

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	IV
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	XI
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
<i>1.1 Le VIH</i>	<i>1</i>
1.1.1 Historique	1
1.1.1.1 Émergence d'un nouveau mal	1
1.1.1.2 Identification de l'agent causal.....	1
1.1.1.3 État actuel de l'épidémie du VIH	3
1.1.2 Rétrovirus	4
1.1.2.1 Structure et composantes	4
1.1.2.2 Cycle viral : infection et réplication	7
1.1.2.3 Transmission	8
1.1.2.4 Groupes de VIH-1	10
<i>1.2 Le SIDA</i>	<i>12</i>
1.2.1 Le stade SIDA.....	12
1.2.2 Prise en charge	13
1.2.3 Maladie incurable.....	14
1.2.3.1 Virus hors d'atteinte	14
1.2.3.2 Patient de Berlin	15
<i>1.3 Les facteurs de restriction du VIH-1</i>	<i>16</i>
1.3.1 Facteurs de restriction.....	16
1.3.2 Facteurs de restriction et VIH-1	17
1.3.2.1 IFITM.....	18
1.3.2.2 APOBEC3G	18
1.3.2.3 SAMHD1	19

1.3.2.4	Mx2.....	19
1.3.2.5	TRIM22.....	20
1.3.2.6	SLFN11.....	20
1.3.2.7	MARCH8.....	20
1.3.2.8	SERINC5.....	21
1.3.2.9	Tétherine.....	21
1.3.2.10	TRIM5 α	22
1.4	<i>Édition génomique</i>	27
1.4.1	Thérapie génique et édition génomique.....	27
1.4.2	Outils moléculaires.....	29
1.4.2.1	Zinc Fingers Nucleases (ZFNs).....	30
1.4.2.2	TALENs.....	31
1.4.2.3	CRISPR.....	32
1.4.3	Difficultés des outils moléculaires.....	34
1.5	<i>Problématique et objectifs de recherche</i>	34
1.5.1	Objectif 1 : augmenter l'action de facteurs de restriction envers le VIH-1.....	34
1.5.2	Objectif 2 : inhibition de la latence du VIH-1.....	35
CHAPITRE II		
EDITING OF HUMAN TRIM5 GENE TO INTRODUCE MUTATIONS WITH THE POTENTIAL TO INHIBIT HIV-1.		
37		
2.1	<i>Contribution des auteurs</i>	37
2.2	<i>Résumé de l'article</i>	38
2.3	<i>Article complet : Editing of the Human TRIM5 Gene to Introduce Mutations with the Potential to Inhibit HIV-1</i>	39
CHAPITRE III		
INHIBITION DE LA LATENCE DU VIH-1 : UNE POSSIBLE FONCTION DU FACTEUR DE RESTRICTION TRIM5A.....		
62		
3.1	<i>Contribution des auteurs</i>	62
3.2	<i>Résumé du projet</i>	62
3.3	<i>Introduction</i>	64
3.4	<i>Matériel et méthode</i>	64
3.5	<i>Résultats</i>	67

3.6	<i>Discussion</i>	71
CHAPITRE IV		
DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION		72
4.1	<i>Approches thérapeutiques VIH-1</i>	72
4.1.1	Cure fonctionnelle.....	72
4.1.2	Cure stérilisante.....	74
4.1.3	Portée du projet de maîtrise	76
4.2	<i>Perspectives du projet d'édition génomique</i>	77
4.2.1	Méthodes de livraison du matériel d'édition génomique	78
4.2.2	Augmenter l'efficacité de l'édition génomique	81
4.2.2.1	Amélioration de la HDR	81
4.2.2.2	Importance de l'homozygotie.....	82
4.2.2.3	Alternative à Cas9	83
4.3	<i>Perspective du projet sur l'inhibition de la latence du VIH-1</i>	85
4.4	<i>Conclusion</i>	86
RÉFÉRENCES		88
ANNEXE A		
RÉSULTATS D'INFECTION NON-MONTRÉS		109

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Représentation de l'origine du VIH.....	3
1.2	Génome viral du VIH-1.....	4
1.3	Structure et composantes d'un virion VIH-1.....	5
1.4	Représentation schématique des trois précurseurs du VIH-1.....	6
1.5	Phases tardives du cycle viral.....	8
1.6	Classification des groupes de VIH selon leur capacité à inhiber la protéine tétherine, à partir de leurs origines simiennes.....	11
1.7	Les différents facteurs de restriction du VIH-1 et leur cible d'action..	17
1.8	Structure de la protéine TRIM5 α	22
1.9	Modélisation du domaine PRYSPRY de TRIM5.....	23
1.10	Processus de restriction de l'infection par TRIM5 α	24
1.11	Mutations R332 et R335 de huTRIM5 α	26
1.12	Restriction du VIH-1 par huTRIM5 α R332G-R335G.....	27
1.13	Procédé de réparation de l'ADN dirigée par homologie.....	29
1.14	ZFNs.....	30
1.15	TALENs.....	31
1.16	Adaptation du système CRISPR-Cas9 bactérien en outil moléculaire.....	33
3.1	Schématisme de la méthodologie.....	66
3.2	Clonage du gène DsRed à la place du gène GFP dans la construction plasmidique NL4.3.....	67
3.3	Schématisme des résultats attendus lors de l'analyse par cytométrie en flux.....	68
3.4	La restriction de VIH-1-NL4.3-DsRed par huTRIM5 α R332G-R335G est associée à une réactivation du provirus latent VIH-1-GFP.....	69

3.5	La réactivation du provirus VIH-1-GFP latent médiée par la restriction de VIH-1-NL4.3-DsRed par huTRIM5 α R332G-R335G est dépendante de la voie d'activation de l'immunité innée TAK-1....	70
4.1	Schéma représentant les 3 différentes nucléases	84
5.1	Capacité de restriction de différents rétrovirus des 10 clones ayant subi une édition génomique de <i>TRIM5</i>	110
5.2	Capacité de restriction de différents rétrovirus des 10 clones ayant subi une édition génomique de <i>TRIM5</i> après traitement à l'IFN-I.	111

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

AacC2c1	C2c1 des <i>Alicyclobacillus</i>
AAV	Virus associé aux adénovirus
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADCVI	Inhibition virale cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	« Activator Protein 1 »
APOBEC3	« Apolipoprotein B editing complex 3 »
ARN	Acide ribonucléique
ARNg	ARN guide (gRNA en anglais)
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
AsCpf1	Cpf1 des <i>Acidamonococcus</i>
B-MLV	Virus de leucémie murine B-tropique
bNAbs	Anticorps neutralisant à large spectre
BST2	« Bone marrow stromal cell antigen-2 », nom alternatif de tétherine
C2c1	Nucléase, aussi appelée Cas12b
CA	Protéine de la capsid du VIH-1, aussi appelée p24
Cas	Nucléase « CRISPR associated protein »
Cas9	Protéine associée à CRISPR #9
Cas9n	Enzyme Cas9 nickase
CCR5 Δ 32	Délétion de 32 pb dans le gène CCR5
CDC	« Centers for Disease Control of United States »

Cpf1	Nucléase retrouvée chez <i>Francisella novicida</i> , aussi appelée Cas12a
CPP	Peptides pénétrant dans la cellule (« Cell-penetrating peptide »)
CRISPR	Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées
CROI	Conférence sur les rétrovirus et les infections opportunistes
crRNA	ARN de CRISPR
CypA	Cyclophiline A
dCA	Didéhydro-cortistatine A
dCas9	Enzyme Cas9 catalytiquement inactive
dNTPase	Enzyme qui clive les dNTPs
dNTPs	Désoxyribonucléotides
DR	Répétitions directes
DSB	Coupure double-brin de l'ADN
EIAV	Virus de l'anémie infectieuse équine
<i>env</i>	Gène viral « envelope gene »
FACS	« Fluorescence-activated cell sorting », un type de cytométrie en flux
FBS	Sérum bovin fœtal
FokI	Enzyme de restriction de <i>Flavobacterium okeanoikoites</i>
<i>gag</i>	Gène viral « group specific antigens »
GALT	Tissu lymphoïde associé au tube digestif
GFP	Gène rapporteur de fluorescence verte
GRID	« gay-related immunodeficiency », c.-à-d. l'immunodéficience associée aux homosexuels
HDAC	inhibiteur d'histone déacétylase
HDR	Réparation dirigée par homologie

HEK293T	« Human Embryonic Kidney 293 T », des cellules rénales embryonnaires humaines exprimant l'antigène grand T du virus SV40
HPCs	Cellules progénitrices hématopoïétiques
huT5GG	Forme humaine de TRIM5 α , version mutante R332G-R335G
huT5WT	Forme humaine de TRIM5 α , version sauvage
huTRIM5 α	Forme humaine du facteur de restriction TRIM5 α
IFN-I	Interféron de type I
IFN- α	Interféron de type I alpha
IFN- β	Interféron de type I bêta
IFN- ω	Interféron de type I oméga
IFTIM1	« Interferon-induced transmembrane 1 »
IN	Enzyme intégrase
Indel	Insertion ou délétion lors de la réparation de l'ADN
ISG	Gène stimulé à l'interféron
K63	Lysine en position 63
kB	Kilopaires de base, unité de mesure de l'ADN
LAV	Virus de lymphadénopathie
LbCpf1	Cpf1 des <i>Lachnospiraceae</i>
LMA	Leucémie myéloïde aigüe
LN	Nœud lymphatique
LRA	Agents renversant la latence, « latency reversal agent »
LTR	Séquence terminale longue répétée, « Long terminal repeat sequence »
MA	Protéine de la matrice du VIH-1, aussi appelée p17
MARCH8	« Membrane-Associated RING-CH8 »
MW	Poids moléculaire

Mx2	« IFN-induced Myxovirus resistance 2 »
N-MLV	Virus de leucémie murine N-tropique
NC	Protéine de la nucléocapside du VIH-1, aussi appelée p7
Nef	Protéine virale « negative factor »
NF- κ B	« Nuclear factor kappa B »
NHEJ	Jonction d'extrémité non-homologue
NK	Cellules « natural killer » du système immunitaire
ODN	Oligonucléotide d'ADN
OMS	Organisation mondiale de la Santé (WHO en anglais)
PAM	Motif adjacent au protospacer
PAMP	Motif moléculaire associé à un pathogène
PBS	Tampon salin phosphate
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PEP	Traitement post-exposition au VIH-1
PKC	Protéine kinase C
<i>pol</i>	Gène viral « polymerase gene »
PR	Enzyme protéase
PrEP	Prophylaxie pré-exposition
Rev	Protéine virale « regulatory of viral protein expression »
rhTRIM5 α	Forme macaque rhésus du facteur de restriction TRIM5 α
RING	« Really Interesting New Gene », domaine protéique à action E3 ubiquitine ligase
RNP	Complexe ribonucléoprotéique
RPMI	Milieu de culture cellulaire Roswell Park Memorial Institute
RT	Enzyme réverse transcriptase

SAMHD1	« Sterile Alpha Motif and Histidine-aspartate Domain containing protein 1 »
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SLFN11	« Schlafen family of mouse and human proteins #11 »
SpCas9	Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i>
ssODN	Oligonucléotide d'ADN simple brin
TAK-1	« Transforming growth factor beta-activated kinase 1»
TALE	« Transcription activator-like effector »
TALEN	« Transcription activator-like effector nuclease »
Tar	Élément de réponse à la trans-activation
TAR	Traitement antirétroviral (ART en anglais)
Tat	Protéine virale « trans-activator of transcription»
Tcm	Lymphocytes T mémoires centrales
THP-1-gag _{zip} -GFP	Lignée cellulaire monocyttaire de latence du VIH-1
tracrRNA	ARN transactivateur de CRISPR
TRIM	Protéine à motif tripartite
TRIM22	Protéine à motif tripartite #22
TRIM5 α	Protéine à motif tripartite #5 isoforme alpha
TRIMCyp	Protéine TRIM retrouvée chez les singes hiboux
Ttm	Lymphocytes T mémoires transitionnelles
UBC13	« Ubiquitin-conjugating enzyme E2 13 »
UEV1A	« Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1A »
Vif	Protéine virale « virion infectivity factor »
VIH-1	Virus d'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1 en anglais)
VIH-2	Virus d'immunodéficience humaine de type 2 (HIV-2 en anglais)
VIS	Virus d'immunodéficience simienne (SIV en anglais)

VIScpz	VIS de chimpanzés
VIScpzPtt	VIS de chimpanzé de l'espèce <i>Pan troglodytes troglodytes</i>
VISgor	VIS de gorilles
VISgsn	VIS de <i>Cercopithecus nictitans</i>
VISmac	VIS de <i>Macaca mulatta</i>
VISmon	VIS de <i>Cercopithecus mona</i>
VISmus	VIS de <i>Cercopithecus cephus</i>
VISrcm	VIS de Mangabey à collier blanc
VISssm	VIS de Sooty mangabeys d'Afrique
Vpr	Protéine virale R
Vpu	Protéine virale U
VSV-G	Protéine G du virus de la stomatite vésiculaire
ZFN	Nucléase à doigts de zinc

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le VIH

1.1.1 Historique

1.1.1.1 Émergence d'un nouveau mal

Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) a fait son apparition dans la communauté scientifique il y a maintenant plus de trente ans, soit en 1981, alors que le United States Centers for Disease Control (CDC) publiait un rapport décrivant la curieuse condition médicale de cinq jeunes hommes âgés de 29 et 36 ans à Los Angeles. Ces cinq hommes, ayant des pratiques homosexuelles, étaient atteints d'une pneumonie causée par *Pneumocystis carinii*, souffraient de candidose en plus d'être infectés par le cytomégalovirus, trois maladies opportunistes plutôt rares chez les adultes ((s.a.), 1981). Après la publication de ce rapport, le nombre de cas répertoriés a drastiquement augmenté, tant à Los Angeles qu'ailleurs aux États-Unis. De façon alarmante, près de la moitié de ces cas décédaient dans les mois suivant le diagnostic. Au niveau biologique, il fut constaté que tous ces jeunes gens souffraient d'une chute spectaculaire de leur nombre de lymphocytes T CD4+, un type cellulaire au cœur de l'immunité adaptative (Owen *et al.*, 2013). On baptisa cette pathologie SIDA, bien que certains la nommèrent plutôt GRID (gay-related immunodeficiency) puisqu'alors elle n'affectait que des membres de la communauté gaie.

1.1.1.2 Identification de l'agent causal

Cela prit près de 2 ans pour que la cause de cette immunodéficience acquise soit identifiée. Il s'agissait d'un virus, d'abord nommé LAV (virus de lymphadénopathie) par Luc Montagnier et son équipe (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983), puis rebaptisé en 1986 VIH

(virus d'immunodéficience humaine, ou HIV en anglais) (Case, 1986). Nous savons aujourd'hui que ce virus se transmet par le sang et lors de relations sexuelles non protégées, qu'elles soient homosexuelles ou hétérosexuelles. En 1986, alors qu'on ignorait toujours l'origine du VIH, un second virus causant également le SIDA fut découvert dans l'ouest de l'Afrique (Sharp & Hahn, 2011). Ce nouveau virus, bien que morphologiquement semblable au VIH, n'affichait pas les mêmes antigènes que ce dernier. On le nomma VIH-2, et son prédécesseur VIH-1. On constata que le VIH-2 avait plusieurs ressemblances avec le VIS (virus d'immunodéficience simienne, ou SIV en anglais) retrouvé chez les macaques, un primate vivant en Asie. Sur le plan phylogénétique, le VIH-2 découlerait d'une adaptation du VIS non pathogénique des singes Sooty mangabey d'Afrique (VISmm) (Hirsch *et al.*, 1989), adaptation qui lui a permis de franchir la barrière inter-espèce. Le VIH-2 est présent presque exclusivement dans l'ouest de l'Afrique, majoritairement au Sénégal et en Guinée-Bissau : il diffère du VIH-1 par une plus faible charge virale et par le fait que la plupart des gens infectés ne développeront pas le stade SIDA au cours de leur vie (Sharp & Hahn, 2011).

Néanmoins, le mystère persista plusieurs années quant à l'origine du VIH-1. C'est en 1989 que se fait la première identification d'un VIS chez un chimpanzé né en nature au Gabon (VIScpz-gab1) (Pepin, 2011). Ses ressemblances phylogéniques avec le VIH-1 furent le premier indice de l'origine de ce dernier. Plusieurs analyses d'échantillons et études phylogéniques (figure 1.1) ont permis de déterminer l'évolution des différents VIS, et de conclure que le VIScpz proviendrait d'une recombinaison entre deux lignées de VIS, soit celui du mangabey à collier blanc (VISrcm) et du VIS infectant la famille *Cercopithecus* (VISgsn du *C. nictitans*, VISmus du *C. cephus* et VISmon du *C. mona*) (Sharp & Hahn, 2011). La raison la plus probable de cette recombinaison découle du fait que les chimpanzés se nourrissent entre autres de plus petits singes, les mettant donc en contact direct avec le sang infecté par le VIS de ceux-ci. Il faut néanmoins attendre jusqu'en 2008 pour que Keele *et coll.* démontrent sans équivoque que le VIH-1 proviendrait en fait d'une adaptation du VIS trouvé chez les chimpanzés (VIScpz) (Keele *et al.*, 2008).

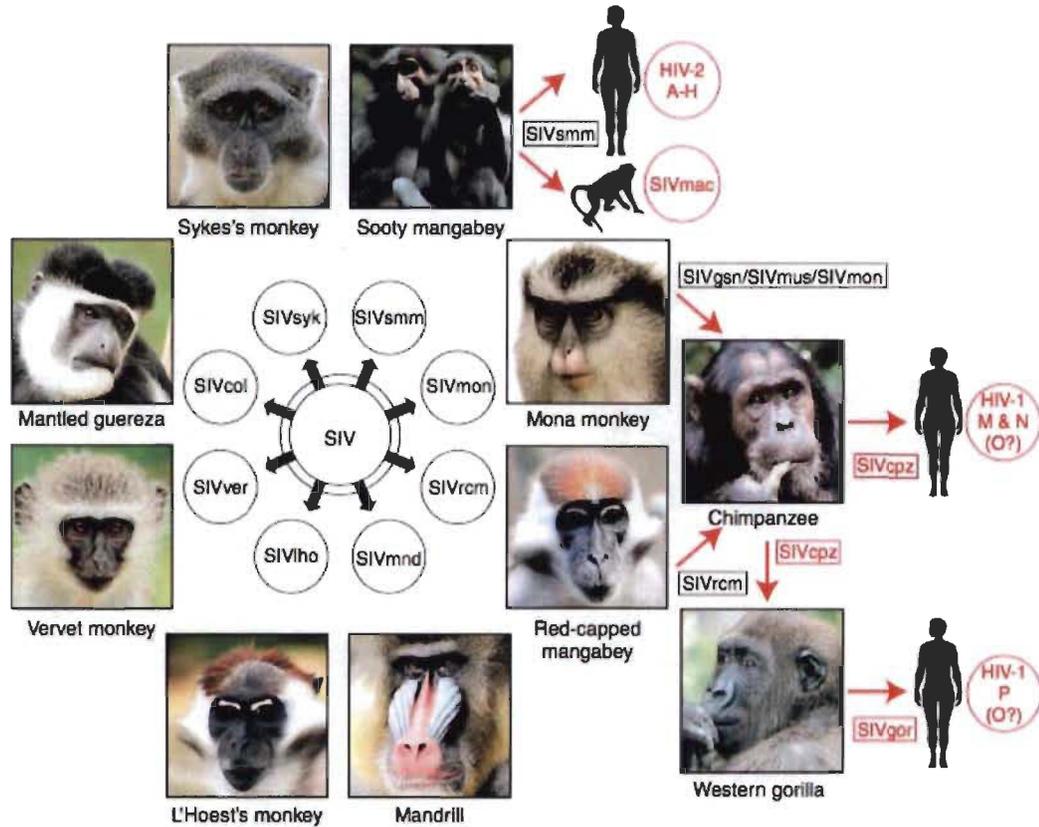


Figure 1.1 Représentation de l'origine du VIH.

Le VIH dérive du virus d'immunodéficience simienne (VIS), retrouvé chez plusieurs espèces différentes de singe. Les groupes M et N de VIH-1 proviennent d'une adaptation du VIS de chimpanzés. Le groupe P de VIH-1 est issu du VIS de gorille, qui est lui-même une dérive du VIS de chimpanzés. Le VIS de singes Sooty mangabey est pour sa part à l'origine du VIH-2 ainsi que du VIS de macaque. (Sharp & Hahn, 2011)

1.1.1.3 État actuel de l'épidémie du VIH

Selon les informations fournies par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), en 2016, on dénombrait 36,7 millions de personnes dans le monde aux prises avec une infection au VIH, que ce soit de type 1 ou de type 2 (World Health Organization, 2017). La majorité des cas de VIH se retrouvent en Afrique (25,6 millions de personnes). Également en date de 2016, on estime que près de 53 % des gens infectés mondialement sont sous traitement antirétroviral (TAR). On évalue que seulement 70 % des sujets VIH+ connaissent leur statut de porteur. Néanmoins, depuis le début du XXI^e siècle, l'OMS a constaté une diminution du nombre de nouvelles infections de 39 %, soit 1,8

million de nouveaux cas entre janvier et décembre 2016, et que le nombre de décès a régressé d'un tiers, pour s'élever à 1 million pour cette même année. Au Canada, en 2011, un TAR annuel coûtait près de 13 000 \$, et les frais totaux de la prise en charge des soins de santé s'élevaient à un peu plus de 22 000 \$ par an pour un sujet en phase SIDA (Kingston-Riechers, 2011). Néanmoins, l'espérance de vie au Canada d'une personne séropositive sous TAR a atteint 59 ans en 2011 (Kingston-Riechers, 2011).

1.1.2 Rétrovirus

1.1.2.1 Structure et composantes

Le VIH est un virus à ARN simple brin enveloppé (Kartikeyan *et al.*, 2007) appartenant à la famille des rétrovirus. Son génome (figure 1.2) se trouve sous la forme d'un segment de 9,8 kB d'ARN, en deux copies identiques non complémentaires (Levy, 1998). Les rétrovirus ont la particularité de convertir leur ARN viral en ADN (acide désoxyribonucléique) une fois à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte, et cet ADN viral linéaire sera par la suite intégré de façon permanente au génome de celle-ci.

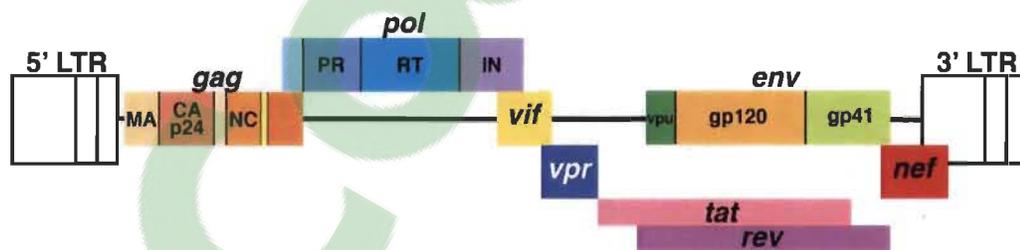


Figure 1.2 Génome viral du VIH-1.

Le génome du VIH-1 est constitué de 9 gènes : *gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* et *nef*. (Adapté de Altfeld *et al.* (2015))

On retrouve dans le cœur viral trois enzymes : une reverse transcriptase (RT), qui permet la conversion ARN→ADN, une intégrase (IN) pour l'incorporation de cet ADN viral, et une protéase (PR) nécessaire à la maturation des virions. Ce cœur viral, en forme de cône, où nichent les 2 brins d'ARN associés à la nucléocapside (NC ou p7), est circonscrit par des protéines formant la capsid (CA ou p24). Finalement, le tout est

enrobé d'une enveloppe, provenant de la membrane cellulaire, où se situent les glycoprotéines de surface gp41 et gp120 (figure 1.3).

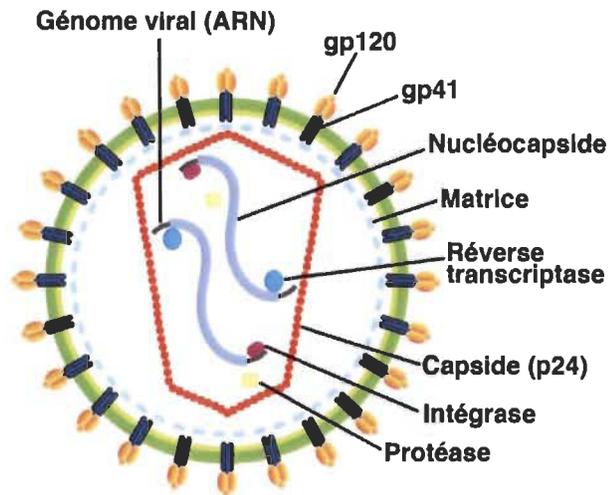


Figure 1.3 Structure et composants d'un virion VIH-1.

Le cœur viral du VIH-1, entouré par la capside, est constitué des deux brins d'ARN, protégés par la nucléocapside, et des enzymes protéase, réverse transcriptase et intégrase. L'enveloppe virale possède une bicouche lipidique d'origine cellulaire à laquelle s'ajoutent la matrice et les trimères de gp120-gp41. (Adapté de Altfeld *et al.* (2015))

Toutes ces protéines, dites structurales, sont communes à tous les rétrovirus (Kartikeyan *et al.*, 2007) et sont encodées par trois gènes (Larrouy *et al.*, 2010) (figure 1.4). Le premier, *gag*, code pour le précurseur Gag (ou p55) incluant les protéines de matrice (MA, ou p17), CA, NC, p6 ainsi que SP1 et SP2 (Freed, 2015). Pour sa part, *pol* est responsable de la synthèse de Gag-pol, précurseur issu d'un changement programmé du cadre de lecture de l'ARN messager (ARNm) de *gag*, duquel découlent les enzymes virales (PR, RT et IN) (Freed, 2015). Finalement, les protéines de l'enveloppe gp120 et gp41 proviennent du précurseur gp160 encodé par *env* (Kartikeyan *et al.*, 2007).

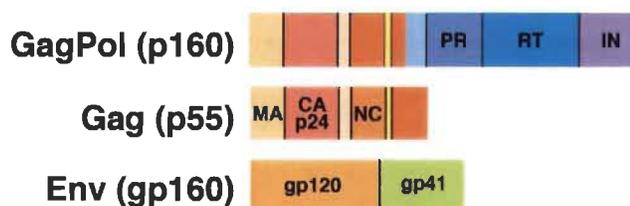


Figure 1.4 Représentation schématique des trois précurseurs du VIH-1.
 Les protéines structurales du VIH-1 sont d'abord synthétisées sous forme de précurseurs. (Adapté de Freed (2015))

D'autres protéines virales, dites non structurales sont encodées par 6 gènes supplémentaires et sont pour leur part propres aux lentivirus. Les deux protéines régulatrices associées à l'ARN sont Tat et Rev, responsables respectivement d'augmenter l'expression des gènes viraux (Sodroski *et al.*, 1985) et de permettre l'export des ARN non épissés et partiellement épissés du noyau vers le cytoplasme (Malim *et al.*, 1989). Les quatre protéines accessoires, importantes pour la pathogénicité du virus, sont : Nef, impliqué dans la pathogénicité du virus en éliminant le récepteur CD4 des cellules infectées (Arganaraz *et al.*, 2003), en induisant l'apoptose des cellules CD4⁺ (Lenassi *et al.*, 2010) et en inhibant la réponse immunitaire cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ envers les cellules infectées (Collins *et al.*, 1998); Vpr, qui stimule la synthèse virale en s'associant aux LTR (Cohen *et al.*, 1990), qui joue un rôle dans l'import nucléaire chez les cellules qui ne sont pas en division (Heinzinger *et al.*, 1994), qui permet l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 afin d'augmenter la production de virions (He *et al.*, 1995) et qui entraîne la dégradation protéasomale de UNG, une uracile-ADN glycosylase qui clive les résidus uracile pouvant avoir été incorporés par l'action du facteur de restriction APOBEC3G (Schrofelbauer *et al.*, 2005); Vif et Vpu, qui jouent un rôle dans les phases tardives du cycle viral en inhibant respectivement les facteurs de restriction APOBEC3G (Sheehy *et al.*, 2003) et tétherine (Neil *et al.*, 2008), concepts qui seront détaillés dans la section 1.3 de ce chapitre. Vpu a aussi comme rôle de réguler à la baisse l'expression du récepteur CD4 (Willey *et al.*, 1992). Cette protéine virale n'est pas présente chez le VIH-2 ni dans la majorité des VIS, où elle est remplacée par Vpx (Kartikeyan *et al.*, 2007).

1.1.2.2 Cycle viral : infection et réplication

Lors de l'infection, les protéines gp120 de l'enveloppe du virus se lient aux récepteurs CD4 des cellules humaines, présents chez les monocytes, les lymphocytes T et les cellules dendritiques. L'association gp120-CD4 seule n'est pas suffisante à l'entrée du virus dans la cellule : pour qu'il y ait fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire, il faut la présence d'un co-récepteur (CCR5 ou CXCR4, selon son tropisme envers les macrophages ou les cellules T) (Levy, 1998). À la suite de cette fusion, le cœur viral se retrouve au niveau du cytoplasme, où s'amorcera la transcription inverse par la RT, en utilisant les désoxyribonucléotides (dNTPs) présents dans la cellule. Grâce à un synchronisme peu compris entre la transcription inverse, la décapsidation du cœur viral et l'import nucléaire (Maelfait *et al.*, 2014), l'ADN viral double-brin se retrouve au noyau afin d'être intégré dans le génome de la cellule par l'IN. Les étapes comprises entre l'association du virus à la cellule-hôte et l'intégration de l'ADN viral constituent la phase précoce du cycle réplcatif du VIH-1 (Freed, 2015). La seconde phase de la réplication virale débute au moment où il y a transcription des gènes viraux dans l'optique de produire de nouveaux virions (figure 1.5). Les ARNs messager (ARNm) codant pour les précurseurs des polyprotéines Gag et de Gag-pol, pour les glycoprotéines de l'enveloppe (gp120 et gp41) ainsi que les protéines accessoires et régulatrices, sont exportés au niveau du cytoplasme de la cellule infectée afin d'être traduit.

Une fois les précurseurs synthétisés, ceux-ci sont acheminés à la membrane plasmique pour l'assemblage des particules virales, où sont encapsidées 2 copies d'ARN viral non épissé. Finalement, les glycoprotéines d'enveloppe sont insérées dans la membrane cellulaire, à l'aide du domaine MA du précurseur gag, pour que les virions formés puissent s'extraire de la cellule infectée par bourgeonnement. Ne reste que l'étape de maturation des virions, rendue possible grâce à la PR exprimée à partir du précurseur Gag-pol. Cette enzyme permet le clivage des deux précurseurs en leurs différentes protéines distinctes, ce qui mène à une maturation complète des virions.

Cette étape est cruciale puisque seuls les virions matures peuvent par la suite infecter de nouvelles cellules (Freed, 2015).

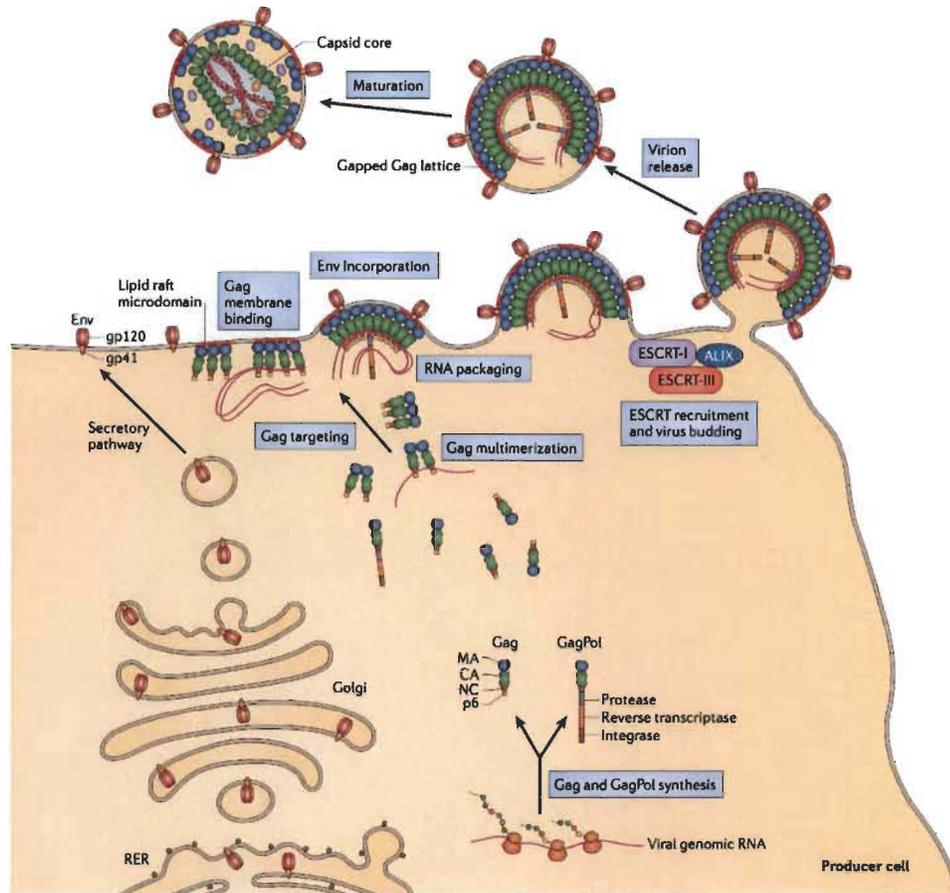


Figure 1.5 Phases tardives du cycle viral.

