhsenius and J. Francis (2010). "NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes." Cardiovascular research 85(3): 473-83.
- Marin, T., B. Gongol, Z. Chen, B. Woo, S. Subramaniam, S. Chien and J. Y. Shyy (2013). "Mechanosensitive microRNAs-role in endothelial responses to shear stress and redox state." Free radical biology & medicine 64: 61-8.

- Marino, G., A. P. Ugalde, N. Salvador-Montoliu, I. Varela, P. M. Quiros, J. Cadinanos, I. van der Pluijm, J. M. Freije, et al. (2008). "Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction." *Human molecular genetics* 17(14): 2196-211.
- Mary-Krause, M., S. Grabar, L. Lievre, S. Abgrall, E. Billaud, F. Boue, L. Boyer, A. Cabie, et al. (2014). "Cohort Profile: French hospital database on HIV (FHDH-ANRS CO4)." *International journal of epidemiology* 43(5): 1425-36.
- Massague, J. and D. Wotton (2000). "Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system." *The EMBO journal* 19(8): 1745-54.
- Matsumura, T., Z. Zerrudo and L. Hayflick (1979). "Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology." *Journal of gerontology* 34(3): 328-34.
- McCord, R. P., A. Nazario-Toole, H. Zhang, P. S. Chines, Y. Zhan, M. R. Erdos, F. S. Collins, J. Dekker, et al. (2013). "Correlated alterations in genome organization, histone methylation, and DNA-lamin A/C interactions in Hutchinson-Gilford progeria syndrome." *Genome research* 23(2): 260-9.
- Meaburn, K. J., E. Cabuy, G. Bonne, N. Levy, G. E. Morris, G. Novelli, I. R. Kill and J. M. Bridger (2007). "Primary laminopathy fibroblasts display altered genome organization and apoptosis." *Aging cell* 6(2): 139-53.
- Menini, S., C. Iacobini, C. Ricci, C. Blasetti Fantauzzi, L. Salvi, C. M. Pesce, M. Relucenti, G. Familiari, et al. (2013). "The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis." *Cardiovascular research* 100(3): 472-80.
- Metifiot, M., C. Marchand and Y. Pommier (2013). "HIV integrase inhibitors: 20-year landmark and challenges." *Advances in pharmacology* 67: 75-105.
- Meune, C., J. H. Van Berlo, F. Anselme, G. Bonne, Y. M. Pinto and D. Duboc (2006). "Primary prevention of sudden death in patients with lamin A/C gene mutations." *The New England journal of medicine* 354(2): 209-10.
- Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, M. S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C. M. van der Horst, D. M. Majoor, J. W. Shay, et al. (2005). "BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi." *Nature* 436(7051): 720-4.
- Michaud, V., T. Bar-Magen, J. Turgeon, D. Flockhart, Z. Desta and M. A. Wainberg (2012). "The dual role of pharmacogenetics in HIV treatment: mutations and polymorphisms regulating antiretroviral drug resistance and disposition." *Pharmacological reviews* 64(3): 803-33.
- Micheletti, R. G., G. A. Fishbein, M. C. Fishbein, E. J. Singer, R. E. Weiss, R. A. Jeffries and J. S. Currier (2009). "Coronary atherosclerotic lesions in human immunodeficiency virus-infected patients: a histopathologic study." *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 18(1): 28-36.
- Mills, A. M., M. Nelson, D. Jayaweera, K. Ruxrungtham, I. Cassetti, P. M. Girard, C. Workman, I. Dierynck, et al. (2009). "Once-daily darunavir/ritonavir vs. lopinavir/ritonavir in treatment-naive, HIV-1-infected patients: 96-week analysis." *Aids* 23(13): 1679-88.
- Minamino, T. and I. Komuro (2007). "Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis." *Circulation research* 100(1): 15-26.
- Mizushima, N. and M. Komatsu (2011). "Autophagy: renovation of cells and tissues." *Cell* 147(4): 728-41.
- Mocroft, A., B. Ledergerber, C. Katlama, O. Kirk, P. Reiss, A. d'Arminio Monforte, B. Knysz, M. Dietrich, et al. (2003). "Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study." *Lancet* 362(9377): 22-9.

- Mocroft, A., S. Vella, T. L. Benfield, A. Chiesi, V. Miller, P. Gargalianos, A. d'Arminio Monforte, I. Yust, et al. (1998). "Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group." *Lancet* 352(9142): 1725-30.
- Molina, J. M., J. Andrade-Villanueva, J. Echevarria, P. Chetchotisakd, J. Corral, N. David, G. Moyle, M. Mancini, et al. (2008). "Once-daily atazanavir/ritonavir versus twice-daily lopinavir/ritonavir, each in combination with tenofovir and emtricitabine, for management of antiretroviral-naïve HIV-1-infected patients: 48 week efficacy and safety results of the CASTLE study." *Lancet* 372(9639): 646-55.
- Molina, J. M., J. Andrade-Villanueva, J. Echevarria, P. Chetchotisakd, J. Corral, N. David, G. Moyle, M. Mancini, et al. (2010). "Once-daily atazanavir/ritonavir compared with twice-daily lopinavir/ritonavir, each in combination with tenofovir and emtricitabine, for management of antiretroviral-naïve HIV-1-infected patients: 96-week efficacy and safety results of the CASTLE study." *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 53(3): 323-32.
- Monforte, A., P. Reiss, L. Ryom, W. El-Sadr, F. Dabis, S. De Wit, S. W. Worm, M. G. Law, et al. (2013). "Atazanavir is not associated with an increased risk of cardio- or cerebrovascular disease events." *Aids* 27(3): 407-15.
- Morange, P. E. and M. C. Alessi (2013). "Thrombosis in central obesity and metabolic syndrome: mechanisms and epidemiology." *Thrombosis and haemostasis* 110(4): 669-80.
- Moyle, G. J. and D. Back (2001). "Principles and practice of HIV-protease inhibitor pharmacoenhancement." *HIV medicine* 2(2): 105-13.
- Muchir, A., G. Bonne, A. J. van der Kooi, M. van Meegen, F. Baas, P. A. Bolhuis, M. de Visser and K. Schwartz (2000). "Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B)." *Human molecular genetics* 9(9): 1453-9.
- Muchir, A., P. Pavlidis, V. Decostre, A. J. Herron, T. Arimura, G. Bonne and H. J. Worman (2007). "Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy." *The Journal of clinical investigation* 117(5): 1282-93.
- Muchir, A., S. A. Reilly, W. Wu, S. Iwata, S. Homma, G. Bonne and H. J. Worman (2012). "Treatment with selumetinib preserves cardiac function and improves survival in cardiomyopathy caused by mutation in the lamin A/C gene." *Cardiovascular research* 93(2): 311-9.
- Muchir, A. and H. J. Worman (2010). "Signaling defects and the nuclear envelope in progeria." *Developmental cell* 19(3): 355-6.
- Mullick, A. E., K. Soldau, W. B. Kiosses, T. A. Bell, 3rd, P. S. Tobias and L. K. Curtiss (2008). "Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events." *The Journal of experimental medicine* 205(2): 373-83.
- Musich, P. R. and Y. Zou (2009). "Genomic instability and DNA damage responses in progeria arising from defective maturation of prelamin A." *Aging* 1(1): 28-37.
- Nadra, I., J. C. Mason, P. Philippidis, O. Florey, C. D. Smythe, G. M. McCarthy, R. C. Landis and D. O. Haskard (2005). "Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification?" *Circulation research* 96(12): 1248-56.
- Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon, et al. (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." *Cell* 113(6): 703-16.
- Nathan, C. and Q. W. Xie (1994). "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls." *Cell* 78(6): 915-8.

- Navarro, C. L., J. Cadinanos, A. De Sandre-Giovannoli, R. Bernard, S. Courrier, I. Boccaccio, A. Boyer, W. J. Kleijer, et al. (2005). "Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors." *Human molecular genetics* **14**(11): 1503-13.
- Navarro, C. L., V. Esteves-Vieira, S. Courrier, A. Boyer, T. Duong Nguyen, T. T. Huong le, P. Meinke, W. Schroder, et al. (2014). "New ZMPSTE24 (FACE1) mutations in patients affected with restrictive dermopathy or related progeroid syndromes and mutation update." *European journal of human genetics : EJHG* **22**(8): 1002-11.
- Navarro, C. L., Y. Poitelon and N. Levy (2008). "[A-type lamins and progeroid syndromes : persistent farnesylation with dramatic effects]." *Medecine sciences : M/S* **24**(10): 833-40.
- Neuhaus, J., D. R. Jacobs, Jr., J. V. Baker, A. Calmy, D. Duprez, A. La Rosa, L. H. Kuller, S. L. Pett, et al. (2010). "Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection." *The Journal of infectious diseases* **201**(12): 1788-95.
- New, S. E., C. Goettsch, M. Aikawa, J. F. Marchini, M. Shibasaki, K. Yabusaki, P. Libby, C. M. Shanahan, et al. (2013). "Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques." *Circulation research* **113**(1): 72-7.
- Nielsen, M. H., F. S. Pedersen and J. Kjemis (2005). "Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication." *Retrovirology* **2**: 10.
- Novelli, G., A. Muchir, F. Sangiuolo, A. Helbling-Leclerc, M. R. D'Apice, C. Massart, F. Capon, P. Sbraccia, et al. (2002). "Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C." *American journal of human genetics* **71**(2): 426-31.
- O'Rourke, M. F. and J. Hashimoto (2007). "Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective." *Journal of the American College of Cardiology* **50**(1): 1-13.
- Oldenburg, A. R., E. Delbarre, B. Thiede, C. Vigouroux and P. Collas (2014). "Deregulation of Fragile X-related protein 1 by the lipodystrophic lamin A p.R482W mutation elicits a myogenic gene expression program in preadipocytes." *Human molecular genetics* **23**(5): 1151-62.
- Olive, M., I. Harten, R. Mitchell, J. K. Beers, K. Djabali, K. Cao, M. R. Erdos, C. Blair, et al. (2010). "Cardiovascular pathology in Hutchinson-Gilford progeria: correlation with the vascular pathology of aging." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **30**(11): 2301-9.
- Orimo, H. (2010). "The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease." *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi* **77**(1): 4-12.
- Orjalo, A. V., D. Bhaumik, B. K. Gengler, G. K. Scott and J. Campisi (2009). "Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(40): 17031-6.
- Ortiz, R., E. Dejesus, H. Khanlou, E. Voronin, J. van Lunzen, J. Andrade-Villanueva, J. Fourie, S. De Meyer, et al. (2008). "Efficacy and safety of once-daily darunavir/ritonavir versus lopinavir/ritonavir in treatment-naive HIV-1-infected patients at week 48." *Aids* **22**(12): 1389-97.
- Osmanagic-Myers, S., T. Dechat and R. Foisner (2015). "Lamins at the crossroads of mechanosignaling." *Genes & development* **29**(3): 225-37.
- Osorio, F. G., C. Barcena, C. Soria-Valles, A. J. Ramsay, F. de Carlos, J. Cobo, A. Fueyo, J. M. Freije, et al. (2012). "Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF-kappaB activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response." *Genes & development* **26**(20): 2311-24.

