

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Rôle de l'autophagie dans la dissémination du VIH-1 par les cellules dendritiques dérivées des monocytes circulants

par
Tévy-Suzy Tep

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en microbiologie et immunologie

Montréal, le 7 octobre 2015

© Tévy-Suzy Tep, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé

**Rôle de l'autophagie dans la dissémination du VIH-1 par les cellules
dendritiques dérivées des monocytes circulants**

présenté par

Tévy-Suzy Tep

A été évalué par un jury composé des professeurs suivants :

Dr. Jacques Thibodeau, Université de Montréal

Président du jury

Dr. Caroline Gilbert, Université Laval

Membre du jury

Dr. Petronela Ancuta, Université de Montréal

Directrice de recherche

Résumé

Les cellules myéloïdes incluant les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (DCs, *dendritic cells*) contribuent à la pathogénèse de l'infection à VIH-1 en participant à la dissémination du virus, mais également en représentant des réservoirs viraux potentiels. Leurs fonctions sont exploitées par le VIH-1 afin d'assurer sa propagation à travers l'organisme. Notamment, une infection à VIH-1 est associée à une altération de la présentation antigénique et la perte de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques à des antigènes. L'autophagie est un processus catabolique universel impliqué dans la régulation de la présentation antigénique subséquente à la neutralisation/destruction du pathogène. Des études récentes suggèrent que le VIH-1 altère le mécanisme d'autophagie afin d'assurer sa survie.

Le premier volet de ce projet de maîtrise a visé la caractérisation des effets du VIH-1 sur l'autophagie dans les DCs dérivées de monocytes circulants (MDDC, *monocyte-derived dendritic cells*) et l'identification des stratégies thérapeutiques pour contrecarrer ces effets. Les objectifs spécifiques ont été de : (i) caractériser l'expression de marqueurs de maturation sur des MDDC exposées au VIH-1 *in vitro*, (ii) quantifier l'expression des protéines liées à la régulation positive (*i.e.*, ATG5, LC3, p62) et négative (*i.e.*, mTOR) de l'autophagie dans les MDDC exposées au VIH, (iii) déterminer le rôle de l'autophagie dans la *trans* infection du VIH aux lymphocytes T CD4⁺ et (iv) explorer l'impact de l'autophagie sur la présentation antigénique par les MDDC infectées à VIH-1 *in vitro*.

Nos résultats démontrent qu'une exposition des MDDC au VIH-1 *in vitro* altère dramatiquement leur maturation et leur habileté à induire la prolifération des cellules T autologues en réponse à *Staphylococcus aureus* et *Cytomegalovirus (CMV)* mais pas la réponse induite par *Staphylococcal enterotoxin B (SEB)*. Nous démontrons que l'exposition des MDDC au VIH s'associe à une augmentation de l'expression de la protéine mTOR totale et de sa forme phosphorylée (phospho-mTOR) et de la protéine p62. Le traitement des MDDC à la rapamycine diminue l'expression de mTOR et réduit la capacité de *trans* infection du VIH-1 par les MDDC, sans toutefois restaurer leur potentiel immunogène. En effet, nous

observons que la rapamycine réduit l'expression de CD83 par les MDDC et augmente l'expression de CCR7, indiquant ainsi que l'effet immunosuppresseur documenté de la rapamycine est associé à une défaillance de maturation des MDDC.

Le second volet de ce projet de recherche s'est intéressé à la contribution des cellules myéloïdes à la persistance virale chez les sujets infectés par le VIH-1 sous thérapie antirétrovirale. Les objectifs spécifiques ont été : (i) d'évaluer la présence de différentes formes d'ADN viral dans les monocytes circulants de patients infectés par le VIH-1 et (ii) de mesurer l'intégration et la réplication virale dans des macrophages dérivés de monocytes (MDM) de patients infectés sous ART. Nos résultats indiquent que les monocytes portent des formes précoces de transcription virale inverse (ADN du VIH RU5) et que, malgré une charge virale plasmatique indétectable sous ART, les MDM supportent la réplication virale. Ces données très préliminaires apportent des évidences en faveur de la contribution des cellules myéloïdes à la persistance virale sous ART et représentent une ouverture pour un projet de recherche plus complexe dans le futur.

En somme, nos résultats démontrent que le VIH-1 altère le potentiel immunogène des MDDC et que la rapamycine peut être employée pour limiter la *trans* infection des lymphocytes T CD4+ par les MDDC. Néanmoins, l'incapacité de la rapamycine à rétablir le potentiel immunogène des MDDC incite à identifier de nouvelles stratégies manipulant l'autophagie pour une restauration optimale de la compétence immunitaire chez les sujets infectés à VIH-1. Les cellules myéloïdes jouent un rôle primordial dans la dissémination et la persistance virale et doivent donc être ciblées par les stratégies actuelles d'éradication des réservoirs du VIH sous ART.

Mots-clés : Autophagie, rapamycine, *trans* infection, présentation antigénique, maturation, MDDC, monocyte, macrophage, cellules myéloïdes, VIH-1, ART

Abstract

Myeloid cells including monocytes, macrophages and dendritic cells (DC) contribute to HIV-1 pathogenesis by participating in viral dissemination but also by representing potential viral reservoirs. Myeloid cells functions are exploited by HIV in order for the virus to spread throughout the organism. Notably, HIV-1 infection is associated with alterations in antigen presentation and the loss of pathogen-specific CD4+ T-cells. Autophagy is a universal catabolic process involved in the regulation of antigen presentation subsequent to pathogen neutralization/destruction. Recent studies suggest that HIV inhibits autophagy in DC so that it survives within the host.

The goal of the main part of this master's research project was to characterize the effects of the HIV exposure on the autophagy process in monocytes-derived DC (MDDC) and to identify therapeutic strategies to counteract these effects. The specific aims were to : (i) measure the expression of maturation markers on MDDC exposed to HIV-1 *in vitro* (ii) quantify the expression of proteins that positively (*i.e.*, ATG5, LC3, p62) or negatively regulate autophagy (*i.e.*, mTOR), (iii) determine autophagy role in HIV-1 *trans infection* to CD4+ lymphocytes T and (iv) explore the impact of autophagy on antigen presentation by *in vitro* HIV-infected MDDC.

Our results demonstrated that exposure to HIV *in vitro* dramatically impaired MDDC maturation and their ability to induce proliferation of autologous CD4+ T-cells in response to *Staphylococcus aureus* and *Cytomegalovirus (CMV)* but not *Staphylococcal enterotoxin B (SEB)*. Exposition of MDDC to HIV-1 was associated with an increase of mTOR, phospho-mTOR and p62 expression. Treatment of MDDC with rapamycin decreased mTOR expression and altered MDDC *trans* infection ability although it failed to restore MDDC immunogenic potential. Indeed, rapamycin diminished CD83 expression on MDDC surface and increased CCR7 expression, indicating that the documented immunosuppressive property of this drug is associated with an impaired MDDC maturation.

The second part of this master's research project focused on the contribution of myeloid cells to HIV-1 reservoir persistence under ART. The objectives were to: (i) evaluate the presence of different forms of viral DNA in circulating monocytes from HIV-1 infected

subjects and (ii) determine the viral integration and replication in monocytes-derived macrophages (MDM) from infected individuals receiving viral suppressive ART. Our results show that monocytes harbor early products from viral transcription (RU5 HIV-DNA) and that MDM support viral replication. Together, these very preliminary findings bring evidences that monocytes contribute to viral persistence under ART.

Overall, our results indicate that HIV alters the immunogenic potential of DC and that rapamycin limits HIV *trans*-infection by DC. However, the fact that rapamycin fails to restore the immunogenic potential of DC stresses the need to identify additional strategies to manipulate the autophagy process for an optimal restoration of immune competence in HIV-infected subjects. Myeloid cells play a crucial role in HIV persistence and dissemination and thus must be aimed at when elaborating an antiviral therapy.

Keywords : Autophagy, rapamycin, *trans* infection, antigen presentation, maturation, HIV-1, MDDC, monocytes, macrophages, myeloid cells, ART

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Remerciements.....	xv
Introduction.....	16
1.1 VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1.....	16
1.1.1 Historique de la découverte du VIH-1.....	16
1.1.2 Caractéristiques générales.....	16
1.1.3 Cycle de réplication virale.....	21
1.1.4 Pathogénèse de l'infection à VIH-1.....	24
1.2 MONOCYTES.....	27
1.2.1 Sous-populations monocytaires.....	27
1.2.2 Mécanismes moléculaires de recrutement des monocytes dans les tissus.....	28
1.2.3 Fonctions pro-inflammatoire des monocytes.....	30
1.2.4 Contribution des monocytes à la pathogénèse de l'infection à VIH-1.....	30
1.3 CELLULES DENDRITIQUES.....	31
1.3.1 Historique de la découverte des DCs.....	31
1.3.2 Sous-populations de DC et distribution tissulaire.....	31
1.3.3 Rôle des DCs dans la présentation antigénique.....	32
1.3.4 Synapse immunologique (SI) entre les DCs et les cellules T CD4+ et CD8+.....	33
1.3.5 Facteur de restriction au VIH dans les DCs.....	35
1.3.6 Implication des DCs dans la pathogénèse de l'infection à VIH-1.....	37
1.3.7 Vaccins thérapeutiques à base de DC.....	38
1.4 AUTOPHAGIE.....	40
1.4.1 Le complexe protéique <i>mammalian Target of Rapamycin</i> (mTOR).....	41
1.4.2 Mécanisme moléculaire de l'autophagie.....	43

1.4.3. Rôle de mTOR dans le vieillissement.....	45
1.4.4 Rôle de l'autophagie dans l'immunité innée et adaptative	46
1.4.5 Rôle de l'autophagie dans les maladies auto-immunes	46
1.4.6 Rôle de l'autophagie dans la pathogénèse à VIH-1	47
1.4.7 La rapamycine, un inhibiteur de mTOR	48
2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	50
3. MATÉRIELS ET MÉTHODES	52
3.1 Obtention des leucaphérèses de sujets sains et infectés.....	52
3.2 Isolement des <i>PBMC</i> par gradient de Ficoll	52
3.3 Isolement de cellules par MACS	53
3.4 Génération des DCs et des macrophages <i>in vitro</i>	54
3.6 Immunobuvardage de type <i>Western</i> des protéines de l'autophagie.....	60
3.7 Test de présentation antigénique <i>via</i> les DCs	64
3.8 <i>Trans</i> infection du VIH-1 des cellules T CD4+ par les MDDC	65
3.8.1 Préparation de virus à partir de plasmides	65
3.9 Détection de protéines par ELISA	67
3.9.1 Quantification de cytokines	67
3.10 PCR en temps réel pour quantifier l'ADN intégré du VIH-1	68
4. RÉSULTATS.....	71
4.1 : Effet du VIH-1 sur les propriétés fonctionnelles des DCs <i>in vitro</i>	71
4.1.1 Obtention des DCs à partir des monocytes de sang périphérique.....	71
4.1.2 Effet du VIH-1 sur la capacité des DCs à présenter l'antigène	71
4.1.3 Effet du VIH-1 sur la maturation des MDDC.....	72
4.1.4 Modulation de l'autophagie par la rapamycine	73
4.1.5. Effet du VIH et du LPS sur l'autophagie.....	73
4.1.6 Effet des modulateurs de l'autophagie sur la capacité des DCs à <i>trans</i> infecter des cellules T activées.....	74
4.1.7 Effet des modulateurs de l'autophagie sur la capacité des DCs à <i>trans</i> infecter des cellules T dans le contexte de la présentation antigénique	76
4.1.8 Effet des modulateurs de l'autophagie sur la capacité des DCs à présenter l'antigène	76

4.1.9 Effet de la rapamycine sur le phénotype des MDDC	77
4.1.10 Effet de la rapamycine sur les récepteurs d'entrée et de fixation du VIH	78
4.2 Persistance du VIH-1 dans les cellules myéloïdes chez les sujets infectés par le VIH-1 sous thérapie antirétrovirale.....	78
5. Discussion, conclusions et perspectives	95
5.1 Sommaire des résultats	95
5.2 Étude de l'impact d'une infection <i>in vitro</i> à VIH-1 sur les fonctions des MDDC	98
5.2.1 Conséquence de l'infection à VIH-1 sur l'habileté à présenter l'antigène	98
5.2.2 Le VIH-1 échoue à induire la maturation des MDDC	99
5.3 Le VIH-1 module l'expression de certaines protéines de l'autophagie.....	100
5.4 La rapamycine inhibe l'expression de la protéine mTOR	101
5.5 L'exposition des MDDC à la rapamycine prévient la <i>trans</i> infection de VIH-1 aux lymphocytes T CD4+.....	101
5.6 Le traitement des MDDC à la rapamycine altère la prolifération des cellules T CD4+ spécifiques aux antigènes.....	103
5.7. La rapamycine ne module pas l'expression des molécules de fixation et d'entrée du VIH-1 chez les MDDC	105
5.8 Contribution des cellules myéloïdes à la persistance du VIH-1	106
Bibliographie.....	i
ANNEXE	i
Liste des présentations et publications.....	ii
Exemple d'affiche présentée à un congrès.....	i

Liste des tableaux

Tableau 1. Protéines impliquées dans la voie de l'autophagie.....	43
Tableau 2. Caractéristiques cliniques des patients infectés à VIH-1.....	52
Tableau 3. Caractéristiques du cytomètre en flux LSRIIA (Becton Dickinson).....	56
Tableau 4. Caractéristiques du cytomètre en flux LSRIIB (Becton Dickinson).....	57
Tableau 5. Liste des anticorps et fluorochromes associés aux diverses expériences.....	59
Tableau 6. Anticorps utilisées pour immunobuvardage de type <i>western</i>	63
Tableau 7. Liste de réactifs pour la quantification de l'ADN proviral du VIH par PCR.....	70

Liste des figures

Figure 1. Structures et protéines du VIH-1.....	18
Figure 2. Organisation génomique de l'ADN proviral de VIH-1.....	19
Figure 3. Cycle de réplication du VIH-1.....	21
Figure 4. Caractéristiques cliniques des phases de la pathogénèse de l'infection à VIH-1.....	24
Figure 5. Mécanismes de recrutement des monocytes dans les tissus enflammés.....	29
Figure 6. Synapse immunologique entre la DC et le lymphocyte T CD4+.....	34
Figure 7. Mécanisme moléculaire de la voie de l'autophagie.....	45
Figure 8. Différenciation des monocytes en MDDC.....	55
Figure 9. Pureté d'un tri cellulaire par cytométrie en flux.....	60
Figure 10. Courbe standard obtenue par une quantification de Bradford.....	61
Figure 11. Présentation antigénique par les MDDC aux lymphocytes T CD4+.....	65
Figure 12. Isolation de monocytes par sélection négative et génération de DC.....	81
Figure 13. L'exposition des MDDC à VIH-1 altère leur habileté à présenter un antigène.....	82
Figure 14. Le VIH-1 empêche une maturation complète des MDDC.....	83
Figure 15. La rapamycine module l'expression de la protéine centrale de l'autophagie mTOR.....	84
Figure 16. Étude de l'effet du LPS et du VIH-1 sur l'expression des protéines de l'autophagie.....	85
Figure 17. Le traitement des MDDC avec la rapamycine prévient la <i>trans</i> infection du VIH-1 aux cellules T CD4+.....	87
Figure 18. Le traitement des MDDC avec la rapamycine diminue la <i>trans</i> infection du VIH-1 aux cellules T CD4+ dans le contexte d'une présentation antigénique.....	88
Figure 19. Les MDDC traitées à la rapamycine exhibent un potentiel immunogène altéré.....	89
Figure 20. Impact de la rapamycine sur la maturation des MDDC immatures.....	90
Figure 21. Impact de la rapamycine sur la maturation des MDDC matures.....	91
Figure 22. Effet de la rapamycine sur les récepteurs de fixation et d'entrée du VIH-1.....	92
Figure 23. Détection de transcrits précoces d'ADN viral dans les monocytes de patients virémiques.....	93
Figure 24. Quantification de la réplication du VIH-1 dans les macrophages dérivés des monocytes (MDM) des sujets infectés et sous ART.....	94

Liste des sigles

3-MA : 3-méthyladénine

ADCC : *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

ADN : Acide déxoribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATG : *Autophagy related gene*

CCL: *Chemokine (C-C motif) ligand*

CCR: *C-C chemokine receptor*

CD : *Cluster of differentiation*

CFSE : *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : *Cytomegalovirus*

DC : cellule dendritique

DMEM : *Dubelcco's modified eagle medium*

DMSO : diméthylsulfoxyde

EDTA : acide éthylène diamine tétracétique

FACS : *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FBS: *Fœtal bovine serum*

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*

FSC: *Forward scatter channel*

GFP: *Green Fluorescent Protein*

HIF: *Hypoxia-inducible factors*

HRP : *Horseradish peroxidase*

IL: Interleukine

IRF: *Interferon regulatory factor*

LPS : Lipopolysaccharide

LTR: *Long terminal repeat*

MACS : *Magnetic-associated cell sorting*

MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein-1*

MDDC : *Monocyte-derived dendritic cell* MFI: *Mean of fluorescence intensity*

MIP: *Macrophage inflammatory protein*

MMP: *Matrix metalloproteinase*
mTOR : *Mammalian Target of Rapamycin*
NF- κ B: *Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*
NK: *Natural killer*
PAMP: *Pattern-associated molecular pathogen*
PB: *Pacific blue*
PBS: *Phosphate-Buffered Saline*
PE: *Phycoerythrin*
PRR: *Pattern recognition receptor*
PBMC : *Peripheral blood mononuclear cell*
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*
ROS: *Reactive oxygen species*
SAMHD1: *SAM domain and HD domain-containing protein 1*
SEB : *Staphylococcal Enterotoxin B*
SIDA : *Syndrome de l'immunodéficience humaine acquise*
SSC: *Side scatter channel*
TLR: *Toll-like receptor*
TNF: *Tumor Necrosis Factor*
Vif : *Viral infectivity factor*
Vpr : *Viral Protein R*
Vpu : *Viral Protein U*
Vpx : *Viral Protein X*
VIH : *Virus de l'immunodéficience humaine*
WT : *Wild type*

*À tous ces individus stigmatisés et ostracisés par leur condition, ceci est pour vous.
Nous sommes là.
À tous ces acteurs politiques, sociaux et scientifiques du changement, chapeau.
Le combat n'est pas fini.
Enfin, à vous, d'une manière ou d'une autre ce mémoire s'est retrouvé entre vos mains.
Tirez en profit.*

*“If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?”
- Albert Einstein*

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à ma directrice de recherche, Dr Petronela Ancuta. Sous votre affable supervision, j'ai pu réaliser ce projet de maîtrise et m'épanouir intellectuellement. Vous êtes pour moi un exemple de persévérance et de rigueur scientifique. Merci infiniment de m'avoir accordé cet honneur d'intégrer votre équipe.

Ensuite, merci aux actuels et anciens membres du laboratoire: Delphine, Annie, Yuwei, Stéphane «FanFan» Saitta, Rosa «AznSensation» Pyon, Mélanie «Bebe Alligator» Guiot, Sylvia, Mathilde, Vanessa, Aurélie, Sandrina, Josépha et également à Younes et Mohamed El-Far. Je vous remercie pour votre soutien, vos précieux conseils et les bons moments passés en votre compagnie. Le bébé du labo s'en va héhé!

J'aimerais également saluer les gens que j'ai côtoyés à St-Luc et au CRCHUM pour avoir fait de ces lieux un environnement agréable et stimulant particulièrement les agentes Sarah T-Rex Tran, LA B-ville ainsi que Camille Péneau et Nirmine, des âmes exceptionnelles.

Merci à ma grand-maman, la plus magnifique des créatures sur Terre. Papa, Mam, merci pour tous les sacrifices que vous avez faits pour nous. Ce mémoire est une façon de vous le rendre partiellement. Vous êtes une source d'inspiration et de courage. Merci de me pousser à me surpasser et de croire en moi. À mes 3 frères: *Bros over doughs. (if you read it out loud, you can hear bros overdose...Pure coincidence or nah?! Yikes)*. Merci de m'avoir préparée à la dureté, à la cruauté et à l'indifférence de la vie dès mon jeune âge. Je vous aime. Lori, merci pour ton support constant et à ma nièce Lya, l'idée de te voir grandir me comble d'un bonheur incommensurable.

I would like to express my extreme gratitude to my (extended) family from around the world for greeting me with cheap and pleasant vacations when school was getting hectic and also for being the best host I could ask for. Thanks for making me feel like I'm home wherever I go and for practicing languages with me.

Enfin, à mes chers amis, devant mon laxisme inhérent à un stress périodique, votre amitié a été plus énergisante qu'une canette de redbull à 4°C, plus savoureuse que cette bouteille de vin qu'on cale après une victoire des HABS, plus reconfortante que ce pot de crème glacée qu'on dévore après une rupture amoureuse et plus apaisante qu'un massage suédois exécuté par une femme poilue d'un salon du 450. Merci de m'avoir accueillie chez vous à bras ouverts à des heures inopportunes, d'avoir essuyé mes larmes, de m'avoir écoutée râler, de m'avoir botté l'arrière-train et d'avoir cru en moi tout au long de cette odyssée. *Thank you for understanding and also for sticking around. You have been great. The best is yet to come.*

Introduction

1.1 VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1

1.1.1 Historique de la découverte du VIH-1

Au cours de l'été 1981, des cliniciens newyorkais et californiens diagnostiquent plusieurs cas inhabituels d'infections opportunistes tel que le *Pneumocystis carinii* et de cancers tel que le sarcome de Kaposi dans la communauté homosexuelle [1]. Certains individus étaient aussi affectés par une lymphadénopathie persistante. Observant que ces patients présentaient une diminution significative de leurs taux de lymphocytes T CD4+ périphériques, les médecins ont vite convenu que ces gens devaient être atteints d'un déficit immunologique commun. À partir de ce moment, la quête de l'agent étiologique de cette maladie s'était amorcée. Étant donné que la prévalence de cette immunodéficiency était élevée chez les hommes gays, les premières hypothèses stipulaient qu'elle résultait d'une transmission sexuelle [2, 3]. Or, une étude a rapidement réfuté cette idée en démontrant que le syndrome était observé chez divers groupes sociaux aux États-Unis suggérant plutôt une transmission par le sang [4]. En 1983, une équipe de recherche incluant Françoise Barré-Sinoussi et son mentor Luc Montagnier de l'Institut Pasteur, isole à partir d'un ganglion lymphatique d'un patient infecté, l'agent étiologique de ce qu'on appelle désormais le syndrome de l'immunodéficiency acquise (SIDA) [5]. Ils nomment ce pathogène infectieux le *lymphadenopathy-Associated Virus* (LAV). Curieusement, ce virus exhibait une similitude frappante avec les *Type I and III Human Lymphotropic-T Virus* (HLTV-I et III) identifiés antérieurement par Robert Gallo [6, 7]. Enfin, il s'est avéré que le LAV et le HTLV-III étaient en fait le même virus qui, après un consensus international se nomme dorénavant le virus de l'immunodéficiency humaine (VIH) [8].

1.1.2 Caractéristiques générales

Le VIH appartient à la famille des *Retroviridae* du genre lentivirus qui se caractérise par une longue période d'incubation précédant la maladie. Il existe sous deux types, soit le

type 1 (VIH-1) et le type 2 (VIH-2) qui se distinguent par leur pathogénicité et leur séquence génétique [9]. Leur homologie génomique variant de 40 à 50% se transpose dans les différences au niveau des caractéristiques cliniques et biologiques de l'infection menant au SIDA. Le VIH-2 se démarque par une pathogénicité et un taux de transmission faible. Son infection est restreinte à l'Afrique de l'Ouest [9]. En contraste, le VIH-1 est répandu sur tout le globe et on lui attribue la pandémie actuelle. Ces deux types de VIH seraient issus d'une série de transmissions interespèces de virus simiens (SIV) vers l'humain en l'occurrence du chimpanzé (SIVcpz) pour le VIH-1 et du *sooty mangabeys* (SIVsm) pour le VIH-2 [10].