La transcription des gènes viraux et la synthèse de virions sont les dernières étapes du cycle viral. Les précurseurs Gag et Gag-pol sont incorporés tels quels lors de l'assemblage des virions à la membrane cellulaire. Ce n'est qu'après le bourgeonnement des virions que ces précurseurs seront clivés par la protéase, lors du processus de maturation. (Freed, 2015)

1.1.2.3 Transmission

Le VIH-1 est un virus qui infecte certaines cellules retrouvées entre autres dans le sang. Dès lors, il lui faut atteindre ces cellules par différentes portes d'entrée. Il peut y avoir contamination directe par le sang (partage de seringues souillées, transfusion sanguine ou transplantation d'organe provenant d'un donneur infecté, blessure

accidentelle avec du matériel médical ayant servi à un patient VIH+), ou par voie périnatale (contact sanguin entre le fœtus et la mère lors d'un accouchement par les voies naturelles, transmission par le lait maternel). Néanmoins, la voie d'infection la plus commune reste la transmission lors de relation sexuelle. Toutefois, l'efficacité de transmission varie beaucoup entre ces différentes voies :

- Près de 95 % lors de transfusion sanguine provenant d'un donneur infecté ;
- Entre 50 et 90 % lors de transplantation d'organe provenant d'un donneur infecté ;
- Entre 20 et 40 % par voie transplacentaire si la mère n'est pas sous TAR ;
- Entre 3 et 10 % lors de partage de seringues par les utilisateurs de drogues injectables ;
- Environ 0,5 % lors de blessure accidentelle avec une aiguille dans un environnement hospitalier ;
- Et finalement entre 0,1 à 1 % d'efficacité lors de relation sexuelle non protégée (Kartikeyan *et al.*, 2007).

La transmission par voie sexuelle étant la moins efficace, il demeure que c'est de cette façon que le virus se propage le plus entre les individus. Il est à noter que c'est la personne dite « receveuse » lors de la relation qui est la plus à risque d'infection, que ce soit un homme ou une femme (Levy, 1998). Depuis le début de la pandémie en 1981, la diminution des nouveaux cas dans les pays industrialisés est due majoritairement au TAR, mais également à un meilleur dépistage, à un contrôle pointu des dons (organes et sang), à un suivi des grossesses rigoureux chez les femmes séropositives en plus d'effectuer les naissances par césarienne et de traiter tant la mère que l'enfant durant l'allaitement, à l'apparition des centres d'injections supervisées et évidemment à une sensibilisation de la population quant aux pratiques sexuelles protégées (World Health Organization, 2017).

1.1.2.4 Groupes de VIH-1

Il existe officiellement 4 groupes de VIH-1. Ils sont entre autres distingués par leur lieu d'origine et par l'action de leur protéine régulatrice Vpu (figure 1.6). Cette protéine virale chez VIScpz permet la dégradation du récepteur CD4 (Sharp & Hahn, 2011). Par contre, pour franchir la barrière inter-espèce, Vpu a acquis une capacité d'action contre le facteur de restriction humain tétherine (Yang *et al.*, 2011), protéine anti-VIH-1 qui sera décrite plus en détail dans la prochaine section de cette introduction.

- Le groupe M (pour « main », qui signifie principal en anglais) est responsable de la pandémie actuelle du virus. Il découlerait d'une dérive du VIScpz de la sous-espèce *Pan troglodytes troglodytes* (VIScpzPtt) vivant dans le sud du Cameroun (Keele *et al.*, 2008). Premier groupe découvert, en 1983, on estime que sa transmission à l'humain daterait du début du XXe siècle, et que c'est à Kinshasa en République démocratique du Congo que se sont faites presque toutes les différenciations du VIH-1 émanant de cet unique évènement de transmission chimpanzé-humain (Sharp & Hahn, 2011). C'est seulement chez le groupe M qu'on trouve un VIH-1 ayant un Vpu efficace tant dans son action anti-CD4 qu'anti-tétherine, ce qui pourrait expliquer sa prévalence (Sharp & Hahn, 2011).
- Le groupe O (« outlier », qui signifie à l'écart en anglais) a été découvert quant à lui en 1990. Moins de 1 % des gens infectés par le VIH-1 font partie de ce groupe, et ceux-ci se situent presque exclusivement au Cameroun, au Gabon et dans les environs (Sharp & Hahn, 2011). Les analyses phylogénétiques tendent à démontrer que le groupe O tiendrait sa source d'un VIS retrouvé chez les gorilles (VISgor), lui-même étant une adaptation du VIScpz. Le Vpu retrouvé chez le groupe O possède toujours son action anti-CD4, mais n'a que peu d'effet pour bloquer l'action anti-VIH-1 de tétherine.
- Le groupe N (« new », nouveau en anglais) regroupait en 2010 que 13 cas. Identifié en 1998, il s'agirait d'une variation ayant émergé dans une région du centre sud du Cameroun. Pour sa part, le groupe N produit une protéine Vpu

qui a non seulement une faible activité contre tétherine, mais qui a également perdu sa fonction anti-CD4 (Sharp & Hahn, 2011).

- Le groupe P est le dernier des groupes de VIH-1. Sa découverte datant de seulement 2009, il semble être également une adaptation du VISgor, et uniquement deux cas, une femme et un homme originaire du Cameroun, ont pu être identifiés entre 2009 et 2011 (Sharp & Hahn, 2011).

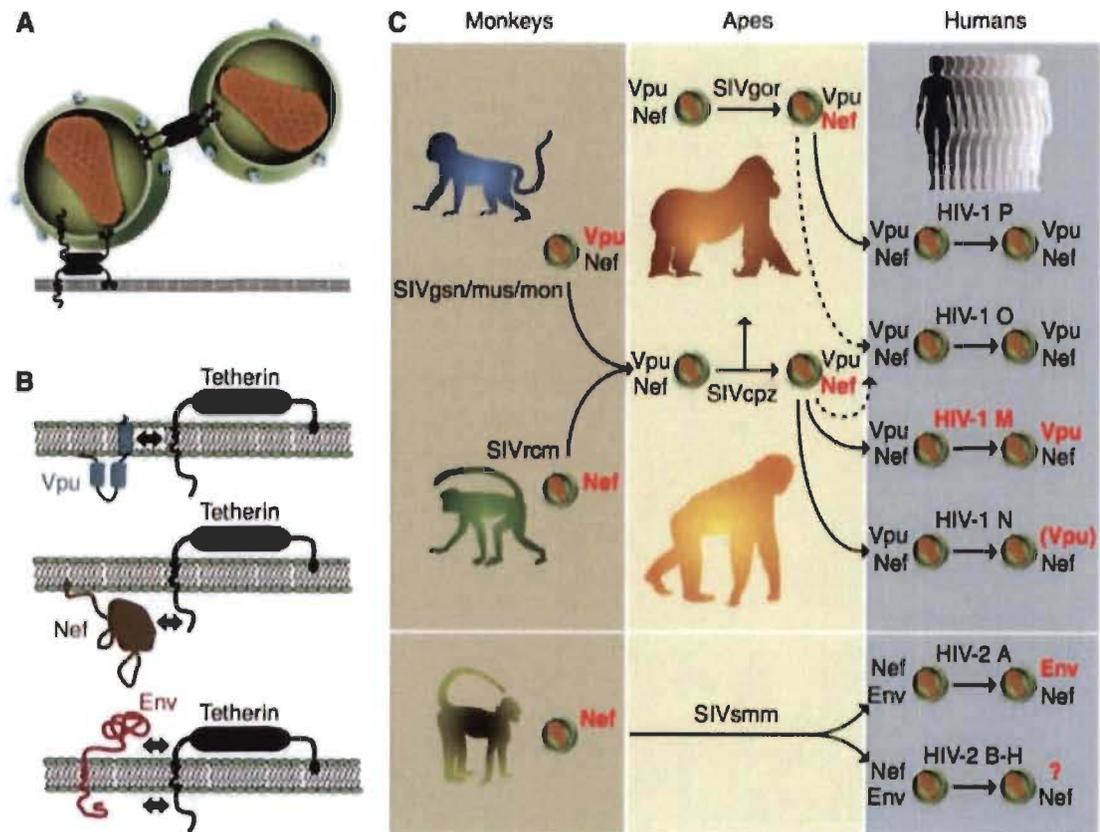


Figure 1.6 Classification des groupes de VIH selon leur capacité à inhiber la protéine tétherine, à partir de leurs origines simiennes.

Les groupes de VIH se distinguent par leur capacité à empêcher la restriction médiée par tétherine. Selon le virus simien duquel découle le groupe de VIH, tétherine est inhibé par Vpu ou Nef. (Sharp & Hahn, 2011)

1.2 Le SIDA

1.2.1 Le stade SIDA

Le VIH est un virus qui s'attaque aux cellules immunitaires possédant le récepteur CD4, menant éventuellement à une immunodéficience sévère. La maladie qui en découle se développe en trois phases (U.S. Department of Health and Human Services, 2017) :

- La phase aigüe se produit dès le moment de l'infection et dure entre deux et quatre semaines. Durant cette phase, les sujets infectés ressentent des symptômes grippaux (fièvre, maux de tête) sans plus. Pourtant, c'est lors de cette phase qu'ils sont le plus infectieux : en effet, c'est au cours des premières semaines que le virus est hautement réplicatif et qu'il se dissémine au travers de tout l'organisme. Puisque le système immunitaire s'active pour combattre l'infection, un plus grand nombre de cellules CD4+ sont mises à contribution, permettant au virus d'infecter encore plus de ces cellules hôtes.
- La phase chronique de l'infection est plutôt cliniquement asymptomatique. Néanmoins, le sujet peut démontrer des symptômes de fièvre, de perte de poids, de diarrhée, de toux et d'enflure des ganglions lymphatiques (World Health Organization, 2017). Le système immunitaire n'est plus activé et la multiplication virale ralentit. C'est aussi à ce moment qu'on peut commencer à détecter des anticorps spécifiques au VIH-1, dont ceux contre la protéine virale de CA p24. Bien que la charge virale sanguine soit diminuée comparativement à la phase aigüe, le sujet reste infectieux. S'il y a absence de traitement, il passera lentement vers la phase finale de l'infection en 2 à 15 ans (World Health Organization, 2017).
- La phase finale est appelée stade SIDA. On établit qu'un sujet atteint cette phase lorsque son taux de cellules CD4+ passe en dessous de 200 copies par ml de sang, ou lorsqu'il se trouve aux prises avec des infections opportunistes, puisque le système immunitaire est gravement affaibli. Un sujet sidéen non traité a une espérance de vie d'environ 3 ans.

1.2.2 Prise en charge

La première étape de la prise en charge de l'infection au VIH-1 demeure le dépistage. Étant donné que le virus ne cause que peu de symptômes spécifiques lors de la phase aiguë, il est plutôt difficile d'identifier l'infection à ce stade. Il faut donc que les gens aux comportements à risques (utilisateurs de drogues injectables, travailleurs du sexe, participants d'une relation sexuelle non protégée) aillent se faire dépister rapidement à la suite d'un possible événement de transmission. Le dépistage de base consiste à déterminer s'il y a présence ou non d'anticorps anti-VIH chez l'individu. Par contre, puisque ces anticorps peuvent prendre jusqu'à 28 jours à se former (World Health Organization, 2017), il est possible qu'un dépistage très tôt en phase aiguë donne tout de même un résultat négatif. S'il y a eu une probable exposition au virus dans les 72 heures précédant la consultation, le sujet recevra alors un traitement post-exposition (PEP), c'est-à-dire qu'il sera mis sous TAR durant 28 jours avant de passer un nouveau test de dépistage. De cette façon, s'il y a eu transmission, il est possible que le traitement empêche l'infection de s'établir. Une autre méthode de plus en plus utilisée depuis quelques années, particulièrement chez les individus à haut risque de contracter le VIH-1, est la prophylaxie pré-exposition (PrEP). Ces individus, non porteurs du virus, prennent un TAR de façon préventive les protégeant de l'établissement de l'infection.

Lorsque le diagnostic d'infection au VIH-1 tombe, peu importe le taux de cellules CD4+, la première ligne de TAR consiste en une combinaison de trois inhibiteurs de l'enzyme réverse transcriptase, soit une dose unique quotidienne de Tenofovir Disoproxil Fumarate, de Lamivudine et d'Efavirenz (World Health Organization, 2016). Si cette combinaison s'avère inefficace (résistance du virus, hausse de la charge virale, effets secondaires indésirables), d'autres classes d'antirétroviraux existent, tels les inhibiteurs de la PR, les inhibiteurs de fusion, les inhibiteurs d'entrée (ou les antagonistes du co-récepteur CCR5) ainsi que les inhibiteurs de l'IN (U.S. Food and Drug Administration, 2016). Ces médicaments bloquent la réplication du virus dans les cellules : sans être un traitement curatif, il empêche presque totalement la transmission du VIH-1, et rend possible le rétablissement du système immunitaire du sujet (World Health Organization, 2017).

En plus de la prise en charge des effets physiques, il ne faut pas négliger l'aspect psychologique de l'infection. L'annonce d'un diagnostic de VIH-1 est une énorme source de stress pour l'individu, qui peut par la suite ressentir diverses manifestations psychologiques telles que la dépression, l'anxiété, de l'insomnie, un stress post-traumatique, voire même des pensées suicidaires (U.S. Department of Health and Human Services, 2016). Les personnes séropositives doivent entre autres gérer, en plus de la prise en charge physique, des émotions intenses envers leur entourage, un stress concernant leurs plans futurs, une fatigue psychologique due à l'acceptation de leur condition et au changement soudain de leur quotidien (Société Canadienne du SIDA, 2014). Leur estime de soi est grandement affectée, que ce soit à cause de la stigmatisation ou des préjugés auxquels ils devront faire face. Finalement, le virus lui-même est connu pour entraîner des problèmes neurocognitifs, particulièrement chez les sujets non traités (Société Canadienne du SIDA, 2014). Il va donc de soi qu'un individu mis sous TAR se doit également d'envisager de consulter un psychologue, ou même d'incorporer un groupe de soutien et d'entraide afin de sortir de son isolement.

1.2.3 Maladie incurable

1.2.3.1 Virus hors d'atteinte

Malgré les efforts en ce qui a trait à la recherche sur le VIH depuis plus de trente ans, il n'existe toujours aucun traitement curatif contre ce virus. La panoplie de drogues antirétrovirales utilisées permet la suppression de la réplication virale dans les cellules infectées, c'est-à-dire qu'ils empêchent la formation de nouveaux virus dans l'organisme par les cellules où l'infection a eu lieu. On considère que le traitement est efficace lorsque la charge virale plasmatique est sous le niveau de détection, soit moins de 50 copies d'ADN viral par millilitre (Siliciano & Greene, 2011). Par contre, malgré cette absence apparente de charge virale, l'arrêt du TAR mène irrémédiablement à un rebond de la virémie, généralement dans les 2 à 3 semaines suivant l'interruption du traitement (Davey *et al.*, 1999). Cette virémie résiduelle est présente chez tous les patients infectés par le VIH-1, peu importe depuis combien d'années ils sont sous TAR (Siliciano &

Greene, 2011). Il existe donc des réservoirs de cellules où le VIH-1 échappe aux antirétroviraux, sans pour autant acquérir des mutations de résistances à ces drogues, et tout en gardant leur potentiel répliatif menant à ce rebond viral (Finzi *et al.*, 1997). C'est d'abord dans les lymphocytes T CD4+ au repos (« resting CD4+ T cells ») qu'ont été découverts des virus latents. Ces virus sont non-actifs, c'est-à-dire qui ne synthétisent pas de protéine virale, mais ne sont pas défectueux, puisque leur cycle de répliation peut être réactivé (Chun *et al.*, 1995). Par la suite, il a été démontré que le réservoir principal de cellules latentes se situe au niveau des lymphocytes T mémoires centrales (Tcm) et mémoires transitionnelles (Ttm) (Chomont *et al.*, 2009). On estime que la demi-vie de ce réservoir est de près de 44 mois, ce qui signifie qu'une éradication naturelle de celui-ci prendrait autour de 60 ans (Finzi *et al.*, 1999). Parmi les autres réservoirs possibles, on trouve les macrophages (Igarashi *et al.*, 2001), les cellules progénitrices hématopoïétiques (HPCs) de la moelle osseuse (Carter *et al.*, 2010) et les astrocytes du système nerveux central (Churchill *et al.*, 2009). Le tissu lymphoïde associé au tractus digestif (GALT pour « gut-associated lymphoid tissue ») et les nœuds lymphatiques (LN) (Rothenberger *et al.*, 2015) sont connus pour être des sanctuaires anatomiques de cellules infectées latentes. Ce sont tous ces réservoirs qui empêchent, à l'heure actuelle, d'éradiquer le VIH-1 des sujets infectés (Siliciano & Greene, 2011).

1.2.3.2 Patient de Berlin

En 2005, un homme dans la quarantaine d'origine américaine, sous TAR depuis 10 ans suite à un diagnostic de VIH-1 en 1995, développe une leucémie myéloïde aigüe (LMA) alors qu'il vit à Berlin, en Allemagne. Malgré quatre traitements de chimiothérapies, la leucémie est toujours présente chez ce patient. La greffe de cellules souches hématopoïétiques devient une nécessité, et plusieurs donneurs compatibles sont trouvés. Par contre, à ce moment, le docteur Gero Hütter décide de chercher parmi les donneurs compatibles un candidat qui serait aussi homozygote pour la mutation du gène CCR5. Cette mutation (CCR5 Δ 32) est une délétion de 32 paires de bases au niveau du gène, retrouvée chez environ 1 % de la population européenne, qui fournit une résistance naturelle à l'infection au VIH-1 (Hütter *et al.*, 2009). Un donneur parfaitement

compatible et homozygote pour CCR5 Δ 32 a pu être identifié et une première greffe eût lieu le 6 février 2007 (Brown, 2015). Le patient interrompit son TAR la veille de l'intervention. Néanmoins, 391 jours plus tard, une deuxième greffe fut nécessaire, provenant du même donneur CCR5 Δ 32 (Hütter *et al.*, 2009), compte tenu d'une récurrence de la leucémie. Le cas est devenu célèbre en 2009 puisque plus de 20 mois suivant l'arrêt de tout TAR, aucune trace du VIH-1 n'était détectable chez celui qu'on désigna comme le Patient de Berlin (Hütter *et al.*, 2009). Timothy Ray Brown est le premier humain guéri du VIH-1, et reste à ce jour le seul et l'unique. En février 2017, lors d'un atelier en marge du CROI (Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections) à Seattle, Brown célébrait ses dix ans de guérison, bien qu'il ait déclaré avoir débuté une PrEP afin de se protéger contre un éventuel VIH-1 qui utilise le co-récepteur CXCR4 plutôt que le CCR5 (Highleyman, 2017).

1.3 Les facteurs de restriction du VIH-1

1.3.1 Facteurs de restriction

Les cellules, susceptibles à une multitude de virus, possèdent une panoplie d'éléments de défense pour se prévenir de ces infections. Les facteurs de restriction font partie de ces mécanismes qui empêchent un virus donné de procéder à un cycle viral complet une fois celui-ci entré au niveau du cytoplasme de la cellule infectée. Les facteurs de restriction sont, par définition, des protéines cellulaires spécialisées, effectrices de l'immunité innée, et encodées par des ISGs, des gènes stimulés par l'interféron de type I (IFN-I) (Merindol & Berthoux, 2015). De façon générale, ils ont un effet d'inhibition plus important sur des rétrovirus qui sont non spécifiques à l'espèce de la cellule-hôte. De ce fait, un virus qui parvient à sauter la barrière inter-espèce est un virus qui s'est adapté au nouvel hôte en acquérant des mécanismes de résistance face aux facteurs de restriction présents chez cette espèce.

1.3.2 Facteurs de restriction et VIH-1

Plusieurs facteurs de restriction ont été identifiés pour avoir une action, de faible à forte, envers le VIH-1 (figure 1.7). Ils agissent au niveau de différentes phases de l'infection, et leur efficacité varie selon le type cellulaire impliqué (Merindol & Berthoux, 2015). On peut les classer en deux catégories : ceux qui restreignent le VIH-1 avant l'intégration, et ceux qui entrent en jeu après l'intégration du virus afin d'empêcher sa propagation à d'autres cellules (Soliman *et al.*, 2017).

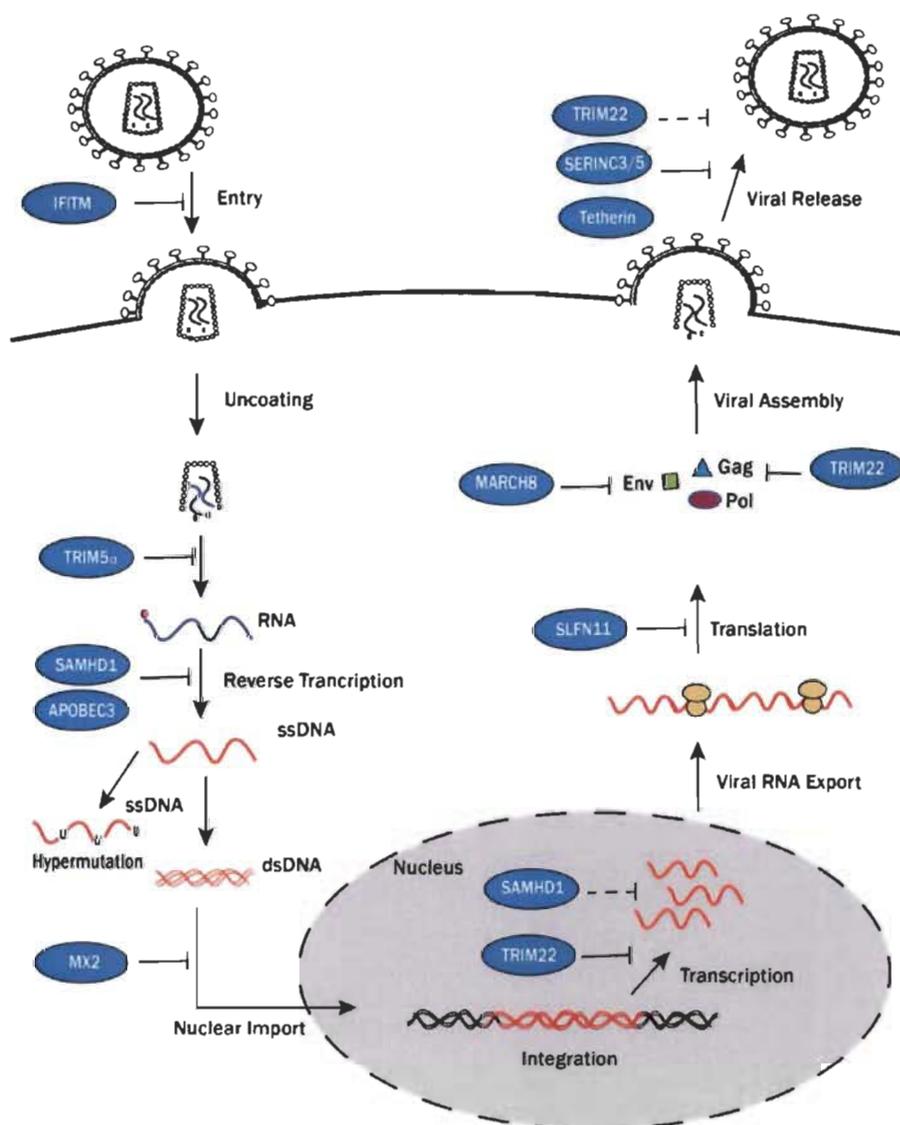


Figure 1.7 Les différents facteurs de restriction du VIH-1 et leur cible d'action. Les facteurs de restriction du VIH-1 ont chacun leur cible d'action et agissent à différents stades du cycle viral, que ce soit en amont de l'intégration du virus ou en aval. (Soliman *et al.*, 2017)

1.3.2.1 IFITM

Lors de l'infection par le VIH-1, la première étape qu'il est possible de bloquer est l'entrée du VIH-1 dans la cellule par IFITM1 (« Interferon-Induced Transmembrane 1 ») (Lu *et al.*, 2011). Cette protéine agit sur la membrane cytoplasmique afin de diminuer sa fluidité, en modulant sa composition lipidique et sa courbature (Li *et al.*, 2013). Cette soudaine rigidité membranaire empêche l'hémifusion, le processus durant lequel les hémimembranes externes des bicouches lipidiques du virion et de la cellule fusionnent (Tartour & Cimarelli, 2015). L'équipe de Liu a pour sa part démontré *in vitro* que IFITM2 et IFITM3 peuvent interagir avec les protéines d'enveloppe du VIH-1 et ainsi empêcher l'infection entre les cellules (Yu *et al.*, 2015).

1.3.2.2 APOBEC3G

Deux facteurs de restrictions bloquent l'étape de la transcription inverse du VIH-1. Le premier d'entre eux est APOBEC3G, un des sept membres de la famille des APOBEC (« Apolipoprotein B editing complex 3 ») (Soliman *et al.*, 2017). Ces protéines, qu'on retrouve à des niveaux variables chez les lymphocytes T CD4+, CD8+, les lymphocytes B et les cellules myéloïdes (Koning *et al.*, 2009), ont une action cytosine déaminase (Harris & Dudley, 2015). Pendant la transcription inverse, durant la synthèse du brin (-) d'ADN viral, les APOBEC3 reconnaissent de façon spécifique des motifs di- ou tri-nucléotidiques ((C)CC ou (T)TC) sur l'ADN simple-brin (ssDNA) des rétrovirus (Yu *et al.*, 2004), et provoquent la conversion C→U de ces motifs (Chelico *et al.*, 2006). Il en résulte une hypermutation de l'ADN viral (Mangeat *et al.*, 2003). Celui-ci peut être dégradé par la cellule-hôte, qui le reconnaît comme un ssDNA aberrant compte tenu de la présence de nucléotides d'uracile (Okada & Iwatani, 2016; Yang *et al.*, 2007). D'un autre côté, si l'ADN viral parvient à s'intégrer au génome de la cellule, la présence d'un grand nombre de mutations peut avoir largement réduit son potentiel infectieux (Mbisa *et al.*, 2007; Russell *et al.*, 2009). Néanmoins, le VIH-1 a développé une façon de contourner cette restriction : la protéine virale Vif permet le retrait

d'APOBEC3G des virions en formation, en plus d'entraîner l'ubiquitination de ce facteur de restriction afin qu'il soit dégradé par le protéasome (Sheehy *et al.*, 2003).

1.3.2.3 SAMHD1

Le second acteur de l'inhibition de la transcription inverse, découvert en 2011 (Laguet *et al.*, 2011) est SAMHD1 (« Sterile Alpha Motif And Histidine-aspartate Domain containing protein 1 »). Fortement exprimée chez les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4⁺ au repos (Descours *et al.*, 2012), cette protéine se situe tant au niveau du cytoplasme que du noyau et n'est inductible à l'IFN-I que dans les monocytes (St Gelais *et al.*, 2012). Le domaine SAM de la protéine permet l'interaction avec de l'ARN ou d'autres protéines, alors que le domaine catalytique HD a une activité dNTPase (Goldstone *et al.*, 2011; White *et al.*, 2013), scindant les nucléotides (dNTPs) présents dans la cellule. Cette diminution du nombre total de dNTPs disponibles, provoquée par SAMHD1, réduit l'efficacité de la synthèse d'ADN lors de la transcription inverse du VIH-1 (Baldauf *et al.*, 2012). Il a également été démontré, *in vitro*, qu'en présence de peu de dGTP, SAMHD1 peut lier tant les formes simple-brin d'ADN et d'ARN viral et entraîner leur dégradation par son action RNase, particulièrement lors de la transcription inverse (Ryoo *et al.*, 2014). Le VIH-1 ne possède pas de mécanisme pour contrer la restriction médiée par SAMHD1, bien qu'un tel mécanisme existe chez le VIH-2 (Laguet *et al.*, 2011), le VISmm et le VISmac (Goujon *et al.*, 2007) via la protéine virale Vpx.

1.3.2.4 Mx2

L'import nucléaire de l'ADN viral est la dernière étape où il est possible de bloquer l'infection avant l'intégration. Mx2, aussi connu sous l'appellation MxB (« IFN-inducible Myxovirus resistance 2/B ») est une GTPase de la famille des « Dynamin-like » (Holzinger *et al.*, 2007). Son action anti-VIH-1, découverte en 2013 (Goujon *et al.*, 2013; Kane *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013), est associée à une diminution de l'intégration virale, observable par une baisse des cercles 2-LTR au niveau du noyau cellulaire due à un blocage de l'import nucléaire (Goujon *et al.*, 2013). Aussi, Mx2

reconnaît spécifiquement la capsid virale (Fricke *et al.*, 2014). Plus précisément, l'interaction protéine-protéine se fait via la boucle cyclophylène-A des protéines de capsides (Liu *et al.*, 2015), permettant l'inhibition de la décapsidation virale par Mx2 (Fricke *et al.*, 2014).

1.3.2.5 TRIM22

Une fois le virus intégré au sein du génome de la cellule-hôte, il y a initiation du cycle répliatif menant à l'expression des protéines virales. TRIM22 est un facteur de restriction qui reconnaît le LTR du VIH-1, permettant d'interférer dans la transcription des gènes viraux (Kajaste-Rudnitski *et al.*, 2011). TRIM22 s'interpose aussi dans l'assemblage des virions en s'associant à Gag afin d'en contrecarrer le trafic intracellulaire (Barr *et al.*, 2008).

1.3.2.6 SLFN11

SLFN11 (« Schlafen family of mouse and human proteins ») (Soliman *et al.*, 2017) est une protéine induite par l'interféron de type I (Li *et al.*, 2012), connue entre autres pour son implication dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Mavrommatis *et al.*, 2013). Elle restreint la traduction virale en s'associant aux ARN de transfert (ARNt), primordiaux à la synthèse des protéines, limitant ainsi leur disponibilité (Li *et al.*, 2012). Les premières observations de son implication dans le contrôle du VIH-1 datent de 2013, où il a été constaté que l'expression de SLFN11 est plus élevée chez les lymphocytes T CD4⁺ des contrôleurs élités (Abdel-Mohsen *et al.*, 2013), des sujets VIH⁺ ayant une charge virale indétectable et une progression excessivement lente vers le stade SIDA malgré l'absence de traitement (Saag & Deeks, 2010).

1.3.2.7 MARCH8

Un nouveau facteur de restriction, ayant une action anti-VIH-1 intéressante *in vitro* dans les cellules myéloïdes différenciées, est une E3 ubiquitine ligase nommée MARCH8 (« Membrane-Associated RING-CH8 ») (Tada *et al.*, 2015). Cette protéine,

hautement exprimée chez les cellules dendritiques et les macrophages, rend les virions nouvellement formés non infectieux, puisqu'elle contrecarre l'incorporation des glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 (Tada *et al.*, 2015).

1.3.2.8 SERINC5

SERINC5 est une autre protéine qui affecte l'infectivité des virions en agissant au niveau de l'enveloppe (Soliman *et al.*, 2017). Ce facteur de restriction a pour rôle d'ajouter des sérines, un acide aminé polaire, dans la membrane lipidique (Inuzuka *et al.*, 2005). Cette protéine est incorporée dans les virions, ce qui réduit leur infectivité puisque l'ajout de sérines empêche la fusion des virions à de futures cellules cibles. Par contre, cette action anti-VIH-1 de SERINC5 est neutralisée par Nef (Rosa *et al.*, 2015; Trautz *et al.*, 2016).

1.3.2.9 Téthérine

Aussi connue sous les noms BST2 (« Bone marrow stromal cell antigen-2 ») et CD137, tétherine est une protéine transmembranaire située tant dans la membrane cytoplasmique que dans le réseau trans-Golgi (Kupzig *et al.*, 2003) et les endosomes (Dube *et al.*, 2009). Exprimée chez beaucoup de types cellulaires différents, dont les lymphocytes T CD4+ (Blasius *et al.*, 2006) et les macrophages (Chu *et al.*, 2012), tétherine cible la bicouche lipidique et cause la restriction de plusieurs virus enveloppés (Jouvenet *et al.*, 2009). En effet, ce facteur de restriction possède un domaine transmembranaire qui l'ancre à la membrane de la cellule, et un domaine glycosylphosphatidylinositol en C-terminal (Kupzig *et al.*, 2003) s'insérant dans l'enveloppe virale. Lors du bourgeonnement des virions, tétherine empêche leur relâche en les retenant à la membrane de la cellule infectée (Neil *et al.*, 2008). De plus, cette accumulation des virions à la surface de la cellule jouerait le rôle de PAMP (« pathogen-associated molecular pattern ») permettant l'activation de l'immunité innée par la voie NF- κ B (Galão *et al.*, 2012). Par contre, l'action de tétherine envers le VIH-1 est inhibée par les protéines virales Vpu (pour les groupes M et N) (Le Tortorec *et al.*, 2011) et Nef

(pour le groupe O) (Kluge *et al.*, 2014), qui capturent tétherine au site d'assemblage des virions et la retirent de ceux-ci (McNatt *et al.*, 2013).