- Osorio, F. G., C. L. Navarro, J. Cadinanos, I. C. Lopez-Mejia, P. M. Quiros, C. Bartoli, J. Rivera, J. Tazi, et al. (2011). "Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging." Science translational medicine 3(106): 106ra07.
- Osouda, S., Y. Nakamura, B. de Saint Phalle, M. McConnell, T. Horigome, S. Sugiyama, P. A. Fisher and K. Furukawa (2005). "Null mutants of *Drosophila* B-type lamin Dm(0) show aberrant tissue differentiation rather than obvious nuclear shape distortion or specific defects during cell proliferation." Developmental biology 284(1): 219-32.
- Overton, E. T., E. Arathoon, E. Baraldi and F. Tomaka (2012). "Effect of darunavir on lipid profile in HIV-infected patients." HIV clinical trials 13(5): 256-70.
- Paddy, M. R., A. S. Belmont, H. Saumweber, D. A. Agard and J. W. Sedat (1990). "Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery." Cell 62(1): 89-106.
- Pai, A., E. M. Leaf, M. El-Abbadi and C. M. Giachelli (2011). "Elastin degradation and vascular smooth muscle cell phenotype change precede cell loss and arterial medial calcification in a uremic mouse model of chronic kidney disease." The American journal of pathology 178(2): 764-73.
- Pai, A. S. and C. M. Giachelli (2010). "Matrix remodeling in vascular calcification associated with chronic kidney disease." Journal of the American Society of Nephrology : JASN 21(10): 1637-40.
- Palella, F. J., Jr., K. M. Delaney, A. C. Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Satten, D. J. Aschman and S. D. Holmberg (1998). "Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators." The New England journal of medicine 338(13): 853-60.
- Paloian, N. J. and C. M. Giachelli (2014). "A current understanding of vascular calcification in CKD." American journal of physiology. Renal physiology 307(8): F891-900.
- Parhami, F., B. Basseri, J. Hwang, Y. Tintut and L. L. Demer (2002). "High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells." Circulation research 91(7): 570-6.
- Pathai, S., H. Bajillan, A. L. Landay and K. P. High (2014). "Is HIV a model of accelerated or accentuated aging?" The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences 69(7): 833-42.
- Pekovic, V., I. Gibbs-Seymour, E. Markiewicz, F. Alzoghaibi, A. M. Benham, R. Edwards, M. Wenhert, T. von Zglinicki, et al. (2011). "Conserved cysteine residues in the mammalian lamin A tail are essential for cellular responses to ROS generation." Aging cell 10(6): 1067-79.
- Pekovic, V. and C. J. Hutchison (2008). "Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: the role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches." Journal of anatomy 213(1): 5-25.
- Pendas, A. M., Z. Zhou, J. Cadinanos, J. M. Freije, J. Wang, K. Hultenby, A. Astudillo, A. Wernerson, et al. (2002). "Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in *Zmpste24* metalloproteinase-deficient mice." Nature genetics 31(1): 94-9.
- Peng, H. B., P. Libby and J. K. Liao (1995). "Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B." The Journal of biological chemistry 270(23): 14214-9.
- Polager, S. and D. Ginsberg (2009). "p53 and E2f: partners in life and death." Nature reviews. Cancer 9(10): 738-48.
- Post, W. S., M. Budoff, L. Kingsley, F. J. Palella, Jr., M. D. Witt, X. Li, R. T. George, T. T. Brown, et al. (2014). "Associations between HIV infection and subclinical coronary atherosclerosis." Annals of internal medicine 160(7): 458-67.

- Potash, M. J., G. Bentsman, T. Muir, C. Krachmarov, P. Sova and D. J. Volsky (1998). "Peptide inhibitors of HIV-1 protease and viral infection of peripheral blood lymphocytes based on HIV-1 Vif." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(23): 13865-8.
- Price, P. A., M. R. Urist and Y. Otawara (1983). "Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone." Biochemical and biophysical research communications **117**(3): 765-71.
- Proudfoot, D., J. D. Davies, J. N. Skepper, P. L. Weissberg and C. M. Shanahan (2002). "Acetylated low-density lipoprotein stimulates human vascular smooth muscle cell calcification by promoting osteoblastic differentiation and inhibiting phagocytosis." Circulation **106**(24): 3044-50.
- Quijano-Roy, S., B. Mbieleu, C. G. Bonnemann, P. Y. Jeannet, J. Colomer, N. F. Clarke, J. M. Cuisset, H. Roper, et al. (2008). "De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy." Annals of neurology **64**(2): 177-86.
- Raffi, F., A. Rachlis, H. J. Stellbrink, W. D. Hardy, C. Torti, C. Orkin, M. Bloch, D. Podzamczar, et al. (2013). "Once-daily dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection: 48 week results from the randomised, double-blind, non-inferiority SPRING-2 study." Lancet **381**(9868): 735-43.
- Ragnauth, C. D., D. T. Warren, Y. Liu, R. McNair, T. Tajsic, N. Figg, R. Shroff, J. Skepper, et al. (2010). "Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging." Circulation **121**(20): 2200-10.
- Redwood, A. B., I. Gonzalez-Suarez and S. Gonzalo (2011). "Regulating the levels of key factors in cell cycle and DNA repair: new pathways revealed by lamins." Cell cycle **10**(21): 3652-7.
- Reynolds, J. L., A. J. Joannides, J. N. Skepper, R. McNair, L. J. Schurgers, D. Proudfoot, W. Jahnen-Dechent, P. L. Weissberg, et al. (2004). "Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD." Journal of the American Society of Nephrology : JASN **15**(11): 2857-67.
- Reynolds, J. L., J. N. Skepper, R. McNair, T. Kasama, K. Gupta, P. L. Weissberg, W. Jahnen-Dechent and C. M. Shanahan (2005). "Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification." Journal of the American Society of Nephrology : JASN **16**(10): 2920-30.
- Rober, R. A., K. Weber and M. Osborn (1989). "Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study." Development **105**(2): 365-78.
- Rodier, F. and J. Campisi (2011). "Four faces of cellular senescence." The Journal of cell biology **192**(4): 547-56.
- Rodier, F., J. P. Coppe, C. K. Patil, W. A. Hoeijmakers, D. P. Munoz, S. R. Raza, A. Freund, E. Campeau, et al. (2009). "Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion." Nature cell biology **11**(8): 973-9.
- Rolston, K. V. and G. P. Bodey (1986). "Acquired immunodeficiency syndrome." Seminars in surgical oncology **2**(2): 53-71.
- Ross, A. C., N. Rizk, M. A. O'Riordan, V. Dogra, D. El-Bejjani, N. Storer, D. Harrill, M. Tungsiripat, et al. (2009). "Relationship between inflammatory markers, endothelial activation markers, and carotid intima-media thickness in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **49**(7): 1119-27.
- Roy, M. E. and S. K. Nishimoto (2002). "Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity." Bone **31**(2): 296-302.

- Sage, A. P., J. Lu, Y. Tintut and L. L. Demer (2011). "Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro." Kidney international 79(4): 414-22.
- Saha, B., G. Zitnik, S. Johnson, Q. Nguyen, R. A. Risques, G. M. Martin and J. Oshima (2013). "DNA damage accumulation and TRF2 degradation in atypical Werner syndrome fibroblasts with LMNA mutations." Frontiers in genetics 4: 129.
- Samaras, K., S. K. Gan, P. W. Peake, A. Carr and L. V. Campbell (2009). "Proinflammatory markers, insulin sensitivity, and cardiometabolic risk factors in treated HIV infection." Obesity 17(1): 53-9.
- Sandler, N. G., H. Wand, A. Roque, M. Law, M. C. Nason, D. E. Nixon, C. Pedersen, K. Ruxrungtham, et al. (2011). "Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection." The Journal of infectious diseases 203(6): 780-90.
- Scaffidi, P. and T. Misteli (2005). "Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Nature medicine 11(4): 440-5.
- Scaffidi, P. and T. Misteli (2008). "Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing." Nature cell biology 10(4): 452-9.
- Scherzer, R., S. B. Heymsfield, D. Lee, W. G. Powderly, P. C. Tien, P. Bacchetti, M. G. Shlipak, C. Grunfeld, et al. (2011). "Decreased limb muscle and increased central adiposity are associated with 5-year all-cause mortality in HIV infection." Aids 25(11): 1405-14.
- Schlieper, G., A. Aretz, S. C. Verberckmoes, T. Kruger, G. J. Behets, R. Ghadimi, T. E. Weirich, D. Rohrmann, et al. (2010). "Ultrastructural analysis of vascular calcifications in uremia." Journal of the American Society of Nephrology : JASN 21(4): 689-96.
- Schmidt, M. I., B. B. Duncan, A. R. Sharrett, G. Lindberg, P. J. Savage, S. Offenbacher, M. I. Azambuja, R. P. Tracy, et al. (1999). "Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study." Lancet 353(9165): 1649-52.
- Sehgal, P., P. Chaturvedi, R. I. Kumaran, S. Kumar and V. K. Parnaik (2013). "Lamin A/C haploinsufficiency modulates the differentiation potential of mouse embryonic stem cells." PloS one 8(2): e57891.
- Shanahan, C. M. (2007). "Inflammation ushers in calcification: a cycle of damage and protection?" Circulation 116(24): 2782-5.
- Shanahan, C. M., M. H. Crouthamel, A. Kapustin and C. M. Giachelli (2011). "Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate." Circulation research 109(6): 697-711.
- Shay, J. W., O. M. Pereira-Smith and W. E. Wright (1991). "A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence." Experimental cell research 196(1): 33-9.
- Shevelyov, Y. Y. and D. I. Nurminsky (2012). "The nuclear lamina as a gene-silencing hub." Current issues in molecular biology 14(1): 27-38.
- Shioi, A., M. Katagi, Y. Okuno, K. Mori, S. Jono, H. Koyama and Y. Nishizawa (2002). "Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages." Circulation research 91(1): 9-16.
- Shobeiri, N., M. A. Adams and R. M. Holden (2014). "Phosphate: an old bone molecule but new cardiovascular risk factor." British journal of clinical pharmacology 77(1): 39-54.
- Speer, M. Y., H. Y. Yang, T. Brabb, E. Leaf, A. Look, W. L. Lin, A. Frutkin, D. Dichek, et al. (2009). "Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries." Circulation research 104(6): 733-41.

- Stary, H. C., A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, et al. (1995). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 15(9): 1512-31.
- Stein, G. H. and V. Dulic (1995). "Origins of G1 arrest in senescent human fibroblasts." BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology 17(6): 537-43.
- Steinberg, D. (1997). "A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis." Atherosclerosis 131 Suppl: S5-7.
- Stewart, C. and B. Burke (1987). "Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B." Cell 51(3): 383-92.
- Stierle, V., J. Couprie, C. Ostlund, I. Krimm, S. Zinn-Justin, P. Hossenlopp, H. J. Worman, J. C. Courvalin, et al. (2003). "The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain." Biochemistry 42(17): 4819-28.
- Strategies for Management of Antiretroviral Therapy Study, G., W. M. El-Sadr, J. Lundgren, J. D. Neaton, F. Gordin, D. Abrams, R. C. Arduino, A. Babiker, et al. (2006). "CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment." The New England journal of medicine 355(22): 2283-96.
- Strebel, K. (2013). "HIV accessory proteins versus host restriction factors." Current opinion in virology 3(6): 692-9.
- Sullivan, T., D. Escalante-Alcalde, H. Bhatt, M. Anver, N. Bhat, K. Nagashima, C. L. Stewart and B. Burke (1999). "Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy." The Journal of cell biology 147(5): 913-20.
- Sun, Y., C. H. Byon, K. Yuan, J. Chen, X. Mao, J. M. Heath, A. Javed, K. Zhang, et al. (2012). "Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification." Circulation research 111(5): 543-52.
- Sun, Y., X. R. Zeng, L. Wenger and H. S. Cheung (2003). "Basic calcium phosphate crystals stimulate the endocytotic activity of cells--inhibition by anti-calcification agents." Biochemical and biophysical research communications 312(4): 1053-9.
- Szmitko, P. E., C. H. Wang, R. D. Weisel, J. R. de Almeida, T. J. Anderson and S. Verma (2003). "New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I." Circulation 108(16): 1917-23.
- Takeda, E., Y. Taketani, K. Morita and K. Miyamoto (1999). "Sodium-dependent phosphate co-transporters." The international journal of biochemistry & cell biology 31(3-4): 377-81.
- Tang, X., Y. X. Luo, H. Z. Chen and D. P. Liu (2014). "Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases." Frontiers in physiology 5: 175.
- Tazir, M., H. Azzedine, S. Assami, P. Sindou, S. Nouioua, R. Zemmouri, T. Hamadouche, M. Chaouch, et al. (2004). "Phenotypic variability in autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to the R298C mutation in lamin A/C." Brain : a journal of neurology 127(Pt 1): 154-63.
- Tesoriero, J. M., S. M. Gieryic, A. Carrascal and H. E. Lavigne (2010). "Smoking among HIV positive New Yorkers: prevalence, frequency, and opportunities for cessation." AIDS and behavior 14(4): 824-35.
- Thomas, J. A., R. A. Deaton, N. E. Hastings, Y. Shang, C. W. Moehle, U. Eriksson, S. Topouzis, B. R. Wamhoff, et al. (2009). "PDGF-DD, a novel mediator of smooth muscle cell phenotypic modulation, is upregulated in endothelial cells exposed to atherosclerosis-prone flow patterns." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology 296(2): H442-52.