Les multiples transmissions inter-espèces ont généré quatre groupes distincts de VIH-1 qui sont M (*Main*), O (*Outlier*), N (*Non-O, Non-M*) et plus récemment P [11]. Le groupe M a été découvert en premier et est le plus fréquent [10]. Ce dernier est divisé en 9 sous-groupes A, B, C, D, F, G, H, J et K qui sont à leur tour subdivisés en plusieurs sous-sous-groupes par exemple A1, A2, A3 et A4 [12]. Le sous-groupe B est retrouvé en plus grande fréquence en Amérique du Nord, cependant le sous-groupe C est le plus présent globalement et plus particulièrement en Afrique [11]. Le groupe O, décelé en 1990, représente moins de 1% des infections mondiales, principalement concentrées au Cameroun et au Gabon [13]. Enfin, le groupe N a été découvert en 1998 et sa prévalence est moindre que le groupe O [14]. Jusqu'à présent, les 13 cas d'infections par ce groupe proviennent tous du Cameroun [15].

L'abondance de ces souches, conjointement à une accumulation de mutations aléatoires de la rétro-transcriptase virale et aux erreurs de celle-ci, a favorisé l'émergence de formes recombinantes circulantes (CRF) et uniques (URF) du VIH-1. Les CRF et les URF sont issues d'une recombinaison entre les différents sous-types et ont au minimum trois ou une séquence disponible dans la même structure respectivement [16]. Jusqu'à présent, 55 CRF ont été recensées à travers le monde [17]. L'identification de ces innombrables souches témoigne de la diversité génétique du VIH-1.

1.1.2.1 Structure du VIH-1

Le VIH-1 est revêtu d'une enveloppe formée d'une bicouche lipidique couvrant une nucléocapside (Figure 1). Son diamètre varie autour de 100 nm. Le matériel génétique viral est

formé de deux copies d'ARN simples brins de polarité positive. Le génome du VIH-1, long de 9,2 kb, est composé des trois gènes structuraux Gag (*Group of Specific-Antigen*), Pol (*Polymerase*) et Env (*Envelope*). Ces derniers sont encadrés par deux séquences longues répétées en 5' et 3', U3-R-U5, communément appelées les LTR (*Long Terminal Repeat*). Six gènes accessoires Nef, Tat, Rev, Vpx, Vpr et vif forment également le génome viral [18, 19] (Figure 1).

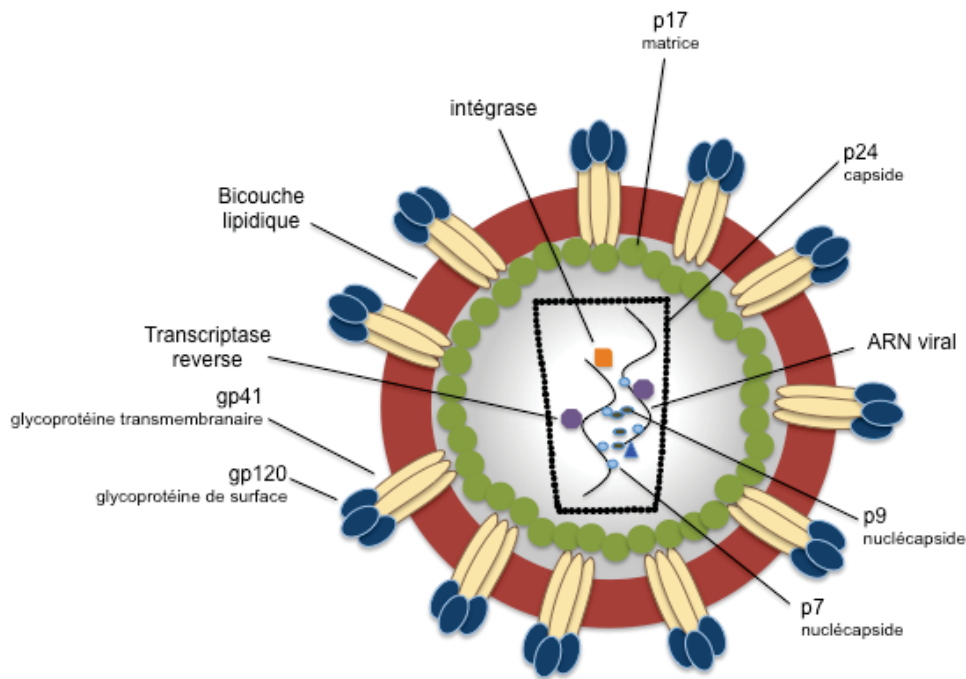


Figure 1. Structure et protéines du VIH-1. Schéma adapté de Harriet L. Robinson, utilisation autorisée par Dr. Harriet L. Robinson [20].

1.1.2.2 Protéines virales structurales

Chaque gène structural est initialement traduit sous la forme d'un précurseur protéolytique. Une fois le précurseur de Pol clivé, la protéase (PR), la transcriptase reverse (RT) et l'intégrase (IN), les enzymes cruciales pour la réplication et la survie du virion, peuvent être synthétisées [18]. En effet, la transcriptase inverse s'occupe de rétro-transcrire l'ARN viral en ADN. La protéase se consacre au clivage des protéines néo-synthétisées. Enfin, l'intégrase permet l'intégration du génome viral au sein de celui de l'hôte. Le gène Env

code pour la polyprotéine précurseur gp160. Cette dernière est clivée par la protéase cellulaire furine afin de générer les protéines membranaire gp120 et transmembranaire gp41 qui hérissent l'enveloppe virale [21-23]. Ces deux protéines sont habituellement retrouvées sous forme d'un complexe trimérique. Dans la même veine, le précurseur de Gag requiert une deuxième ronde de clivage après la maturation des virions en protéines de la matrice p17, de la nucléocapside p7, de la capside p24 et p6. Cet ensemble de polypeptides constitue le cœur de VIH-1 et tapisse l'intérieur de l'enveloppe virale (Figure 2).

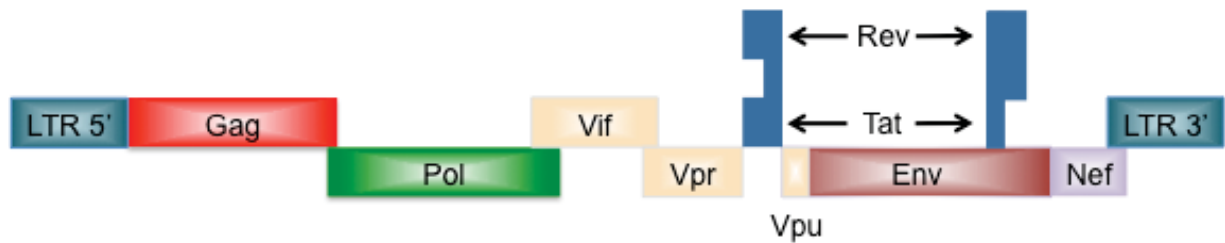


Figure 2. Organisation génomique de l'ADN proviral du VIH-1. Schéma adapté de Peterlin & Trono et utilisée par Dr. Matija Peterlin [24].

1.1.2.3 Protéines virales accessoires

À défaut de ne pas contribuer de manière essentielle à la réplication du VIH *in vitro*, les protéines virales accessoires Tat, Rev, Nef, Vif, Vpu et Vpr assurent néanmoins la persistance et la virulence du VIH *in vivo*. Elles ne possèdent pas de fonction enzymatique mais agissent plutôt comme protéine adaptatrice en interagissant ou en contrecarrant des mécanismes immunitaires mis en place par l'hôte [25].

La protéine Tat (*TransActivator of transcription*) régule la transcription virale. Elle se lie à une structure en tige-boucle TAR (*Transactivation response element*) située en 5' de l'ARN viral. Cette interaction favorise l'activité de l'ARN polymérase et stimule la formation de complexes d'élongation de l'ARNm permettant d'accélérer la transcription du génome viral [26, 27]. Rev (*Regulator of virion expression*) participe à l'export nucléaire de l'ARNm. Son gène encode pour un signal de localisation nucléaire dupant ainsi la cellule pour son passage

dans le noyau. En se fixant à la région RRE (*Rev responsive element*) des ARN non épissés, *Rev* les guide vers le cytoplasme afin d'accroître la production de protéines tardives [28].

La protéine Nef (*Negative regulatory factor*), potentiellement la plus immunogène du VIH, est myristoylée ce qui lui confère la capacité d'interagir avec une panoplie de molécules de l'hôte. C'est une protéine multi-fonctionnelle dont les activités majeures sont de perturber la signalisation cellulaire et d'interférer avec le trafic des vésicules cellulaires. Nef est capable notamment de réguler à la baisse l'expression de CD4 et du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de les réacheminer vers la voie ubiquitinaire pour la dégradation permettant ainsi au virus d'esquiver les mécanismes du système immunitaire de l'hôte [29, 30]. De plus, il a été récemment démontré que Nef modulait à la baisse l'expression de CTLA-4, un régulateur négatif de l'activation des cellules T, via les voies endosomale et lysosomale ce qui favoriserait une activation soutenue de ces cellules et conséquemment la dissémination du VIH-1 [31].

La protéine Vif (*Viral Infectivity Factor*) joue un rôle crucial dans la production de virus infectieux. Elle exclut la cytidine déaminase APOBEC3G des virions et la dégrade afin d'éviter de perturber la réplication virale. En effet, APOBEC3G introduit des mutations dans le génome viral qui rendent ce dernier méconnaissable par la machinerie de transcription cellulaire et du coup entraîne sa fragmentation [25, 32].

En ce qui concerne la protéine Vpu (*Viral Protein Unique*), son rôle est plutôt axé sur la libération des virions en agissant comme antagoniste du facteur de restriction cellulaire BST-2 [33]. Elle régule à la baisse l'expression du récepteur CD4 et inhibe l'activation du facteur de transcription NF- κ B [34]. Un fait intéressant à propos de Vpu est qu'elle est unique au VIH-1. En effet, le VIH-2 et des souches non pathogènes de SIV (*Sooty Mangabeys*, *African Green Monkeys*) codent plutôt pour la protéine Vpx (*Viral Protein X*) [35, 36]. Vpx ressemble structurellement à Vpr auquel le gène est en fait un homologue [37]. Son poids moléculaire varie entre 12 à 16 kDa [38]. Vpx est incorporée dans les néo-particules virales *via* son interaction avec le domaine p6 de Gag [39-41]. Elle s'associe également aux virions matures ce qui suggère qu'elle est impliquée dans les phases initiales de l'infection [42]. Vpx contribue à la dissémination virale du SIV et VIH-2 en contrecarrant SAMHD1 et en le dirigeant vers la voie de dégradation protéasomale. Compte tenu du fait que le VIH-1

n'exprime pas Vpx, SAMHD1 représente un facteur de restriction important dans les cellules myéloïdes [43, 44].

Enfin, la protéine Vpr (*Viral Protein R*) contribue à l'infectiosité virale en régularisant l'import nucléaire du complexe d'intégration du VIH. De plus, elle entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et active la réponse aux dommages de l'ADN [45]. Parmi ses autres fonctions, on compte la régulation et l'activation de l'apoptose des cellules infectées. Vpr permet également la réplication du VIH dans les cellules quiescentes et promeut l'infection des macrophages [45, 46]. Elle régule à la hausse l'expression des ligands permettant l'activation des NK [45].

1.1.3 Cycle de réplication virale

Le cycle de réplication du VIH-1 inclut 2 phases qui sont dites précoce et tardive (Figure 3). La phase précoce s'amorce avec la fixation du virus par le biais de récepteurs à la surface de la cellule cible. Elle aboutit à l'intégration de l'ADN viral au génome de la cellule hôte. La phase tardive correspond aux étapes de régulation de l'expression de VIH-1. Elle se termine par la maturation et le bourgeonnement des nouveaux virions. Au cours des dernières décennies, l'étude de la réplication virale a mené au développement d'agents antirétroviraux (ART) qui ont grandement amélioré la qualité de vie des patients infectés à VIH-1 sans toutefois les guérir. Ces drogues ciblent les différentes étapes du cycle viral.

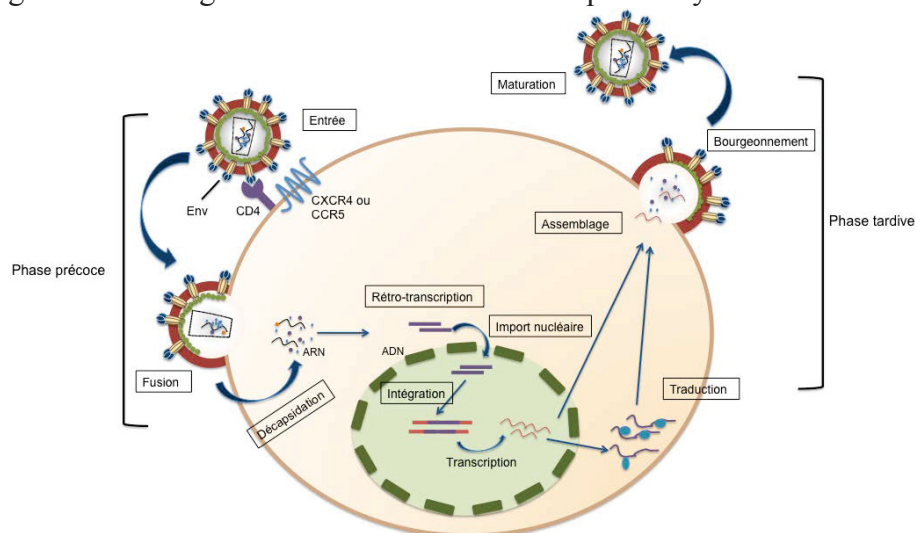


Figure 3. Cycle de réplication du VIH-1. Figure adaptée de Engelman & Chereparov [47] avec l'autorisation de Dr. Alan Engelman.

1.1.3.1 Cellules cibles du VIH-1 et tropisme cellulaire

Les principales cellules du système immunitaires ciblées par le VIH-1 sont les cellules dendritiques (DCs), les monocytes/macrophages et les cellules T CD4+ [48-51]. Ces leucocytes ont en commun l'expression de la glycoprotéine transmembranaire CD4 qui agit à titre de récepteur primaire du virus [52]. Le récepteur CD4 initie le cycle de réplication du VIH-1 en permettant à celui-ci de s'attacher et de pénétrer dans la cellule hôte via la formation d'un syncytia ou non [47, 49]. Le ciblage des différentes cellules a permis d'établir une première classification du tropisme des différentes souches virales (lymphocyte T ou macrophagique) conjointement à l'induction de la formation ou non d'un syncytia lors de la fusion du virus avec la cellule (*Non-Syncytium Inducing, NSI* ou *Syncytium Inducing, SI*) [53, 54]. Cependant, l'identification ultérieure des récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 comme corécepteurs principaux requis pour l'entrée du VIH a engendré une nouvelle classification du tropisme viral basée sur une interaction préférentielle avec l'une de ces molécules [55]. De ce fait, les souches qui se lient à CCR5 sont appelées R5 alors que celles-ci qui se fixent à CXCR4 sont nommées X4. De plus, l'appellation R5/X4 est appliquée aux souches pouvant utiliser l'un ou l'autre des deux corécepteurs [55]. Les souches X4 émergent normalement plus tard au cours de l'infection à VIH-1 alors que les souches R5 sont les plus souvent transmises et définissent en grande partie les souches dites fondatrices [56]. Enfin, les souches X4 capables d'infecter les lymphocytes T CD4+ naïfs alors que les souches R5 infectent autant les macrophages que les cellules T CD4+ mémoires.

1.1.3.2 Phase précoce

La réplication du VIH-1 débute avec la fixation de la protéine virale gp120 au récepteur CD4 de la cellule cible. Cette interaction induit un premier changement de conformation rendant disponible un site de fixation qui se lie au corécepteur CXCR4 ou CCR5 [57]. Cette seconde liaison entraîne de nouveau un changement de conformation de la gp120 qui libère son peptide de fusion pour s'ancrer dans la membrane cellulaire [58, 59]. Le virus peut alors pénétrer dans la cellule. Son entrée provoque le repliement des hélices de la gp41 pour resserrer le contact entre le virus et la cellule et permettre leur fusion membranaire [60].

Par conséquent, la nucléocapside est larguée dans le cytoplasme et se désagrège. Les deux brins d'ARN du VIH en plus de quelques enzymes déjà présentes dans le virion sont relâchés dans le milieu intracellulaire. La transcriptase inverse rétro-transcrit l'ARN viral en ADN double brin à l'aide d'une ARN de transfert (ARNt) comme amorce. Cette enzyme possède une activité ribonucléase H qui dégrade au fur et à mesure l'ARN viral servant de matrice et hybridé à l'ADN néo-synthétisé [61]. Toutefois, des séquences riches en purines (PPT : *polypurine tracts*) résistent à la digestion enzymatique et seront employées comme amorce pour la synthèse du second brin d'ADN [62]. Une fois la génération des deux brins d'ADN complémentaires terminée, le complexe de pré-intégration (CPI) se met en place. Ce dernier est constitué d'ADN viraux, de l'intégrase, de la protéine Vpr et de protéines cellulaires. Le CPI est transporté au noyau cellulaire à travers les pores nucléaires grâce aux signaux de localisation nucléaire que possèdent les protéines de la matrice [63]. Enfin, sous l'action de l'intégrase, le génome du VIH-1 est incorporé dans celui de la cellule hôte et on le nomme désormais provirus.

1.1.3.3 Phase tardive

Lors de la phase tardive, les provirus sont transcrits en ARNm par une ARN polymérase cellulaire. Certains ARNm subissent une étape d'épissage avant leur traduction dans le cytoplasme par les ribosomes. C'est le cas notamment des ARNm courts qui codent pour les protéines Nef, Tat et Rev produites lors d'une première ronde de traduction. Ainsi, la protéine Rev s'occupe de transporter les ARNm longs non épissés hors de la cellule afin de permettre leur traduction en polyprotéine précurseur Gag, Gag-Pol et Env [18]. Les protéines obtenues par clivage de ces précurseurs vont s'associer aux deux brins d'ARN viral afin former de nouveaux virions. Cependant, les protéines de l'enveloppe, gp120 et gp141 sont intégrées à la membrane cellulaire [64]. Elles sont emportées en même temps qu'une partie de la membrane plasmique de l'hôte lorsque le virus bourgeonne à travers la membrane cytoplasmique de la cellule hôte. Enfin, le clivage de protéines par des protéases virales se produit dans les nouveaux virions et assure la maturation et la virulence du VIH-1.

1.1.4 Pathogénèse de l'infection à VIH-1

1.1.4.1 Phases cliniques

La pathogénèse de l'infection à VIH-1 se caractérise par une chute drastique du taux de lymphocytes T CD4+, spécialement au niveau du tractus gastro-intestinal [65, 66]. Par conséquent, l'individu infecté présente un système immunitaire affaibli qui le rend vulnérable aux maladies opportunistes. L'infection à VIH-1 se divise en trois phases cliniques distinctes incluant aigüe, chronique et SIDA (Figure 4). Chaque phase se différencie par sa durée et ses caractéristiques cliniques spécifiques.

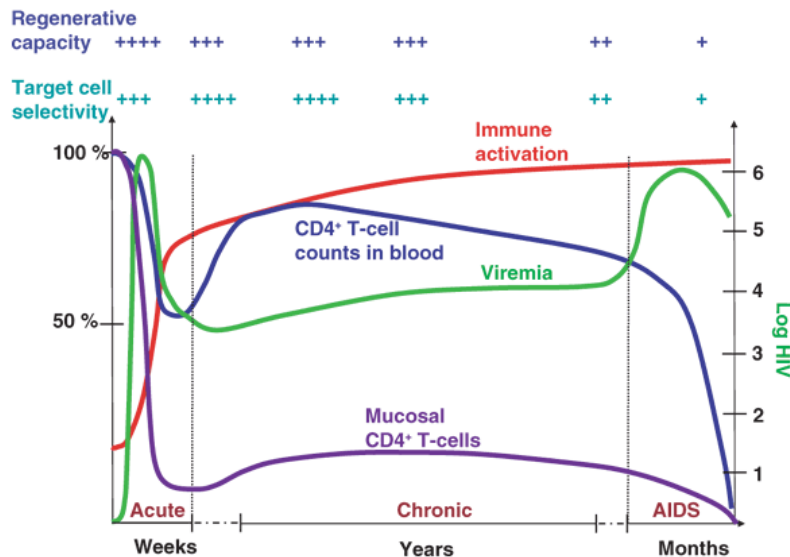


Figure 4. Caractéristiques cliniques des différentes phases de la pathogénèse de l'infection à VIH-1. Les 3 différentes phases cliniques et leurs caractéristiques, reproduction autorisée par Zvi Grossman [67].

1.1.4.1.1 Phase aigüe

Durant la primo-infection, on observe une déplétion importante du taux de lymphocytes T CD4+, particulièrement au niveau des organes lymphoïdes associés au tractus gastro-intestinal et aux organes génitaux. À cela s'ajoute une réplication virale soutenue qui se

manifeste cliniquement par des symptômes comme la fièvre, la fatigue ou la perte de poids [68]. La majorité des virus identifiés lors de cette phase sont à tropisme R5 alors que ceux utilisant le corécepteur CXCR4 n'apparaissent que beaucoup plus tard au cours de l'infection [69, 70]. Concomitant avec leur état d'activation plus avancé comme le témoigne l'expression à la hausse des récepteurs CD25, CD69 et HLA-DR, les cellules T CD4+ CCR5+ représentent donc des cibles de choix pour une infection à VIH-1 [70, 71]. Cet état d'activation avancé peut être causé par une sécrétion soutenue de cytokines pro-inflammatoires dans les muqueuses ou encore provoqué par l'action des protéines accessoires Nef, Tat, Env et Vpr qui contourne l'activation par le récepteur des cellules T (TCR) [72-77]. De plus, le VIH-1 répand son infection jusqu'aux cellules T mémoires quiescentes afin de donner naissance à des réservoirs latents qui peuvent survivre des années dans l'organisme [48, 78].

La phase aigüe s'étend sur quelques semaines durant lesquelles le virus opère une chute dramatique du taux des lymphocytes T CD4+ CCR5. Cette mort cellulaire exorbitante est attribuable à la cytopathologie du VIH-1 ou encore est associée à des dommages collatéraux provenant de la mise en place d'une réponse immunitaire qui entraîne la destruction des cellules infectées par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et les cellules *Natural killer* (NK) [70, 79].

Néanmoins, lorsque la phase aigüe commence graduellement à s'estomper, une stratégie de défense immunitaire est coordonnée par les lymphocytes B et les anticorps (médiation humorale) et les lymphocytes T CD8+ et les NK (médiation cellulaire). Celle-ci permet de contrôler la réplication virale et aussi de restaurer partiellement le niveau de lymphocytes T CD4+ périphérique mais pas au niveau des muqueuses intestinales [80].

