

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations	xi
Remerciements	xiv
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1. Origine du virus et de l'épidémie	1
1.1.1. Les premiers cas répertoriés	1
1.1.2. Épidémiologie	1
1.1.3. Les origines du VIH-1	2
1.2. Génome et structure du VIH-1.....	3
1.2.1. Génome viral	3
1.2.2. Structure du virion.....	4
1.3. Cycle de réplication du VIH-1	5
1.3.1. Les premières étapes de l'infection.....	5
1.3.2. Formation de l'ADN viral et intégration dans le génome.....	6
1.3.3. Production des protéines virales et maturation du virion.....	7
1.3.4. Les facteurs de restriction viraux	8
1.4. Immunopathogénèse du virus	9
1.4.1. Les modes de transmission du VIH-1	9
1.4.2. Les phases de l'infection virale.....	10
1.4.3. Antirétroviraux	12
1.4.4. Réservoirs et sanctuaires viraux	14
1.5. Macrophages	15
1.5.1. Origine des macrophages	15
1.5.2. Types de macrophages et leurs fonctions dans l'organisme	15
1.5.2.1. Macrophages tissulaires.....	15
1.5.2.2. Macrophages dérivés de monocytes.....	16
1.5.3. Polarisation des macrophages	17

1.6. Le VIH-1 et les macrophages	19
1.6.1. Le cycle viral du VIH-1 chez les MDM.....	19
1.6.2. Impact des macrophages de l'intestin sur la barrière épithéliale	19
1.7. Le folate, vitamine essentielle à l'organisme.....	20
1.7.1. Structure du folate	21
1.7.2. Le cycle du folate	21
1.7.2.1. L'absorption du folate et son entrée dans la cellule	21
1.7.2.2. Le contrôle du niveau de folate intracellulaire	22
1.7.2.3. La sortie de la cellule.....	24
1.7.3. Les analogues du folate	25
1.7.3.1. Méthotrexate.....	25
1.7.3.2. Raltitrexed	25
Chapitre 2 : Hypothèse et objectifs.....	27
Chapitre 3 : Matériel et Méthodes	28
3.1. Production de particules virales.....	28
3.1.1. Modèles viraux	28
3.1.2. Culture de cellules HEK293T	28
3.1.3. Transfection du plasmide viral.....	29
3.1.4. Récolte de la production virale.....	29
3.1.5. Dosage de la production virale.....	29
3.1.5.1. ELISA p24.....	29
3.1.5.2. TCID50 sur lignée de cellules TZM-BL	30
3.2. Production de macrophages dérivés de monocytes à partir de sang périphérique de donneurs sains.....	31
3.2.1. Isolement des macrophages dérivés de monocytes (MDM)	31
3.3. Modifications dans le cycle du folate	33
3.3.1. Utilisation de petits ARN interférents.....	33
3.3.2. Utilisation d'un inhibiteur chimique	34
3.3.2.1. Méthotrexate.....	34
3.3.2.2. Raltitrexed	34
3.3.3. Effet de l'acide folique sur la réplication virale.....	34
3.4. Infection des macrophages.....	35
3.5. Analyse des données	35

3.5.1. Cytométrie en flux.....	35
3.5.2. ELISA p24.....	36
3.6. Validation de l'efficacité des ARN interférents	36
3.6.1. Extraction de l'ARN.....	36
3.6.2. PCR quantitative.....	36
3.7. Étude du mécanisme d'action du Raltitrexed chez les MDM.....	38
3.7.1. Préparation des cellules	38
3.7.2. Extraction de l'ADN.....	38
3.7.3. PCR en temps réel pour l'ADN intégré.....	39
3.8. Statistiques	40
Chapitre 4 : Résultats.....	41
4.1. Validation de la diminution des ARNm de protéines impliquées dans le métabolisme du folate par des siRNA.....	41
4.2. La réduction des ARNm d'enzymes essentielles impliquées dans le cycle du folate a un impact sur la réplication du VIH-1	42
4.3. La réduction des ARNm d'enzymes essentielles impliquées dans le cycle du folate a un impact sur la production de nouveaux virions	43
4.4. La suppression du folate dans la culture des MDM n'a pas d'impact à court terme sur la réplication virale du VIH-1	44
4.5. Le MTX n'a pas d'effet significatif sur la réplication virale, malgré une diminution de l'activité métabolique.....	45
4.6. Le RTX diminue le nombre de MDM productivement infectés, mais augmente la transcription virale dans ces cellules.....	46
4.7. Le RTX influence la susceptibilité des MDM à l'infection.....	47
4.8. Le RTX n'influence pas l'intégration virale dans les MDM	48
Chapitre 5 : Discussion.....	49
5.1. Sélection des gènes d'intérêt et impact sur l'infection des MDM par le VIH-1.....	49
5.1.1. Gamma-Glutamyl Hydrolase (GGH)	49
5.1.2. Folylpolyglutamate Synthase (FPGS).....	50
5.1.3. Méthylènetétrahydrofolate Réductase (MTHFR)	51
5.1.4. Dihydrofolate Réductase (DHFR).....	52
5.2. En réponse à l'infection, le folate serait exporté de la cellule afin de nuire à la réplication virale	52
5.3. À court terme, une diminution du niveau d'acide folique n'a pas d'effet significatif sur la réplication virale.	55

5.4. Le MTX n'affecterait pas la susceptibilité des MDM à l'infection.....	55
5.5. Le RTX diminue le nombre de cellules productivement infectées.....	57
5.6. Le RTX diminuerait la susceptibilité des MDM à l'infection par le VIH-1.....	58
5.7. Le RTX n'affecterait pas l'intégration virale dans les MDM.....	59
Chapitre 6 : Conclusion et perspectives	62
Chapitre 7 : Bibliographie	64

Liste des tableaux

Tableau 1 : Fonction des différentes protéines virales	5
Tableau 2 : Séquence des siRNA utilisés	33
Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour la PCR ciblant l'ARN	38
Tableau 4 : Liste des amorces utilisées pour la PCR quantitative.....	40

Liste des figures

Figure 1 : Prévalence géographique de l'infection par le VIH-1 en 2016.....	2
Figure 2 : Le génome du VIH-1	3
Figure 3 : La structure du VIH-1	4
Figure 4 : Le cycle de réplication du VIH-1 et les facteurs de restriction viraux	9
Figure 5 : Immunopathogénèse du VIH-1	12
Figure 6 : L'origine des macrophages	17
Figure 7 : La polarisation des macrophages	18
Figure 8 : La structure générique du folate	21
Figure 9 : Le mécanisme de rétention du folate dans la cellule	24
Figure 10 : Structure du Méthotrexate et du Raltitrexed	26
Figure 11 : Clone moléculaire NL4-3 BAL Env IRES HSA	28
Figure 12 : Expression génique des siRNA utilisés	41
Figure 13 : Modulation du nombre de cellules productivement infectées à la suite de la transfection de siRNA	42
Figure 14 : Cinétique de production virale à la suite de la transfection de siRNA	43
Figure 15 : Effet de l'acide folique sur la réplication virale.....	44
Figure 16 : Effet du MTX sur la réplication virale.....	45
Figure 17 : Effet du RTX sur la réplication virale.....	46
Figure 18 : Cinétique de production virale à la suite de l'utilisation du RTX avant ou après l'infection par le VIH-1	47
Figure 19 : Nombre de copies d'ADN intégré à la suite du traitement avec le RTX.....	48

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	De l'anglais <i>Bovine Serum Albumin</i>
CA	Capside
CCR5	De l'anglais <i>C-C chemokine receptor type 5</i>
CD	Cluster de différenciation
CDC	De l'anglais <i>U.S. Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CXCR4	De l'anglais <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
dNTP	Désoxyribonucléotides
dpi	De l'anglais <i>days post-infection</i>
DC-SIGN	De l'anglais <i>dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule -3-grabbing non integrin</i>
DHFR	Dyhydrofolate Réductase
ELISA	De l'anglais <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Env	Enveloppe
FPGS	Folylpolyglutamate Synthase
Gag	De l'anglais <i>Group-specific antigen</i>
GGH	Gamma Glutamyl Hydrolase
GM-CSF	De l'anglais <i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
HBS	De l'anglais <i>Hepes buffered saline</i>
hpi	De l'anglais <i>hours post-infection</i>
HRP	De l'anglais <i>Horseradish peroxydase</i>
HSA	De l'anglais <i>Heat stable antigen</i>
HTLV-III	De l'anglais <i>Human T-lymphotopic retrovirus III</i>
IL	Interleukine

IN	Intégrase
LAV	De l'anglais <i>Lymphadenopathy associated virus</i>
LC	De l'anglais Langerans cell
LPS	Lipopolysaccharide
LTR	De l'anglais <i>Long terminal repeat</i>
lyT CD4+	Lymphocytes T CD4+
lyT CD8+	Lymphocytes T CD8+
M-CSF	De l'anglais <i>Macrophage-colony stimulating factor</i>
MA	Matrice
MDM	Macrophage dérivé de monocyte
MOI	De l'anglais <i>Multiplicity of infection</i>
MTHFR	Méthylènetétrahydrofolate Réductase
MTX	Méthotrexate
NC	Nucléocapside
Nef	De l'anglais <i>Negative factor</i>
p24	Protéine de capsid virale
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PBMC	De l'anglais <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBL	De l'anglais <i>Peripheral blood lymphocytes</i>
PBS	De l'anglais <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	De l'anglais <i>Polymerase chain reaction</i>
PIC	De l'anglais <i>Pre-integration complex</i>
Pol	Polymérase
PR	Protéase
PSMA	De l'anglais <i>Prostate specific membrane antigen</i>
Rev	De l'anglais <i>Regulator of viral gene expression</i>
RNAPII	ARN polymérase II
RPMI	De l'anglais <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	De l'anglais <i>Reverse Transcriptase</i>
RT-PCR	De l'anglais <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>

RTX	Raltritrexed
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
siRNA	De l'anglais <i>Small interfering ribonucleic acid</i>
Tat	De l'anglais <i>Transactivator of transcription</i>
TCID50	De l'anglais <i>50% Tissue culture Infective Dose</i>
THF	Tétrahydrofolate
TK	Thymidylate Kinase
TLR	De l'anglais <i>Toll-like receptor</i>
TNF	De l'anglais <i>Tumor necrosis factor</i>
Vif	De l'anglais <i>Viral infectivity factor</i>
Vpu	De l'anglais <i>Viral protein U</i>
Vpr	De l'anglais <i>Viral protein R</i>
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Michel J. Tremblay de m'avoir accueilli au sein de son équipe et d'avoir supervisé mes études à la maîtrise. Dr Tremblay est un mentor hors du commun et je suis choyé d'avoir pu amorcer ma carrière scientifique dans son laboratoire.

Je voudrais également remercier toute l'équipe MJT avec qui j'ai passé 2 années extraordinaires. Rarement dans ma vie j'ai eu la chance de travailler avec une équipe aussi unie et agréable. Je vais garder de beaux moments passés en votre compagnie.

J'aimerais aussi remercier Michel Ouellet pour son soutien et ses conseils. Entre deux *dad's jokes* (souvent douteuses), tu trouves réponse à tout et tu nous pousses à réfléchir afin de tirer le meilleur de nous-mêmes. Avec ton expérience, tu as su garder un esprit jeune et c'est ce qui fait qu'il est agréable de t'avoir comme chef de projet. Je dois également remercier Yann qui malgré lui, a dû travailler avec moi. Ta générosité et ta patience font de toi quelqu'un d'unique et ce fut un plaisir de t'avoir comme collègue. Je n'ai aucun doute que tu es à la bonne place et que la science est ton domaine! Bien sûr, je ne peux pas oublier les *Special Boys* avec qui j'ai eu tellement de plaisir autant au labo qu'à l'extérieur. Je suis content de vous connaître et je souhaite que notre amitié perdure au fil du temps.

Je voudrais remercier les organismes subventionnaires qui ont permis le financement de ce projet, dont le Consortium canadien de recherche sur la guérison du VIH (CanCURE).

Merci à ma famille qui a cru en moi et qui m'a soutenu dans mon changement de carrière. Ce n'est pas facile de quitter un emploi stable pour faire un 180 degré professionnel et repartir à zéro. Vous êtes toujours là pour moi et je vous en remercie sincèrement.

Finalement, je veux remercier ma copine Maria avec qui j'ai la chance de partager ma vie. Tu m'as soutenu durant mes études et tu t'es montrée compréhensive lorsque je devais passer mes soirées dans mes livres ou à l'écriture de ce mémoire. Même si tu ne comprends pas tout ce que je fais, tu t'y intéresses et tu veux en savoir plus. Pour moi, cela est très important. Merci d'être là !

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Origine du virus et de l'épidémie

1.1.1. Les premiers cas répertoriés

Au début des années 1980, le *U.S. Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) est alerté de plusieurs cas d'infections pulmonaires rares à *Pneumocystis carinii* chez des hommes homosexuels [1]. Ces infections sont accompagnées d'une perte de fonction du système immunitaire que l'on connaît maintenant sous le nom de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Au fil des mois, le nombre de cas augmente drastiquement si bien que les autorités médicales et gouvernementales sont forcées d'agir rapidement. C'est en 1983 que l'équipe du Dr Luc Montagnier de l'Institut Pasteur de Paris découvre l'agent causal du SIDA [2]. Il s'agit d'un rétrovirus isolé à partir de ganglions de patients atteints de la maladie qui est nommé *Lymphadenopathy Associated Virus* (LAV). L'année suivante, l'équipe du Dr Robert Gallo en Californie isole un nouveau rétrovirus nommé *Human T-Lymphotropic Retrovirus III* (HTLV-III), qui s'avère être la cause du SIDA [3]. Après des observations, on constate que ces deux nouveaux virus n'en sont qu'un seul et au mois de mai 1986, le comité international de taxonomie sur les virus propose que le nom virus de l'immunodéficience humaine (VIH) soit dorénavant utilisé [4].

1.1.2. Épidémiologie

Selon les dernières statistiques de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) en 2016, environ 37 millions de personnes seraient infectées par le VIH-1. La majorité de ces personnes vivent en Afrique subsaharienne. Annuellement, environ 1.8 million de nouvelles personnes contractent le virus et plus de 1 million en meurt. En date de la mi-2017, environ 20,9 millions de personnes recevaient des traitements antirétroviraux. Le programme ONUSIDA est une initiative de l'Organisation des Nations Unies (ONU) servant à coordonner les efforts dans la lutte contre la pandémie de VIH/SIDA. Son but est d'éliminer complètement l'épidémie de SIDA d'ici 2030. Pour ce faire, ils veulent d'ici 2020 réduire sous la barre des 500 000 nouveaux cas par année sans qu'aucun enfant en meure. De plus,

ils veulent que 90% des personnes infectées soient testées, 90% soient traitées et 90% aient une suppression complète du virus [5].

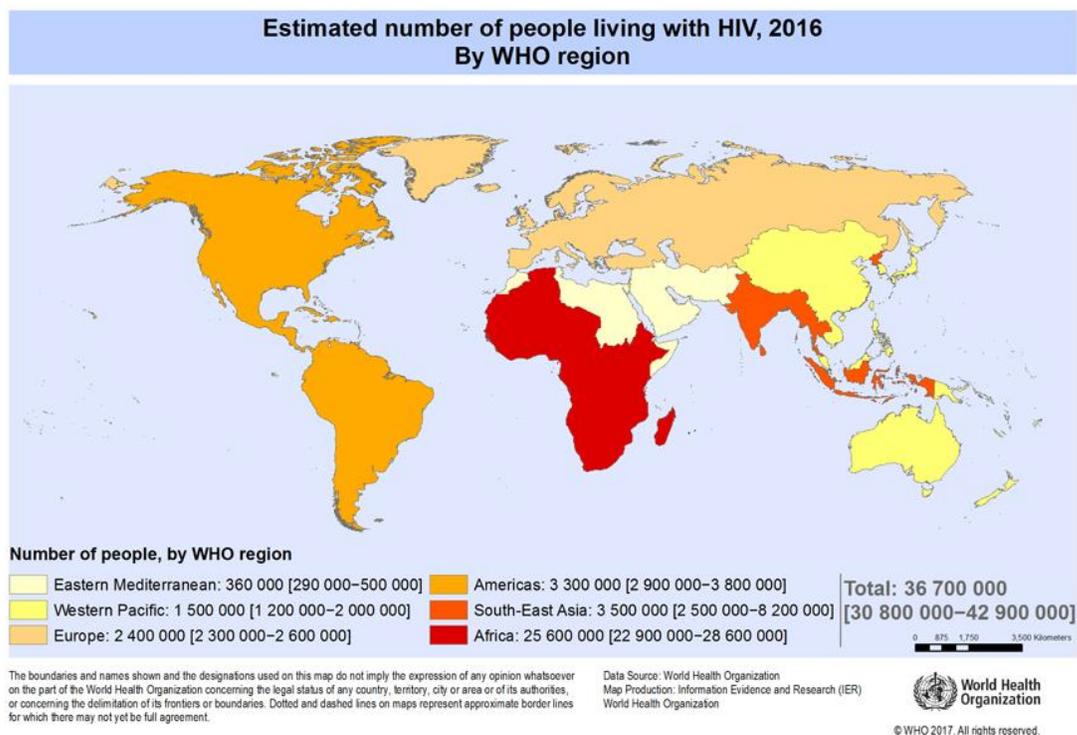


Figure 1 : Prévalence géographique de l'infection par le VIH-1 en 2016

Plus récentes données sur l'estimation du nombre de personnes qui vivent avec le VIH-1 dans le monde (2016). Source : Organisation mondiale de la Santé [6]

1.1.3. Les origines du VIH-1

Depuis la découverte du VIH-1, beaucoup de théories plus ou moins crédibles ont émergé sur l'origine du virus. Nous savons cependant à l'heure actuelle que l'épidémie aurait commencé au début des années 1920 dans un petit village de l'Afrique de l'Ouest appelé Kinshasa [7]. C'est à cet endroit que la diversité génétique du virus est la plus grande et que la plus vieille souche du virus a été isolée [8]. Il y aurait probablement eu à cet endroit une zoonose avec un virus similaire : le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) [9]. Avec le début de l'ère de l'industrialisation au 20^e siècle, le virus s'est propagé à travers le monde pour atteindre le continent américain au début des années 1970 [10].

1.2. Génome et structure du VIH-1

1.2.1. Génome viral

Le VIH-1 est un rétrovirus du genre lentivirus possédant un génome de seulement 9200 nucléotides [11]. Les rétrovirus ont la particularité de rétrotranscrire l'ARN pour former de l'ADN tandis que le genre lentivirus a la capacité d'établir une infection latente et de tuer les cellules [12]. Chaque virion contient deux copies d'un ARN monocaténaire à polarité positive contenu dans une capsid virale. Le virus possède trois (3) polyprotéines appelées Gag, Pol et Env qui sont respectivement responsables des gènes de structure (matrice (MA), capsid (CA), nucléocapsid (NC) et p6), des enzymes virales (transcriptase inverse (RT), intégrase (IN) et protéase (PR)) et de l'enveloppe (gp120 et gp41). Le génome possède également des protéines essentielles (Tat, Rev) et des protéines accessoires (Vpr, Vpu, Vif, Nef) régulant la biosynthèse du virus [13]. Finalement, le génome est flanqué de deux séquences hautement conservées appelées *long terminal repeats* (LTR). Ces LTR servent d'éléments de régulation en interagissant avec différentes protéines virales et de l'hôte lors du cycle de réplication [14]. La figure 2 illustre l'organisation génomique des différentes protéines du VIH-1.

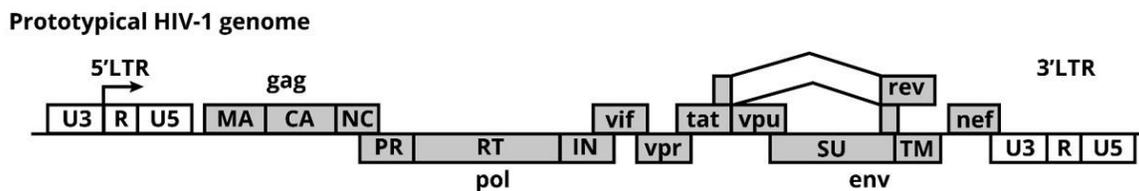


Figure 2 : Le génome du VIH-1

Organisation du génome d'ARN monocaténaire du VIH-1 et de ses différentes protéines.

1.2.2. Structure du virion

Le VIH-1 mesure environ 120 nm de diamètre et possède une structure relativement complexe. À sa surface, des trimères de gp120 sont arrimés avec des trimères de gp41 [15]. Ces derniers sont ancrés dans une enveloppe composée d'une bicouche lipidique obtenue lors du bourgeonnement du virus de la cellule hôte [16]. Cette enveloppe entoure une matrice (MA, p17) aidant à la structure au virion et régulant différentes étapes du cycle viral, dont l'assemblage [17]. Finalement, à l'intérieur se trouve une capsid de forme conique appelée p24 (CA). Elle contient les 2 copies d'ARN monocaténaire à polarité positive entouré d'une nucléocapside (NC) qui les protègent contre la dégradation et intervenant dans plusieurs étapes du cycle viral, dont la transcription inverse ainsi que l'assemblage du virion [18]. Dans la capsid, il y a également les diverses protéines essentielles et accessoires, le complexe de transcriptase inverse, l'intégrase ainsi que la protéase virale [19].

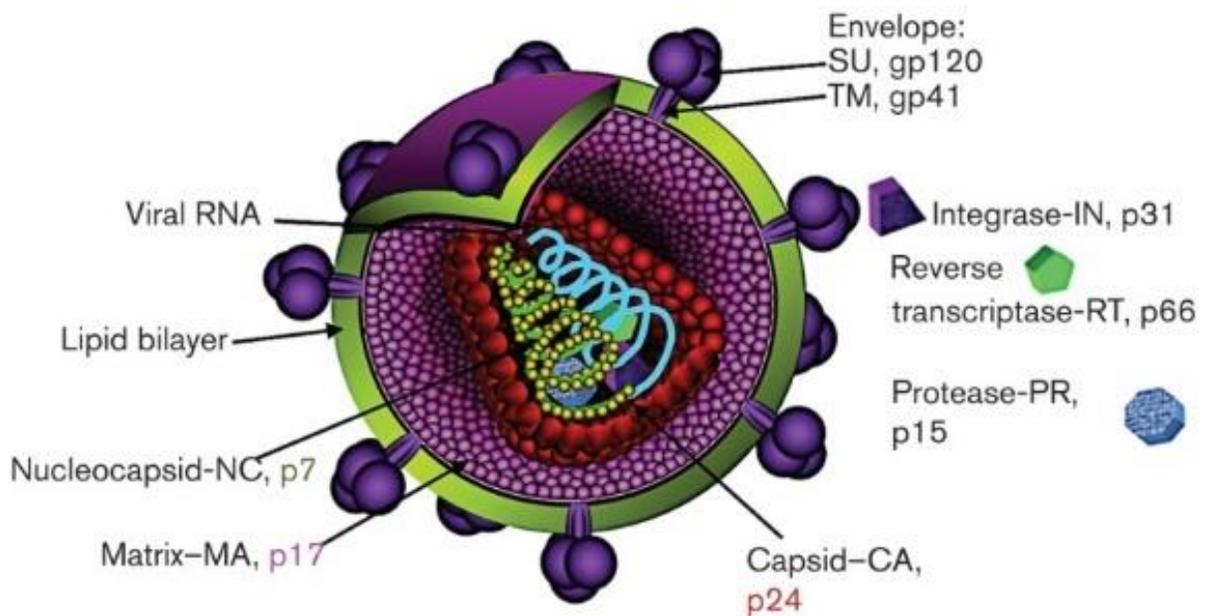


Figure 3 : La structure du VIH-1

Organisation structurale d'un virion mature et emplacement de ses différentes protéines.