- Tien, P. C., A. I. Choi, A. R. Zolopa, C. Benson, R. Tracy, R. Scherzer, P. Bacchetti, M. Shlipak, et al. (2010). "Inflammation and mortality in HIV-infected adults: analysis of the FRAM study cohort." Journal of acquired immune deficiency syndromes 55(3): 316-22.
- Tilgner, K., K. Wojciechowicz, C. Jahoda, C. Hutchison and E. Markiewicz (2009). "Dynamic complexes of A-type lamins and emerin influence adipogenic capacity of the cell via nucleocytoplasmic distribution of beta-catenin." Journal of cell science 122(Pt 3): 401-13.
- Tilstra, J. S., C. L. Clauson, L. J. Niedernhofer and P. D. Robbins (2011). "NF-kappaB in Aging and Disease." Aging and disease 2(6): 449-65.
- Tintut, Y., J. Patel, M. Territo, T. Saini, F. Parhami and L. L. Demer (2002). "Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification in vitro." Circulation 105(5): 650-5.
- Torres, R. A. and W. Lewis (2014). "Aging and HIV/AIDS: pathogenetic role of therapeutic side effects." Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 94(2): 120-8.
- Toth, J. I., S. H. Yang, X. Qiao, A. P. Beigneux, M. H. Gelb, C. L. Moulson, J. H. Miner, S. G. Young, et al. (2005). "Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(36): 12873-8.
- Triant, V. A., H. Lee, C. Hadigan and S. K. Grinspoon (2007). "Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 92(7): 2506-12.
- Ukekawa, R., K. Miki, M. Fujii, H. Hirano and D. Ayusawa (2007). "Accumulation of multiple forms of lamin A with down-regulation of FACE-1 suppresses growth in senescent human cells." Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms 12(3): 397-406.
- Ullrich, N. J., M. W. Kieran, D. T. Miller, L. B. Gordon, Y. J. Cho, V. M. Silvera, A. Giobbie-Hurder, D. Neuberg, et al. (2013). "Neurologic features of Hutchinson-Gilford progeria syndrome after lonafarnib treatment." Neurology 81(5): 427-30.
- Vadrot, N., I. Duband-Goulet, E. Cabet, W. Attanda, A. Barateau, P. Vicart, F. Gerbal, N. Briand, et al. (2015). "The p.R482W substitution in A-type lamins deregulates SREBP1 activity in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy." Human molecular genetics 24(7): 2096-109.
- van den Berg, B. M., J. A. Spaan and H. Vink (2009). "Impaired glycocalyx barrier properties contribute to enhanced intimal low-density lipoprotein accumulation at the carotid artery bifurcation in mice." Pflügers Archiv : European journal of physiology 457(6): 1199-206.
- van der Kooij, A. J., G. Bonne, B. Eymard, D. Duboc, B. Talim, M. Van der Valk, P. Reiss, P. Richard, et al. (2002). "Lamin A/C mutations with lipodystrophy, cardiac abnormalities, and muscular dystrophy." Neurology 59(4): 620-3.
- Varela, I., S. Pereira, A. P. Ugalde, C. L. Navarro, M. F. Suarez, P. Cau, J. Cadinanos, F. G. Osorio, et al. (2008). "Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging." Nature medicine 14(7): 767-72.
- Varga, R., M. Eriksson, M. R. Erdos, M. Olive, I. Harten, F. Kolodgie, B. C. Capell, J. Cheng, et al. (2006). "Progressive vascular smooth muscle cell defects in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(9): 3250-5.
- Vasile, E., Y. Tomita, L. F. Brown, O. Kocher and H. F. Dvorak (2001). "Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 15(2): 458-66.

- Verstraeten, V. L., S. Caputo, M. A. van Steensel, I. Duband-Goulet, S. Zinn-Justin, M. Kamps, H. J. Kuijpers, C. Ostlund, et al. (2009). "The R439C mutation in LMNA causes lamin oligomerization and susceptibility to oxidative stress." *Journal of cellular and molecular medicine* 13(5): 959-71.
- Verstraeten, V. L., J. Y. Ji, K. S. Cummings, R. T. Lee and J. Lammerding (2008). "Increased mechanosensitivity and nuclear stiffness in Hutchinson-Gilford progeria cells: effects of farnesyltransferase inhibitors." *Aging cell* 7(3): 383-93.
- Vigouroux, C., M. Auclair, E. Dubosclard, M. Pouchelet, J. Capeau, J. C. Courvalin and B. Buendia (2001). "Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene." *Journal of cell science* 114(Pt 24): 4459-68.
- Virchow, R. (1989). "Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858." *Nutrition reviews* 47(1): 23-5.
- Virmani, R., A. P. Avolio, W. J. Mergner, M. Robinowitz, E. E. Herderick, J. F. Cornhill, S. Y. Guo, T. H. Liu, et al. (1991). "Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities." *The American journal of pathology* 139(5): 1119-29.
- von Hundelshausen, P. and C. Weber (2007). "Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease." *Circulation research* 100(1): 27-40.
- Walker, U. A., M. Auclair, D. Lebrecht, M. Kornprobst, J. Capeau and M. Caron (2006). "Uridine abrogates the adverse effects of antiretroviral pyrimidine analogues on adipose cell functions." *Antiviral therapy* 11(1): 25-34.
- Wand, H., A. Calmy, D. L. Carey, K. Samaras, A. Carr, M. G. Law, D. A. Cooper, S. Emery, et al. (2007). "Metabolic syndrome, cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus after initiation of antiretroviral therapy in HIV infection." *Aids* 21(18): 2445-53.
- Wei, W., W. A. Jobling, W. Chen, W. C. Hahn and J. M. Sedivy (2003). "Abolition of cyclin-dependent kinase inhibitor p16Ink4a and p21Cip1/Waf1 functions permits Ras-induced anchorage-independent growth in telomerase-immortalized human fibroblasts." *Molecular and cellular biology* 23(8): 2859-70.
- Weiss, H. A., J. N. Wasserheit, R. V. Barnabas, R. J. Hayes and L. J. Abu-Raddad (2008). "Persisting with prevention: the importance of adherence for HIV prevention." *Emerging themes in epidemiology* 5: 8.
- Werner, A., L. Dehmelt and P. Nalbant (1998). "Na⁺-dependent phosphate cotransporters: the NaPi protein families." *The Journal of experimental biology* 201(Pt 23): 3135-42.
- Winston, A. and M. Boffito (2005). "The management of HIV-1 protease inhibitor pharmacokinetic interactions." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 56(1): 1-5.
- Won, D., S. N. Zhu, M. Chen, A. M. Teichert, J. E. Fish, C. C. Matouk, M. Bonert, M. Ojha, et al. (2007). "Relative reduction of endothelial nitric-oxide synthase expression and transcription in atherosclerosis-prone regions of the mouse aorta and in an in vitro model of disturbed flow." *The American journal of pathology* 171(5): 1691-704.
- Worm, S. W., C. Sabin, R. Weber, P. Reiss, W. El-Sadr, F. Dabis, S. De Wit, M. Law, et al. (2010). "Risk of myocardial infarction in patients with HIV infection exposed to specific individual antiretroviral drugs from the 3 major drug classes: the data collection on adverse events of anti-HIV drugs (D:A:D) study." *The Journal of infectious diseases* 201(3): 318-30.
- Worman, H. J. (2012). "Nuclear lamins and laminopathies." *The Journal of pathology* 226(2): 316-25.
- Xiong, Z. M., C. LaDana, D. Wu and K. Cao (2013). "An inhibitory role of progerin in the gene induction network of adipocyte differentiation from iPS cells." *Aging* 5(4): 288-303.

- Yamada, S., M. Taniguchi, M. Tokumoto, J. Toyonaga, K. Fujisaki, T. Suehiro, H. Noguchi, M. Iida, et al. (2012). "The antioxidant tempol ameliorates arterial medial calcification in uremic rats: important role of oxidative stress in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease." Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 27(2): 474-85.
- Yang, S. H., M. O. Bergo, J. I. Toth, X. Qiao, Y. Hu, S. Sandoval, M. Meta, P. Bendale, et al. (2005). "Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(29): 10291-6.
- Yang, S. H., X. Qiao, L. G. Fong and S. G. Young (2008). "Treatment with a farnesyltransferase inhibitor improves survival in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation." Biochimica et biophysica acta 1781(1-2): 36-9.
- Yeung, F., J. E. Hoberg, C. S. Ramsey, M. D. Keller, D. R. Jones, R. A. Frye and M. W. Mayo (2004). "Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase." The EMBO journal 23(12): 2369-80.
- Yu, K. R., S. Lee, J. W. Jung, I. S. Hong, H. S. Kim, Y. Seo, T. H. Shin and K. S. Kang (2013). "MicroRNA-141-3p plays a role in human mesenchymal stem cell aging by directly targeting ZMPSTE24." Journal of cell science 126(Pt 23): 5422-31.
- Yudkin, J. S., C. D. Stehouwer, J. J. Emeis and S. W. Coppel (1999). "C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?" Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 19(4): 972-8.
- Zanni, M. V., S. Abbara, J. Lo, B. Wai, D. Hark, E. Marmarelis and S. K. Grinspoon (2013). "Increased coronary atherosclerotic plaque vulnerability by coronary computed tomography angiography in HIV-infected men." Aids 27(8): 1263-72.
- Zeng, L., A. Zampetaki, A. Margariti, A. E. Pepe, S. Alam, D. Martin, Q. Xiao, W. Wang, et al. (2009). "Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in response to disturbed flow." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(20): 8326-31.
- Zhou, J., Y. S. Li and S. Chien (2014). "Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 34(10): 2191-8.
- Zuo, B., J. Yang, F. Wang, L. Wang, Y. Yin, J. Dan, N. Liu and L. Liu (2012). "Influences of lamin A levels on induction of pluripotent stem cells." Biology open 1(11): 1118-27.
- Zwergler, M., C. Y. Ho and J. Lammerding (2011). "Nuclear mechanics in disease." Annual review of biomedical engineering 13: 397-428.

Annexe

Seminars in Cell & Developmental Biology 29 (2014) 148–157



Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell & Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcdb

Review

Nuclear envelope-related lipodystrophies



A.C. Guénantin^{a,b,1}, N. Briand^{a,b,1}, G. Bidault^{a,b,c}, P. Afonso^{a,b,c}, V. Béréziat^{a,b,c},
C. Vatiér^{a,b,c}, O. Lascols^{a,b,c,d}, M. Caron-Debarle^{a,b,c}, J. Capeau^{a,b,c,e}, C. Vigouroux^{a,b,c,e,*}

^a INSERM UMR_S938, Centre de Recherche Saint-Antoine, F-75012 Paris, France^b ICAN, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris, France^c Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S938, F-75005 Paris, France^d AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires, F-75012 Paris, France^e AP-HP, Hôpital Tenon, Service de Biochimie et Hormonologie, F-75020 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 30 December 2013

Keywords:

Lipodystrophy
A-type-lamins
Adipocyte
Insulin resistance
Senescence
Differentiation

ABSTRACT

Several alterations in nuclear envelope proteins building up the lamina meshwork beneath the inner nuclear membrane (mutations in lamins A/C, alterations of prelamin-A maturation, lamin B mutations or deregulation) have been shown to be responsible for or associated to human lipodystrophic syndromes. Lipodystrophic syndromes are rare and heterogeneous diseases, either genetic or acquired, characterized by generalized or partial fat atrophy associated with metabolic complications comprising insulin-resistant diabetes, dyslipidemia, and non-alcoholic fatty liver disease. Recent advances in the molecular genetics of different types of lipodystrophies generally pointed to primary adipocyte alterations leading to impaired adipogenesis and/or deregulation of the adipocyte lipid droplet. However, the precise mechanisms linking nuclear envelope abnormalities to lipodystrophies remain largely unknown. The phenotype of nuclear envelope-linked lipodystrophies ranges from the typical familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type (FPLD2), due to heterozygous substitutions of the 482nd arginine of lamins A/C, to complex diseases that can combine lipodystrophy, metabolic complications, muscular or cardiac alterations and/or signs of accelerated aging. In this review we present the clinical, tissular and cellular characteristics of the nuclear envelope-linked lipodystrophies, as well as their hypothetical pathophysiological mechanisms.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction: lamins and the lipodystrophic syndromes.....	149
2. Genetic lipodystrophies due to mutations in <i>LMNA</i> , encoding A-type lamins.....	149
2.1. Clinical characteristics and genotype–phenotype correlations.....	149
2.1.1. Familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type (FPLD2).....	149
2.1.2. Metabolic laminopathies.....	149
2.1.3. Progeria and progeroid syndromes.....	149
2.2. Pathological features of patients' adipose tissue.....	149
2.3. Patients' cells alterations.....	150
2.4. Elements of pathophysiology.....	150
2.4.1. Structural alterations of mutated A-type-lamins and altered binding to partners.....	150
2.4.2. Altered prelamin-A maturation and cellular consequences.....	152
2.4.3. Modélisation of cellular alterations observed in <i>LMNA</i> -linked lipodystrophy using stem cells.....	152
3. Lipodystrophies associated with HIV-antiretroviral treatments: an acquired form of laminopathy contributing to pathophysiology.....	153
3.1. Phenotypes and risk factors.....	153
3.2. Tissue analyses: accumulation of prelamin-A.....	154
3.3. Modélisation of cellular alterations due to antiretrovirals.....	154

* Corresponding author at: INSERM UMR_S938, Centre de Recherche Saint-Antoine, F-75012 Paris, France. Tel.: +33 1 40 01 14 84.