1.3.2.10 TRIM5 α

Finalement, le dernier facteur de restriction du VIH-1 d'importance, et celui qui est au cœur même de ce projet de maîtrise, est la protéine cytoplasmique TRIM5 α . Il s'agit de l'isoforme le plus long découlant du ISG TRIM5, un membre de la famille des TRIM (« Tripartite motif ») (Stremlau *et al.*, 2004). Tous les membres de cette famille ont un domaine RING (« Really Interesting New Gene ») en N-terminal qui possède une activité E3 ubiquitine ligase, un ou deux domaines B-Box qui permet la trimérisation des dimères de protéines, et un domaine coiled-coil responsable de la dimérisation (Nisole *et al.*, 2005). Certains TRIM, comme TRIM5 α (figure 1.8), possèdent, en plus de ces trois motifs, un domaine C-terminal nommé PRYSPRY (ou PRY, ou B30.2), qui permet l'interaction protéine-protéine (Li *et al.*, 2007). Cette portion de la protéine, qui possède 4 régions hyper variables (V1 à V4) (Song *et al.*, 2005)) permet la reconnaissance spécifique de la capsid de différents rétrovirus (Stremlau *et al.*, 2004).



Figure 1.8 Structure de la protéine TRIM5 α .

La protéine de TRIM5 α possède 3 motifs propres à la famille des TRIM (RING, Bbox et Coiled Coil) ainsi qu'un domaine PRYSPRY en C-terminal. Celui-ci possède 4 régions hyper variables. (Adapté de Pham *et al.* (2010))

Les régions hyper variables correspondent, sur la protéine, à des boucles dont la structure flexible permet la reconnaissance de différentes capsides rétrovirales (figure 1.9) (Grütter & Luban, 2012). Ces boucles forment plusieurs points de contact de faible affinité, mais la somme de ces points de contact, qui reconnaissent tous ensemble la structure complexe qu'est la capsid virale, permet une interaction de forte affinité menant à la restriction du rétrovirus (Sebastian & Luban, 2005).

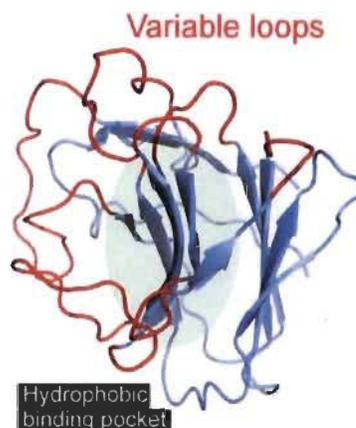


Figure 1.9 Modélisation du domaine PRYSPRY de TRIM5.

Les régions hyper variables (en rouge) du domaine PRYSPRY de TRIM5 forment des boucles qui permettent un contact spécifique avec les capsides rétrovirales (Grütter & Luban, 2012).

TRIM5 α agit chez les primates comme barrière de la transmission inter-espèce (Soll *et al.*, 2013) : l'orthologue de TRIM5 α des singes macaques rhésus (rhTRIM5 α) a une forte action anti-VIH-1 (Stremlau *et al.*, 2004), tandis que la forme humaine (huTRIM5 α), qui a une faible efficacité contre le VIH-1, agit plutôt pour contrecarrer l'infection du virus de la leucémie murine N-tropique (N-MLV) et du virus de l'anémie équine infectieuse (EIAV) (Zhang *et al.*, 2006). La restriction médiée par TRIM5 α se produit très tôt durant l'infection, dès l'entrée du cœur viral dans la cellule-hôte. Les dimères de TRIM5 α forment un feuillet d'hexagones, où tous les domaines effecteurs RING sont alignés d'un côté du feuillet, tandis que les domaines reconnaissance PRYSPRY sont alignés de l'autre côté (Wagner *et al.*, 2016). Ceux-ci s'associent aux protéines de capsides (CA) afin d'entraîner la décapsidation prématurée du virus (Stremlau *et al.*, 2004), causant la restriction (figure 1.10). En effet, le processus de réverse transcription de l'ARN en ADN se produit au sein de la capsid virale, et la décapsidation prématurée entraîne la dégradation par le protéasome de certaines composantes du virus essentielles à ce processus (Kutluay *et al.*, 2013). Au fil des ans, d'autres possibles voies d'inhibition de l'infection ont été décrites pour TRIM5 α , que ce soit en interférant la transcription inverse et l'import nucléaire (Roa *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2006), en dégradant des virus par autophagie grâce à une interaction avec Atg8 (Mandell *et al.*, 2014), ou encore en servant de senseur pour l'activation de l'immunité

innée par la voie NF- κ B (Nepveu-Traversy & Berthoux, 2014; Pertel *et al.*, 2011). Cette activation découle de la formation de chaînes libres de Lysine 63 (K63), synthétisées par l'action E3 ubiquitine ligase du domaine RING et association avec le complexe de conjugaison E2 ubiquitine UBC13-UEV1A. Ces chaînes K63 permettent par la suite l'autophosphorylation du complexe kinase TAK-1 (Nakayama & Shioda, 2012; Pertel *et al.*, 2011), un point central à la translocation nucléaire des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (Ajibade *et al.*, 2013) menant à l'activation de l'immunité innée.

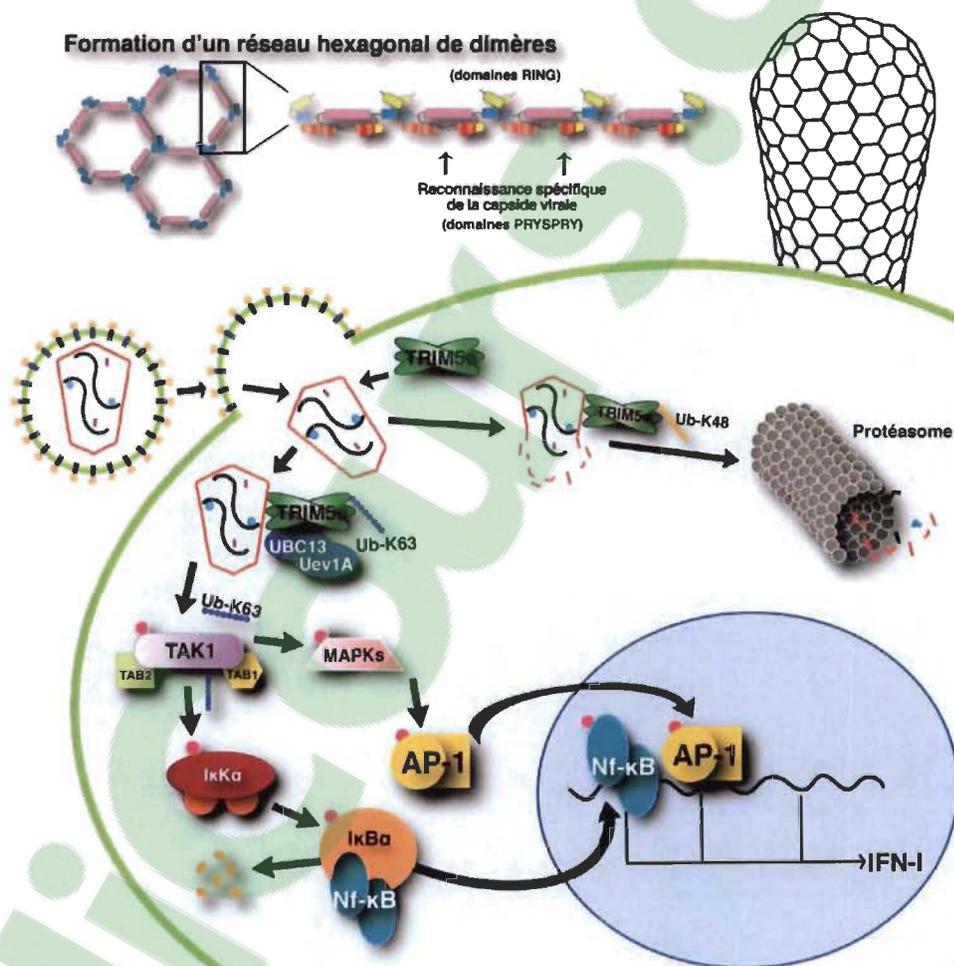


Figure 1.10 Processus de restriction de l'infection par TRIM5 α .

La protéine dimérise à l'aide de son domaine Coiled-Coil, puis les dimères s'assemblent en trimères grâce aux B-Box. De cette façon, un filet hexagonal de TRIM5 α est formé, où les domaines effecteurs RING se retrouvent tous d'un côté et les domaines de reconnaissance PRYSPRY d'un l'autre. La reconnaissance de la capsid virale entraîne une décapsidation prématurée, en plus de servir de senseur à l'activation de l'immunité innée par la voie TAK-1. (Adapté de Nakayama et Shioda (2012))

Tout comme pour SAMHD1, le VIH-1 ne possède pas de mécanisme d'évasion contre TRIM5 α . Étant donné qu'il s'agit d'un puissant facteur de restriction anti-VIH-1 chez les singes macaques, et que la spécificité de reconnaissance de la capsid virale se situe au niveau du domaine PRYSPRY, des équipes ont tenté de créer des mutants de cette protéine humaine qui permet à huTRIM5 α de restreindre le VIH-1. Une équipe a d'abord obtenu cette restriction virale grâce à une chimère de huTRIM5 α possédant les régions hyper variables du domaine PRYSPRY de rhTRIM5 α (Ohkura *et al.*, 2006). Il a par la suite été démontré que le résidu en position 332, situé dans la région V1 du PRYSPRY de la protéine (Stremlau *et al.*, 2005), permettait à lui seul d'accroître la restriction du VIH-1 par huTRIM5 α lorsqu'il était muté pour un résidu non chargé positivement, mais sans pour autant atteindre les niveaux observés chez rhTRIM5 α (Li *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que chez rhTRIM5 α , le résidu 332 est plutôt une proline (Yap *et al.*, 2005).

À partir de cette découverte, par PCR génératrice d'erreurs, une mutagenèse dirigée a permis à notre laboratoire de construire une bibliothèque de différents clones de huTRIM5 α possédant des mutations aléatoires dans le domaine PRYSPRY (Pham *et al.*, 2010), et plus particulièrement au niveau du V1 (résidus en position 332 à 340) qui constitue la boucle la plus grande et la plus variable (Yap *et al.*, 2005). Ces clones ont été exprimés dans une lignée cellulaire humaine afin de subir deux cycles de sélection fonctionnelle, c'est-à-dire deux sélections successives où ne sont gardés que les clones cellulaires étant au minimum deux fois moins infectés par le VIH-1 que la forme non mutée de huTRIM5 α . Ce projet a permis de découvrir que la mutation du résidu arginine en position 335 par une glycine permettait également d'obtenir une restriction marquée du VIH-1 (figure 1.11). La mutation R vers G permet de remplacer les résidus en position 332 et 335 pour un acide aminé neutre, supprimant ainsi la charge positive. En effet, en plus de la glycine, l'arginine en position 335 a été également remplacé dans ce projet par d'autres acides aminés (acide aspartique, acide glutamique, leucine, phénylalanine et lysine), et seulement la mutation R335K ne conférait qu'une très faible

amélioration de la restriction étant donné que la charge positive était ici maintenue (Pham *et al.*, 2010).

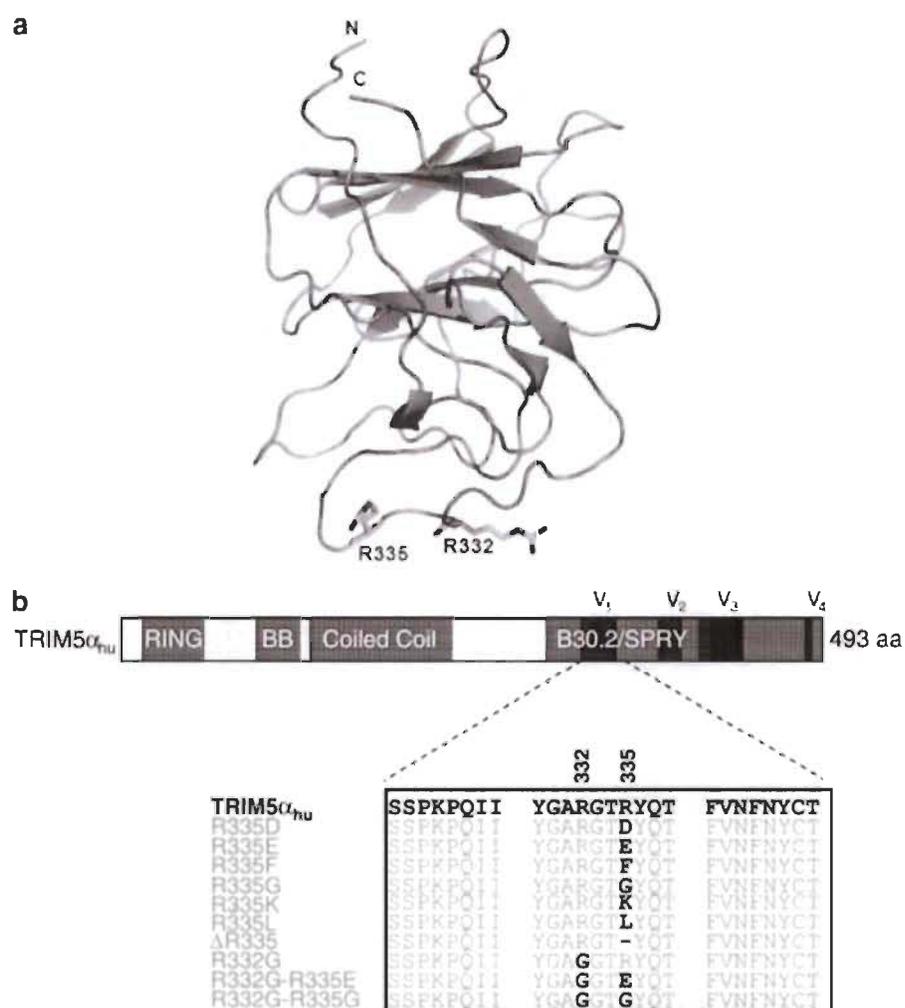


Figure 1.11 Mutations R332 et R335 de huTRIM5 α .

Emplacement des résidus R332 et R335 (a) et séquence des différents clones obtenus en mutant spécifiquement le résidu 335, avec ou sans la mutation R332G (b) (Pham *et al.*, 2010).

Notre laboratoire a par la suite démontré que la combinaison de ces deux mutations, R332G et R335G, permettait de restreindre l'infection au VIH-1 à des niveaux équivalant à ceux de rhTRIM5 α (figure 1.12) (Pham *et al.*, 2010).

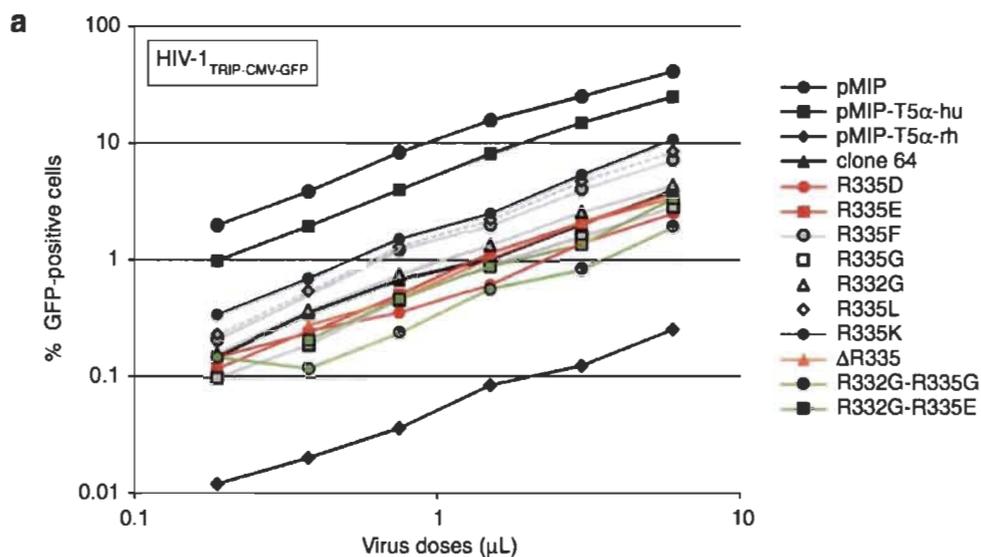


Figure 1.12 Restriction du VIH-1 par huTRIM5α R332G-R335G.

Le double mutant R332G-R335G permet de rendre huTRIM5α aussi restrictif du VIH-1 que l'est rhTRIM5α (Pham *et al.*, 2010).

1.4 Édition génomique

1.4.1 Thérapie génique et édition génomique

Les maladies génétiques sont, par définition, des affections où il y a un ou plusieurs gènes anormaux. Ces maladies, telles la chorée de Huntington ou la dystrophie musculaire de Duchenne, sont pour la plupart incurables par le biais des traitements conventionnels (chirurgie, diète spéciale, utilisation de drogues). En 1972 déjà apparaissait le concept de traitement par la thérapie génique, c'est-à-dire l'introduction de matériel génétique dans les cellules d'un sujet affecté afin de traiter les symptômes issus de l'anomalie du gène responsable de la pathologie (Friedmann & Roblin, 1972). Au fil du temps, mis à part les maladies héréditaires, la thérapie génique est devenue une avenue de traitement pour différents cancers et également pour l'infection au VIH-1 (Drake & Bates, 2015). Dans les dernières années, le développement d'outils permettant d'effectuer une édition génomique, une procédure visant à modifier la séquence même du gène dans la cellule, ont augmenté les possibilités de thérapie génique. Que ce soit pour inactiver un gène (un « knock-out »), pour en supprimer une portion entière (une délétion), pour en introduire un nouveau (un « knock-in ») ou encore pour en réécrire la

séquence (une correction), l'édition génomique utilise des outils moléculaires basés sur le même principe : la coupure double-brin de l'ADN (DSB, « double strand break ») par une nucléase (Maeder & Gersbach, 2016).

Les nucléases sont des enzymes qui parviennent à couper l'ADN. Pour que la cellule survive après une DSB, cette cassure doit être réparée. Deux voies principales de réparation sont mises à contribution : la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ) ou la réparation dirigée par homologie (HDR) (Sander & Joung, 2014). Les deux voies se font compétition, et une seule des deux effectuera la réparation sur un allèle donné. La NHEJ est une voie de réparation propice aux erreurs, et donc à l'apparition de mutations. Elle entraîne l'insertion ou la délétion (indel) de nucléotides au site de coupe, allant de 1 seul à plusieurs nucléotides de long. Cet indel peut se produire au niveau d'un exon du gène et occasionner un décalage du cadre de lecture, ou encore se faire au niveau du promoteur : dans les deux cas, le gène se retrouvera inactivé (Sander & Joung, 2014). De son côté, la HDR permet une réparation sans erreur : celle-ci se base sur l'homologie entre le brin à réparer et un brin servant de gabarit. Ce procédé, surtout actif en phase S ou G2 du cycle cellulaire, s'effectue généralement à l'aide de la deuxième copie du gène, présent sur le second allèle chez les cellules humaines (Maeder & Gersbach, 2016). Par contre, si, au moment de la coupure double-brin de l'ADN, il y a présence d'un ADN donneur, où des mutations ponctuelles sont incorporées, celui-ci pourra être utilisé pour la HDR afin d'introduire des mutations spécifiques dans le gène (Sander & Joung, 2014). Trois grandes étapes sont nécessaires pour ce faire (figure 1.13) : suite au DSB, il y aura résection de l'extrémité 5' de chacun des deux brins d'ADN au site de coupe. Par la suite, il y a invasion de l'ADN donneur simple brin (ssODN), servant à la réparation, afin de former une « D-loop » où se produira l'élongation du brin coupé homologue. Finalement, une fois que la portion élonguée est liguée au restant du brin homologue, le ssODN se dissocie, laissant place au processus d'élongation du deuxième brin d'ADN coupé à partir du brin nouvellement réparé (Addgene, 2017).

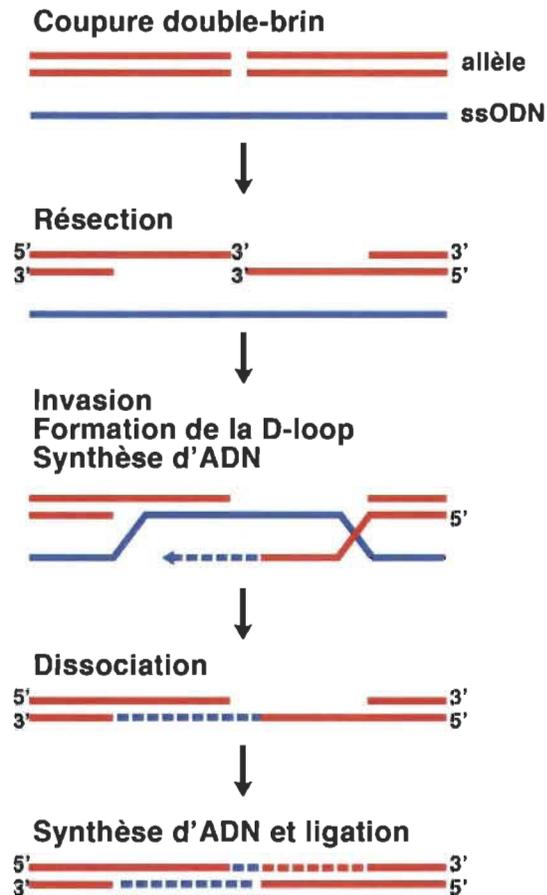


Figure 1.13 Procédé de réparation de l'ADN dirigée par homologie.

Suivant la coupure double-brin de l'ADN, il y aura d'abord résection des deux extrémités 5', suivi d'une invasion du ssODN. Une « D-loop » sera formée où se fera la synthèse d'ADN sur le brin homologue. Le ssODN se dissociera et s'en suivra la synthèse du deuxième brin d'ADN à partir du brin déjà réparé. (Adapté de Addgene « CRISPR 101 – Homology Directed Repair » (Cortez, 2015))

1.4.2 Outils moléculaires

Afin de modifier un gène donné dans une cellule, il faut des nucléases qui parviennent à cibler celui-ci. À ce jour, trois différents outils moléculaires sont utilisés pour faire de l'édition génomique. Dans les trois cas, le but est d'occasionner une coupure double-brin de l'ADN à un endroit précis : la méthode pour y parvenir diffère, mais les trois mettent à profit les deux voies de réparation de l'ADN mentionnées précédemment pour éditer le gène d'intérêt.

1.4.2.1 Zinc Fingers Nucleases (ZFNs)

Les protéines qui peuvent s'associer à l'ADN, tels les facteurs de transcription par exemple, sont relativement fréquentes dans une cellule. Ce sont des domaines précis au sein de la protéine qui permettent cette association, et parmi ceux les plus fréquents chez l'humain se trouvent le domaine doigt de zinc Cys2-His2, communément appelé « zinc finger » (Berg, 1988). En présence d'un ion de zinc, ces structures en forme d'hélice α s'associent à 3 ou 4 paires de bases de l'ADN et s'y introduisent (Pavletich & Pabo, 1991). Suite à la découverte que l'enzyme de restriction FokI, une endonucléase provenant de la bactérie *Flavobacterium okeanoicoites*, possède un domaine de reconnaissance de l'ADN en N-terminal fonctionnant de façon indépendante au domaine catalytique en C-terminal (Li *et al.*, 1992), l'idée est venue de construire une chimère de cette enzyme qui aurait un triplet de doigt de zinc en N-terminal. Cette chimère protéique, dénommée « zinc finger nuclease » (ZFN), permet d'induire des coupures à des endroits ciblés de l'ADN (Kim *et al.*, 1996). Chaque ZFN possède trois doigts de zinc en N-terminal (Pabo *et al.*, 2001), et un des deux dimères de FokI nécessaires à la coupure double-brin de l'ADN (Smith *et al.*, 2000). De façon optimale, les deux ZFNs (figure 1.14), chacune reconnaissant 9 paires de bases d'ADN, doivent cibler un brin d'ADN différent, avec un léger décalage de 6 paires de bases entre eux (Bibikova *et al.*, 2001).

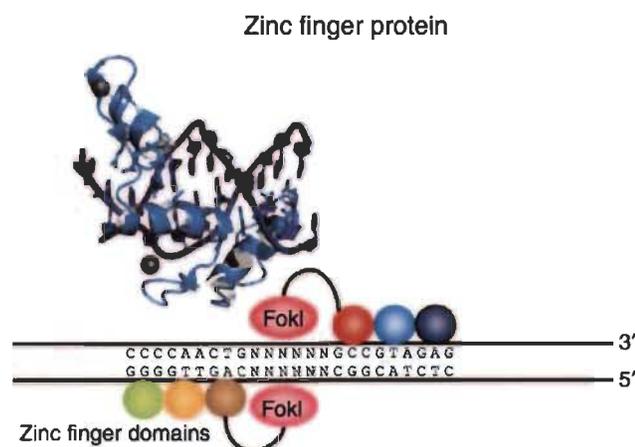


Figure 1.14 ZFNs.

Deux protéines ZFN, chacune possédant 3 doigts de zinc et un dimère de FokI, sont nécessaires pour entraîner la coupure double-brin de l'ADN. (Maeder & Gersbach, 2016)

1.4.2.2 TALENs

En 2009 fût découvert, chez la bactérie de plante *Xanthomonas* le facteur de virulence AvrBs3. Cette protéine agit de façon semblable à un activateur de la transcription (TALE, pour « transcription activator-like effector ») : elle stimule la synthèse de gènes de la cellule de plante en s'associant à l'ADN grâce aux répétitions de 34 acides aminés de son domaine central (Boch *et al.*, 2009). De ces 34 acides aminés, seulement ceux en position 12 et 13 variaient d'une répétition à l'autre, et ce sont ces deux acides aminés hypervariables qui confèrent la spécificité de reconnaissance d'un nucléotide de l'ADN (Boch *et al.*, 2009). Tout de suite après cette caractérisation des TALEs est apparues les TALENs (« transcription activator-like effector nuclease »), des chimères protéiques construites de la même façon que les ZFNs (Maeder & Gersbach, 2016). En effet, un TALEN est la fusion de TALE à un monomère de la portion catalytique de FokI (figure 1.15), où chaque TALE permet la reconnaissance d'un nucléotide précis (Christian *et al.*, 2010). Tout comme les ZFNs, les TALENs fonctionnent en paires pour occasionner une coupure double-brin de l'ADN (Maeder & Gersbach, 2016).

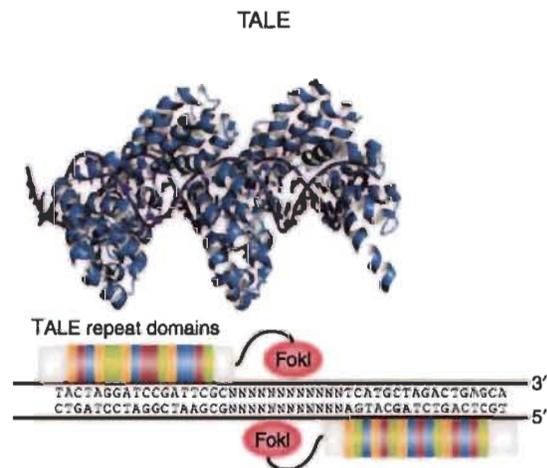


Figure 1.15 TALENs.

Un TALEN est la fusion entre un monomère de FokI et de différents TALEs. (Maeder & Gersbach, 2016)

1.4.2.3 CRISPR

L'outil moléculaire qui est responsable de l'engouement actuel pour l'édition génomique a été publié en 2012. Le système CRISPR-Cas (« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ») est un mécanisme de défense immunitaire contre les infections par les phages, retrouvé chez les bactéries et les archées (Grissa *et al.*, 2007). Ce système a pour but de fragmenter les brins d'ADN provenant d'envahisseurs : le locus CRISPR contient plusieurs motifs répétitifs entrecoupés de « spacers » d'ADN étranger, et en cas d'infection virale, ces derniers sont utilisés afin de produire des crRNA (CRISPR RNA). Les crRNA s'associent à un ARN transactivateur (tracrRNA), et ce complexe d'ARN sert par la suite à guider précisément la nucléase, nommée Cas (« CRISPR associated protein »), jusqu'à l'ADN envahisseur. Celui-ci possède une séquence d'ADN complémentaire au crRNA, et immédiatement suivie d'un motif de quelques nucléotides nommé PAM (« protospacer adjacent motif ») (Zhang *et al.*, 2014). La présence de ce motif PAM permet une recherche rapide de la séquence cible par le complexe CRISPR-Cas, puisque qu'il s'associe d'abord qu'aux PAM de l'ADN et non aux séquences complémentaires au crRNA (Sternberg *et al.*, 2014). L'obligation de d'abord reconnaître le PAM, présent dans l'ADN envahisseur, empêche une coupure non désirée de l'ADN de la cellule, puisque l'ADN double-brin ne sera dénoué qu'après la reconnaissance du PAM, permettant ainsi au crRNA d'accéder à la séquence d'ADN cible (Sternberg *et al.*, 2014). À la suite de cette étape, la nucléase Cas peut alors causer le DSB, occasionnant l'interférence de l'invasion par l'ADN étranger (Brouns *et al.*, 2008).

Ce système de défense bactérien a été adapté pour être utilisé en tant qu'outil moléculaire d'édition génomique, où le crRNA et le tracrRNA ont été fusionnés en un seul ARN guide (sgRNA ou ARNg), et où la séquence de reconnaissance de 20 nucléotides en 5' de cette chimère d'ARN est modifiable, permettant de cibler pratiquement n'importe quel gène d'intérêt d'un génome (figure 1.16) (Jinek *et al.*, 2012). Cet ARNg, associé à la nucléase Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) dont les codons ont été optimisés, permet au système CRISPR-Cas9 d'être exprimé dans des cellules de mammifères (Cong *et al.*, 2013). SpCas9 a pour motif PAM la séquence 5'-

NGG- 3', où N représente n'importe quel nucléotide (Jinek *et al.*, 2012), et celui-ci doit être présent sur le brin non ciblé (NT pour « not targeted ») à la séquence de l'ARNg (Stella *et al.*, 2017). Cette nucléase parvient à couper l'ADN double-brin grâce à deux domaines catalytiques : le brin ciblé (T pour « targeted ») par l'ARNg est clivé par le domaine HNH tandis que le second brin est pris en charge par le domaine RuvC (Gasiunas *et al.*, 2012). Cette coupure franche survient 3 nucléotides en amont du motif PAM, soit au niveau des positions 17 et 18 de la séquence de l'ARNg (Jinek *et al.*, 2012).

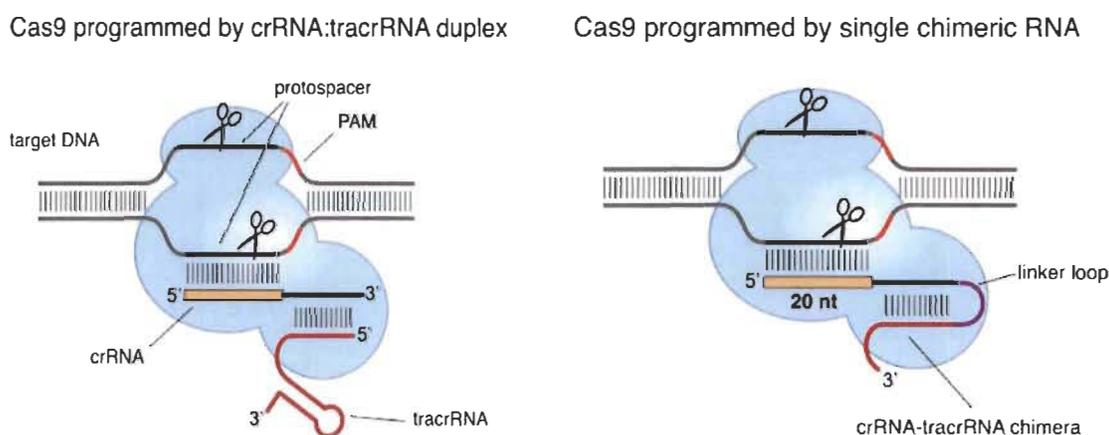


Figure 1.16 Adaptation du système CRISPR-Cas9 bactérien en outil moléculaire. Le système CRISPR-Cas9 est une adaptation du mécanisme bactérien, où le tracrRNA et le crRNA sont fusionnés à l'aide d'une boucle de liaison. (Jinek *et al.*, 2012)

Comparativement aux deux outils moléculaires précédents, où il est question de synthétiser des paires de protéines, le système CRISPR-Cas9 est beaucoup plus simple et facile à adapter. En effet, la protéine demeure toujours la même, et seul l'ARNg change. Les 20 nucléotides de celui-ci peuvent être conçus par ordinateur et commandés aisément, à très peu de frais, auprès de compagnies de biotechnologie au même titre que des amorces pour effectuer des PCRs, un procédé utilisé plus que fréquemment dans les laboratoires de biologie (Zhang *et al.*, 2014). De plus, ce système permet de modifier plus d'une cible à la fois, en fusionnant plusieurs séquences de 20 nucléotides espacées par des répétitions directes (DR pour « direct repeats »), telles que retrouvées dans le locus CRISPR des bactéries (Cong *et al.*, 2013).