1.1.4.1.2 Phase chronique

La phase chronique qui peut se dérouler sur plusieurs années accentue la déplétion abondante et progressive des lymphocytes T CD4+. En contraste, la quantité de lymphocytes T CD8+ activés augmente en flèche [70]. Le VIH-1 poursuit son activité de réplication de manière soutenue. Bien qu'elle laisse place à une activation persistante du système immunitaire, cette phase est habituellement exempte de symptômes. Cet état d'activation exacerbé se manifeste entre autres par une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires accrue et

sert d'outil clinique pour évaluer la progression de l'infection. Il découlerait du bris de la barrière de la muqueuse gastro-intestinale qui se produit au cours de la phase aigüe entraînant une translocation bactérienne [81]. Considérant que seule une portion minime des lymphocytes T sont infectés *in vivo* par le VIH-1, il serait faux d'affirmer que l'infection virale à elle-seule cause la chute massive de cellules T CD4+ [82, 83]. Ce phénomène serait plutôt causé par un épuisement métabolique découlant de l'activation chronique du système immunitaire et qui s'avère mortelle pour ces lymphocytes [70, 84]. De nombreux mécanismes contribuent à une asthénie du métabolisme cellulaire dont une diminution conjoncturelle des cellules T mémoires lors de l'inflammation chronique. Bien qu'une fraction de cellules T naïves s'activent et deviennent mémoires ce nombre est insuffisant pour éponger le déficit cellulaire. D'autre part, une stimulation récurrente du système immunitaire réduit le *pool* de cellules de réserve [70]. Puis, les sources lymphopoïétiques sont dysfonctionnelles et par conséquent incapables de subvenir à la demande en régénération des lymphocytes T naïfs. La structure des ganglions lymphatiques est endommagée dû à un dépôt de collagène interférant avec la survie et l'expansion des lymphocytes T CD4+ [85, 86].

1.1.4.1.3 Phase SIDA

Le stade SIDA est atteint lorsque le taux de lymphocytes T CD4+ du sang périphérique tombe sous le seuil 200 cellules/ μ L [87, 88]. À cette phase sont associées une chute inexorable du taux de lymphocytes T CD4+ du sang périphérique conjointement à une augmentation de la virémie. De plus, les souches virales X4 font leur entrée progressive durant cette phase de l'infection permettant au virus d'employer le co-récepteur CXCR4. En conséquence, un plus grand nombre de cellules sont infectées ce qui favorise une propagation plus rapide du virus et une accélération vers la maladie du SIDA [70]. L'individu présente un système immunitaire compromis affectant particulièrement l'immunité adaptative à médiation cellulaire ce qui le rend vulnérable aux pathogènes opportunistes qui peuvent s'avérer mortels. Les micro-organismes qui présentent normalement une virulence limitée bénéficient donc de la faiblesse immunitaire pour devenir plus dangereux. Ces derniers provoquent des infections qui s'attaquent entre autres aux tissus pulmonaires et oesophagiens. Parmi les infections opportunistes, on compte par exemple la tuberculose engendrée par la bactérie *Mycobacterium*

tuberculosis, la pneumonie résultant d'une infection par le parasite *Pneumocystis carinii*, la méningite à cryptocoque provoquée par la levure *Cryptococcus neoformans*, les infections au cytomégalovirus (CMV) consécutif d'une infection par un herpesvirus et enfin des néoplasies comme le sarcome de kaposi [89, 90].

1.2 MONOCYTES

Les monocytes sont de larges cellules mononuclées avec une morphologie et un degré de granulosité variable [91]. Ils représentent approximativement 10% des leucocytes dans le sang périphérique chez l'homme [92, 93]. Ils circulent dans le sang avec une durée de demi-vie d'environ 3 jours [93]. Ces cellules se développent à partir d'un progéniteur granulocyte-monocyte de la moelle osseuse [94]. Elles sont munies de nombreux récepteurs de chimiokines et de *pattern recognition receptors* (PRR) qui facilitent respectivement leur migration du sang vers les tissus et leur contribution aux réponses immunitaires lors d'une infection [95]. Leur plasticité s'illustre par leur différenciation en macrophages ou en DCs dépendamment de la composition en cytokines de l'environnement tissulaire où ils sont recrutés [96-98]. Les monocytes sont impliqués autant dans l'immunité innée que dans l'immunité adaptative *via* la phagocytose d'un pathogène qu'ils présenteront ensuite à un lymphocyte T pour induire leur prolifération. Ils produisent également des cytokines inflammatoires [95] et contribuent au maintien de l'homéostasie et à la réparation tissulaire [99]. Les monocytes représentent une population très hétérogène comme le témoigne leur transcriptome extrêmement diversifié avec 2 759 gènes sur 16 238 exprimés différemment par les sous-populations monocytaires exprimant ou non le récepteur CD16 [100]. Les différences dans leur profil transcriptionnel se transposent dans des activités biologiques distinctes comme la réponse au stress, le métabolisme et le cycle cellulaire [91, 100].

1.2.1 Sous-populations monocytaires

Initialement, la classification des monocytes était basée sur leur morphologie et leur cytochimie. Puis, avec le développement de la technique de cytométrie en flux une étude

menée par l'équipe de Ziegler-Hietbrock a mis en évidence l'existence des sous-populations monocytaires exprimant différemment les molécules CD14 et CD16/FcγRIII [101]. Le marqueur CD14 est une glycoprotéine ancrée à la membrane cellulaire par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) [102]. Il agit de concert avec le *Toll-Like Receptor 4* (TLR4) comme un corécepteur des lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif [103]. Quant à la molécule CD16, elle appartient à la famille des récepteurs de la fraction cristallisable (Fc) des immunoglobulines G (IgG) qui comprend également CD32 (FcγRII) et CD64 (FcγRI) [104]. CD16 est exprimé sur les cellules NK, les macrophages et les neutrophiles. Sa liaison de faible affinité avec la région Fc des anticorps déclenche la réaction d'*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC) et promeut l'élimination de complexes immuns du sang périphérique. Selon le niveau d'expression de ces deux récepteurs, trois populations distinctes ont été définies: les classiques (CD14+++CD16-), les intermédiaires (CD14+++CD16+) et les non-classiques (CD14-CD16+) [101]. Chacune d'entre elles a un profil phénotypique et fonctionnel différent, par exemple les classiques expriment le récepteur CCR2 alors que les intermédiaires et les non-classiques expriment plus fortement CCR5 [91, 105] et CX3CR1 [106]. De plus, le phénotype des monocytes CD16+ ressemblent énormément à celui des macrophages tissulaires, exprimant des niveaux élevés de CMH de classe II [107]. Bien que les monocytes exprimant CD16 ne représentent qu'une fraction minime des monocytes totaux (5-10%), plusieurs études ont démontré leur expansion dans des conditions pathologiques tels que le cancer, *M. tuberculosis*, VIH [108-110], suggérant ainsi leur implication dans plusieurs pathogénèses imputable à leurs diverses propriétés biologiques [111].

1.2.2 Mécanismes moléculaires de recrutement des monocytes dans les tissus

Les populations monocytaires se distinguent par leur potentiel de migration (Figure 5). En effet, les monocytes CD16- expriment le récepteur CCR2 et migrent en réponse aux ligands MPC-1/CCL2 et MIP-1 α alors que les monocytes CD16+ expriment le récepteur CX3CR1 et migrent à la suite d'une interaction avec les chimiokines fractalkine (FKN)/CX3CL1 et CXCL12 [105, 112]. Ainsi, ceci suggère que les monocytes sont recrutés à différents sites anatomiques dépendamment des chimiokines secrétées localement. La

fractalkine est une glycoprotéine transmembranaire exprimée de manière constitutive dans plusieurs organes tels que le cœur, le cerveau et le pancréas. Sa forme soluble est obtenue par clivage protéolytique et lui confère ses propriétés chimiotactiques [113]. De plus, sa forme membranaire est retrouvée à la surface des cellules endothéliales vasculaires et permet d'arrêter au passage les monocytes CD16⁺ mais pas les CD16⁻ et guide leur migration transendothéliale [113, 114]. Cette interaction ligand-récepteur induit la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et MCP-1 et de la métalloprotéinase MMP-9. Ceci indique que la sous-population exprimant CD16 est recrutée au niveau des parois veineux et pourrait participer à la destruction des tissus par une infiltration délétère [111, 112]. Des études portées sur l'homologue murin Ly6⁺ du récepteur CD16 démontre des résultats semblables. Les monocytes sont recrutés vers les tissus inflammés et sont également prédisposés à s'y différencier en macrophages comme le suggère leur état de différenciation plus avancé [115].

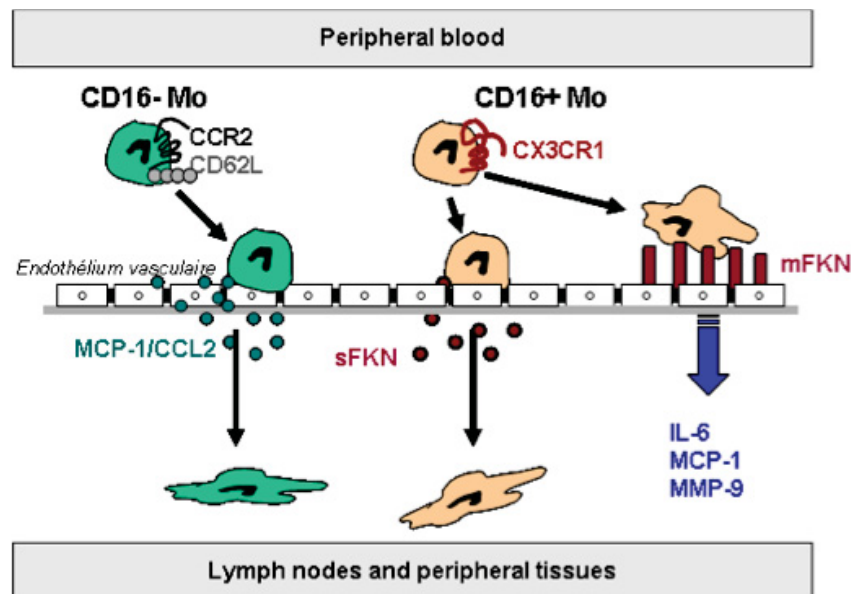


Figure 5. Mécanismes de recrutement des monocytes dans les tissus inflammés. Utilisation autorisée par Dr. Petronela Ancuta.

1.2.3 Fonctions pro-inflammatoire des monocytes

Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont souligné la qualité pro-inflammatoire des monocytes CD16+ *versus* CD16-. Ils secrètent un haut niveau de *Tumoral Necrosis Factor* (TNF), en particulier le TNF- α et l'IL-1 β . En contraste, ils produisent très peu de cytokine anti-inflammatoire IL-10 [110, 116]. Ces cellules expriment un haut niveau de HLA-DR comparativement au CD16-, conjointement aux molécules de co-stimulation CD80 et CD86 suggérant une activité accrue de présentation antigénique [101]. Concomitant à cela, on détecte également à leur surface des marqueurs associés aux DCs tels que CD40 et CD83 indiquant une différenciation privilégiée en ce type de leucocyte [117]. Les monocytes CD16+ démontrent une capacité supérieure à stimuler les cellules T à la suite de la présentation d'un peptide antigénique [118].

1.2.4 Contribution des monocytes à la pathogénèse de l'infection à VIH-1

L'ensemble des monocytes se montre très réfractaire à une infection à VIH-1 *in vitro* qui est bloquée rapidement suivant l'entrée du virus [119, 120]. La permissivité de ces cellules au VIH-1 est régit par leur stade de différenciation en macrophages [121]. Il a été proposé qu'au stade G0 du cycle cellulaire, les monocytes possèdent un niveau faible de désoxyribonucléotides (dNTP) et par conséquent ceci limite l'efficacité de la synthèse d'ADN viral complémentaire [121, 122]. Malgré cela, une faible proportion des monocytes est tout de même infectée. De par leurs propriétés biologiques, les monocytes CD16+ sont impliquées dans l'infection à VIH-1, en plus de plusieurs autres maladies tels l'athérosclérose et la maladie de Kawasaki [118]. En effet, leur fréquence est augmentée lors de plusieurs conditions pathologiques dont la plupart impliquent un état d'inflammation exacerbé (cancer, *M. tuberculosis*, VIH, *etc.*) [108-110]. La proportion de monocytes intermédiaires versus les non-classiques est en corrélation avec la progression de la maladie chez les individus infectés chroniquement par VIH-1, c'est-à-dire une augmentation de la charge virale et une diminution du taux de lymphocytes T CD4+ [123]. Au niveau neurologique, il a été démontré qu'une hausse du taux de monocytes CD16+ circulant est liée à une démence associée au VIH [124, 125]. De plus, un rôle nuisible a été attribué au recrutement de ces cellules au système nerveux central durant la pathogénèse de l'infection à VIH-1 [126]. La progression de l'infection à

VIH-1 est associée à une expansion de monocytes CD16+ dans le sang périphérique des individus infectés par VIH-1 et ce nombre peut atteindre jusqu'à 50% chez les patients sidatiques [108]. Les monocytes CD16+ comparativement aux monocytes CD16- exhibent un niveau supérieur d'ADN viral *in vivo*, étant plus permissifs à l'infection à VIH-1 [127]. En effet, ils expriment un niveau plus élevé du récepteur CD4 et du corécepteur CCR5 relativement aux monocytes CD16- [127]. Les monocytes CD16+ contribuent à l'établissement de réservoirs de VIH et à une activation immune chronique.

1.3 CELLULES DENDRITIQUES

1.3.1 Historique de la découverte des DCs

Les DCs ont été décrites pour la première fois dans des organes lymphoïdes périphériques de souris en 1973 par Ralph Steinman *et al.* [128]. Cette découverte lui a d'ailleurs mérité un prix Nobel de physiologie post-mortem en 2011. Néanmoins, un siècle auparavant, Paul Langerhans avait identifié des cellules semblables, les cellules de Langerhans, au niveau de l'épiderme sans toutefois être conscient de leur rôle central dans la réponse immunitaire [129]. Il pensait à tort que les cellules qu'il observait étaient plutôt des cellules nerveuses de la peau. Le nom des DCs est attribuable à leur morphologie exhibant des dendrites similaires à celles des neurones.

1.3.2 Sous-populations de DC et distribution tissulaire

Les DCs peuvent être d'origine myéloïde (mDC) ou plasmacytoïde (pDC). Plus précisément, les mDCs sont générées à partir d'un précurseur situé dans la moelle osseuse alors que les pDCs sont issues du thymus. Les monocytes peuvent également se différencier en mDC suivant une polarisation par les cytokines GM-CSG et IL-4 [130]. Cette provenance ainsi que leur distribution spécifique dans les tissus gouvernent leurs fonctions. Les pDCs sont majoritairement localisées dans le sang périphérique et les ganglions lymphatiques. Elles se distinguent des mDCs entre autres par l'expression des récepteurs CD123 et CD303/BDCA-2 [131]. Les pDCs sont davantage impliquées dans l'immunité innée par la production massive

de cytokines antivirales IFN de type I lors de l'activation de leur *toll-like receptor (TLR)* 7 ou TLR9 en cas d'infection virale [131, 132]. Elles induisent préférentiellement l'activation des lymphocytes T CD8+ plutôt que des lymphocytes T CD4+ comme les mDCs. Ces dernières sont regroupées selon leur distribution anatomique *via* laquelle on leur a attribué un nom. Par exemple, au niveau de l'épiderme on retrouve les cellules de Langerhans. Les différences entre les mDCs et les pDCs se reflètent au niveau physiologique et au niveau de l'expression de divers *Pattern Recognition Receptor (PRR)*. Malgré ces divergences, ces deux groupes de DCs se joignent en tant que famille de cellules présentatrices d'antigène professionnelles.

1.3.3 Rôle des DCs dans la présentation antigénique

Les DCs jouent un rôle crucial dans le système immunitaire en établissant un pont entre l'immunité innée et adaptative. Elles se rangent dans la catégorie des cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles [133]. Elles capturent un antigène en périphérie et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires afin de présenter un peptide apprêté à un lymphocyte T naïf afin d'orchestrer une réponse immune adéquate [133]. À cet effet, elles jouent un rôle dans l'induction et le maintien de la tolérance en éliminant les lymphocytes T trop réactifs. Elles coordonnent le recrutement des NKs, des granulocytes et de d'autres DCs au site de l'infection notamment par le biais de sécrétion des cytokines spécifiques.

Les DCs immatures résidant dans les tissus patrouillent leur environnement à la recherche de *Pathogen Associated molecular-patterns (PAMPs)*. Elles s'activent lors de la reconnaissance et la capture d'un pathogène potentiel *via* la myriade de PRRs (*pattern recognition receptors*) qu'elles expriment incluant les TLR, les NOD-1 (*nucleotide-binding oligomerization domain proteins*), les récepteurs RIG-I-like (*retinoic acid-inducible gene 1*) et les récepteurs de lectine de type C [134, 135]. Les DCs engouffrent aussi des antigènes par la voie d'endocytose comme la phagocytose ou la macropinocytose.

Les antigènes de nature endogène sont dégradés par la machinerie du protéasome et chargés dans le CMH de classe I à l'aide de la protéine TAP. Le complexe est ensuite livré à la surface cellulaire grâce à des protéines chaperonnes. D'un autre côté, le CMH de classe I est chargé avec un antigène exogène obtenu par la voie endocytaire ou endogène. Néanmoins, des

études récentes ont mis la lumière sur un phénomène de cross-présentation où les DCs avaient la capacité de présenter un antigène exogène complexé au CMH de classe II afin d'induire la prolifération des cellules T CD8+ cytotoxiques naïves [136].

Les DCs sont ensuite recrutées au site d'inflammation via la liaison des chimiokines MIP-1 alpha/CCL3, RANTES/CCL5 et MIP-3 alpha/CCL20 à leur récepteur de surface CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 et CXCR1 [137]. Leur activité endocytaire s'intensifie transitoirement. Toutefois, la maturation des DCs provoque un arrêt soudain de l'endocytose afin de restreindre la stimulation des lymphocytes T seulement aux antigènes qu'elles ont rencontré au site d'inflammation [138]. En parallèle, un rehaussement des caractéristiques d'une CPA professionnelle se met en branle régulant à la hausse le niveau d'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 ainsi que du CMH de classe II et CD40. Elles expriment aussi le CMH de classe I [98].

Les DCs vont ensuite migrer vers les organes lymphoïdes secondaires afin de présenter l'antigène dégradé et complexé à leur CMH au récepteur des lymphocytes T (TCR) naïfs. Au cours de leur maturation, les DCs acquièrent l'expression du récepteur de chimiokine CCR7 un régulateur clé de leur trafic. Lorsque la chimiokine CCL19 ou CCL21 se lie au CCR7, les DCs peuvent effectuer une migration *trans*-endothéliale vers les organes lymphoïdes riches en cellules T et B [139-142].

1.3.4 Synapse immunologique (SI) entre les DCs et les cellules T CD4+ et CD8+

Lorsque les lymphocytes T sont activés par une DC, un réarrangement moléculaire est mis en place dans ces deux cellules pour donner naissance à une jonction adhésive nommée synapse immunologique (SI) [143]. Cette structure stable facilite la communication entre la cellule T et la CPA. Sa formation nécessite un remodelage du cytosquelette qui se déroule presque instantanément après la reconnaissance d'un antigène spécifique. La formation de la SI entraîne l'élaboration de radeaux lipidiques permettant de relocaliser les protéines qui la constituent [144]. Des complexes supramoléculaires d'activation (SMAC) composent la structure de la SI et sont divisés en trois principaux compartiments. D'abord, on retrouve le SMAC central (cSMAC) lui-même partagé en deux composantes : interne, qui inclut les

complexes peptides-CMH en interaction avec les TCRs et externe, qui comprend les molécules requises pour la transduction du signal en plus des molécules de co-stimulation CD80/CD86 et leur récepteur CD28 [145]. Puis, il y a le SMAC périphérique (pSMAC) constitué de l'intégrine LFA-1 et de son récepteur ICAM-1 et également de la protéine taline du cytosquelette. Un quatrième compartiment a aussi été identifié et se nomme SMAC distal (dSMAC). Il est composé de la phosphatase CD45 essentielle pour l'activation des kinases Src qui sont impliquées dans la transduction du signal par le TCR [146].

Lors de la présentation antigénique, le premier contact entre la DC et le lymphocyte T s'effectue à travers une liaison de faible affinité entre leur LFA-1 et leur ICAM-1 respectivement. Puis, la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR induit un changement de conformation de LFA-I augmentant ainsi son degré d'affinité pour ICAM-1 afin de rapprocher les deux cellules. Les composantes de la SI se relocalisent toutes à l'interface du lymphocyte T et de la DC. Le contact intercellulaire permet l'internalisation du TCR ce qui entraîne une régulation à la baisse de l'expression de LFA-1. Graduellement, le contact entre les cellules se dissipe. En parallèle, la cellule T accroît l'expression des molécules de régulation négative CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) et PD-1 (*Programmed cell death 1*). L'interaction soutenue de ces protéines avec leurs ligands CD80 et CD86 ainsi que PDL-1 respectivement inhibe la cascade de signalisation du TCR [147]. Cela informe la cellule T qu'elle doit se détacher de la CPA pour proliférer et se différencier.

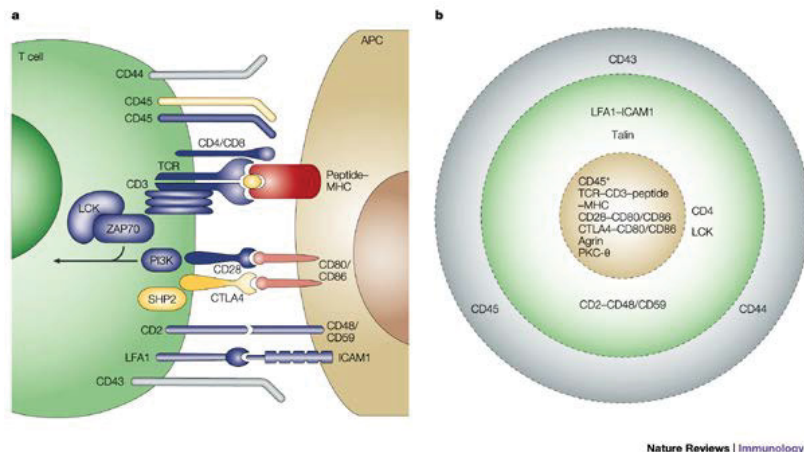


Figure 6. Synapse immunologique entre la DC et le lymphocyte T CD4+. Image tirée de [148] et reproduite avec la permission de l'auteur Dr Johannes Huppa.

1.3.5 Facteur de restriction au VIH dans les DCs

Les cellules immunitaires ont mis au point des mécanismes de restriction afin de limiter la propagation d'infection virale telle que celle du VIH-1. Ces facteurs de l'immunité innée incluant APOBEC3G, SAMHD1, TRIM5- α et Téthérine/BTS2 ciblent des étapes précises du cycle de réplication virale.

1.3.5.1 APOBEC3G

En 2002, l'équipe de Dr. Michael Malim oriente leurs efforts vers l'identification de protéines qui pourraient prodiguer une activité antivirale lorsque le virus du VIH-1 n'exprime pas la protéine VIF (Δ Vif). En absence de cette dernière, des virions non infectieux sont générés par les cellules T primaires humaines mais également par des lignées cellulaires telles les CEM, une lignée de cellules lymphoblastiques provenant d'un cas de leucémie [149]. Le laboratoire de Dr. Malim se tourne vers une technique de soustraction d'ADNc qui se fonde sur une PCR comparative de l'infection à VIH-1- Δ Vif des cellules CEM permissives (CEM-SS) et non permissives (CEM) [150]. Cette stratégie révèle l'existence d'un ADNc long de 1.5 kb subséquent nommé CEM15. Étrangement, ce dernier possède la même séquence en ARNm que la protéine APOBEC3G caractérisée au courant de la même période par l'équipe de Jarmuz [151]. Malim *et al.* poursuivent leur enquête sur cette protéine en ayant recours à un système qui exploite le virus de la leucémie murine (MLV). Les résultats qu'ils obtiennent attribuent un rôle de cytidine déaminase à APOBEC3G. En d'autres termes, ce facteur de restriction est capable d'enlever les groupements amines des cytidines pour les convertir en uridine aboutissant alors à des hypermutations des guanosines en adénosines au niveau de l'ADN [152]. Par conséquent, l'intégrité de l'ADN viral est compromise et perturbe le cycle de réplication du VIH-1. Toutefois, étant donné que APOBEC3G est retenu dans le cytoplasme, l'ADN de la cellule hôte demeure intact [153]. L'action d'APOBEC3G peut être contrecarré par VIF qui mobilise une E3 ubiquitine ligase afin de polyubiquitiner et induire une dégradation de ce facteur de restriction via la machinerie protéosomale [154].