Source : Steckbeck et al. [20]

Tableau 1 : Fonction des différentes protéines virales

Gène	Fonction
Gag	Structure : matrice et capsid virale
Pol	Enzymes virales : protéase, intégrase et transcriptase inverse
Env	Enveloppe virale : gp120 et gp41
Vif	Dégrade les facteurs de restriction viraux APOBEC3G et APOBEC3F
Vpr	Arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M
Tat	Activation de la transcription virale
Vpu	Diminution de CD4 et CMH et relargage du virion
Rev	Permet l'export nucléaire des ARN contenant des introns
Nef	Bloque l'apoptose et augmente l'infectivité du virion

Liste des différentes protéines du VIH-1 et leurs rôles dans la pathogenèse du virus. Le tableau est adapté de Swanson, C.M et *al.* [21]

1.3. Cycle de réplication du VIH-1

1.3.1. Les premières étapes de l'infection

L'enveloppe virale est constituée d'hétérodimères de glycoprotéines gp120 et gp41 qui forment des trimères à sa surface [15]. Tout d'abord, la gp120 s'attache à une cellule possédant des récepteurs CD4 tels que les lymphocytes T CD4⁺ (lyT CD4⁺) et les macrophages [22, 23]. La gp120 virale possède 5 domaines conservés (C1-C5) et 5 domaines variables (V1-V5) [24]. L'attachement de la gp120 avec le CD4 cause un changement de conformation dans les régions V1, V2 et V3 [25]. La boucle V3 est importante, car elle a un impact majeur sur le tropisme du virus et sa capacité à se lier aux co-récepteurs [26]. Le changement de conformation rapproche la protéine gp41 de la membrane cellulaire et facilite l'attachement au co-récepteur CCR5 (tropisme R5) ou CXCR4 (tropisme X4) [27, 28]. Tôt dans l'infection, le virus utilise principalement le récepteur transmembranaire CCR5 alors que plus tard dans l'évolution de la maladie il préconise le CXCR4 [29]. Les raisons de ce changement ne sont pas très bien comprises, mais celui-ci est observé chez les patients ayant une progression rapide de la maladie ainsi qu'un compte de lyT CD4⁺ faible [30]. Cette perte de lyT CD4⁺ combinée à l'inflammation chronique du système immunitaire et à des mutations accumulées dans la région V3 de la gp120 pourrait expliquer ce changement de phénotype [31, 32]. L'attachement au co-récepteur va causer un autre changement de

conformation permettant l'insertion de la gp41 dans la membrane de la cellule hôte afin de favoriser sa fusion avec la membrane virale [33]. Cette fusion libère la capsid virale dans le cytoplasme et permet la poursuite de la biosynthèse du virus [34].

1.3.2. Formation de l'ADN viral et intégration dans le génome

Une fois dans le cytoplasme, la capsid est partiellement désassemblée afin de libérer l'ARN viral et les protéines nécessaires à sa réplication. Cette étape implique la phosphorylation des protéines CA et MA [35] ainsi que l'action de plusieurs autres protéines virales et cellulaires dont la cyclophiline A (CypA). Cette dernière s'attache à la capsid virale afin de réguler la décapsidation et contrôler l'infectivité du virion [36, 37]. Avec l'aide de microfilaments d'actine venant stabiliser l'ARN du virus, le complexe de transcriptase inverse (RT) transforme l'ARN en ADN bicaténaire [38]. La sous-unité p66 de la RT contient les sites actifs, soit une polymérase ARN/ADN dépendante ainsi qu'une RNase H qui sont responsables, respectivement, de la synthèse du brin d'ADN et de la dégradation du brin d'ARN [39]. Cet ADN double brin nouvellement synthétisé est toujours associée avec des protéines virales (IN, RT, MA, Vpr) ainsi que des protéines de la cellule hôte comme la *barrier-to-autointegration factor 1* (BAF 1), les *high-mobility group proteins* (HMGs) et la *lens-epithelium-derived growth factor* (LEDGF/p75) pour former le complexe de préintégration (PIC) [40-43]. Le PIC utilise alors le réseau de microtubules pour se diriger vers le noyau avec l'aide de signaux de localisation nucléaire (NLS) provenant de la MA, de l'IN de la Vpr et du rabattement (flap) d'ADN qui est formé lors de l'étape de RT. Ces signaux sont reconnus par les importines qui vont permettre l'import direct du PIC dans le noyau au travers des pores nucléaires. Le NLS de la protéine Vpr permet notamment d'infecter les cellules quiescentes et pleinement différenciées comme les macrophages et les lyT mémoires [44]. Une fois dans le noyau, l'ADN viral doit être intégré dans le génome de la cellule hôte afin de pouvoir se répliquer. L'intégrase virale est responsable de cliver un dinucléotide à chaque extrémité 3' afin de permettre cette étape. Elle est également responsable de lier l'ADN viral à l'ADN génomique [40]. Une fois l'ADN intégré, la cellule répare rapidement le brin contenant le provirus par des mécanismes de réparation de l'ADN. Lorsqu'il n'y a pas d'intégration, les deux extrémités de l'ADN viral peuvent se joindre pour former des cercles LTR par recombinaisons homologues ou bien s'intégrer sur soi-même et

former des ADN circulaires tronqués (autointégration) [45]. Ces formes ne sont pas infectieuses, mais elles peuvent produire des protéines Tat et Nef [46].

1.3.3. Production des protéines virales et maturation du virion

Il y a généralement une intégration dans les régions génomiques où la transcription est active afin de permettre la formation d'ARN messagers viraux (ARNm). Ces régions permettent le recrutement de l'ARN polymérase II (RNAPII), ce qui amorce l'initiation de la transcription. La RNAPII n'est cependant pas capable d'allonger le génome viral efficacement, ce qui résulte en la formation de petits transcrits non polyadénylés. Pour pallier ce problème, la protéine virale Tat, avec l'aide de la cycline T1, s'attache au *trans-activation response element* (TAR) localisé à l'extrémité 5' sur le LTR viral et recrute la cyclin-dépendant kinase 9 (Cdk9) [47, 48]. Cette dernière phosphoryle l'extrémité C-terminale de la RNAPII dans le complexe du *positive transcription-elongation factor b* (P-TEFb), permettant alors l'élongation de l'ARNm [49]. En l'absence de séquence inhibitrice d'ARN (IRS), les ARN préalablement épissés à plusieurs reprises (Nef, Rev et Tat) se retrouvent rapidement dans le cytoplasme. La protéine Rev possède une séquence d'export nucléaire (NES) s'assemblant avec l'exportine-1 afin de permettre le transport des autres ARN hors du noyau. Ce mécanisme est médié par le facteur cellulaire Ran, qui effectue des échanges GTP/GDP avec l'aide des importines pour amener les ARNm du noyau vers le cytoplasme [50]. Une fois tous les éléments viraux rassemblés en quantité suffisante, le virion peut commencer à être assemblé. Cette étape est dirigée par les polyprotéines Gag-Pol et Gag avec l'aide de la protéine Env qui recrute deux copies d'ARN monocaténaire et la protéine virale Vpr [51]. Avec l'aide de la protéine HP68 et en présence d'environ 1500 polyprotéines Gag, il y a assemblage de la capsid virale [52]. Le bourgeonnement du virion se fait généralement dans des régions de la membrane cellulaire riches en cholestérol appelées radeaux lipidiques. Ceci favorise la sortie du virion, sa stabilité et la fusion avec une nouvelle cellule [53]. Lors du bourgeonnement, le virion emporte avec lui des molécules de l'hôte comme HLA-DR et ICAM-1, ce qui facilitera son attachement à une nouvelle cellule [54]. Finalement, les polyprotéines Gag et Gag-Pol sont clivées par la protéase virale (PR) afin d'obtenir les protéines d'un virion mature et infectieux (CA, NC et MA, RT, IN et PR) [55].

1.3.4. Les facteurs de restriction viraux

Afin de construire une défense efficace contre le virus, la cellule possède un système de facteurs de restriction viraux. Ces facteurs ne sont cependant pas infaillibles, car ils peuvent être dégradés à leur tour par des protéines accessoires virales. Il en existe 3 principaux pour contrer le VIH-1 soit APOBEC3G, SAMHD1 et la tétherine.

L'*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G* (APOBEC3G) est un membre d'une famille de désaminase simple brin (APOBEC3) [56]. Pour effectuer son activité, la protéine doit être encapsidée et libérée lors d'une infection subséquente [57]. Elle agit en inhibant la réplication des lentivirus par un mécanisme de désamination de la cytosine en uracile (C→U) sur le brin antisens lors de l'étape de transcription inverse virale. Cela cause une série excessive de mutations (G→A) sur le brin codant menant à l'arrêt de la transcription et ultimement à la dégradation de l'ADN [58]. En présence de la protéine Vif, APOBEC3G est dégradée par un système ubiquitine-protéasomes avant l'emballage dans le virion [57, 59].

Les cellules possèdent également un autre facteur de restriction interagissant avec la transcription inverse soit la *Sterile alpha motive domain and histidine/aspartic domain-containing protein 1* (SAMHD1). Le domaine HD de la protéine a une activité nucléotidase et phosphodiesterase causant une diminution de la concentration des déoxynucléotides triphosphate (dNTP) afin de les transformer en déoxynucléotides et en triphosphate inorganique. Cela affecte la transcriptase inverse du virus, car le niveau de dNTP n'est pas suffisant pour favoriser la synthèse de l'ADN viral [60, 61]. Contrairement au VIS et au VIH-2 possédant Vpx, le VIH-1 n'a pas de protéine permettant la dégradation de SAMHD1 [62]. Cependant, la restriction du VIH-1 par SAMHD1 a un effet sur l'activation du système immunitaire inné. En effet, SAMHD1 limite la production d'interféron et le nombre d'antigènes présentés aux cellules myéloïdes. Cela a pour effet de réduire la portée de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ (LyT CD8⁺) face à la présence du virus [63].

Finalement, la cellule peut restreindre la sortie du virion avec l'aide de la tétherine (BST2). Cette protéine est exprimée constitutivement dans plusieurs types cellulaires et en réponse à une réponse interféron de type 1 [64]. Elle est localisée dans la membrane cellulaire et possède des dimères qui viennent former des liens croisés avec la membrane du virus. Cela

empêche la sortie de ce dernier et le rend sensible à l'activité de protéases [65]. La tétherine peut être contrée par la protéine virale Vpu. Le domaine transmembranaire de cette dernière interagit avec BST2, ce qui permet le relargage du virion hors de la cellule [66]

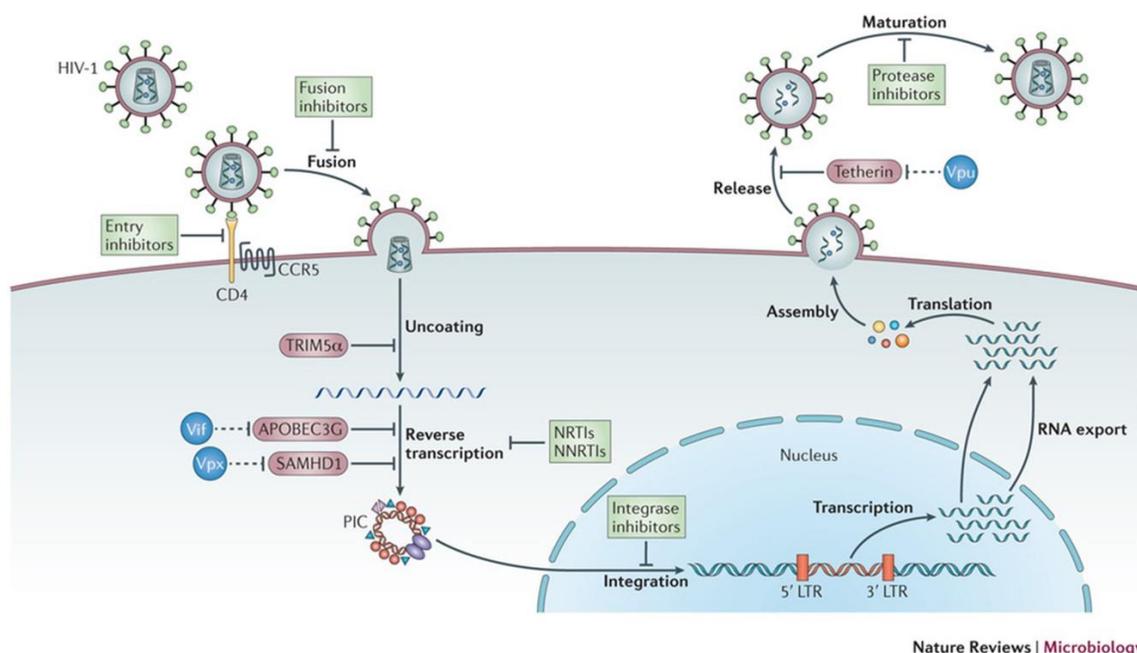


Figure 4 : Le cycle de réplication du VIH-1 et les facteurs de restriction viraux

Le cycle viral du VIH-1 de son entrée jusqu'à la production de virions matures. En rouge sont représentés les différents facteurs de restriction viraux. Ces derniers peuvent être dégradés par des protéines virales, présentées en bleu. Source : Barré-Sinoussi et al. [67]

1.4. Immunopathogénèse du virus

1.4.1. Les modes de transmission du VIH-1

Le VIH-1 peut se transmettre de trois principales façons. Premièrement, il peut y avoir un contact direct avec du sang contaminé. Souvent, cela se produit par l'utilisation de seringues ou d'aiguilles souillées. Par la suite, il est possible de transmettre le VIH-1 à la suite des contacts avec des liquides biologiques d'une personne infectée. Le sperme, le liquide préséminal, les sécrétions anales ou vaginales ainsi que le lait maternel d'une personne infectée ne prenant pas de thérapie antirétrovirale (ART) peuvent contenir une charge virale importante qui permet la transmission du virus. Finalement, il est possible qu'une mère

infectée transmette le virus à son enfant soit lors de l'accouchement via les voies vaginales ou par l'allaitement. Dans des cas extrêmement rares, le VIH-1 peut être transmis par le sexe oral ou lors de transfusion sanguine [68].

Une revue exhaustive de littérature réalisée par Patel, P. et *al* en 2014 a recensé et mis à jour la prévalence des principaux facteurs de risque de transmission à la suite d'un contact avec le VIH-1 [69]. Le contact avec du sang contaminé s'avère le moyen de transmission le plus élevé (9250 cas sur 10 000), suivi de la transmission de la mère à l'enfant (2260 cas sur 10 000). La transmission lors des relations sexuelles n'est pas très efficace, même si c'est la plus fréquente. Elle est plus risquée chez le receveur autant lors de relations anales (138 cas sur 10 000) que vaginales (8 cas sur 10 000). Il a été noté que le meilleur moyen de protection était la prise d'antirétroviraux en combinaison au port du condom lors de relations sexuelles qui diminuait de 99.2 % le risque de transmission.

1.4.2. Les phases de l'infection virale

L'infection par le VIH-1 peut être divisée en trois grandes phases. La première est la phase aiguë dans laquelle il y a infection et montée rapide de la charge virale. Suivant la transmission du virus, ce dernier entre en contact avec des cellules dendritiques (DC), des lyT CD4⁺ et des macrophages qui sont présents dans les muqueuses. Ce contact favorise la phagocytose des particules virales par des cellules présentatrices d'antigènes (APC) qui présenteront des peptides antigéniques à leur surface via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) [70]. Cela active l'immunité innée, ce qui mène au recrutement de nouvelles cellules T et B, initiant un processus d'inflammation et la production d'anticorps contre le virus (séroconversion). Une période appelée d'une dizaine de jours (phase éclipse) est nécessaire afin que le virus soit détectable dans le plasma sanguin. À la fin de cette dernière, un processus favorisé par les DC via la lectine de type C *DC-SIGN* amène les cellules infectées et le virus vers les ganglions lymphatiques. À cet endroit, elles vont rencontrer des lyT CD4⁺ mémoires activés exprimant CCR5 et susceptibles à l'infection [71]. S'en suit alors d'une dissémination rapide du virus dans l'organisme et dans les autres tissus lymphoïdes dont le tissu associé au tube digestif (GALT). Cela va causer une activation et la mort d'environ 80% des lyT CD4⁺ présents dans le GALT due au relargage de TNF, Fas

ligand et de microparticules apoptotiques par les lyT CD4⁺ infectés [72, 73]. Au fil du temps, la charge virale diminue progressivement pour devenir stable après 12 à 20 semaines.

Vient alors une phase de latence qui est asymptomatique. Cette dernière peut durer jusqu'à 10 ans grâce au système immunitaire qui réussit à contrôler la charge virale. Cependant, au fil du temps, la mort programmée induite par une activation excessive des cellules (AICD) diminue le nombre de lyT CD4⁺. Cette dernière est provoquée par les interactions entre Fas et Fas ligand, présent à la surface des lymphocytes [74]. Comme les cellules matures sont en quantité limitée dans l'organisme, leur mort provoque l'épuisement des réservoirs cellulaires, présents en grande quantité dans le GALT [72]. Tout au long de l'infection, le virus subit une série de mutations et de recombinaisons qui fait changer le tropisme R5 d'environ 50% des lyT CD4⁺ vers un tropisme X4. Ce changement permettrait au virus de mieux infecter les cellules, particulièrement les lyT CD4⁺, plus susceptible au VIH-1. Cela favoriserait donc une réduction plus rapide de leur nombre dans l'organisme et une évolution plus rapide de la maladie [32, 75].

Finalement, la dernière phase de la maladie débute lorsque l'équilibre entre la charge virale et la quantité de lyT CD4⁺ dans le sang est brisé. Le compte de cellules passe d'environ 1000 cellules par mm³ pour diminuer sous les 300 cellules par mm³. Il y a alors l'apparition de maladies opportunistes, un des premiers signes du SIDA. Il est fréquent à ce stade de développer des infections à *Mycobacterium tuberculosis* ou bien certains cancers comme des lymphomes ou le syndrome de Kaposi [76]. Au fil du temps, des syndromes neurologiques peuvent également apparaître. Sans traitement contrôlant la charge virale, la mort de la personne infectée est inévitable.

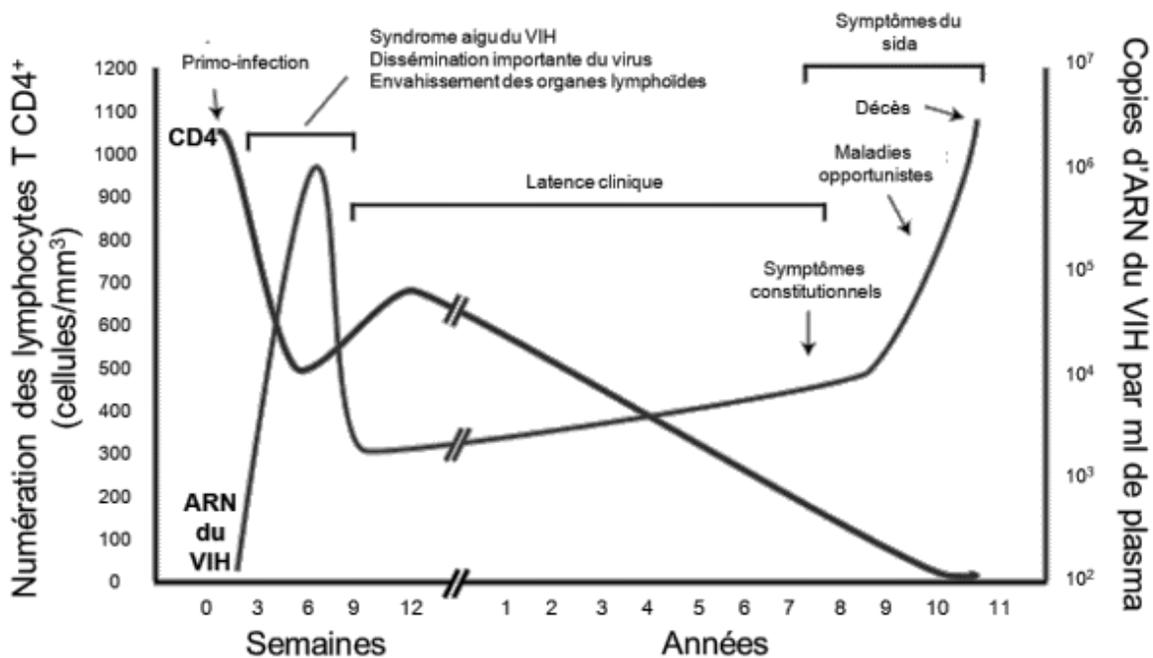


Figure 5 : Immunopathogénèse du VIH-1

Les différentes étapes de la pathogénèse lors de l'infection par le VIH-1. Celle-ci peut être divisée en trois étapes soit la phase aiguë, la phase de latence et l'apparition de symptômes reliés au SIDA. Source : Agence de santé publique du Canada [77]

1.4.3. Antirétroviraux

Les premiers traitements antirétroviraux contre le VIH-1 ont été développés vers la fin des années 1980 [78]. Au fil du temps, de nombreuses molécules ont été synthétisées afin de cibler différentes étapes du processus de réplication du virus. Ces molécules peuvent être classées en différents groupes selon leur mécanisme d'action. Trois principales classes de médicaments sont généralement utilisées pour le traitement du VIH-1 soit les inhibiteurs de transcriptase inverse, d'intégrase et de protéase.

Les inhibiteurs de la transcriptase inverse peuvent être classés en deux groupes soit les *nucleoside reverse transcriptase inhibitor* (NRTI) et les *non nucleoside reverse transcriptase inhibitor* (NNRTI). Les NRTI agissent en s'incorporant dans la chaîne naissante d'ADN viral à la place des nucléotides. Cela a pour effet d'inhiber l'élongation d'un des deux brins d'ADN et d'empêcher sa synthèse. Parmi les molécules les plus connues de ce groupe, on peut noter la zidovudine (AZT) et le Tenofovir. Les NNRTI quant à eux inhibent l'activité de la

transcriptase inverse en s'attachant directement à l'enzyme. Ceci crée une poche hydrophobe qui restreint la mobilité de l'enzyme et l'empêche d'accomplir ses fonctions. L'Efavirenz est la molécule de ce groupe qui est la plus utilisée. [79, 80]

Les inhibiteurs de l'intégrase virale (IN) sont parmi les molécules qui ont été synthétisées le plus récemment [81]. Ces inhibiteurs s'insèrent entre l'ADN viral et l'IN, ce qui a pour effet de bloquer le site actif et déstabiliser l'extrémité 3' de l'ADN viral. Au final, cela empêche l'intégration dans le génome de la cellule hôte [82]. Les molécules les plus connues de ce groupe sont le Raltegravir et le Dolutégravir.

Finalement, les inhibiteurs de protéase virale préviennent le clivage des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol en venant s'attacher directement sur l'enzyme. Cela empêche la formation de protéines virales matures capable d'infecter une nouvelle cellule [83]. Parmi les molécules les plus connues, il y a le Saquinavir, l'Atazanavir et le Darunavir.

Il existe également d'autres voies qui peuvent être ciblées par des inhibiteurs. Par exemple certains médicaments peuvent empêcher l'attachement de la gp120 au récepteur CD4 ou à un de ses co-récepteurs (CCR5 ou CXCR4). D'autres peuvent également empêcher la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire. Présentement, deux agents ciblant l'entrée du virus sont sur le marché soit le Maraviroc et l'Enfuvirtide.

Selon les nouvelles lignes directrices en vigueur aux États-Unis et en Europe, une thérapie antirétrovirale doit être entamée dès qu'il y a un compte de moins de 350 lyT CD4⁺ par mm³ de sang. Avec un traitement efficace, il est possible de réduire la charge virale sanguine sous le seuil de détection minimal (moins de 50 copies d'ARN par ml de sang). Normalement, la prise simultanée de trois médicaments est recommandée afin de lutter contre le virus, soit deux NRTIs combinés à un inhibiteur de protéase, d'intégrase ou de transcriptase inverse [84]. Ce genre de thérapie est appelée la *highly active antiretroviral therapy* (HAART). Avec la HAART, les personnes infectées peuvent augmenter leur espérance de vie de plusieurs dizaines d'années. Cependant, une résistance peut se développer au fil du temps rendant le traitement moins efficace. De plus, de nombreux effets secondaires dont des problèmes rénaux, cardiaques ou gastriques sont présents chez les patients qui les utilisent. Ces troubles sont une des causes de non-observance du traitement antirétroviral qui doit être pris de façon continue, car un arrêt de celui-ci crée inévitablement un rebond viral rapide.