E-mail addresses: anne.clair.guenantin@inserm.fr (A.C. Guénantin), nolwenn.briand@inserm.fr (N. Briand), guillaume.bidault@inserm.fr (G. Bidault), pauline.afonso@inserm.fr (P. Afonso), veronique.bereziat@inserm.fr (V. Béréziat), camille.vatier@inserm.fr (C. Vatiér), olivier.lascols@inserm.fr (O. Lascols), martine.debarle@inserm.fr (M. Caron-Debarle), jacqueline.capeau@inserm.fr (J. Capeau), corinne.vigouroux@inserm.fr (C. Vigouroux).

¹ These authors contributed equally to this paper.

1084-9521/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcb.2013.12.015>

4. Lamin-B and lipodystrophies	154
4.1. Lamin-B2 mutations and acquired partial lipodystrophies	154
4.2. Non LMNA-linked premature aging syndromes with lipodystrophies: role of DNA damages and dysregulation of lamin-B1 expression	154
5. Conclusions	154
Acknowledgment	154
References	154

1. Introduction: lamins and the lipodystrophic syndromes

The nuclear lamina is composed of the intermediate filaments A- and B-type lamins, which form a meshwork underlying the nuclear envelope. Lamins have a typical tripartite structure, with a central α -helical rod dimerization domain flanked by a short N-terminal head and a large C-terminal tail containing a globular immunoglobulin-like domain. B-type lamins, ubiquitously expressed, are encoded by the *LMNB1* and *LMNB2* genes, whereas prelamin-A and lamin-C, the main isoforms of A-type lamins, are developmentally regulated splice variants of the *LMNA* gene expressed in most lineage precursors and differentiated cells. Prelamin-A undergoes a complex post-translational maturation process affecting its C-terminal CaaX motif (Fig. 1, left panel). After farnesylation on the cysteine, aaX aminoacyls are removed, farnesyl-cysteine is carboxymethylated, and then 15 C-terminal aminoacyls are cleaved by the metalloprotease ZMPSTE24 to produce mature lamin-A. Lamins are important regulators of assembly, structure, shape and mechanical stability of the nucleus, and also participate to pleiotropic nuclear functions, such as organization of chromatin, gene expression, and DNA replication and repair [1]. Naturally occurring mutations in A-type lamins cause several different diseases called laminopathies, comprising lipodystrophies, skeletal and/or cardiac myopathies, neuropathies, premature aging diseases, and overlapping phenotypes. Lipodystrophic syndromes and/or accelerated aging phenotypes were also linked to acquired or genetically determined alterations of prelamin-A maturation or B-type lamins functions.

Lipodystrophic syndromes constitute a heterogeneous group of genetic or acquired diseases, characterized by generalized or partial fat atrophy (lipoatrophy) and metabolic complications (insulin-resistant diabetes, dyslipidemia, non-alcoholic fatty liver disease). Monogenic causes of lipodystrophies, although diverse, mostly converge on primary alterations affecting adipose tissue (AT), such as impaired adipogenesis or defects in the formation, maintenance and/or regulation of the adipocyte lipid droplet, leading to secondary dysfunctions of the whole body metabolism (Fig. 2) [2]. However, the pathophysiology of lipodystrophic syndromes due to genetic or acquired defects in lamins still remains largely undeciphered. We present here the different forms of laminopathic lipodystrophies, from a genetic, clinical, tissular, and cellular point of view, and discuss the main pathophysiological hypotheses raised by recent studies.

2. Genetic lipodystrophies due to mutations in LMNA, encoding A-type lamins

2.1. Clinical characteristics and genotype–phenotype correlations

2.1.1. Familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type (FPLD2)

Heterozygous mutations affecting the C-terminal part of A-type-lamins, with a mutational hot-spot substituting the positively charged arginine at codon 482 for a neutral amino-acid (tryptophan, glutamine, leucine), are responsible for the typical form of Dunnigan-type familial partial lipodystrophy (FPLD2) (Fig. 3) [3,4]. Homozygosity for the *LMNA* p.R482Q mutation was observed in a

single family, resulting in a combination of lipodystrophic, myopathic and progeroid phenotype [5].

FPLD2 is characterized by the disappearance, around puberty, of AT in the limbs, buttocks and trunk, contrasting with a cushingoid appearance due to fat accumulation in the neck, face and axillary regions. Accumulation of fat also occurs in intra-abdominal areas, and in the perineum in females. Patients show a generalized muscular hypertrophy, with an actual increase in skeletal muscle volume [6] accentuated by lipoatrophy. Metabolic consequences develop progressively, with severe hypertriglyceridemia, insulin resistance (clinically recognized by brownish hyperkeratotic skin lesions of *Acanthosis nigricans* of body folds), diabetes, liver steatosis, premature atherosclerosis [7,8] and frequent ovarian hyperandrogenism in females [9]. Endocrine functions of AT are also affected, with decreased adiponectin and leptin circulating levels. The lipodystrophic and metabolic phenotype is more severe in females than in males [10] suggesting that sex steroids, which are known factors contributing to the physiological sexual dimorphism of body fat distribution, could be involved in the lipodystrophic phenotype resulting from these *LMNA* mutations. Some patients also present muscular and cardiac abnormalities characteristic of other forms of laminopathies [11].

2.1.2. Metabolic laminopathies

Non-codon 482 *LMNA* mutations, diversely affecting the C-terminal, rod, or N-terminal domains of A-type-lamins, can lead to atypical forms of lipodystrophic syndromes. Lipoatrophy can be clinically mild, with android obesity in some cases, but features of the metabolic syndrome including insulin resistance and dyslipidemia are present [12–15]. Metabolic laminopathies can associate with muscular and cardiac abnormalities.

2.1.3. Progeria and progeroid syndromes

The Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) is a rare and severe segmental accelerated aging syndrome. HGPS is mainly due to a *de novo* heterozygous *LMNA* mutation leading to the synthesis of progerin, a mutated prelamin-A lacking its endoprotease cleavage site and remaining constitutively farnesylated [16,17]. The phenotype develops in the first years of life, with growth retardation, bone and cartilage dysplasia, hair loss, scleroderma-like skin alterations, generalized subcutaneous lipoatrophy with insulin resistance and low HDL-cholesterol, and severe and precocious atherosclerosis, leading to early mortality generally at adolescence [18]. Other premature aging syndromes, due to mutations in *LMNA* or *ZMPSTE24*, as mandibulo-acral dysplasia (MAD) [19,20] or atypical progeroid syndromes, present similar signs than HGPS, although less severe, with generalized or partial lipodystrophy, insulin resistance, dyslipidemia and liver steatosis. These observations suggest that lipodystrophies and accelerated aging syndromes share partially common pathophysiological determinants.

2.2. Pathological features of patients' adipose tissue

The different body fat depots have distinct physiological responses, including a depot-specific pattern of A-type-lamins mRNA expression [21]. However, the stereotyped anatomical pattern of lipoatrophy in FPLD2 remains largely unexplained.

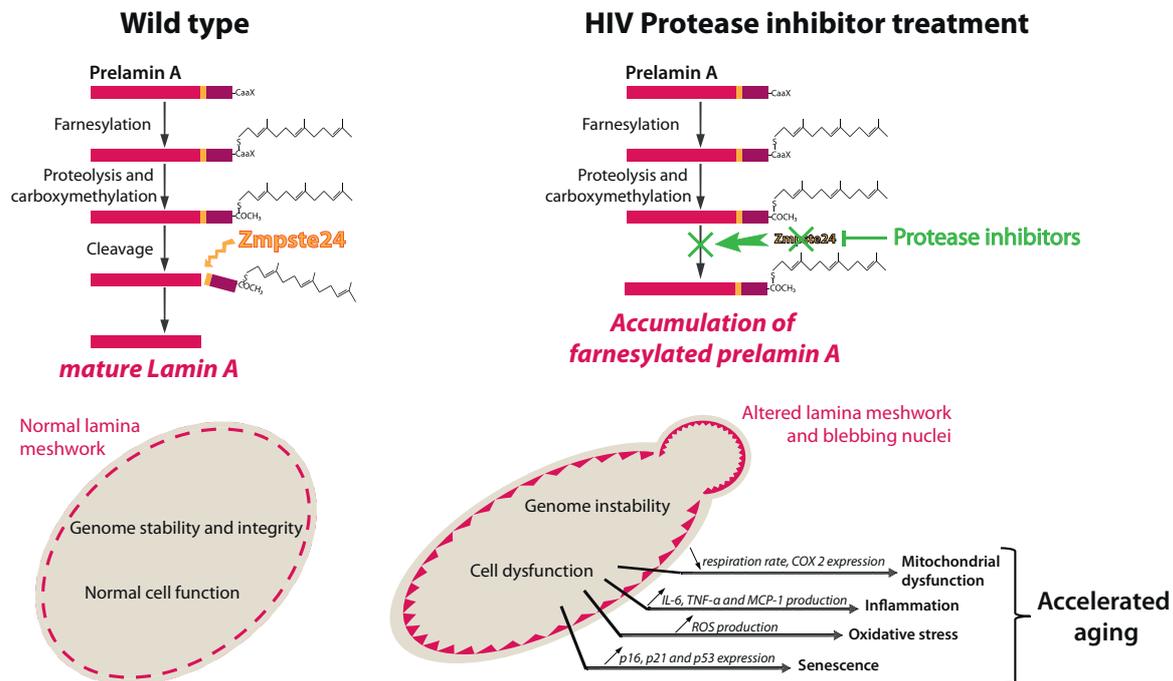


Fig. 1. Maturation of prelamin-A into mature lamin-A: physiological steps and alterations induced by some HIV-protease inhibitors. IL-6: interleukin 6, TNF α : tumor necrosis factor α , MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1, ROS: reactive oxygen species, COX2: mtDNA-encoded subunit 2 of the cytochrome oxidase (respiratory chain complex IV).

Lipotropic fat from these patients is characterized by accumulation of prelamin-A and altered expression of genes involved in adipocyte differentiation and proliferation (peroxisome proliferator-activated receptor PPAR γ , cyclin D3, retinoblastoma protein (pRb), lipoprotein lipase) [22]. In addition, our group showed that increased faciocervical fat is not simply due to a compensatory excess of triglycerides stores, but rather to a peculiar tissular remodeling, with fibrosis, prelamin-A accumulation, altered expression of adipogenic factors, mitochondrial proliferation and enhanced uncoupling protein 1 (UCP1) expression, suggesting a brown fat-like differentiation process [23]. Therefore, FPLD2 results in a generalized alteration of AT, with different phenotypic expressions depending on the anatomical localizations.

2.3. Patients' cells alterations

Abnormalities of nuclear architecture characterize cultured skin fibroblasts of patients with FPLD2. We showed that 10 to 15% of FPLD2 fibroblasts (but less of 1% of controls) had dysmorphic blebbing nuclei, with altered staining of lamins-A/C and their partners, such as lamin-B, emerin, nuclear pore complexes, lamina-associated protein 2 β (LAP2 β), and decondensed chromatin in nuclear herniations [24]. Nuclear envelope was weakened in mutated cells, as attested by its increased sensitivity to heat shock, and the low stringency of extraction of its components. An abnormal fibrous dense lamina with defects in the peripheral heterochromatin was also observed in adipocytes from patients with FPLD2 [22]. These nuclear alterations were reproduced in fibroblast, myoblast and preadipocyte cell lines transfected with FPLD2-linked p.R482W-mutated lamin-A, but also with the Emery-Dreifuss muscular dystrophy-associated p.R453W-mutated lamin-A, showing that the nuclear abnormalities are not specific to a unique laminopathic clinical phenotype [25]. Similar nuclear abnormalities have

been reported in fibroblasts from patients with laminopathies of muscular and/or progeroid clinical expression [19,26,27].