1.3.5.2 SAMHD1

La protéine SAMHD1 (*SAM domain and HD domain 1*) est constituée de 626 acides aminés. Elle se divise en trois domaines qui sont SAM à l'extrémité N-terminal, HD au centre

et un domaine non-caractérisé à l'extrémité C-terminal [155, 156]. Elle est fortement exprimée dans les DCs et à un niveau moindre dans les macrophages, rendant ces deux populations plus réfractaires à une infection à VIH-1. SAMHD1 a été découvert en parallèle par les équipes de Jacek Skowronski et Moncef Benkirane [43, 44]. Les deux groupes de recherche ont mené des travaux pour identifier le facteur cellulaire qui interagit avec la protéine virale Vpx du SIV pour ainsi restreindre l'infection à VIH-1 dans les cellules myéloïdes humaines. Il était connu depuis longtemps que le VIH se répliquait très peu dans les cellules myéloïdes et que la surexpression de Vpx pouvait augmenter la réplication du VIH dans ces cellules [157]. Les équipes de Skowronski et Benkirane ont procédé avec des approches semblables en protéomique, combinant des expériences en immunoprécipitation et de la spectrométrie en masse et ont réussi à identifier le domaine SAM comme le principal partenaire de liaison de Vpx. En ce qui concerne le mécanisme d'action, l'équipe de Webb *et al.* accorde à SAMHD1 une fonction déoxynucléotide triphosphohydrolase, c'est à dire la capacité de transformer les déoxynucléotides triphosphates (dNTP) en déoxynucléotide et en triphosphate [158]. Cette activité enzymatique de SAMHD1 empêche la rétrotranscription du VIH en hydrolysant abondamment les dNTP cellulaires inhibant du coup la réplication virale [158]. Des recherches dirigées par Margottin-Goguet appuient le fait que SAMHD1 limite le pool de dNTP cellulaire pour abroger la réplication virale [159]. De façon plus globale, il suggère que le développement d'un mécanisme de restriction diminuant le pool de dNTP peut s'avérer fatal pour les virus nécessitant un intermédiaire ADN comme le VIH-1 [159]. Plus récemment, une activité RNase a été décrite pour SAMHD1 [160].

1.3.5.3 TRIM5 α

Le facteur de restriction TRIM5 α (*Tripartite motif-containing protein 5 isoform alpha*) appartient à la vaste et diversifiée famille des *TRIM-containing proteins*. Les membres de ce groupe possèdent tous trois domaines distincts en N-terminale qui sont RING (impliqué dans l'ubiquitination), doigts de zinc et superhélice [161]. TRIM5 α est une protéine cytoplasmique d'environ 500 acides aminés qui intervient lors de l'entrée et de la décapsidation du VIH-1 dans la cellule hôte [162]. Son interaction avec des motifs précis de la capsid accélère la fragmentation de cette structure virale en l'espace de 15-30 minutes et bloque la transcription

inverse [163, 164]. Les chemins menant à la découverte de TRIM5 α ont été tracés à la suite d'un intérêt suscité par l'existence d'un facteur de restriction présent dans les cellules d'un groupe de primates dénommé *Old World monkeys* qui se montraient plus réfractaires à une infection à VIH-1 comparativement aux autres cellules de mammifères [165-167]. C'est l'équipe de Joseph Sodroski qui découvre en 2004 cette protéine à travers des expériences de transduction virale de cellules HeLa susceptibles au VIH-1-GFP pseudotypé VSVG combiné à l'utilisation d'une banque d'ADNc construite à l'aide de fibroblastes pulmonaires de singes rhésus macaques [162].

1.3.5.4 Téthérine/BST2

La protéine Téthérine a été identifiée sur la base d'observations démontrant que la protéine virale Vpu était nécessaire pour une relâche efficace des virions à partir de certaines lignées cellulaires [168]. De plus, plusieurs études soutenaient que la sécrétion d'IFN α résultait en une inhibition de la libération de nouvelles particules virales. L'équipe de Paul Bieniasz entreprend des travaux utilisant un virus Δ Vpu et montre qu'il y a une accumulation de virions matures à la surface des cellules infectées à VIH-1. Lorsque traitées à la protéase, ces particules virales disparaissent ce qui laissait présager qu'un facteur cellulaire devait contribuer à la rétention des virions à la membrane de la cellule hôte [169]. Les chercheurs poursuivent leurs recherches et leurs observations en microscopie électronique permettent de visualiser l'interaction moléculaire entre les particules virales et la membrane de la cellule infectée. Ce n'est qu'en 2008 que l'équipe de Bieniasz parallèlement à l'équipe de Guatelli identifient la protéine tétherine encodée par le gène BST2 (*Bone marrow stromal cell antigen 2*) [170, 171]. L'action protectrice de tétherine est abolie par Vpu qui la séquestre des endosomes et la dirige vers les lysosomes pour être dégradée [172, 173].

1.3.6 Implication des DCs dans la pathogénèse de l'infection à VIH-1

Une réplication efficace du VIH-1 demande une contribution concertée des divers facteurs cellulaires desquels le virus tire avantage. Plusieurs investigations menées récemment montrent le rôle critique des CPAs telle la DC durant la pathogénèse de l'infection à VIH-1

[51, 174]. En effet, due à leur localisation ubiquitaire, les DCs sont les premières cellules à entrer en contact avec le virus. Elles peuvent donc transmettre facilement les virions aux lymphocytes T qu'elles activent. De plus, suite à leur maturation stimulée par un pathogène, elles migrent grâce au récepteur CCR7 vers les organes périphériques assurant ainsi une dissémination généralisée du virus [175]. Il semblerait que la lectine de type C DC-SIGN, fortement exprimée sur les DCs des muqueuses, favoriserait une infection en *trans* des lymphocytes T CD4+ [176, 177]. Ce récepteur possède une grande affinité pour la protéine de l'enveloppe virale gp120. Il engouffre le VIH-1 en périphérie et aiderait à son transport vers les organes lymphoïdes secondaires peuplés par les lymphocytes T disséminant ainsi le virus dans l'organisme [176]. Il accroît aussi la virulence du VIH-1 en augmentant l'exposition du site de liaison au CD4 de la protéine de l'enveloppe virale. Les DCs expriment également d'autres récepteurs qui permettent à la gp120 de s'attacher: Langerin, DCIR, *etc* [178]. D'un autre côté, les investigations dirigées par Loré *et al.* montrent que l'induction d'une réponse de la cellule T par un antigène spécifique présenté par la DC entraîne une infection et une délétion préférentielle des lymphocytes T CD4+ réagissant au pathogène [174]. Ceci pourrait expliquer les décès reliés aux maladies dites opportunistes. Enfin, les DCs contribuent à la persistance virale chez l'hôte car elles peuvent potentiellement se transformer en réservoir de longue durée de vie [179-181]. Bien que les DCs expriment les deux corécepteurs CXCR4 et CCR5 et le récepteur CD4 comme les lymphocytes T CD4+, elles sont toutefois peu infectées par le VIH-1. SAMHD1, un facteur de restriction présent chez les DCs, serait en grande partie responsable de ce manque de susceptibilité à l'infection à VIH-1. De plus, les DCs possèdent des facteurs intrinsèques leur permettant de détecter cette infection virale et de déclencher rapidement une réponse immune [182]. Cette défense antivirale dépend de l'interaction entre la capsid du VIH-1 et la protéine cellulaire cyclophiline A qui active le facteur de transcription IRF3 [182].

1.3.7 Vaccins thérapeutiques à base de DC

À travers leurs fonctions de capture, d'apprêtement et de présentation d'antigène aux lymphocytes T, les DCs représentent une composante essentielle lors du design d'un vaccin thérapeutique [133]. Elles sont par ailleurs réputées meilleures CPA et ont une capacité

prodigieuse à réguler l'immunité des cellules T. Leur diversité tant sur le plan de leur sous-population que de leur plasticité est indubitablement bénéfique pour la conception d'un vaccin [183]. Les DCs sont souvent incorporées dans les vaccins à titre d'adjuvant mais l'idée de les utiliser dans un vaccin immunothérapeutique contre le cancer n'a émergé que tout récemment. Elle a par ailleurs démontré son efficacité chez des souris possédant des tumeurs [184]. La difficulté avec les cellules cancéreuses c'est que leurs antigènes sont un mélange d'antigène du soi et du non-soi. La discrimination ne se fait pas aisément entre les deux, il faut donc induire une faille dans la tolérance immunitaire sans toutefois aboutir à une auto-immunité.

Les DCs peuvent sécréter de l'IL-12 et par conséquent permettre la génération de lymphocytes T CD4⁺ de type 1 (Th1) produisant de l'interféron- γ qui est primordial pour l'immunité contre les pathogènes intracellulaires et le contrôle tumoral [185, 186]. De plus, cela favorise le *priming* des cellules T CD8⁺ naïves [187]. Lorsque ces dernières interagissent avec le CMH de classe I d'une DC complexé à un peptide spécifique de tumeurs, elles se différencient en CTL qui sont requises pour l'élimination des cellules tumorales [188]. Les DCs exprimant soit CD1c ou CD141 et provenant du sang périphérique ou des tissus ont la capacité d'effectuer la présentation croisée des longs peptides dérivés des antigènes des tissus de mélanomes (MART-1) aux cellules T et ainsi guider la réponse antivirale orchestrée par les cellules T CD8⁺ [189, 190]. De plus, la communication des DCs avec ces cellules est facilitée par la sécrétion de la chimiokine CX3CL1. La sécrétion de TGF- β par les DCs est cruciale pour induire l'expression de CD103 chez les lymphocytes CD8⁺ afin que celles-ci acquièrent un phénotype mucosal. Dans un même ordre d'idée, la sécrétion d'IL-12 est un facteur déterminant de la qualité des cellules T CD4⁺ auxiliaires qui à son tour a une influence sur la qualité de la différenciation des lymphocytes T surtout en cellules mémoires.

Les DCs résidant dans la peau exhibent une hétérogénéité au niveau de leur fonction et de leur phénotype ce qui contribue à une réponse immunitaire efficace. Par exemple, les cellules de Langerhans possèdent une habileté à sécréter de l'IL-15 et à moduler à la hausse l'expression de CD70, les rendant très compétentes pour le *priming* de lymphocytes T CD8⁺ [191].

À partir de toutes ces caractéristiques, il y aurait 3 stratégies à concrétiser pour l'élaboration d'un vaccin anti-cancer à base de DC [188]. D'abord, la première méthode serait d'inclure des peptides non-ciblés ou des protéines et des acides nucléiques qui seraient capturés

par les DCs *in vivo*. Ensuite, l'idée d'un vaccin composé d'antigènes directement couplés à des anticorps de DC a germé. Enfin, le dernier scénario qui a jailli met des DCs générées *ex vivo* chargées d'antigènes à l'action pour concevoir un vaccin. Bien évidemment, les recherches continuent encore aujourd'hui et sont orientées vers une de ces trois stratégies.

Récemment, l'équipe de Felipe Garcia *et al.* a démontré la faisabilité d'un vaccin anti-VIH basé sur des DCs autologues. En effet, pour la conception de leur vaccin, ils ont utilisé des DCs pulsées avec des virions entiers de VIH. Ceci a mené à un meilleur contrôle de la réplication virale et une augmentation constante de la réponse des lymphocytes T CD4+ spécifiques au virus [192]. Leurs études se poursuivent pour élaborer un vaccin qui pourrait complètement guérir du VIH-1.

1.4 AUTOPHAGIE

Le terme autophagie provient des mots grecs « auto » et « phagos » qui se traduisent littéralement par se manger soi-même. C'est à la suite d'observations de dégradation des mitochondries à l'intérieur des lysosomes que Christian de Duve dénomme ce phénomène biologique ainsi [193]. L'autophagie est un processus catabolique hautement conservé chez les eucaryotes avec plus de 32 gènes (ATG: *autophagy-related genes*) identifiés chez la levure [194]. La plupart de ces gènes ont des orthologues chez les mammifères dont l'humain. Il existe trois types d'autophagie qui partagent comme point commun la dégradation de protéines cytosoliques dans les lysosomes: la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes et la macroautophagie. Ces trois variantes se distinguent principalement par leur manière d'engouffrer les protéines cargo. Durant la microautophagie, les composantes cytosoliques à dégrader sont recueillies par l'invagination de la membrane du lysosome. En ce qui concerne l'autophagie médiée par les chaperonnes, le matériel cytoplasmique est complexé avec les chaperonnes et transloqué à travers la membrane lysosomale pour être dégradé. Enfin, lors d'une macroautophagie, les protéines cargo sont séquestrées par une vacuole composée d'une double membrane lipidique appelée phagophore [195]. Dû à un intérêt grandissant pour la macroautophagie inhérent à une accumulation d'évidences supportant son rôle dans de nombreuses maladies, le présent projet de recherche se concentre sur ce type d'autophagie. La macroautophagie sera donc référée sous l'appellation d'autophagie dans les lignes qui suivent.

1.4.1 Le complexe protéique *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR)

L'autophagie est gouvernée par de nombreux gènes possédant des fonctions très diversifiées notamment de lipase, de kinase et de protéase. Toutefois, la protéine-clé de cette voie demeure la sérine/thréonine kinase mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) de 289 kDa. Elle appartient à la famille des phosphoinitide 3-kinase (PI3K). Elle est intégrée dans un réseau modulant une panoplie de voies métaboliques à travers un vaste ensemble d'effecteurs. Son rôle capital de senseur de stress exerce un contrôle négatif sur l'autophagie. En effet, lorsque mTOR est inhibé, le processus catabolique est enclenché et inversement. La protéine mTOR est en fait un ensemble protéique multidomaine formé par les complexes 1 (mTORC1) et 2 (mTORC2) de mTOR [196]. Les différences majeures entre mTORC1 et mTORC2 résident essentiellement dans leur constitution protéique, leur sensibilité à la rapamycine et leurs fonctions biologiques.

Cinq protéines composent mTORC1 : mTOR, Raptor (*Regulatory-associated protein of mTOR*), mLST8 ou GβL (*mammalian lethal with Sec 13 protein 8*), PRAS40 (*Proline-Rich AKT Substrate 40 kDa*) et Deptor (*DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*) [197, 198]. Leur rôle exact reste sujet à enquête. mTOR représente la sous-unité catalytique du complexe. On associerait à Raptor des activités de régulation de l'assemblage du complexe ainsi que de recrutement de substrats pour mTOR [199]. Le rôle de mLST8 demeure nébuleux étant donné que sa délétion ne montre pas d'impact sur les fonctions de mTORC1 *in vivo* [200]. Enfin, des études proposent que PRAS40 et Deptor exercent distinctement une régulation négative de mTORC1 [197, 201].

En ce qui a trait au complexe mTORC2, il est composé de 6 protéines: Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), Protor-1 (*Protein observed with Rictor-1*), mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase interacting protein*) en plus de mTOR, mLST8 et Deptor qui sont communs à mTORC1 [198]. Encore une fois, la fonction exacte de ces protéines reste à être élucidée.

La sensibilité de mTORC1 et mTORC2 à la rapamycine, un macrolide bactérien, permet aussi de distinguer ces deux complexes [202]. Lorsque la rapamycine entre dans la cellule, elle se lie à la protéine *FK506-binding protein of 12 kDa* (FKBP12). Ce conjugué

interagit à son tour avec le domaine FRB (FKBP12-rapamycin binding domain) de mTOR ce qui résulte en l'inhibition de ce dernier. À l'opposé, le complexe FKBP12-rapamycine ne peut pas interagir avec mTORC2. Par conséquent, mTORC1 a été identifié comme le complexe sensible à la rapamycine en contraste avec mTORC2 qui y est insensible. Néanmoins, cette caractérisation est contestée par des récentes études montrant qu'un traitement prolongé de mTORC2 à la rapamycine peut dans certains cas entraver son assemblage [203]. À cela s'ajoute des travaux de recherche qui sous-tendent que certaines fonctions cruciales de mTORC1 ne sont pas inhibées par la rapamycine [204-206]. Plusieurs analogues de la rapamycine, appelés rapalogues, ont été synthétisés et commercialisés: everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), deferolimus (AP23573, MK-8669), *etc* [207].

Découlant de leur constitution protéique mais aussi de leur résistance à la rapamycine, les complexes 1 et 2 de mTOR exercent des fonctions différentes qui continuent d'être explorées. mTORC1 concentre ses activités dans la régulation de la croissance, la prolifération et le métabolisme cellulaire. À cet effet, il possède l'habileté d'intégrer divers stimulus comme les facteurs de croissance, le niveau d'énergie indiqué par l'ATP, le taux d'oxygène et les acides aminés. Lorsqu'un facteur de croissance se lie à son récepteur membranaire, une transduction du signal est engendrée activant mTORC1. À son tour, ce complexe va réguler la synthèse protéique via la phosphorylation des facteurs de transcription *Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1* (4E-BP1), pour favoriser une traduction cap-dépendante et *p70 ribosomal S6 kinase* pour accroître la synthèse d'ARNm, promouvoir la traduction et l'élongation et assurer une biogénèse des ribosomes [208, 209]. mTORC1 régule également la biosynthèse des lipides, essentielle à la croissance cellulaire, via la modulation de l'activité des facteurs de transcription *sterol regulatory element binding protein 1* (SREBP1) et *peroxisome proliferator-activated receptor- γ* (PPAR γ) [210]. Ces deux protéines contrôlent l'expression d'effecteurs qui maintiennent l'homéostasie des lipides et du cholestérol. Par ailleurs, l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine diminue le niveau de phosphorylation de la lipine-1, un acide phosphatique impliqué dans la synthèse des glycérolipides et dans la co-activation de nombreux facteurs de transcription reliés au métabolisme lipidique [211]. Bien évidemment, mTORC1 est impliqué dans le mécanisme de l'autophagie qui sera discuté plus en détail ultérieurement.

Quant à mTORC2, son rôle est beaucoup moins bien caractérisé que mTORC1. Des travaux dirigés par Sarbassov *et al.* démontrent qu'il régule la survie, la prolifération ainsi que le métabolisme cellulaire en phosphorylant AKT (aussi connue sous le nom de protéine kinase B), une sérine/thréonine kinase au cœur de ces différentes voies métaboliques [212]. De plus, mTORC2 agirait sur l'organisation du cytosquelette. En effet, des études montrent que l'inactivation des gènes constituant mTORC2 influence la polymérisation de l'actine et affecte la morphologie cellulaire par divers mécanismes : promotion de la phosphorylation de la protéine kinase C α , phosphorylation et relocalisation de la paxiline aux adhésions focales et chargement en GTP de RhoA et Rac1 [213].

1.4.2 Mécanisme moléculaire de l'autophagie

Le processus d'autophagie peut se résumer en 5 grandes étapes qui sont l'isolation d'un phagophore, son élongation et sa maturation, sa fusion avec un lysosome pour former un autophagolysosome et enfin la dégradation des protéines cargo. Les nombreux gènes gouvernant l'autophagie possèdent des fonctions très diversifiées notamment comme lipase (ATG15), kinase (ATG1) et protéase (ATG4).

Tableau 1. Protéines impliquées dans la voie de l'autophagie

Protéine	Fonction	Étape de l'autophagie
mTOR	Sérine/thréonine kinase	initiation
ATG5	E3 ubiquitine ligase	Élongation de l'autophagosome
LC3-I, LC3-II	E3 ubiquitine ligase	Élongation de l'autophagosome
p62/sequestosome1	Protéine échafaudrice	Dégradation de la protéine cargo

L'autophagie est initiée à la suite d'un stress cellulaire telle que la carence en nutriment, la présence de pathogène ou l'absence de facteurs de croissance. Dépendamment, du stimulus détecté, plusieurs voies de signalisation peuvent être activées comme celle des PI3K, l'AMP kinase ou encore Ras. En somme, la transduction du signal aboutit à l'inhibition

du complexe mTORC1 la protéine-clé du processus d'autophagie. Cette inhibition de mTORC1 empêche la phosphorylation du complexe ULK1, composé de ULK, FIP200 et ATG13, qui se détache alors de mTORC1 pour aller se fixer au réticulum endoplasmique (RE). Le complexe PI3kinase de classe III, formé de Beclin-1, vps34 et Atg14L, va à son tour s'attacher au RE via Atg14. La protéine vps34 commence alors à générer un *pool* de phosphatidylinositol-3-phosphate qui sera reconnu par la *double FYVE-containing protein 1* (DFCP1). Cette dernière se charge de synthétiser un omégasome, un intermédiaire de l'autophagosome [214]. La protéine de l'autophagie WIPI2 s'ancre aux omégasomes et initie la formation de l'autophagosome [215]. Le complexe Atg12-Atg15 est recruté par Atg16 vers le RE pour l'élongation du phagophore jusqu'à l'obtention de l'autophagosome. Il participe également à la lipidation de LC3-I [216]. La protéine LC3 existe sous deux formes soit cytosolique LC3-I, soit lipidique LC3-II via l'ajout d'un groupement phosphatidylethanolamine. Cette conversion est effectuée par la cystéine protéase ATG4B et permet à LC3-II de s'insérer dans l'autophagosome et de contribuer à la biogénèse de cette structure. Cette modification moléculaire de même que l'élongation de l'autophagosome permettent de suivre l'activité autophagique. Une fois la synthèse de cette vésicule complétée, les protéines cargo, c'est-à-dire celles qui sont destinées à être dégradées s'y lient via la protéine p62 qui agit comme échafaud. LC3-II est soit recyclé, soit reconverti en LC3-I via ATG4B. L'autophagosome mature et fusionne avec un lysosome selon un mécanisme qui reste à être caractérisé mais qui implique la petite protéine G Rab7 et une interaction entre les protéines Beclin-1 et Vps34 du complexe de PI3K [217, 218]. Cette fusion donne naissance à une nouvelle structure appelée autophagolysosome et aboutit à la dégradation des protéines cargo sous l'action des hydrolases. Les fragments d'acides aminés générés sont relâchés dans le cytosol à travers les perméases.

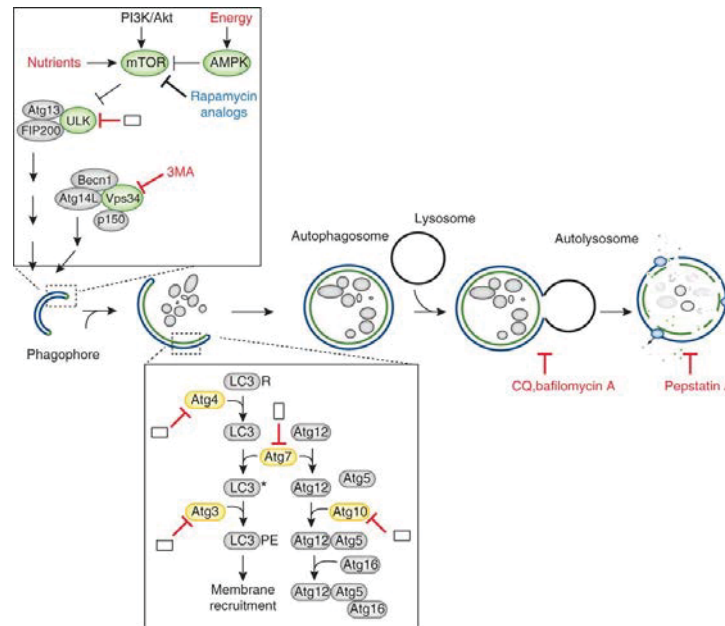


Figure 7. Mécanisme moléculaire de la voie de l'autophagie [219]. Reproduction autorisée par Dr. Heesun Cheong.