1.4.4. Réservoirs et sanctuaires viraux

Malgré la prise d'agents antirétroviraux, le virus ne peut pas être complètement éliminé chez les personnes infectées. Cela est en partie expliqué par la présence de réservoirs viraux. Ces derniers sont définis comme des endroits dans l'organisme où une forme répliquative du virus est toujours présente malgré la prise en continu d'une thérapie antirétrovirale [85]. Des sites anatomiques comme le GALT et le système nerveux central sont suspectés de contenir des cellules favorisant l'établissement de ces réservoirs. En effet, il est bien documenté que le VIH-1 persiste dans certaines populations de $lyT\ CD4^+$ mémoires et qu'un arrêt de la médication résulte inévitablement à l'augmentation rapide de la charge virale dans le sang [86]. Cependant, au cours des dernières années, des travaux montrent que les macrophages pourraient également être des réservoirs viraux. Par contre, cette affirmation ne fait pas l'unanimité, car plusieurs études semblent prouver le contraire. Par exemple, des travaux de Calantone et *al* ont montré dans un modèle primate la présence d'ADN proviral et de récepteur des cellules T (TCR) dans les macrophages [87]. Les auteurs concluent que leur présence serait due à la phagocytose des cellules infectées plutôt qu'à une infection des macrophages *de novo*. Néanmoins, il est montré que plusieurs types de macrophages peuvent être infectés par le VIH-1 notamment dans le cerveau, les poumons et les tissus lymphoïdes [88]. Vu la difficulté d'obtenir des cellules de ces organes chez l'humain, des études sont réalisées dans des modèles animaux. Il a été montré récemment dans un modèle de souris humanisée que les macrophages pouvaient constituer un réservoir du virus après une thérapie antirétrovirale [89].

Une autre raison qui explique la persistance du VIH-1 dans l'organisme est la présence de sanctuaires viraux. Ces derniers sont des endroits dans l'organisme où le traitement antirétroviral n'atteint pas les concentrations requises pour être efficace. Les macrophages tissulaires, le système nerveux central et les organes lymphoïdes sont reconnus comme des sanctuaires viraux empêchant l'élimination complète du VIH-1 [90]. Il existe également des sanctuaires immunologiques comme les yeux ou les testicules où le virus n'est pas détecté par le système immunitaire [91].

1.5. Macrophages

1.5.1. Origine des macrophages

Les macrophages sont des cellules du système immunitaire qui jouent un rôle crucial dans l'immunité autant innée qu'adaptative. Ces phagocytes mononucléés sont classés dans la même catégorie que les monocytes et les cellules dendritiques (DC) [92]. Ils sont présents dans le corps humain sous deux grands groupes. Le premier étant les macrophages tissulaires, principalement responsables de l'élimination des cellules endommagées ou des microorganismes comme les bactéries et les moisissures. Le second étant les macrophages dérivés de monocytes (MDM) qui sont présents en cas d'inflammation et favorisent le retour à l'homéostasie [93].

1.5.2. Types de macrophages et leurs fonctions dans l'organisme

1.5.2.1. Macrophages tissulaires

Les macrophages tissulaires sont une population hétérogène présente dans de nombreux organes du corps. Il est maintenant connu que ce type de macrophage se retrouve dans les tissus bien avant la naissance et sont établis tôt dans l'embryogenèse. On estime que les macrophages primitifs apparaissent vers le 8^e ou le 9^e jour de l'embryon dans le sac vitellin pour ensuite se propager dans l'organisme via la circulation sanguine [94]. Les microglies, macrophages du cerveau, proviennent exclusivement du sac vitellin. Elles migrent vers le cerveau tout au long du développement pour représenter 10% des cellules présentes [95]. D'autres cellules proviennent quant à eux du foie fœtal et sont établies quelques jours plus tard dans l'embryogenèse. Par exemple, les cellules de Langherans (LC) proviennent principalement du foie fœtal, mais avec une contribution du sac vitellin [96]. Les macrophages tissulaires ont une certaine capacité d'autorenouvellement, qui leur permettent de rester dans les tissus jusqu'à l'âge adulte et de se régénérer après un épisode inflammatoire [97, 98]. Selon leur emplacement et les stimuli de l'environnement, le devenir des macrophages peut être différent. Un facteur de stimulation important est le *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF) qui aide à la différenciation, la prolifération et la survie des macrophages. Cette cytokine se lie à son récepteur CSFR1 et permet la différenciation ainsi que le maintien des cellules dans un phénotype anti-inflammatoire de type M2 [99].

L'interleukine-34 (IL-34) peut également se lier au récepteur et favoriser la différenciation des macrophages dans l'épiderme de la peau et le système nerveux central [100].

Les macrophages tissulaires jouent un rôle dans la résolution de l'inflammation et dans le retour à l'homéostasie. Ces derniers expriment à leur surface de nombreux récepteurs reconnaissant des patrons moléculaires de dangers ou de pathogènes (DAMPs et PAMPs). Ils possèdent notamment des récepteurs de type Toll (TLR), de type NOD (NLR) et des lectines de type C reconnaissant les cellules apoptotiques et différents microorganismes [101]. Cette reconnaissance amorce le processus de réparation tissulaire qui permet le recrutement de monocytes circulant au site de l'inflammation.

1.5.2.2. Macrophages dérivés de monocytes

Les monocytes proviennent de précurseurs de la moelle osseuse et représentent environ 10% des leucocytes présents dans le sang [93, 102]. Ces derniers peuvent être divisés en trois sous-groupes selon la présence des récepteurs de LPS (CD14) ou de récepteur Fc (CD16) à leur surface [103]. Le premier, de type classique (CD14⁺⁺ CD16⁻) représente 85% des monocytes circulants. Les deux autres sous-groupes sont les monocytes intermédiaires (CD14⁺⁺CD16⁺) et les non-classiques (CD14^{low} CD16⁺). À la suite d'une activation avec des LPS, les monocytes classiques sécrètent de grandes quantités de *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), de *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) et de RANTES. Les monocytes non classiques quant à eux expriment beaucoup de TNF et d'IL-10. Les monocytes intermédiaires expriment ces cytokines à des niveaux variant entre les deux autres sous-types [103]. *In vivo*, les monocytes classiques ont une durée de vie relativement courte (environ 24 heures). Les monocytes intermédiaires et non classiques quant à eux peuvent survivre entre 4 et 7 jours avant de sortir de la circulation sanguine ou mourir [104].

Lors de l'inflammation, ces cellules sont recrutées dans les tissus avec l'aide de signaux provenant entre autres de la famille des *monocytes chemoattractant proteins* dont MCP-1/CCL2. Cette dernière se lie aux monocytes et favorise leur recrutement. Les cytokines présentes dans l'environnement favoriseront alors leur différenciation afin qu'ils puissent devenir des macrophages dérivés de monocytes (MDM) [105].

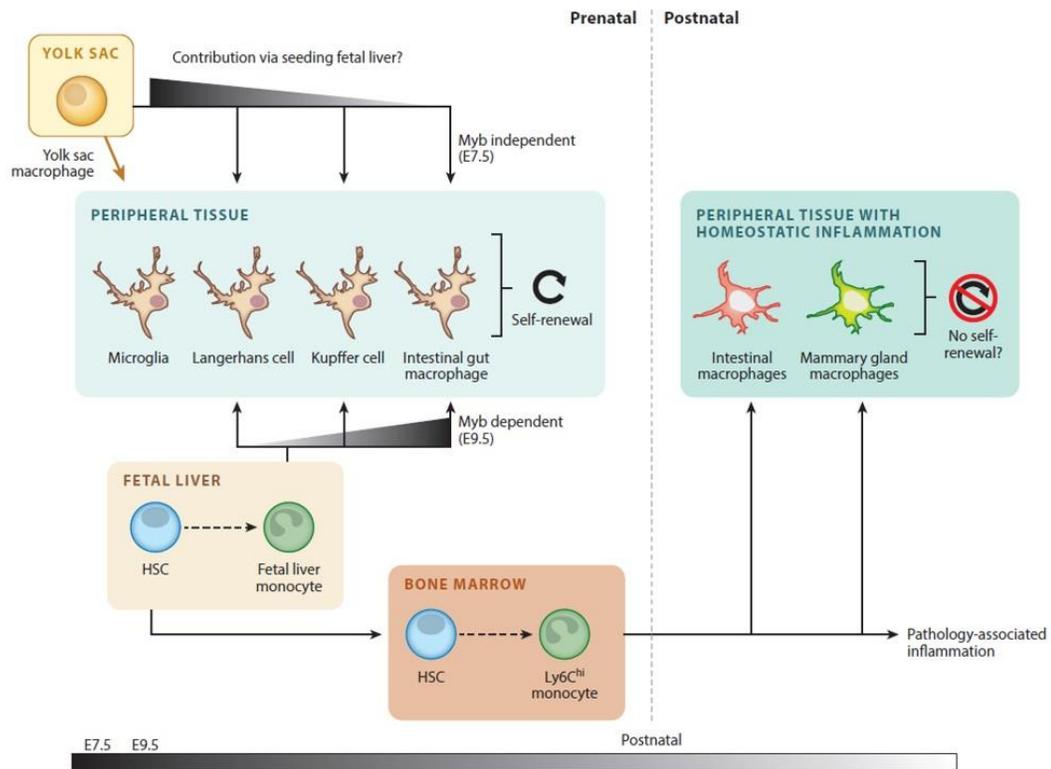


Figure 6 : L'origine des macrophages

Provenance des sous-populations de macrophages dans l'organisme Source : Varol et al. [106]

1.5.3. Polarisation des macrophages

À la suite de leur activation, les macrophages se polarisent afin de répondre aux différents stimuli environnementaux et d'organiser une réponse efficace selon le contexte. Le classement des différents types est basé sur celui des lymphocytes T auxiliaires (Th1 et Th2)

Les macrophages de type M1 répondent aux stimuli pro-inflammatoires comme les LPS ou le TNF. Ils produisent de l'oxyde nitrique (NO) et des espèces réactives d'oxygène (ROS), qui ont des activités microbicides et inhibitrices de prolifération cellulaire [107]. Ce sont également des producteurs d'IL-1 β , de TNF et d'IL-6 qui sont des cytokines pro-inflammatoires. Ils partagent avec les Th1 la défense contre les bactéries intracellulaires et les tumeurs [108]. Ce type de macrophage est responsable de la phagocytose et a une bonne capacité de présentation antigénique aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ [109]

Les macrophages de type M2 acquièrent leur phénotype à la suite des stimuli de la réponse de type Th2. Ils produisent notamment de l'ornithine qui peut promouvoir la réparation par différentes fonctions de remodelage, dont la synthèse de polyamine et de collagène [107]. Ces macrophages participent principalement à la résolution de l'inflammation et au retour à l'homéostasie [109]. Le type M2 est assez hétérogène et peut se sous-diviser en trois sous-groupes (M2a, M2b, M2c). Les M2a sont stimulés par l'IL-4 et l'IL-13 et produisent une réponse de type Th2. Ils sont également présents lors des allergies et peuvent favoriser la production de matrice extracellulaire. Les M2b sont stimulés par le LPS et les complexes immuns. Ils jouent un rôle dans la régulation immunologique. Finalement, les M2c sont stimulés par l'IL10 et le TGF- β et sont principalement responsable du remodelage tissulaire et du réarrangement de la matrice extracellulaire [110, 111]

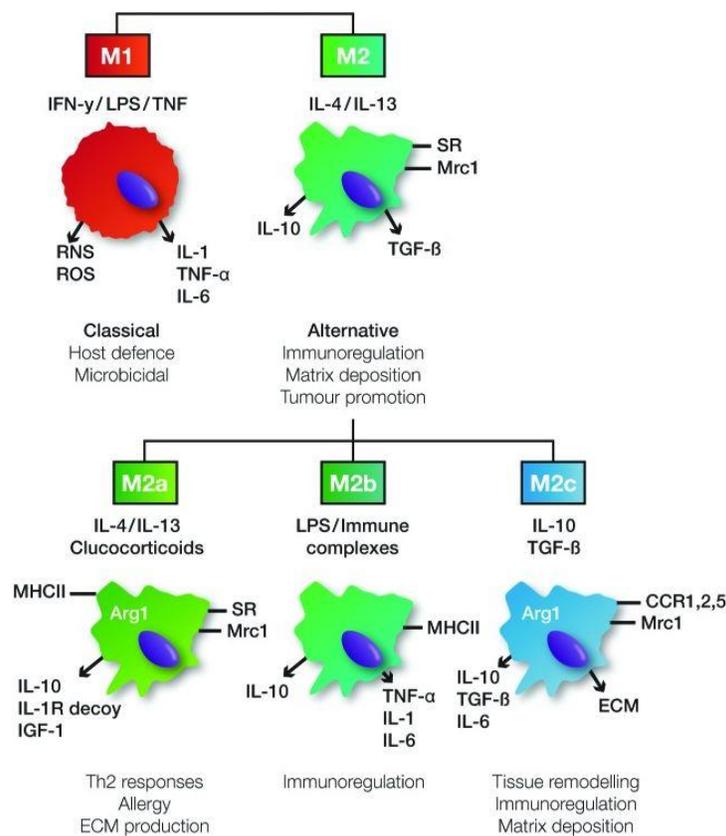


Figure 7 : La polarisation des macrophages

Stimuli favorisant la polarisation des macrophages. Source : Jones et al. [111]

1.6. Le VIH-1 et les macrophages

1.6.1. Le cycle viral du VIH-1 chez les MDM

Les macrophages possèdent les récepteurs permettant l'entrée du VIH-1 dans la cellule (CD4, CCR5, CXCR4). Cependant, ceux-ci sont moins exprimés que sur les lyT CD4⁺, ce qui fait de ces derniers la principale cible du virus tôt dans l'infection [112]. Les macrophages s'infectent préférentiellement à la suite de la liaison avec le co-récepteur CCR5, quoiqu'une liaison à CXCR4 soit possible plus tard dans l'évolution de la maladie. Les macrophages peuvent également être infectés lorsqu'ils phagocytent une cellule infectée par le virus comme un lymphocyte.

1.6.2. Impact des macrophages de l'intestin sur la barrière épithéliale

La plus grande concentration de macrophages tissulaires se retrouve dans la muqueuse intestinale [113]. Ils sont responsables de réguler la réponse inflammatoire lorsque des microorganismes traversent la barrière épithéliale. En présence du VIH-1, l'environnement de l'intestin est altéré à la suite du relargage de cytokines pro-inflammatoires issues notamment de la mort programmée des lyT CD4⁺ infectés. Cet environnement favorise également la polarisation des macrophages vers le type M1. Au fil du temps, cela contribue à la destruction de la barrière épithéliale de l'intestin et favorise la translocation bactérienne [114].

Les macrophages intestinaux ne sont pas permissifs à l'infection par le virus. Cependant, au fil de l'avancement de la maladie, il y a déplétion des lyT CD4⁺ ce qui mène à un recrutement de monocytes provenant du sang dans l'intestin. Le recrutement de ces cellules permet de maintenir une infection productive à cet endroit plus longtemps et est reconnu comme un facteur de risque pour de nombreuses maladies cardiovasculaires ou des co-infections microbiennes comme *Mycobacterium tuberculosis* ou à *Leishmania* [113, 115, 116]. La destruction de la barrière épithéliale est également susceptible de causer des troubles intestinaux affectant l'absorption de nutriments à travers l'intestin comme le folate, vitamine essentielle à l'organisme.

1.7. Le folate, vitamine essentielle à l'organisme

Le folate (acide folique, vitamine B9) est une vitamine qui est nécessaire dans plusieurs réactions biologiques. Elle participe notamment au *one carbon metabolism* qui effectue le transfert de molécules carbonées via le tétrahydrofolate (THF), forme métaboliquement active de la vitamine. Cela mène entre autres à la formation d'acides aminés (méthionine, glycine, sérine) qui sont essentiels à la croissance, la division et la survie cellulaire [117]. Contrairement aux plantes et aux bactéries, les humains ne peuvent pas synthétiser du folate *de novo*, car ils ne possèdent pas les capacités enzymatiques nécessaires pour former cette molécule [118]. L'homme doit plutôt acquérir le folate par une alimentation saine et équilibrée. La principale source de vitamine B9 se retrouve dans les légumes verts, les fruits, dans certaines fèves ainsi que dans le foie de certains animaux [119]. La quantité recommandée est d'environ 400 µg par jour chez l'adulte, mais peut augmenter jusqu'à 600 µg chez la femme enceinte ou en période d'allaitement [120]. En cas de déficience en acide folique, plusieurs effets secondaires peuvent survenir comme de la fatigue extrême, des troubles de croissance ou des problèmes intestinaux [117, 119]. Chez les femmes enceintes, une déficience de cette vitamine peut causer des retards de croissance chez le bébé ou des troubles du tube neural menant au spina-bifida ou à l'anencéphalie [121, 122]. Depuis que l'on connaît ces effets sur la santé, de nombreux pays ont adopté une stratégie nationale de supplémentation en acide folique pour les femmes enceintes ou prévoyant l'être. Une stratégie de la sorte a été adoptée au Canada. Depuis son implantation, une diminution des accouchements prématurés a été remarquée [121].

1.7.1. Structure du folate

Le folate a une structure classique composée de 3 éléments. Premièrement, il y a l'anneau ptéridine formé de la fusion d'une pyrimidine avec un noyau pyrazine. Il y a ensuite un acide para-4-aminobenzoïque (PABA) auquel est attaché un ou plusieurs résidus de glutamate. Leurs nombres sont importants, car ils ont une incidence sur l'affinité de la molécule pour les différentes enzymes [123]. Le folate est retrouvé sous plusieurs formes avec différents niveaux de modifications au niveau de sa structure (glutamination, méthylation ou oxydation) selon son emplacement dans l'organisme [124]. L'acide folique est une forme synthétique et inactive du folate ne contenant qu'un seul résidu glutamate. Afin d'être active, elle doit être réduite à 2 reprises par la Dihydrofolate Réductase (DHFR) afin de former du tétrahydrofolate [125]. La forme la plus présente en circulation sanguine (98%) est le 5-méthyltétrahydrofolate (5-MTHF) [126].

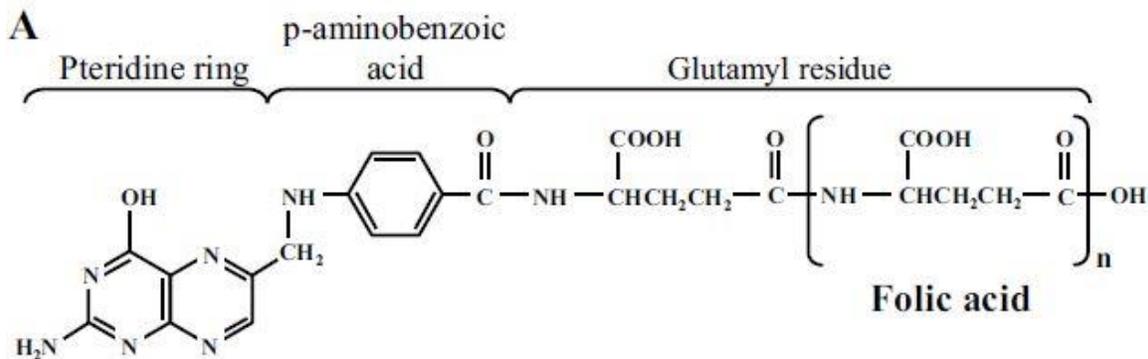


Figure 8 : La structure générique du folate

La structure classique du folate est composée d'un anneau ptéridine, d'un acide para-4-aminobenzoïque et d'un ou plusieurs résidus de glutamate. Source : Raz et al. [127]

1.7.2. Le cycle du folate

1.7.2.1. L'absorption du folate et son entrée dans la cellule

Chez les plantes comme chez l'humain, le folate est principalement retrouvé sous une forme polyglutaminée, ce qui lui permet d'être maintenu à l'intérieur de la cellule et d'accomplir ses fonctions. C'est également sous cette forme que sa stabilité et son affinité avec les enzymes sont les meilleures [123]. À la suite de son obtention à partir de l'alimentation, le folate est dirigé vers les intestins où il sera absorbé par l'organisme. Afin de traverser la

membrane intestinale, le folate polyglutaminé doit d'abord être hydrolysé sous une forme plus simple. C'est la Glutamate Carboxypeptidase II (GCPII) aussi connue sous le nom de *Prostate-Specific Membrane Antigen* (PSMA) qui joue ce rôle chez l'humain. Cette enzyme membranaire est présente en très grande quantité dans la prostate, mais également dans le jéjunum et le système nerveux. Il s'agit notamment d'un marqueur biologique connu pour le cancer de la prostate [128]. Dans l'intestin, la GCPII clive les résidus glutamate sur le folate pour en faire du folate monoglutaminé, ce qui facilitera son entrée dans la cellule [129].

Cependant, étant donné sa taille et la présence d'un groupement d'acide glutamique conférant une charge négative à la molécule, le folate ne peut pas traverser la membrane cellulaire par simple diffusion. Un système de transport spécifique doit donc être utilisé afin que ce métabolite entre dans la cellule. Chez l'humain, il y en a 3 de connus. Dans un premier temps, le *Proton Coupled Folate Transporter* (PCFT) est principalement responsable d'absorber le folate obtenu par l'alimentation. Il s'agit d'un mécanisme en symport avec un proton de façon unidirectionnelle. C'est pourquoi il est retrouvé dans l'intestin et dans les lysosomes. Ces environnements acides permettent une meilleure disponibilité en protons et une meilleure activité enzymatique du transporteur [130]. Par la suite, le Reduced Folate Carrier (RFC, SLC19A1) est un transporteur bidirectionnel qui échange une molécule de folate pour une molécule de phosphate organique selon les besoins de la cellule. C'est le transporteur qui est le plus utilisé par l'organisme pour l'import de folate [131]. Le RFC est également le transporteur principal des antifolates comme le Méthotrexate et le Raltitrexed. Finalement, il existe une famille de récepteurs du folate (*Folate Receptor α , β , γ , δ*) qui importent de l'acide folique par endocytose [132]. Cette méthode étant plus lente que les autres, les récepteurs de cette famille sont moins utilisés, mais demeurent tout de même très importants dans l'import du folate dans la cellule. Il y a notamment une augmentation de l'expression du récepteur FR β chez les macrophages pro-inflammatoires [133].

1.7.2.2. Le contrôle du niveau de folate intracellulaire

Une fois dans la cellule, le folate réduit doit être polyglutaminé à nouveau afin de demeurer à l'intérieur de celle-ci et être en quantité suffisante [123]. Deux enzymes sont importantes afin de contrôler le niveau de folate intracellulaire soit la Folylpolylglutamate Synthase (FPGS) et la Gamma-Glutamyl Hydrolase (GGH). La FPGS ajoute des résidus glutamate de

façon séquentielle au folate. Cette réaction est dépendante de l'ATP qui est couplée à un ion magnésium (MgATP) [134]. Il y a en moyenne entre 2 et 9 résidus d'acide glutamique présents sur le substrat [135]. La FPGS est retrouvée sous deux isoformes dans la cellule : mitochondriale et cytoplasmique. Sous sa forme mitochondriale, l'enzyme est utilisée principalement pour la synthèse de la glycine, tandis que la forme cytosolique permet l'utilisation du folate dans le *one carbon metabolism* servant entre autres au transfert de molécules carbonées qui participent à la fabrication de la thymidine et à la méthylation de l'homocystéine en méthionine [117] [136].

Tel que mentionné précédemment, le folate doit être polyglutaminé pour rester dans la cellule et être utilisable par celle-ci pour différentes réactions biologiques. Cependant, lorsque la concentration intracellulaire est trop élevée, celui-ci peut être exporté. Comme lors de son entrée, le folate doit subir une hydrolyse afin de traverser la membrane. C'est l'enzyme GGH qui joue ce rôle. Son activité est inverse à FPGS soit d'hydrolyser le folate polyglutaminé. Cela produit du folate réduit et du monoglutamate [137]. La GGH est une enzyme qui est retrouvée dans les lysosomes, un lieu où l'activité de l'enzyme est optimale dû à l'environnement acide de ces derniers. Sous sa forme réduite, le folate pourra alors être exporté hors de la cellule ou bien recyclé par la FPGS [138].

1.7.2.3. La sortie de la cellule

Afin de permettre l'export du folate, la cellule possède deux mécanismes principaux. Tout d'abord, le RFC permet de transporter du folate de façon bidirectionnelle en échange d'une molécule de phosphate organique. Comme dans le cas de l'import, le RFC est le transporteur qui est le plus utilisé pour l'export de folate [139]. Il existe également une autre famille de transporteur participant au transport du folate. Il s'agit de la famille des transporteurs de type ABC (*ATP Binding Cassette*). Ces transporteurs couplés à l'ATP favorisent le transport membranaire de nombreuses molécules, dont le folate [139]. La sous-famille des *Multidrug Resistant Proteins* (MRP) en est notamment responsable, en particulier la protéine MRP-2/BCRP. Cette protéine est impliquée dans l'homéostasie du folate et est une des causes de la résistance aux antifolates lors du traitement du cancer [140, 141].