2.4. Elements of pathophysiology

2.4.1. Structural alterations of mutated A-type-lamins and altered binding to partners

Two groups revealed that the C-terminal domain of human A-type-lamins adopts an immunoglobulin fold-like structure [28,29]. Unlike LMNA mutations causing muscular dystrophies, FPLD2-associated mutations do not disrupt this tridimensional conformation but alter a positively charged interaction site, which could modify the binding of A-type-lamins to biological partners [28–30]. Thus, tissue-specific defects associated with different LMNA mutations could arise from impaired gene expression through altered interactions of lamins-A/C with transcription factors or regulators [31]. The main candidates for altered binding to mutated lamins-A/C are discussed below.

2.4.1.1. Sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1c).

SREBP1c, a transcription factor playing a major role in the control of genes involved in adipocyte differentiation (as PPAR γ) and lipid metabolism, has been shown to interact with lamins-A/C and prelamin-A [32–35]. SREBP1c colocalizes with prelamin-A at the nuclear envelope in fibroblasts from laminopathic patients or treated with a farnesyltransferase inhibitor [34]. In murine preadipocyte cell lines, treated with HIV-protease inhibitors (PIs), that inhibit ZMPSTE24 as discussed below (see Section 3), both localization and transactivation abilities of SREBP1c were altered as the lamina network was disorganized [33]. Thus, prelamin-A accumulation, by inducing SREBP1c sequestration at the nuclear rim, could decrease PPAR γ activation and reduce adipogenesis. In agreement, decreased PPAR γ expression was observed in thigh [22]

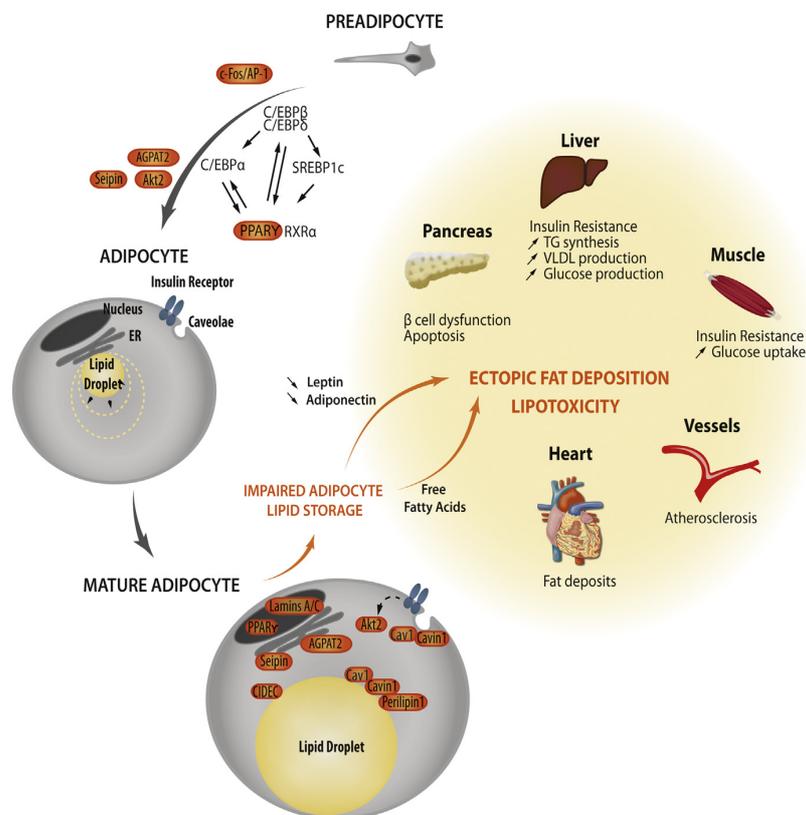


Fig. 2. Main causes of genetic forms of lipodystrophic syndromes. Proteins mutated in monogenic forms of lipodystrophies are depicted in red. Adipocytes arise from mesenchymal stem cells that differentiate in response to hormonal signals (such as insulin, steroids) and adipogenic transcription factors, mainly CCAAT (cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine)-enhancer-binding proteins (C/EBP) β/δ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), C/EBP α , c-fos (AP-1) and sterol regulatory element-binding protein (SREBP) 1c. Other proteins involved in lipodystrophies (seipin, AGPAT2, CIDEA, caveolin-1, cavin-1, perilipin) are critical for the formation and regulation of the unique adipocyte lipid droplet, which stores energy as triglycerides. Seipin, a protein of the endoplasmic reticulum membrane regulating adipocyte lipid droplet formation, AGPAT2, an enzyme involved in triglyceride synthesis, and Akt2, an insulin signaling intermediate, also contribute to adipocyte differentiation. Impaired adipocyte lipid storage and defective endocrine functions of AT (secretion of leptin, adiponectin) led to ectopic fat deposition with cellular lipotoxicity, which contributes to insulin resistance, diabetes, dyslipidemia and liver steatosis.

and faciocervical subcutaneous AT [23] from patients with FPLD2. However, the role of the p.R482W *LMNA* mutation itself on SREBP1 binding remains unclear. *In silico* studies predicted stronger interactions between p.R482W-lamin-A and SREBP1 [30] while *in vitro* experiments showed weaker [32] or similar binding [35] as compared to wild-type lamin-A, depending on the experimental model.

2.4.1.2. SUMO1. Sumoylation consists in the attachment of a small ubiquitin-related modifier (SUMO) to proteins that regulates their localization, functions and interactions. Several lamin-A domains, including the immunoglobulin-fold, are modified by SUMOs [36]. Two atypical lipodystrophy-causing mutations (*LMNA* p.G465D and p.K486N), but not the typical FPLD2-associated p.R482W, were shown to decrease lamin-A sumoylation [36]. Altered interactions, in particular with partners requiring an unmodified lamin-A immunoglobulin-fold (as SREBP1), may provide a mechanism for these atypical lipodystrophies.

2.4.1.3. Sp1. The Sp1 transcription factor regulates the transcription of genes involved in fatty acid synthesis and extracellular matrix remodeling, both required for adipocyte differentiation. In a model of human mesenchymal stem cells (MSC) treated with PIs to induce farnesylated prelamin-A accumulation, a stable interaction between prelamin-A and Sp1 and a reduced Sp1 transcriptional

activity were demonstrated [37]. Inhibition of Sp1 activity during adipocyte differentiation decreased the lipid droplet size in a time and dose-dependent manner, contributing to impaired adipogenesis.

2.4.1.4. Fragile X related protein 1 (FXR1P). The group of Collas and collaborators identified FXR1P, a mRNA binding protein involved in muscle development, as new lamin-A partner at the nuclear envelope [38]. In fibroblasts from FPLD2 patients, FXR1P was upregulated but its nuclear localization reduced. Stable expression of p.R482W-lamin-A, or overexpression of FXR1P in adipose progenitor cells both resulted in impaired adipogenic differentiation with a switch toward a myogenic gene expression profile [38]. Therefore, in FPLD2, altered interactions between FXR1P and lamin-A could direct precursor cells from an adipogenic commitment toward a myogenic program.

2.4.1.5. Barrier-to autointegration factor (BAF). BAF is a DNA-binding protein that interacts directly with lamins, histones, and LEM (LAP2-Emerin-MAN1) domain-proteins [39]. Through its cellular distribution, BAF regulates chromatin structure, epigenetic modifications, mitosis and gene expression. Noteworthy, BAF interacts with the histone methyltransferase G9a [40], a chromatin-remodeling enzyme that inhibits terminal adipocyte differentiation

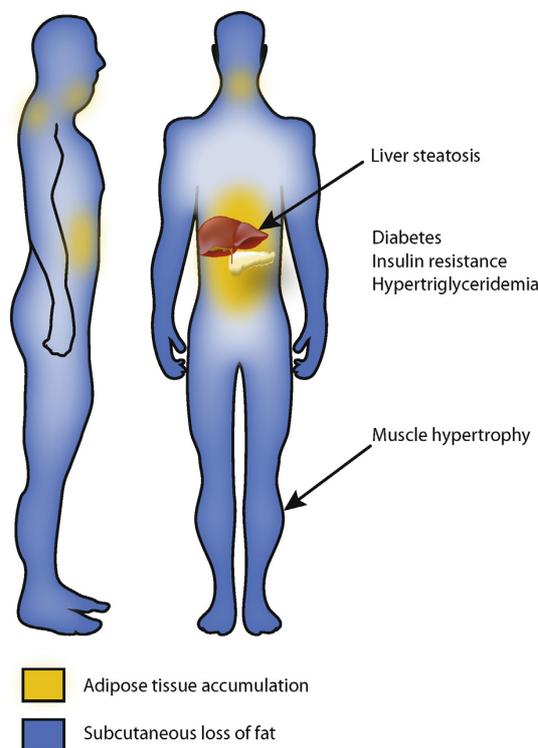


Fig. 3. Schematic representation of the phenotype in familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type (FPLD2). Lipoatrophic areas are shown in blue, and regions of accumulation of fat in yellow. Muscular hypertrophy, enlarged liver due to steatosis, insulin-resistant diabetes and hypertriglyceridemia also characterize the disease.

by silencing PPAR γ expression. In different models of prelamin-A accumulation, including fibroblasts from FPLD2 and MAD patients, BAF relocated to the nucleus [41], where it could interfere with the transcriptional PPAR γ repressor complexes and impair adipocyte differentiation.

2.4.1.6. Retinoblastoma protein (pRb). pRb regulates cell proliferation and differentiation in a cell-cycle dependent manner. A-type-lamins interact with pRb in the G1 phase of the cell cycle, protecting it from proteasomal degradation [39]. Johnson et al. demonstrated that the phenotype of *Lmna*^{-/-} cells resemble that of *Rb*^{-/-} cells, suggesting that pRb alterations could contribute to laminopathies [42]. Indeed, pRb promotes adipogenic differentiation by activating the adipogenic transcription factor C/EBP α [43], and regulates the white or brown fate of adipocytes [44].

2.4.1.7. LAP2 α . The pRb-LAP2 α -A-type-lamins nuclear complexes control the balance between cell proliferation and differentiation. Preadipocytes overexpressing LAP2 α showed enhanced early events of adipocyte differentiation while terminal differentiation was inhibited [45]. Through misregulation of pRb-LAP2 α -A-type-lamins complexes, *LMNA* mutations may affect the balance between proliferation and differentiation in stem cells.

2.4.1.8. Nesprin-2. Recent studies suggest that mutations of lamin A/C could also alter its binding affinity for nesprin-2, which participates, in association with lamins and other nuclear transmembrane proteins, to the LINC complex (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) [46]. Alterations of this complex might cause impaired transfer of mechanically induced signals across the

nuclear envelope, as observed in lamin A/C deficient cells [47]. It is possible that cytoskeleton remodeling, which is an important feature during adipocyte differentiation [48], could be affected by specific *LMNA* mutations through impaired nucleus-cytoskeleton interactions.

Taken as a whole, these studies suggest that altered interactions of mutated A-type lamins with several proteins could lead to defects in the adipogenic differentiation program of progenitor cells, a well-known pathophysiological determinant of lipodystrophic syndromes (Fig. 2). Interactions of A-type lamins with chromatin probably also play important roles in that setting, as discussed below (Section 2.4.3).