1.4.3 Difficultés des outils moléculaires

Évidemment, chacune de ces méthodes possède leurs défauts et difficultés. L'optimisation de l'interaction protéine-ADN des ZFNs peut être très longue, puisque cette interaction se détermine de façon empirique (Drake & Bates, 2015). Les ZFNs et les TALENs sont tous les deux des constructions protéiques, plus difficiles et coûteuses à élaborer. De plus, dans ces méthodes, il est nécessaire d'introduire deux constructions par cellule pour obtenir la coupure de l'ADN, l'enzyme FokI ne fonctionnant qu'une fois dimérisée (Doyon *et al.*, 2011). Les TALENs sont d'autant plus de grosses protéines, puisque 34 acides aminés sont nécessaires pour reconnaître une seule paire de bases dans l'ADN, comparativement à 9 paires de bases reconnues par les 30 acides aminés des ZFNs (Maeder & Gersbach, 2016). De son côté, CRISPR-Cas9 est susceptible d'occasionner des mutations en dehors de la cible (« off-target »), étant donné que le système tolère la non-complémentarité d'un ou deux nucléotides lors de l'étape de la reconnaissance de la séquence cible (Fu *et al.*, 2013).

1.5 Problématique et objectifs de recherche

Compte tenu de toutes les informations sur le VIH-1 et les technologies que nous possédons actuellement, une solution pour parvenir à une cure stérilisante de l'infection au VIH-1 semble se trouver dans la thérapie génique. Notre laboratoire axant son champ d'expertise sur le facteur de restriction TRIM5 α , nous sommes parvenus à deux hypothèses concernant le mutant huTRIM5 α R332G-R335G et sa possible candidature pour une thérapie génique du VIH-1.

1.5.1 Objectif 1 : augmenter l'action de facteurs de restriction envers le VIH-1

Notre première hypothèse est qu'il est possible d'augmenter l'efficacité d'action du gène TRIM5 chez l'humain, dans l'optique de rendre les cellules résistantes au VIH-1, sans augmenter le niveau d'expression protéique ni causer de génotoxicité. Dans les publications précédentes de notre laboratoire, le mutant huTRIM5 α R332G-R335G

démontre une excellente capacité de restriction lorsque cette protéine est surexprimée dans des cellules humaines (Jung *et al.*, 2015; Pham *et al.*, 2010; Pham *et al.*, 2013). Pour obtenir une expression endogène de ce mutant, nous nous sommes tournés vers l'édition génomique par le système CRISPR-Cas9 décrit précédemment, en suivant la procédure élaborée par le laboratoire de Zhang (Ran *et al.*, 2013b). Nous avons comme objectifs d'éditer le gène humain TRIM5 afin que la version mutante R332G-R335G de la protéine soit exprimée dans ces cellules, et de démontrer par la suite que celles-ci possèdent désormais une résistance accrue face à l'infection au VIH-1 spécifiquement. Nos résultats de recherche pour cette partie du projet de maîtrise ont été regroupés pour la publication d'un article scientifique présenté en chapitre 2. Nous sommes parvenus à faire une édition génomique chez ~ 5% des clones isolés. Dix clones positifs ont été maintenus en culture et utilisés pour des analyses subséquentes de séquençage de nouvelle génération (NGS), et neuf d'entre eux possédaient un moins un allèle avec les mutations anti-VIH-1 R332G et R335G au sein du gène TRIM5. À ce jour, il s'agit d'une première étude où un facteur de restriction humain est amélioré *in vitro* dans des lignées cellulaires afin de rendre celles-ci résistantes au VIH-1, tout outil moléculaire à l'édition génomique confondu.

1.5.2 Objectif 2 : inhibition de la latence du VIH-1

La seconde hypothèse concerne plutôt le rôle d'activateur de l'immunité innée du facteur de restriction. Considérant que le promoteur du VIH-1 possède deux sites de liaison pour le facteur de transcription NF- κ B (Hiscott *et al.*, 2001), et que le rôle de senseur de l'immunité innée TRIM5 entraîne la translocation nucléaire d'AP-1 et de NF- κ B (Pertel *et al.*, 2011), nous avons formulé l'hypothèse que l'action de TRIM5 α pouvait activer la transcription des provirus VIH-1 latents. Plus précisément, l'idée était d'étudier l'effet de réactivation du provirus latent dans des cellules qui sont à nouveau infectées par le VIH-1, et que celui-ci est reconnu par huTRIM5 α R332G-R335G. Nous avons à notre disposition pour cette étude une lignée cellulaire possédant un provirus VIH-1 latent inductible associé à un gène rapporteur GFP : les THP-1-gag_{zip}-GFP, une lignée monocyttaire. Le mutant huTRIM5 α R332G-R335G y a été surexprimé par transduction lentivirale, et les cellules ont été infectées à l'aide d'un vecteur VIH-1-

NL4.3-DsRed. Les objectifs de ce second projet étaient de démontrer que la restriction d'une nouvelle infection au VIH-1 par huTRIM5 α R332G-R335G est associée à une activation de la transcription du provirus latent, puis que cette réactivation passe par la voie TAK-1, voie centrale activant les effecteurs de l'immunité innée que sont AP-1 et NF- κ B. Ce deuxième projet de maîtrise a permis d'obtenir des résultats préliminaires allant dans le sens de notre hypothèse, présentés en chapitre 3. Néanmoins, de plus amples expériences seront nécessaires dans l'avenir afin de confirmer le rôle préventif du mutant huTRIM5 α R332G-R335G dans l'établissement de la latence virale.

CHAPITRE II

EDITING OF HUMAN TRIM5 GENE TO INTRODUCE MUTATIONS WITH THE POTENTIAL TO INHIBIT HIV-1.

Caroline Dufour, Alix Claudel, Nicolas Joubarne, Natacha Mérindol, Tara Maisonnet, Nasser Masroori, Mélodie B. Plourde, Lionel Berthoux.

Le contenu de ce chapitre fait l'objet d'une publication en anglais publiée le 26 janvier 2018 pour la revue PlosOne. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191709>)

2.1 Contribution des auteurs

Caroline Dufour a conçu et effectué la majorité des expériences de ce projet, en plus d'avoir créé les figures et participé à la rédaction du manuscrit. Alix Claudel et Nicolas Joubarne, étudiants de baccalauréats en stage, ont également élaboré et exécuté une partie des manipulations expérimentales. Natacha Mérindol, post-doctorante, a aidé à la conception des expériences, à l'analyse et a effectué quelques manipulations. Tara Maisonnet, stagiaire de baccalauréat, a aussi effectué une expérience. Nasser Masroori, doctorant, a aidé à la conception des expériences. Mélodie B. Plourde, assistante de recherche, a participé à la conception des expériences et à l'analyse. Lionel Berthoux, directeur de recherche et superviseur du projet, a participé à la conception des expériences, à l'analyse et à la rédaction du manuscrit.

2.2 Résumé de l'article

Le facteur de restriction humain TRIM5 α est une protéine cellulaire stimulée par l'interféron de type I (IFN-I) qui bloque spécifiquement l'infection de rétrovirus non humains, tels les virus murin N-MLV et équin EIAV. Néanmoins, son potentiel restrictif envers le VIH-1 est relativement faible. Par contre, suite à la conversion de deux acides aminés arginine en glycine (R332G et R335G) au sein du domaine protéique responsable de la reconnaissance de la capsid virale, huTRIM5 α permet une restriction efficace du VIH-1 lorsque cette version mutante est stablement surexprimée dans des cellules humaines. La technologie CRISPR-Cas9 est une approche précise d'édition de l'ADN qui peut être utilisée pour modifier *TRIM5* dans des cellules humaines. Dans cette optique, nous avons introduit les deux mutations désirées dans *TRIM5* chez des cellules humaines HEK293T, bien que l'action antivirale de TRIM5 α soit faible dans cette lignée cellulaire. Selon un protocole simple de transfection du système d'édition génomique CRISPR-Cas9, nous sommes parvenus à muter le gène *TRIM5* pour sa version restrictive du VIH-1 dans les HEK293T grâce à la réparation dirigée par homologie (HDR). Nous avons isolé 9 clones cellulaires ayant intégré les deux mutations sur au moins un de leurs allèles (5,6 % d'efficacité) et un dixième clone qui contenait pour sa part que la mutation R332G. Nos résultats de séquençage nous ont permis de constater qu'aucun des clones n'avait été édité sur tous ses allèles, et de mettre en lumière la présence de mutations non désirée au sein de la séquence ciblée par l'ARNg chez la plupart d'entre eux. Notre étude démontre néanmoins la faisabilité de l'édition génomique de *TRIM5* dans des cellules humaines dans l'optique de les rendre résistantes à l'infection au VIH-1, tout en identifiant les difficultés à surmonter pour parvenir à cette restriction qui pourrait être utilisée comme potentielle thérapie génique contre ce virus.

2.3 Article complet : Editing of the Human TRIM5 Gene to Introduce Mutations with the Potential to Inhibit HIV-1.

ABSTRACT

The type I interferon (IFN-I)-inducible human restriction factor TRIM5 α inhibits the infection of human cells by specific nonhuman retroviruses, such as N-MLV and EIAV, but does not generally target HIV-1. However, the introduction of two aminoacid substitutions, R332G and R355G, in the human TRIM5 α (huTRIM5 α) domain responsible for retroviral capsid recognition leads to efficient HIV-1 restriction upon stable over-expression. CRISPR-Cas-based approaches to precisely edit DNA could be employed to modify *TRIM5* in human cells. Toward this aim, we set out to introduce the desired modifications in *TRIM5* of the human cell line HEK293T, even though TRIM5 α has low antiviral activity in this specific cell line. Using a DNA transfection-based CRISPR-Cas9 genome editing protocol, we successfully mutated *TRIM5* to its potentially HIV-1-restrictive version by homology-directed repair (HDR) in HEK293T cells. Nine clones bearing at least one HDR-edited *TRIM5* allele containing both mutations were isolated (5.6% overall efficiency), whereas another one contained only the R332G mutation. Of concern, several of these HDR-edited clones contained on-target undesired mutations, and none had all the alleles corrected. Our study demonstrates the feasibility of editing the TRIM5 gene in human cells and identifies the main challenges to be addressed in order to use this approach to confer protection from HIV-1.

INTRODUCTION

Viruses are obligate parasites whose success at infecting a host cell typically requires evasion from antiviral factors. In mammals, many cellular antiviral factors that can potentially interfere with the progression of viral infections have been identified. These factors can often act without external stimulation, but their expression and activity are enhanced by type I interferons (IFN-I) [1]. Among the IFN-stimulated genes (ISGs) relevant to retroviruses, the family of viruses to which HIV-1 belongs, is *TRIM5*, which encodes the cytoplasmic protein TRIM5 α [2]. In humans, *TRIM5* is transcribed into 5 isoforms, among which only TRIM5 α possesses antiviral activity [3]. At its C-terminus, a domain called SPRY (PRYSPRY, B30.2) determines the retrovirus targeting specificity. This domain comprises hyper-variable loops that directly interact with the N-terminal domain of capsid proteins early after entry of the retrovirus into the host cell membrane [4]. When such interactions occurs, the retrovirus is inhibited (“restricted”) through mechanisms that include destabilization of the capsid core [5], proteasomal degradation of some core components [6] and sequestration of the viral particle in TRIM5 α cytoplasmic bodies [7]. huTRIM5 α generally has little-to-no activity against HIV-1, but efficiently inhibits the infectivity of the nonhuman gammaretrovirus “N-tropic” murine leukemia virus (N-MLV) as well as the nonhuman lentivirus equine infectious anemia virus (EIAV) [8]. Those two viruses are typically inhibited ~10-fold (EIAV) and ~100-fold (N-MLV) by endogenous huTRIM5 α , with some variation depending on the cellular context.

Several groups, including ours, have attempted to harness the antiviral power of TRIM5 α in order to interfere with HIV-1. This virus is efficiently restricted (~100-fold) by some orthologs of TRIM5 α found in Old World monkeys such as the Rhesus macaque TRIM5 α (rhTRIM5 α) [2]. However, significant sequence variation between the human and macaque orthologs preclude the possibility of using the latter one in gene therapy approaches, as this would increase the risk to elicit an immune response against the transgene in patients. Thus, all the studies have consisted in over-expressing versions of huTRIM5 α designed to target HIV-1 through modifications in the SPRY domain. Some of the TRIM5 α variants used were chimeric products containing small regions of

rhTRIM5 α in the SPRY [9,10]. Other teams mapped with further precision the HIV-1 restriction determinants in rhTRIM5 α that were absent in huTRIM5 α , leading to the discovery that mutating the Arg332 residue in huTRIM5 α was sufficient to inhibit HIV-1. Although initial observations [11,12] raised the hope that single mutations at this position might inhibit HIV-1 as efficiently as rhTRIM5 α did, later work made it clear that this was not the case [13].

Our laboratory explored a different approach: generating libraries of TRIM5 α SPRY mutants then applying a functional screen to isolate mutants that conferred HIV-1 restriction [14,15]. These studies identified mutations at Arg335 inhibiting HIV-1 by 5- to 10-fold. When we combined a mutation at Arg335 (R335G) with one at Arg332 (R332G), we obtained restriction levels that were higher than with either of the single mutants [14,15]. Although not quite as restrictive as rhTRIM5 α , R332G-R335G huTRIM5 α efficiently inhibited the propagation of a highly pathogenic strain of HIV-1, and cells expressing the transgene had a survival advantage over unmodified cells [13].

Although R332G-R335G huTRIM5 α is considered a prime candidate in HIV-1 gene therapy approaches to inhibit HIV-1, using viral vectors to overexpress it in human cells is not without caveats. Indeed, the physiological effects of TRIM5 α overexpression *in vivo* are not clear, considering that it is involved in innate immune responses [16,17] and possibly in autophagy [18]. In addition, the genotoxicity of lentiviral vectors integrating in the human genome is still poorly predictable. In the longer term, it would thus be desirable to be able to introduce mutations in the endogenous human *TRIM5* by genome editing. The most advanced approach toward this aim consists in inducing double strand DNA breaks through the use of the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats with Cas9 (CRISPR-Cas9) system, and simultaneously providing a single-stranded “donor DNA” to serve as a template for homology-directed repair (HDR) [19,20]. In this report, we use a simple, DNA transfection-based protocol to introduce the various components required into a highly transfection-permissive human cell line, HEK293T. We successfully mutate Arg332 and Arg335 of *TRIM5* in these

cells, although undesired mutations are also found and no cell clone could be isolated that had all *TRIM5* alleles bearing the corrections.

RESULTS

HEK293T cells provide a poor cellular environment for TRIM5 α antiviral activity.

HEK293T cells were chosen for this study due to their very high permissiveness to DNA transfection [21], thus allowing us to test our general strategy using simple, cost-effective methods of proven robustness. Perhaps surprisingly, considering that HEK293T cells are commonly used to produce retroviral vectors, the capacity of TRIM5 α to inhibit retroviruses in this cell line is poorly known. We found one study, in which the stable transduction of rhTRIM5 α leads to a ~5-fold decrease in permissiveness to a GFP-expressing HIV-1 vector [22], which is more than 10-fold lower than what is usually found in other human cell lines in similar experimental settings [14,17]. To evaluate the potential of HEK293T cells as a cellular model for R332G-R335G huTRIM5 α -mediated HIV-1 restriction, we retrovirally transduced the gene in this cell line and (as a control) in the monocytic cell line THP-1. The unmutated (wild-type, WT) version of huTRIM5 α , which restricts HIV-1 at very low levels, was used as an additional control. Untransduced cells were killed by antibiotic treatment. Then, the cells were challenged with an HIV-1 vector expressing GFP, and the percentage of infected cells was determined by FACS. We found that in THP-1 cells, over-expression of R332G-R335G huTRIM5 α but not WT huTRIM5 α reduced permissiveness to HIV-1 by ~100-fold, whereas the magnitude of the restriction was much smaller (~3-fold) in HEK293T (Fig. 1A). These results suggest that HEK293T cells are only moderately conducive of restriction by over-expressed TRIM5 α . To investigate whether this observation extended to the endogenous TRIM5 α in HEK293T, we infected these cells with increasing amounts of N-MLV_{GFP} and B-MLV_{GFP}. As a control, we used the same vectors to infect Jurkat cells. When the amounts of vectors used were normalized for their infectious power in a non-restrictive cell line (CRFK cells), we found that as expected, N-MLV_{GFP} was highly restricted in Jurkat cells, compared with B-MLV_{GFP} (Fig. 1B). In contrast, N-MLV_{GFP} was only 2- to 3-times less infectious than B-MLV_{GFP} in HEK293T cells (Fig. 1B). Such poor restriction levels

could be explained by low *TRIM5 α* expression levels. In order to boost *TRIM5* transcription, we treated the cells with IFN- α , IFN- β or IFN- ω and then infected them with the two MLV-based vectors (Fig 1C). We observed that treatment with IFN- α and IFN- β , but not IFN- ω , slightly decreased (2-fold) the infectivity of the N-MLV vector and had no effect on B-MLV. Thus, IFN-I treatments moderately enhanced the restriction of N-MLV but failed to induce restriction levels consistent with what is generally found for this murine virus in human cells. We conclude that the potential for *TRIM5 α* -mediated restriction is abnormally low in HEK293T cells, irrespective of whether *TRIM5 α* is expressed endogenously or exogenously and irrespective of the restricted virus.

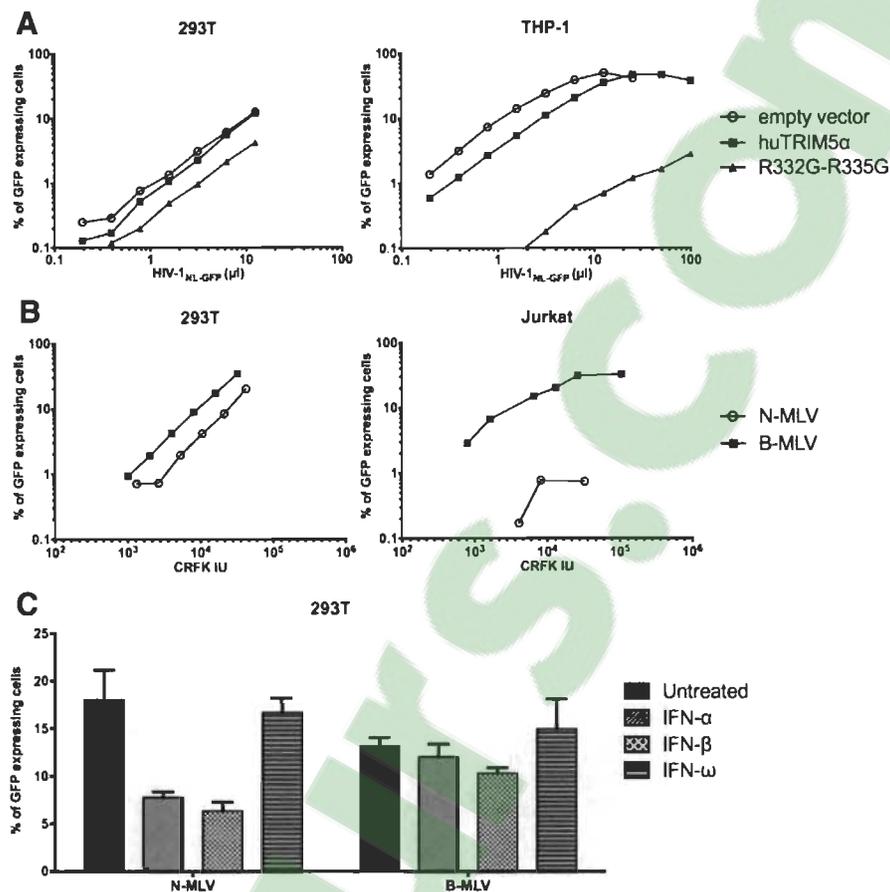


Fig 1. Restriction by exogenous or endogenous TRIM5 α is inefficient in HEK293T cells. (A) HEK293T and THP-1 cells were retrovirally transduced with WT huTRIM5 α , R332G-R335G huTRIM5 α or with the “empty” vector as indicated. Untransduced cells were eliminated by hygromycin treatment, and the cell populations were then challenged with increasing amounts of the HIV-1_{NL-GFP} vector. The percentage of cells expressing GFP was then determined by FACS. (B) HEK293T Jurkat cells were infected with increasing amounts of N-MLV_{GFP} and B-MLV_{GFP}. The amounts of virus used are expressed as multiplicities of infection (MOI) as calculated in the non-restrictive CRFK cells. The percentage of infected cells was determined by FACS. For N-MLV in Jurkat cells, only the 3 virus doses that yielded detectable infections are shown. (C) HEK293T cells were treated with IFN- α , IFN- β or IFN- ω for 16h prior to a single-dose infection with N-MLV_{GFP} and B-MLV_{GFP}. The percentage of infected cells was determined by FACS.

Strategy for the mutagenesis of *TRIM5* by HDR. Human *TRIM5* is found on chromosome 11p15.4 and the region of the gene encoding the SPRY domain is present in exon 8 (Fig 2A). We searched for DNA loci close to the codons for Arg332 and Arg335 that would be potential targets for CRISPR-Cas9-mediated double-strand cleavage. CRISPR guide RNAs (gRNAs) were designed for the 3 potential target sites that were nearest to the two codons to be mutated (Fig 2B). CRISPR plasmids expressing Cas9 along with one of the designed gRNAs were transfected in human embryonic kidney 293T cells (HEK293T), and a Surveyor assay was performed to test the capacity of the three gRNAs to target the endogenous *TRIM5* gene. Results showed that all three gRNAs were competent (Fig 2B). Because gRNA1 induces a cleavage that is closest to the targeted codons (right before the first nt of Arg332), the rest of the project was carried out with this gRNA. The HDR donor DNA consisted of a single-stranded oligodeoxynucleotide (ssODN) that was 200 nt long and antisense relative to the gRNA, in keeping with published methods [19,23]. The central section of this ssODN containing the mutations introduced is shown in Fig 2C (depicted in the same orientation as the *TRIM5* mRNA for clarity purposes). In addition to the mutations substituting arginine residues into glycine at positions 332 and 335, we included 4 silent mutations in the region recognized by the gRNA and 1 more silent mutation in the protospacer adjacent motif (PAM), amounting to a total of 7 substitutions expected to prevent the cleavage of the donor DNA by Cas9. One of the mutations also created a *Hae*III cut site for convenient downstream screening of the cell clones obtained.



Fig 2. Design of the gRNA and donor ssODN for the HDR-mediated editing of *TRIM5*. (A) *TRIM5* localization on chromosome 11 (top), and Arg332-Arg335 localization in exon 8 of the gene (bottom). (B) Top panel: position of the three gRNAs (gRNA1, 9 and 19) designed to target the Arg332-Arg335 region. The two arginine codons are underlined and in bold. Bottom panel: Surveyor assay following the transfection of HEK293T cells with CRISPR-Cas9 plasmids expressing one of the three gRNAs. WT DNA from nontransfected cells was used as a control. (C) HDR donor DNA mutagenesis strategy. 8 substitutions were present, including three nonsilent substitutions to mutate Arg332 and Arg335 into Gly (green), one silent mutation to disrupt the PAM sequence (pink), and four silent mutations in the sequence targeted by gRNA1 (orange). The HaeIII restriction site created as a result of one of the silent substitutions is indicated, as is the position of the primer used in specific PCR screening.

Isolation of *TRIM5*-edited HEK293T clones. We transiently transfected a plasmid (pX459) expressing Cas9 and the gRNA1 into HEK293T cells, along with the ssODN. Single-cell clones were then isolated by limiting dilution. We screened 161 clones at random for the presence of HDR-modified alleles by specifically amplifying the mutated *TRIM5* sequence using a primer whose sequence is indicated in Fig 2C. As shown in Fig 3, 14 clones showed a positive signal (of varying intensity) in this assay. One of the clones, F2X, yielded a band whose size seemed bigger compared to another positive clone (C8) analyzed on the same gel.

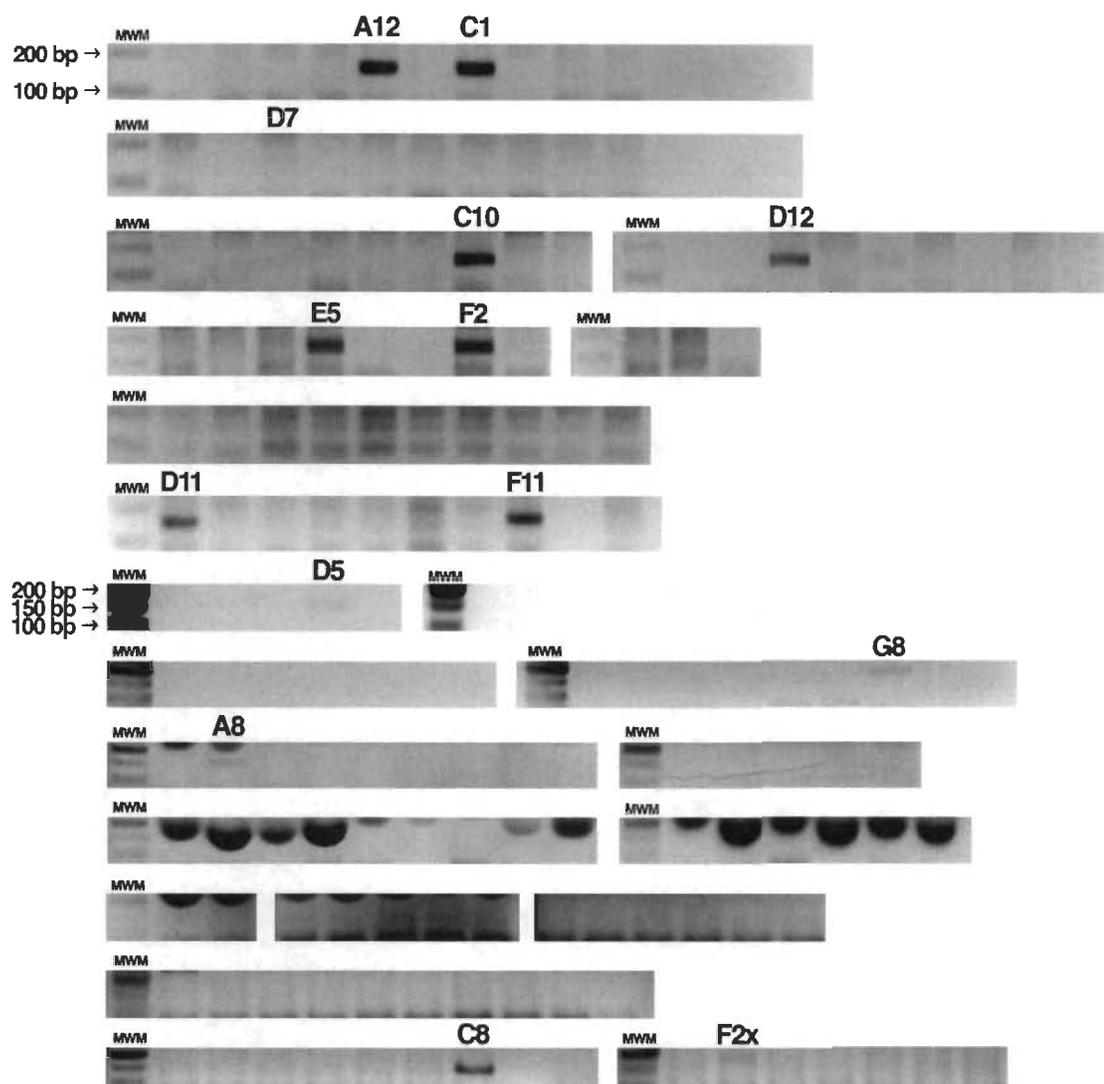


Fig 3. Pre-screening of isolated clones by specific PCR. Following 20 days of growth, 161 isolated HEK293T clones were screened for HDR-edited TRIM5 gene by mutation-specific PCR. 14 clones that passed this pre-screen step are indicated by their names. MWM, molecular weight marker.

All these clones (minus A12, which did not survive) were re-analyzed using the same specific PCR assay and also using a second assay in which the targeted region is amplified and then digested by HaeIII, which cuts at a site created by one of the silent mutations (see Fig 1C). In the latter assay, amplification was done using primers that bind outside the 200 nts corresponding to the donor ssODN in order to insure that the

ssODN was not inadvertently detected. Figure 4 shows a positive signal for 10 of these clones in both assays. The three remaining clones were negative in both assays.

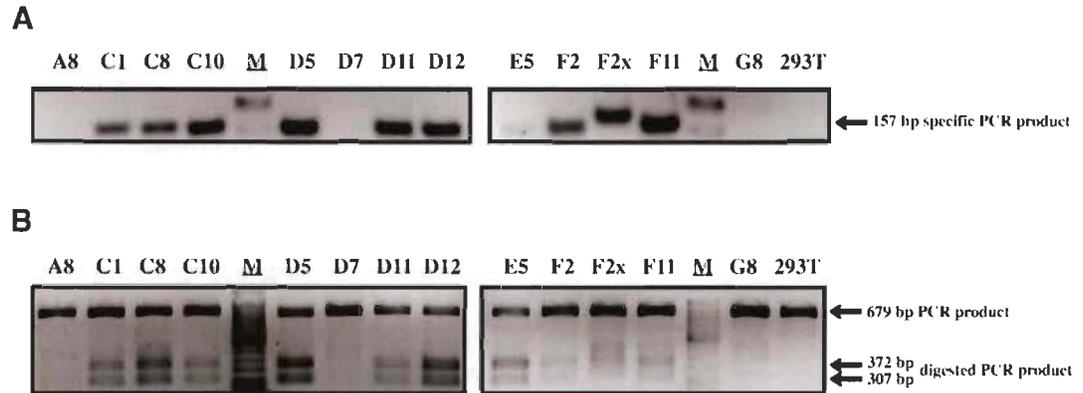


Fig 4. Identification of HDR-edited clones. Following the isolation of HEK293T clones, HDR-edited clones were identified by a dual PCR screen. The figure shows the analysis of 13 clones that passed a pre-screen step (see Supporting Information). (A) PCR using a primer specific for the mutated *TRIM5*. Untransfected HEK293T cells were used as a control. M, molecular weight marker. (B) Non-specific PCR of the targeted region followed by HaeIII digestion. The expected sizes of the digested PCR products are shown on the right. The full-length gels are available on the FigShare public repository (see “Availability of data” section).

Genotype analysis. The 10 clones showing indications of HDR-mediated editing were then subjected to PCR using the same primers that were also utilized in the HaeIII screen described above. PCR products were analyzed by deep sequencing, and a color-coded alignment of the results is shown in Fig 5. The HEK293 cells and their derivatives are pseudotriploid [24] and accordingly, we found that two clones had two *TRIM5* alleles and seven were triploid. F2X seemed to possess 6 *TRIM5* alleles, a finding that is discussed below. For each clone, both desired mutations at Arg332 and Arg335 were present on one allele or more, with the exception of F2 which only had the Arg332 mutation. However, only one clone (D11) contained an allele with all 8 substitutions present. The HDR-generated alleles in the other cell clones generally contained the

expected mutations in the PAM-proximal side of the cleavage site, with the exception of F2 which lacked the A-to-G mutation required to introduce the R335G change. All HDR-generated alleles had the A-to-C silent mutation creating the HaeIII restriction site at the first nucleotide upstream of the cleavage site on the PAM-distal side. This is consistent with the fact that all clones that were found to be positive in the specific PCR screen were also positive in the HaeIII assay (Fig 4). Strikingly, for the three other substitution mutations in the PAM-distal region, only one clone (D11) had all of them whereas another one (F11) had only one. It would be tempting to conclude that HDR is biased so that mutations were more likely to be incorporated in the PAM-proximal side of the cut, and other teams have reported such imbalances in the conversion rate [25]. On the other hand, our specific PCR screen requires a successful amplification using a primer whose 3' half is complementary to the PAM-proximal region (Fig 2C), thus creating a bias toward the detection of mutated DNA containing the expected mutations in this PAM-proximal region.