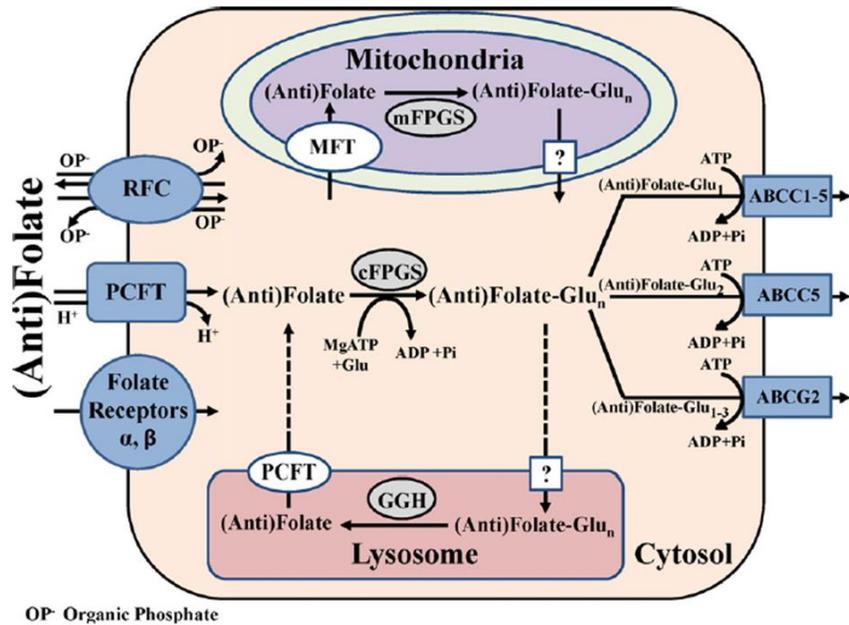


Figure 9 : Le mécanisme de rétention du folate dans la cellule

Schéma illustrant les différentes enzymes impliquées dans la rétention du folate dans la cellule. Source : Gonen et al. [142]

1.7.3. Les analogues du folate

Comme le cycle du folate est essentiel dans plusieurs réactions biologiques, de nombreuses maladies peuvent survenir lorsqu'il y a un dérèglement de ce sentier métabolique. C'est pourquoi les chercheurs se penchent depuis longtemps sur des médicaments qui permettent de moduler ce cycle afin d'affecter le *one carbon metabolism*. Il existe de nombreuses molécules présentes sur le marché qui peuvent jouer ce rôle comme le Méthotrexate (MTX) et le Raltitrexed (RTX). Ces molécules sont principalement utilisées pour l'inhibition de la croissance cellulaire dans certains types de cancers. En voici une brève description.

1.7.3.1. Méthotrexate

Le MTX est un inhibiteur non spécifique de la DHFR. Il inhibe également la Thymidylate Synthase (TYMS) en plus d'altérer le transport des folates réduits. Ces enzymes sont nécessaires à la formation de thymidines, de purines, et à la régénération du *pool* de THF dans la cellule. Le MTX est utilisé depuis longtemps pour le traitement de plusieurs types de cancers à des doses variant entre 25 et 80 mg/m² [143, 144]. Il agit pendant la phase S du cycle cellulaire démontrant une activité immunosuppressive sur les cellules [145]. À des doses plus faibles (1-10 mg), le MTX est également utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, mais son mécanisme d'action n'est pas encore bien compris [146]. Étant un analogue du folate, le MTX est métabolisé de la même façon que ce dernier. Après 24 h, environ 85% du médicament est éliminé par les reins et sa demi-vie est 3 et 15 h selon la dose utilisée [144].

1.7.3.2. Raltitrexed

Le RTX est un analogue du folate qui inhibe spécifiquement la TYMS. Cette enzyme synthétise de la déoxythymidine monophosphate (dTMP) à partir de déoxyuridine monophosphate (dUMP). Le dTMP sera plus tard phosphorylé pour former du déoxythymidine triphosphate (dTTP), un constituant essentiel pour la formation de l'ADN. L'inhibition de cette enzyme a donc pour effet de causer une fragmentation de l'ADN, ce qui mène à la mort cellulaire. Le médicament est principalement utilisé pour le traitement du cancer du sein [147], du cancer de l'œsophage [148] et du mésothéliome [149]. Le métabolisme du RTX est similaire à celui du Méthotrexate. La demi-vie du composé est

cependant plus élevée (8 jours), ce qui en fait donc un médicament potentiellement toxique chez une personne avec des fonctions rénales diminuées [150].

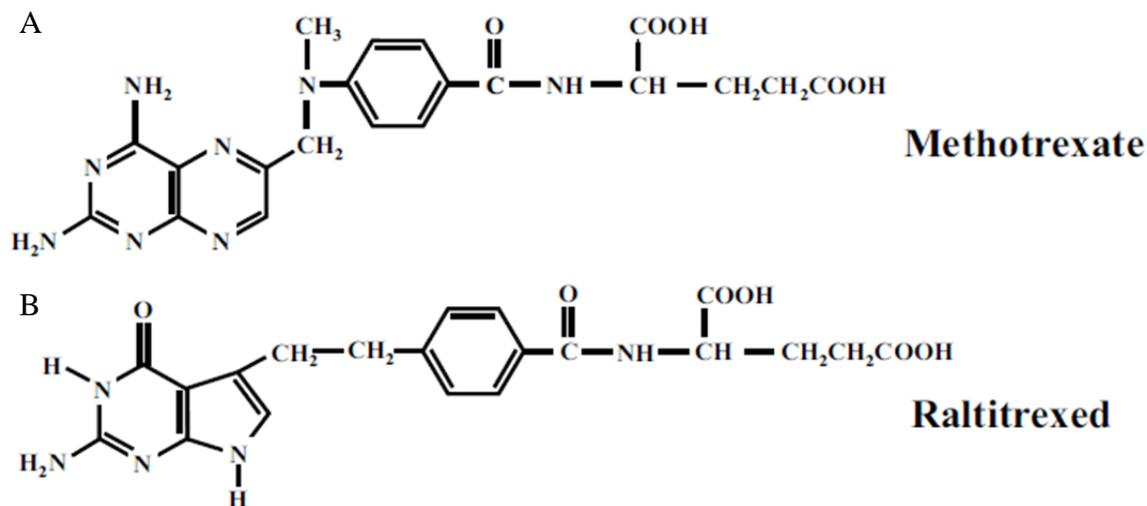


Figure 10 : Structure du Méthotrexate et du Raltitrexed

Structure de deux analogues du folate couramment utilisés dans le traitement de nombreuses maladies dont le cancer soit le Méthotrexate (A) et le Raltitrexed (B). Source : Raz et al. [127]

Chapitre 2 : Hypothèse et objectifs

Des travaux de notre laboratoire réalisés au cours des dernières années sur des macrophages infectés ou non par le VIH-1 ont montré une modulation de plusieurs gènes lors de l'infection par le virus [151]. Plus de 5000 gènes sont modulés dans les cellules productivement infectées par le VIH-1 en comparaison avec les cellules étant en présence du virus, mais sans être infectés productivement (cellules spectatrices ou *bystanders*). La GGH, enzyme responsable de l'hydrolyse des molécules de glutamate sur le folate, a montré une augmentation significative de son expression 36 heures après l'infection avant de revenir à un niveau de base après 6 jours. L'expression de DHFR, de TYMS et d'ABCG2 (BCRP) est également modulée de façon similaire. D'autres enzymes clés du cycle du folate comme FPGS, Méthylènetétrahydrofolate Réductase (MTHFR) et les différents récepteurs favorisant l'entrée du folate dans la cellule n'ont montré quant à eux aucune modulation à la suite de l'infection par le VIH-1. Lors de la mise en sourdine de FPGS, GGH et MTHFR avec des petits ARN interférents (siRNA), une augmentation du nombre de cellules productivement infectées par le virus a été notée. Ces cellules produisent également plus de virions par rapport au contrôle (siCTL). Dans cette optique, il est suggéré qu'en réponse à l'infection par le VIH-1, le métabolisme des MDM est altéré. Cela a pour effet de réduire la concentration de folate intracellulaire, diminuant ainsi la production de nucléotides, ce qui interfère avec la réplication virale. De plus, l'inhibition de l'activité de la TYMS par le RTX diminue le nombre de cellules productivement infectées et la production de nouveaux virions. Il est donc suggéré que l'inhibition de cet enzyme par le RTX affecte la production de déoxythymidine au détriment de déoxyuracile. Ces derniers sont ensuite incorporés dans l'ADN viral et causent des mutations menant à une dégradation de l'ADN ou la production de protéines non fonctionnelles.

Il y a 2 objectifs principaux à ce projet :

1. Évaluer le rôle des enzymes qui sont impliquées dans la régulation de la concentration intracellulaire du folate sur la réplication du VIH-1 dans les MDM.
2. Identifier le mécanisme par lequel ces enzymes modulent l'infection par le VIH-1 dans les MDM.

Chapitre 3 : Matériel et Méthodes

3.1. Production de particules virales

3.1.1. Modèles viraux

Deux modèles viraux ont été utilisés au cours de ce projet. Tout d'abord, il y a le NL4-3 BAL Env, qui est un plasmide viral codant pour le VIH-1. Ce dernier a été utilisé pour les expériences de PCR quantitative. Il y a également le NL4-3 BAL Env IRES HSA qui a été produit à partir d'un vecteur NLENG1-IRES (offert gracieusement par le Dr D.N. Levy, New York University College of Dentistry, NY). Ce clone moléculaire possède tous les gènes du VIH-1, mais auquel une séquence permettant l'expression d'une protéine murine à la surface des cellules productivement infectées (Heat Stable Antigen/CD24) a été ajoutée. L'enveloppe a également été modifiée pour conférer un tropisme R5 au virus [152]. Le NL4-3 BAL Env IRES HSA permet de sélectionner les cellules productivement infectées par cytométrie en flux. Il a également été utilisé pour les expériences d'ELISA de la protéine de capsid p24.

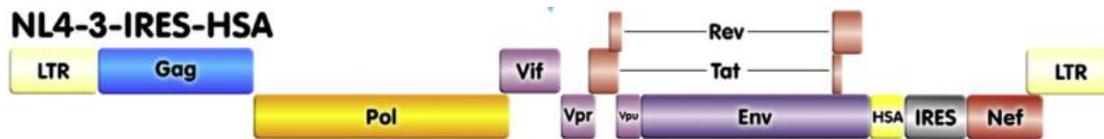


Figure 11 : Clone moléculaire NL4-3 BAL Env IRES HSA

3.1.2. Culture de cellules HEK293T

La lignée cellulaire HEK 293T (gracieusement fourni par le Dr Warner C. Greene du J. Gladstone Institute, San Francisco, CA) provient de cellules embryonnaires de rein humain. Elles ont une bonne susceptibilité à la transfection, ce qui permet d'obtenir une production virale appréciable. Lors de leur utilisation, elles sont décongelées et mises en culture à 37°C sous 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) (Corning, New York, NY) supplémenté de 10% de sérum foetal bovin (FBS) (Corning) inactivé à la chaleur et de pénicilline/streptomycine 1X (P/S) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Lorsque les cellules atteignent 75% de confluence, celles-ci sont lavées avec du PBS 1X (*phosphate buffered saline*) et décollées avec de la trypsine 1X contenant 0.5% d'EDTA (acide éthylène diamine tétracétique) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Elles sont ensuite remises en

culture à raison de 3 millions de cellules par flacon T75 (Corning) dans 10 ml de milieu DMEM complet jusqu'à l'étape de transfection.

3.1.3. Transfection du plasmide viral

Afin de produire des particules virales, un clone moléculaire infectieux du VIH-1 est transfecté dans les cellules 293T. Environ 1 h avant la transfection, le milieu est remplacé par du milieu DMEM complet. La solution de transfection est obtenue en mélangeant le plasmide viral dans 500 µl d'une solution de phosphate de calcium 2M. À cette solution est ajouté 500 µl de HBS 2X (*hepes buffered saline*) (140 mM de NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄•2H₂O et 50 mM d'HEPES dans de l'eau Mili-Q filtrée 0,22 µm) goutte à goutte tout en mélangeant doucement. Après 20 min d'incubation à température de la pièce, la solution de transfection est ajoutée lentement sur les cellules 293T pour ensuite être incubée à 37°C sous 5% de CO₂. Après 16 h, le milieu est retiré, les cellules lavées avec 10 ml de PBS 1X, puis remises en culture avec du milieu complet frais pendant 24 à 48 h.

3.1.4. Récolte de la production virale

Le surnageant contenant les particules virales est récolté, centrifugé 5 min à 300 g (modèle ST40R, Thermo Fisher Scientific) puis filtré sur membrane 0.22 µm (Millipore, Dramstadt, Allemagne) afin de retirer les débris cellulaires. Le surnageant filtré est ultracentrifugé pendant 45 min à 100 000 g (modèle Optima L90-K, Beckman-Coulter, Brea, CA) dans des tubes appropriés (Beckman-Coulter). Par la suite, le surnageant est retiré délicatement et le culot est resuspendu dans un volume de PBS 1X équivalent à 10% du volume initial. La production virale est ensuite aliquotée dans des tubes stériles (Thermo Fisher Scientific) et entreposée à -80 °C. 1

3.1.5. Dosage de la production virale

3.1.5.1. ELISA p24

Le dosage de la capsid p24 par la technique immunoenzymatique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) permet d'obtenir la concentration de capsid virale p24 de l'échantillon. Pour réaliser l'ELISA, des plaques 96 puits (Thermo Fisher Scientific) sont enduits de 100 µl d'un anticorps spécifique à la p24 (183-H12-5C à 2.5 µg/ml) (NIH AIDS

Research and Reference Program, Germantown, MD) et incubées pendant la nuit à 4 °C. Le lendemain, à la suite d'une série de trois lavages au PBS 1X contenant 0.05% de Tween 20 (Thermo Fisher Scientific) (PBST) avec un laveur de plaques automatisé (modèle ELx405, Bio-Tek Instrument inc., Winooski, VT) les sites de liaison non spécifique sont bloqués avec 200 µl de PBST contenant 0.5% (w/v) d'albumine sérique bovine (BSA) (Fitzgerald Industries International, Acton, MA) pendant 1 h à température de la pièce sur un agitateur de plaques à vitesse modérée. Pendant ce temps, une dilution en série du virus et d'un standard de la protéine p24 (généreusement fourni par Chiron Corporation, Emeryville, CA) allant de 31.25 à 2000 pg/ml est faite en plus d'un contrôle négatif (PBST seul). Après une autre série de lavage, 100 µl des échantillons et des standards dilués sont placés dans la plaque puis lysés avec 25 µl d'un tampon (PBS comprenant 0.05% (v/v) de Tween-20, 2.5% (v/v) de Triton-X100 et 2% (v/v) de bleu de trypan) avant d'être incubé à température de la pièce pendant 1 h avec agitation modérée. À la suite de cette incubation, une autre série de lavage est réalisée puis 100 µl d'un anticorps biotinylé anti-p24 (clone 31-90-25) (ATCC, Manassas, VA) est ajouté à raison de 0.5 µg/ml dans du PBST + 0.5% BSA pendant 1 h à température de la pièce. Par la suite, une autre série de lavage est réalisée et 100 µl de l'enzyme conjuguée HRP40-Streptavidine (*horseradish peroxidase*) (Thermo Fisher Scientific) diluée 1 : 20 000 est ajoutée et incubée pendant 20 min à température de la pièce avec agitation modérée. À la suite d'une dernière étape de lavages, 100 µl de substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) (enhanced K-Blue® TMB Substrate) (Neogen, Lexington, KY) est ajouté, donnant alors une coloration bleutée lors de la réaction d'oxydation. Cette dernière est arrêtée avec l'ajout de 50 µl d'acide phosphorique (H₃PO₄ 1M). La lecture de l'absorbance à 450 nm est réalisée avec l'aide d'un lecteur d'absorbance (modèle ELx808, Bio-Tek Instrument inc.).

3.1.5.2. TCID₅₀ sur lignée de cellules TZM-BL

La TCID₅₀ (50% Tissue culture Infective Dose) est la mesure de la dose nécessaire afin d'infecter 50% des cellules d'un échantillon. La lignée cellulaire TZM-BL (développée par les Drs John C. Kappes et Xiaoyun Wu en collaboration avec Tranzyme Inc. et obtenue auprès du AIDS Research & Reagent Program) est dérivée de cellules HeLa et a été modifiée pour exprimer le CD4 et le CCR5 à sa surface. De plus, ces cellules contiennent deux gènes rapporteurs soit pour la luciférase (des lucioles) et la β-galactosidase qui sont contrôlés par

le LTR du VIH-1. L'essai luciférase de ces cellules TZM-BL permet donc de mesurer efficacement le pouvoir infectieux de la production virale afin de calculer la quantité de virus infectieux par cellule à ajouter dans les puits (Multiplicity of Infection ; MOI). Pour réaliser cet essai, les cellules d'abord sont mises à une concentration de 2×10^5 par ml de milieu DMEM et incubées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant la préparation du virus. Par la suite, 150 µl de DMEM est ajouté dans chaque puits d'une plaque 96 puits (Thermo Fisher Scientific). Le virus est alors dégelé rapidement dans un bain à 37°C et dilué dans un ratio 1:12 (200 µl de virus pour 2.2 ml de DMEM). Ce mélange est alors réparti dans la première colonne (200 µl par puits). Des dilutions successives sont alors réalisées avec l'aide d'une pipette multicanaux en prenant 50 µl du contenu des puits de la première colonne (4^{-2}) pour le transférer dans la 2^e colonne (4^{-3}) et ainsi de suite jusqu'à la 11^e colonne (4^{-12}) où le surnageant est jeté. Par la suite, 10 000 cellules (50 µl) sont ajoutées dans chaque puits et la plaque est mise en incubation à 37°C sous 5% de CO₂. Après 24 h, 100 µl du surnageant est retiré de chaque puits pour être remplacé par 25 µl de tampon de lyse (50% de glycérol, 5% de Triton X-100 auquel du dithiothréitol (DTT) et du trishydroxyméthylaminométhane (Tris) sont ajoutés). La plaque est agitée modérément pendant 30 minutes à température de la pièce puis soumise à un cycle de gel/dégel à -20 °C. La lecture de l'activité luciférase est réalisée avec un appareil de type Varioskan (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific). La formule de Spearman-Karber nous permet ensuite de calculer la TCID₅₀ afin d'obtenir la MOI.

3.2. Production de macrophages dérivés de monocytes à partir de sang périphérique de donneurs sains

Des macrophages dérivés de monocytes (MDM) ont été obtenus par isolation de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) provenant de volontaires sains. Le prélèvement a été fait selon un protocole approuvé par le comité d'éthique du CHU de Québec-Université Laval.

3.2.1. Isolement des macrophages dérivés de monocytes (MDM)

Le sang récolté (environ 450 ml/donneur) est tout d'abord mis dans des tubes de 50 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) contenant 15 ml de *Lymphocyte Separation medium*

(Corning) puis centrifugé pendant 25 min à 800 g sans frein (modèle Sorvall ST16R, Thermo Fisher Scientific). À la suite de la centrifugation, les différentes phases du sang sont séparées et il est possible de récolter l'anneau de PBMCs avec une pipette de collection (Thermo Fisher Scientific) puis de les transférer dans des tubes contenant 50 ml de PBS 1X pour un premier lavage. Les tubes sont centrifugés à 200 g pendant 10 min afin d'enlever les plaquettes résiduelles. À la suite de cette centrifugation, le surnageant est jeté et une autre étape de lavage est réalisée dans du PBS 1X par centrifugation à 300 g. Après avoir jeté le surnageant, une dernière étape de lavage est réalisée avec du RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Corning) à 300 g pendant 10 min. Ces étapes de lavages permettent également de concentrer les PBMCs dans un seul tube. En général, on obtient environ 500 millions de PBMCs par donneur. Après avoir été comptées, les cellules sont mises dans des pétris de 150 mm² (1.2×10^8 à 1.8×10^8 PBMC/pétri) (Sarstedt, Allemagne) contenant 20 ml de RPMI et incubés à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 3 h. Suite à l'incubation, le surnageant et les cellules en suspension sont retirées et les cellules adhérentes sont lavées 2 fois avec 10 ml de PBS 1X. Les monocytes adhèrent au pétri alors que les lymphocytes du sang périphérique (PBL) seront en suspension dans le surnageant. Suite aux lavages, les cellules sont mises en culture avec 20 ml de RPMI contenant 10% de sérum AB humain (Valley Biomedical, Winchester, VA) et 25 ng/ml de Macrophage Colony Stimulating factor (M-CSF) (Genscript, Piscataway NJ) afin de fournir un milieu permettant la différenciation des monocytes en macrophages. Après 3 jours, le milieu est retiré puis les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS 1X pour être remplacé par 20 ml de RPMI contenant 10% de sérum AB humain et de la P/S 1X. Après un total de 6 jours, le surnageant est retiré puis les cellules sont lavées avec du PBS 1X avant d'être traitées avec 7 ml d'Accutase (Thermo Fisher Scientific) pendant 60 min à 37°C sous 5% de CO₂. L'Accutase décolle les cellules tout en permettant la conservation des épitopes à leur surface. Après 1 h, les MDM sont raclés avec l'aide d'un grattoir (Thermo Fisher Scientific) puis récoltés dans du PBS 1X avant d'être centrifugés à 300 g pendant 10 min. Les cellules sont ensuite remises dans du milieu RPMI complet avant d'être comptées puis utilisées.

3.3. Modifications dans le cycle du folate

3.3.1. Utilisation de petits ARN interférents

De petits ARN interférents (*short interfering RNAs* ; siRNA) ont été utilisés pour diminuer l'expression génique de plusieurs protéines d'intérêt dont la Gamma-Glutamyl Hydrolase (siGGH), la Folylpolylglutamate Synthase (siFPGS), la Methylenetetrahydrofolate Réductase (siMTHFR) et la Dihydrofolate Réductase (siDHFR) (Thermo Fisher Scientific). Les siRNA sont des petits ARN doubles brins qui activent les mécanismes d'interférence à l'ARN de la cellule. Cela a pour effet de mener à la dégradation spécifique des ARNm ciblés. Dans un premier temps, les siRNA (1 nmol) ont été dilués jusqu'à une concentration de 4 μ M dans de l'eau sans nucléase (Thermo Fisher Scientific) et mis pendant 30 min à 4 °C. Ils sont ensuite congelés jusqu'à leur utilisation. Immédiatement avant la transfection, les siRNA sont dilués à une concentration de 400 nM dans du milieu *Optimal Minimal Essential Medium* (Opti-MEM) (Thermo Fisher Scientific) avant d'être dilué de nouveau dans un ratio 1:1 dans de l'Opti-MEM contenant de la Lipofectamine RNAiMax (1,5 μ l de Lipofectamine RNAiMax dans 25 μ l d'Opti-MEM) (Thermo Fisher Scientific) pour une concentration finale de 200 nM. Après avoir bien mélangé la solution, celle-ci est incubée à température de la pièce pendant 15 min. Durant ce temps, les MDM préalablement mis en culture à raison de 150 000 par puits d'une plaque 24 puits (Sarstedt) sont lavés avec du PBS 1X pour enlever le sérum résiduel. Par la suite, 200 μ l de RPMI sans sérum et antibiotiques est ajouté dans chaque puits avec 50 μ l du mélange de siRNA/lipofectamine. Le volume est ajusté à 500 μ l et le tout est incubé à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 2 h. Après l'incubation, 500 μ l de RPMI contenant 20 % de sérum AB humain sont ajoutés. Les MDM sont laissés en culture 72 h avant d'être infectés par le virus.