2.4.2. Altered prelamin-A maturation and cellular consequences

Abnormal prelamin-A accumulation, observed in skin fibroblasts, vascular cells and AT from patients with lipodystrophic laminopathies [8,23,34,49], could be due to a primary impairment of the recognition of mutated prelamin-A by ZMPSTE24. In accordance, we showed in endothelial cells, that the maturation rate of p.R482W prelamin-A was decreased as compared to that of wild-type prelamin A, explaining at least in part the accumulation of its farnesylated form [8]. Farnesylated prelamin-A, predominantly localized at the nuclear rim [8], acted as a dominant-negative toxin, that disrupted the nuclear envelope and induced cellular defects, including oxidative stress, DNA damages and senescence in several cellular models expressing FPLD2-linked *LMNA* mutations [8,23,34,49]. In accelerated aging syndromes, decreased proliferation capacity, cellular senescence, oxidative stress and genomic instability have been shown to be induced by defective prelamin-A processing in *Zmpste24*^{-/-} models, and by progerin synthesis in HGPS [50–52]. Finally, both prelamin-A and progerin could be biomarkers of normal aging [53–55]. Interestingly, lamin-A plays a key role in maintaining cellular redox balance. Oxidation of its C-terminal cysteine residues was shown to buffer excessive production of reactive oxygen species (ROS), avoiding DNA damages and cellular senescence [56].

Accordingly, decreasing the amount of farnesylated prelamin-A or progerin partially rescued the progeroid phenotypes in mice and human [57,58]. However, regarding *LMNA*-linked lipodystrophies, some non-codon 482 mutations induced increased ROS production in the absence of prelamin-A accumulation [59], or in the presence of only non-farnesylated prelamin-A [14].

Therefore, while farnesylated prelamin-A or progerin accumulation appears as a major pathophysiological determinant in premature aging syndromes, abnormalities of prelamin-A maturation are not present in all *LMNA*-linked lipodystrophies, and could represent an aggravating factor.

2.4.3. Modelisation of cellular alterations observed in *LMNA*-linked lipodystrophy using stem cells

2.4.3.1. Altered adipocyte differentiation. Given the molecular mechanisms of other lipodystrophies, resulting in adipocyte dysfunction (Fig. 2), an important pathophysiological hypothesis in laminopathic lipodystrophies is that *LMNA* mutations could impair adipocyte differentiation. In addition, as patients with FPLD2 generally begin to lose fat after the onset of puberty, an inability to maintain the differentiated state of AT in response to hormonal changes is possible.

However, the impact of A-type-lamins on adipose differentiation remains controversial. The siRNA-mediated knockdown of A-type-lamins in rat MSC promoted adipocyte differentiation with increased mRNA expression of the adipocyte markers PPAR γ and aP2 [60]. Conversely, lamin-A knockdown in human adipose progenitor cells impaired adipogenic differentiation without inducing cell death or cell cycle arrest [38]. In addition, in 3T3-L1 murine preadipocytes, the stable overexpression of both wild-type

or p.R482W lamin-A inhibited intracellular lipid storage through defective *de novo* lipogenesis and decreased PPAR γ level [61]. In human adipose stem cells, although overexpression of GFP-wild-type-lamin-A affected early adipogenic gene expression, stable expression of GFP-R482W-lamin-A more strikingly decreased adipogenesis [38].

These discrepancies may result from the use of distinct cellular models, with different degrees of adipogenic commitment. In addition, the sensitivity to alterations induced by lamins-A/C overexpression, even wild-type or mutated, varied among different cell lines [25].

To investigate the role of mutated lamin-A in AT *in vivo*, a mouse model expressing the FPLD2-associated p.R482Q mutant specifically in AT was generated [62]. When submitted to a high fat diet, these mice displayed a FPLD2-like phenotype with lack of fat accumulation, insulin resistance and enlarged fatty liver. AT histological examination revealed a reduction of adipocytes' size that cannot be imputed to an increased lipolysis, suggesting an impaired differentiation. Accordingly, the AT stroma-vascular fraction from these mice was unable to accumulate triglycerides when submitted to adipogenic conditions [62].

2.4.3.2. Lamins-A/C-mediated regulation of epigenetics and stem cells differentiation. Taken as a whole, laminopathies preferentially affect tissues from mesenchymal origin. Therefore, different defects in mesenchymal stem cell differentiation or renewal could underlie the specific tissular alterations of the different laminopathies.

A-type-lamins interact directly with nucleic acids and chromatin, being closely associated with heterochromatin in specialized regions. These regions, called Lamina-Associated-Domains (LADS), cover about 40% of the genome and are considered to be transcriptionally repressive [63]. Promoters within LADs generally carry repressive histone marks, as H3K9 and H3K27 methylations. A-type-lamins-chromatin interactions involve N- and C-terminal domains of histones and the lamins immunoglobulin-fold [64], centered around amino-acid R482 [65]. As R482 substitutions specifically lead to FPLD2, defects in lamins-A/C-DNA interactions may participate to the pathophysiology of lipodystrophy.

LMNA-mutated cells showed an altered chromosomes' organization, with chromosomes 13 and 18 located away from the nuclear periphery, as seen in quiescent fibroblasts [66]. In dermal fibroblasts from patients carrying the LMNA mutations p.R482W (FPLD2) or p.G608G (HGPS), a loss of peripheral heterochromatin has been observed [24,27], associated with a delocalization and solubilization of the epigenetic marks H3K9me3 and HP1 β in cells bearing the MAD-associated p.R527H mutation [67]. These altered lamins-A/C-chromatin interactions and epigenetic modifications could lead to deregulated genome functions that are critical for cell developmental potential [68].

Indeed, differentiation processes are dependent upon tight chromosome regulation. During development, A-type-lamins are first detected between day 9 and 11 after fertilization [69], suggesting their important role in differentiation. *In vitro*, A-type-lamins, are not [70] or mildly [71] expressed in pluripotent stem cells and thus considered as markers of early differentiation. During mouse embryonic stem cells (mESC) differentiation, a reorganization of LADs occurs, heterochromatin protein dynamics being regulated by lamin-A [72]. Furthermore, as cell differentiation progresses, many genes related with pluripotency become associated with the nuclear lamina, suggesting that lamins are involved in cell fate decisions. In human AT stem cells, A-type-lamins interact with distinct spatially restricted subpromoter regions, within and outside LADs, leading to distinct transcriptional outcomes. As adipogenic differentiation resets many of these lamin-genome associations, it is proposed that lamins-A/C, by modulating local gene expression, contributes to commitment and differentiation to the adipose

lineage [73]. Interestingly, using induced pluripotent stem cells (iPSCs) obtained from HGPS cells, Xiong et al. showed a severe defect in lipid storage during late adipose differentiation stages, unraveling a regulatory role of lamin-A in terminal adipogenesis [74]. Therefore, iPSCs provide an excellent tool to understand the role of A-type-lamins in mesenchymal stem cell differentiation in physiology and in response to naturally occurring mutations.

Mutations in A-type-lamins could also perturb the balance between maintenance and proliferation in the adult stem cell niche, leading to decreased tissue regeneration and senescence [75,76]. In HGPS, where several tissues of mesenchymal origin are affected, the overexpression of progerin in human MSCs affects their differentiation potential and their ability of self-renewal, resulting in a progressive tissular deterioration [77]. Mesenchymal tissue proliferation and differentiation is mainly driven by the canonical Wnt/ β -catenin pathway, which promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis. Emerin and A-type-lamins regulate this pathway by modulating the transcriptional activity of β -catenin through its nucleocytoplasmic distribution [78]. To note, β -catenin is also involved in the defense against oxidative stress [79], which is strikingly enhanced in laminopathic cells. Therefore, this pathway, which is crucial for mesenchymal tissue homeostasis and adipocyte differentiation, could play a role in laminopathies [80].

Taken as a whole, these data stress out the interest of stem cell models to understand the pathophysiology of laminopathies.

3. Lipodystrophies associated with HIV-antiretroviral treatments: an acquired form of laminopathy contributing to pathophysiology

3.1. Phenotypes and risk factors

Some HIV-infected patients develop, when given antiretroviral treatment (ART), different forms of lipodystrophies. One of them can be considered as an acquired form of laminopathy induced by ART.

The introduction of antiretroviral multitherapies resulted, in the 1990s, in a spectacular decrease in AIDS-related morbidity and mortality. ART associated, at that time, two nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors (NRTI) and, from 1996, one HIV-protease inhibitor (PI). However, soon after the initiation of the triple therapy, a number of patients presented with a lipodystrophic syndrome. Thymidine NRTIs (tNRTI), mainly stavudine but also zidovudine, were shown to contribute to lipodystrophy, due to their mitochondrial toxicity [81]. First generation PIs were proposed to act in synergy with tNRTIs to favor visceral and upper body fat hypertrophy. Lipodystrophy was generally associated with metabolic abnormalities, with severe hypertriglyceridemia, insulin resistance, altered glucose tolerance and even diabetes [81]. This mixed phenotype was to some extent reminiscent of that of FPLD2 patients. Then tNRTIs, in particular stavudine, were switched to less toxic NRTIs, and first generation PIs were replaced by second generation molecules. In general, the severe peripheral lipodystrophy was partly reversible but visceral fat accumulation persisted. A specific role for PIs in this android fat accumulation has been hypothesized. Even if there is no consensus on the question [82], several well-performed studies indicate that treatment with some PIs (atazanavir, lopinavir) boosted with ritonavir resulted in increased trunk fat [83,84].

HIV-infected patients, even well controlled for their infection, present an increased incidence of age-related comorbidities (in particular myocardial infarctions [85,86] and osteoporosis), which could suggest a process of premature senescence [81,87]. Importantly, these comorbidities were linked in priority to ART including PIs [83,86,88].

3.2. Tissue analyses: accumulation of prelamin-A

To document the hypothesis of PI-induced laminopathy, tissular studies were performed and our group initially revealed the presence of prelamin-A in abdominal subcutaneous AT from HIV-infected, PI-treated patients with lipodystrophy [49]. Prelamin-A also accumulated in peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected patients receiving PIs but not NRTIs [89]. In the Lipostop study, subcutaneous AT from HIV-infected patients was examined before and 6 months after stopping ART. PI withdrawal was associated with improved adipocyte differentiation and mitochondrial function [90]. In a comparative study between FPLD2 *LMNA*-mutated cervical subcutaneous fat and HIV-related buffalo humps, we showed that both tissues were dystrophic, with an increased percentage of small adipocytes, increased fibrosis without inflammatory features, and decreased number of blood vessels, as compared with control samples. Moreover, cervical fat from *LMNA*-mutated or PI-treated patients showed accumulation of prelamin-A, altered expression of adipogenic proteins and brown fat-like features with UCP1 overexpression and increased number of mitochondria [23]. These results stress for a role for prelamin-A in PI-induced lipodystrophy.

3.3. Modelisation of cellular alterations due to antiretrovirals

When considering the possible mechanism of antiretroviral toxicity on AT, it has been shown by the group of Coffinier that some HIV-PIs, but not all, were able to inhibit ZMPSTE24 [91–93] and, accordingly, we have shown that several PIs (indinavir, nelfinavir, ritonavir, lopinavir) induced accumulation of farnesylated prelamin A at the nuclear rim, disrupting the nuclear integrity in several cellular models [33,89,94]. Therefore, it can be hypothesized that PI-induced fat redistribution could represent an acquired form of laminopathy [49].

PIs affected almost all cell types, including adipose, vascular, muscular, and renal cells, at different levels, proliferation, differentiation, survival and/or senescence [89,95–97]. PIs also impaired major cell functions such as insulin signaling and glucose transport [95,98,99], and endothelial cell function [89,97,100].

Entrapment of farnesylated prelamin-A at the nuclear membrane induced multiple downstream effects, including the deregulation of gene expression [57,58]. In PI-treated adipocytes, expression and localization of the adipogenic transcription factors SREBP1 and PPAR γ were altered, resulting in defective adipose cell differentiation [33,94,101–103]. PI-induced prelamin-A accumulation was also associated with mitochondrial dysfunction [104], oxidative stress [49], inflammation [99,105], and activation of the senescence program [49,81,89]. Otherwise, PI-induced dysfunction could also trigger paracrine signals, indirectly affecting the cardiovascular system or the aging process [81,85].

The prevention or reversion of cellular pathological phenotypes by farnesyltransferase inhibitors or pravastatin, highlighted the implication of permanently farnesylated prelamin-A in the PI toxicity [49,57,91,106]. Consistent with these data, the effect of PIs on lamin-A maturation and the associated cellular phenotypes can be reversed following PI washout [107]. Taken as a whole these findings suggest that the inhibition of prelamin-A processing by HIV-PIs might be considered as a valuable experimental model to study prelamin-A-associated lipodystrophic diseases.