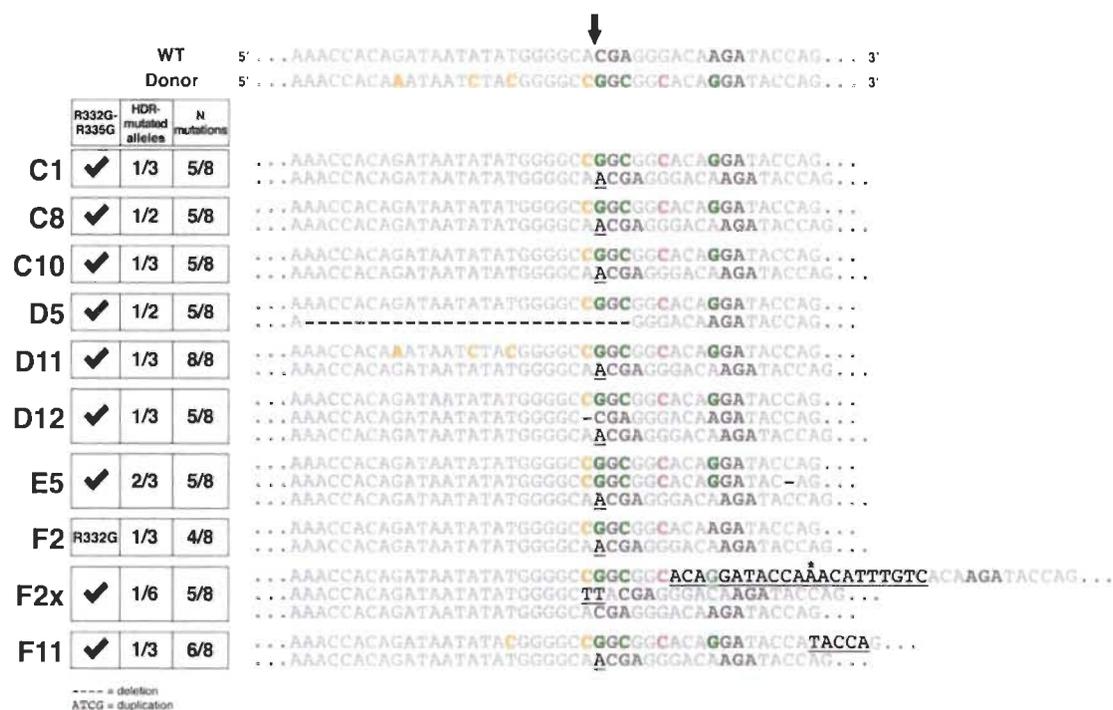


Fig 5. Deep sequencing analysis of *TRIM5* editing in 10 screened clones. The ~200-nt HDR-targeted *TRIM5* region was amplified by PCR and the PCR products were then analyzed by Illumina MiSeq sequencing. The alignment shown includes the targeted locus for each allele of the 10 clones, in comparison with the WT sequence and with the expected HDR-mutated sequence (top 2 lines). Expected substitutions are shown in green (R332G/R335G) and orange (silent mutations). The star indicates the position of an unexpected substitution within a duplicated region in one allele of F2X. duplications/insertions are underlined whereas deletions are represented by dashes. The Cas9 cleavage site on the WT sequence is shown at the top. On the left is a table summarizing the results obtained for each clone: presence of the two therapeutic mutations R332G/R335G, proportion of *TRIM5* alleles modified by HDR and the proportion of the expected substitution mutations in the HDR-edited alleles. Note that only one clone (D11) has an allele containing all the desired mutations and that most of the non-HDR-edited alleles contain indels at the cleavage site.

Some HDR-generated alleles showed additional, unexpected mutations. In E5, one of the two HDR alleles had a one-nt deletion 16 nts from the cleavage site in the PAM-

proximal region. In F11, the HDR allele had a 5 nt (TACCA) duplication in the same region. F2X showed an intriguing genotype: firstly, we found that the HDR allele was present in 17 % (1:6) of the amplicons, whereas 33 % (2:6) were wild-type (WT) and 50% (3:6) contained a TT insertion. HEK293 cells are known to be prone to chromosomal translocations leading to a high level of variation in copy numbers [26], which might explain our findings. The HDR-generated allele in F2X had a surprising structure, with a 21 nt duplication consistent with the slower-migrating bands in Fig 3 and in Fig 4. The repeated sequence that was closest to the cleavage site had the expected mutations in the PAM and at Arg335 and also contained an additional substitution (G-to-A) that is not present in the donor ssODN, whereas the second repeat of this sequence only had the G-to-C mutation in the PAM. These HDR-generated alleles that also contained unexpected insertions/deletions (indels) are unlikely to encode functional TRIM5 α , due to the frameshifts leading to premature termination (E5, F11) or due to the insertion of 7 aminoacids at a region crucial for capsid binding (F2X). The rest of the HDR-generated alleles (in C1, C8, C10, D5, D12 and one of the two HDR alleles in E5), however, may potentially encode proteins that efficiently target HIV-1.

Examination of the *TRIM5* alleles not modified by HDR in these cell clones revealed that they showed clear signs of NHEJ-induced mutations, i.e. indels at the cleavage site. 8 alleles had an A inserted at the cleavage site, whereas one of the F2X alleles had a TT inserted at the same locus. The A insertion was so prevalent that in half of the clones (C1, C10, D11, F2, F11), 2 of the 3 *TRIM5* copies were mutated by NHEJ leading to this particular mutation. Although the nature of NHEJ-directed mutations is known to vary widely depending on the gRNA used [27], such +1 insertions have been described to be prevalent as a result of Cas9 editing [28,29]. One D5 allele had a larger, 27 nt-long deletion whereas one D12 allele had a single deletion at the cleavage site. Therefore, and with the exception of F2X, our data strongly suggest that in all cell clones in which one or two of the *TRIM5* alleles were mutated by HDR, the remaining alleles were mutated by NHEJ. This is consistent with findings published by others [19]. Furthermore, these NHEJ-generated *TRIM5* alleles are all expected to encode non-

functional TRIM5 α due to missense mutations in the SPRY domain and premature termination.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first attempt at using genome editing to mutate a restriction factor with the aim of conferring an innate antiviral function in human cells. Our preliminary observations indicated that restriction by TRIM5 α was suboptimal in HEK293T cells. We nonetheless went ahead and attempted genome editing in this cell line, reasoning that this would provide valuable information on the efficiency and accuracy of the editing procedure itself. In order for HDR-mediated editing of a restriction factor like TRIM5 α to be successful, it is presumably desirable to be able to modify both alleles of the gene in diploid cells. In addition, no additional mutations (indels especially) should be present. Our results show that on both of those points, challenges lie ahead. In all but one of the clones in which the two therapeutic mutations were present, they were found on only one allele. In almost all cases, the non-HDR-corrected allele(s) contained indels, a clear sign of NHEJ-mediated repair. It is predicted that the SPRY-truncated TRIM5 α proteins resulting from the presence of such indels will interact with the full-length TRIM5 α and will interfere with its targeting of incoming retroviruses, similar to the activity of natural, shorter TRIM5 isoforms [3,30]. Another pitfall is the occurrence of unwanted on-target indels, which we observed in 3 out of 9 alleles bearing the two therapeutic mutations in this study. We did not observe HIV-1 restriction activity in any of the 9 cell clones (not shown), which likely resulted from a combination of causes including the suboptimal cellular environment and allelic heterogeneity. In conclusion, in order to obtain scarless modification of *TRIM5* by HDR, we will need to address the difficulty of achieving bi-allelic HDR-mediated editing while avoiding the advent of additional mutations in the modified alleles. Recent technological advances, including the development of a marker-free system to enrich cells in which HDR occurred [31], are likely to enhance editing efficiency as well as bi-allelic editing.

METHODS

Cells and *TRIM5* genotyping. HEK293T and CRFK cells were maintained in DMEM medium (HyClone). THP-1 and Jurkat cells were maintained in RPMI medium (Hyclone). All culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin (HyClone). To analyze the sequence of the targeted genomic region, cellular DNA was prepared using the Bioline genomic DNA kit (London, UK), and the *TRIM5* region encompassing the targeted locus was PCR-amplified using primers T5a_Surveyor_fwd (5'GTCCGACGCTACTGGGGTAAG) and T5a_Surveyor_rev (5'ATAATCACAGAGAGGGGCACA). The PCR product was Sanger-sequenced using the same primers. We found no variation in this region compared to the consensus sequence (NCBI Gene ID: 85363).

Design of gRNAs and Surveyor assay. The lentiviral expression vector pLentiCRISPRv2 (pLCv2) was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid # 52961) [32]. Three gRNAs targeting *TRIM5* were designed using the Zhang lab online software available at crispr.mit.edu. The sequences targeted are 5'AGATAATATATGGGGCACGA (gRNA1), 5'CCGAAACCACAGATAATATA (gRNA9) and 5'AATTGAAATTCACAAATGTC (gRNA19). The ODNs needed for the generation of pLCv2-based constructs targeting those sequences were designed exactly as described in published protocols [27,32]. Sense/antisense pairs of primers were annealed and cloned into pLCv2 cut with BsmBI. To evaluate the capacity of the constructed plasmids to induce on-target indels in *TRIM5*, a surveyor nuclease assay was performed. HEK293T cells were transfected with either pLCv2-gRNA1, -gRNA9 or -gRNA19 using polyethyleneimine [33]. 3 d later, the genomic DNA was extracted from the transfected cells using the Bioline genomic DNA kit. The targeted *TRIM5* region was PCR-amplified using primers T5a_Surveyor_fwd and T5a_Surveyor_rev. PCR amplicons were heat-denatured at 95 °C, and re-annealed by slow cooling to promote formation of dsDNA heteroduplexes. The heteroduplexes were then cleaved by Surveyor nuclease S provided as part of the Transgenomic Surveyor mutation detection kit (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA), according to the manufacturer's instructions. Digestion products were visualized by agarose gel electrophoresis.

Design of the HDR donor DNA and *TRIM5* editing. The following *TRIM5* minus strand-derived HDR DNA was synthesized by Integrated DNA Technologies: 5'CGTCTACCTCCCAGTAATGTTTCCCTGATGTGATACTTTGAGAGCCCAGGATGCCAGTACAATAATTGAAATTCACAAATGTCTGGTATCCTGTGCCGCCGCCGCCGTAGATTATTTGTGGTTTCGGAGAGCTCACTTGTCTCTTATCTTCAGAAATGACAGCACATGAAATGTTGTTTGGAGCCACTGTCACATCAACT. Residues mutated compared to the WT *TRIM5* sequence are underlined. pX459-gRNA1 was constructed in a manner similar to pLCv2-gRNA1, by ligating the corresponding annealed gRNA1 ODN duplex into pX459 (pSpCas9(BB)-2A-Puro; Addgene #62988) [34] digested with BbsI. HEK293T cells were plated in 6-well plates at 2.7×10^5 per well and transfected the next day using polyethyleneimine, with 2.5 μ g of pX459-gRNA1 together with 5 μ l of the HDR DNA prepared at 20 μ M. When cells reached confluence, they were trypsinized and plated at 0.5 cell per well in 96-well plates, using conditioned medium. To screen the colonies for HDR-mediated *TRIM5* editing, part of the cells were lysed in the DirectPCR Lysis reagent (Viagen Biotech, Los Angeles, USA) diluted 1:1 in proteinase K-containing water as recommended by the manufacturer. Lysis was allowed to proceed overnight at 55°C followed by heating at 85°C for 90 min to deactivate proteinase K. For the specific PCR-based screening, 5 μ l of the lysed cells were subjected to PCR using primers T5a_mut_fwd (5'-AAATAATCTACGGGGCCGGCGGCACAG) and T5a_qPCR_rev (5'-CCAGCACATACCCCCAGGAT). PCR was performed for 30 cycles using the following conditions: 30 sec at 94°C, 30 sec at 61.5°C, 30 sec at 68°C. The 157-bp expected PCR product was resolved on agarose gels. For the HaeIII-based screening, lysed cells were subjected to PCR using primers T5a_Surveyor_fwd and T5a_Surveyor_rev, similar to the Surveyor assay. 10 μ l of the PCR product were digested by HaeIII for 60 min at 37°C. The reaction products were analyzed using agarose gels in order to reveal the 307-bp and 372-bp bands corresponding to digested products. For MiSeq sequencing, cellular DNA was submitted to PCR using the following ODNs, which bind to DNA sequences located 10 nt outside the 200 nt-long region corresponding to the HDR: huTR5aGG_seq_FOR,

5'ACACTGACGACATGGTTCTACAATCCCTTAGCTGACCTGTTA, and
huTR5aGG_seq_REV,
5'TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTCCCCCAGGATCCAAGCAGTT. The
underlined sequences are barcodes. MiSeq sequencing results were analyzed using the
online tool Integrative Genomics Viewer
(<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>).

Retroviral vectors production and viral challenges. To generate the HEK293T cells stably expressing WT and R332G-R335G huTRIM5 α , cells were transduced with the corresponding pMIH-huTRIM5 α vectors followed by puromycin selection as described previously [14]. To produce GFP-expressing retroviral vectors, HEK293T cells were seeded in 10 cm culture dishes and transiently co-transfected with the following plasmids: pMD-G, pCNCG and pCIG3-B or pCIG3-N to produce B-MLV_{GFP} and N-MLV_{GFP}, respectively; pMD-G and pHIV-1_{NL-GFP} to produce HIV-1_{NL-GFP} (see [35,36] and references therein). Retroviral vector preparations were titrated by infecting cat CRFK cells with multiple vector doses and then calculating the MOI based on nonsaturating virus doses. For retroviral challenges, cells were seeded into 96-well plates at 10,000 cells per well and infected the following day with the GFP-expressing retroviral vectors. Cells were trypsinized at 2 d post-infection and fixed in 2.5% formaldehyde (Fisher Scientific, MA, USA). The percentage of GFP-positive cells was then determined by analyzing 1×10^4 cells on a FC500 MPL cytometer (Beckman Coulter, CA, USA) using the CXP Software (Beckman Coulter). For infections done in presence of IFN-I, recombinant human IFN- α , IFN- β or IFN- ω (PeproTech, Rocky Hill, NJ) was added to cell cultures 16 h prior to infection and at a final concentration of 10 ng/ml.

AVAILABILITY OF MATERIALS AND DATA

The datasets generated in the course of this study are available in the FigShare repository, https://figshare.com/projects/Dufour_et_al_2017/24445. Biological materials are available for sharing.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Feng Zhang (Broad Institute, Cambridge, USA) for sharing reagents. We thank Pierre Lepage and Frédérick Robidoux (Genome Quebec Innovation Center, Montréal) for help with MiSeq data generation and analysis.

References

1. Schoggins JW, Rice CM (2011) Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* 1: 519-525.
2. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, et al. (2004) The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427: 848-853.
3. Battivelli E, Migraine J, Lecossier D, Matsuoka S, Perez-Bercoff D, et al. (2011) Modulation of TRIM5alpha activity in human cells by alternatively spliced TRIM5 isoforms. *J Virol* 85: 7828-7835.
4. Malim MH, Bieniasz PD (2012) HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006940.
5. Takeda E, Kono K, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, et al. (2015) Fluorescent image analysis of HIV-1 and HIV-2 uncoating kinetics in the presence of old world monkey TRIM5alpha. *PloS one* 10: e0121199.
6. Kutluay SB, Perez-Caballero D, Bieniasz PD (2013) Fates of Retroviral Core Components during Unrestricted and TRIM5-Restricted Infection. *PLoS Pathog* 9: e1003214.
7. Campbell EM, Perez O, Anderson JL, Hope TJ (2008) Visualization of a proteasome-independent intermediate during restriction of HIV-1 by rhesus TRIM5alpha. *J Cell Biol* 180: 549-561.
8. Keckesova Z, Ylinen LM, Towers GJ (2004) The human and African green monkey TRIM5alpha genes encode Ref1 and Lv1 retroviral restriction factor activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10780-10785.
9. Walker JE, Chen RX, McGee J, Nacey C, Pollard RB, et al. (2012) Generation of an HIV-1-resistant immune system with CD34(+) hematopoietic stem cells transduced with a triple-combination anti-HIV lentiviral vector. *J Virol* 86: 5719-5729.
10. Sawyer SL, Wu LI, Emerman M, Malik HS (2005) Positive selection of primate TRIM5alpha identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2832-2837.
11. Li Y, Li X, Stremlau M, Lee M, Sodroski J (2006) Removal of arginine 332 allows human TRIM5alpha to bind human immunodeficiency virus capsids and to restrict infection. *J Virol* 80: 6738-6744.

12. Yap MW, Nisole S, Stoye JP (2005) A single amino acid change in the SPRY domain of human Trim5alpha leads to HIV-1 restriction. *Curr Biol* 15: 73-78.
13. Jung U, Urak K, Veillette M, Nepveu-Traversy ME, Pham QT, et al. (2015) Preclinical Assessment of Mutant Human TRIM5alpha as an Anti-HIV-1 Transgene. *Hum Gene Ther* 26: 664-679.
14. Pham QT, Bouchard A, Grutter MG, Berthoux L (2010) Generation of human TRIM5alpha mutants with high HIV-1 restriction activity. *Gene Ther* 17: 859-871.
15. Pham QT, Veillette M, Brandariz-Nunez A, Pawlica P, Thibert-Lefebvre C, et al. (2013) A novel aminoacid determinant of HIV-1 restriction in the TRIM5alpha variable 1 region isolated in a random mutagenic screen. *Virus Res*.
16. Pertel T, Hausmann S, Morger D, Zuger S, Guerra J, et al. (2011) TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* 472: 361-365.
17. Nepveu-Traversy ME, Berthoux L (2014) The conserved sumoylation consensus site in TRIM5alpha modulates its immune activation functions. *Virus Res* 184C: 30-38.
18. Ribeiro CM, Sarrami-Forooshani R, Setiawan LC, Zijlstra-Willems EM, van Hamme JL, et al. (2016) Receptor usage dictates HIV-1 restriction by human TRIM5alpha in dendritic cell subsets. *Nature* 540: 448-452.
19. Paquet D, Kwart D, Chen A, Sproul A, Jacob S, et al. (2016) Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* 533: 125-129.
20. Liang X, Potter J, Kumar S, Ravinder N, Chesnut JD (2017) Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *J Biotechnol* 241: 136-146.
21. Stepanenko AA, Dmitrenko VV (2015) HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene* 569: 182-190.
22. Saenz DT, Teo W, Olsen JC, Poeschla EM (2005) Restriction of feline immunodeficiency virus by Ref1, Lv1, and primate TRIM5alpha proteins. *J Virol* 79: 15175-15188.

23. Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA (2014) Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife* 3: e04766.
24. Bylund L, Kytola S, Lui WO, Larsson C, Weber G (2004) Analysis of the cytogenetic stability of the human embryonal kidney cell line 293 by cytogenetic and STR profiling approaches. *Cytogenet Genome Res* 106: 28-32.
25. Kan Y, Ruis B, Takasugi T, Hendrickson EA (2017) Mechanisms of precise genome editing using oligonucleotide donors. *Genome Res* 27: 1099-1111.
26. Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, et al. (2014) Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun* 5: 4767.
27. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, et al. (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343: 84-87.
28. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339: 823-826.
29. Yang L, Guell M, Byrne S, Yang JL, De Los Angeles A, et al. (2013) Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic acids research* 41: 9049-9061.
30. Berthoux L, Sebastian S, Sayah DM, Luban J (2005) Disruption of human TRIM5alpha antiviral activity by nonhuman primate orthologues. *J Virol* 79: 7883-7888.
31. Agudelo D, Durringer A, Bozoyan L, Huard CC, Carter S, et al. (2017) Marker-free coselection for CRISPR-driven genome editing in human cells. *Nat Methods* 14: 615-620.
32. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F (2014) Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 11: 783-784.
33. Masroori N, Cherry P, Merindol N, Li JX, Dufour C, et al. (2017) Gene Knockout Shows That PML (TRIM19) Does Not Restrict the Early Stages of HIV-1 Infection in Human Cell Lines. *mSphere* 2.
34. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, et al. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8: 2281-2308.

35. Masroori N, Merindol N, Berthoux L (2016) The interferon-induced antiviral protein PML (TRIM19) promotes the restriction and transcriptional silencing of lentiviruses in a context-specific, isoform-specific fashion. *Retrovirology* 13: 19.
36. Berthoux L, Sebastian S, Sokolskaja E, Luban J (2005) Cyclophilin A is required for TRIM5alpha-mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14849-14853.

CHAPITRE III

INHIBITION DE LA LATENCE DU VIH-1 : UNE POSSIBLE FONCTION DU FACTEUR DE RESTRICTION TRIM5 α .

Le chapitre III de ce mémoire concerne un projet connexe à celui sur d'édition génomique du facteur de restriction humain TRIM5 α présenté précédemment. Les expériences qui découlent de ce projet ne font pas encore partie d'une publication scientifique, mais sont ajoutées au mémoire compte tenu des résultats prometteurs obtenus concernant également le mutant huTRIM5 α R332G-R335G.

3.1 Contribution des auteurs

- Caroline Dufour : j'ai moi-même conçu et effectué les expériences, l'analyse et la compilation des résultats ainsi que les conceptions des figures présentées ;
- Natacha Mérindol : post-doctorante du laboratoire qui m'a aidé à la conception des expériences ainsi qu'à l'analyse des résultats ;
- Lionel Berthoux : directeur de recherche du laboratoire et superviseur de ce projet.

3.2 Résumé du projet

La quête d'une cure contre l'infection au VIH-1, l'agent causal du SIDA, est toujours d'actualité malgré plus de 30 ans de recherches scientifiques. Une cure stérilisante, qui permettrait d'éliminer les provirus latents des réservoirs, pourrait être atteinte à partir de l'approche « shock and kill », où la réactivation des provirus latents est forcée. Le facteur de restriction TRIM5 α , lorsqu'il intercepte une capsid virale à son entrée dans la cellule, active l'immunité innée par la translocation nucléaire de NF- κ B via la voie TAK-1. Par contre, seulement la forme humaine de TRIM5 α possédant 2

mutations d'acides aminés, R332G et R335G, est capable de reconnaître la capsid du VIH-1.

Le mutant huTRIM5 α R332G-R335G, ou la forme sauvage de la protéine, sont surexprimés de façon stable dans les cellules monocytaires THP-1 ayant un provirus VIH-1 latent associé au gène rapporteur à fluorescence verte GFP (THP-1gag_{zip}-GFP). Ces cellules sont par la suite infectées avec un vecteur lentiviral VIH-1-NL4.3-DsRed. Les cellules sont préalablement traitées ou non au 5Z-7-Oxozeaenol, un inhibiteur de TAK-1. Les niveaux de restriction (DsRed) ainsi que de réactivation des provirus (GFP) sont mesurés par cytométrie en flux.

Les THP-1-gag_{zip}-GFP surexprimant stablement huTRIM5 α R332G-R335G (huT5GG) sont plus restrictives que celles surexprimant la forme sauvage (huT5WT), tout en ayant 4X plus de provirus réactivés. De plus, lorsque l'activation de TAK-1 est bloquée par un inhibiteur pharmacologique, l'augmentation de la réactivation des provirus chez les cellules huT5GG est perdue, alors que l'inhibiteur n'affecte en rien l'expression basale de GFP chez les cellules huT5WT.

Nos résultats démontrent que l'effet d'activation de l'immunité innée occasionnée par l'action de restriction de TRIM5 α , plus spécifiquement du mutant huT5GG en présence d'une infection par le VIH-1, permet une activation intensifiée de la transcription des provirus VIH-1 des cellules en latence associée à la voie de signalisation TAK-1 menant à la translocation nucléaire de NF- κ B. Cette étude démontre le possible rôle préventif sur l'établissement de la latence que peut avoir le mutant humain TRIM5 α R332G-R335G, une cible potentielle de thérapie génique pour un traitement du VIH-1.

3.3 Introduction

TRIM5 α permet, chez les primates, la restriction de rétrovirus d'espèces différentes de l'hôte. En plus d'entraîner la décapsidation prématurée du virus restreint, TRIM5 α est également un senseur de l'immunité innée, menant à la translocation nucléaire des facteurs de transcription que sont NF- κ B et AP-1, tous les deux activés par la voie TAK-1. Fait intéressant, le provirus latent du VIH-1 possède en son promoteur des sites de liaisons pour NF- κ B et AP-1. De ce fait, nous avons voulu vérifier si la version mutante humaine de TRIM5 α (huTRIM5 α R332G-R335G), restrictive du VIH-1, permet effectivement de réactiver un provirus VIH-1 latent intégré dans la cellule par cette action de senseur de l'immunité innée lors de la restriction de l'infection.

3.4 Matériel et méthode

Culture cellulaire. Les cellules THP-1-gag_{zip}-GFP, une lignée monocyttaire ayant un provirus VIH-1-GFP latent inductible à la doxycycline, est un généreux don de la part de Anne Gatignol (McGill Lady Davis Institute) et de Alan Cochrane (University of Toronto). Ces cellules ont été maintenues en culture dans du RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) (HyClone). Le milieu de culture est supplémenté avec 8 % de sérum fœtal bovin (FBS), 10 % de pénicilline/streptomycine (HyClone) et de 2,5 mg/ml de plasmocine (InvivoGen).

Clonage de DsRed dans le plasmide pNL4.3 Δ env Δ nef-GFP. Le gène DsRed a été amplifié à partir du plasmide pLVX-DsRed (amorce sens : 5'GATGCGGCCGCAATGGACAACACCGAG ; amorce antisens : 5'GTACTCGAGCTACTGGGAGCCGGAGTG) par PCR avec l'enzyme OneTaq (NEB) (30 cycles : 94°C 30 secondes, 60°C 30 secondes, 68°C 90 secondes). Le produit PCR a été purifié sur colonne (EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit, Qiagen). Le produit PCR purifié DsRed ainsi que le vecteur pNL4.3 Δ env Δ nef-GFP (Berthoux *et al.*, 2004) ont été digérés à l'aide de XhoI et NotI (NEB) à 37°C durant 120 minutes puis les enzymes ont été inactivées 20 minutes à 65°C. DsRed et pNL4.3 Δ env Δ nef Δ GPF ont été purifiés sur gel d'agarose 1 % puis extrait (QIAEX II

Gel Extraction Kit, Qiagen) pour ensuite subir la ligation à l'aide de l'enzyme T4 DNA ligase (NEB) (10 minutes à température pièce et 16 h à 16°C, puis inactivation de l'enzyme 10 minutes à 65°C).

Production de vecteurs lentiviraux. La production de vecteurs lentiviraux s'effectue dans des cellules HEK293T à confluence environnant 80 % dans des pétris de 10 cm. La co-transfection s'est effectuée en présence de polyéthylèneimine (Polyscience) avec les plasmides appropriés comme indiqué : pour la production de vecteur VIH-1 NL4.3-GFP, 10 µg de pNL4.3 Δ env Δ nef-DsRed et 5 µg de pMD.G (Berthoux *et al.*, 2004); pour les vecteurs pMIH, 10 µg de pMIH-huTRIM5 α WT ou de pMIH-huTRIM5 α R332G-R335G (vecteur d'expression associé à un gène de résistance à l'hygromycine nécessaire à la sélection (Malbec *et al.*, 2010)), 10 µg de pCL-Eco (vecteur exprimant le promoteur viral CMV et les protéines lentivirales Gag et Pol (Naviaux *et al.*, 1996)) et 5 µg de pMD.G (vecteur exprimant VSV-G (protéine G du virus de la stomatite vésiculaire) qui permet l'entrée du vecteur viral par fusion (Berthoux *et al.*, 2003)) (Pham *et al.*, 2010). Le milieu des cultures a été changé 6 h post-transfection, et le surnageant contenant les virus a été récolté 24 h plus tard. Les virus collectés ont été centrifugés 5 min à 1500 rpm et conservés à -80°C par la suite.

Génération de lignées cellulaires stablement transduites. 150 000 cellules THP-1-gag_{zip}-GFP ont été centrifugées 5 min à 1500 rpm, puis le culot cellulaire a été remis en suspension dans 0,2 ml de vecteurs lentiviraux MIH-huTRIM5 α WT, MIH-huTRIM5 α R332G-R335G ou avec le vecteur MIH vide à titre de contrôle. Du polybrene (Sigma Aldrich, É.-U.), à une concentration finale de 8 µg/ml, a été ajouté à chaque préparation de vecteurs. Les cellules ont par la suite été mises en plaque 24-puits et spinfectées 90 min à 1800 rpm à 30°C. 0,2 ml de milieu de culture a été ajouté à chaque puits suivant la spinfection. Trois jours post-spinfection, le milieu des cultures a été supplémenté en hygromycine B (Wisent, Canada), à des concentrations de 400 µg/ml. La sélection s'est déroulée sur dix jours, même si les cellules contrôles non transduites étaient toutes mortes au bout de trois jours.

Infections et traitements pharmacologiques. Les cellules ont été mises en plaques 96-puits à une concentration de 50 000 cellules/puits en présence ou non à la doxycycline (concentration finale de 2 µg/ml). Les cellules ont ensuite été infectées avec 100 µl de virus NL4.3-DsRed (figure 3.1), avec un traitement préalable de 60 minutes avec l'inhibiteur de TAK-1 5Z-7-Oxozeaenol (Sigma Aldrich, É.-U.) (concentration finale de 10 µM). 24 h après l'infection, les cellules ont été nettoyées 2X et remises en culture en RPMI, avec ou sans doxycycline selon le cas. 72 h post-infection, les cellules ont été fixées à l'aide d'une solution de formaldéhyde 2,5 % dans du PBS (Phosphate-buffered saline). Le pourcentage de cellules GFP ou DsRed positive a été déterminé en analysant 10 000 cellules avec un appareil de cytométrie en flux FC500 MPL (Beckman Coulter, USA), à l'aide du logiciel CXP (Beckman Coulter).

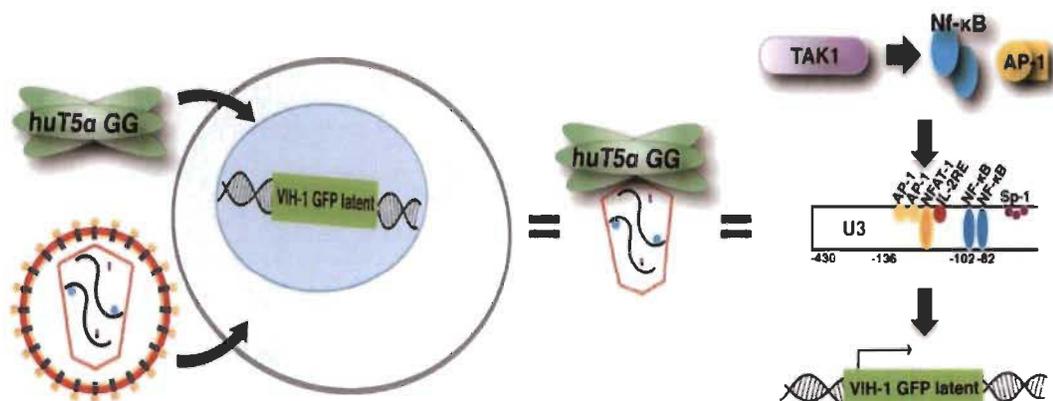


Figure 3.1 Schématisation de la méthodologie.

Les cellules THP-1-gag_{zip}-GFP sont modifiées afin de surexprimer la protéine huTRIM5α R332G-R335G, et sont par la suite infectées à l'aide de virus NL4.3-DsRed. L'activation de la transcription du provirus latent GFP de ces cellules, occasionnée par la restriction de l'infection par huTRIM5α R332G-R335G, sera mesurée par cytométrie en flux.

Analyses statistiques. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism6 (GraphPad).

3.5 Résultats

En premier lieu, le projet nécessitait l'utilisation du vecteur du VIH-1 NL4.3 exprimant un autre marqueur que le gène GFP. Nous avons donc cloné le gène rapporteur DsRed d'un autre plasmide à la place de GFP, puis confirmé que ce nouveau vecteur rétroviral demeure infectieux tout en exprimant cette protéine de fluorescence rouge (figure 3.2).

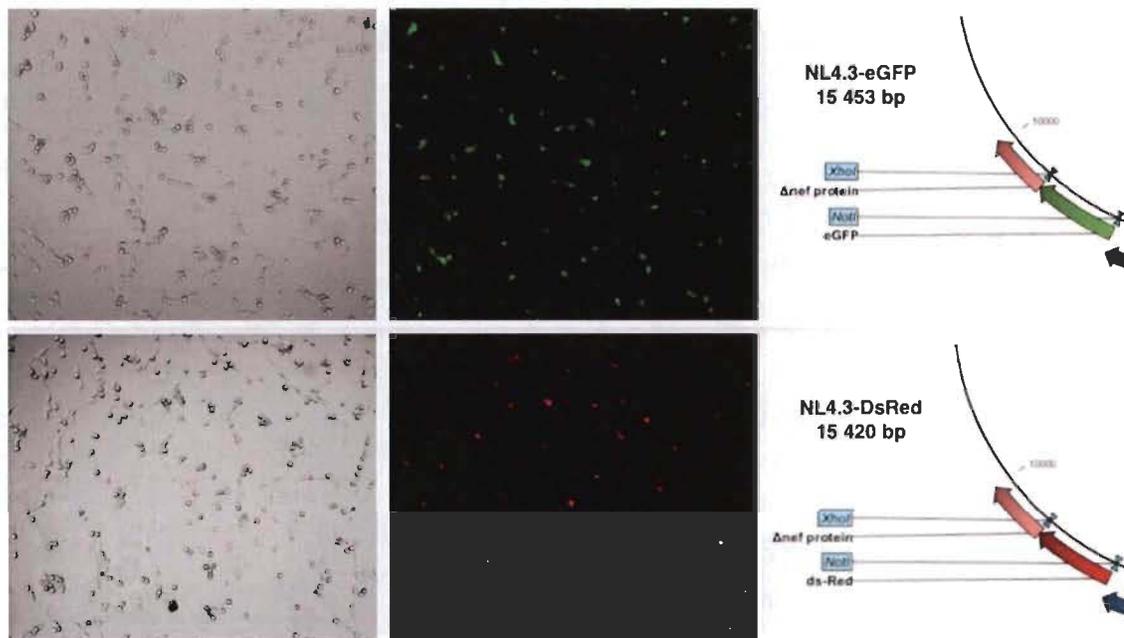


Figure 3.2 Clonage du gène DsRed à la place du gène GFP dans la construction plasmidique NL4.3.