Tableau 2 : Séquence des siRNA utilisés

Gène visé	Séquence
FPGS	ACUUCACAGUGACACUGGAtt
GGH	GGAUUGAGUUUAUUUCAACAtt
MTHFR	CCGAUUUCAUCAUCACGCAtt
DHFR	GAACAACCAGAAUUAGACAAtt

3.3.2. Utilisation d'un inhibiteur chimique

3.3.2.1. Méthotrexate

Le méthotrexate (MTX) (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MI) a été utilisé pour inhiber la DHFR, enzyme principalement responsable de la régénération d'une forme de folate métaboliquement actif (Tétrahydrofolate (THF)). Des MDM préalablement mis en plaque 24 puits à raison de 150 000 par puits sont d'abord lavés 1 fois avec du PBS 1X avant d'être mis en culture dans 500 µl de RPMI contenant 10% de sérum AB humain et une concentration de MTX allant de 10 à 100 nM en plus d'un contrôle négatif pendant 6 h à 37°C sous 5% de CO₂. Après l'incubation, les cellules sont lavées avec du PBS 1X puis remises en culture avec du RPMI complet sans MTX avant d'être infectées par le NL4-3 BAL Env IRES HSA. Après 3 jours d'infection, un test PMS/MTS est réalisé afin d'évaluer l'activité métabolique mitochondriale des cellules. (CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega). Celles-ci sont ensuite lavées analysées par cytométrie en flux (voir section 3.5.1).

3.3.2.2. Raltitrexed

Le Raltitrexed (ApexBio, Taiwan) a été utilisé pour l'inhibition de la thymidylate synthase (TYMS), enzyme responsable de la production de désoxythymidine monophosphate (dTMP) à partir de désoxyuridine monophosphate (dUMP). Des MDM préalablement mis en plaque 24 puits à raison de 150 000 par puits sont lavés avec du PBS 1X avant d'être mis dans 500 µl de RPMI contenant 10% de sérum AB humain. Le RTX a été ajouté dans une série de concentrations allant de 50 pM à 10 µM 3 jours avant, pendant ou après l'infection avec le virus NL4-3 BAL Env IRES HSA. Un contrôle négatif a également été effectué. Les cellules sont gardées en culture de 3 à 15 jours suivant l'infection. La moitié du milieu est remplacé par du RPMI complet frais sans RTX à tous les 3 jours. Un test PMS-MTS est réalisé avant que les cellules soient analysées par cytométrie en flux (voir section 3.5.1) et le surnageant par ELISA de la protéine p24 (voir section 3.1.5.1).

3.3.3. Effet de l'acide folique sur la réplication virale.

Afin de mesurer l'effet de la concentration en acide folique de l'environnement sur la capacité du virus à effectuer une infection productive, des MDM ont été mis en culture dans

du RPMI contenant 10% de sérum AB humain avec ou sans acide folique. Pour ce faire, des MDM sont mis dans des plaques 24 puits dans 500 µl de RPMI avec acide folique (Corning) afin de favoriser leur adhésion et mis en incubation à 37°C sous 5% de CO₂ durant la nuit. Le lendemain, le milieu est remplacé dans la moitié des puits par du RPMI sans acide folique (Thermo Fisher Scientific) contenant 10% de sérum AB humain. Après 4 ou 8 jours d'incubation, les cellules sont lavées avec du PBS 1X et remises en culture dans du RPMI complet (avec ou sans acide folique) et infectées avec du virus NL4.3 Bal Env IRES HSA. Après 3 jours d'infection, un test PMS-MTS est réalisé et les cellules sont analysées par cytométrie en flux.

3.4. Infection des macrophages

Les MDM préalablement traités ou non avec un siRNA ou un inhibiteur chimique sont lavés une fois avec du PBS 1X. Ils sont ensuite infectés 24 h avec du virus NL4.3 Bal Env IRES HSA (30 ng par 100 000 cellules) dans 300 µl de RPMI avec ou sans acide folique contenant 10% de sérum AB humain et mis en culture pour 24 h à 37°C sous 5% de CO₂. Le lendemain, les MDM sont lavés au PBS 1X puis du RPMI complet frais est ajouté pour une culture de 3 à 15 jours suivant l'infection à 37°C sous 5% de CO₂.

3.5. Analyse des données

3.5.1. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux a été utilisée pour évaluer le nombre de cellules productivement infectées par le virus NL4-3 BAL Env IRES HSA. De 3 à 6 jours suivant l'infection, le surnageant est enlevé et mis de côté. Les MDM sont quant à eux mis dans du PBS EDTA 2mM avec ou sans BSA 0.5% pendant 1 h à 37°C sous 5% de CO₂. Par la suite, les MDM sont décollés par des pipetages successifs dans le puits à l'aide d'une micropipette. À la suite d'un lavage avec du PBS-EDTA 2mM 0.5% BSA, le colorant de viabilité *Fixable Viability Dye eFluor®780* (Thermo Fisher Scientific) est ajouté à une concentration de 1 µl par million de cellules et incubé à 4 °C pendant 30 min. Après un second lavage, les cellules sont incubées dans 100 µl de tampon de blocage (PBS, 5mM EDTA, 1% BSA, 20% Normal Goat

Serum, 10% sérum AB humain filtré 0.22 μ M) pendant 1 h à 4 °C. Par la suite, un anticorps conjugué à un fluorophore ciblant la protéine HSA (CD24) (0,3 μ l par échantillon dans 50 μ l de tampon de blocage) (M1/69; ThermoFisher Scientific) est ajouté pour une incubation à 4 °C pendant 10 min. À la suite de 2 autres lavages, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% (Thermo Fischer Scientific) pendant 30 min à 4 °C. Après 2 derniers lavages, les MDM sont mis dans du PBS EDTA 2 mM sans BSA pour être traités par le cytomètre en flux (BD FACS Celesta et BD FACS Canto A, BD Biosciences, Mississauga, ON). Une analyse des résultats est ensuite effectuée avec le logiciel FlowJo (Flowjo version 0.7, Becton Dickinson).

3.5.2. ELISA p24

De 3 à 12 jours suivant l'infection, 500 μ l de surnageant est récolté puis remplacé par du RPMI complet frais. Les surnageants récoltés sont placés à -20 °C jusqu'à l'analyse. La technique ELISA est effectuée telle que décrite dans la section 3.1.5.1.

3.6. Validation de l'efficacité des ARN interférents

3.6.1. Extraction de l'ARN

La PCR quantitative a servi à valider la diminution de l'expression génique des différents siRNA utilisés lors des expériences. Suite au traitement avec les petits ARN interférents (voir section 3.3.1), les MDM sont lavés 1 fois avec du PBS 1X puis extraites selon le protocole d'extraction de l'ARN *Nucleospin RNA* de Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). La quantité d'ARN présente a été évaluée avec l'aide d'un spectrophotomètre pour microvolume (modèle DS-11 FX+, DeNovix, Wilmington, DE). Les échantillons sont ensuite mis à -80 °C pour conservation jusqu'à leur utilisation ultérieure.

3.6.2. PCR quantitative

Au moment d'effectuer la PCR, les tubes d'ARN sont décongelés et gardés sur glace durant toute la durée des manipulations. Par la suite, 0.5 μ g de chaque ARN est dilué dans 14 μ l d'eau DEPC (diethyl pyrocarbonate 0.1%) (Thermo Fischer Scientific) auquel on ajoute 1 μ l (500 ng) d'amorce non spécifique (Roche, Bâle, Suisse) pour un total de 15 μ l. Les tubes

sont ensuite chauffés pendant 5 min à 70 °C avant d'y ajouter 10 µl d'un mélange réactionnel contenant (par échantillon) : 4 µl d'eau DEPC, 5 µl de tampon RT 5X (Thermo Fisher Scientific), 0.5 µl d'une solution équimolaire de désoxynucléotides (dNTP) 25mM (Thermo Fisher Scientific) puis 0.5 µl de *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) (Thermo Fisher Scientific). Le mélange est chauffé à 37°C pendant 60 min avant d'être centrifugé brièvement.

Par la suite, 10 µl de la solution d'ARN est mise dans 190 µl d'eau (dilution 1/20) et bien mélangé. 5 µl de cette solution diluée est alors mis dans des puits de plaque 384 puits (Thermo Fisher Scientific). Pendant ce temps, un mélange réactionnel est réalisé en mélangeant (par échantillon) : 6 µl de SYBER Green (Thermo Fisher Scientific), 0.24 µl de chaque amorce du gène spécifique (sens et antisens) à 5 µM du gène spécifique et 0.52 µl d'eau. Il faut également faire un mélange avec les amorces du gène 18S, gène constitutif exprimé au même niveau chez tous les eucaryotes. Une courbe standard est réalisée en prenant 10 µl de chaque échantillon dilué et en les mélangeant dans un tube. Par la suite, 40 µl de ce mélange est dilué dans un ratio 1 : 1 avec de l'eau DEPC pour en faire une dilution sériée de 1/20 à 1/2560. Le standard est alors mis dans les puits en duplicata. Tout juste avant la PCR, 7 µl de mélange réactionnel (gène spécifique ou 18S) est mis dans les puits appropriés et la plaque est scellée, centrifugée et mise dans le système pour effectuer la PCR (QuantStudio 6, Thermo Fischer Scientific) selon les conditions suivantes :

1. 2 min à 50 °C
2. 2 min à 95 °C
3. Répéter 40 fois
 - a. 15 sec à 95 °C
 - b. 1 min à 60 °C
4. 15 sec à 95 °C
5. 1 min à 60 °C
6. 15 sec à 95 °C

Les données sont ensuite analysées par le logiciel fourni avec le système pour la PCR (QuantStudio Real Time PCR Software version 1.3, Thermo Fisher Scientific).

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour la PCR ciblant l'ARN

Gène visé	Amorce sens	Amorce antisens
FPGS	CATGGAGTACCAGGATGCGC	CGTGCCAGGTACAGTTCCAT
GGH	TCCTTTTCCCTGGAGGAAGT	TCTGGAACATTCTGCTGTGC
MTHFR	AGCTTCATGTTCTGGAAGGACG	CCAGTGGGAAGTCATTGTCCA
18 S	TAGAGGGACAAGTGGCGTTC	CGCTGAGCCAGTCAGTGT

3.7. Étude du mécanisme d'action du Raltitrexed chez les MDM

3.7.1. Préparation des cellules

Les cellules sont tout d'abord mises en culture à raison de 400 000 cellules par puits dans une plaque 12 puits (Thermo Fisher Scientific). Après 24 h d'adhésion, les cellules sont mises en contact avec ou sans 0,05 ou 5 nM de RTX pendant 72 h (voir section 3.3.2.2). Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X puis 500 µl de RPMI contenant 10% de sérum AB humain frais est ajouté. Par la suite, 100 µM d'Efavirenz (NIH AIDS Reagent Program) est ajouté dans un puits comme contrôle de la transcriptase inverse et 2 µM de Raltégravir (Cayman Chimichal, Ann Arbor, MI) dans un autre comme contrôle de l'intégration virale. La plaque est incubée 1 h à 37°C sous 5% de CO₂. Pendant ce temps, le virus NL4.3 Bal Env est traité à la DNase I. Pour ce faire, un volume de virus équivalent à 80 ng de capsid p24 par puits a été mis dans un tube en présence de DNase I grade II (40 µg/ml) (Roche), d'EGTA (500 mM) (*ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) et de MgCl₂ (10 mM). La solution est ensuite incubée 45 min à la température de la pièce après avoir bien été mélangée. Le virus traité est alors ajouté dans chaque puits à l'exception du contrôle négatif et mis en incubation pendant 24 h. Après l'incubation, 100 µM d'Efavirenz est ajouté dans les puits infectés n'ayant pas reçu de traitement auparavant afin de limiter le cycle de réplication viral et d'empêcher une réinfection.

3.7.2. Extraction de l'ADN

Après un total de 48 h, les cellules sont lavées une fois avec du PBS 1X puis elles sont extraites selon le protocole d'extraction d'ADN génomique à partir de tissus *Nucleospin Tissue* de Macherey-Nagel. La concentration d'ADN de l'échantillon est évaluée avec l'aide

d'un spectrophotomètre à microvolumes. Les échantillons sont conservés à -80 °C jusqu'à l'utilisation.

3.7.3. PCR en temps réel pour l'ADN intégré

Afin de connaître la quantité d'ADN viral intégré, une PCR quantitative en deux étapes est réalisée. La première étape servant à amplifier l'ADN viral consiste à mélanger 100 µg d'ADN génomique à 10 µl d'un mélange réactionnel contenant (par échantillon) une solution équimolaire de dNTP 25mM, 1.5 µl de MgCl₂ (10 mM), 5 µl de tampon enzymatique 10X, 0.5 µl de Taq polymérase (Invitrogen), 1.4 µl d'eau Mili-Q et 0.5 µl d'amorces Alu et M661 (50 µM) (Integrated DNA Technology, San Jose, CA). Le tout est complété jusqu'à 50 µl avec de l'eau Mili-Q filtrée 0.22 µM. La première PCR est réalisée avec un appareil thermocycler (modèle MJ Mini, BioRad, Hercules, CA) dans les conditions ci-dessous :

1. 3 minutes à 94 °C
2. 22 cycles :
 - a. 30 secondes à 94 °C
 - b. 30 secondes à 66 °C
 - c. 10 minutes à 70 °C
3. 10 minutes à 72 °C
4. Garder à 16 °C

À la suite de cette première PCR, 8 µl de l'échantillon est mis dans 192 µl d'eau Mili-Q filtrée 0.22 µM (dilution 1 : 25). Parallèlement, un mélange réactionnel contenant (par échantillon) : 0.22 µl d'amorces AA55 et M667 (Integrated DNA Technology, San Jose, CA), 0.033 µl de sonde HIV-FAM (3 µM), 5.5 µl de TaqMix 2X (Thermo Fisher Scientific) et 0.027 µl d'eau Mili-Q filtrée 0.22 µM. Un contrôle est également réalisé avec la globine, une protéine conservée et exprimée à un niveau similaire dans les cellules. Pour le contrôle, les amorces AA55 et M667 sont remplacées par les amorces β-Globin sens et β-Globin antisens et la sonde est remplacée par la β-Globin-VIC. Le tout est ensuite mis dans le système pour réaliser une PCR dans les conditions suivantes :

1. 2 min à 50 °C
2. 20 sec à 95 °C
3. Répéter 40 fois
 - a. 1 sec à 95 °C
 - b. 20 sec à 60 °C

Les résultats sont analysés avec le logiciel fourni avec le système pour la PCR.

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées pour la PCR quantitative

M667	GGC TAA CTA GGG AAC CCA CTG C
AA55	CTG CTA GAG ATT TTC CAC ACT GAC
M661	CCT GCG TCG AGA GAT CTC CTC TG
Alu	TCC CAG CTA CTC GGG AGG CTG AGG
Globine sens	TGG TCT ATT TTC CCA CCC TG
Globine antisens	TGG CAA AGG TGC CCT TGA

3.8. Statistiques

Les moyennes des données brutes ont été comparées avec un test de Student avec ratios pairés (*ratio paired t-test*) avec l'aide du logiciel GraphPad Prism Version 7 pour Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Chapitre 4 : Résultats

4.1. Validation de la diminution des ARNm de protéines impliquées dans le métabolisme du folate par des siRNA

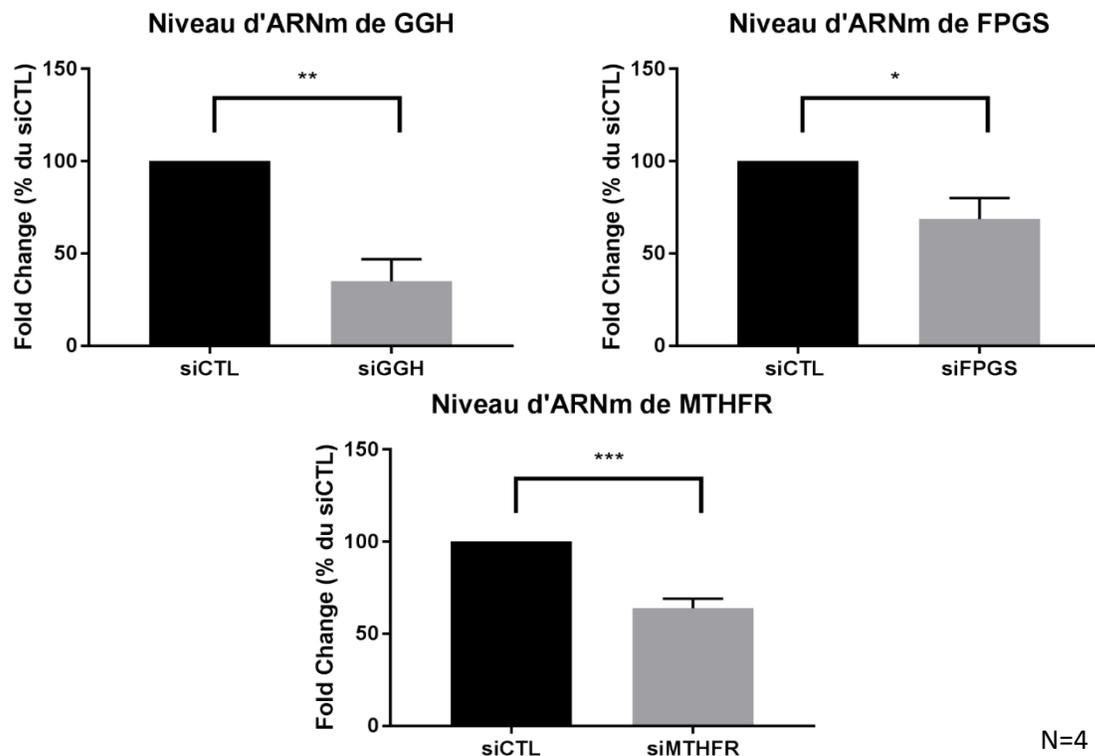


Figure 12 : Expression génique des siRNA utilisés

Trois enzymes jouant un rôle clé dans la rétention du folate intracellulaire (GGH, FPGS et MTHFR) ont été ciblées avec des siRNA. Le but de cette expérience était de valider l'efficacité de ces derniers à diminuer le niveau d'expression des ARNm des enzymes ciblées de façon significative. Les niveaux d'ARNm ont été évalués par une PCR quantitative à la suite de leur transfection avec les siRNA. Brièvement, des MDM ont été transfectés avec un siRNA spécifique pendant 72 h tel qu'indiqué dans la section 3.3.1. L'ARN a ensuite été extrait et analysé par PCR quantitative (section 3.6.2). La figure 12 montre le niveau d'expression d'ARNm du siRNA spécifique (gris) comparé au siRNA contrôle (noir). Une diminution significative de l'expression génique par rapport au contrôle est remarquée lorsque le siRNA spécifique est utilisé. Cela indique que ces derniers sont fonctionnels.

4.2. La réduction des ARNm d'enzymes essentielles impliquées dans le cycle du folate a un impact sur la réplication du VIH-1

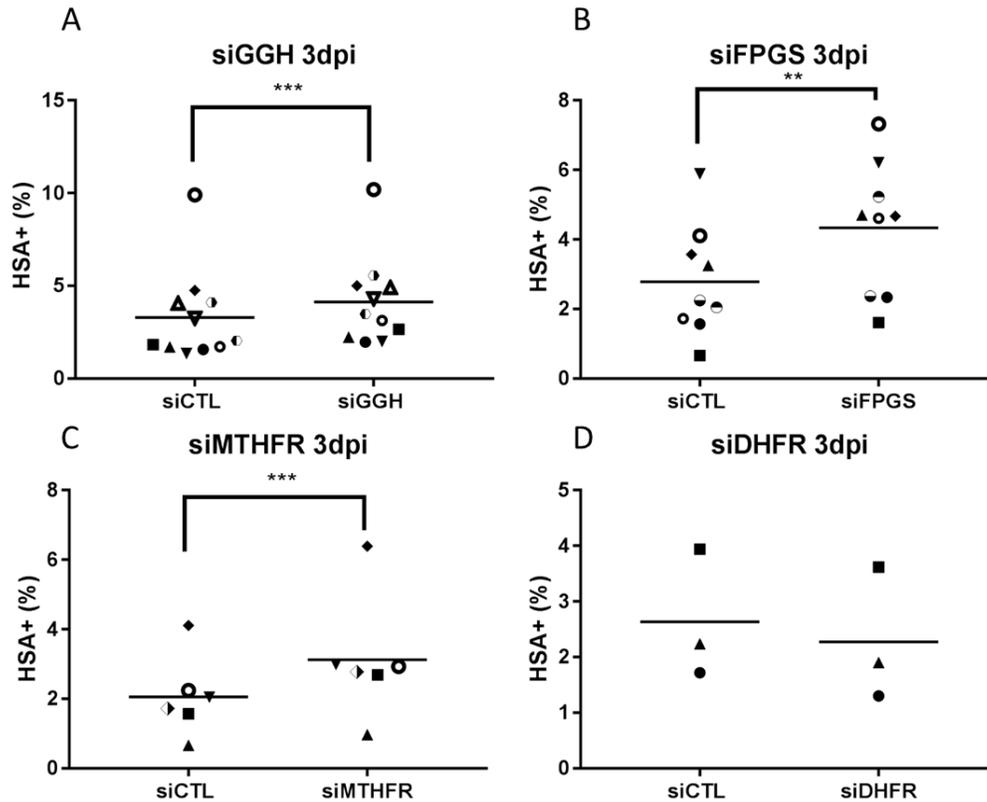


Figure 13 : Modulation du nombre de cellules productivement infectées à la suite de la transfection de siRNA

Afin vérifier l'effet de la mise en sourdine par siRNA d'enzymes impliquées dans le cycle du folate sur le nombre de cellules productivement infectées, des MDM ont été mis en culture 3 jours avec un siRNA spécifique (siGGH, siFPGS, siMTHR ou siDHFR) avant d'être infectés pendant 3 jours avec le virus NL4.3 BAL Env IRES HSA puis analysés par cytométrie en flux. La figure ci-dessus (figure 13A-C) montre une augmentation significative du nombre de cellules productivement infectées, exprimant la protéine HSA à leur surface, à la suite de l'utilisation de siGGH, siFPGS et siMTHFR par rapport au contrôle (siCTL). Cependant, des résultats préliminaires avec siDHFR (figure 13D) semblent montrer une légère diminution du nombre de cellules productivement infectées par rapport au contrôle.

4.3. La réduction des ARNm d'enzymes essentielles impliquées dans le cycle du folate a un impact sur la production de nouveaux virions

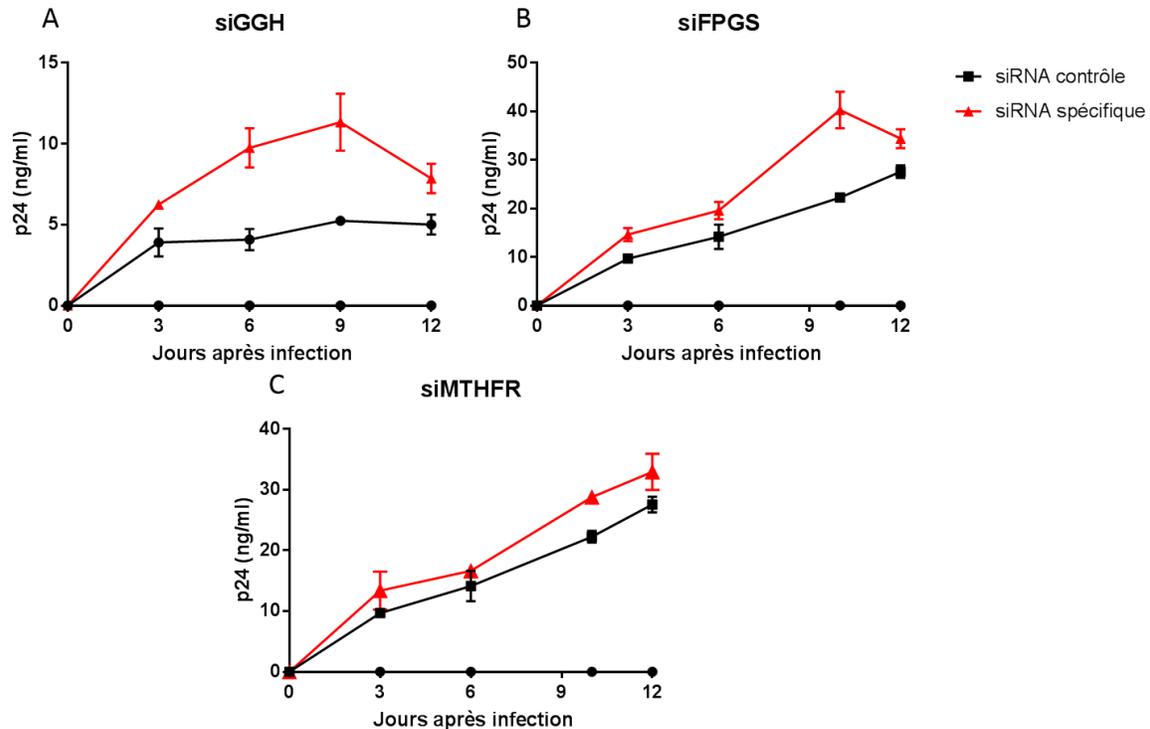


Figure 14 : Cinétique de production virale à la suite de la transfection de siRNA

Afin d'évaluer la quantité de nouveaux virions étant produits par les MDM infectés, un ELISA de la capsid p24 a été réalisé. Pour ce faire, des MDM ont été transfectés pendant 3 jours avec un siRNA ciblant une protéine d'intérêt (siGGH, siFPGS ou siMTHFR) avant d'être infectés pendant 24 heures. La moitié du surnageant a été récolté à intervalle régulier et remplacé par du milieu frais pendant 12 jours. La quantité de protéine p24 a été dosée par ELISA tel qu'indiqué dans la section 3.1.5.1. La figure 14 présente des résultats représentatifs montrant que les MDM traités avec un siRNA spécifique (rouge) produisent une plus grande quantité de p24 par rapport au siCTL (noir). Cet effet est plus important avec siGGH qu'avec les deux autres siRNA (siFPGS et siMTHFR). Ces résultats montrent qu'il y a une augmentation de la production de nouveaux virions dans les MDM lorsque l'expression de certaines enzymes est diminuée par un siRNA.