1.4.3. Rôle de mTOR dans le vieillissement

Les premières évidences suggérant un rôle modulateur de mTOR dans le vieillissement proviennent d'étude chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [220]. Les travaux montrent qu'une délétion du gène S6K aboutit à une augmentation considérable de la durée de vie de la levure soit le double du temps initial. Les recherches se sont poursuivies chez *C. elegans* et démontrent qu'une mutation ou encore un *knockdown* par ARNi de mTOR allonge la durée de vie chez ce nématode [221, 222]. L'augmentation de la durée de vie passe également par une restriction diététique qui inhibe l'expression de mTOR. Les mécanismes par lesquels mTOR participe au prolongement de la durée de vie restent incertains. Des indices laissent croire que c'est un ensemble d'effecteurs qui contribuent à ce phénomène. Par exemple, la répression de mTOR promeut la synthèse de protéines. D'un autre côté, la voie de l'autophagie décline avec le temps ce qui pourrait aboutir à une accumulation de déchets cellulaires tels des métabolites de la mitochondrie, des agrégats protéiques qui seraient en temps normal éliminés par cette voie métabolique.

1.4.4 Rôle de l'autophagie dans l'immunité innée et adaptative

L'autophagie est l'un des plus anciens mécanismes élaborés par la cellule pour se défendre contre les microorganismes intracellulaires et pour maintenir une homéostasie. La vaste gamme de responsabilités qu'elles possèdent dans l'immunité peut être groupé en 4 catégories qui sont : rôle effecteur versus régulateur, fonction de l'immunité innée versus adaptative, propriétés inflammatoires versus anti-inflammatoires et rôle d'une cellule immune spécifique et spécialisée *versus* une cellule générique homéostatique [223]. Ceci illustre la dualité fonctionnelle de l'autophagie qui est bénéfique pour la cellule.

Au niveau de l'immunité innée, cette voie métabolique peut être activée à la suite de la reconnaissance d'un PAMP par un PRR ou par la liaison d'un anticorps avec son récepteur FcY [224-227]. Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS: *Reactive oxygen species*) sont aussi capable d'amorcer l'autophagie [228]. En aval de la voie des PRR, le facteur de transcription NF-κB est activé afin de permettre la production de cytokines et la survie cellulaire notamment [229]. En ce qui concerne l'immunité adaptative, l'autophagie participe à la présentation antigénique de concert avec le CMH de classe II en engouffrant les pathogènes intracellulaires, des protéines cytosoliques et les antigènes synthétisés par la cellule hôte à l'aide de ses vésicules [230]. De plus, cette voie catabolique façonne la tolérance centrale à travers la sélection thymique du répertoire de cellule T [231]. Elle agit sur l'homéostasie des cellules T et B [232, 233]. Enfin, elle permet également de spécialiser les fonctions des granulocytes des cellules de Paneth de l'épithélium intestinal [234].

1.4.5 Rôle de l'autophagie dans les maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes regroupent un ensemble hétérogène de maladies complexes qui affectent divers organes ou systèmes [235]. Un ensemble de facteurs génétiques et environnementaux serait la cause de ces maladies [236]. L'auto-immunité découle de l'évasion d'une cellule T auto-réactive du thymus vers la périphérie expliquée par l'absence d'un antigène spécifique reconnu dans cet organe [237]. Au cours de l'auto-immunité, les cellules T auxiliaires qui ont réussi à échapper au mécanisme de tolérance du soi vont provoquer une inflammation par la production de cytokines [238]. Ceci va contribuer à la différenciation des cellules B auto-réactives qui vont produire des anticorps contre le soi et

ainsi causer des dommages tissulaires [239].

Dernièrement, une hypothèse formulait que l'auto-immunité pouvait être induite à la suite d'une augmentation exhaustive de l'autophagie [240]. Ceci entraînerait une augmentation de la survie des cellules auto-réactives et réduirait leur mort par apoptose [240]. Néanmoins, plusieurs évidences se sont accumulées pour démontrer qu'une altération de l'autophagie, via par exemple une mutation des gènes de l'autophagie, était impliquée dans la progression de plusieurs maladies auto-immunes tels le psoriasis, le vitiligo, la sclérose en plaques multiples, les maladies inflammatoires chroniques intestinales, l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé [235, 240].

1.4.6 Rôle de l'autophagie dans la pathogénèse à VIH-1

Étant donné l'importance du processus autophagique dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, il va de soi que le VIH-1 va contourner et même tirer avantage de cette voie métabolique pour sa survie. Un article publié en 2010 dans le journal *Immunity* par l'équipe de Vincent Piguet montre que le mécanisme d'autophagie est altéré chez les DCs lors de l'infection à VIH-1 [241]. D'abord, les protéines virales de l'enveloppe activent mTOR de manière exhaustive ce qui entraîne une défaillance de l'activation des TLR4 et 8 et entrave la transduction du signal pour la mise en place d'une réponse immunitaire adéquate. De plus, une infection à VIH-1 induit une réduction de LC3-II conjointement à une accumulation de p62 suggérant une perturbation du flux autophagique qui empêche la dégradation des protéines cargo. La répression de l'expression des protéines de l'autophagosome LC3 et ATG5 augmente la quantité de Gag associée aux cellules et promeut une infection en *trans* par les DCs aux lymphocytes T CD4+. Plusieurs autres études soulignent l'importance de l'autophagie lors de l'infection à VIH-1. Notamment, des travaux révèlent que le virus utilise la membrane autophagosomale comme échafaud pour l'assemblage de ses virions [242]. Lorsque les virions complets ou incomplets entrent dans la cellule via la voie de l'endocytose, ils peuvent être dégradés par l'autophagie. C'est pourquoi le VIH-1 va abroger les phases tardives de cette voie métabolique pour éviter la digestion par les autophagolysosomes [243].

1.4.7 La rapamycine, un inhibiteur de mTOR

La rapamycine est un macrolide découvert en 1975 sur l'île de Pâques par Suren Seghal [244]. Elle a été identifiée et caractérisée chez la bactérie *Streptomyces hygroscopicus*. Elle inhibe l'expression de mTOR en se liant à la protéine FKBP12 ce qui active le processus d'autophagie. La rapamycine possède plusieurs propriétés bénéfiques au système immunitaire. Elle exerce un effet immunostimulateur sur la différenciation des cellules T CD8+ mémoires en augmentant la quantité et la qualité de ces cellules induites par infection virale ou par vaccination [245]. Il a été démontré que son utilisation prolonge la durée de vie chez différentes espèces dont le ver, la souris, la mouche et la levure [246]. La rapamycine contribue à la diversification des immunoglobulines. En effet, cet antibiotique favorise la formation des centres germinaux et inhibe le changement de classe des lymphocytes B ce qui génère un répertoire unique d'anticorps contre le virus d'influenza [247]. De plus, il possède des activités anti-tumorales qui sont toujours sujets à investigation. Notamment, la rapamycine régule l'expression d'HIF-1 α et permet donc l'inhibition de l'adaptation cellulaire en cas d'hypoxie pour empêcher la tumorigénèse et l'angiogénèse [248]. Ces propriétés ont été transposées au niveau clinique et ont permis l'approbation de la rapamycine par la *Food and Drug Administration* (FDA) à titre d'agent anticancéreux et immunosuppresseur pour contrer les rejets de greffe lors des transplantations. Par ailleurs, on observe un meilleur contrôle de la réplication virale chez les patients infectés ayant subi une transplantation hépatique sous monothérapie de rapamycine [249]. Au niveau des maladies neurodégénératives, il a été démontré que ce macrolide favorise l'élimination de protéines neurotoxiques dans les maladies telles que la chorée de Huntington et l'Alzheimer [250]. Enfin, plus spécifiquement dans le contexte de la pathogénèse de l'infection à VIH-1, la rapamycine inhibe la progression de l'infection. Elle entraîne une répression de l'expression de CCR5 et une augmentation de la sécrétion de MIP-1 α et MIP-1 β qui sont les ligands naturels de ce récepteur entraînant alors une compétition avec les protéines de l'enveloppe pour un site de fixation [251]. Elle procure un effet synergique lorsque combiné avec l'antagoniste de CCR5 vicriviroc qui se montre plus efficace contre les souches de VIH-1 résistantes aux drogues [252]. La rapamycine accroît également la production de TNF induite par l'engagement du TLR4 et supprime la sécrétion d'IL-10 chez les patients VIH+ asymptomatiques [253]. Elle régule la balance de la

différenciation entre les Treg et Th17, une population hautement permissive à l'infection à VIH-1, en modulant l'expression de HIF1 α , requis pour le programme glycolytique des Th17 [254].

2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Ces travaux de recherche s'inscrivent dans un plus vaste programme de recherche dans le laboratoire de la Dre Petronela Ancuta, programme financé par les IRSC, qui vise à caractériser les propriétés fonctionnelles des MDDC CD16+ et CD16- dans le contexte de la pathogénèse de l'infection à VIH-1. Des études menées au laboratoire révèlent que les MDDC CD16+ *versus* CD16- ont une capacité accrue à transmettre le VIH-1 aux cellules T CD4+ conjointement à un potentiel immunogène altéré. Il a été démontré que la voie de la présentation antigénique croise celle de l'autophagie. Plus récemment, un papier publié par Blanchet *et al.* démontre que l'autophagie est inhibée dans les DCs exposées au VIH. S'échafaudant sur l'ensemble de ces observations, mon projet de maîtrise s'intéresse donc plus particulièrement à l'altération de la voie de l'autophagie dans les MDDC totales lors d'une infection à VIH-1 *in vitro*. Nous avons formulé l'**hypothèse** selon laquelle **l'autophagie contrôle la capacité des MDDC à présenter l'antigène et leur habilité à transmettre le VIH aux lymphocytes T CD4+**. Ultiment, nous souhaitons reproduire les résultats obtenus avec les MDDC totales sur les sous-populations dérivées des monocytes CD16+ et CD16-.

Nous avons divisé notre projet en 2 volets comportant chacun plusieurs objectifs.

Partie #1: Effet du VIH sur les propriétés fonctionnelles des DCs *in vitro*

Objectif #1 : Caractériser le phénotype des MDDC totales exposées au VIH-1 *in vitro*

Objectif #2: Quantifier l'expression des protéines liées à la régulation positive (*i.e.*, ATG5, LC3, p62) et négative (*i.e.*, mTOR) de l'autophagie dans les MDDC totales

Objectif #3: Déterminer le rôle de l'autophagie dans la *trans* infection du VIH aux lymphocytes T CD4+

Objectif #4: Explorer l'impact de l'autophagie sur la présentation antigénique par les MDDC totales infectées à VIH-1 *in vitro*

Partie #2: Persistance du VIH-1 dans les cellules myéloïdes chez les sujets infectés par le VIH-1 sous thérapie antirétrovirale

Objectif #1: Détecter des formes précoces de transcription inverse dans les monocytes des sujets infectés par le VIH-1

Objectif #2: Quantifier la réplication virale dans les macrophages dérivés de monocytes des sujets infectés par le VIH-1

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Obtention des leucaphérèses de sujets sains et infectés

Le recrutement de sujets sains a été réalisé par l'intermédiaire du Dr. Jean-Pierre Routy à l'Hôpital Royal Victoria affilié à l'Université McGill. Chaque participant a donné son consentement éclairé qui a été approuvé par un comité éthique interne. Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC; *Peripheral blood mononuclear cell*) ont été recueillies par leucaphérèse.

Tableau 2. Caractéristiques cliniques des patients infectés à VIH-1.

ID du donneur	Compte de CD4 ¹	Charge virale ²	Temps depuis l'infection ³	ART
1	368	1705	-	Non
2	560	50	-	Oui
3	571	5897	7	Non
4	269	40	-	Oui
5	391	40	165	Oui
6	433	40	15	Oui
7	318	40	12	Oui

¹: cellules/ μ L ; ²; copies d'ARN de VIH par mL de plasma; ³: en mois

3.2 Isolement des PBMC par gradient de Ficoll

Les PBMCs (DCs, basophiles, lymphocytes B et T, monocytes, et cellules NK) ont été isolées des autres types cellulaires (granulocytes, globules rouges et plaquettes) par centrifugation des leucaphérèses sur gradient de *Lymphocytes separation medium* (LSM ; Wisent Bioproducts Inc., Montréal, Québec, Canada). Brièvement, la poche de 200 mL de sang a été diluée dans 400 mL de milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*; Gibco, Grand Island, New York, États-Unis). Le sang a ensuite été mélangé par inversion puis déposé délicatement sur une couche de 15 mL de LSM à raison de 30 mL de sang dilué par tube. Les tubes ont été centrifugés durant 21 minutes à 2000 rpm avec une décélération à 1. Suite à cela,

les PBMCs, qui forment un anneau à la surface du LSM, ont été récupérées et lavées deux fois par centrifugation avec du milieu RPMI. Les cellules ont été comptées à l'aide d'un hémacytomètre en utilisant une solution de bleu de trypan (Gibco) pour dénombrer les cellules mortes et une solution d'ACK (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, États-Unis) pour lyser les globules rouges résiduels et les exclure du décompte. Enfin, les cellules ont été resuspendues dans du sérum de veau fœtal (FBS; Sigma-Aldrich) contenant 20% de DMSO (diméthylsulfoxyde; Sigma-Aldrich) et congelées à -80°C durant 24h avant d'être transférées dans de l'azote liquide pour éviter un choc thermique.

3.3 Isolement de cellules par MACS

Le principe d'isolation de cellules par sélection immuno-magnétique négative repose sur la déplétion, par des anticorps spécifiques couplés à des billes magnétiques, de l'ensemble des cellules d'une suspension à l'exception de la population d'intérêt. Dans le cadre de ce projet, les monocytes ainsi que les lymphocytes T CD4+ totaux ont été enrichis à partir des PBMCs par sélection négative à l'aide de trousse commerciales (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne).

Pour ce faire, les PBMCs ont été décongelées, filtrées et comptées, puis resuspendues à une concentration de 10^6 cellules / μ L dans du tampon MACS (*Magnetic-Associated Cell Sorting*) composé de PBS1x (Gibco), 10% de FBS (Sigma-Aldrich) et 2 mM d'EDTA (Bioshop, Burlington, Ontario, Canada).

Les monocytes ont ensuite été purifiés à l'aide d'une trousse d'isolement de monocytes (*Monocyte Isolation Kit II human*; Miltenyi Biotec) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, les PBMCs ont été incubées avec un agent bloquant le récepteur de la fraction cristallisable des anticorps (FcR) afin d'éliminer toute liaison non spécifique. Ensuite, un marquage primaire avec un cocktail d'anticorps monoclonaux conjugués à la biotine (anti-CD3 (lymphocyte T), CD19 (lymphocyte B), CD56 (cellules NK), glycoporine A (érythrocyte), CD123 (pDC et granulocyte basophile) et CD7 (thymocyte et cellule T mature)) a été effectué, suivi d'un marquage secondaire à l'aide d'anticorps anti-biotine couplés à des billes magnétiques. Après incubation, les cellules ont été lavées avec du tampon MACS, centrifugées et resuspendues dans ce même tampon à une concentration de 10^8 cellules/500

µL. Puis, elles ont été passées à travers une colonne MidiMACS (Miltenyi Biotec) placée dans un champ magnétique intense qui permet de retenir les cellules marquées. La fraction récupérée (éluat) correspond aux monocytes. La pureté de ces cellules a été déterminée par un marquage au FACS et est typiquement de > 95%.

Les lymphocytes T CD4⁺ ont été purifiés à l'aide d'une trousse d'isolation de cellules T-CD4⁺ (*CD4⁺ T-cell Isolation Kit II human*; Miltenyi Biotec) selon les recommandations du fabriquant. La suspension de PBMCs a d'abord été incubée avec un mélange d'anticorps biotinylés anti-CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , et CD235a (Glycophorin A) suivi d'un second marquage à l'aide d'anticorps anti-biotine couplés à des billes magnétiques. Les cellules ont été passées sur une colonne MidiMACS (Miltenyi Biotec) tel que décrit précédemment. La pureté des lymphocytes T CD4⁺ a été déterminée par marquage extracellulaire anti-CD3, CD4, et Vivid et analysée au FACS et est typiquement de > 95%.

3.4 Génération des DCs et des macrophages *in vitro*

Afin de générer des DCs dérivées des monocytes (MDDC; Figure 1A), les monocytes isolés par sélection négative (tel que décrit dans la section 3.2) ont été mis en culture dans du milieu RPMI (Gibco) contenant 2% de FBS (Sigma-Aldrich) en présence de rhGM-CSF (*recombinant human granulocyte/macrophage-colony stimulating factor*; 20 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN, États-Unis) et de rhIL-4 (20 ng/mL; R&D Systems). Les cellules ont été cultivées pendant 6 jours dans une atmosphère à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais à chaque 2 jours. La maturation des MDDC a été induite par stimulation avec 1 µg/mL de lipopolysaccharide (LPS) (Sigma) d'*Escherichia coli* (Sigma) pendant 48h à 37°C et 5% de CO₂.

Pour la génération de macrophages (MDM : *Monocyte-derived Macrophage*; Figure 1B), les monocytes ont été mis en culture dans du milieu RPMI (Gibco) contenant cette fois-ci 10% de FBS (Sigma-Aldrich) en présence de rhM-CSF (*recombinant human macrophage-colony stimulating factor*; 10 ng/mL; R&D Systems) durant 6 jours à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu de culture a été changé aux 2 jours.

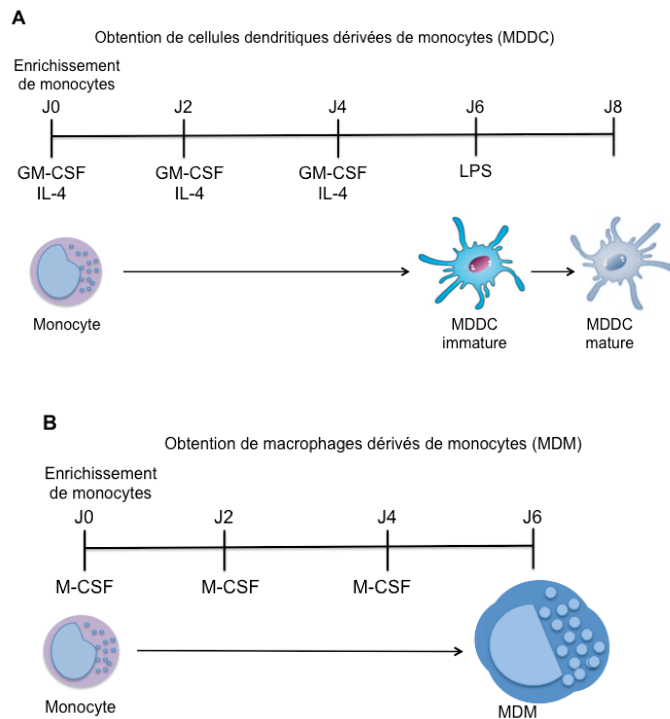


Figure 8. Différenciation des monocytes en MDDC ou MDM. (A) Les MDDC ont été générées par la mise en culture de monocytes dans du milieu RPMI contenant 2% de FBS et en présence de GM-CSF (20 ng/mL) et d'IL-4 (20 ng/mL) durant 6 jours. La maturation des MDDC a été obtenue par stimulation via la LPS (1 µg/mL) durant 48h. (B) Les MDM ont été obtenus par la mise en culture de monocytes dans du milieu RPMI contenant 10% de FBS et en présence de M-CSF (10 ng/mL) durant 6 jours.

3.5 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est un puissant outil permettant la caractérisation individuelle des cellules immunes. Cette méthode comporte trois systèmes principaux: fluïdique, optique et électronique. D'abord, la composante fluïdique assure le transport des échantillons marqués d'anticorps fluorescents dans un courant à très haut débit jusqu'au faisceau du laser. Ce dernier agit comme centre d'interrogation en illuminant les particules. La lumière diffuse engendrée par le passage de la cellule permet de recueillir des informations sur sa taille (*Forward scatter channel*, FSC) et sa granulosité (*Side scatter channel*, SSC). En parallèle, la lumière émise par la cellule est captée par divers filtres optiques et est réacheminée vers les détecteurs appropriés. Enfin, le système électronique assure la conversion de la lumière émise en un signal reconnaissable par l'ordinateur afin de révéler l'identité du fluorochrome détecté

et par conséquent de la protéine qui lui est conjuguée. Les cytomètres BD LSR II et BD AriaII (Becton Dickinson) ont été utilisés pour la présente étude et leurs paramètres sont listés dans le tableau 1.

Tableau 3. Caractéristiques du cytomètre en flux LSRIIA (Becton Dickinson)

Lasers	Détecteur	Filtre <i>Band Pass</i>	Filtre <i>Long Pass</i>	Fluorochromes
	FSC	-		<i>Forward Scatter</i>
	SSC	488/10		<i>Side Scatter</i>
Bleu 488 nm	B	530/30	502LP	FITC, Alexa488, GFP, CFSE, BB515,
	A	710/20	690LP	PerCP-Cy5.5, PerCP-eFluor 710
	A	670/14	635LP	PerCP, 7AAD
	C	660/20	-	APC, Alexa-647, DiD
Rouge 640 nm	B	720/30	690LP	APC-Cy5.5, Alexa680, Alexa700
	A	780/60	740LP	APC-Cy7, APC-H7, APC-eFluor780
	F	440/40	-	Pacific Blue, V450, e-fluor450, DAPI, BV421, Alexa405
Violet 405 nm	E	525/50	505LP	AmCyan, V500, e-fluor506, Aqua Vivid, Pacific Orange, Alexa430
	D	610/20	600LP	Qdat 605, 8V605
	C	660/20	630LP	e-fluor650, BV650
	B	710/50	690LP	BV711
	A	780/60	750LP	BV786
Jaune-vert 561 nm	E	586/15	-	PE, TD-Tomato, RFP
	D	610/20	600LP	PE-TxRed, ECD, PI, PE-CF594, DsRed, Alexa594, M-Cherry
	C	670/14	635LP	PE-Cy5, 7AAD
	B	710/50	685LP	PECy5.5
	A	780/60	750LP	PE-Cy7

Tableau 4. Caractéristiques du cymomètre en flux LSRIIB (Becton Dickinson)

Lasers	Décteur	Filtre	Filtre	Fluorochromes
		<i>Band Pass</i>	<i>Long Pass</i>	
Bleu 488 nm	FSC	-		<i>Forward Scatter</i>
	SSC	488/10		<i>Side Scatter</i>
	B	530/30	505LP	FITC, Alexa488, GFP, CFSE, BB515, YFP
	A	710/50	690LP	PerCP-Cy5.5, PerCP-eFluor 710
	A	670/14	635LP	PerCP, 7AAD
Rouge 663 nm	C	670/14	-	APC, Alexa-647, CV5, DiD
	B	720/30	690LP	APC-Cy5.5, Alexa680, Alexa700
	A	780/60	740LP	APC-Cy7, APC-H7, APC-eFluor780
Violet 405 nm	F	450/40	-	Pacific Blue, V450, e-fluor450, DAPI, BV421, Alexa405
	E	525/50	505LP	AmCyan, V500, e-fluor506, Aqua Vivid, Pacific Orange, Alexa430
	D	610/10	600LP	Qdat 605, 8V605
	C	660/20	630LP	e-fluor650, BV650
	B	710/50	690LP	BV711
Jaune-vert 561 nm	A	780/60	750LP	BV786
	E	586/15	-	PE, TD-Tomato, RFP
	D	610/20	600LP	PE-TxRed, ECD, PI, PE-CF594, DsRed, Alexa594, M-Cherry
	C	670/14	635LP	PE-Cy5, 7AAD
	B	695/40	685LP	PECy5.5, 7AAD
UV 355 nm	A	780/60	750LP	PE-Cy7
	B	379/28	-	BUV395
	A	740/35	690LP	BUV737

3.5.1 Marquage de surface et analyse phénotypique

Pour procéder au marquage de protéines extracellulaires, les cellules ont d'abord été lavées avec du tampon FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) composé de PBS 1X (Gibco), 10% de FBS (Sigma) et 0,02% d'azide de sodium (Sigma). Puis, elles ont été marquées avec des anticorps spécifiques dirigés contre des protéines membranaires durant 30 minutes à 4°C dans l'obscurité. Les cocktails d'anticorps utilisés pour chaque expérience sont présentés dans le Tableau 2. Les cellules ont ensuite été lavées avec le tampon FACS afin d'éliminer l'excès d'anticorps non couplés. Enfin, les cellules ont été fixées avec un tampon de fixation contenant du tampon FACS et 2% de paraformaldéhyde (Sigma).