Le gène GFP du vecteur NL4.3-eGFP est digéré à l'aide de XhoI et NotI pour être remplacé par le gène DsRed. Les cellules infectées avec NL4.3-DsRed ont une fluorescence rouge.

L'utilisation de ce VIH-1-NL4.3-DsRed permet donc de distinguer, dans notre étude, entre la restriction de l'infection (en rouge) et la réactivation du virus latent (GFP) (figure 3.3).

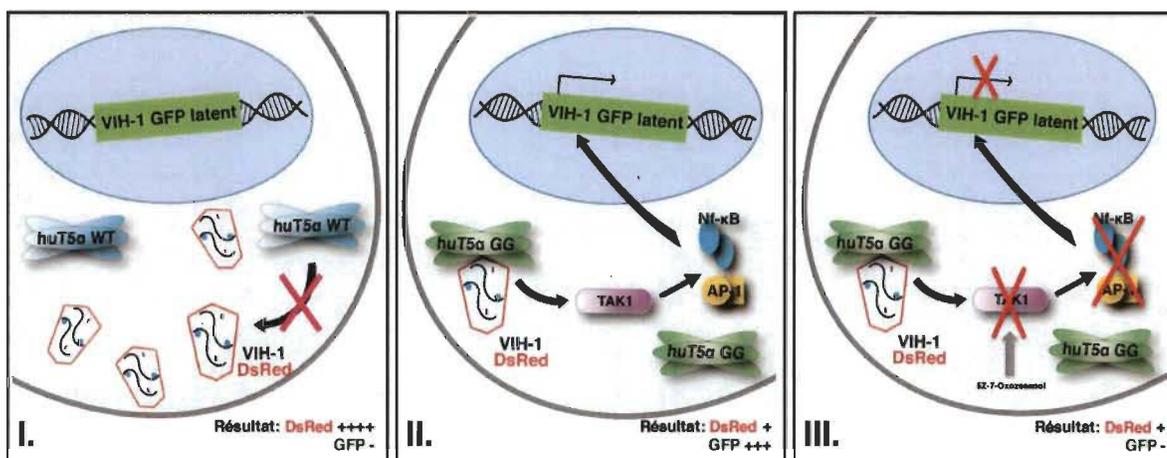


Figure 3.3 Schématisation des résultats attendus lors de l'analyse par cytométrie en flux.

- I. Les cellules exprimant huTRIM5α de type sauvage (WT), lorsqu'elles sont infectées avec du VIH-1-DsRed, n'occasionnent pas de restriction (DsRed +++) et donc pas de réactivation du VIH-1 latent (GFP -).
- II. Les cellules exprimant le mutant huTRIM5α R332G-R335G (GG) vont restreindre l'infection du VIH-1-DsRed (DsRed +), activant la transcription du VIH-1 latent (GFP +++).
- III. Le traitement des cellules exprimant huTRIM5α GG avec un inhibiteur de TAK-1 permet de conserver la restriction du VIH-1-DsRed (DsRed +), mais empêche l'effet de réactivation du VIH-1 latent découlant de cette restriction (GFP -).

Suite à l'infection des cellules avec VIH-1-NL4.3-DsRed, nous avons pu démontrer que la restriction de l'infection médiée par huTRIM5α GG est associée à une réactivation du provirus VIH-1-GFP latent (figure 3.4). En effet, la réactivation est 6X plus importante chez les cellules exprimant huTRIM5α GG infectées que chez celles exprimant la version sauvage (WT).

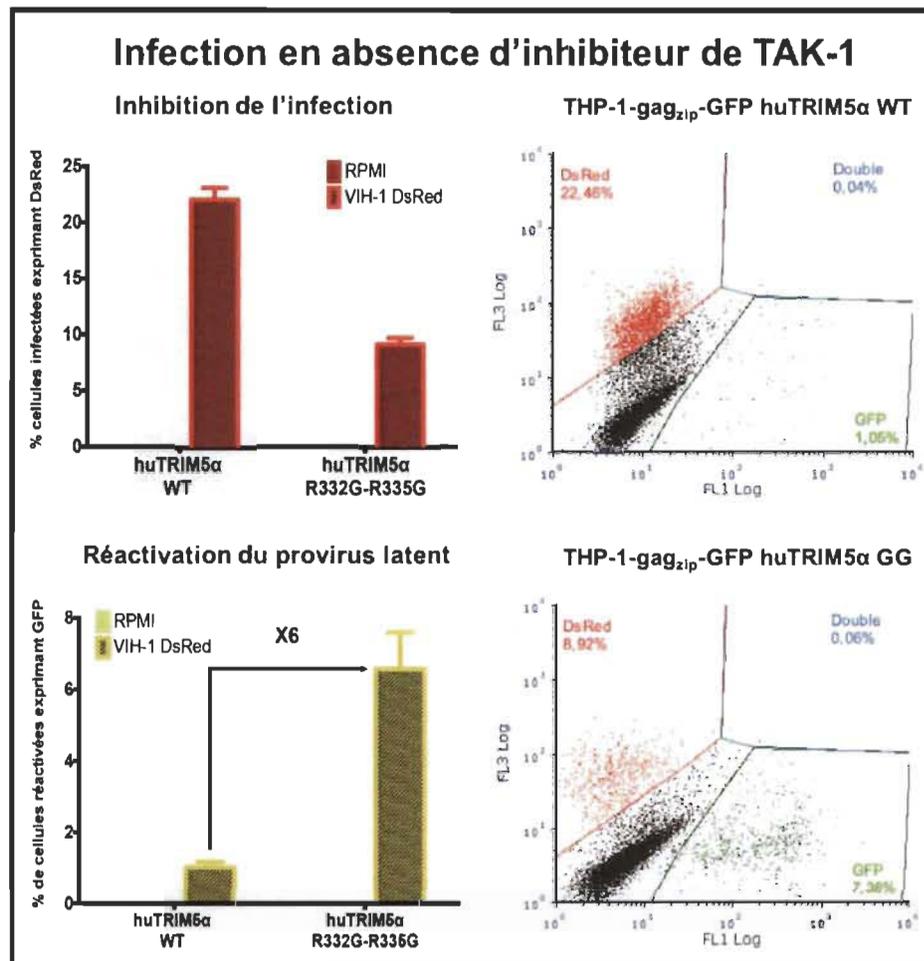


Figure 3.4 La restriction de VIH-1-NL4.3-DsRed par huTRIM5α R332G-R335G est associée à une réactivation du provirus latent VIH-1-GFP. Les cellules THP-1-gag_{zip}-GFP surexprimant huTRIM5α R332G-R335G et infectées par NL4.3-DsRed sont plus restrictives de l'infection et ont plus d'activation de leur provirus latent.

Afin de confirmer notre hypothèse selon laquelle il s'agit du rôle de senseur à l'activation de l'immunité innée de TRIM5 qui permet cette réactivation du provirus VIH-1 latent, nous avons inhibé la kinase TAK-1, qui est une voie centrale à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1. Nos résultats démontrent qu'effectivement, l'inhibition de la voie TAK-1 permet de bloquer la réactivation du provirus occasionnée par la restriction de huTRIM5α GG, ramenant l'expression de GFP au même niveau que celui retrouvé chez les cellules non restrictives huTRIM5α WT (figure 3.5). Pour sa part, l'inhibition de TAK-1 chez les cellules huTRIM5α WT

n'affecte en rien l'expression basale du provirus latent, expression observable due à l'induction de ce modèle cellulaire par la doxycycline.

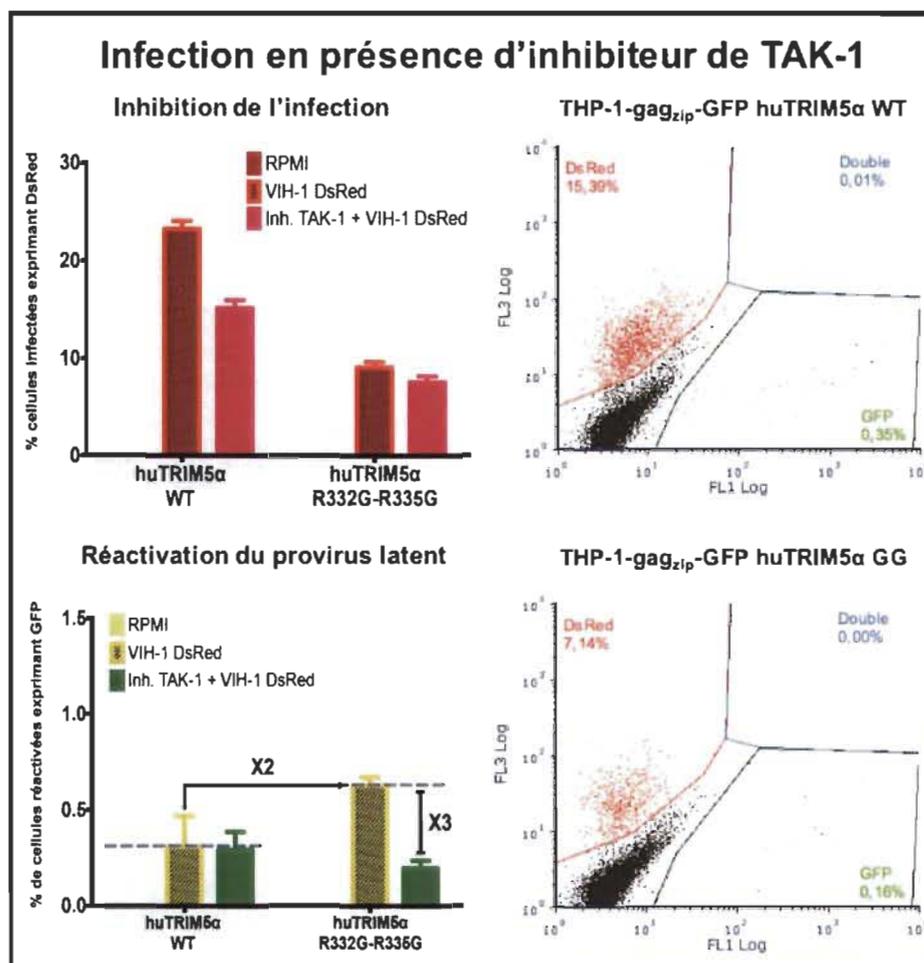


Figure 3.5 La réactivation du provirus VIH-1-GFP latent médiée par la restriction de VIH-1-NL4.3-DsRed par huTRIM5α R332G-R335G est dépendante de la voie d'activation de l'immunité innée TAK-1. Lorsque les cellules THP-1-gag_{zip}-GFP surexprimant huTRIM5α R332G-R335G et infectées par NL4.3-DsRed sont préalablement traitées avec un inhibiteur de la voie d'activation TAK-1, la réactivation du provirus latent chez ces cellules est perdue, sans pour autant affecter la restriction de l'infection.

3.6 Discussion

Ces résultats préliminaires ont permis de confirmer notre hypothèse concernant le possible rôle d'inhibition de la latence que possède le mutant huTRIM5 α R332G-R335G. Étant donné que le projet principal de la maîtrise s'axe sur l'édition génomique de ce facteur de restriction dans des cellules humaines, afin que le mutant restrictif du VIH-1 y soit exprimé, ce sous-projet permet de mettre en lumière une autre fonction de huTRIM5 α R332G-R335G dans une optique de thérapie génique du VIH-1. En effet, en plus d'entraîner la restriction du VIH-1 lors de l'infection, le mutant R332G-R335G pourrait avoir un rôle préventif sur l'établissement de la latence du VIH-1.

CHAPITRE IV

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

4.1 Approches thérapeutiques VIH-1

Les différentes approches thérapeutiques du VIH-1 actuellement en développement se divisent en deux grandes catégories, selon qu'elles cherchent à obtenir une cure fonctionnelle ou stérilisante.

4.1.1 Cure fonctionnelle

La cure fonctionnelle peut se définir comme un traitement où les réservoirs de virus latents ne posent plus de problème de rebond viral lorsqu'un patient arrête d'être sous TAR (Khalili *et al.*, 2015). De cette façon, les sujets infectés par le VIH-1 n'auraient plus besoin de prendre de la médication à vie.

Le patient de Berlin, qui est demeuré avirémique malgré un arrêt de tout TAR pendant 10 ans, est le seul cas de guérison du VIH-1 à ce jour. Cependant, trois analyses ont détecté de très faibles quantités d'ARN viral dans le plasma et d'ADN viral dans une biopsie rectale, et il est impossible d'établir s'il s'agit de faux positifs ou simplement si les cellules avec un provirus intégré sont si rares qu'il est difficile de les détecter de façon constante (Yukl *et al.*, 2013). À défaut de pouvoir prouver hors de tout doute l'élimination du VIH-1 de son organisme, le patient de Berlin est considéré comme fonctionnellement guéri. Néanmoins, il est impossible d'envisager de traiter toutes les personnes atteintes du VIH-1 par une greffe de cellules souches hématopoïétiques, sans compter que l'intervention elle-même a pratiquement tué Timothy Ray Brown (Brown, 2015). De ce cas unique ont néanmoins découlé plusieurs approches de thérapie génique visant à altérer le co-récepteur CCR5. Celui-ci peut être simplement inactivé par l'introduction d'indels dans son gène (Cradick *et al.*, 2013), mais il est également

possible d'effectuer la délétion spécifique de 32 pb avec CRISPR-Cas9, à un taux d'efficacité de 33 % (Cho *et al.*, 2013). Cette même mutation a été tentée dans des cellules souches pluripotentes, avec des taux de succès variables selon qu'on utilise les TALENs (14 %) ou CRISPR-Cas9 (33 %) (Ye *et al.*, 2014), et dans des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse à l'aide de ZFNs (Manotham *et al.*, 2015). L'équipe de Doms est parvenue pour sa part, en utilisant deux paires de ZFNs en simultanée, à modifier les deux co-récepteurs du VIH-1, soit CCR5 et CXCR4, dans des lymphocytes T CD4+ primaires humains et d'obtenir de ces cellules une résistance à l'infection au VIH-1 (Didigu *et al.*, 2014). L'édition génomique de CCR5 s'est rendue en essai clinique en 2014, où la thérapie génique par ZFNs a été tentée chez 12 patients sous TAR : cette étude a permis de démontrer qu'une telle approche est sécuritaire ; néanmoins tous les participants sont redevenus virémiques après l'arrêt du TAR, bien que la moitié d'entre eux ait eu un rebond viral plus lent (Tebas *et al.*, 2014).

Une autre approche de thérapie génique tente plutôt d'empêcher l'expression virale, par exemple en introduisant des mutations avec CRISPR-Cas9 dans la région hyperconservée Tar (« trans-activation response element ») du promoteur LTR du VIH-1 essentielle à l'initiation de la transcription virale (Ebina *et al.*, 2013). L'équipe de Belmonte a aussi démontré qu'il est possible d'empêcher l'expression du VIH-1 en utilisant CRISPR-Cas9 pour cibler tant des régions codantes que des régions non codantes du génome viral, et que ce blocage était d'autant plus efficace lorsque CRISPR était associé à un multiplexe d'ARNg ciblant plusieurs régions du virus à la fois (Liao *et al.*, 2015).

L'approche « block and lock » est un traitement fonctionnel de plus en plus envisagé, qui base son fondement sur l'idée qu'il serait possible d'empêcher la transcription virale des cellules infectées (« block ») afin de les rendant perpétuellement latentes (« lock ») (Darcis *et al.*, 2017). La protéine virale Tat est essentielle à l'initiation de la transcription, puisqu'elle permet de recruter les facteurs de transcription nécessaires au promoteur du VIH-1 (Dingwall *et al.*, 1990). L'équipe de Valente a démontré *in vitro* cette année qu'en utilisant un inhibiteur de Tat nommé Didéhydro-

Cortistatine A (dCA) en combinaison avec la TAR, il était possible d'empêcher la transcription résiduelle du VIH-1. De plus, les virus latents stimulés à la prostratine (agoniste de la protéine kinase C), approche thérapeutique décrite dans la prochaine section, ne parviennent pas à être réactivés lorsque les cellules sont traitées à la dCA. Finalement, l'utilisation de cet inhibiteur de Tat permet de ralentir le rebond viral après l'interruption de la TAR, passant de 7 à 25 jours (Kessing *et al.*, 2017).

4.1.2 Cure stérilisante

La seconde approche aspire à une cure stérilisante, où il n'y aurait plus du tout trace de provirus VIH-1 capable de se répliquer chez un individu infecté (Khalili *et al.*, 2015). Plusieurs avenues sont envisagées pour y arriver.

Dans l'approche « shock and kill », il est question de forcer la réactivation des provirus latents (le « shock ») tout en maintenant une TAR (le « kill ») afin d'épuiser les réservoirs. Le bémol de cette approche est qu'il n'est possible d'atteindre que les virus inductibles, empêchant une éradication complète (Datta *et al.*, 2016). Plusieurs agents pharmacologiques permettant la réactivation de la latence (LRAs, pour « latency-reversing agents ») ont été testés au fil du temps, notamment en jouant sur l'état de la chromatine à l'aide des inhibiteurs d'histone déacétylases (HDACs) comme l'acide valproïque (Ylisastigui *et al.*, 2004) ou le Vorinostat (Archin *et al.*, 2009), ou en induisant la voie NF- κ B par des agonistes de la protéine kinase C (PKC) comme la Prostratin (Kulkosky *et al.*, 2001) et la Bryostatine-1 (Darcis *et al.*, 2015). Le principal problème avec ces agents pharmacologiques est leur manque de spécificité pour les cellules infectées, en plus de causer d'importants effets secondaires (Datta *et al.*, 2016). Des approches de thérapie génique qui activent de façon spécifique la transcription virale en ciblant les LTRs des provirus ont également été développées (Wang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

Une autre approche stérilisante serait de parvenir à exciser les provirus intégrés. L'excision complète du génome viral a été tentée, à l'aide de ZFNs, en ciblant la région

Tar au sein du LTR du VIH-1, avec près de 50 % d'efficacité (Qu *et al.*, 2013). Quant à elle, l'équipe de Khalili, en utilisant l'approche par CRISPR-Cas9, est parvenue à l'excision de provirus latents de cellules monocytaires (Hu *et al.*, 2014).

Des vaccins thérapeutiques sont aussi envisagés, afin de stimuler la production d'anticorps neutralisant à large spectre (bNAbs) ou d'anticorps non neutralisants (Margolis *et al.*, 2016). Les bNAbs sont des anticorps particuliers, possédant pour la plupart des régions variables hautement mutées (Mascola & Haynes, 2013) leur conférant la capacité de reconnaître des épitopes provenant d'une grande variété du même virus (Koff, 2016). Les bNAbs permettent d'obtenir une réponse immunitaire efficace, incluant la réponse cytotoxique contre les cellules infectées en latence ou non (Margolis *et al.*, 2016), malgré les multiples variations observées parmi les quasi-espèces du VIH-1 (Ahmed *et al.*, 2017). Pourtant, ce n'est qu'entre 10 et 30 % des sujets infectés au VIH-1 de façon chronique depuis 2 à 5 ans qui vont développer de tels anticorps (Klein *et al.*, 2013). Pour leur part, les anticorps non neutralisants ne sont pas à négliger, puisqu'ils contribuent en partie au contrôle de l'infection au VIH-1 observé chez les contrôleurs élites, un petit groupe d'individus qui parvient à maintenir une charge virale indétectable durant plusieurs années en absence de TAR (Baum, 2010). Ces anticorps entraînent plutôt la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et l'inhibition virale cellulaire dépendante des anticorps (ADCVI), deux mécanismes de défense de l'immunité cellulaire qui permettent la suppression des cellules infectées par les NK, les monocytes et les neutrophiles (Overbaugh & Morris, 2012). Les anticorps non neutralisants seraient d'ailleurs responsables du taux d'efficacité de 31,2 % obtenu lors de l'essai clinique de phase III RV144 (une combinaison de deux vaccins, ALVAC and AIDSVAX, testée sur 16 402 sujets en Thaïlande) (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). Il s'agit du seul essai clinique, sur plus de 256 (Lema *et al.*, 2014) ayant permis d'obtenir une certaine protection à l'infection au VIH-1 (Margolis *et al.*, 2016). La quête d'un vaccin anti-VIH-1, malgré son haut taux de complexité, demeure d'actualité puisqu'il s'agit d'une approche thérapeutique qui permettrait potentiellement la protection et la guérison (Lema *et al.*, 2014).

4.1.3 Portée du projet de maîtrise

La quête d'une cure contre le VIH-1 emprunte de multiples avenues différentes. La thérapie génique fait partie des directions prometteuses, considérant que l'édition génomique de CCR5 s'est rendue jusqu'en essais cliniques. Cette approche, ciblant un gène humain, ne rendra pourtant pas les individus résistants aux souches du VIH-1 utilisant plutôt le co-récepteur CXCR4. Pour leurs parts, l'excision du génome du VIH-1 des cellules infectées et l'inactivation de la transcription virale par édition génomique s'attaquent directement au virus après l'infection. Néanmoins, compte tenu de la grande diversité génétique des quasi-espèces de VIH-1, ces approches de thérapie génique doivent pratiquement être personnalisées à chaque sujet infecté (Datta *et al.*, 2016). De plus, il faudrait parvenir à cibler la totalité des virus intégrés afin d'éviter que la réplication résiduelle ne mène à l'apparition virus mutés résistants à l'édition génomique.

Le facteur de restriction TRIM5 α a déjà été utilisé tant comme cible pour de l'édition génomique que pour de la thérapie génique envers le VIH-1.

D'abord, Wang *et al.* ont démontré qu'il était possible de modifier le gène TRIM5 afin de rendre inactive la protéine qui en découle, dans une étude ayant pour but d'obtenir un modèle animal de singes pour la recherche sur le VIH-1. En utilisant les TALENs pour introduire des délétions au niveau de l'exon 7 de *TRIM5* de lymphocytes T CD4⁺ de macaques, ils sont parvenus à empêcher la restriction de la capsid du VIH-1 par rhTRIM5 α (Wang, X. *et al.*, 2017).

Ensuite, trois études, où il était question d'améliorer la capacité de reconnaissance du VIH-1 de l'orthologue TRIM5 α humain, ont été précédemment publiées. La première démontrait qu'il était possible d'obtenir une meilleure restriction du VIH-1 que celle observée par rhTRIM5 α , dans des lignées lymphocytaires, en surexprimant une chimère protéique humaine où la portion N-terminale de TRIM5 α est fusionnée à la cyclophiline A (CypA), afin d'imiter la protéine TRIM-Cyp restrictive du VIH-1 retrouvée chez les

singes du Nouveau Monde (Neagu *et al.*, 2009). La seconde étude obtient une restriction légèrement inférieure à celle obtenue par rhTRIM5 α , en surexprimant dans des cellules primaires lymphocytaires, une version humaine de TRIM5 α possédant 5 substitutions d'acides aminés dans le domaine PRYSPRY retrouvées chez le macaque (Richardson *et al.*, 2014). Finalement, une troisième étude, provenant de notre laboratoire, démontrait que la mutation de deux acides aminés dans le domaine PRYSPRY de huTRIM5 α , en position R332 et en position R335, conférait une capacité de restriction du VIH-1 pratiquement équivalent à celui de rhTRIM5 α lorsque ce mutant est surexprimé dans des lignées lymphocytaires humaines (Pham *et al.*, 2010).

Néanmoins, l'édition génomique du facteur de restriction humain TRIM5 α par CRISPR-Cas9, effectuée au cours de mon parcours de maîtrise et décrite dans ce mémoire, dans l'optique d'améliorer sa capacité de restriction du VIH-1 dans des cellules humaines, constitue une première. En effet, notre étude démontre qu'il est possible d'éditer *TRIM5* humain à partir de l'ARNg et le ssODN que nous avons conçus. Les résultats de ce projet de recherche ont également permis de mettre à jour plusieurs difficultés qu'il sera nécessaire de surmonter dans l'avenir pour pouvoir considérer cette approche en thérapie génique. Ces différentes difficultés et possibles solutions sont élaborées dans la prochaine section.

4.2 Perspectives du projet d'édition génomique

L'utilisation de l'édition génomique chez l'humain nécessite une approche parfaite, ce qui se comprend d'un point de vue éthique. En effet, modifier l'ADN d'un individu pour guérir une condition médicale devrait, dans un monde idéal, se faire sans risquer d'introduire d'autres altérations pouvant entraîner des dommages irréversibles à cette personne, encore moins à sa descendance si cette modification doit être effectuée sur les cellules germinales (Philippidis, 2016). L'optimisation du processus d'édition génomique est nécessaire et prend en compte d'un côté la méthode de livraison de l'outil moléculaire et sa cytotoxicité, et de l'autre l'augmentation du taux d'efficacité de l'édition tout en limitant les mutations hors cibles (Kwarteng *et al.*, 2017).

Notre étude s'est heurtée à cinq problèmes majeurs :

- La difficulté d'introduire le matériel d'édition génomique dans les cellules cibles du VIH-1, soit les lymphocytes et les monocytes (résultats non montrés);
- Une cytotoxicité importante des cellules en suspens électroporées ;
- Un taux d'efficacité de HDR en-dessous de 10 % chez les cellules HEK293T ;
- L'absence de clones HEK293T homozygotes pour huTRIM5 α R332G-R335G;
- L'absence de restriction chez ces clones HEK293T malgré la présence des mutations nécessaires à l'expression de huTRIM5 α R332G-R335G (résultats montrés en annexe A) .

La poursuite du projet passe donc par l'élaboration de solutions afin de surmonter ces problèmes.

4.2.1 Méthodes de livraison du matériel d'édition génomique

Un problème commun aux trois outils moléculaires (ZFNs, TALENs et CRISPR-Cas) se situe dans la méthode d'introduction du matériel au niveau de la cellule, le tout devant rester compatible avec une utilisation en thérapie génique du VIH-1 *ex vivo*. En effet, il faut considérer une méthode de livraison permettant un bon taux d'efficacité dans des cellules primaires et lymphocytaires tout en limitant les risques cytotoxiques, puisque ces cellules seront réinfusées au patient par la suite.

Lors d'expériences *in vitro*, la méthode de livraison la plus simple est la transfection chimique de cellules à l'aide de plasmides. Néanmoins, cette technique, qui permet une expression transitoire du matériel à l'édition génomique (c'est-à-dire l'ARNg, les enzymes pour effectuer la double cassure d'ADN ainsi que l'ADN donneur), n'est que peu efficace dans plusieurs types cellulaires (Maeder & Gersbach,

2016). Il est aussi possible d'introduire le plasmide par électroporation, une technique où un champ électrique est utilisé pour momentanément augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire (Wang, M. *et al.*, 2017). De plus, l'utilisation de plasmides peut impliquer une certaine toxicité reliée à la quantité d'ADN inséré, peut entraîner une intégration aléatoire de son contenu, sans oublier que ce sont à la base des constructions d'origine bactérienne (Maeder & Gersbach, 2016) pouvant être perçus comme de l'ADN étranger et ainsi activer le système immunitaire.

Dans notre étude, nous sommes parvenus à transfecter des cellules épithéliales HEK293T. Celles-ci ne sont pas des cellules cibles du VIH-1, mais sont connues pour être très facilement transfectables (Lin, Y. C. *et al.*, 2014), d'où leur utilisation. Toutefois, l'électroporation a été tentée sur des cellules lymphocytaires Jurkat, étant donné que les lymphocytes T CD4⁺ la cible principale du VIH-1. Suite à l'électroporation du ssODN et du plasmide d'expression de SpCas9 et de l'ARNg, un signal PCR positif à la présence des mutations pour huTRIM5 α R332G-R335G a été détecté sur le lot de cellules Jurkat, et ce à plusieurs reprises. Néanmoins, malgré deux techniques différentes d'isolation de clones positifs, soit le tri fonctionnel par FACS (« fluorescence-activated cell sorting », un type de cytométrie en flux) des cellules n'exprimant pas GFP suite à une infection à l'aide du vecteur VIH-1-NL4.3-GFP à haute dose et la dilution limite à partir du lot de cellules, il a été impossible de trouver un seul clone positif pour huTRIM5 α R332G-R335G par PCR sur près de 1000 clones testés. Une cytotoxicité reliée à la présence du plasmide, du ssODN ou à l'expression de la Cas9 pourrait expliquer que les clones positifs n'aient pas survécu suite aux deux méthodes d'expansion clonale. De toute évidence, d'autres procédés de livraison devront être envisagés pour parvenir à l'édition génomique de TRIM5 dans des monocytes et lymphocytes T humains.

Afin d'éviter l'utilisation de matériel bactérien pour obtenir une expression transitoire, plusieurs études se sont tournées vers le complexe d'ARNs (l'ARNg et l'ARN messager codant pour la Cas9) (Cho *et al.*, 2013) ou ribonucléoprotéique (RNPs) où l'ARNg est préalablement associé à la protéine de Cas9 (Lin, S. *et al.*, 2014). La

livraison peut se faire par électroporation (Chen *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2014), mais cette technique endommage considérablement les cellules, ce qui limite son utilisation dans un contexte de thérapie génique (Wang, M. *et al.*, 2017). La livraison peut aussi se faire par fusion à la membrane à l'aide de peptides permettant l'entrée dans la cellule (CPP, « cell-penetrating peptide »), tels le poly-Arg (Liu *et al.*, 2014) ou le Feldan Shuttle (Feldan Therapeutics), ou encore à l'aide de nanoparticules lipidiques (LNP) (Yin *et al.*, 2017). Il n'empêche que tant les complexes d'ARNs que les RNPs nécessitent un bon dosage du matériel introduit pour limiter les effets de toxicité et des mutations hors cibles (Maeder & Gersbach, 2016).

Finalement, la plupart des types cellulaires peuvent être efficacement transduits à l'aide de vecteurs biologiques (associé aux adénovirus (AAV) ou lentiviraux) (Datta *et al.*, 2016; Kwarteng *et al.*, 2017). Ceux-ci peuvent contenir une grande quantité d'ADN (jusqu'à 4,8 kb) tout en évitant l'effet cytotoxique des autres méthodes (Maeder & Gersbach, 2016). Les vecteurs AAV permettent une expression transitoire du matériel génétique tout en possédant une bonne efficacité de transduction (Holkers *et al.*, 2013), mais parviennent difficilement à empaqueter 2 TALENs (4 kB chacun) ou SpCas9 (4,2 kB) en plus de l'ARNg et de l'ADN donneur (Maeder & Gersbach, 2016). Il existe des vecteurs lentiviraux pour l'expression de Cas9 et de l'ARNg tel le lentiCRISPRv2 (Sanjana *et al.*, 2014). Néanmoins, les vecteurs lentiviraux entraînent l'intégration de leur contenu dans le génome de la cellule. Cette intégration peut avoir de graves conséquences en rendant la cellule oncogénique (Kwarteng *et al.*, 2017). Pour contrer cet effet non souhaité, certains utilisent plutôt des vecteurs lentiviraux possédant une déficience au niveau du gène de l'intégrase, empêchant cette intégration permanente (Genovese *et al.*, 2014), ce qui pourrait s'avérer être une solution dans notre étude.

4.2.2 Augmenter l'efficacité de l'édition génomique

4.2.2.1 Amélioration de la HDR

Lors de la réparation de l'ADN, tel que mentionné précédemment, les mécanismes de NHEJ et de HDR se font compétition sur chaque allèle à réparer. Étant donné que la NHEJ se produit nettement plus fréquemment que la HDR, et que la mutation ponctuelle précise de nucléotides survient grâce à la HDR, il n'est pas surprenant de constater que nous avons obtenu un taux d'efficacité en-dessous de 10 % lors de l'édition génomique de *TRIM5*. Il serait possible d'améliorer la HDR de deux façons.

Premièrement, considérant que la HDR est un mécanisme de réparation majoritairement actif durant les phases S et G2 du cycle cellulaire, des équipes ont testé la capacité d'agents pharmacologiques, permettant de préalablement synchroniser les cellules, à améliorer l'efficacité de la réparation par ce mécanisme. Il a été démontré qu'en arrêtant le cycle cellulaire en phase fin de phase G2 à l'aide de Nocodazole ou en début de phase S avec de l'Aphidicoline, il était possible d'obtenir des taux de réparation par HDR avoisinant les 40 % (Lin, S. *et al.*, 2014).

À l'opposé, comme la NHEJ et la HDR ne peuvent survenir en même temps durant la réparation, il est également possible d'inhiber la NHEJ. Arras et Fraser en ont d'ailleurs identifié 4 composés pharmacologiques, utilisé à faible dose, permettant d'améliorer la HDR de près de 5 fois : le W7, la chlorpromazine, le Nu7026 et le AG14361 (Arras & Fraser, 2016).

De tels agents pharmacologiques pourraient être mis à contribution dans la suite du projet d'édition génomique du gène humain *TRIM5* afin d'isoler plus de clones positifs pour huTRIM5 α R332G-R335G. Ce serait également une alternative à considérer pour tenter d'obtenir des clones homozygotes pour la mutation de huTRIM5 α . Néanmoins, ces agents pharmacologiques ont une toxicité élevée, limitant

par le fait même leur utilisation dans le cadre de thérapie génique sur des cellules de patients.