4.4. La suppression du folate dans la culture des MDM n'a pas d'impact à court terme sur la réplication virale du VIH-1

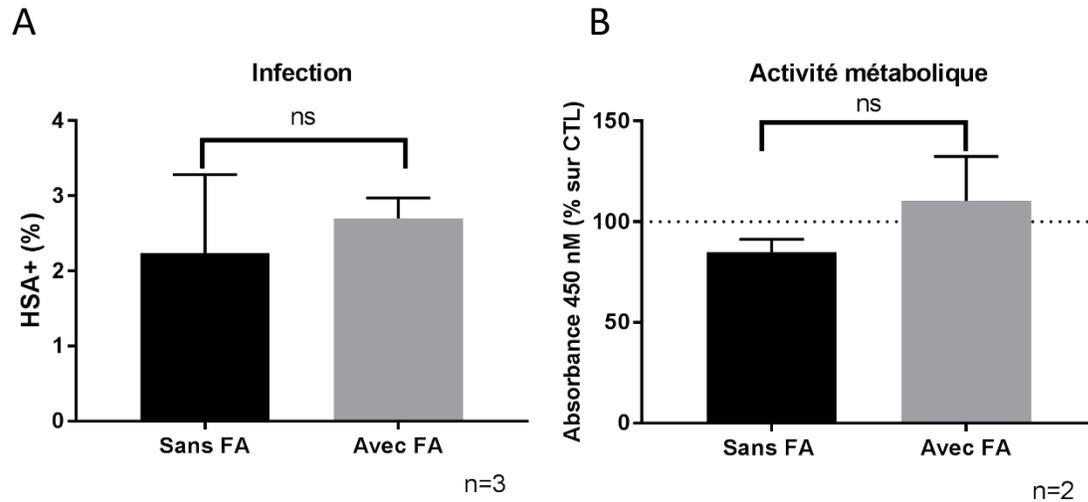


Figure 15 : Effet de l'acide folique sur la réplication virale

Afin d'évaluer l'effet d'une carence en folate sur la capacité du virus à infecter productivement les MDM, ces derniers ont été mis en culture dans du RPMI avec ou sans acide folique pendant 4 jours pour être ensuite infectés dans le même milieu pendant 3 jours supplémentaires. L'analyse du nombre de cellules productivement infectées par cytométrie en flux montre qu'il n'y a pas de différences significatives en présence ou en absence d'acide folique dans le milieu (figure 15A). L'activité métabolique quant à elle est légèrement diminuée lors de l'infection dans un milieu sans acide folique, par rapport au milieu régulier en contenant (figure 15B). Ces résultats suggèrent qu'à court terme, la capacité d'infection du virus n'est pas affectée par une diminution de l'apport en folate, malgré une diminution de l'activité métabolique dans les MDM.

4.5. Le MTX n'a pas d'effet significatif sur la réplication virale, malgré une diminution de l'activité métabolique

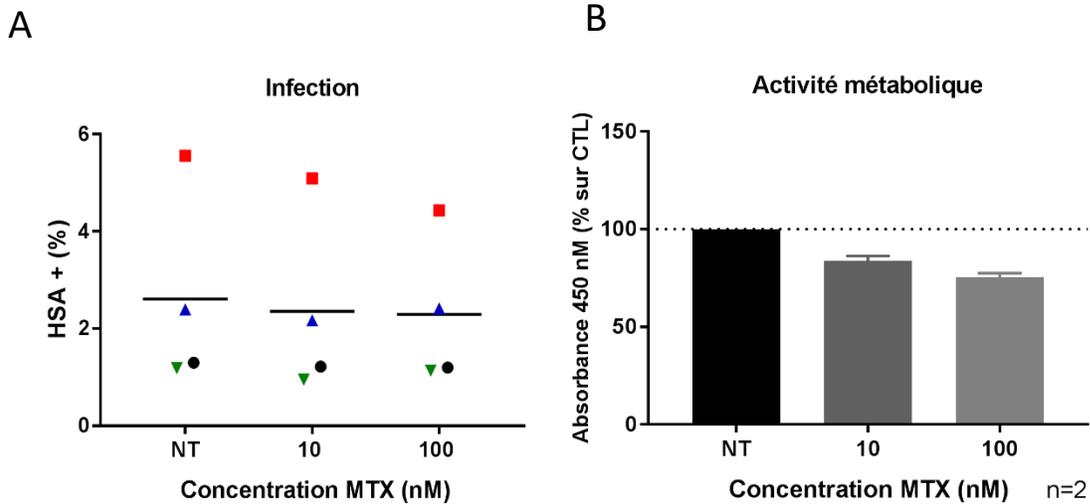


Figure 16 : Effet du MTX sur la réplication virale

Afin de vérifier l'effet d'un traitement au MTX sur la réplication virale, des MDM ont été mis en culture pendant 6 h avant d'être infectés pendant 3 jours avec le virus NL4.3 Bal Env IRES HSA. Le nombre de cellules productivement infectées ainsi que l'activité métabolique ont ensuite été évalués respectivement par analyse en cytométrie en flux et par un test de métabolisme. Aux doses utilisées, le nombre de cellules productivement infectées n'est pas affecté significativement par le MTX (figure 16A) malgré une baisse du métabolisme mitochondrial (figure 16B). La viabilité n'est pas affectée par le traitement (résultats non présentés).

4.6. Le RTX diminue le nombre de MDM productivement infectés, mais augmente la transcription virale dans ces cellules

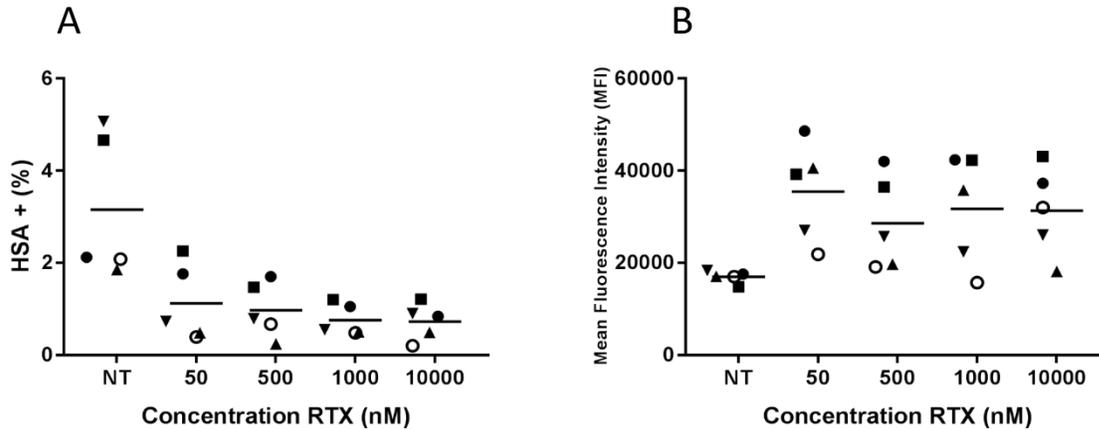


Figure 17 : Effet du RTX sur la réplication virale

Afin de vérifier l'effet d'un traitement au RTX sur la réplication virale, des MDM ont été infectés pendant 72 h en présence d'une concentration croissante de l'inhibiteur chimique et de virus NL4.3 BAL Env IRES HSA. Ceux-ci ont ensuite été analysés par cytométrie en flux où le pourcentage de cellules exprimant la protéine HSA a été mesuré. En présence de RTX, il y a une diminution dose dépendante du nombre de cellules productivement infectées (figure 17A) puisque les MDM exprimant la protéine HSA ont diminué avec l'augmentation de la concentration en RTX. Parallèlement, les cellules productivement infectées (exprimant la protéine HSA) et traitées avec le RTX montrent une intensité moyenne de fluorescence (MFI) augmentée (figure 17B). Cela suggère que malgré la diminution de l'infection, il y a une augmentation de la transcription spécifiquement dans les MDM qui sont productivement infectés.

4.7. Le RTX influence la susceptibilité des MDM à l'infection

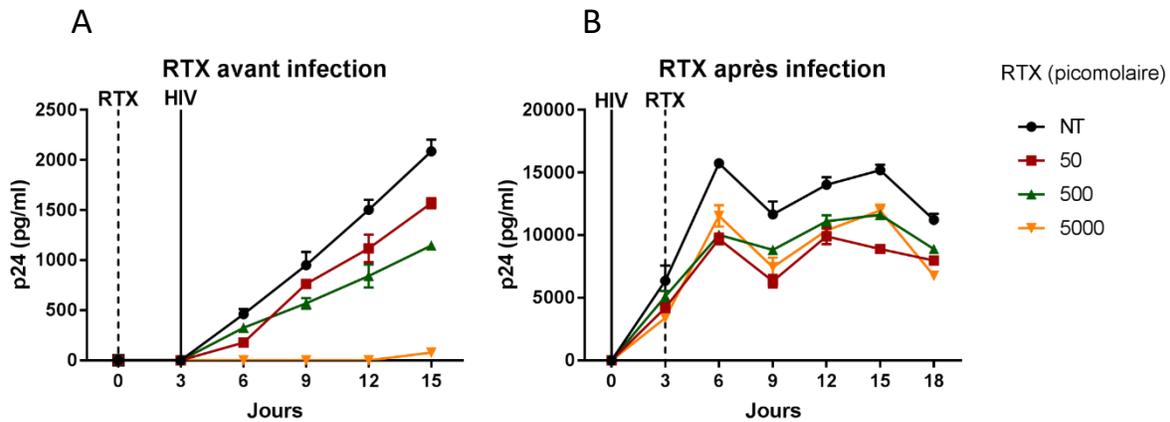


Figure 18 : Cinétique de production virale à la suite de l'utilisation du RTX avant ou après l'infection par le VIH-1

Afin de vérifier la susceptibilité des MDM à l'infection par le VIH-1 à la suite d'un traitement au RTX, ceux-ci ont été traités avec une dose croissante de l'inhibiteur chimique pendant 3 jours avant (figure 18A) ou après (figure 18B) l'infection avec le virus NL4.3 Bal Env IRES HSA. Une cinétique de production virale a ensuite été réalisée à tous les 3 jours pendant 12 à 15 jours suivant le traitement avec le RTX. La protéine de capsid p24 a ensuite été évaluée par ELISA. Des résultats représentatifs illustrent une diminution dose dépendante de la quantité de p24 pour atteindre un maximum qui est non détectable au-delà de 5000 pM lorsque le RTX est utilisé avant l'infection. Il n'y a cependant pas d'effet du RTX lorsque celui-ci est utilisé après l'infection. Cela suggère que le RTX agit rapidement dans le cycle viral en diminuant la susceptibilité des MDM à l'infection par le VIH-1. Une fois les cellules infectées, le RTX perd son effet inhibiteur.

4.8. Le RTX n'influence pas l'intégration virale dans les MDM

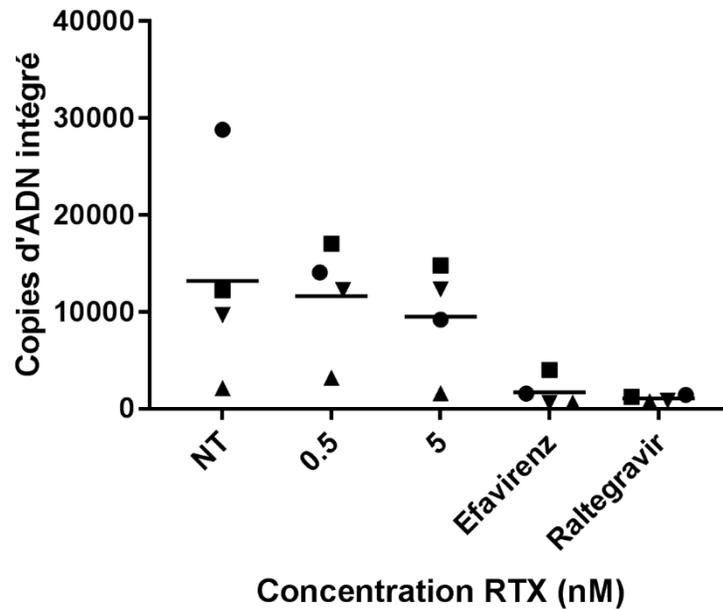


Figure 19 : Nombre de copies d'ADN intégré à la suite du traitement avec le RTX

Afin de vérifier si un traitement au RTX a une influence sur l'intégration virale, une PCR quantitative évaluant le nombre de copies d'ADN intégré a été réalisée. Pour ce faire, des MDM ont été traités 3 jours avec du RTX avant d'être infectés pendant 48 heures avec le virus NL4-3 BAL Env. L'ADN a ensuite été extrait et le nombre de copies d'ADN intégré est mesuré. La figure 19 montre qu'aux concentrations utilisées, le RTX n'a pas d'effet significatif sur l'intégration virale dans les MDM.

Chapitre 5 : Discussion

5.1. Sélection des gènes d'intérêt et impact sur l'infection des MDM par le VIH-1

5.1.1. Gamma-Glutamyl Hydrolase (GGH)

Le criblage effectué précédemment dans le laboratoire a permis de faire ressortir les différents gènes qui étaient modulés lors de l'infection des MDM par le VIH-1. La GGH est une enzyme qui a attiré l'attention, car elle est surexprimée rapidement dans les cellules productivement infectées (près de 4 fois plus) en comparaison aux cellules spectatrices (*bystanders*). Son expression revient à un niveau basal 6 jours après l'infection, ce qui suggère une réponse précoce de la cellule à la suite de l'infection. La GGH est responsable de cliver les résidus de glutamate sur le folate afin de permettre son export hors de la cellule. Son rôle est très similaire à la GCPII (PSMA), qui effectue le clivage du glutamate au niveau de la prostate, l'intestin et le système nerveux. GCPII est d'ailleurs surexprimée dans les cellules cancéreuses de la prostate et est liée à un mauvais pronostic de la maladie. Quant à GGH, des études récentes ont montré que cette protéine pouvait être modulée de façon similaire dans les cellules cancéreuses du rectum [153].

Un autre aspect de la GGH est qu'elle produit du glutamate lors de la réaction d'hydrolyse avec le folate. Ce neurotransmetteur est retrouvé en quantité largement supérieure dans le liquide céphalorachidien et le plasma de patients infectés avec le VIH [154]. Il est en grande partie responsable du recrutement de cytokines pro-inflammatoires menant à l'inflammation chronique présente lors de désordres neurocognitifs reliés au VIH (HAND) [155]. Chez les MDM, cette augmentation serait due à la protéine Vpr, qui affecte le métabolisme du glutamate et favorise son exportation hors de la cellule afin de créer un environnement cytotoxique [156]. Notre première hypothèse a donc été que le niveau d'expression de GGH pouvait affecter le niveau de glutamate intracellulaire et ainsi moduler la susceptibilité des macrophages à l'infection par le VIH-1.

Lors de la mise en sourdine de la GGH, une augmentation du nombre de cellules productivement infectées et de la production de nouveaux virions est remarquée (figures 13-

14 A). Tel que mentionné précédemment, la polyglutamylation du folate lui permet de rester dans la cellule. Le folate est un métabolite essentiel à la croissance et à la prolifération cellulaire ainsi qu'à la formation de produits méthylés. Il est notamment responsable de la formation de purines et de pyrimidine, constituants essentiels de l'ADN. Chez les macrophages, une grande concentration de folate intracellulaire n'est pas nécessaire étant donné que ces cellules ne prolifèrent pas. Cependant, le virus a besoin de ces nucléotides pour se répliquer et former son ADN viral lors de l'étape de transcription inverse. Cela est encore plus vrai dans les macrophages où il a été noté que le niveau est de 130 à 250 fois moins élevé que dans les lyT CD4⁺ activés [157]. Il est montré que la surexpression de GGH favorisait l'export et la résistance aux antifolates comme le MTX et le 5-fluorouracil (5-FU) [138]. Sachant que ces molécules utilisent le même chemin métabolique que le folate, une baisse de l'expression de GGH pourrait donc entraîner une rétention de ce métabolite dans la cellule. Une plus grande concentration de folate intracellulaire favoriserait la synthèse de nucléotides servant à la formation de l'ADN viral. D'autre part, l'augmentation de folate intracellulaire pourrait favoriser la formation de produits méthylés et réduire l'expression de certains gènes. Il est donc possible que ces deux réactions aient des effets inverses sur l'expression génique, ce qui expliquerait l'augmentation modeste du nombre de cellules productivement infectées.

5.1.2. Folylpolyglutamate Synthase (FPGS)

La FPGS est l'enzyme qui effectue la réaction contraire à la GGH soit d'ajouter des résidus de glutamate sur le folate afin de le concentrer dans la cellule et d'augmenter son affinité avec les enzymes. Lors de l'infection par le VIH-1, elle n'est pas modulée. Tout comme la GGH, la FPGS est beaucoup impliquée dans le cancer. En effet, une diminution de l'expression de cette protéine diminue la polyglutamination des antifolates et affecte leur rétention dans la cellule, ce qui a une incidence sur l'efficacité de ces traitements [127].

Étant donné que cette protéine joue un rôle inverse à GGH, une diminution de l'infection était attendue. Or, c'est plutôt le contraire qui s'est produit alors qu'une augmentation 2 fois supérieure du nombre de cellules productivement infecté a été observée par rapport à siGGH (figure 13 B). Une augmentation du nombre de nouveaux virions a également été observée, mais celle-ci est moins importante qu'avec siGGH (figure 14 B). Le mécanisme expliquant

l'effet observé à la suite de la diminution de l'expression de FPGS n'est pas bien compris. Il est cependant possible que cette extinction génique entraîne une rétroaction homéostatique diminuant l'expression de la GGH et permettant de maintenir les niveaux de folate dans la cellule. Cela permettrait à celle-ci de conserver sa capacité de produire les nucléotides requis pour la réplication du virus. Il est également possible que l'extinction génique de FPGS diminue le niveau de folate intracellulaire, ce qui créerait une diminution de la méthylation de l'ADN. En effet, il est montré dans le cancer que l'hypométhylation pouvait mener à une expression génique anormale, un processus causant éventuellement une prolifération cellulaire excessive [158]. Dans le contexte du VIH, cela pourrait se traduire par une augmentation de la transcription des gènes viraux menant à un plus grand nombre de cellules infectées. De plus, il est possible que cet effet soit accentué par l'excitotoxicité du glutamate à la suite de l'infection, déjà bien documenté dans le contexte du VIH-1 [155]. Si le glutamate ne peut se lier au folate, cela pourrait favoriser une hausse importante de sa concentration extracellulaire et augmenter la susceptibilité des MDM à l'infection par le VIH-1.

5.1.3. Méthylène tétrahydrofolate Réductase (MTHFR)

La MTHFR a été sélectionnée, car elle sert de route alternative pour la régénération du THF, forme de folate métaboliquement active. En suivant cette route, cela favorise également la méthylation de l'homocystéine, acide aminé potentiellement toxique, en méthionine. Lors de l'infection par le VIH-1, elle n'est pas modulée. Une expression trop faible de la MTHFR ou une mutation affectant l'activité enzymatique (principalement la mutation C677T) entraîne une augmentation d'homocystéine dans le sang (hyperhomocystéinémie). Cette condition est un facteur de risque pour des maladies cardiovasculaires, certains cancers ainsi que de nombreux désordres neurocognitifs [159-161]. Par exemple, dans plusieurs types de cancer, il a été montré que des mutations dans la MTHFR étaient associées à un changement dans le cycle du folate qui affecte le transfert de molécules carbonées ainsi que la méthylation et la synthèse de l'ADN. La concentration de folate est également importante, car plusieurs études suggèrent qu'une déficience en folate pourrait affecter cette enzyme et augmenter le risque de cancer [162, 163].

En diminuant l'activité de la MTHFR, une augmentation du nombre de cellules productivement infectées se situant entre le niveau de siGGH et siFPGS est remarquée

(figure 13 C). De plus, l'augmentation de la production de nouveaux virions est similaire à siFPGS (figure 14 C). En affectant l'activité de la MTHFR, la régénération du THF via la voie TYMS/DHFR est favorisée. Cela pourrait donc mener un recyclage du THF plus rapide et une augmentation de l'activité des enzymes produisant des nucléotides. Par le fait même, cela pourrait augmenter l'activité des enzymes virales et favoriser la production de nouveaux virions. Il se pourrait aussi que la diminution de l'activité de la MTHFR cause une hypométhylation de l'ADN, se traduisant par une augmentation de l'expression génique.

5.1.4. Dihydrofolate Réductase (DHFR)

La DHFR a été sélectionnée, car c'est l'enzyme principalement responsable de régénérer le THF et de réduire l'acide folique (forme synthétique du folate) pour qu'il puisse être utilisé par la cellule. Lors de l'infection par le VIH-1, elle est modulée de façon similaire à la GGH. La DHFR est ciblée par de nombreux médicaments, notamment dans les cas de cancers où son inhibition réduit la croissance et la prolifération cellulaire [164]. Les résultats préliminaires montrent que sa mise en sourdine avec un siRNA ne semble pas avoir d'effet significatif sur la réplication virale (figure 13 D). Son rôle ne semble donc pas crucial dans l'infection des MDM par le VIH-1. La régénération du THF par la voie de MTHFR pourrait être suffisante pour les besoins de la cellule et du virus. Il est également possible qu'une augmentation de la méthylation de l'ADN puisse expliquer la légère diminution observée, car cette dernière pourrait avoir comme effet de diminuer l'expression génique.

5.2. En réponse à l'infection, le folate serait exporté de la cellule afin de nuire à la réplication virale

Lors d'une infection productive par le VIH-1, l'expression de GGH est augmentée rapidement pour revenir à un niveau basal après quelques jours. Il est possible de croire qu'une surexpression de la GGH favorise l'export du folate. Cette vitamine est importante pour la production de nucléotides et la méthylation. Chez les MDM, le niveau de dNTP est plus faible, car ces cellules terminalement différenciées ne prolifèrent pas. Cependant, les nucléotides sont importants pour le virus qui les utilise afin de former l'ADN viral lors de l'étape de transcription inverse. C'est pourquoi il est supposé que lors de l'infection par le

virus, le métabolisme du folate dans les MDM est altéré ce qui favoriserait la sortie de ce métabolite à l'extérieur de la cellule. Cela aurait pour effet de nuire à la réplication virale en diminuant la quantité de nucléotides synthétisés. Cette méthode d'action est similaire à celle du facteur de restriction SAMHD1 qui transforme les dNTP en déoxynucléotides et en phosphate inorganique ayant pour effet de réduire la concentration intracellulaire de nucléotides. Cet effort est cependant insuffisant, car le virus peut quand même se répliquer et produire de nouveaux virions. Cela pourrait être expliqué en partie par une hypométhylation de l'ADN causée par la diminution du niveau de folate intracellulaire. Cela aurait pour effet d'augmenter l'expression génique et favoriser la production de nouveaux virions.