Le Vivid (*Molecular Probes® LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain kits*, Life Technologies, Carlsbad, CA, États-Unis) a aussi été ajouté au cocktail d'anticorps afin de pouvoir discriminer entre les cellules vivantes et mortes. C'est un réactif fluorescent qui interagit de manière covalente avec les amines situées à l'intérieur comme à l'extérieur des cellules mortes. En effet, les cellules nécrosées ont une membrane endommagée ce qui permet au vivid de s'y infiltrer. Chez les cellules vivantes, le vivid ne peut que se lier aux amines localisées à la surface cellulaire. Par conséquent, les cellules mortes émettent une fluorescence beaucoup plus élevée que celles qui sont vivantes.

L'analyse phénotypique a été réalisée par cytométrie en flux multicolore. L'usage de billes de compensations (BD CompBeads, Anti-Mouse Ig et *Negative Control*, BD Biosciences) marquées d'un seul anticorps est requis pour établir des contrôles positifs-pour chaque fluorochrome. Des cellules non marquées ont été employées à titre de contrôle négatif. Additionnellement, l'usage de contrôles *Fluorescence Minus One* (FMO) permet de délimiter les fenêtres de positivité. Dans ces tubes contrôles, tous les anticorps sauf un sont rajoutés afin de déterminer les fenêtres de positivité en tenant compte des chevauchements des émissions de fluorescence pour chaque anticorps dans l'ensemble du cocktail.

L'acquisition et l'analyse des résultats s'effectuent grâce au logiciel DIVA 10.0 (BD FACSDiva 10.0 Software, BD Biosciences) ou FlowJo vX.07 (FlowJo 10.0.7r2, Tree Star) installés sur des ordinateurs connectés à un cytomètre.

Tableau 5. Liste des anticorps et fluorochromes associés aux diverses expériences

Expérience	Anticorps	Fluorochrome	Compagnie
Test de purification de monocytes	CD3	Pacific Blue	BD Biosciences
	CD4	Alexa 700	BD Biosciences
	CD14	FITC	Beckman Coulter
	CD16	PE-CY5	Beckman Coulter
	HLA-DR	APC	BD Pharmingen
	-	Vivid	InVitrogen
Analyse phénotypique de la maturation des MDDC	CD1c	PE	Miltenyi
	CD83	PE-CY5	Beckman Coulter
	CCR7	PE-CY7	BD Pharmingen
	HLA-DR	APC	BD Pharmingen
	CD14	FITC	Beckman Coulter
	-	Vivid	InVitrogen
Étude de la présentation antigénique par les MDDC aux lymphocytes T CD4+ par une dilution de la CFSE	CD3	Pacific Blue	BD Biosciences
	CD1c	PE	Miltenyi
	-	Vivid	InVitrogen
Évaluation de la <i>trans</i> infection des lymphocytes T CD4+ par les MDDC avec un virus NBaL-GFP	CD3	Pacific Blue	BD Biosciences
	CD1c	PE	Miltenyi
	-	Vivid	InVitrogen

3.5.2 Tri cellulaire au FACS des monocytes CD16- et CD16+

Le tri cellulaire des monocytes CD16+ et CD16- a été réalisé par FACS. Les monocytes totaux ont d'abord été isolés à partir des PBMCs de sujets sains par sélection négative avec des billes magnétiques (Miltenyi) tel que décrit précédemment (section 3.2). Les monocytes ont été marqués avec un cocktail d'anticorps incluant anti-CD16, CD3, CD7, CD19, CD56, et CD1c. Les monocytes CD16+ et CD16- n'exprimant pas CD3, CD7, CD19, CD56, et CD1c ont été triés au FACS (BD Aria). La pureté des monocytes isolés est typiquement >99%.

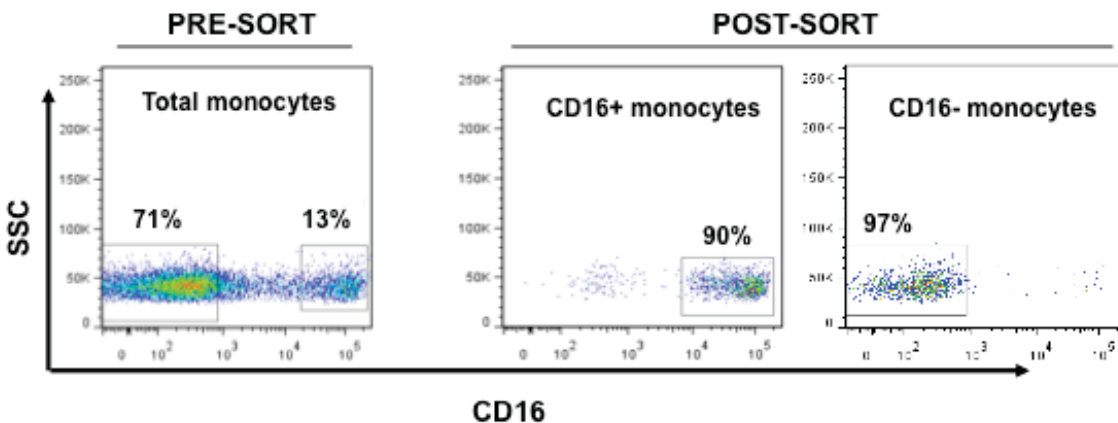


Figure 9. Pureté d'un tri cellulaire par cytométrie en flux.

3.6 Immunobuvardage de type *Western* des protéines de l'autophagie

L'immunobuvardage de type *Western* est une technique biochimique destinée à la détection et à la quantification relative de protéines spécifiques dans un mélange. Les protéines sont séparées en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel et ensuite transférées sur une membrane. Puis, celle-ci est incubée avec des anticorps spécifiques. Enfin, ces anticorps sont révélés selon différentes techniques exploitant les propriétés lumineuses : luminescence, fluorescence, radioactivité, *etc.*

3.6.1 Extraction protéique des échantillons

Les culots cellulaires ont d'abord été lysés à l'aide de tampon RIPA 1x (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachussets, États-Unis) à raison de 400 $\mu\text{L}/10^7$ cellules. Des inhibiteurs de phosphatases (PhosSTOP, Roche Diagnostics, Basel, Suisse) et de protéases (*Complete Mini EDTA-free protease inhibitors*, Roche Diagnostics) ont été incorporés au tampon de lyse afin d'empêcher une dégradation des protéines et de leur groupement phosphate. Le mélange a été vortexé, incubé sur glace pendant 15 minutes et centrifugé. Les lysats cellulaires ont été récupérés.

Les protéines ont par la suite été dosées par la technique de Bradford à l'aide d'une trousse *Quick Start Bradford Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californie, États-Unis). Brièvement, ce réactif a été dans une plaque 96 puits *Immulon* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Une courbe standard de BSA préparée par dilution en série à la $\frac{1}{2}$ ainsi que les échantillons ont été rajoutés dans les puits en duplicata et en triplicata respectivement. Après incubation de 10 minutes à température pièce et dans la noirceur, l'absorbance des protéines a été lue par un spectrophotomètre (Synergy HT, Biotek, Winooski, VT, États-Unis) à 595 nm afin de déterminer les concentrations des lysats cellulaires.

Les protéines dosées ont ensuite été dénaturées par un chauffage à 99°C durant 10 minutes dans du tampon Laemmli (BioRad). Puis, une quantité de 10 μg de protéines par échantillon a été chargée dans les puits d'un gel SDS/PAGE. Une échelle de poids moléculaire (*Precision Plus Protein Dual Colors Standards, Bio-Rad*) a aussi été ajoutée dans un puits afin de pouvoir identifier la protéine d'intérêt sur le gel.

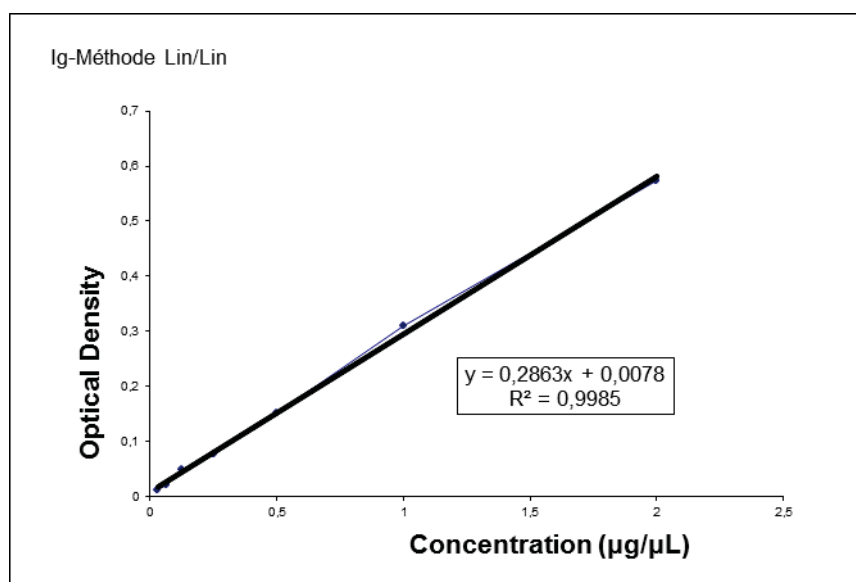


Figure 10. Exemple d'une courbe standard obtenue à partir d'une quantification par la méthode de Bradford

3.6.2 Migration des échantillons sur gel SDS-PAGE

La migration des échantillons s'est déroulée sur un gel SDS/PAGE pour *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*. Ce gel est formé à partir de la polymérisation d'acrylamide et de N,N-méthylènebisacrylamide. Il est divisé en deux sections, la partie supérieure du gel étant le *Stacking gel* et la partie inférieure étant le *running gel*. Un *stacking gel* de 5% et deux *running gel* de 7 et 12% ont été fabriqués. Le gel de 12% a servi à la détection des petites protéines (ATG5, LC3-I, LC3-II et p62) et celui de 7% a permis d'étudier les plus grosses protéines (phospho-mTOR et mTOR). Les échantillons ont migré dans le *stacking gel* pendant 20 minutes à 80V et 1h30 à 100V dans le *running gel*.

3.6.3 Transfert des protéines sur membrane

Les protéines ont subséquentement été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Immobilon, Milipore, Billerica, Massachusetts, États-Unis) ayant des pores de 0.2 μm . Cette membrane a été préalablement hydratée avec du méthanol 100% afin d'assurer son activation. Un ampérage (Bio-Rad) constant de 0.350 mA a été appliqué à la membrane durant 1h. Le montage a été placé dans un sceau de glace afin d'éviter de surchauffer la membrane. À la suite du transfert, les protéines ont été visualisées sur la membrane par coloration au rouge du Ponceau.

3.6.4 Blocage de la membrane

Afin d'éviter toutes liaisons non-spécifiques des anticorps, la membrane a été incubée pendant 1h à température pièce dans du T-PBS (PBS1x, Tween 0,1%) contenant 5% de lait.

3.6.5 Marquage avec les anticorps

L'anticorps primaire (Tableau 3) a été dilué dans du T-PBS contenant 5% de BSA sauf pour la β -actine qui a été diluée dans du T-PBS contenant 5% de lait. Il a été incubé avec la

membrane sous agitation toute la nuit à 4°C ou 1h à température pièce dans le cas de la β -actine. Ensuite, la membrane a été lavée 3 fois durant 5 minutes avec du T-PBS.

L'anticorps secondaire couplé à une peroxydase a été dilué dans du T-PBS lait 5% et ensuite incubé sous agitation avec la membrane pendant 1h à température pièce. Puis, la membrane a de nouveau été lavée 3 fois 5 minutes avec du T-PBS et également 1 minute dans du PBS1x.

3.6.6 Révélation des anticorps

La membrane a été incubée dans la noirceur avec un substrat chimiluminescent (*ECL Plus Western Blotting Detection System*, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Angleterre) pendant 5 minutes. Dans la chambre noire, un film a été déposé sur la membrane. Il a ensuite été développé par la machine (Kodak) pour révéler les protéines d'intérêt. Pour tester d'autres protéines, la membrane a été incubée sous agitation avec 6 mL de tampon de décapage (*Re-Blot Plus Strong Solution 10x*, Millipore) pendant 20 minutes à température ambiante. Puis, la membrane a été lavée et l'immunobuvardage a été recommencé à partir de l'étape de blocage.

Tableau 6. Anticorps utilisés pour immunobuvardage de type *Western*

Anticorps	Taille protéines	Espèce	Type	Compagnie
p-2448 mTOR	289 kDa	lapin	monoclonal	Cell signaling
mTOR	289 kDa	lapin	polyclonal	Cell signaling
SQSTM1 (p62)	65 kDa	lapin	polyclonal	Cell signaling
LC3 α/β	15-18 kDa	lapin	monoclonal	Cell signaling
APG5 (Atg5)	~ 25 kDa	lapin	polyclonal	Cell signaling
β -actine	42 kDa	souris	monoclonal	Sigma-Aldrich
anti-lapin IgG, HRP	-	chèvre	polyclonal	Cell signaling
anti-souris IgG, HRP	-	chèvre	polyclonal	Thermo Scientific

3.7 Test de présentation antigénique *via* les DCs

Les MDDC obtenues par différenciation de monocytes ont été traitées à jour 6 durant 2h avec différentes drogues modulant l'autophagie soit 50 µg/mL de rapamycine (Sigma-Aldrich), 50 nM de bafilomycine (Sigma-Aldrich) ou 5 mM de 3-méthyladenine (Sigma-Aldrich) tel qu'illustré à la figure 3. Les MDDC ont ensuite été lavées par centrifugation avec du milieu RPMI (Gibco). Puis, elles ont été chargées avec différents peptides antigéniques soit *Staphylococcal Enterotoxin B (SEB)* ou *Staphylococcus aureus (S. aureus)*. Les MDDC ont été mises en co-culture à un ratio 1:4 avec des lymphocytes T CD4⁺ autologues chargés en CFSE dans du milieu de prolifération. Ce dernier est composé de milieu RPMI (Gibco) avec 10% de sérum humain (Gemini, West Sacramento, Californie, États-Unis), 1% de L-glutamine (Gibco), 1% d'HEPES (Gibco) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco). Les cellules T CD4⁺ purifiées ont été chargées avec 0,5 µM de *Carbofluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)*; (Sigma-Aldrich)

La CFSE est une molécule fluorescente qui diffuse de manière passive dans la cellule. Une fois à l'intérieur, son groupement acétate est clivé par des estérases générant alors la molécule fluorescente carboxyfluoresceine. Le groupement succinimidyle restant interagit avec les groupements amines cellulaires liant ainsi de manière covalente le colorant aux protéines intracellulaires. Par conséquent, à chaque division la fluorescence est diminuée de moitié dans les cellules filles permettant de suivre la prolifération des cellules T CD4⁺ spécifiques à un antigène.

Brièvement, le marquage à la CFSE s'est déroulé comme suit. Les lymphocytes T CD4⁺ purifiés par sélection négative avec des billes magnétiques (section 3.2) ont été lavés deux fois avec du PBS 1x et resuspendus à raison de 20×10^6 de cellules par mL dans une solution de CFSE 0,5 µM. Les cellules ont été incubées pendant 8 minutes à température pièce dans l'obscurité. Par la suite, 1 mL de sérum humain (Gemini) inactivé pendant 45 minutes à 56°C a été rajouté par tranche de 20×10^6 de cellules. Après une incubation de 2 minutes à température pièce dans la noirceur, les cellules ont été lavées et resuspendues dans du milieu de prolifération. Puis, elles ont été mises en co-culture avec les MDDC durant 5 jours. Une analyse ultérieure en cytométrie en flux a permis de suivre la prolifération des lymphocytes T CD4⁺. Les cellules ayant proliféré ont été identifiés comme CFSE^{low}.

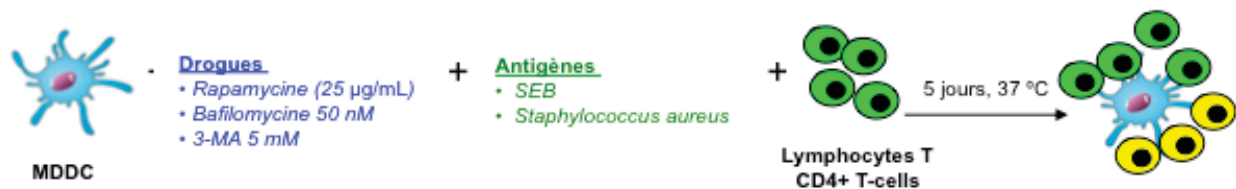


Figure 11. Schéma protocolaire de la présentation antigénique par les MDDC aux lymphocytes T CD4+

3.8 Trans infection du VIH-1 des cellules T CD4+ par les MDDC

3.8.1 Préparation de virus à partir de plasmides

3.8.1.1 Culture des cellules 293T

Les cellules 293T (ATCC; *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, États-Unis) sont dérivées des cellules embryonnaires de rein humain (HEK 293). Elles expriment l'antigène T du virus simien, le SV-40, et sont idéales pour la transfection.

Les cellules 293T conservées dans l'azote liquide ont été décongelées et lavées avec du milieu DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium*; Gibco, Grand Island, New York, États-Unis) 20% FBS et 1% P/S. Elles ont ensuite été cultivées dans une flasque avec du milieu DMEM 10% FBS et 1% P/S à 37°C, 5% CO₂ jusqu'à une confluence maximale où les cellules subiront un premier passage. Les cellules ont donc été décollées suivant une incubation de 2 minutes à 37°C avec de la trypsine. Cette dernière a été inactivée avec l'ajout de FBS.

3.8.1.2 Transfection et récolte des virions

Des stocks de VIH ont été produits par transfection des cellules 293T en utilisant des plasmides codant pour le génome viral. Brièvement, les cellules 293T à une confluence 80%, ont été lavées et transfectées par des plasmides viraux à l'aide du réactif *Fugene* (*FuGENE® 6 Transinfection Reagent*, Roche). Le *Fugene* est un composé non-liposomale contenant des lipides et qui se complexe à l'ADN plasmidique afin de lui frayer un chemin dans la cellule. Le *Fugene* est d'abord ajouté à du milieu de culture OptiMEM (Life Technologies) et incubé 5

minutes à température ambiante. Ce milieu a ensuite été additionné à 10 µg de plasmide viral et incubé pendant 15 minutes. Enfin, les deux solutions ont été mélangées, ajoutées goutte à goutte dans le milieu des cellules 293T et incubées à 37°C. À 48h post-transfection, le surnageant a été récolté et filtré (45 µm) afin d'éliminer tous débris cellulaires. Puis, la suspension virale a été aliquotée à raison de 0,5 mL/tube et conservée à -80°C. Le titre du virus a été quantifié en mesurant la concentration de la protéine p24 du VIH-1 par ELISA.

3.8.1.3 Souches du VIH-1 employées

La production des souches NL4.3BaL de type sauvage ou *Wild Type* (WT) et NL4.3 BaL GFP a été effectuée par transfection comme décrite à la section 3.8.1.2. Les ADN plasmidiques contenant le génome viral complet proviennent de diverses sources. En ce qui concerne la souche NL4.3BaL WT, (don de l'équipe de Roger J Pomerantz; Université Thomas Jefferson, Philadelphie, PA, États-Unis) elle contient le génome entier de la souche NL4.3 exceptée l'enveloppe qui a été remplacée par une enveloppe à tropisme R5 de la souche BaL. La souche NL4.3BaL GFP (don du laboratoire de Dana Gabuzda, Université Harvard, Boston, MA, États-Unis) a une séquence similaire au clone NL4.3BaL WT, à l'exception du fait que le gène VIH-1 Nef a été remplacé par le gène *Green Fluorescent Protein* (GFP).

Lors de l'infection, les cellules ont été lavées et resuspendues dans du milieu RPMI 10% FBS 1% P/S pour obtenir un volume final d'environ 300 µL lorsque le virus sera rajouté. Dépendamment de l'expérience réalisée, une quantité variant entre 50 et 100 ng de protéine p24 du VIH-1/10⁶ cellules a été additionnée à la suspension cellulaire. Le mélange a été agité et incubé à 37°C durant 3h. Ensuite, les cellules ont été lavées 2 fois par centrifugation avec du milieu et remises en cultures dans une plaque 48 puits dans du RPMI 10% FBS 1% P/S.

3.8.2 Trans infection du VIH-1 des cellules T CD4+ par les MDDC

Pour induire leur maturation, les MDDC (obtenues après 6 jours de culture en présence de GM-CSF et IL-4) ont été stimulées par 1 µg/mL de LPS d'*Escherichia coli* (Sigma) pendant 18h. Une fois matures, ces MDDC ont été traitées pendant 2 heures avec différentes drogues autophagiques: 25 µg/mL de rapamycine (Sigma), 50 nM de bafilomycine (Sigma) ou 5 mM de 3-méthyladenine (Sigma). Elles ont ensuite été lavées par centrifugation avec du milieu RPMI (Gibco). Puis, les MDDC ont été exposées durant 3 heures à 50 ng de VIH

NL4.3BaL-GFP. Elles ont de nouveau été lavées par centrifugation avec du milieu RPMI (Gibco) afin d'éliminer l'excès de virus non fixé aux cellules. Subséquemment, elles ont été mises en co-culture avec des cellules T CD4+ préalablement activées pendant 3 jours avec des anticorps CD3/CD28 (BD Bioscience). La co-culture a été réalisée selon un ratio 1 :4 (1 MDDC: 4 lymphocytes T CD4+) pendant 5 jours dans du milieu RPMI (Gibco) contenant 10% de FBS (Sigma) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco). Enfin, les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CD3 (BD Bioscience), CD1c ainsi que Vivid tel que décrit précédemment (section 3.5.1). Enfin, une analyse en cytométrie en flux a permis d'étudier la *trans* infection par les MDDC. Les cellules infectées ont été identifiées comme GFP+.

3.9 Détection de protéines par ELISA

3.9.1 Quantification de cytokines

La détection de cytokines a été effectuée grâce à des trousse *ELISA Ready-SET-Go!* (eBioscience, San Diego, Californie, États-Unis) suivant le protocole établi par le fabricant. Brièvement, un anticorps spécifique à la cytokine d'intérêt a été incubé dans une plaque 96 puits à 4°C durant toute la nuit. Le lendemain, la plaque a été lavée 3 fois avec du T-PBS (PBS 1x 0,05% Tween-20). Les échantillons ainsi que le standard préparé par dilution en série ont été déposés dans les puits pour incubation d'une heure à température pièce. Puis, après 3 lavages avec du T-PBS, les échantillons ont été incubés avec un anticorps biotinylé pendant une heure à température ambiante. Ensuite, une série de lavage a été effectué afin d'éliminer les anticorps non-liés. Une solution d'avidine-HRP (*Horseradish peroxidase*) a été dispensée dans les puits et incubée pendant 30 minutes à température pièce. Les échantillons ont à nouveau été lavés avec du T-PBS. Le substrat a alors été ajouté aux puits pour une période d'environ 15 minutes. Enfin, la solution d'arrêt a été distribuée dans la plaque pour permettre la lecture immédiate de la densité optique des puits à 450 nm par un spectrophotomètre (Model 550 *Microplate Reader*, Bio-Rad, Californie, États-Unis).