4.2.2.2 Importance de l'homozygotie

Les cellules HEK293T étant majoritairement triploïdes, la probabilité d'obtenir un clone homozygote était faible, malgré tout nous ne sommes pas parvenus à en isoler un seul parmi nos 10 clones positifs. De ce fait, nous avons constaté toute l'importance d'arriver à cette homozygotie. Les allèles exempts de réparation par HDR avaient tous subi l'action de la nucléase, puisque sur la totalité on retrouvait un indel au site de coupe de la Cas9. Ceci permet de conclure qu'une expression transitoire par transfection plasmidique est nettement suffisante pour que le système CRISPR-Cas9 exécute son travail. L'apparition d'indels au site de coupe est rapportée par Paquet *et al.* (Paquet *et al.*, 2016), où ils démontrent que l'absence de HDR homologue se solde toujours par la présence de ces indels, due à la très haute efficacité de la nucléase. En effet, Cas9 reconnaît continuellement sa cible ADN immédiatement suivi du motif PAM, et l'apparition d'un indel au site de coupe entraîne un décalage du cadre de lecture du PAM. Celui-ci n'est alors plus détecté par la Cas9, empêchant toute reconnaissance subséquente de cet allèle par le complexe CRISPR-Cas9. De cette façon, très rares sont les allèles restés intacts suite à l'action de CRISPR-Cas9, malgré que l'enzyme soit exprimée dans la cellule à peine durant quelques jours. Plus important encore, dans notre étude, cet indel survient dans le domaine de reconnaissance de la capsid virale, en fin de protéine, et entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré. Le TRIM5 α qui en découle serait tronqué en portion C-terminale, au début du domaine PRYSPRY, tout en ayant intacts les trois autres domaines. De ce fait, il n'est pas impossible que l'absence de restriction perçue dans nos expériences d'infection de nos clones positifs puisse s'expliquer en partie à cause de ce phénomène : si huTRIM5 α R332G-R335G et huTRIM5 α tronqué sont exprimés simultanément dans la cellule, ceux-ci peuvent dimériser ensemble par leur domaine Coiled-Coil (Berthoux *et al.*, 2005). Il se peut donc que l'augmentation de la capacité de reconnaissance de la capsid du VIH-1 de

huTRIM5 α R332G-R335G soit inhibée par la perte de capacité de reconnaissance de la protéine tronquée.

Une procédure permettant une HDR homozygote, nécessitant deux cycles d'édition génomique par CRISPR-Cas9, nommée CORRECT, a été élaborée (Paquet *et al.*, 2016). Suite au premier cycle de CRISPR, menant à l'insertion de mutations désirées par HDR, les clones isolés hétérozygotes subiront une nouvelle édition génomique ciblant spécifiquement les allèles où un indel a été introduit par NHEJ. De cette façon, les allèles ayant eu une HDR en premier lieu ne sont pas ciblés par la deuxième vague d'édition génomique. Ce protocole, bien que fournissant une bonne alternative au problème d'hétérozygotie, est néanmoins plus long et coûteux, nécessitant de tout faire en double.

4.2.2.3 Alternative à Cas9

Depuis l'adaptation du système CRISPR-Cas en 2012, des alternatives à SpCas9 ont été développées, entre autres à cause de l'identification de nouvelles protéines effectrices de CRISPR-Cas de classe 2.

La première alternative proposée pour augmenter la spécificité de l'édition génomique par CRISPR-Cas9 est l'utilisation d'une version mutante de Cas9 où l'activité nucléase (c.-à-d. le clivage des deux brins d'ADN) est convertie en activité nickase (c.-à-d. le clivage d'un seul brin d'ADN). Cette Cas9n, possédant une mutation D10A (Cong *et al.*, 2013), est utilisée en paire, à l'instar des ZFNs et des TALENs. Les deux ARNg doivent cibler, de façon opposée, des régions rapprochées se trouvant sur chacun des brins d'ADN (Ran *et al.*, 2013a). Ainsi, la coupure double-brin de l'ADN ne survient que si les deux cibles sont reconnues, permettant de réduire les modifications hors cibles comparativement à l'utilisation de la Cas9.

Une seconde alternative à SpCas9, l'enzyme Cpf1, a été caractérisée chez *Francisella novicida* en 2015 par Zetsche *et al.* Cette enzyme, aussi dénommée Cas12a,

entraîne la coupure double-brin de l'ADN, mais fonctionne différemment de Cas9 : 1) l'enzyme ne possède qu'un seul domaine catalytique ; 2) la séquence guide ne comporte que le crRNA de 42 nucléotides de long ; 3) le motif PAM, riche en T, se situe en 5' de la séquence cible sur l'ADN ; 4) la coupure des deux brins est décalée (Zetsche *et al.*, 2015). Deux Cpf1, AsCpf1 de *Acidamonococcus* et LbCpf1 de *Lachnospiraceae*, possèdent une activité dans les cellules humaines (Zetsche *et al.*, 2015) permettant de les utiliser comme outil d'édition génomique (Kleinstiver *et al.*, 2016). Un dernier effecteur CRISPR de classe 2 a été identifié jusqu'à maintenant. C2c1, retrouvée entre autres chez les *Alicyclobacillus* (AacC2c1), est une enzyme fonctionnant de façon très similaire à Cpf1, à la différence que la séquence guide nécessite le crRNA et le tracrRNA (figure 4.1) (Shmakov *et al.*, 2015).

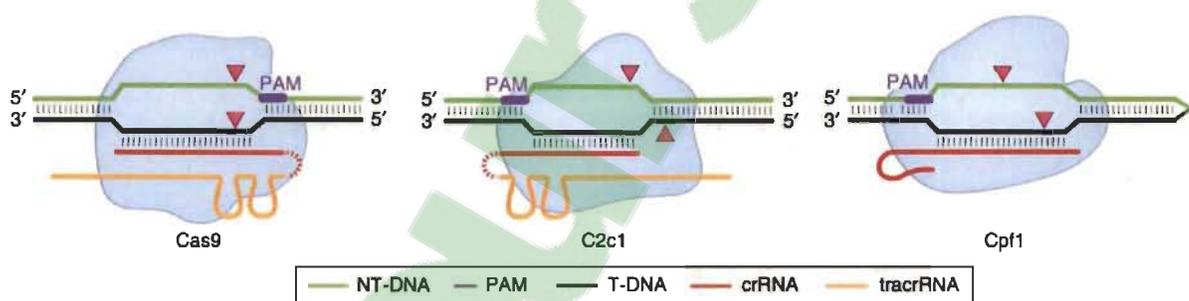


Figure 4.1 Schéma représentant les 3 différentes nucléases

Cas9, C2c1 et Cpf1 : composantes de l'ARNg, position du motif PAM et sites de coupe de l'ADN (Stella *et al.*, 2017)

Cpf1 et C2c1 ont de sérieux avantages sur Cas9. D'abord, le motif PAM est riche en thymidine, contrairement au NGG de Cas9, ce qui permet de cibler des régions différentes du génome. De plus, le PAM doit se situer en 5' de la séquence ciblée : de cette façon, l'apparition d'indel au site de coupe n'affecte aucunement la reconnaissance du PAM par l'enzyme. Ainsi, plusieurs cycles reconnaissance-coupeure peuvent survenir (Zetsche *et al.*, 2015), menant éventuellement à une réparation par HDR. Finalement, ces deux enzymes coupent les deux brins d'ADN en décalé, ce qui occasionnent l'apparition de bouts cohésifs, ce qui soulève l'idée qu'il serait possible d'introduire de petites séquences d'ADN sans passer par la réparation par HDR (Zetsche *et al.*, 2015), un peu à la façon du clonage par enzyme de restriction. Dans notre cas, l'utilisation de

Cpf1 ou de C2c1 pourrait permettre d'augmenter les probabilités d'obtenir des clones homozygotes. Néanmoins, leur utilisation nécessiterait de revoir notre conception d'ARNg et d'ADN donneur, puisque notre séquence nucléotidique ciblée pour les mutations R332G et R335G du gène TRIM5 est riche en G et nous permettait d'obtenir une coupure exactement entre les deux sites à muter avec la Cas9.

Finalement, une nouvelle approche d'édition génomique, soit l'édition de base d'ADN, a été proposée par Komor *et al.* en 2016, en se servant de la capacité de Cas9 à cibler une séquence précise de nucléotides. Ils ont fusionné, en N-terminal, une version non catalytique de Cas9 (dCas9, où on retrouve les mutations D10A et H840A inactivant les deux domaines catalytiques RuvC et HNH (Jinek *et al.*, 2012)) à rAPOBEC1, une cytidine déaminase (Komor *et al.*, 2016). La cytidine déaminase ainsi guidée entraîne la conversion C→T (ou le complémentaire G→A) sur une distance de 5 nucléotides, situés entre les positions 4 à 8 de la séquence ciblée par l'ARNg de dCas9 (Komor *et al.*, 2016). Ils ont pu obtenir un taux d'efficacité de 44 % d'édition génomique, avec une fréquence d'indel égale ou inférieure à 0,1 %, sans avoir recours à la coupure d'ADN (simple ou double brin) ni à la présence d'un ADN donneur. Cette approche n'est pas nécessairement applicable dans toutes les situations d'édition génomique, et serait difficilement utilisable dans notre étude, mais ouvre la voie à l'élaboration de constructions semblables avec d'autres types d'enzymes modifiant l'ADN, telles les méthylases et les déméthylases (Komor *et al.*, 2016).

4.3 Perspective du projet sur l'inhibition de la latence du VIH-1

Le second projet effectué lors de cette maîtrise concernait l'inhibition de la latence par huTRIM5 α R332G-R335G. Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer notre hypothèse selon que huTRIM5 α R332G-R335G entraîne la réactivation de provirus VIH-1 latent lorsque le mutant restreint une nouvelle infection au VIH-1. Tel que prévu, nous avons aussi démontré qu'en inhibant la voie d'activation de l'immunité innée TAK-1, cette réactivation était annulée. Néanmoins, ce projet devra être poursuivi pour pouvoir établir le rôle de huTRIM5 α R332G-R335G dans

l'inhibition de la latence virale. D'abord, il faudra confirmer que cette réactivation passe par la voie TAK-1 à l'aide de l'interférence à l'ARN de cette kinase, ce qui permet de prouver de deux façons différentes son implication de la réactivation des provirus latents. De plus, il sera important de déterminer l'apport de NF- κ B et AP-1, ensemble et séparément, dans cette réactivation. Pour se faire, l'infection sera faite en présence d'inhibiteurs pharmacologiques, tel BAY 11-7085 pour NF- κ B et SP6-00125 pour AP-1. De même que pour TAK-1, l'interférence à l'ARN sera également nécessaire pour confirmer l'implication de ces deux facteurs de transcriptions dans la réactivation de la latence. Finalement, et c'est à ce stade que les deux projets de ma maîtrise se rejoignent, parvenir à éditer le gène TRIM5 chez ce modèle cellulaire de latence du VIH-1 permettrait de démontrer sans équivoque le rôle de huTRIM5 α R332G-R335G dans l'inhibition de la latence virale.

4.4 Conclusion

Les deux projets effectués lors de cette maîtrise concernant le mutant huTRIM5 α R332G-R335G ont permis d'un côté de confirmer la faisabilité de l'édition de ce gène par CRISPR-Cas9, et de l'autre de mettre en lumière son possible rôle dans l'inhibition de la latence grâce à son action de senseur de l'immunité innée. Étant donné que ce mutant humain ne diffère que de deux acides aminés de la version sauvage, comparativement à l'orthologue macaque qui a près de 12 % d'acides aminés différents (Pham *et al.*, 2010), huTRIM5 α R332G-R335G est un meilleur candidat de thérapie génique que le transgène provenant du singe. De plus, il a été démontré que ce mutant permet la restriction d'une variété de souches de VIH-1 différentes en plus d'entraîner une meilleure survie cellulaire (Jung *et al.*, 2015). Notre étude constitue la première tentative d'édition génomique d'un facteur de restriction afin d'augmenter sa capacité d'action anti-VIH-1, et nos résultats de réactivation de la latence tendent à démontrer que le mutant huTRIM5 α R332G-R335G ne permet pas sa capacité d'activer l'immunité innée, rôle qui n'avait pas été évalué jusqu'à maintenant. Nos résultats soutiennent l'idée qu'il est primordial d'améliorer les techniques de livraison du matériel d'édition génomique ainsi que le taux d'efficacité de la HDR pour songer à une thérapie génique

du VIH-1 par huTRIM5 α R332G-R335G. Finalement, il n'est pas exclu que le virus parvienne à développer des mutations le rendant résistant à la restriction par cette version améliorée de huTRIM5 α , et c'est pourquoi il serait nécessaire d'arriver à une édition génomique multiplex, où plusieurs ARNg sont utilisés simultanément (Cong *et al.*, 2013). De cette façon, une cellule humaine pourrait subir une triple édition génomique anti-VIH-1 : augmenter la capacité de reconnaissance de la capsid du VIH-1 par TRIM5 α (mutations R332G et R335G) (Pham *et al.*, 2010), rendre APOBEC3G résistant à la protéine virale Vif (mutation D128K) (Schrofelbauer *et al.*, 2004) et empêcher tétherine d'être dégradé par Vpu (mutation T45I) (Gupta *et al.*, 2009).

RÉFÉRENCES

- (s.a.). (1981). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 30(21), 250-252.
- Abdel-Mohsen, M., Raposo, R.A.S., Deng, X., Li, M., Liegler, T., Sinclair, E., Salama, M.S., Ghanem, H.E.-d.A., Hoh, R., Wong, J.K., David, M., Nixon, D.F., Deeks, S.G., et Pillai, S.K. (2013). Expression profile of host restriction factors in HIV-1 elite controllers. *Retrovirology*, 10, 106-106.
- Addgene. (2017). *CRISPR 101: A Desktop Resource* (2 éd.). Addgene. Repéré à <http://info.addgene.org/download-addgenes-ebook-crispr-101-2nd-edition>
- Ahmed, Y., Tian, M., et Gao, Y. (2017). Development of an anti-HIV vaccine eliciting broadly neutralizing antibodies. *AIDS Res Ther*, 14(1), 50.
- Ajibade, A.A., Wang, H.Y., et Wang, R.-F. (2013). Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling. *Trends in Immunology*, 34(7), 307-316.
- Altfeld, M., Barmeyer, A., Behrens, G., Berzow, D., Boesecke, C., Braun, P., Buhk, T., Camp, R., Draenert, R., Eggers, C., Esser, S., Fätkenheuer, G., Günther, G., Harrer, T., Herzmann, C., Horst, H.A., Hower, M., Lange, C., Lorenzen, T., Niehues, T., Noah, C., Pauli, R., Rieke, A., Rosenkranz, T., Schaaf, B., Sonnenberg-Schwan, U., Spinner, C., Stoll, M., Streeck, H., Thoden, J., Unnewehr, M., Vocks-Hauck, M., Weigel, M., Weitzel, T., et Wolf, E. (2015). *HIV 2015/16*. HIVbook. Repéré à <https://hivbook.com>
- Archin, N.M., Espeseth, A., Parker, D., Cheema, M., Hazuda, D., et Margolis, D.M. (2009). Expression of latent HIV induced by the potent HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 25(2), 207-212.
- Arganaraz, E.R., Schindler, M., Kirchhoff, F., Cortes, M.J., et Lama, J. (2003). Enhanced CD4 down-modulation by late stage HIV-1 nef alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication. *J Biol Chem*, 278(36), 33912-33919.
- Arras, S.D., et Fraser, J.A. (2016). Chemical Inhibitors of Non-Homologous End Joining Increase Targeted Construct Integration in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE*, 11(9), e0163049.

- Baldauf, H.M., Pan, X., Erikson, E., Schmidt, S., Daddacha, W., Burggraf, M., Schenkova, K., Ambiel, I., Wabnitz, G., Gramberg, T., Panitz, S., Flory, E., Landau, N.R., Sertel, S., Rutsch, F., Lasitschka, F., Kim, B., Konig, R., Fackler, O.T., et Keppler, O.T. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat Med*, 18(11), 1682-1687.
- Barr, S.D., Smiley, J.R., et Bushman, F.D. (2008). The Interferon Response Inhibits HIV Particle Production by Induction of TRIM22. *PLoS Pathogens*, 4(2), e1000007.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., et Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868-871.
- Baum, L.L. (2010). Role of humoral immunity in host defense against HIV. *Curr HIV/AIDS Rep*, 7(1), 11-18.
- Berg, J.M. (1988). Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(1), 99-102.
- Berthoux, L., Sebastian, S., Sayah, D.M., et Luban, J. (2005). Disruption of human TRIM5alpha antiviral activity by nonhuman primate orthologues. *J Virol*, 79(12), 7883-7888.
- Berthoux, L., Sebastian, S., Sokolskaja, E., et Luban, J. (2004). Lv1 inhibition of human immunodeficiency virus type 1 is counteracted by factors that stimulate synthesis or nuclear translocation of viral cDNA. *J Virol*, 78(21), 11739-11750.
- Berthoux, L., Towers, G.J., Gurer, C., Salomoni, P., Pandolfi, P.P., et Luban, J. (2003). As(2)O(3) enhances retroviral reverse transcription and counteracts Ref1 antiviral activity. *J Virol*, 77(5), 3167-3180.
- Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D.J., Trautman, J.K., Smith, J., Kim, Y.G., et Chandrasegaran, S. (2001). Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol*, 21(1), 289-297.
- Blasius, A.L., Giurisato, E., Cella, M., Schreiber, R.D., Shaw, A.S., et Colonna, M. (2006). Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J Immunol*, 177(5), 3260-3265.

- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., et Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959), 1509-1512.
- Brouns, S.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., et van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321(5891), 960-964.
- Brown, T.R. (2015). I Am the Berlin Patient: A Personal Reflection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 31(1), 2-3.
- Carter, C.C., Onafuwa-Nuga, A., McNamara, L.A., Riddell, J.t., Bixby, D., Savona, M.R., et Collins, K.L. (2010). HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat Med*, 16(4), 446-451.
- Case, K. (1986). Nomenclature: human immunodeficiency virus. *Annals Of Internal Medicine*, 105(1), 133-133.
- Chelico, L., Pham, P., Calabrese, P., et Goodman, M.F. (2006). APOBEC3G DNA deaminase acts processively 3' --> 5' on single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 13(5), 392-399.
- Chen, S., Lee, B., Lee, A.Y., Modzelewski, A.J., et He, L. (2016). Highly Efficient Mouse Genome Editing by CRISPR Ribonucleoprotein Electroporation of Zygotes. *J Biol Chem*, 291(28), 14457-14467.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., et Kim, J.S. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 31(3), 230-232.
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.-R., Ghattas, G., Brenchley, J.M., Schacker, T.W., Hill, B.J., Douek, D.C., Routy, J.-P., Haddad, E.K., et Sékaly, R.-P. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature medicine*, 15(8), 893-900.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., et Voytas, D.F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2), 757-761.
- Chu, H., Wang, J.-J., Qi, M., Yoon, J.-J., Chen, X., Wen, X., Hammonds, J., Ding, L., et Spearman, P. (2012). Tetherin/BST-2 is essential for the formation of the

- intracellular virus-containing compartment in HIV-infected macrophages. *Cell Host & Microbe*, 12(3), 360-372.
- Chun, T.W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D., et Siliciano, R.F. (1995). In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med*, 1(12), 1284-1290.
- Churchill, M.J., Wesselingh, S.L., Cowley, D., Pardo, C.A., McArthur, J.C., Brew, B.J., et Gorry, P.R. (2009). Extensive astrocyte infection is prominent in human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann Neurol*, 66(2), 253-258.
- Cohen, E.A., Terwilliger, E.F., Jalinoos, Y., Proulx, J., Sodroski, J.G., et Haseltine, W.A. (1990). Identification of HIV-1 vpr product and function. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 3(1), 11-18.
- Collins, K.L., Chen, B.K., Kalams, S.A., Walker, B.D., et Baltimore, D. (1998). HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, 391(6665), 397-401.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
- Cortez, C. (2015, consulté le 3 Novembre, 2017). CRISPR 101: Homology Directed Repair. Repéré à < <http://blog.addgene.org/crispr-101-homology-directed-repair> >
- Cradick, T.J., Fine, E.J., Antico, C.J., et Bao, G. (2013). CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res*, 41(20), 9584-9592.
- Darcis, G., Kula, A., Bouchat, S., Fujinaga, K., Corazza, F., Ait-Ammar, A., Delacourt, N., Melard, A., Kabeya, K., Vanhulle, C., Van Driessche, B., Gatot, J.-S., Cherrier, T., Pianowski, L.F., Gama, L., Schwartz, C., Vila, J., Burny, A., Clumeck, N., Moutschen, M., De Wit, S., Peterlin, B.M., Rouzioux, C., Rohr, O., et Van Lint, C. (2015). An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various In Vitro and Ex Vivo HIV-1 Latency Models Identified Bryostatins-1+JQ1 and Ingenol-B+JQ1 to Potently Reactivate Viral Gene Expression. *PLoS Pathogens*, 11(7), e1005063.
- Darcis, G., Van Driessche, B., et Van Lint, C. (2017). HIV Latency: Should We Shock or Lock? *Trends in Immunology*, 38(3), 217-228.

- Datta, P.K., Kaminski, R., Hu, W., Pirrone, V., Sullivan, N.T., Nonnemacher, M.R., Dampier, W., Wigdahl, B., et Khalili, K. (2016). HIV-1 Latency and Eradication: Past, Present and Future. *Current HIV research*, 14(5), 431-441.
- Davey, R.T., Jr., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T.W., Metcalf, J.A., Dewar, R., Natarajan, V., Lempicki, R.A., Adelsberger, J.W., Miller, K.D., Kovacs, J.A., Polis, M.A., Walker, R.E., Falloon, J., Masur, H., Gee, D., Baseler, M., Dimitrov, D.S., Fauci, A.S., et Lane, H.C. (1999). HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26), 15109-15114.
- Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A., Schwartz, O., Laguette, N., et Benkirane, M. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells. *Retrovirology*, 9, 87-87.
- Didigu, C.A., Wilen, C.B., Wang, J., Duong, J., Secreto, A.J., Danet-Desnoyers, G.A., Riley, J.L., Gregory, P.D., June, C.H., Holmes, M.C., et Doms, R.W. (2014). Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors ccr5 and cxcr4 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Blood*, 123(1), 61-69.
- Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M.J., Green, S.M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A.D., Singh, M., et Skinner, M.A. (1990). HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *The EMBO Journal*, 9(12), 4145-4153.
- Doyon, Y., Vo, T.D., Mendel, M.C., Greenberg, S.G., Wang, J., Xia, D.F., Miller, J.C., Urnov, F.D., Gregory, P.D., et Holmes, M.C. (2011). Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods*, 8(1), 74-79.
- Drake, M.J., et Bates, P. (2015). Application of Gene Editing Technologies to HIV-1. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 10(2), 123-127.
- Dube, M., Roy, B.B., Guiot-Guillain, P., Mercier, J., Binette, J., Leung, G., et Cohen, E.A. (2009). Suppression of Tetherin-restricting activity upon human immunodeficiency virus type 1 particle release correlates with localization of Vpu in the trans-Golgi network. *J Virol*, 83(9), 4574-4590.
- Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., et Koyanagi, Y. (2013). Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci. Rep.*, 3.
- Feldan Therapeutics. Notre plateforme : Le Feldan Shuttle. Page consultée le 17 novembre 2017 à l'adresse <<http://www.feldan.ca/feldan-shuttle/?lang=fr>>

- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J.D., Margolick, J.B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisziewicz, J., Lori, F., Flexner, C., Quinn, T.C., Chaisson, R.E., Rosenberg, E., Walker, B., Gange, S., Gallant, J., et Siliciano, R.F. (1999). Latent infection of CD4⁺ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*, 5(5), 512-517.
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., Gallant, J., Markowitz, M., Ho, D.D., Richman, D.D., et Siliciano, R.F. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, 278(5341), 1295-1300.
- Freed, E.O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(8), 484-496.
- Fricke, T., White, T.E., Schulte, B., de Souza Aranha Vieira, D.A., Dharan, A., Campbell, E.M., Brandariz-Nuñez, A., et Diaz-Griffero, F. (2014). MxB binds to the HIV-1 core and prevents the uncoating process of HIV-1. *Retrovirology*, 11, 68.
- Friedmann, T., et Roblin, R. (1972). Gene Therapy for Human Genetic Disease? *Science*, 175(4025), 949-955.
- Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K., et Sander, J.D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 31(9), 822-826.
- Galão, Rui P., Le Tortorec, A., Pickering, S., Kueck, T., et Neil, Stuart J. (2012). Innate Sensing of HIV-1 Assembly by Tetherin Induces NFκB-Dependent Proinflammatory Responses. *Cell Host & Microbe*, 12(5), 633-644.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., et Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(39), E2579-2586.
- Genovese, P., Schirotti, G., Escobar, G., Tomaso, T.D., Firrito, C., Calabria, A., Moi, D., Mazziere, R., Bonini, C., Holmes, M.C., Gregory, P.D., van der Burg, M., Gentner, B., Montini, E., Lombardo, A., et Naldini, L. (2014). Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature*, 510(7504), 235-240.
- Goldstone, D.C., Ennis-Adeniran, V., Hedden, J.J., Groom, H.C., Rice, G.I., Christodoulou, E., Walker, P.A., Kelly, G., Haire, L.F., Yap, M.W., de Carvalho, L.P., Stoye, J.P., Crow, Y.J., Taylor, I.A., et Webb, M. (2011). HIV-1 restriction

- factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature*, 480(7377), 379-382.
- Goujon, C., Moncorge, O., Bauby, H., Doyle, T., Ward, C.C., Schaller, T., Hue, S., Barclay, W.S., Schulz, R., et Malim, M.H. (2013). Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*, 502(7472), 559-562.
- Goujon, C., Riviere, L., Jarrosson-Wuilleme, L., Bernaud, J., Rigal, D., Darlix, J.L., et Cimorelli, A. (2007). SIVSM/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells. *Retrovirology*, 4, 2.
- Grissa, I., Vergnaud, G., et Pourcel, C. (2007). The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 8, 172-172.
- Grütter, M.G., et Luban, J. (2012). TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling. *Current Opinion in Virology*, 2(2), 142-150.
- Gupta, R.K., Hué, S., Schaller, T., Verschoor, E., Pillay, D., et Towers, G.J. (2009). Mutation of a Single Residue Renders Human Tetherin Resistant to HIV-1 Vpu-Mediated Depletion. *PLoS Pathogens*, 5(5), e1000443.
- Harris, R.S., et Dudley, J.P. (2015). APOBECs and Virus Restriction. *Virology*, 0, 131-145.
- He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D.O., et Landau, N.R. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *Journal of Virology*, 69(11), 6705-6711.
- Heinzinger, N.K., Bukinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., Kewalramani, V., Lee, M.A., Gendelman, H.E., Ratner, L., Stevenson, M., et Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15), 7311-7315.
- Highleyman, L. (2017, February 28). CROI 2017: Timothy Brown, the Berlin Patient, Celebrates a Decade Cured of HIV. Page consultée le 20 octobre 2017 à l'adresse <<http://www.hivandhepatitis.com/hiv-treatment/hiv-cure/6007-timothy-brown-the-berlin-patient-celebrates-a-decade-cured-of-hiv>>

- Hirsch, V.M., Dapolito, G., McGann, C., Olmsted, R.A., Purcell, R.H., et Johnson, P.R. (1989). Molecular cloning of SIV from sooty mangabey monkeys. *J Med Primatol*, 18(3-4), 279-285.
- Hiscott, J., Kwon, H., et Génin, P. (2001). Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kB pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 107(2), 143-151.
- Holkers, M., Maggio, I., Liu, J., Janssen, J.M., Miselli, F., Mussolino, C., Recchia, A., Cathomen, T., et Gonçalves, M.A.F.V. (2013). Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Research*, 41(5), e63-e63.
- Holzinger, D., Jorns, C., Stertz, S., Boisson-Dupuis, S., Thimme, R., Weidmann, M., Casanova, J.L., Haller, O., et Kochs, G. (2007). Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. *J Virol*, 81(14), 7776-7785.
- Hu, W., Kaminski, R., Yang, F., Zhang, Y., Cosentino, L., Li, F., Luo, B., Alvarez-Carbonell, D., Garcia-Mesa, Y., Karn, J., Mo, X., et Khalili, K. (2014). RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(31), 11461-11466.
- Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müßig, A., Allers, K., Schneider, T., Hofmann, J., Kücherer, C., Blau, O., Blau, I.W., Hofmann, W.K., et Thiel, E. (2009). Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 360(7), 692-698.
- Igarashi, T., Brown, C.R., Endo, Y., Buckler-White, A., Plishka, R., Bischofberger, N., Hirsch, V., et Martin, M.A. (2001). Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4+ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(2), 658-663.
- Inuzuka, M., Hayakawa, M., et Ingi, T. (2005). Serinc, an Activity-regulated Protein Family, Incorporates Serine into Membrane Lipid Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35776-35783.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., et Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816.

- Jouvenet, N., Neil, S.J., Zhadina, M., Zang, T., Kratovac, Z., Lee, Y., McNatt, M., Hatzioannou, T., et Bieniasz, P.D. (2009). Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. *J Virol*, 83(4), 1837-1844.
- Jung, U., Urak, K., Veillette, M., Nepveu-Traversy, M.-É., Pham, Q.T., Hamel, S., Rossi, J.J., et Berthoux, L. (2015). Preclinical Assessment of Mutant Human TRIM5 α as an Anti-HIV-1 Transgene. *Human Gene Therapy*, 26(10), 664-679.
- Kajaste-Rudnitski, A., Marelli, S.S., Pultrone, C., Pertel, T., Uchil, P.D., Mehti, N., Mothes, W., Poli, G., Luban, J., et Vicenzi, E. (2011). TRIM22 Inhibits HIV-1 Transcription Independently of Its E3 Ubiquitin Ligase Activity, Tat, and NF- κ B-Responsive Long Terminal Repeat Elements. *Journal of Virology*, 85(10), 5183-5196.
- Kane, M., Yadav, S.S., Bitzegeio, J., Kutluay, S.B., Zang, T., Wilson, S.J., Schoggins, J.W., Rice, C.M., Yamashita, M., Hatzioannou, T., et Bieniasz, P.D. (2013). MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*, 502(7472), 563-566.
- Kartikeyan, S., Bharmal, R.N., Tiwari, R.P., et Bisen, P.S. (2007). *HIV and AIDS:: Basic Elements and Priorities*. Netherlands: Springer Netherlands.
- Keele, B.F., Giorgi, E.E., Salazar-Gonzalez, J.F., Decker, J.M., Pham, K.T., Salazar, M.G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., Wei, X., Jiang, C., Kirchherr, J.L., Gao, F., Anderson, J.A., Ping, L.H., Swanstrom, R., Tomaras, G.D., Blattner, W.A., Goepfert, P.A., Kilby, J.M., Saag, M.S., Delwart, E.L., Busch, M.P., Cohen, M.S., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., Gaschen, B., Athreya, G.S., Lee, H.Y., Wood, N., Seoighe, C., Perelson, A.S., Bhattacharya, T., Korber, B.T., Hahn, B.H., et Shaw, G.M. (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(21), 7552-7557.
- Kessing, C.F., Nixon, C.C., Li, C., Tsai, P., Takata, H., Mousseau, G., Ho, P.T., Honeycutt, J.B., Fallahi, M., Trautmann, L., Garcia, J.V., et Valente, S.T. (2017). In Vivo Suppression of HIV Rebound by Didehydro-Cortistatin A, a “Block-and-Lock” Strategy for HIV-1 Treatment. *Cell reports*, 21(3), 600-611.
- Khalili, K., Kaminski, R., Gordon, J., Cosentino, L., et Hu, W. (2015). Genome editing strategies: potential tools for eradicating HIV-1/AIDS. *J Neurovirool*, 21(3), 310-321.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J., et Kim, J.S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res*, 24(6), 1012-1019.

- Kim, Y.G., Cha, J., et Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(3), 1156-1160.
- Kingston-Riechers, J. (2011). *Le coût économique du VIH/sida au Canada*. Société Canadienne du Sida. Repéré à <http://www.cdnaids.ca/fr/le-cout-economique-du-vihsida-au-canada/>
- Klein, F., Mouquet, H., Dosenovic, P., Scheid, J., Scharf, L., et Nussenzweig, M.C. (2013). Antibodies in HIV-1 Vaccine Development and Therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6151), 1199-1204.
- Kleinstiver, B.P., Tsai, S.Q., Prew, M.S., Nguyen, N.T., Welch, M.M., Lopez, J.M., McCaw, Z.R., Aryee, M.J., et Joung, J.K. (2016). Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 34(8), 869-874.
- Kluge, S.F., Mack, K., Iyer, S.S., Pujol, F.M., Heigle, A., Learn, G.H., Usmani, S.M., Sauter, D., Joas, S., Hotter, D., Bibollet-Ruche, F., Plenderleith, L.J., Peeters, M., Geyer, M., Sharp, P.M., Fackler, O.T., Hahn, B.H., et Kirchhoff, F. (2014). Nef proteins of epidemic HIV-1 group O strains antagonize human tetherin. *Cell Host Microbe*, 16(5), 639-650.
- Koff, W.C. (2016). A shot at AIDS. *Curr Opin Biotechnol*, 42, 147-151.
- Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A., et Liu, D.R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603), 420-424.
- Koning, F.A., Newman, E.N.C., Kim, E.-Y., Kunstman, K.J., Wolinsky, S.M., et Malim, M.H. (2009). Defining APOBEC3 Expression Patterns in Human Tissues and Hematopoietic Cell Subsets. *Journal of Virology*, 83(18), 9474-9485.
- Kulkosky, J., Culnan, D.M., Roman, J., Dornadula, G., Schnell, M., Boyd, M.R., et Pomerantz, R.J. (2001). Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood*, 98(10), 3006-3015.
- Kupzig, S., Korolchuk, V., Rollason, R., Sugden, A., Wilde, A., et Banting, G. (2003). Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic*, 4(10), 694-709.
- Kutluay, S.B., Perez-Caballero, D., et Bieniasz, P.D. (2013). Fates of Retroviral Core Components during Unrestricted and TRIM5-Restricted Infection. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003214.