D'autres protéines sont régulées de la même façon que la GGH soit TYMS et DHFR. La TYMS produit lors de sa réaction de méthylation du dihydrofolate (DHF) qui sera utilisé par la DHFR afin de reformer du THF, forme de folate métaboliquement active. Ce THF polyglutaminé pourra ensuite être hydrolysé par GGH afin d'être exporté de la cellule. Il existe plusieurs transporteurs qui peuvent exporter le folate, mais ABCG2 en est un qui est modulé de la même façon que les autres enzymes lors de l'infection par le VIH-1 [151]. Ce transporteur couplé à l'ATP est très impliqué dans la résistance à plusieurs drogues, d'où le nom de la sous-famille à laquelle il appartient (Multi Drugs Resistance Protein ; MRP). Il est notamment surexprimé chez les patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique [165]. Lors de cette maladie, l'expression de GGH est aussi augmentée [166]. Il est même montré que la méthylation dans l'un des îlots CpG de l'ADN de ces protéines diminuait leurs niveaux d'expression [166, 167]. L'augmentation de leur activité a comme effet de diminuer l'efficacité des traitements anticancéreux (dont les antifolates) dans certaines lignées cellulaires [168]. Quant aux enzymes comme FPGS, MTHFR et les différents récepteurs favorisant l'entrée du folate (RFC, PCFT, FR) ceux-ci ne sont pas modulés lors de l'infection (résultats non présentés). Cela suggère que dans les MDM productivement infectés, l'expression des gènes responsable de l'export du folate serait favorisée et que le niveau de ce métabolite pourrait être modulé dans ces cellules.

Le sentier du folate est très complexe et touche à plusieurs autres sentiers métaboliques, dont celui de la méthionine et de la transsulfuration. À la suite d'une analyse plus approfondie de

la modulation des différents gènes sur les voies métaboliques reliées au cycle du folate, l'utilisation de siRNA ou d'inhibiteurs chimiques pourra servir à évaluer l'effet de leur expression ou de leur activité sur la réplication du VIH-1. Le premier gène à cibler est l'ABCG2 pour les raisons mentionnées ci-haut. Son rôle dans l'exportation des antifolates serait intéressant à étudier dans le contexte du VIH-1, car le niveau de folate influence l'expression d'ABCG2. En effet, une diminution de la concentration en folate mène à la surexpression de cette protéine [169]. Il serait également intéressant d'étudier l'impact de l'extinction génique de la Méthionine Synthase (gène MTRR) sur la réplication virale. Tout comme MTHFR, de nombreuses mutations dans le gène MTRR peuvent causer une augmentation du niveau d'homocystéine dans l'organisme. Ces mutations sont reliées à de nombreux types de cancer [170]. Il serait également important de se pencher sur le niveau de méthylation des gènes dont l'expression est augmentée lors de l'infection par le VIH-1. Dans le cancer, le niveau de folate pourrait avoir des effets sur la méthylation de l'ADN en favorisant l'hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs et l'hypométhylation d'oncogènes [171]. La méthylation a comme effet de diminuer l'expression génique par l'ajout de groupement méthyles sur l'ADN. Elle est réalisée par des ADN méthyle-transférases (DNMT). Lors de l'infection par le VIH-1, l'expression de la DNMT1 est augmentée. Son rôle est de maintenir la méthylation sur les deux brins d'ADN. Il se peut que l'augmentation de l'expression de cette enzyme ait un effet sur la transcription de certains gènes viraux lors de l'infection par le VIH-1.

Finalement, afin de valider cette hypothèse, une analyse des concentrations de folate et de glutamate autant intracellulaire qu'extracellulaire devra être faite. On sait que le folate est essentiel dans de nombreuses réactions biologiques, dont la formation de nucléotides et la méthylation. Le glutamate quant à lui est un important neurotransmetteur qui permet notamment de conserver le folate dans la cellule et d'augmenter l'affinité de celui-ci pour les enzymes. Leur niveau doit donc être évalué, car ils pourraient influencer la susceptibilité des MDM à l'infection par le VIH-1. Des analyses préliminaires avec des trousseaux colorimétriques ou par cytométrie n'ont pas permis de déterminer avec précision la concentration de ces métabolites dans les macrophages primaires. Il faudrait donc utiliser une approche plus sensible, par HPLC par exemple. L'évaluation du niveau de dNTP

intracellulaires et de l'effet de l'ajout de ceux-ci sur l'infection serait aussi de mise afin de comprendre le rôle du folate dans l'infection par le VIH-1.

5.3. À court terme, une diminution du niveau d'acide folique n'a pas d'effet significatif sur la réplication virale.

Contrairement à ce qui était attendu, la culture pendant 4 jours suivis de l'infection pendant 3 jours dans un milieu sans acide folique ne diminue pas significativement le nombre de cellules productivement infectées ainsi que le métabolisme cellulaire (figure 15). Le temps laissé dans le milieu sans acide folique n'est probablement pas assez long pour créer une déficience du métabolite affectant la réplication virale dans les cellules. De plus, une concentration inadéquate en acide folique pourrait avoir comme effet de diminuer la méthylation de l'ADN et mener à l'augmentation de l'expression génique. Il pourrait donc y avoir des effets adverses, ce qui explique qu'il n'y a pas de différence notable entre les deux milieux.

Afin d'avoir une meilleure idée de l'importance du folate dans le contexte de l'infection par le VIH-1, il serait donc important d'effectuer la culture sur une plus longue période de temps afin d'obtenir une cinétique de production virale. De plus, l'utilisation d'un appareil de type Seahorse (SeahorseBioscience, North Billerica, MA) pourrait être faite afin d'évaluer le profil et le potentiel métabolique des cellules en culture. Les données recueillies serviraient à l'évaluation des différences métaboliques lors de la culture des MDM dans un milieu avec ou sans acide folique. Il serait également intéressant de différencier les macrophages dans du milieu sans acide folique dès le départ afin de minimiser l'apport en acide folique des macrophages. Cela risquerait par contre de causer des problèmes de différenciation aux cellules étant en manque d'acide folique et ainsi affecter le phénotype de celles-ci.

5.4. Le MTX n'affecterait pas la susceptibilité des MDM à l'infection

Le MTX est un antifolate non spécifique inhibant principalement la DHFR. Il est utilisé dans un bon nombre de maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde ainsi que dans certains types de cancer. Il a donc été utilisé dans le contexte cette étude, car il cible une

enzyme clé dans le métabolisme du folate. Le choix des concentrations a été basé sur un article évaluant l'effet du MTX sur les macrophages [172]. Dans celui-ci, l'expression génique des macrophages pro-inflammatoires (polarisés GM-CSF) est comparée avec celle des macrophages anti-inflammatoires (polarisés M-CSF) à la suite de l'utilisation de l'agent chimique. Aux concentrations utilisées, il n'y a pas d'effet sur la réplication du virus malgré la diminution de l'activité métabolique (figure 16). Cela est compatible avec les résultats de l'article qui montre un effet du MTX dans les macrophages pro-inflammatoires, mais aucun dans les macrophages anti-inflammatoires. De plus, le MTX cible également la TYMS et altère le transport des formes réduites de folate en inhibant plusieurs autres enzymes. Il se peut donc que cette faible spécificité force la régénération du THF par la voie de MTHFR et que cela soit suffisant pour maintenir une concentration du métabolite adéquate pour le virus. De plus, ces données viennent confirmer les résultats obtenus avec l'utilisation de siDHFR où une faible diminution du nombre de cellules productivement infectées a été remarquée (figure 13 D).

Afin d'améliorer l'expérience, il faudrait utiliser un inhibiteur de la DHFR différent comme le Triméthexate afin de voir si celui-ci peut avoir un effet sur la réplication virale. Cet antimétabolite est utilisé dans le traitement des pneumonies à *Pneumocystis carinii* chez les patients atteints de SIDA [173]. Il faudrait également s'assurer de la viabilité cellulaire avec l'aide d'un marqueur qui n'est pas basé sur l'activité métabolique ce qui induirait moins de biais dans l'interprétation des résultats. Par exemple, il serait possible d'utiliser un colorant de viabilité qui marque la membrane cellulaire dont l'intégrité a été compromise. Il serait également possible d'utiliser un marqueur de mort cellulaire comme l'annexine V. Finalement, il serait intéressant de vérifier l'effet du MTX sur des macrophages différenciés avec du GM-CSF. La différenciation avec le GM-CSF pousse les cellules vers un phénotype de type inflammatoire ce qui réduit la capacité des MDM à être infectés par le VIH-1 [174]. Il est donc possible que l'action anti-inflammatoire du MTX augmente la susceptibilité de ces MDM à l'infection par le virus.

5.5. Le RTX diminue le nombre de cellules productivement infectées

Le RTX est un médicament utilisé pour l'inhibition spécifique de la TYMS. Contrairement au MTX, il n'inhiberait que cette enzyme. La TYMS produit du dTMP à la suite de la méthylation du dUMP. Le dTMP produit sera ensuite phosphorylé en dTTP par la Thymidylate Kinase (TK) pour être incorporé dans l'ADN sous forme de thymidine. Comme les données concernant cet agent chimique sur les macrophages sont pratiquement inexistantes, les doses de RTX utilisées ont été initialement basées sur les doses de MTX utilisées. À la suite de l'incubation conjointe du virus et du RTX, une diminution de manière dose dépendante du nombre des MDM productivement infectés est constatée (figure 17 A). De plus, cela n'affecte pas la viabilité et l'activité métabolique. Curieusement, l'intensité moyenne de fluorescence de la protéine HSA (MFI) des cellules productivement infectées est plus élevée chez celles qui ont été traitées avec le RTX par rapport au contrôle non traité (figure 17 B). Cela signifie qu'il y aurait moins de MDM productivement infectés, mais que ces derniers ont une transcription virale plus soutenue. La cause de cette augmentation n'est pas bien comprise, mais il est possible que le RTX affecte le ratio dUTP/dTTP dans la cellule en favorisant la production de dUTP au détriment de dTTP.

Comme la RT du VIH-1 a une faible spécificité, elle discerne difficilement ces deux bases nucléées [175]. Dans les MDM, il y aurait environ 60 fois plus de dUTP que de dTTP, ce qui favoriserait grandement l'incorporation d'uracile dans l'ADN viral [175]. En présence de cette base nucléée dans l'ADN, plusieurs choses pourraient se produire. Tout d'abord, cela pourrait causer des mutations de transition ($G : C \rightarrow A : U$). [176, 177]. Avec la diminution importante de dTTP, la RT n'aurait pas d'autre choix que d'incorporer des dUTP ce qui augmenterait davantage la quantité de mutations dans l'ADN. Si celles-ci ne sont pas corrigées, il pourrait y avoir une dégradation rapide de l'ADN viral par les mécanismes de réparation cellulaires. Une enzyme importante dans la réparation de l'ADN est l'uracile DNA glycosylase 2 (UNG2). Retrouvée dans le noyau cette enzyme est responsable de corriger les ADN faiblement uracylés, et mène à la dégradation des ADN qui le sont fortement. Une dégradation de l'ADN pourrait donc mener à une diminution de l'intégration de celle-ci et ultimement à la diminution de l'expression protéique.

Cependant, cela n'explique pas l'augmentation de la MFI observée dans les cellules traitées et productivement infectées, car afin que la protéine HSA soit exprimée, il doit y avoir transcription des gènes viraux. Il se peut donc que l'ADN uracylé ne soit pas dégradé et qu'il y ait intégration dans le génome. Cette intégration pourrait cependant mener à la production de protéines non fonctionnelles empêchant la synthèse du virus, mais permettant l'expression de HSA à la surface des MDM. En inhibant la TYMS, il est également possible que le THF soit régénéré par la voie MTHFR, augmentant ainsi le niveau de méthylation de l'ADN. Cela pourrait donc affecter l'expression des gènes viraux.

5.6. Le RTX diminuerait la susceptibilité des MDM à l'infection par le VIH-1

Afin d'évaluer à quel moment le RTX agit et son effet au fil du temps, différentes concentrations ont été ajoutées à des MDM 3 jours avant ou 3 jours suivant l'infection par le virus. La durée de 3 jours a été sélectionnée, car c'est à ce moment où la diminution maximale du nombre de cellules productivement infectées a été remarquée (résultats non publiés). L'utilisation du RTX avant l'infection diminue la production de nouveaux virions de manière dose dépendante pour atteindre un maximum à 5 nM (figure 18 A). La dose inhibant 50% de la croissance cellulaire (IC_{50}) est située entre 1 et 8 nM [178]. Elle dépend de plusieurs facteurs dont le type cellulaire, les conditions de culture et la présence d'agoniste. Le RTX et le folate sont des ligands compétitifs de la TYMS. La concentration de chacun d'eux pourrait donc influencer l'efficacité de l'agent chimique. Il est également possible que les MDM exportent le RTX et que cela change la concentration cellulaire (et l' IC_{50} par le fait même). De plus, l'effet perdure dans le temps, car il n'y a pas d'augmentation de la production de nouveaux virions même après 15 jours suivants le traitement. En comparaison, lorsque l'on ajoute le RTX 3 jours après l'infection, aucun effet sur la production de nouveaux virions n'est remarqué (figure 18B). Ces résultats permettent donc de constater que l'utilisation du RTX avant l'infection diminue la susceptibilité des MDM au VIH-1. Cette diminution de susceptibilité pourrait ultimement empêcher le virus de se propager de manière adéquate à long terme. Cet effet pourrait également être attribuable à la longue demi-vie du RTX, qui est d'environ 8 jours.

Une limitation de cette technique est qu'il existe des variations entre les puits dans la quantité totale de cellules ou de virus présents. Cela dépend du schéma expérimental qui est utilisé et des conditions de culture. Néanmoins, les résultats sont probants sur l'efficacité du RTX lorsqu'il est administré avant l'infection. Il serait tout de même intéressant de compléter le milieu avec une dose constante de RTX afin de voir si la cinétique est différente lorsqu'il est ajouté avant l'infection et si un effet peut être observable lorsqu'ajouté après celle-ci.

5.7. Le RTX n'affecterait pas l'intégration virale dans les MDM

L'une des hypothèses entourant le mécanisme d'action du RTX est qu'il agirait sur l'intégration virale. À la suite de l'analyse de la quantité d'ADN intégré par PCR quantitative, il semble que le RTX n'a pas d'effet significatif sur l'intégration virale dans les MDM aux doses utilisées (figure 19). Malgré une diminution de la production de p24 importante à la suite d'un traitement avec une dose de 5 nM de RTX, la quantité d'ADN intégré ne semble pas être affectée de la même manière. Des travaux réalisés par Weil et *al* suggèrent un mécanisme qui implique la diminution de la quantité d'ADN intégré lorsque les cellules sont traitées avec du RTX pendant 6 h avant l'infection [179]. Ces travaux réalisés avec la lignée cellulaire HT29 montrent que l'étape de transcription inverse est retardée par une grande quantité de dUTP dans la cellule. Après 24 h, l'ADN dans les étapes tardives de la transcription inverse revient cependant au même niveau qu'une cellule normale. La faible spécificité de la RT du VIH-1 entre les dUTPs et les dTTPs est ce qui mènerait à l'incorporation de dUTPs dans l'ADN viral. Ces travaux montrent aussi une diminution de l'ADN intégré en fonction de la dose de RTX utilisée et que cet ADN n'est pas uracylé. Une grande partie de l'efficacité de ce mécanisme de défense antiviral serait due à une grande expression d'UNG2 et à une concentration élevée de dUTP. Les ADN non dégradés par ce mécanisme seraient intégrés dans le génome ce qui mènerait à diminution de la transcription virale qui est inversement proportionnelle à la quantité de RTX utilisée. Or, dans les MDM, il n'y pas une grande activité d'UNG2 et c'est peut-être pourquoi il n'y aurait pas d'effet direct sur l'intégration virale dans ces cellules. Le mécanisme d'action dans les MDM ne semble donc pas affecter cette étape du cycle viral.

Le RTX pourrait donc agir avant ou après l'intégration. Des travaux de Klarmann et *al* montrent que l'incorporation d'uracile dans le brin antisens (-) de l'ADN viral ralentit la formation du brin sens (+) [180]. Le niveau de dUTP pourrait donc affecter le cycle de réplication viral dans les premières étapes en diminuant la spécificité de la RT lors de la synthèse du brin sens. Cependant, tel que montré dans les travaux de Weil et *al*, le niveau d'ADN dans les étapes tardives de la RT revient à un niveau normal après 24 heures. Étant donné la faible expression d'UNG2 dans les MDM, il est possible que l'incorporation d'uracile dans l'ADN soit corrigée par la dUTP diphosphatase (dUTPase) chez ces cellules. Cette enzyme est responsable de transformer les dUTP en dUMP, qui seront ensuite méthylés par la TYMS pour former du dTMP. Cependant, si l'activité de la TYMS est affectée par le RTX, cette réaction ne peut se produire et cela ne changerait pas la concentration intracellulaire de dUMP. Une autre possibilité est qu'il y ait synthèse de l'ADN puis une intégration dans le génome de la cellule hôte, même en présence d'uracile. Ce ne serait qu'à l'étape de la transcription, à la suite de l'intégration, que des mutations dans les promoteurs (LTR) ou dans des éléments importants de l'ADN pourraient créer des protéines non fonctionnelles et mener à la diminution du nombre de cellules productivement infectées. Des PCR ciblant l'ARN de la protéine virale Tat devront être faites afin d'évaluer la quantité d'ARNm transcrit dans les étapes post-intégration.

Plusieurs causes pourraient expliquer les différences entre nos résultats et le modèle proposé par Weil et *al*. La première est la concentration de RTX utilisée. En effet, la concentration choisie dans cette expérience est 3 fois plus faible que celle utilisée dans cet article. La diminution de la production de nouveaux virions (p24) ne corrèle donc pas avec la diminution de l'ADN intégré. Il faudrait refaire les expériences, mais en utilisant des concentrations plus élevées afin de voir si un effet peut être observable. De plus, ces travaux ont été réalisés principalement sur une lignée cellulaire sélectionnée pour leur forte expression de l'enzyme UNG2 et d'une concentration élevée de dUTP (HT29). Ces résultats sont donc très spécifiques au type cellulaire utilisé, et pourraient ne pas être reproductibles, car il est possible que le faible niveau d'expression d'UNG2 ait une influence sur la sensibilité du RTX dans les MDM. Afin de valider cette hypothèse, il serait intéressant d'exprimer l'UNG2 dans les cellules 293T lors de la production virale. Cela permettra de créer un clone

moléculaire infectieux exprimant cette protéine et d'évaluer l'effet de son expression sur la susceptibilité des MDM à l'infection.

En définitive, les travaux réalisés montrent que le cycle du folate est le théâtre de nombreuses interactions réciproques avec le VIH-1 à la suite d'une infection productive dans les MDM. Bien sûr, ces travaux ont une portée limitée, car ils ont été réalisés sur un seul type cellulaire différencié de la même façon et avec une seule souche virale. Il serait donc important de faire des études sur d'autres types cellulaires, comme les $lyT\ CD4^+$. Étant donné que ces cellules sont prolifératives, il est fort probable que les résultats soient différents. Il est possible que la toxicité soit plus grande dans ces cellules et la dose d'inhibiteur à utiliser devra être ajustée en conséquence. Il y a également une grande variabilité entre les donneurs, ce qui les rend plus ou moins susceptibles à l'infection par le VIH-1. Chacun d'eux possède un système immunitaire distinct ainsi qu'une résistance différente aux microorganismes et aux agents chimiques. Finalement, les différents siRNA utilisés n'ont pas toute la même activité étant donné que leur spécificité peut être différente. Comme beaucoup d'enzymes étudiées ne possèdent pas d'inhibiteur spécifique, cela restera un inconvénient important dans la poursuite de ces travaux.

Chapitre 6 : Conclusion et perspectives

Le projet avait pour but initial d'évaluer l'effet de la modulation de l'expression de la GGH sur la réplication du VIH-1 chez les macrophages primaires humains. L'expression de ce gène est augmentée tôt à la suite d'une infection productive pour revenir à un niveau basal 6 jours plus tard. La GGH n'a aucun lien connu avec le VIH-1 et très peu de recherches sont faites à son sujet. De plus, les macrophages sont potentiellement l'un des plus grands réservoirs viraux du corps humain, d'où l'importance de bien comprendre le rôle de cette protéine dans ces cellules lors de l'infection par le VIH-1.

La diminution de l'expression de GGH augmente le nombre de cellules productivement infectées par le VIH-1 et la production de nouveaux virions. Des résultats similaires sont obtenus en mettant en sourdine FPGS et MTHFR, deux protéines essentielles impliquées dans le sentier métabolique du folate. Cet effet pourrait être attribuable à une augmentation du folate intracellulaire menant à une augmentation de la concentration de nucléotides. L'excitotoxicité causée par le glutamate pourrait également jouer un rôle dans la susceptibilité des macrophages à l'infection par le VIH-1. C'est pourquoi lors de cette dernière, il est supposé que le métabolisme du folate dans les MDM est affecté et favorise un export de folate de la cellule. Cela aurait pour effet de réduire la concentration de nucléotides et d'affecter principalement la transcription inverse du virus. Il est également possible que des modifications épigénétiques viennent affecter la transcription des gènes afin de réduire la capacité du virus à former des protéines fonctionnelles.

Des inhibiteurs chimiques ont également été utilisés pour empêcher l'activité de certaines autres enzymes. Le MTX, tout comme le siRNA spécifique à la DHFR, ne montre pas d'effet significatif sur l'infection. Cela pourrait être principalement dû au phénotype des macrophages utilisés lors de l'expérience. Il est également possible que la voie alternative empruntée par le folate lors de l'inhibition de la DHFR soit suffisante pour le virus afin qu'il accomplisse son cycle de réplication. Pour ce qui est du RTX, une diminution dose dépendante du nombre de cellules productivement infectées a été observée lorsque celui-ci est administré avant ou pendant l'infection. De plus, la MFI est augmentée dans les MDM traités et productivement infectés, laissant supposer une augmentation de la transcription virale dans ces cellules. À l'heure actuelle, le mécanisme d'action précis du RTX dans les

MDM n'est pas connu. Cependant, il est possible de croire que l'inhibition de la TYMS fait augmenter le niveau d'uracile dans l'ADN. Cet ADN hautement uracylé pourrait être dégradé avant l'intégration ou mener à la production de protéines non fonctionnelles à la suite de la transcription. Des études plus approfondies devront être faites à ce sujet.

Ce projet a permis de mettre en lumière une nouvelle voie métabolique pouvant jouer un rôle dans la susceptibilité des macrophages à l'infection par le VIH-1. Le sentier du folate est essentiel pour une multitude de réactions biologiques et il est déjà bien documenté que des modulations dans ce dernier peuvent affecter la cellule. Cependant, dans le contexte du VIH-1, les données disponibles sont limitées. Il est fort possible que ce sentier métabolique soit beaucoup plus important que l'on pense lors de l'infection. De plus, l'utilisation du RTX, un médicament anticancéreux, a montré une inhibition de la réplication virale sans affecter la viabilité et l'activité métabolique dans les MDM. Cet agent chimique pourrait donc être étudié davantage afin de comprendre son mode de fonctionnement lors de l'infection par le VIH-1 dans les MDM et ultimement dans d'autres types cellulaires. Bien que ces travaux soient très préliminaires, ils pourraient éventuellement paver la voie à l'élaboration d'une nouvelle stratégie thérapeutique contre le VIH-1. Bien entendu, un obstacle de taille reste les réservoirs viraux qui empêchent l'élimination complète du virus. Il faudra s'assurer que le RTX cible efficacement ces endroits anatomiques qui empêchent l'éradication complète du virus chez les individus infectés.

Finalement, ces travaux montrent que des similarités pourraient être présentes entre le VIH-1 et le cancer. L'expression de plusieurs des gènes étudiés dans le cadre de cette étude est modulée de façon similaire dans les cellules cancéreuses. De plus, de nombreux traitements qui sont utilisés actuellement lors de l'infection par le VIH-1 ont été développés initialement pour le traitement du cancer. Beaucoup de progrès ont été faits au cours des 40 dernières années afin d'améliorer la qualité de vie des patients atteints de ces pathologies. Des vaccins sont présentement à l'étude afin de traiter ces deux maladies. Il serait donc intéressant de les étudier conjointement afin d'établir des stratégies communes servant à leurs traitements et ultimement, à leur éradication chez les personnes affectées.