3.9.2 Quantification de la réplication virale par ELISA de la protéine p24 de VIH-1

Une trousse ELISA p24 mise au point par le laboratoire du Dr Rafick-Pierre Sékaly a été utilisée pour quantifier la protéine p24 du VIH [82]. Les surnageants des cultures cellulaires infectées à VIH ont été récoltés et conservés à -20°C. Ils ont été neutralisés avec du tampon de neutralisation 5x (PBS, 0,05% Tween-20, 2,5% de Triton X-100, 1% bleu de trypan, 0,02% thimérosal) pendant 1 heure à 37°C. Une plaque de 96 puits a été recouverte d'anticorps de capture 183-H12-5C (*National Institute of Health*, Bethesda, Maryland, U.S.) et incubée à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, les puits ont été rincés trois fois avec du T-PBS (PBS1x, Tween-20 0,05%). Les échantillons neutralisés, en plus de la courbe standard préparée par dilution en série à la ½, ont été ajoutés à la plaque pour incubation d'une heure à 37°C. Puis, la plaque a été lavée 3 fois avec du T-PBS. Un anticorps biotinylé a ensuite été ajouté dans les puits et a été incubé pendant 45 minutes à 37°C. Encore une fois, les échantillons ont été débarrassés des anticorps non-liés par 5 lavages avec le tampon T-PBS. Par la suite, les échantillons ont été incubés avec un anticorps *streptavidin poly-HRP* (North Acton, MA, États-Unis) durant 15 minutes à température ambiante. Une série de lavage a permis d'enlever l'excès d'anticorps non-liés. Enfin, du substrat TMB-S (Fitzgerald) a été ajouté aux échantillons pour une incubation de 15 minutes dans la noirceur. La réaction a été arrêtée avec une solution d'arrêt (H₃PO₄ 1 mol/L). La plaque a été lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm (Bio-Rad model 550).

3.10 PCR en temps réel pour quantifier l'ADN intégré du VIH-1

Une variante de la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) nichée en temps réel incorporant la méthode de *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) a été réalisée pour pouvoir quantifier l'ADN total et intégré du VIH-1 [82, 255]. Les réactifs utilisés sont identifiés dans le tableau 4. En résumé, les cellules infectées à VIH-1 ont été digérées par un tampon comprenant la protéinase K (Life Technologies) pendant toute la nuit à 55°C sous agitation dans un bain sec (*Thermomixer comfort*, Eppendorf; Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Un total de 10⁵cellules/15 µL de lysat a été requis conjointement à la Taq polymérase (Life Technologies) et les réactifs JumpStart Taq Ready Mix (Life Technologies).

L'amplification a été amorcée par la dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 8 minutes à l'aide de l'appareil *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) et s'est poursuivi sur 12 cycles (1 minute à 95°C, 1 minute à 55°C et 10 minutes à 72°C). Elle s'est conclue par une étape d'élongation de 15 minutes à 72°C. L'amplification a nécessité l'aide des amorces Alu1 et Alu2 mais également de l'amorce LM667 associée à un fragment λT qui est spécifique à la séquence LTR du VIH. À titre de référence, le gène CD3 a été multiplié avec l'assistance d'amorces spécifiques sens HCD3-interne et anti-sens HCD3-interne tel que décrit dans le tableau 4. Il a permis d'évaluer le nombre de cellules par réaction.

Les amplicons de CD3 et d'Alu-VIH ont subi une seconde étape d'amplification mais cette fois-ci par PCR nichée en temps réel par FRET grâce à l'appareil LightCycler 480 (Roche Diagnostics) et au réactif LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics). La PCR a été faite en duplicata pour le standard et en triplicata pour les échantillons. Des amorces internes et des sondes spécifiques ont été utilisées pour amplifier le gène CD3. Parallèlement, des amorces complémentaires aux séquences λT et à la région U5 du LTR du VIH ont été employées. Ces sondes d'ADN sont flanquées soit d'un fluorochrome donneur (fluorescéine) en 3' ou accepteur (phosphate) en 5' (Tableau 4). Lorsqu'elles sont hybridées et séparées par un très petit nombre de nucléotides, il y a transfert de l'énergie du fluorochrome donneur à l'accepteur. Ce dernier émet une fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN amplifiée. La spécificité des produits amplifiés est vérifiée en visualisant le profil des courbes de fusion.

Brièvement, pour la seconde amplification, l'ADN a d'abord été dénaturé pendant 4 minutes à 4°C. Puis, la séquence d'amplification s'est déroulée sur 45 cycles qui se définit comme suit: 10 secondes à 45°C, 10 secondes à 60°C et 15 secondes à 72°C. Ensuite, l'étape de la courbe de fusion s'est étalée sur 8 secondes à 95°C, suivie d'une minute à 45°C et s'est terminé par une remontée graduelle de la température jusqu'à 95°C en mode d'acquisitions continues. Les résultats obtenus ont tenu compte de 2 copies de CD3 par cellule et ont été exprimés comme le nombre de copies d'ADN proviral/ 10^6 cellules. De l'eau hautement pure (sans ARN/ADN) a été utilisée comme contrôle négatif

Tableau 7. Liste de réactifs pour la quantification de l'ADN proviral du VIH par PCR

Amorces et sondes	Séquences	T _m °C
Amorce sens HCD3-externe	5'-ACT GAC ATG GAA CAG GGG AAG-3'	60.0
Amorce anti-sens HCD3-externe	5'-CCA GCT CTG AAG TAG GGA ACA TAT-3'	60.3
Amorce sens HCD3 interne	5'-GGCTATCATCATTCTTCTTCAAGGT-3'	56.3
Amorce anti-sens HCD3-interne	5'-CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA-3'	56.3
Sonde CD3 no°1 : fluorescéine	5'-GGCTGAAGGTTAGGGATACCAATATTC CTGTCTC-3'	66.9
Sonde CD3 no°2 : LC Red 705	5'-CTAGTGATGGGCTCTTCCCTTGAGCCC TTC-3'	68.9
Amorce LM667-λT	5'-ATGCCACGTAAGCGAAACTCTGGCTAA CTAGGGAACCCACTG-3'	65.3
Amorce ALU 1	5'-TCC CAG CTA CTG GGG AGG CTG AGG-3'	68.8
Amorce ALU 2	5'-GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G- 3'	65.3
Amorce sens λT	5'-ATG CCA CGT AAG CGA AAC T -3'	55.4
Amorce anti-sens AA55M	5'-GCT AGA GAT TTT CCA CAC TGA CTA A- 3'	58.7
Sonde LTR no°1 Fluorescéine	5'-CAC AAC AGA CGG GCA CAC ACT ACT TGA-3'	65.0
Sonde LTR no°2 LC Red 640	5'-CACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGG-3'	62.0

4. RÉSULTATS

4.1 : Effet du VIH-1 sur les propriétés fonctionnelles des DCs *in vitro*

4.1.1 Obtention des DCs à partir des monocytes de sang périphérique

Afin d'examiner plus en profondeur les multiples propriétés fonctionnelles des DCs, nous avons d'abord généré des DCs à partir de monocytes purifiés du sang périphérique de sujets sains par sélection négative. Les monocytes ont été identifiés par cytométrie en flux sur la base de l'expression de HLA-DR, CD14 et/ou CD16 et l'absence d'expression de marqueurs spécifiques aux cellules T (CD3, CD4) et aux DCs (CD1c) (Figure 12A). La pureté des monocytes isolés est typiquement >95%. Les monocytes ont ensuite été mis en culture durant 6 jours en présence de GM-CSF et IL-4 pour induire leur différenciation en DCs, comme précédemment démontré [256]. Puis, dans le but d'induire la maturation des MDDC, celles-ci ont été stimulées par le LPS (1 µg/mL) [257]. Cette étape dans le développement des MDDC entraîne un changement phénotypique qui permet de discriminer entre les MDDC immatures et matures. Ainsi, en réponse à un PAMP comme le LPS, les MDDC régulent à la hausse l'expression des récepteur CD83 (une molécule de régulation négative exprimée sur des MDDC matures), HLA-DR (une molécule hétérodimérique qui présente un antigène processé au TCR) et CCR7 (un récepteur important pour la migration des cellules vers les ganglions lymphatiques), tel qu'illustré à la Figure 12B [258-261].

4.1.2 Effet du VIH-1 sur la capacité des DCs à présenter l'antigène

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont levé le voile sur l'impact de l'infection à VIH-1 sur les propriétés fonctionnelles des DCs. Étant très polyvalentes, ces cellules assurent la capture, l'apprêtement et la présentation d'un antigène aux lymphocytes T afin de coordonner une défense immunitaire efficace [133, 262]. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes particulièrement penchés sur le processus de présentation antigénique et les altérations causées par le VIH. Nous avons émis notre première **hypothèse** selon laquelle l'exposition au VIH affecte négativement la capacité des MDDC à présenter les antigènes aux

cellules T CD4+. Ceci pourrait expliquer l'immunodéficience observée chez les sujets infectés par le VIH-1 [263].

L'effet du VIH-1 sur l'habileté des MDDC à présenter des antigènes tels que *S. aureus*, *CMV* et *SEB* (toxine) a été évaluée par mesure de la capacité des lymphocytes T CD4+ à proliférer après coculture avec des MDDC exposées ou non à la souche R5 NL4.3BaL du VIH et chargées en antigènes. Un test de présentation antigénique impliquant la coloration par CFSE a été mis au point au laboratoire et a permis d'étudier cet aspect fonctionnel des MDDC (Figure 13A) [264]. Au cinquième jour de co-culture entre les MDDC chargées en antigènes et les cellules T CD4+ autologues, la capacité des MDDC à présenter un antigène aux cellules T et provoquer leur prolifération a été observée par cytométrie en flux en évaluant la diminution de la fluorescence de la CFSE. En accord avec notre hypothèse, les résultats obtenus montrent que lorsque les MDDC sont exposées au VIH-1, leur aptitude à induire une prolifération des lymphocytes T CD4+ en réponse à *S. aureus* et *CMV* est altérée de manière significative (*Wilcoxon Test* $p=0.03$). En contraste, les MDDC exposées au VIH-1 ne semblent pas avoir d'altération fonctionnelle significative lors de la présentation du *SEB* aux cellules TCD 4+ si on les compare aux MDDC non exposées au VIH (Figure 13B). *SEB* est un super antigène dont la présentation aux cellules T se fait sans nécessité d'apprêtement et nous l'avons ainsi utilisé comme contrôle de prolifération [265]. Ces résultats générés sur des cellules provenant de 5 donneurs différents suggèrent l'**hypothèse** selon laquelle le VIH-1 altère la présentation antigénique en interférant avec le processus de maturation des MDDC.

4.1.3 Effet du VIH-1 sur la maturation des MDDC

Sous l'effet d'un stimulus, comme un agent pathogène (PAMPs) ou des cytokines spécifiques, les DCs subissent une étape de maturation [266]. Durant ce processus, les DCs acquièrent l'expression de certains marqueurs au profit de d'autres afin d'accomplir leurs nouvelles fonctions dans l'établissement d'une réponse immunitaire. Elles régulent à la hausse l'expression des marqueurs CD83, HLA-DR et CCR7 (Figure 12B). Nous nous sommes donc penchés sur les répercussions de l'exposition au VIH-1 sur la maturation des MDDC. À cet effet, nous avons exposé les MDDC au VIH durant 3h *in vitro* ou nous les avons stimulées avec du LPS. Puis, nous avons évalué l'expression de différents marqueurs de maturation de

ces cellules par cytométrie en flux 48h plus tard. Les résultats obtenus démontrent qu'une exposition des MDDC au VIH-1 n'induit pas la maturation des MDDC. En effet, elles ne parviennent pas à réguler à la hausse l'expression de HLA-DR, de CD83 et de CCR7 (Figure 14). En parallèle, tel que décrit dans la littérature [267], une stimulation par le LPS permet au MDDC de moduler positivement l'expression de ces trois marqueurs (Figure 14). Nos résultats générés sur des cellules provenant de 6 donneurs différents montrent que le VIH-1 est incapable d'induire la maturation des MDDC ce qui pourrait en partie limiter le processus de présentation antigénique.

4.1.4 Modulation de l'autophagie par la rapamycine

Afin d'introduire ce concept biologique dans nos expériences ultérieures et d'en établir un lien fonctionnel avec l'infection à VIH-1, nous avons testé l'effet de l'antibiotique rapamycine sur l'expression de la protéine-clé de l'autophagie, mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), et de sa forme active phospho-mTOR. La rapamycine est bien connue pour être un inhibiteur de mTOR et donc un activateur de l'autophagie [268]. Les MDDC ont été prétraitées durant 2 heures avec de la rapamycine (50 µg/mL). Puis les cellules ont été lavées, récoltées, lysées et quantifiées pour l'expression de mTOR par immunobuvardage de type *Western*. Les bandes obtenues illustrent une diminution de l'expression de mTOR et de phospho-mTOR à la suite d'un traitement avec la rapamycine (Figure 15). Les résultats obtenus sur des cellules provenant de 2 donneurs différents confirment donc les données dans la littérature stipulant une inhibition de mTOR par la rapamycine.

4.1.5. Effet du VIH et du LPS sur l'autophagie

Le lien entre l'autophagie et le VIH dans les DCs demeure nébuleux. Néanmoins, les quelques études portées sur ce sujet ont proposé que les protéines de l'enveloppe virale régulent à la hausse l'expression du mTOR, entraînant ainsi une inhibition de l'autophagie [241]. De plus, une autophagie altérée par le VIH-1 mène à une augmentation de la propagation virale et une présentation antigénique inefficace [241]. Nous avons commencé par confirmer si le VIH-1 altère la voie de l'autophagie et module l'expression des protéines

de cette voie. Plusieurs protéines de ce processus biologique ont été sélectionnées en se basant sur leur rôle clé tout au long de la voie menant à la destruction d'une protéine cargo: mTOR, ATG5, LC3-I, LC3-II, et p62. Pour étudier leur expression, les MDDC ont été exposées pendant 15 min ou 12h au VIH-1 ou stimulées par LPS durant 12h. Ensuite, les cellules ont été lavées, récoltées et lysées. Les lysats cellulaires ont été quantifiés par la méthode de Bradford et a permis de poursuivre l'expérience avec la réalisation d'un immunobuvardage de type *Western*. Lorsque les MDDC sont exposées à VIH-1 durant 15 minutes, nous observons une modulation à la hausse de l'expression des protéines mTOR et phospho-mTOR ce qui sous-entend une inhibition du processus d'autophagie (Figure 16A et B). Par contre, nous n'observons pas de régulation significative de mTOR lors d'une exposition de 12h à VIH-1 (Figure 16C et D). Lors d'une stimulation par le LPS de 12h, une diminution de l'expression de mTOR et phospho-mTOR est observée (Figure 16C et D). Ces résultats sont en accord avec le rôle bien établi du LPS dans la maturation des MDDC et l'augmentation de l'autophagie [266, 269]. Ensuite, nous ne remarquons pas de changements au niveau de l'expression des protéines ATG5 et LC3-1 dans le cas d'une infection à VIH-1 ou de stimulation par LPS de 12h (Figure 16C et D). Puis, l'expression de LC3-II tend à décroître lorsque les MDDC sont stimulées par le LPS mais pas quand elles sont exposées au VIH-1. Enfin, pour ce qui est de la protéine échaffaudrice p62, nous remarquons une tendance à l'augmentation de son expression lorsque les MDDC sont exposées à VIH-1 et une tendance à la diminution de son expression lors d'une stimulation par le LPS (Figure 16C et D). Ces résultats suggèrent l'**hypothèse** selon laquelle le VIH a un impact négatif sur la voie de l'autophagie *via* l'induction de la phosphorylation de mTOR. Toutefois, nous notons les variations interindividuelles dans nos mesures, et ainsi l'inclusion de plus de donneurs dans ces investigations sera nécessaire. Aussi, nous réalisons que le temps d'exposition au VIH et au LPS pour la mesure de différentes protéines pourrait ne pas être optimal, malgré le fait que ces choix sont basés sur la littérature [241].

4.1.6 Effet des modulateurs de l'autophagie sur la capacité des DCs à *trans* infecter des cellules T activées

Les MDDC sont bien connues pour leur habileté à capturer des faibles quantités de

virus et à transmettre le VIH-1 aux cellules T CD4+ [270]. Ceci favorise la réplication virale dans les lymphocytes et accélère la propagation de l'infection à travers l'organisme. Nous avons subséquemment exploré l'effet des différentes drogues modulant l'autophagie sur la capacité des MDDC à transférer le VIH-1 aux cellules T CD4+. En plus de la rapamycine, nous avons utilisé la bafilomycine (un inhibiteur de l'ATPase vacuolaire qui modifie l'acidification des endosomes) et le 3-MA (un inhibiteur des PI3K) qui inhibent tous les deux l'autophagie [271, 272]. Nous formulons l'hypothèse selon laquelle la rapamycine prévient la *trans* infection du VIH-1 aux lymphocytes T CD4+ par les MDDC. Les MDDC stimulées ou non par le LPS pour induire leur maturation ont été prétraitées avec soit la rapamycine (50 µg/mL), la bafilomycine (50 nM) ou le 3-MA (5 mM). Les MDDC ont ensuite été exposées à une souche R5 de VIH-1 (NL4.3BaL-GFP; 50 ng de p24 du VIH-1/10⁶ cellules) pendant 3h. Puis, les MDDC ont été mises en co-culture avec des lymphocytes T CD4+ préalablement activés pour 3 jours *via* CD3/CD28. L'infection productive du VIH-1 dans les cellules T CD4+ a été mesurée par FACS en focalisant sur la fréquence des cellules exprimant la GFP sous le contrôle du LTR du VIH. Alors que la réplication productive du VIH-1 dans les MDDC est altérée de façon importante par la maturation [273], nos résultats démontrent que la *trans* infection VIH des cellules T CD4+ activées par les MDDC matures *versus* immatures est similaire pour les donneurs #2 et #3, mais inférieure pour le donneur #1 (Figure 17A-B). Les résultats générés avec les cellules des donneurs #1 et #2 illustrent une capacité altérée des MDDC immatures et matures à *trans* infecter les cellules T CD4+ lorsqu'elles subissent un prétraitement avec la rapamycine (Figure 17A-B). Pour le donneur #3, ces effets sont observés seulement pour les MDDC matures. En ce qui concerne les effets de la bafilomycine ou du 3-MA, les résultats sont très hétérogènes entre les donneurs et l'on observe un effet augmentant de la *trans* infection seulement pour les MDDC immatures et matures du donneur #1. Pour le donneur #2, les résultats indiquent une absence d'effet de la bafilomycine et du 3-MA. Ces différences interindividuelles soulignent l'importance d'inclure un nombre supérieur de donneurs dans ces études. Malgré ces différences interindividuelles, les effets de la rapamycine sont très reproductibles entre les donneurs. D'importance majeure, le marquage au Vivid montre que la rapamycine n'induit pas la mort cellulaire tout comme la bafilomycine ou le 3-MA (résultats non présentés). Nos résultats attribuent à la rapamycine un rôle crucial de limitation de la dissémination du VIH-1.

4.1.7 Effet des modulateurs de l'autophagie sur la capacité des DCs à *trans* infecter des cellules T dans le contexte de la présentation antigénique

Ensuite, suivant la logique de l'expérience précédente, nous nous sommes penchés sur l'effet d'une exposition à VIH-1 sur la compétence des MDDC à *trans* infecter les cellules T CD4+, mais cette fois-ci dans le contexte d'une présentation antigénique. Nous anticipons que la rapamycine aura les mêmes effets de diminution de la *trans* infection dans ces circonstances également. Pour ces expériences, nous avons mesuré la réplication virale par un test ELISA de la protéine p24 du VIH-1 dans les surnageants de co-culture recueillis à jour 5 après exposition au VIH et co-culture. Tout d'abord, on observe une *trans* infection VIH supérieure par les MDDC immatures comparé aux matures (Figure 17B). Par la suite, nos résultats montrent qu'un prétraitement à la rapamycine des MDDC immatures et matures exposées au VIH-1 et chargées avec *S. aureus* ou *SEB* diminue le transfert du virus aux lymphocytes T CD4+ chez 3 donneurs différents (Figure 18). En parallèle, un prétraitement avec la bafilomycine ou le 3-MA n'a pas modifié de façon majeure la *trans* infection par les MDDC. Ces résultats s'ajoutent aux précédents résultats inclus dans le Figure 17 et supportent la conclusion que la rapamycine réduit la *trans* infection du VIH-1 aux lymphocytes T CD4+ par les MDDC immatures et matures.

4.1.8 Effet des modulateurs de l'autophagie sur la capacité des DCs à présenter l'antigène

La voie de l'autophagie est à l'intersection avec celle de la présentation antigénique. Il a été démontré que l'autophagie représente un chemin alternatif pour délivrer les antigènes aux CMH de classe II [274]. De plus, ce processus catabolique contribue à la *cross* présentation impliquant le CMH de classe I comme montré avec des antigènes tumoraux et permet l'activation des lymphocytes T CD8+ [275]. Nous avons donc été intéressés à étudier l'impact d'une modulation de l'autophagie sur le processus de présentation antigénique lors d'une infection à VIH-1 *in vitro*. Sur la base des résultats publiés par l'équipe de Dr. Vincent Piguet [241], nous avons anticipé que les MDDC infectées à VIH-1 et traitées à la rapamycine

ont une capacité supérieure à induire une prolifération des lymphocytes TCD4+ spécifiques aux antigènes. Un test de dilution de la CFSE a été effectué pour mesurer la prolifération des cellules T CD4+ mises en co-culture avec des MDDC exposées ou non au VIH et prétraitées avec soit la rapamycine, la bafilomycine ou le 3-MA. En contraste avec notre prédiction, les résultats de la Figure 19 démontrent que la rapamycine diminue le potentiel immunogène des MDDC, alors que la bafilomycine et le 3-MA n'affectent pas ce processus de manière significative. Ces résultats sont observés lorsque les MDDC exposées à VIH-1 sont chargées en *S. aureus* ou *SEB*. Compte tenu du fait que le *SEB* est un super antigène activant directement le TCR et le CMH de classe I et II, cela indique un effet global de la rapamycine sur les fonctions effectrices des MDDC en dehors du processus de l'autophagie. Les données que nous avons obtenues corroborent cependant avec la littérature qui souligne les propriétés immunosuppressives de la rapamycine [276].

4.1.9 Effet de la rapamycine sur le phénotype des MDDC

L'utilisation de la rapamycine peut avoir un impact sur plusieurs aspects fonctionnels des MDDC, d'autant plus que cette drogue agit directement sur la protéine mTOR qui est à la croisée des chemins de nombreuses voies métaboliques [198]. Dans ce contexte, nous avons exploré les effets de la rapamycine sur le processus de maturation des MDDC. Après un traitement de 2h avec la rapamycine, les MDDC ont été marquées avec une variété de marqueurs spécifiques dont l'expression a ensuite été évaluée au FACS. L'analyse par cytométrie en flux révèle que la rapamycine accroît l'expression du marqueur de maturation CD83 à la surface des MDDC immatures de 4 donneurs sur 6 (Figure 20). En parallèle, l'expression des récepteurs CCR7 et HLA-DR ne démontre pas de changements statistiquement significatifs sur 6 donneurs différents ; on note toutefois des variations marquantes entre les donneurs (Figure 20). À la lumière de ces résultats, nous nous sommes penchés sur l'effet de la rapamycine sur le phénotype des MDDC matures. Le protocole expérimental a été appliqué de la même façon que pour l'étude précédente sauf que les cellules ont subi une étape de maturation par stimulation avec le LPS après le traitement avec la rapamycine. Il s'avère que pour les MDDC matures, c'est l'expression du récepteur de migration vers les ganglions lymphatiques CCR7 qui est réduite de façon significative chez 5

donneurs sur 6, alors qu'on ne décèle pas de changement significatif pour les marqueurs CD83 ou HLA-DR (Figure 21). Ces résultats indiquent une maturation précoce des MDDC traitées à la rapamycine et une altération de la migration vers les tissus lymphoïdes par les MDDC matures traitées à la rapamycine.