- Kwarteng, A., Ahuno, S.T., et Kwakye-Nuako, G. (2017). The therapeutic landscape of HIV-1 via genome editing. *AIDS Research and Therapy*, 14, 32.
- Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., S#x00E, g#x00E, ral, E., Yatim, A., Emiliani, S.x.E., phane, Schwartz, O., et Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*, 474(7353), 654-657.
- Larrouy, L., Brun-Vézinet, F., et Descamps, D. (2010). Mutations au niveau des sites de clivage de gag et du changement de cadre de lecture gag-pol du VIH-1 et réponse virologique à un traitement par inhibiteurs de protéase. *Virologie*, 14(2), 119-128.
- Le Tortorec, A., Willey, S., et Neil, S.J. (2011). Antiviral inhibition of enveloped virus release by tetherin/BST-2: action and counteraction. *Viruses*, 3(5), 520-540.
- Lema, D., Garcia, A., et De Sanctis, J.B. (2014). HIV vaccines: a brief overview. *Scand J Immunol*, 80(1), 1-11.
- Lenassi, M., Cagney, G., Liao, M., Vaupotic, T., Bartholomeeusen, K., Cheng, Y., Krogan, N.J., Plemenitas, A., et Peterlin, B.M. (2010). HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic*, 11(1), 110-122.
- Levy, J.A. (1998). *HIV and the Pathogenesis of AIDS* (2 éd.). Washington, USA: American Society Microbiology Press.
- Li, K., Markosyan, R.M., Zheng, Y.-M., Golfetto, O., Bungart, B., Li, M., Ding, S., He, Y., Liang, C., Lee, J.C., Gratton, E., Cohen, F.S., et Liu, S.-L. (2013). IFITM Proteins Restrict Viral Membrane Hemifusion. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003124.
- Li, L., Wu, L.P., et Chandrasegaran, S. (1992). Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(10), 4275-4279.
- Li, M., Kao, E., Gao, X., Sandig, H., Limmer, K., Pavon-Eternod, M., Jones, T.E., Landry, S., Pan, T., Weitzman, M.D., et David, M. (2012). Codon-usage-based inhibition of HIV protein synthesis by human schlafen 11. *Nature*, 491(7422), 125-128.
- Li, X., Gold, B., O'HUigin, C., Diaz-Griffero, F., Song, B., Si, Z., Li, Y., Yuan, W., Stremlau, M., Mische, C., Javanbakht, H., Scally, M., Winkler, C., Dean, M., et Sodroski, J. (2007). Unique features of TRIM5a among closely related human TRIM family members. *Virology*, 360(2), 419-433.

- Li, Y., Li, X., Stremlau, M., Lee, M., et Sodroski, J. (2006). Removal of Arginine 332 Allows Human TRIM5 α To Bind Human Immunodeficiency Virus Capsids and To Restrict Infection. *Journal of Virology*, 80(14), 6738-6744.
- Liao, H.K., Gu, Y., Diaz, A., Marlett, J., Takahashi, Y., Li, M., Suzuki, K., Xu, R., Hishida, T., Chang, C.J., Esteban, C.R., Young, J., et Izipisua Belmonte, J.C. (2015). Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat Commun*, 6, 6413.
- Lin, S., Staahl, B.T., Alla, R.K., et Doudna, J.A. (2014). Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife*, 3, e04766.
- Lin, Y.C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance, S., Drmanac, R., Chen, J., Speleman, F., Lambrechts, D., Van de Peer, Y., Tavernier, J., et Callewaert, N. (2014). Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*, 5, 4767.
- Liu, J., Gaj, T., Patterson, J.T., Sirk, S.J., et Barbas, C.F., 3rd. (2014). Cell-penetrating peptide-mediated delivery of TALEN proteins via bioconjugation for genome engineering. *PLoS ONE*, 9(1), e85755.
- Liu, Z., Pan, Q., Ding, S., Qian, J., Xu, F., Zhou, J., Cen, S., Guo, F., et Liang, C. (2013). The interferon-inducible MxB protein inhibits HIV-1 infection. *Cell Host Microbe*, 14(4), 398-410.
- Liu, Z., Pan, Q., Liang, Z., Qiao, W., Cen, S., et Liang, C. (2015). The highly polymorphic cyclophilin A-binding loop in HIV-1 capsid modulates viral resistance to MxB. *Retrovirology*, 12, 1.
- Lu, J., Pan, Q., Rong, L., Liu, S.-L., et Liang, C. (2011). The IFITM Proteins Inhibit HIV-1 Infection. *Journal of Virology*, 85(5), 2126-2137.
- Maeder, M.L., et Gersbach, C.A. (2016). Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Molecular Therapy*, 24(3), 430-446.
- Maelfait, J., Seiradake, E., et Rehwinkel, J. (2014). Keeping your armour intact: how HIV-1 evades detection by the innate immune system: HIV-1 capsid controls detection of reverse transcription products by the cytosolic DNA sensor cGAS. *Bioessays*, 36(7), 649-657.

- Malbec, M., Pham, Q.T., Plourde, M.B., Letourneau-Hogan, A., Nepveu-Traversy, M.E., et Berthoux, L. (2010). Murine double minute 2 as a modulator of retroviral restrictions mediated by TRIM5alpha. *Virology*, 405(2), 414-423.
- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V., et Cullen, B.R. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*, 338(6212), 254-257.
- Mandell, M.A., Jain, A., Arko-Mensah, J., Chauhan, S., Kimura, T., Dinkins, C., Silvestri, G., Münch, J., Kirchhoff, F., Simonsen, A., Wei, Y., Levine, B., Johansen, T., et Deretic, V. (2014). TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Developmental cell*, 30(4), 394-409.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., et Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*, 424(6944), 99-103.
- Manotham, K., Chattong, S., et Setpakdee, A. (2015). Generation of CCR5-defective CD34 cells from ZFN-driven stop codon-integrated mesenchymal stem cell clones. *J Biomed Sci*, 22, 25.
- Margolis, D.M., Garcia, J.V., Hazuda, D.J., et Haynes, B.F. (2016). Latency reversal and viral clearance to cure HIV-1. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6297), aaf6517-aaf6517.
- Mascola, J.R., et Haynes, B.F. (2013). HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways. *Immunol Rev*, 254(1), 225-244.
- Mavrommatis, E., Fish, E.N., et Plataniias, L.C. (2013). The Schlafen Family of Proteins and Their Regulation by Interferons. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 33(4), 206-210.
- Mbisa, J.L., Barr, R., Thomas, J.A., Vandegraaff, N., Dorweiler, I.J., Svarovskaia, E.S., Brown, W.L., Mansky, L.M., Gorelick, R.J., Harris, R.S., Engelman, A., et Pathak, V.K. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration. *J Virol*, 81(13), 7099-7110.
- McNatt, M.W., Zang, T., et Bieniasz, P.D. (2013). Vpu binds directly to tetherin and displaces it from nascent virions. *PLoS Pathog*, 9(4), e1003299.
- Merindol, N., et Berthoux, L. (2015). Restriction Factors in HIV-1 Disease Progression. *Curr HIV Res*, 13(6), 448-461.

- Nakayama, E.E., et Shioda, T. (2012). Role of human TRIM5 α in intrinsic immunity. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Naviaux, R.K., Costanzi, E., Haas, M., et Verma, I.M. (1996). The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol*, 70(8), 5701-5705.
- Neagu, M.R., Ziegler, P., Pertel, T., Strambio-De-Castillia, C., Grütter, C., Martinetti, G., Mazzucchelli, L., Grütter, M., Manz, M.G., et Luban, J. (2009). Potent inhibition of HIV-1 by TRIM5-cyclophilin fusion proteins engineered from human components. *The Journal Of Clinical Investigation*, 119(10), 3035-3047.
- Neil, S.J.D., Zang, T., et Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 451(7177), 425-430.
- Nepveu-Traversy, M.-É., et Berthoux, L. (2014). The conserved sumoylation consensus site in TRIM5 α modulates its immune activation functions. *Virus Research*, 184(0), 30-38.
- Nisole, S., Stoye, J.P., et Saib, A. (2005). TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Micro*, 3(10), 799-808.
- Ohkura, S., Yap, M.W., Sheldon, T., et Stoye, J.P. (2006). All three variable regions of the TRIM5 α B30.2 domain can contribute to the specificity of retrovirus restriction. *J Virol*, 80(17), 8554-8565..
- Okada, A., et Iwatani, Y. (2016). APOBEC3G-Mediated G-to-A Hypermutation of the HIV-1 Genome: The Missing Link in Antiviral Molecular Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2027.
- Overbaugh, J., et Morris, L. (2012). The Antibody Response against HIV-1. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(1), a007039.
- Owen, J.A., Punt, J., Stranford, S.A., Jones, P.P., et Kuby, J. (2013). *Kuby immunology* (7th éd.). New York: W.H. Freeman and Company.
- Pabo, C.O., Peisach, E., et Grant, R.A. (2001). Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem*, 70, 313-340.
- Paquet, D., Kwart, D., Chen, A., Sproul, A., Jacob, S., Teo, S., Olsen, K.M., Gregg, A., Noggle, S., et Tessier-Lavigne, M. (2016). Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature*, 533(7601), 125-129.

- Pavletich, N.P., et Pabo, C.O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, 252(5007), 809-817.
- Pepin, J. (2011). *The Origins of AIDS* (1 éd.). New York, USA: Cambridge University Press.
- Pertel, T., Hausmann, S., Morger, D., Züger, S., Guerra, J., Lascano, J., Reinhard, C., Santoni, F., Uchil, P.D., Chatel, L., Bisiaux, A., Albert, M., Strambio-De-Castillia, C., Mothes, W., Pizzato, M., Grütter, M., et Luban, J. (2011). TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature*, 472(7343), 361-365.
- Pham, Q.T., Bouchard, A., Grutter, M.G., et Berthou, L. (2010). Generation of human TRIM5 α mutants with high HIV-1 restriction activity. *Gene Ther*, 17(7), 859-871.
- Pham, Q.T., Veillette, M., Brandariz-Nunez, A., Pawlica, P., Thibert-Lefebvre, C., Chandonnet, N., Diaz-Griffero, F., et Berthou, L. (2013). A novel aminoacid determinant of HIV-1 restriction in the TRIM5 α variable 1 region isolated in a random mutagenic screen. *Virus Res*, 173(2), 306-314.
- Philippidis, A. (2016). Pursuing CRISPR Vision on Germline Editing. *Clinical OMICs*, 3(8), 16-19.
- Qu, X., Wang, P., Ding, D., Li, L., Wang, H., Ma, L., Zhou, X., Liu, S., Lin, S., Wang, X., Zhang, G., Liu, S., Liu, L., Wang, J., Zhang, F., Lu, D., et Zhu, H. (2013). Zinc-finger-nucleases mediate specific and efficient excision of HIV-1 proviral DNA from infected and latently infected human T cells. *Nucleic Acids Res*, 41(16), 7771-7782.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., et Zhang, F. (2013a). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380-1389.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., et Zhang, F. (2013b). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 8(11), 2281-2308.
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Prensri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., Benenson, M., Gurunathan, S., Tartaglia, J., McNeil, J.G., Francis, D.P., Stablein, D., Birx, D.L., Chunsuttiwat, S., Khamboonruang, C., Thongcharoen, P., Robb, M.L., Michael, N.L., Kunasol, P., et Kim, J.H. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med*, 361(23), 2209-2220.

- Richardson, M.W., Guo, L., Xin, F., Yang, X., et Riley, J.L. (2014). Stabilized human TRIM5 α protects human T cells from HIV-1 infection. *Molecular Therapy: The Journal Of The American Society Of Gene Therapy*, 22(6), 1084-1095.
- Roa, A., Hayashi, F., Yang, Y., Lienlaf, M., Zhou, J., Shi, J., Watanabe, S., Kigawa, T., Yokoyama, S., Aiken, C., et Diaz-Griffero, F. (2012). RING domain mutations uncouple TRIM5 α restriction of HIV-1 from inhibition of reverse transcription and acceleration of uncoating. *J Virol*, 86(3), 1717-1727.
- Rosa, A., Chande, A., Ziglio, S., De Sanctis, V., Bertorelli, R., Goh, S.L., McCauley, S.M., Nowosielska, A., Antonarakis, S.E., Luban, J., Santoni, F.A., et Pizzato, M. (2015). HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature*, 526(7572), 212-217.
- Rothenberger, M.K., Keele, B.F., Wietgreffe, S.W., Fletcher, C.V., Beilman, G.J., Chipman, J.G., Khoruts, A., Estes, J.D., Anderson, J., Callisto, S.P., Schmidt, T.E., Thorkelson, A., Reilly, C., Perkey, K., Reimann, T.G., Uday, N.S., Nganou Makamdop, K., Stevenson, M., Douek, D.C., Haase, A.T., et Schacker, T.W. (2015). Large number of rebounding/founder HIV variants emerge from multifocal infection in lymphatic tissues after treatment interruption. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(10), E1126-1134.
- Russell, R.A., Moore, M.D., Hu, W.-S., et Pathak, V.K. (2009). APOBEC3G induces a hypermutation gradient: purifying selection at multiple steps during HIV-1 replication results in levels of G-to-A mutations that are high in DNA, intermediate in cellular viral RNA, and low in virion RNA. *Retrovirology*, 6, 16-16.
- Ryoo, J., Choi, J., Oh, C., Kim, S., Seo, M., Kim, S., Seo, D., Kim, J., White, T.E., Brandariz-Nunez, A., Diaz-Griffero, F., Yun, C.-H., Hollenbaugh, J.A., Kim, B., Baek, D., et Ahn, K. (2014). The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nature medicine*, 20(8), 936-941.
- Saag, M., et Deeks, S.G. (2010). How do HIV elite controllers do what they do? *Clin Infect Dis*, 51(2), 239-241.
- Sander, J.D., et Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotech*, 32(4), 347-355.
- Sanjana, N.E., Shalem, O., et Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*, 11(8), 783-784.

- Schrofelbauer, B., Chen, D., et Landau, N.R. (2004). A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(11), 3927-3932.
- Schrofelbauer, B., Yu, Q., Zeitlin, S.G., et Landau, N.R. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases. *J Virol*, 79(17), 10978-10987.
- Sebastian, S., et Luban, J. (2005). TRIM5 α selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid. *Retrovirology*, 2(1), 40.
- Sharp, P.M., et Hahn, B.H. (2011). Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a006841.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., et Malim, M.H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *9*, 1404.
- Shmakov, S., Abudayyeh, O.O., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Gootenberg, J.S., Semenova, E., Minakhin, L., Joung, J., Konermann, S., Severinov, K., Zhang, F., et Koonin, E.V. (2015). Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell*, 60(3), 385-397.
- Siliciano, R.F., et Greene, W.C. (2011). HIV Latency. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1).
- Smith, J., Bibikova, M., Whitby, F.G., Reddy, A.R., Chandrasegaran, S., et Carroll, D. (2000). Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res*, 28(17), 3361-3369.
- Société Canadienne du SIDA. (2014). *Parler de dépression, d'anxiété et de VIH/sida*. Société Canadienne du SIDA. Repéré à <http://www.cdnaids.ca/wp-content/uploads/f-Talking-About-Depression.pdf>
- Sodroski, J., Rosen, C., Wong-Staal, F., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Arya, S., Gallo, R.C., et Haseltine, W.A. (1985). Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science*, 227(4683), 171-173.
- Soliman, M., Srikrishna, G., et Balagopal, A. (2017). Mechanisms of HIV-1 Control. *Current HIV/AIDS Reports*, 14(3), 101-109.
- Soll, S.J., Wilson, S.J., Kutluay, S.B., Hatzioannou, T., et Bieniasz, P.D. (2013). Assisted Evolution Enables HIV-1 to Overcome a High TRIM5 α -Imposed Genetic Barrier to Rhesus Macaque Tropism. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003667.

- Song, B., Javanbakht, H., Perron, M., Park, D.H., Stremlau, M., et Sodroski, J. (2005). Retrovirus Restriction by TRIM5 α Variants from Old World and New World Primates. *Journal of Virology*, 79(7), 3930-3937.
- St Gelais, C., de Silva, S., Amie, S.M., Coleman, C.M., Hoy, H., Hollenbaugh, J.A., Kim, B., et Wu, L. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in dendritic cells (DCs) by dNTP depletion, but its expression in DCs and primary CD4(+) T-lymphocytes cannot be upregulated by interferons. *Retrovirology*, 9, 105-105.
- Stella, S., Alc3n, P., et Montoya, G. (2017). Class 2 CRISPR-Cas RNA-guided endonucleases: Swiss Army knives of genome editing.
- Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C., et Doudna, J.A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62-67.
- Stremlau, M., Owens, C., Perron, M., Kiessling, M., Autissier, P., et Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, 427(6977), 848-853.
- Stremlau, M., Perron, M., Welikala, S., et Sodroski, J. (2005). Species-specific variation in the B30.2(SPRY) domain of TRIM5 α determines the potency of human immunodeficiency virus restriction. *J Virol*, 79(5), 3139-3145.
- Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Tobiume, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yamaoka, S., Fujita, H., et Tokunaga, K. (2015). MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *21*, 1502.
- Tartour, K., et Cimorelli, A. (2015). Les IFITM, un obstacle commun à de nombreux virus. *Med Sci (Paris)*, 31(4), 377-382.
- Tebas, P., Stein, D., Tang, W.W., Frank, I., Wang, S.Q., Lee, G., Spratt, S.K., Surosky, R.T., Giedlin, M.A., Nichol, G., Holmes, M.C., Gregory, P.D., Ando, D.G., Kalos, M., Collman, R.G., Binder-Scholl, G., Plesa, G., Hwang, W.T., Levine, B.L., et June, C.H. (2014). Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*, 370(10), 901-910.
- Trautz, B., Pierini, V., Wombacher, R., Stolp, B., Chase, A.J., Pizzato, M., et Fackler, O.T. (2016). The Antagonism of HIV-1 Nef to SERINC5 Particle Infectivity Restriction Involves the Counteraction of Virion-Associated Pools of the Restriction Factor. *Journal of Virology*, 90(23), 10915-10927.
- U.S. Department of Health and Human Services. (2016, October 19). HIV and Mental Health. Understanding HIV/AIDS - Fact Sheets - Living with HIV. Page

consultée le 17 octobre 2017 à l'adresse <<https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/27/92/hiv-and-mental-health#>>

U.S. Department of Health and Human Services. (2017, August 22). The Stages of HIV Infection. Understanding HIV/AIDS - Fact Sheets - HIV Overview. Page consultée le 17 octobre 2017 à l'adresse <<https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/46/the-stages-of-hiv-infection>>

U.S. Food and Drug Administration. (2016, August 9). Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. For Patients - Get Illness/Condition Information - HIV/AIDS - HIV/AIDS Treatment. Page consultée le 17 octobre 2017 à l'adresse <<https://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118915.htm>>

Wagner, J.M., Roganowicz, M.D., Skorupka, K., Alam, S.L., Christensen, D., Doss, G., Wan, Y., Frank, G.A., Ganser-Pornillos, B.K., Sundquist, W.I., et Pornillos, O. (2016). Mechanism of B-box 2 domain-mediated higher-order assembly of the retroviral restriction factor TRIM5 α . *eLife*, 5, e16309.

Wang, M., Glass, Z.A., et Xu, Q. (2017). Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy. *Gene Ther*, 24(3), 144-150.

Wang, X., Wang, P., Fu, Z., Ji, H., Qu, X., Zeng, H., Zhu, X., Deng, J., Lu, P., Zha, S., Song, Z., et Zhu, H. (2015). Designed transcription activator-like effector proteins efficiently induced the expression of latent HIV-1 in latently infected cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 31(1), 98-106.

Wang, X., Yu, Q., Yuan, Y., Teng, Z., Li, D., et Zeng, Y. (2017). Targeting the rhesus macaque TRIM5 α gene to enhance the susceptibility of CD4⁺ T cells to HIV-1 infection. *Arch Virol*, 162(3), 793-798.

White, T.E., Brandariz-Nunez, A., Valle-Casuso, J.C., Amie, S., Nguyen, L., Kim, B., Brojatsch, J., et Diaz-Griffero, F. (2013). Contribution of SAM and HD domains to retroviral restriction mediated by human SAMHD1. *Virology*, 436(1), 81-90.

Willey, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A., et Strebel, K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol*, 66(12), 7193-7200.

World Health Organization. (2016). What's new in HIV treatment. Fact sheet: HIV treatment and care. 2015. Page consultée le 17 octobre 2017 à l'adresse <<http://www.who.int/hiv/pub/arv/arv2015-treatment-factsheet/en/>>

- World Health Organization. (2017, July). HIV/AIDS. Media Center : Fact Sheet. Page consultée le 17 octobre 2017 à l'adresse <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>>
- Wu, X., Anderson, J.L., Campbell, E.M., Joseph, A.M., et Hope, T.J. (2006). Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(19), 7465-7470.
- Yang, B., Chen, K., Zhang, C., Huang, S., et Zhang, H. (2007). Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/apyrimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA. *J Biol Chem*, 282(16), 11667-11675.
- Yang, S.J., Lopez, L.A., Exline, C.M., Haworth, K.G., et Cannon, P.M. (2011). Lack of adaptation to human tetherin in HIV-1 Group O and P. *Retrovirology*, 8, 78-78.
- Yap, M.W., Nisole, S., et Stoye, J.P. (2005). A single amino acid change in the SPRY domain of human Trim5alpha leads to HIV-1 restriction. *Curr Biol*, 15(1), 73-78.
- Ye, L., Wang, J., Beyer, A.I., Teque, F., Cradick, T.J., Qi, Z., Chang, J.C., Bao, G., Muench, M.O., Yu, J., Levy, J.A., et Kan, Y.W. (2014). Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Delta32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(26), 9591-9596.
- Yin, H., Song, C.Q., Suresh, S., Wu, Q., Walsh, S., Rhym, L.H., Mintzer, E., Bolukbasi, M.F., Zhu, L.J., Kauffman, K., Mou, H., Oberholzer, A., Ding, J., Kwan, S.Y., Bogorad, R.L., Zatspein, T., Koteliansky, V., Wolfe, S.A., Xue, W., Langer, R., et Anderson, D.G. (2017). Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing. *Nat Biotechnol*.
- Ylisastigui, L., Archin, N.M., Lehrman, G., Bosch, R.J., et Margolis, D.M. (2004). Coaxing HIV-1 from resting CD4 T cells: histone deacetylase inhibition allows latent viral expression. *AIDS*, 18(8), 1101-1108.
- Yu, J., Li, M., Wilkins, J., Ding, S., Swartz, T.H., Esposito, A.M., Zheng, Y.-M., Freed, E.O., Liang, C., Chen, B.K., et Liu, S.-L. (2015). IFITM Proteins Restrict HIV-1 Infection by Antagonizing the Envelope Glycoprotein. *Cell reports*, 13(1), 145-156.
- Yu, Q., Chen, D., Konig, R., Mariani, R., Unutmaz, D., et Landau, N.R. (2004). APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication. *J Biol Chem*, 279(51), 53379-53386.

- Yukl, S.A., Boritz, E., Busch, M., Bentsen, C., Chun, T.W., Douek, D., Eisele, E., Haase, A., Ho, Y.C., Hutter, G., Justement, J.S., Keating, S., Lee, T.H., Li, P., Murray, D., Palmer, S., Pilcher, C., Pillai, S., Price, R.W., Rothenberger, M., Schacker, T., Siliciano, J., Siliciano, R., Sinclair, E., Strain, M., Wong, J., Richman, D., et Deeks, S.G. (2013). Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative interventions: a study of the Berlin patient. *PLoS Pathog*, 9(5), e1003347.
- Zetsche, B., Gootenberg, Jonathan S., Abudayyeh, Omar O., Slaymaker, Ian M., Makarova, Kira S., Essletzbichler, P., Volz, Sara E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, Eugene V., et Zhang, F. (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*, 163(3), 759-771.
- Zhang, F., Hatzioannou, T., Perez-Caballero, D., Derse, D., et Bieniasz, P.D. (2006). Antiretroviral potential of human tripartite motif-5 and related proteins. *Virology*, 353(2), 396-409.
- Zhang, F., Wen, Y., et Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*, 23(R1), R40-46.
- Zhang, Y., Yin, C., Zhang, T., Li, F., Yang, W., Kaminski, R., Fagan, P.R., Putatunda, R., Young, W.B., Khalili, K., et Hu, W. (2015). CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Sci Rep*, 5, 16277.

ANNEXE A

RÉSULTATS D'INFECTION NON-MONTRÉS

Dans le projet d'édition génomique du gène TRIM5 afin d'augmenter la capacité de restriction du VIH-1 du facteur de restriction TRIM5 α dans des cellules humaines, des résultats d'infection des clones obtenus n'ont pas été montrés dans l'article publié dans PlosOne.

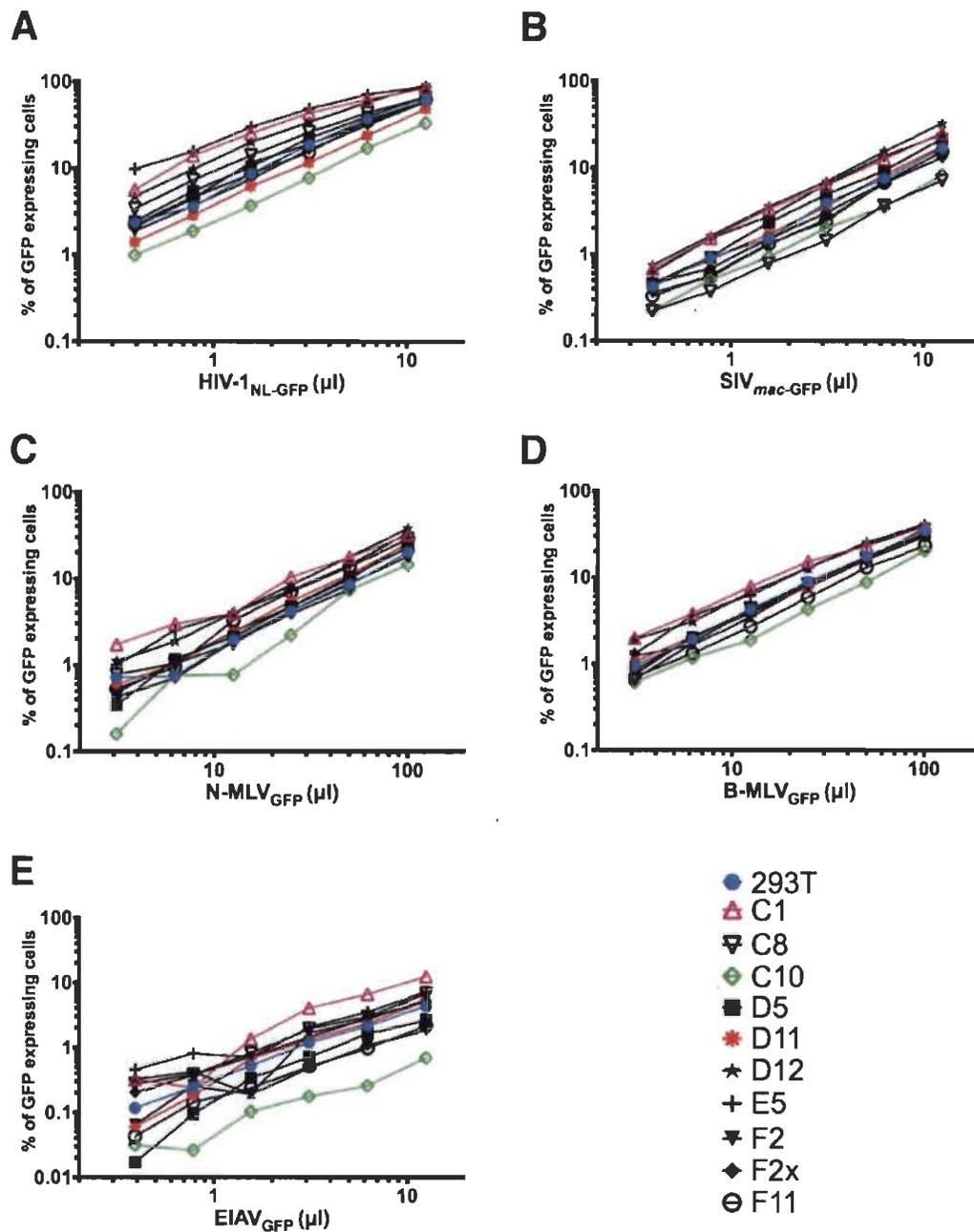


Figure 5.1 Capacité de restriction de différents rétrovirus des 10 clones ayant subi une édition génomique de *TRIM5*.

Les 10 clones ont été infectés avec des doses croissantes de 5 rétrovirus différents (VIH-1, VIS, N-MLV, B-MLV et EIAV) exprimant GFP, puis le pourcentage de cellules exprimant GFP a été déterminé par cytométrie en flux. En comparaison avec les cellules 293T non éditées, aucun des clones n'est spécifiquement plus restrictif du VIH-1.

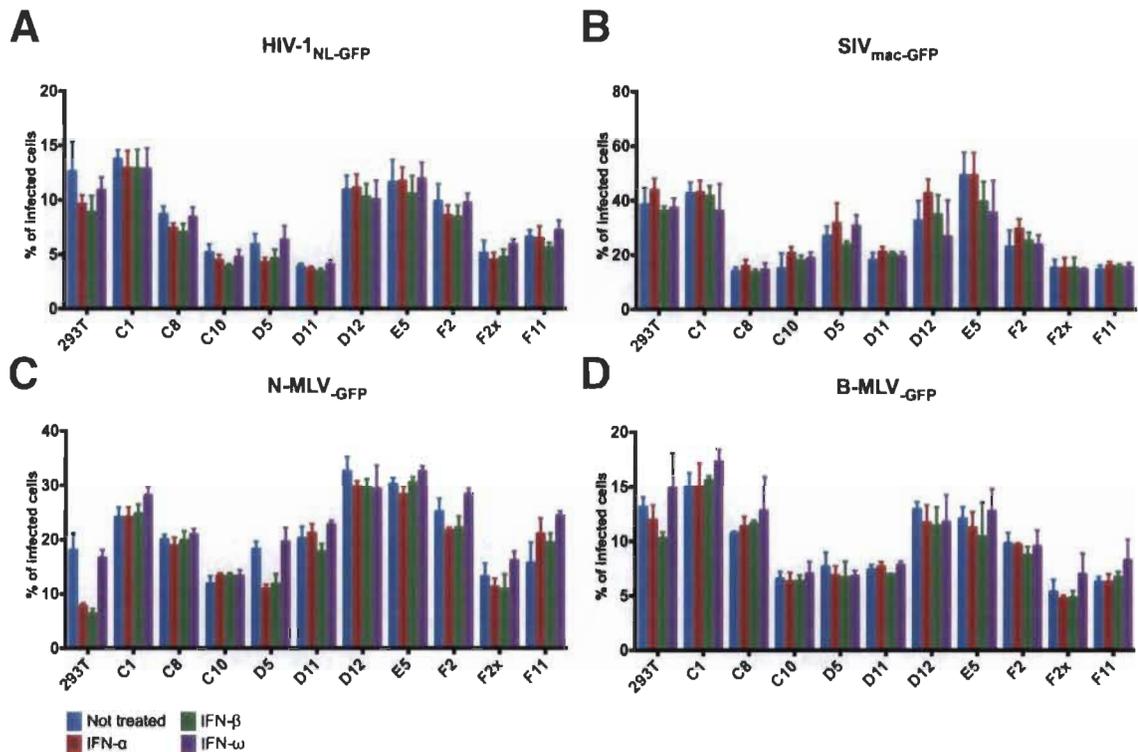


Figure 5.2 Capacité de restriction de différents rétrovirus des 10 clones ayant subi une édition génomique de *TRIM5* après traitement à l'IFN-I.

Les 10 clones ont subi un traitement à l'IFN-I (soit IFN- α , IFN- β ou IFN- ω) 16 heures avant d'être infectés avec une dose unique de 4 rétrovirus différents (VIH-1, VIS, N-MLV et B-MLV) exprimant GFP. Le pourcentage de cellules exprimant GFP a été déterminé par cytométrie en flux. Les cellules 293T non éditées, qui servent de contrôle, ne sont que faiblement plus restrictives de N-MLV lorsqu'elles sont traitées avec l'IFN- α et IFN- β . Aucun des clones n'a de meilleure restriction après un traitement à l'IFN-I, peu importe le rétrovirus.