4. Lamin-B and lipodystrophies

4.1. Lamin-B2 mutations and acquired partial lipodystrophies

Acquired partial lipodystrophy (APL, or Barraquer–Simons syndrome) is characterized by a progressive lipoatrophy of face,

then upper body, affecting predominantly women, and frequently associated with auto-immune disorders, activation of the alternative complement pathway, and membranoproliferative glomerulonephritis. Five patients with APL have been reported with rare heterozygous mutations in *LMNB2*, encoding lamin-B2, a binding partner of A-type-lamins at the nuclear envelope. These mutations could be risk factors for the disease [108,109].

4.2. Non *LMNA*-linked premature aging syndromes with lipodystrophies: role of DNA damages and dysregulation of lamin-B1 expression

Non-laminopathic premature aging syndromes, linked to DNA repair defects, can also be associated with lipodystrophy and insulin resistance. It is the case for Werner syndrome due to inactivating biallelic mutations of *WRN*, a DNA helicase [110], and also for a recently described multisystem disorder due to heterozygous mutations in *POLD1*, encoding DNA polymerase delta, which cooperates with *WRN* to maintain genome stability [111]. We recently observed that *WRN*-mutated fibroblasts have an increased protein expression of lamin-B1 and present nuclear deformations similar to those observed in laminopathies [110]. These abnormalities, also reported in ataxia-telangiectasia, another genetic disease due to DNA damage signaling defects [112], could contribute to cellular senescence [113,114]. These observations are in favor of a pathophysiological link between mesenchymal cellular senescence, linked to DNA damages, and lipodystrophy.

5. Conclusions

Laminopathic lipodystrophies represent a complex phenotypic group among other syndromes of lipodystrophies. Beside the typical FPLD2, linked to the R482 substitution in lamins-A/C, other *LMNA* mutations results in complex mixed phenotypes, in particular with signs of accelerated aging, suggesting that different laminopathies share some common pathophysiological mechanisms. Accordingly, a treatment with HIV-PIs is involved in syndromes of lipodystrophy and premature aging associated with impaired prelamin-A maturation. These clinical observations have been reinforced by cellular experiments and tissular examinations, showing that lamin-A alterations could induce not only AT abnormalities, but also fragilized nuclear envelope, altered chromatin organization, impaired relationships with proteic or genomic partners, oxidative stress and premature senescence in several cellular models. Finally, if the impact of lamins-A/C alterations on adipose differentiation is not yet precisely deciphered, the studies using stem cells models will probably allow important advances in the comprehension of the lamins-A/C-regulated pathways involved in mesenchymal tissue homeostasis and the maintenance and renewal of the adult stem cells niche.

Acknowledgment

The authors are grateful to Betty Jacquin for her expert secretarial assistance.

References

- [1] Burke B, Stewart CL. The nuclear lamins: flexibility in function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:13–24.
- [2] Vigouroux C, Caron-Debarle M, Le Dour C, Magré J, Capeau J. Molecular mechanisms of human lipodystrophies: from adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:862–76.
- [3] Cao H, Hegele RA. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2000;9:109–12.

- [4] Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, et al. LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* 2000;24:153–6.
- [5] Wiltshire KM, Hegele RA, Innes AM, Brownell AK. Homozygous lamin A/C familial lipodystrophy R482Q mutation in autosomal recessive Emery Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2013;23:265–8.
- [6] Ji H, Weatherall P, Adams-Huet B, Garg A. Increased skeletal muscle volume in women with familial partial lipodystrophy, Dunnigan variety. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1410–3.
- [7] Hegele RA. Premature atherosclerosis associated with monogenic insulin resistance. *Circulation* 2001;103:2225–9.
- [8] Bidault G, Garcia M, Vantyghem MC, Ducluzeau PH, Morichon R, Thiagarajah K, et al. Lipodystrophy-linked LMNA p.R482W mutation induces clinical early atherosclerosis and in vitro endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:2162–71.
- [9] Vantyghem MC, Vincent-Desplanques D, Defrance-Faivre F, Capeau J, Feron C, Valat AS, et al. Fertility and obstetrical complications in women with LMNA-related familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2223–9.
- [10] Vigouroux C, Magré J, Vantyghem MC, Bourrut C, Lascols O, Shackleton S, et al. Lamin A/C gene: sex-determined expression of mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy and absence of coding mutations in congenital and acquired generalized lipoatrophy. *Diabetes* 2000;49:1958–62.
- [11] Vantyghem MC, Pigny P, Maurage CA, Rouaix-Emery N, Stojkovic T, Cuisset JM, et al. Patients with familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type due to a LMNA R482W mutation show muscular and cardiac abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5337–46.
- [12] Decaudain A, Vantyghem MC, Guerci B, Hecart AC, Auclair M, Reznik Y, et al. New metabolic phenotypes in laminopathies: LMNA mutations in patients with severe metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4835–44.
- [13] Dutour A, Roll P, Gaborit B, Courrier S, Alessi MC, Tregouet DA, et al. High prevalence of laminopathies among patients with metabolic syndrome. *Hum Mol Genet* 2011;20:3779–86.
- [14] Le Dour C, Schneebeli S, Bakiri F, Jeziorowska D, Reznik Y, Béréziat V, et al. A homozygous mutation of prelamin-A preventing its farnesylation and maturation leads to a severe lipodystrophic phenotype: new insights into the pathogenicity of non-farnesylated prelamin-A. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E856–62.
- [15] Mory PB, Crispim F, Freire MB, Salles JE, Valerio CM, Godoy-Matos AF, et al. Phenotypic diversity in patients with lipodystrophy associated with LMNA mutations. *Eur J Endocrinol* 2012;167:423–31.
- [16] De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, et al. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 2003;300:2055.
- [17] Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003;423:293–8.
- [18] Merideth MA, Gordon LB, Claus S, Sachdev V, Smith AC, Perry MB, et al. Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N Engl J Med* 2008;358:592–604.
- [19] Novelli G, Muchir A, Sangiuolo F, Helbling-Leclerc A, D'Apice MR, Massart C, et al. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet* 2002;71:426–31.
- [20] Agarwal AK, Fryns JP, Auchus RJ, Garg A. Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum Mol Genet* 2003;12:1995–2001.
- [21] Lelliott CJ, Logie L, Sewter CP, Berger D, Jani P, Blows F, et al. Lamin expression in human adipose cells in relation to anatomical site and differentiation state. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:728–34.
- [22] Araujo-Vilar D, Lattanzi G, Gonzalez-Mendez B, Costa-Freitas AT, Prieto D, Columbaro M, et al. Site-dependent differences in both prelamin A and adipogenic genes in subcutaneous adipose tissue of patients with type 2 familial partial lipodystrophy. *J Med Genet* 2009;46:40–8.
- [23] Béréziat V, Cervera P, Le Dour C, Verpont MC, Dumont S, Vantyghem MC, et al. LMNA mutations induce a non-inflammatory fibrosis and a brown fat-like dystrophy of enlarged cervical adipose tissue. *Am J Pathol* 2011;179:2443–53.
- [24] Vigouroux C, Auclair M, Dubosclard E, Pouchelet M, Lépante S, Capeau J, et al. Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in lamin A/C gene. *J Cell Sci* 2001;114:4459–68.
- [25] Favreau C, Dubosclard E, Ostlund C, Vigouroux C, Capeau J, Wehnert M, et al. Expression of lamin A mutated in the carboxyl-terminal tail generates an aberrant nuclear phenotype similar to that observed in cells from patients with Dunnigan-type partial lipodystrophy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Exp Cell Res* 2003;282:14–23.
- [26] Muchir A, Medioni J, Laluc M, Massart C, Arimura T, van der Kooij AJ, et al. Nuclear envelope alterations in fibroblasts from patients with muscular dystrophy, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy carrying lamin A/C gene mutations. *Muscle Nerve* 2004;30:444–50.
- [27] Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, et al. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8963–8.
- [28] Krimm I, Ostlund C, Gilquin B, Couprie J, Hossenlopp P, Mornon JP, et al. The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure (Camb)* 2002;10(6):811–23.
- [29] Dhe-Paganon S, Werner ED, Chi YI, Shoelson SE. Structure of the globular tail of nuclear lamin. *J Biol Chem* 2002;18:18.
- [30] Rajendran V, Purohit R, Sethumadhavan R. In silico investigation of molecular mechanism of laminopathy caused by a point mutation (R482W) in lamin A/C protein. *Amino Acids* 2012;43:603–15.
- [31] Wilson KL, Foisner R. Lamin-binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a000554.
- [32] Lloyd DJ, Trembath RC, Shackleton S. A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet* 2002;11:769–77.
- [33] Caron M, Auclair M, Sterlingot H, Kornprobst M, Capeau J. Some HIV protease inhibitors alter lamin A/C maturation and stability, SREBP-1 nuclear localization and adipocyte differentiation. *AIDS* 2003;17:2437–44.
- [34] Capanni C, Mattioli E, Columbaro M, Lucarelli E, Parnaik VK, Novelli G, et al. Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2005;14:1489–502.
- [35] Duband-Goulet I, Woerner S, Gasparini S, Attanda W, Konde E, Tellier-Lebegue C, et al. Subcellular localization of SREBP1 depends on its interaction with the C-terminal region of wild-type and disease related A-type lamins. *Exp Cell Res* 2011;317:2800–13.
- [36] Simon DN, Domaradzki T, Hofmann WA, Lamin Wilson KL. A tail modification by SUMO1 is disrupted by familial partial lipodystrophy-causing mutations. *Mol Biol Cell* 2013;24:342–50.
- [37] Ruiz de Eguino G, Infante A, Schlangen K, Aransay AM, Fullaondo A, Soriano M, et al. Sp1 transcription factor interaction with accumulated prelamin A impairs adipose lineage differentiation in human mesenchymal stem cells: essential role of sp1 in the integrity of lipid vesicles. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:309–21.
- [38] Oldenburg AR, Delbarre E, Thiede B, Vigouroux C, Collas P. Deregulation of Fragile X-related protein 1 by the lipodystrophic lamin A p.R482W mutation elicits a myogenic gene expression program in preadipocytes. *Hum Mol Genet* 2013 [Epub ahead of print].
- [39] Dorner D, Gotzmann J, Foisner R. Nucleoplasmic lamins and their interaction partners, LAP2alpha, Rb, and BAF, in transcriptional regulation. *FEBS J* 2007;274:1362–73.
- [40] Montes de Oca R, Andreassen PR, Wilson KL. Barrier-to-Autointegration Factor influences specific histone modifications. *Nucleus* 2011;2:580–90.
- [41] Capanni C, Squarzone S, Cenni V, D'Apice MR, Gambineri A, Novelli G, et al. Familial partial lipodystrophy, mandibuloacral dysplasia and restrictive dermopathy feature barrier-to-autointegration factor (BAF) nuclear redistribution. *Cell Cycle* 2012;11:3568–77.
- [42] Johnson BR, Nitta RT, Frock RL, Mounkes L, Barbie DA, Stewart CL, et al. A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9677–82.
- [43] Classon M, Kennedy BK, Mulloy R, Harlow E. Opposing roles of pRB and p107 in adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10826–31.
- [44] Hansen JB, Jorgensen C, Petersen RK, Hallenborg P, De Matteis R, Boye HA, et al. Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4112–7.
- [45] Dorner D, Vlcek S, Foeger N, Gajewski A, Makolm C, Gotzmann J, et al. Lamina-associated polypeptide 2alpha regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *J Cell Biol* 2006;173:83–93.
- [46] Yang L, Munck M, Swaminathan K, Kapinos LE, Noegel AA, Neumann S. Mutations in LMNA modulate the lamin A – Nesprin-2 interaction and cause LINC complex alterations. *PLoS One* 2013;8:e71850.
- [47] Lammerding J, Schulze PC, Takahashi T, Kozlov S, Sullivan T, Kamm RD, et al. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest* 2004;113:370–8.
- [48] Yang W, Thein S, Wang X, Bi X, Ericksen RE, Xu F, et al. BCL2/seipin regulates adipogenesis through actin cytoskeleton remodeling. *Hum Mol Genet* 2014;23:502–13.
- [49] Caron M, Auclair M, Donadille B, Béréziat V, Guerci B, Laville M, et al. Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ* 2007;14:1759–67.
- [50] Pendas AM, Zhou Z, Cadinanos J, Freije JM, Wang J, Hulthenby K, et al. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet* 2002;31:94–9.
- [51] Liu B, Wang J, Chan KM, Tjia WM, Deng W, Guan X, et al. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med* 2005;11:780–5.
- [52] Richards SA, Muter J, Ritchie P, Lattanzi G, Hutchison CJ. The accumulation of un-repairable DNA damage in laminopathy progeria fibroblasts is caused by ROS generation and is prevented by treatment with N-acetyl cysteine. *Hum Mol Genet* 2011;20:3997–4004.
- [53] Scalfidi P, Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 2006;312:1059–63.
- [54] Ragnauth CD, Warren DT, Liu Y, McNair R, Tajsic T, Figg N, et al. Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation* 2010;121:2200–10.
- [55] Cao K, Blair CD, Faddah DA, Kieckhafer JE, Olive M, Erdos MR, et al. Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *J Clin Invest* 2011;121:2833–44.