Chapitre 7 : Bibliographie

1. Centers for Disease, C., *Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1981. **30**(25): p. 305-8.
2. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
3. Popovic, M., et al., *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 497-500.
4. Marx, J.L., *A virus by any other name*. Science, 1985. **227**(4693): p. 1449-51.
5. *Global Health Sector Strategy on HIV 2016-2021 : Toward ending AIDS*. 2016, World Health Organisation: Genève.
6. Santé, O.m.d.l. *Number of people (all ages) living with HIV*. 2017 [cited 2018 29 mars]; Available from: http://www.who.int/gho/hiv/epidemic_status/cases_all/en/.
7. Faria, N.R., et al., *HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations*. Science, 2014. **346**(6205): p. 56-61.
8. Worobey, M., et al., *Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960*. Nature, 2008. **455**(7213): p. 661-4.
9. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 436-41.
10. Worobey, M., et al., *1970s and 'Patient 0' HIV-1 genomes illuminate early HIV/AIDS history in North America*. Nature, 2016. **539**(7627): p. 98-101.
11. Wain-Hobson, S., et al., *Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV*. Cell, 1985. **40**(1): p. 9-17.
12. Stoye, J.P., et al., *ICTV 9th Report*. 2011, International Committee on Taxonomy of Viruses.
13. Frankel, A.D. and J.A. Young, *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 1-25.
14. Shah, S., et al., *Functional properties of the HIV-1 long terminal repeat containing single-nucleotide polymorphisms in Sp site III and CCAAT/enhancer binding protein site I*. Virol J, 2014. **11**: p. 92.
15. Liu, J., et al., *Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 109-13.
16. Freed, E.O., *HIV-1 assembly, release and maturation*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(8): p. 484-96.
17. Fiorentini, S., et al., *Functions of the HIV-1 matrix protein p17*. New Microbiol, 2006. **29**(1): p. 1-10.
18. Muriaux, D. and J.L. Darlix, *Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly*. RNA Biol, 2010. **7**(6): p. 744-53.
19. Ganser-Pornillos, B.K., M. Yeager, and O. Pornillos, *Assembly and architecture of HIV*. Adv Exp Med Biol, 2012. **726**: p. 441-65.
20. Steckbeck, J.D., A.S. Kuhlmann, and R.C. Montelaro, *C-terminal tail of human immunodeficiency virus gp41: functionally rich and structurally enigmatic*. J Gen Virol, 2013. **94**(Pt 1): p. 1-19.
21. Swanson, C.M. and M.H. Malim, *SnapShot: HIV-1 proteins*. Cell, 2008. **133**(4): p. 742, 742 e1.
22. Dalgleish, A.G., et al., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 763-7.

23. Kazazi, F., et al., *Variations in CD4 expression by human monocytes and macrophages and their relationships to infection with the human immunodeficiency virus*. J Gen Virol, 1989. **70 (Pt 10)**: p. 2661-72.
24. Starcich, B.R., et al., *Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS*. Cell, 1986. **45(5)**: p. 637-48.
25. Kwong, P.D., et al., *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. Nature, 1998. **393(6686)**: p. 648-59.
26. Hartley, O., et al., *V3: HIV's switch-hitter*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2005. **21(2)**: p. 171-89.
27. Zaitseva, M., et al., *Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection*. Nat Med, 1997. **3(12)**: p. 1369-75.
28. Lee, B., et al., *Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96(9)**: p. 5215-20.
29. Bleul, C.C., et al., *The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94(5)**: p. 1925-30.
30. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 657-700.
31. Vicenzi, E., P. Lio, and G. Poli, *The puzzling role of CXCR4 in human immunodeficiency virus infection*. Theranostics, 2013. **3(1)**: p. 18-25.
32. Rosen, O., et al., *Molecular switch for alternative conformations of the HIV-1 V3 region: implications for phenotype conversion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103(38)**: p. 13950-5.
33. Melikyan, G.B., et al., *Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion*. J Cell Biol, 2000. **151(2)**: p. 413-23.
34. Forshey, B.M., et al., *Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication*. J Virol, 2002. **76(11)**: p. 5667-77.
35. Veronese, F.D., et al., *Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24*. J Virol, 1988. **62(3)**: p. 795-801.
36. Gamble, T.R., et al., *Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid*. Cell, 1996. **87(7)**: p. 1285-94.
37. Thali, M., et al., *Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions*. Nature, 1994. **372(6504)**: p. 363-5.
38. Bukrinskaya, A., et al., *Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton*. J Exp Med, 1998. **188(11)**: p. 2113-25.
39. Kohlstaedt, L.A., et al., *Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor*. Science, 1992. **256(5065)**: p. 1783-90.
40. Miller, M.D., C.M. Farnet, and F.D. Bushman, *Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition*. J Virol, 1997. **71(7)**: p. 5382-90.
41. Farnet, C.M. and F.D. Bushman, *HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro*. Cell, 1997. **88(4)**: p. 483-92.
42. Lin, C.W. and A. Engelman, *The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes*. J Virol, 2003. **77(8)**: p. 5030-6.
43. Vandegraaff, N., et al., *Biochemical and genetic analyses of integrase-interacting proteins lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)/p75 and hepatoma-derived growth factor*

- related protein 2 (HRP2) in preintegration complex function and HIV-1 replication.* Virology, 2006. **346**(2): p. 415-26.
44. Sherman, M.P. and W.C. Greene, *Slipping through the door: HIV entry into the nucleus.* Microbes Infect, 2002. **4**(1): p. 67-73.
 45. Sloan, R.D. and M.A. Wainberg, *The role of unintegrated DNA in HIV infection.* Retrovirology, 2011. **8**: p. 52.
 46. Wu, Y. and J.W. Marsh, *Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA.* Science, 2001. **293**(5534): p. 1503-6.
 47. Wei, P., et al., *A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA.* Cell, 1998. **92**(4): p. 451-62.
 48. Kao, S.Y., et al., *Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product.* Nature, 1987. **330**(6147): p. 489-93.
 49. Price, D.H., *P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(8): p. 2629-34.
 50. Cullen, B.R., *Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways.* Virology, 1998. **249**(2): p. 203-10.
 51. Freed, E.O., *HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle.* Virology, 1998. **251**(1): p. 1-15.
 52. Wilk, T., et al., *Organization of immature human immunodeficiency virus type 1.* J Virol, 2001. **75**(2): p. 759-71.
 53. Campbell, S.M., S.M. Crowe, and J. Mak, *Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions.* J Clin Virol, 2001. **22**(3): p. 217-27.
 54. Cantin, R., S. Methot, and M.J. Tremblay, *Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses.* J Virol, 2005. **79**(11): p. 6577-87.
 55. Kohl, N.E., et al., *Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4686-90.
 56. Jarmuz, A., et al., *An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22.* Genomics, 2002. **79**(3): p. 285-96.
 57. Mariani, R., et al., *Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif.* Cell, 2003. **114**(1): p. 21-31.
 58. Bishop, K.N., et al., *Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins.* Curr Biol, 2004. **14**(15): p. 1392-6.
 59. Sheehy, A.M., N.C. Gaddis, and M.H. Malim, *The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif.* Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1404-7.
 60. Lahouassa, H., et al., *SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates.* Nat Immunol, 2012. **13**(3): p. 223-228.
 61. Goldstone, D.C., et al., *HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase.* Nature, 2011. **480**(7377): p. 379-82.
 62. Laguette, N., et al., *SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx.* Nature, 2011. **474**(7353): p. 654-7.
 63. Maelfait, J., et al., *Restriction by SAMHD1 Limits cGAS/STING-Dependent Innate and Adaptive Immune Responses to HIV-1.* Cell Rep, 2016. **16**(6): p. 1492-1501.
 64. Blasius, A.L., et al., *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, 2006. **177**(5): p. 3260-5.
 65. Neil, S.J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu.* Nature, 2008. **451**(7177): p. 425-30.

66. Rong, L., et al., *The transmembrane domain of BST-2 determines its sensitivity to down-modulation by human immunodeficiency virus type 1 Vpu*. J Virol, 2009. **83**(15): p. 7536-46.
67. Barre-Sinoussi, F., A.L. Ross, and J.F. Delfraissy, *Past, present and future: 30 years of HIV research*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(12): p. 877-83.
68. Prevention, U.S.C.f.D.C.a. *HIV Transmission*. 2018; Available from: <https://www.cdc.gov/hiv/basics/transmission.html>.
69. Patel, P., et al., *Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review*. AIDS, 2014. **28**(10): p. 1509-19.
70. Guernonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 621-67.
71. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells*. Cell, 2000. **100**(5): p. 587-97.
72. Brencley, J.M., et al., *CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 749-59.
73. Gasper-Smith, N., et al., *Induction of plasma (TRAIL), TNFR-2, Fas ligand, and plasma microparticles after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission: implications for HIV-1 vaccine design*. J Virol, 2008. **82**(15): p. 7700-10.
74. Zhang, J., X. Xu, and Y. Liu, *Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity*. Cell Mol Immunol, 2004. **1**(3): p. 186-92.
75. Connor, R.I., et al., *Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals*. J Exp Med, 1997. **185**(4): p. 621-8.
76. Services, U.S.D.o.H.a.H. *Opportunistic Infections*. 2017 [cited 2018 16 mars]; Available from: <https://www.cdc.gov/hiv/basics/livingwithhiv/opportunisticinfections.html>.
77. Cananda, A.d.l.s.p.d. *Virus de l'immunodéficience humaine - Guide pour le dépistage et le diagnostic de l'infection par le VIH*. 2014; Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/vih-sida/guide-depistage-diagnostic-infection-vih.html>.
78. Young, F.E., *The role of the FDA in the effort against AIDS*. Public Health Rep, 1988. **103**(3): p. 242-5.
79. Richman, D.D., *HIV chemotherapy*. Nature, 2001. **410**(6831): p. 995-1001.
80. Tantillo, C., et al., *Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance*. J Mol Biol, 1994. **243**(3): p. 369-87.
81. Sato, M., et al., *Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics*. J Med Chem, 2006. **49**(5): p. 1506-8.
82. Hare, S., et al., *Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer*. Nature, 2010. **464**(7286): p. 232-6.
83. Eron, J.J., Jr., *HIV-1 protease inhibitors*. Clin Infect Dis, 2000. **30 Suppl 2**: p. S160-70.
84. Services, U.S.d.o.H.a.H. *AIDSinfo : Clinical Guideline*. 2018 [cited 2018 28 février]; Available from: <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines>.
85. Eisele, E. and R.F. Siliciano, *Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication*. Immunity, 2012. **37**(3): p. 377-88.
86. Finzi, D., et al., *Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy*. Science, 1997. **278**(5341): p. 1295-300.
87. Calantone, N., et al., *Tissue myeloid cells in SIV-infected primates acquire viral DNA through phagocytosis of infected T cells*. Immunity, 2014. **41**(3): p. 493-502.
88. Sattentau, Q.J. and M. Stevenson, *Macrophages and HIV-1: An Unhealthy Constellation*. Cell Host Microbe, 2016. **19**(3): p. 304-10.
89. Arainga, M., et al., *A mature macrophage is a principal HIV-1 cellular reservoir in humanized mice after treatment with long acting antiretroviral therapy*. Retrovirology, 2017. **14**(1): p. 17.

90. Cory, T.J., et al., *Overcoming pharmacologic sanctuaries*. *Curr Opin HIV AIDS*, 2013. **8**(3): p. 190-5.
91. Stein, J., M. Storcksdieck Genannt Bonsmann, and H. Streeck, *Barriers to HIV Cure*. *HLA*, 2016. **88**(4): p. 155-63.
92. van Furth, R., et al., [*Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line*]. *Bull World Health Organ*, 1972. **47**(5): p. 651-8.
93. van Furth, R. and Z.A. Cohn, *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. *J Exp Med*, 1968. **128**(3): p. 415-35.
94. McGrath, K.E., et al., *Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo*. *Blood*, 2003. **101**(5): p. 1669-76.
95. Alliot, F., I. Godin, and B. Pessac, *Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain*. *Brain Res Dev Brain Res*, 1999. **117**(2): p. 145-52.
96. Hoeffel, G., et al., *Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages*. *J Exp Med*, 2012. **209**(6): p. 1167-81.
97. Schulz, C., et al., *A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells*. *Science*, 2012. **336**(6077): p. 86-90.
98. Davies, L.C., et al., *A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation*. *Eur J Immunol*, 2011. **41**(8): p. 2155-64.
99. Hamilton, J.A., *Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(7): p. 533-44.
100. Lin, H., et al., *Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome*. *Science*, 2008. **320**(5877): p. 807-11.
101. Taylor, P.R., et al., *Macrophage receptors and immune recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 901-44.
102. Italiani, P. and D. Boraschi, *From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 514.
103. Wong, K.L., et al., *Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets*. *Blood*, 2011. **118**(5): p. e16-31.
104. Patel, A.A., et al., *The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation*. *J Exp Med*, 2017. **214**(7): p. 1913-1923.
105. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(11): p. 762-74.
106. Varol, C., A. Mildner, and S. Jung, *Macrophages: development and tissue specialization*. *Annu Rev Immunol*, 2015. **33**: p. 643-75.
107. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm*. *J Immunol*, 2000. **164**(12): p. 6166-73.
108. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(12): p. 953-64.
109. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. *F1000Prime Rep*, 2014. **6**: p. 13.
110. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 453-61.
111. Jones, C.V. and S.D. Ricardo, *Macrophages and CSF-1: implications for development and beyond*. *Organogenesis*, 2013. **9**(4): p. 249-60.
112. Li, Q., et al., *Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission*. *Nature*, 2009. **458**(7241): p. 1034-8.
113. Smith, P.D., et al., *Intestinal macrophages and response to microbial encroachment*. *Mucosal Immunol*, 2011. **4**(1): p. 31-42.

114. Cassol, E., et al., *CD14(+) macrophages that accumulate in the colon of African AIDS patients express pro-inflammatory cytokines and are responsive to lipopolysaccharide*. BMC Infect Dis, 2015. **15**: p. 430.
115. Crowe, S.M., et al., *The macrophage: the intersection between HIV infection and atherosclerosis*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(4): p. 589-98.
116. Lindoso, J.A., et al., *Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges*. HIV AIDS (Auckl), 2016. **8**: p. 147-156.
117. Bailey, L.B. and J.F. Gregory, 3rd, *Folate metabolism and requirements*. J Nutr, 1999. **129**(4): p. 779-82.
118. Birn, H., *The kidney in vitamin B12 and folate homeostasis: characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(1): p. F22-36.
119. (NIH), O.o.D.S.-N.I.o.H. *Folate : Dietary Supplement Fact Sheet*. 2016 [cited 2017 23 octobre]; Available from: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Folate-HealthProfessional/>.
120. Canada, G.d. *Acide folique, fer et grossesse*. 2016 [cited 2017 23 octobre]; Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/grossesse/acide-folique-fer-et-grossesse.html>.
121. Naimi, A.I. and N. Auger, *Population-wide folic acid fortification and preterm birth: testing the folate depletion hypothesis*. Am J Public Health, 2015. **105**(4): p. 793-5.
122. Canada, G.d., *Lignes directrices sur la nutrition pendant la grossesse à l'intention des professionnels de la santé*, S. Canada, Editor. 2009: Canada. p. 12.
123. Shane, B., *Folylpolyglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism*. Vitam Horm, 1989. **45**: p. 263-335.
124. Fox, J.T. and P.J. Stover, *Folate-mediated one-carbon metabolism*. Vitam Horm, 2008. **79**: p. 1-44.
125. Strickland, K.C., N.I. Krupenko, and S.A. Krupenko, *Molecular mechanisms underlying the potentially adverse effects of folate*. Clin Chem Lab Med, 2013. **51**(3): p. 607-16.
126. Pietrzik, K., L. Bailey, and B. Shane, *Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate: comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Clin Pharmacokinet, 2010. **49**(8): p. 535-48.
127. Raz, S., M. Stark, and Y.G. Assaraf, *Folylpoly-gamma-glutamate synthetase: A key determinant of folate homeostasis and antifolate resistance in cancer*. Drug Resist Updat, 2016. **28**: p. 43-64.
128. Chang, S.S., *Overview of prostate-specific membrane antigen*. Rev Urol, 2004. **6 Suppl 10**: p. S13-8.
129. Sacha, P., et al., *Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain*. Neuroscience, 2007. **144**(4): p. 1361-72.
130. Qiu, A., et al., *Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption*. Cell, 2006. **127**(5): p. 917-28.
131. Goldman, I.D., *The characteristics of the membrane transport of amethopterin and the naturally occurring folates*. Ann N Y Acad Sci, 1971. **186**: p. 400-22.
132. Kamen, B.A., et al., *Delivery of folates to the cytoplasm of MA104 cells is mediated by a surface membrane receptor that recycles*. J Biol Chem, 1988. **263**(27): p. 13602-9.
133. Shen, J., et al., *Folate receptor-beta constitutes a marker for human proinflammatory monocytes*. J Leukoc Biol, 2014. **96**(4): p. 563-70.
134. Sun, X., et al., *Structural homologies with ATP- and folate-binding enzymes in the crystal structure of folylpolyglutamate synthetase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6647-52.
135. Whitehead, V.M., *Polygamma-glutamyl metabolites of folic acid in human liver*. Lancet, 1973. **1**(7806): p. 743-5.

136. Lin, B.F., R.F. Huang, and B. Shane, *Regulation of folate and one-carbon metabolism in mammalian cells. III. Role of mitochondrial folylpoly-gamma-glutamate synthetase*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21674-9.
137. Yao, R., et al., *Human gamma-glutamyl hydrolase: cloning and characterization of the enzyme expressed in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10134-8.
138. Schneider, E. and T.J. Ryan, *Gamma-glutamyl hydrolase and drug resistance*. Clin Chim Acta, 2006. **374**(1-2): p. 25-32.
139. Assaraf, Y.G., *Molecular basis of antifolate resistance*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(1): p. 153-81.
140. Lemos, C., et al., *Cellular folate status modulates the expression of BCRP and MRP multidrug transporters in cancer cell lines from different origins*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(3): p. 655-64.
141. Nakanishi, T. and D.D. Ross, *Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression*. Chin J Cancer, 2012. **31**(2): p. 73-99.
142. Gonen, N. and Y.G. Assaraf, *Antifolates in cancer therapy: structure, activity and mechanisms of drug resistance*. Drug Resist Updat, 2012. **15**(4): p. 183-210.
143. Li, M.C., R. Hertz, and D.M. Bergenstal, *Therapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors with folic acid and purine antagonists*. N Engl J Med, 1958. **259**(2): p. 66-74.
144. Canada, P., *Methotrexate : Monographie de produit*. 2011: Kirkland, Qc. p. 52.
145. Tsurusawa, M., et al., *Methotrexate cytotoxicity as related to irreversible S phase arrest in mouse L1210 leukemia cells*. Jpn J Cancer Res, 1990. **81**(1): p. 85-90.
146. Brown, P.M., A.G. Pratt, and J.D. Isaacs, *Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers*. Nat Rev Rheumatol, 2016. **12**(12): p. 731-742.
147. Smith, I., et al., *A phase II study in advanced breast cancer: ZD1694 ('Tomudex') a novel direct and specific thymidylate synthase inhibitor*. Br J Cancer, 1996. **74**(3): p. 479-81.
148. Eatock, M.M., et al., *A dose-finding study of raltitrexed (tomudex) with cisplatin and epirubicin in advanced gastro-oesophageal adenocarcinoma*. Br J Cancer, 2000. **82**(12): p. 1925-31.
149. Fizazi, K., et al., *Combination of raltitrexed and oxaliplatin is an active regimen in malignant mesothelioma: results of a phase II study*. J Clin Oncol, 2003. **21**(2): p. 349-54.
150. Clarke, S.J., P.J. Beale, and L.P. Rivory, *Clinical and preclinical pharmacokinetics of raltitrexed*. Clin Pharmacokinet, 2000. **39**(6): p. 429-43.
151. Deshiere, A., et al., *Global Mapping of the Macrophage-HIV-1 Transcriptome Reveals that Productive Infection Induces Remodeling of Host Cell DNA and Chromatin*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 5238.
152. Imbeault, M., et al., *Efficient magnetic bead-based separation of HIV-1-infected cells using an improved reporter virus system reveals that p53 up-regulation occurs exclusively in the virus-expressing cell population*. Virology, 2009. **393**(1): p. 160-7.
153. Sadahiro, S., et al., *Gene expression levels of gamma-glutamyl hydrolase in tumor tissues may be a useful biomarker for the proper use of S-1 and tegafur-uracil/leucovorin in preoperative chemoradiotherapy for patients with rectal cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2017. **79**(6): p. 1077-1085.
154. Ferrarese, C., et al., *Increased glutamate in CSF and plasma of patients with HIV dementia*. Neurology, 2001. **57**(4): p. 671-5.
155. Vazquez-Santiago, F.J., et al., *Glutamate metabolism and HIV-associated neurocognitive disorders*. J Neurovirol, 2014. **20**(4): p. 315-31.
156. Datta, P.K., et al., *Glutamate metabolism in HIV-1 infected macrophages: Role of HIV-1 Vpr*. Cell Cycle, 2016. **15**(17): p. 2288-98.

157. Diamond, T.L., et al., *Macrophage tropism of HIV-1 depends on efficient cellular dNTP utilization by reverse transcriptase*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 51545-53.
158. Wilson, A.S., B.E. Power, and P.L. Molloy, *DNA hypomethylation and human diseases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1775**(1): p. 138-62.
159. Khanna, S., et al., *Homocysteine in neurological disease: a marker or a cause?* CNS Neurol Disord Drug Targets, 2011. **10**(3): p. 361-9.
160. Scott, J.M., *Homocysteine and cardiovascular risk*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(2): p. 333-4.
161. Plazar, N. and M. Jurdana, *Hyperhomocysteinemia and the role of B vitamins in cancer*. Radiol Oncol, 2010. **44**(2): p. 79-85.
162. Lee, T.Y., et al., *Lower serum folate is associated with development and invasiveness of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(32): p. 11313-20.
163. Chittiboyina, S., et al., *The role of the folate pathway in pancreatic cancer risk*. PLoS One, 2018. **13**(2): p. e0193298.
164. McGuire, J.J., *Anticancer antifolates: current status and future directions*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(31): p. 2593-613.
165. Ross, D.D., et al., *Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia*. Blood, 2000. **96**(1): p. 365-8.
166. Li, Y., et al., *Methylation level of CpG islands in GGH gene promoter in pediatric acute leukemia*. PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0173472.
167. Turner, J.G., et al., *ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3881-9.
168. Kim, S.E., et al., *gamma-Glutamyl hydrolase modulation and folate influence chemosensitivity of cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate*. Br J Cancer, 2013. **109**(8): p. 2175-88.
169. Ifergan, I., et al., *Folate deprivation results in the loss of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) expression. A role for BCRP in cellular folate homeostasis*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25527-34.
170. Wang, P., et al., *Association of MTRR A66G polymorphism with cancer susceptibility: Evidence from 85 studies*. J Cancer, 2017. **8**(2): p. 266-277.
171. Duthie, S.J., *Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis*. J Inherit Metab Dis, 2011. **34**(1): p. 101-9.
172. Municio, C., et al., *Methotrexate selectively targets human proinflammatory macrophages through a thymidylate synthase/p53 axis*. Ann Rheum Dis, 2016. **75**(12): p. 2157-2165.
173. Koda, R.T., et al., *Pharmacokinetics of trimetrexate and dapsone in AIDS patients with Pneumocystis carinii pneumonia*. J Clin Pharmacol, 1999. **39**(3): p. 268-74.
174. Kedzierska, K., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inhibits HIV-1 replication in monocyte-derived macrophages*. AIDS, 2000. **14**(12): p. 1739-48.
175. Kennedy, E.M., et al., *Abundant non-canonical dUTP found in primary human macrophages drives its frequent incorporation by HIV-1 reverse transcriptase*. J Biol Chem, 2011. **286**(28): p. 25047-55.
176. Voet, D. and J. Voet, G., *Biochemistry*. 1990, Canada: John Wiley & Sons.
177. Pearl, L.H., *Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily*. Mutat Res, 2000. **460**(3-4): p. 165-81.
178. Canada, P., *Tomudex (Raltitrexed) Product Monograph*. 2017: Kirkland, Qc. p. 23.
179. Weil, A.F., et al., *Uracil DNA glycosylase initiates degradation of HIV-1 cDNA containing misincorporated dUTP and prevents viral integration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(6): p. E448-57.
180. Klarmann, G.J., et al., *Incorporation of uracil into minus strand DNA affects the specificity of plus strand synthesis initiation during lentiviral reverse transcription*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 7902-9.