- [56] Pekovic V, Gibbs-Seymour I, Markiewicz E, Alzoghbi F, Benham AM, Edwards R, et al. Conserved cysteine residues in the mammalian lamin A tail are essential for cellular responses to ROS generation. *Aging Cell* 2011;10:1067–79.
- [57] Capell BC, Erdos MR, Madigan JP, Fiordalisi JJ, Varga R, Conneely KN, et al. Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12879–84.
- [58] Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suarez MF, Cau P, et al. Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med* 2008;14:767–72.
- [59] Verstraeten VL, Caputo S, van Steensel MA, Duband-Goulet I, Zinn-Justin S, Kamps M, et al. The R439C mutation in LMNA causes lamin oligomerization and susceptibility to oxidative stress. *J Cell Mol Med* 2009;13:959–71.
- [60] Naito M, Omoteyama K, Mikami Y, Takagi M, Takahashi T. Suppression of lamin A/C by short hairpin RNAs promotes adipocyte lineage commitment in mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26. *Histochem Cell Biol* 2012;137:235–47.
- [61] Boguslavsky RL, Stewart CL, Worman HJ. Nuclear lamin A inhibits adipocyte differentiation: implications for Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2006;15:653–63.
- [62] Wojtanik KM, Edgemon K, Viswanadha S, Lindsey B, Haluzik M, Chen W, et al. The role of LMNA in adipose: a novel mouse model of lipodystrophy based on the Dunnigan-type familial partial lipodystrophy mutation. *J Lipid Res* 2009;50:1068–79.
- [63] Guelen L, Pagie L, Brasset E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W, et al. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 2008;453:948–51.
- [64] Mattout A, Goldberg M, Tzur Y, Margalit A, Gruenbaum Y. Specific and conserved sequences in *D. melanogaster* and *C. elegans* lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes. *J Cell Sci* 2007;120:77–85.
- [65] Stierlé V, Couprie J, Ostlund C, Krimm I, Zinn-Justin S, Hossenlopp P, et al. The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry* 2003;42:4819–28.
- [66] Meaburn KJ, Cabuy E, Bonne G, Levy N, Morris GE, Novelli G, et al. Primary laminopathy fibroblasts display altered genome organization and apoptosis. *Aging Cell* 2007;6:139–53.
- [67] Filesi I, Gullotta F, Lattanzi G, D'Apice MR, Capanni C, Nardone AM, et al. Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiol Genomics* 2005;23:150–8.
- [68] Van Bortle K, Corces VG. Spinning the web of cell fate. *Cell* 2013;152:1213–7.
- [69] Rober RA, Weber K, Osborn M. Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development* 1989;105:365–78.
- [70] Stewart C, Burke B. Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell* 1987;51:383–92.
- [71] Eckersley-Maslin MA, Bergmann JH, Lazar Z, Spector DL. Lamin A/C is expressed in pluripotent mouse embryonic stem cells. *Nucleus* 2013;4:53–60.
- [72] Melcer S, Hezroni H, Rand E, Nissim-Rafinia M, Skoultchi A, Stewart CL, et al. Histone modifications and lamin A regulate chromatin protein dynamics in early embryonic stem cell differentiation. *Nat Commun* 2012;3:910.
- [73] Lund E, Oldenburg AR, Delbarre E, Freberg CT, Duband-Goulet I, Eskeland R, et al. Lamin A/C-promoter interactions specify chromatin state-dependent transcription outcomes. *Genome Res* 2013;23:1580–9.
- [74] Xiong ZM, LaDana C, Wu D, Cao K. An inhibitory role of progerin in the gene induction network of adipocyte differentiation from iPS cells. *Aging (Albany NY)* 2013;5:288–303.
- [75] Gotzmann J, Foisner R. A-type lamin complexes and regenerative potential: a step towards understanding laminopathic diseases. *Histochem Cell Biol* 2006;125:33–41.
- [76] Pekovic V, Hutchison CJ. Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: the role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches. *J Anat* 2008;213:5–25.
- [77] Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat Cell Biol* 2008;10:452–9.
- [78] Tilgner K, Wojciechowicz K, Jahoda C, Hutchison C, Markiewicz E. Dynamic complexes of A-type lamins and emerin influence adipogenic capacity of the cell via nucleocytoplasmic distribution of beta-catenin. *J Cell Sci* 2009;122:401–13.
- [79] Manolagas SC, Almeida M. Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. *Mol Endocrinol* 2007;21:2605–14.
- [80] Andres V, Gonzalez JM. Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J Cell Biol* 2009;187:945–57.
- [81] Caron-Debarle M, Lagathu C, Bocca F, Vigouroux C, Capeau J. HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol Med* 2010;16:218–29.
- [82] de Waal R, Cohen K, Maartens G. Systematic review of antiretroviral-associated lipodystrophy: lipodystrophy, but not central fat gain, is an antiretroviral adverse drug reaction. *PLoS One* 2013;8:e63623.
- [83] McCormsey GA, Kitch D, Sax PE, Tebas P, Tierney C, Jahed NC, et al. Peripheral and central fat changes in subjects randomized to abacavir-lamivudine or tenofovir-emtricitabine with atazanavir-ritonavir or efavirenz: ACTG Study A5224s. *Clin Infect Dis* 2011;53:185–96.
- [84] Curran A, Martinez E, Saumoy M, del Rio L, Crespo M, Larrousse M, et al. Body composition changes after switching from protease inhibitors to raltegravir: SPIRAL-LIP substudy. *AIDS* 2012;26:475–81.
- [85] Bocca F, Lang S, Meuleman C, Ederhy S, Mary-Krause M, Costagliola D, et al. HIV and coronary heart disease: time for a better understanding. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:511–23.
- [86] Lang S, Mary-Krause M, Simon A, Partisani M, Gilquin J, Cotte L, et al. HIV replication and immune status are independent predictors of the risk of myocardial infarction in HIV-infected individuals. *Clin Infect Dis* 2012;55:600–7.
- [87] Capeau J. Premature aging and premature age-related comorbidities in HIV-infected patients: facts and hypotheses. *Clin Infect Dis* 2011;53:1127–9.
- [88] Hernandez-Vallejo SJ, Beaupere C, Larghero J, Capeau J, Lagathu C. HIV protease inhibitors induce senescence and alter osteoblastic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells: beneficial effect of pravastatin. *Aging Cell* 2013;12:955–65.
- [89] Lefèvre C, Auclair M, Bocca F, Bastard JP, Capeau J, Vigouroux C, et al. Premature senescence of vascular cells is induced by HIV protease inhibitors: implication of prelamin A and reversion by statin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:2611–20.
- [90] Kim MJ, Leclercq P, Lanoy E, Cervera P, Antuna-Puente B, Maachi M, et al. A 6-month interruption of antiretroviral therapy improves adipose tissue function in HIV-infected patients: the ANRS EP29 Lipostop Study. *Antivir Ther* 2007;12:1273–83.
- [91] Coffinier C, Hudon SE, Farber EA, Chang SY, Hrycyna CA, Young SG, et al. HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13432–7.
- [92] Hudon SE, Coffinier C, Michaelis S, Fong LG, Young SG, Hrycyna CA. HIV-protease inhibitors block the enzymatic activity of purified Ste24p. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374:365–8.
- [93] Goulbourne CN, Vaux DJ. HIV protease inhibitors inhibit FACE1/ZMPSTE24: a mechanism for acquired lipodystrophy in patients on highly active antiretroviral therapy. *Biochem Soc Trans* 2010;38:292–6.
- [94] Caron M, Auclair M, Vigouroux C, Glorian M, Forest C, Capeau J. The HIV protease inhibitor indinavir impairs sterol regulatory element-binding protein-1 intranuclear localization, inhibits preadipocyte differentiation, and induces insulin resistance. *Diabetes* 2001;50:1378–88.
- [95] Murata H, Hruz PW, Mueckler M. Indinavir inhibits the glucose transporter isoform Glut4 at physiologic concentrations. *AIDS* 2002;16:859–63.
- [96] Vidal F, Domingo JC, Guallar J, Saumoy M, Cordobilla B, Sanchez de la Rosa R, et al. In vitro cytotoxicity and mitochondrial toxicity of tenofovir alone and in combination with other antiretrovirals in human renal proximal tubule cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3824–32.
- [97] Wang X, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C. Roles and mechanisms of human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir and other anti-human immunodeficiency virus drugs in endothelial dysfunction of porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *Am J Pathol* 2009;174:771–81.
- [98] Rudich A, Vanounou S, Riesenberger K, Porat M, Tirosh A, Harman-Boehm I, et al. The HIV protease inhibitor nelfinavir induces insulin resistance and increases basal lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 2001;50:1425–31.
- [99] Lagathu C, Kim M, Maachi M, Vigouroux C, Cervera P, Capeau J, et al. HIV antiretroviral treatment alters adipokine expression and insulin sensitivity of adipose tissue in vitro and in vivo. *Biochimie* 2005;87:65–71.
- [100] Conklin BS, Fu W, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. HIV protease inhibitor ritonavir decreases endothelium-dependent vasorelaxation and increases superoxide in porcine arteries. *Cardiovasc Res* 2004;63:168–75.
- [101] Bastard JP, Caron M, Vidal H, Jan V, Auclair M, Vigouroux C, et al. Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipotrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet* 2002;359:1026–31.
- [102] Caron M, Vigouroux C, Bastard J-P, Capeau J. Adipocyte dysfunction in response to antiretroviral therapy: clinical, tissue and in-vitro studies. *Curr Opin HIV AIDS* 2007;2:268–73.
- [103] Caron M, Vigouroux C, Bastard JP, Capeau J. Antiretroviral-related adipocyte dysfunction and lipodystrophy in HIV-infected patients: Alteration of the PPARgamma-dependent pathways. *PPAR Res* 2009;2009:507141.
- [104] Viengchareun S, Caron M, Auclair M, Kim MJ, Frachon P, Capeau J, et al. Mitochondrial toxicity of indinavir, stavudine and zidovudine involves multiple cellular targets in white and brown adipocytes. *Antivir Ther* 2007;12:919–29.
- [105] Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, Bastard JP, et al. Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir Ther* 2007;12:489–500.
- [106] Capell BC, Olive M, Erdos MR, Cao K, Faddah DA, Tavarez UL, et al. A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:15902–7.
- [107] Liu Q, Kim DI, Syme J, LuValle P, Burke B, Roux KJ. Dynamics of lamin-A processing following precursor accumulation. *PLoS One* 2010;5:e10874.
- [108] Hegele RA, Cao H, Liu DM, Costain GA, Charlton-Menys V, Rodger NW, et al. Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. *Am J Hum Genet* 2006;79:383–9.

- [109] Gao J, Li Y, Fu X, Luo X. A Chinese patient with acquired partial lipodystrophy caused by a novel mutation with LMNB2 gene. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012;25:375–7.
- [110] Donadille B, D'Anella P, Auclair M, Uhrhammer N, Sorel M, Grigorescu R, et al. Partial lipodystrophy with severe insulin resistance and adult progeria Werner syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:106.
- [111] Weedon MN, Ellard S, Prindle MJ, Caswell R, Allen HL, Oram R, et al. An in-frame deletion at the polymerase active site of POLD1 causes a multisystem disorder with lipodystrophy. *Nat Genet* 2013;45:947–50.
- [112] Barascu A, Le Chalony C, Pennarun G, Genet D, Imam N, Lopez B, et al. Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J* 2012;31:1080–94.
- [113] Hutchison CJ. B-type lamins and their elusive roles in metazoan cell proliferation and senescence. *EMBO J* 2012;31:1058–9.
- [114] Dreesen O, Chojnowski A, Ong PF, Zhao TY, Common JE, Lunny D, et al. Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence. *J Cell Biol* 2013;200:605–17.