4.1.10 Effet de la rapamycine sur les récepteurs d'entrée et de fixation du VIH

L'effet de la rapamycine sur la *trans* infection du VIH par les MDDC pourrait être dû à une diminution de la fixation des virions *via* le récepteur de lectine de type C DC-SIGN, et/ou de l'entrée *via* CD4, CCR5 et CXCR4. Afin d'étudier l'impact de la rapamycine sur ces étapes qui initient le cycle de réplication du VIH-1, nous avons mené des expériences d'analyse au FACS de l'expression de CD4, CCR5, CXCR4 et DC-SIGN par les MDDC immatures traitées ou non à la rapamycine. Étant donné son rôle bénéfique dans le contrôle de plusieurs infections, nous formulons l'hypothèse selon laquelle la rapamycine diminue l'expression des récepteurs et co-récepteurs du VIH-1 afin d'exercer un contrôle sur la propagation virale. Nos résultats montrent que l'expression de CD4 et DC-SIGN n'est pas modulée de manière significative lorsque les MDDC sont préalablement traitées pendant 2h avec la rapamycine (Figure 22). Par contre, nous pouvons observer une tendance à l'augmentation de l'expression en CXCR4 et CCR5 chez 2 donneurs sur 3. Ces résultats n'expliquent pas la diminution de la *trans* infection du VIH par les MDDC traitées à la rapamycine et incitent à approfondir nos recherches sur les mécanismes moléculaires responsables des effets observés dans les Figures 17-18.

4.2 Persistance du VIH-1 dans les cellules myéloïdes chez les sujets infectés par le VIH-1 sous thérapie antirétrovirale

Le deuxième volet du projet de recherche s'intéresse aux rôles des cellules myéloïdes dans la dissémination du VIH-1. Les monocytes circulants expriment le récepteur (CD4) et les corécepteurs du VIH-1 (CCR5, CXCR4) et ainsi les phases précoces de la réplication virale (*i.e.*, entrée et initiation de la transcription inverse) sont possibles dans les monocytes [277]. Toutefois, les monocytes se montrent réfractaires à une réplication virale productive [121], en

partie due à l'expression de SAMHD1 [43, 159]. Les monocytes sont pourtant à l'origine des macrophages qui eux représentent des cibles importantes de réplication virale et potentiellement des réservoirs du virus [278]. Des études par le groupe de Randolph *et al.* démontrent que les monocytes peuvent traverser les tissus périphériques, capturer des antigènes et revenir dans la circulation sanguine [279]. Il est ainsi possible que les monocytes peuvent capturer le VIH *in vivo* également. Nous avons donc investi nos efforts pour tester l'hypothèse selon laquelle les monocytes circulants chez les sujets infectés par le VIH avirémiques sous ART portent des formes précoces de transcription inverse et que lors de la différenciation de leurs monocytes en macrophages la transcription inverse est complétée, menant ainsi à l'intégration du provirus et à la réplication virale.

4.2.1 Détection des produits de transcription inverse précoces du VIH-1 dans les monocytes des sujets virémiques

Nous pensons que les monocytes sont une source de VIH-1 et pourraient contribuer à la dissémination virale et à l'établissement de réservoirs viraux lors de leur différenciation en macrophages ou en DCs. Dans le but d'étudier la réplication virale dans les cellules myéloïdes de sujets infectés, nous avons isolé les monocytes à partir des PBMC des sujets virémiques (Tableau 2). Ensuite, une PCR semi-quantitative a été effectuée afin de détecter des formes précoces de l'ADN viral (RU5) dans les PBMC et les monocytes de patients virémiques. Une gamme de cellules ACH2 (une lignée cellulaire possédant une seule copie intégrée de l'ADN du VIH-1 [280]) a été utilisée comme contrôle. De façon similaire aux PBMC, nous avons détecté des formes précoces de transcrits inverses du VIH dans les monocytes provenant de 3 donneurs sur 3 (Figure 23). Nos résultats esquissent le prélude d'une dissémination virale par les cellules issues d'une différenciation des monocytes en macrophages.

4.2.2 Réplication du VIH-1 dans les macrophages dérivées des monocytes des sujets infectés et traités avec thérapie antirétrovirale

À la lumière de ces résultats, nous avons investigué la réplication du VIH-1 dans les macrophages dérivés des monocytes (MDM) des n=4 sujets infectés par le VIH avec charge virale indétectable sous ART (Tableau 2). Nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle malgré le traitement ART, les monocytes sont exposés *in vivo* à des quantités faibles de VIH répliquatifs qui entrent dans les monocytes où un début la transcription inverse aura lieu; ces formes précoces d'ADN viral complètent le cycle de réplication virale lors de la différenciation des monocytes en macrophages. Pour vérifier notre énoncé, des monocytes isolés de sujets infectés et sous traitement ART ont été différenciés en macrophages durant 6 jours. Puis, ils ont été stimulés avec des concentrations variables de LPS pour 24h. Les résultats obtenus en quantifiant la protéine p24 du VIH-1 par ELISA démontrent une activité de réplication virale modeste chez les MDM de patients infectés et sous traitement (Figure 24). Les concentrations de la p24 du VIH ne corrèlent pas tout à fait avec les diverses concentrations de LPS utilisées pour la stimulation et ces valeurs reflètent plutôt les variations entre les puits expérimentaux reflétant ainsi des variations typiques dans la fréquence des cellules portant le VIH répliquatif. De plus, il y a des variations interindividuelles importantes. Néanmoins, la p24 du VIH est détectée chez tous les individus inclus dans l'étude.

Nos résultats nous permettent de constater que les monocytes provenant des sujets avirémiques sous ART se différencient *in vitro* en macrophages qui portent du VIH répliquatif. Ensemble, ces données apportent des évidences quant à la contribution des cellules myéloïdes à la persistance de l'infection à VIH-1 sous ART.

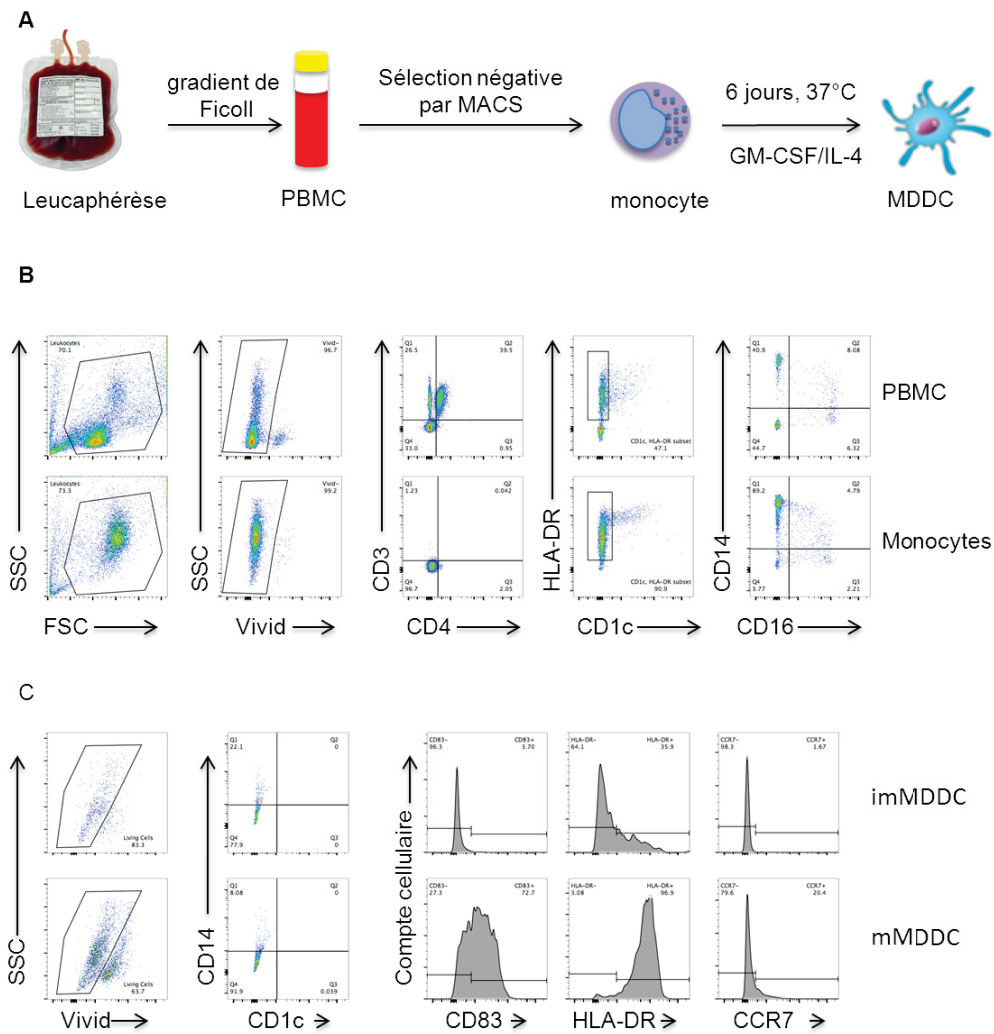


Figure 12. Isolement de monocytes par sélection négative et génération de DCs. (A) Sélection négative des monocytes par MACS (*Magnetic associated cell sorting*). Les monocytes ont été purifiés à partir du sang périphérique de donneurs sains par sélection négative à l'aide de billes magnétiques (Miltenyi). Les cellules ont ensuite été mises en culture en présence de GM-CSF (20 ng/mL) et IL-4 (20 ng/mL) pendant 6 jours pour induire leur différenciation en DCs. (B) Test de pureté des monocytes. Les monocytes ont été marqués avec des anticorps couplés à des fluorochromes: anti-CD3 PB, anti-CD4 Alexa 700, anti-CD14 FITC, anti-CD1c PE et anti-CD16 PE-Cy5. Un marquage avec le marqueur de viabilité Vivid a été effectué afin d'exclure les cellules mortes. Les monocytes ont été identifiés sur la base de l'expression de HLA-DR, CD14 et/ou CD16 et l'absence d'expression de marqueurs spécifiques aux cellules T (CD3, CD4) et aux DCs (CD1c). La pureté des monocytes isolés est typiquement >95%. Les résultats présentés ont été réalisés avec les cellules d'un donneur et sont représentatifs des résultats obtenus avec des cellules de 2 donneurs différents. (C) Maturation des MDDC. À jour 6, les MDDC immatures (imMDDC) ont été stimulées par le LPS (1 µg/mL) durant 18h pour induire leur maturation (mMDDC).

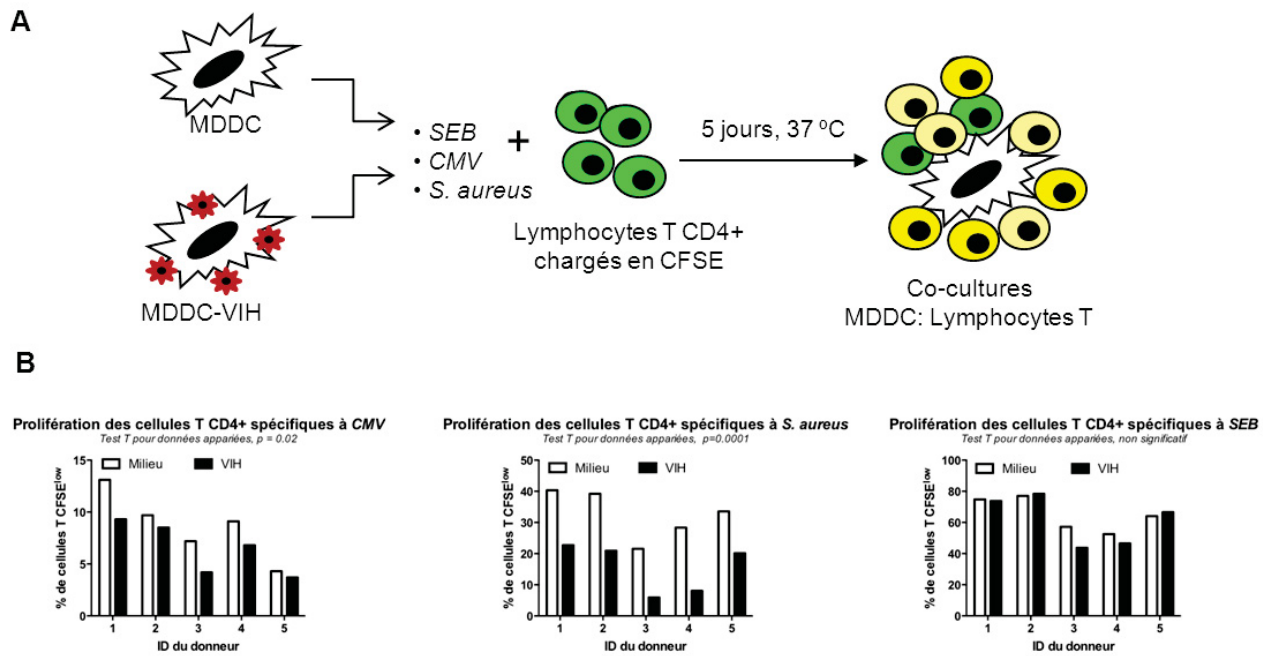


Figure 13. L'exposition des MDDC à VIH-1 altère leur habileté à présenter un antigène. (A) Protocole expérimental. Les MDDC obtenues tel que décrit dans la Figure 12A ont été exposées à une souche R5 sauvage NL43.BaL de VIH-1 (50 ng de p24 de VIH-1/10⁶ cellules) pendant 3 heures. Elles ont ensuite été chargées avec un peptide antigénique de soit *S. aureus*, *CMV* ou *SEB* qui agit à titre de contrôle de prolifération. Puis, les MDDC ont été mises en co-culture avec des lymphocytes T CD4+ autologues chargés en CFSE pendant 5 jours à 37°C (ratio DC-T 1:4). Les co-cultures ont ensuite été recueillies et analysées en cytométrie en flux pour la prolifération cellulaire. Les cellules T ayant proliféré ont été identifiées comme CFSE^{low}. **(B)** Les MDDC exposées à VIH-1 ont une capacité altérée à induire une prolifération des cellules T CD4+ en réponse aux antigènes de *CMV* (test T pour données appariées, p= 0.02), *S. aureus* (test T pour données appariées, p= 0.0001) mais pas *SEB* (test T pour données appariées, non significatif). Les expériences présentées ont été effectuées sur 5 donneurs différents (n=5).

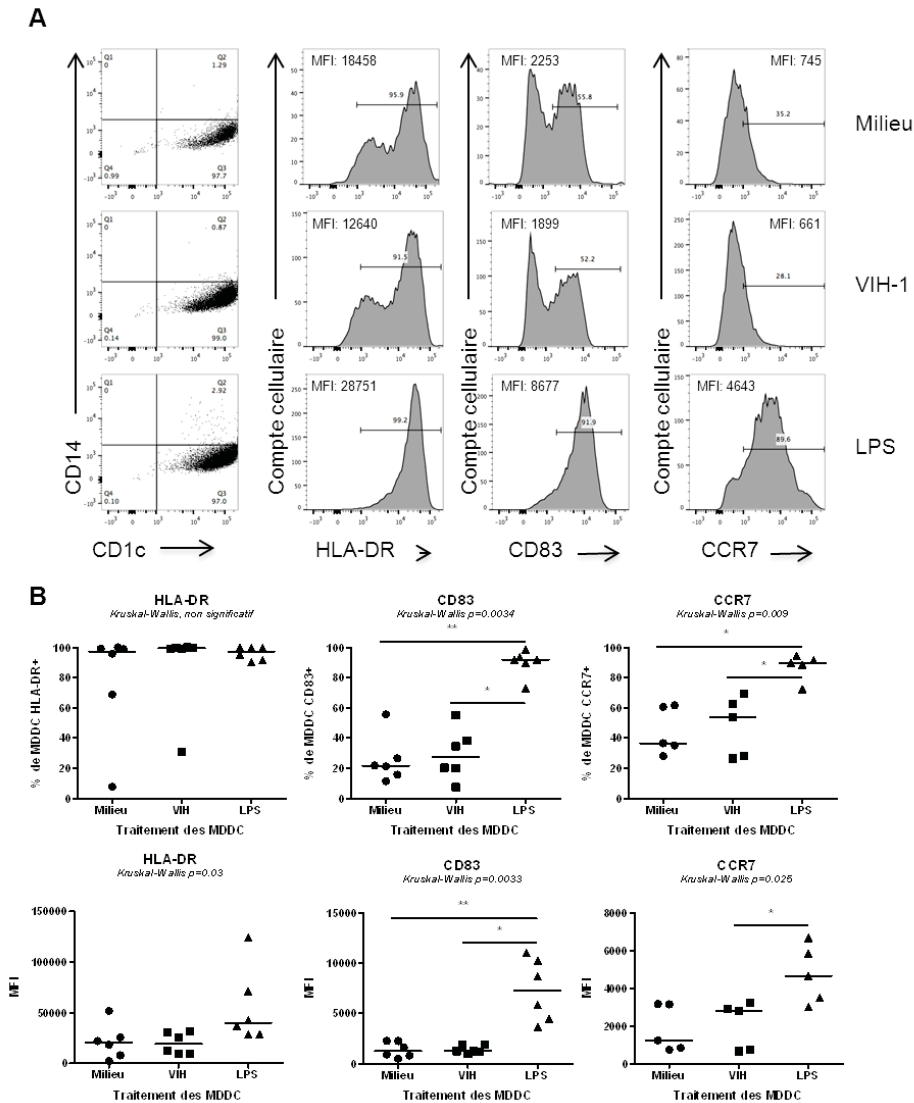


Figure 14. Le VIH-1 empêche une maturation complète des MDDC. (A) Stratégie d'analyse FACS. Brièvement, les MDDC obtenues tel que décrit dans la figure 12A ont été soit infectées à une souche R5 sauvage NL43.BaL de VIH-1 (100 ng de p24 de VIH-1/10⁶ cellules) pendant 3 heures soit stimulées par le LPS (1 µg/mL) durant 48h. Elles ont ensuite été lavées pour éliminer les virus non liés ou l'excès de LPS. Puis, elles ont été marquées pour les marqueurs CD14 et CD1c et les marqueurs de maturation CD83, CCR7 et HLA-DR. La stratégie d'analyse est illustrée ci-haut pour 1 donneur et est représentatif de 6 sujets sains différents (n=6). **(B)** Le VIH-1 bloque le processus de maturation des MDDC exposées à VIH-1. Les analyses par FACS montrent que les MDDC ne sont pas capables de moduler à la hausse l'expression des marqueurs de maturation CD83 et CCR7, et ce autant en terme de pourcentage que de MFI. Par contre, l'expression de HLA-DR et moduler à la hausse. Les analyses statistiques sont indiquées dans les graphiques.

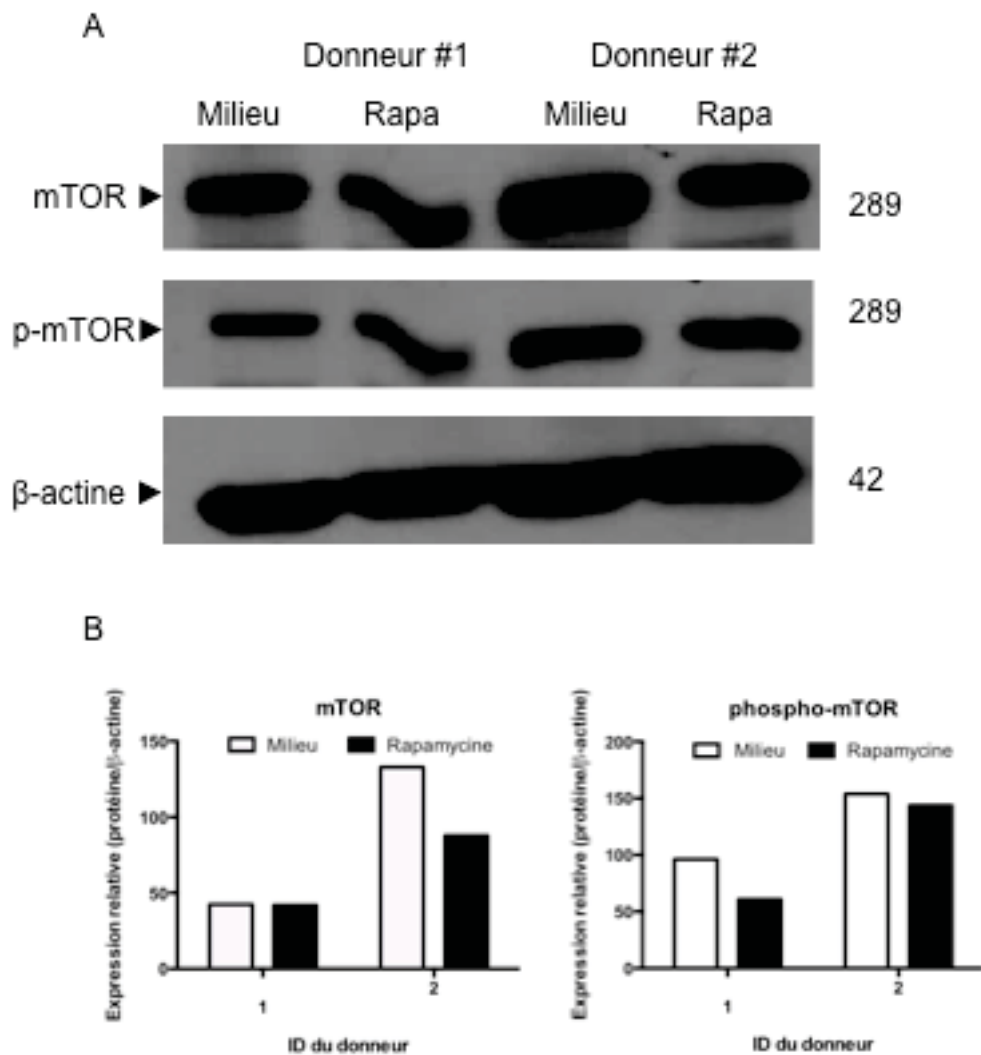


Figure 15. La rapamycine inhibe l'expression de la protéine centrale de l'autophagie mTOR. (A) Brièvement, à jour 6, les MDCC cultivées à raison de 2×10^6 cellules par puits ont été traitées durant 2h avec de la rapamycine (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Puis, les cellules ont été lavées et lysées pendant 10 min à 4°C avec du tampon RIPA. La modulation de l'expression de la protéine centrale de l'autophagie mTOR ainsi que de sa forme phosphorylée phospho-mTOR a été évaluée par un immunobuvardage de type *Western*. (B) L'expression de mTOR, de phospho-mTOR et de la β -actine a été quantifiée par l'évaluation densitométrique des bandes de protéines obtenues par immunobuvardage de type *Western*. Les valeurs indiquées dans le graphique représentent l'expression relative à la β -actine. Les résultats présentés ont été réalisés avec les cellules de 2 donneurs différents.

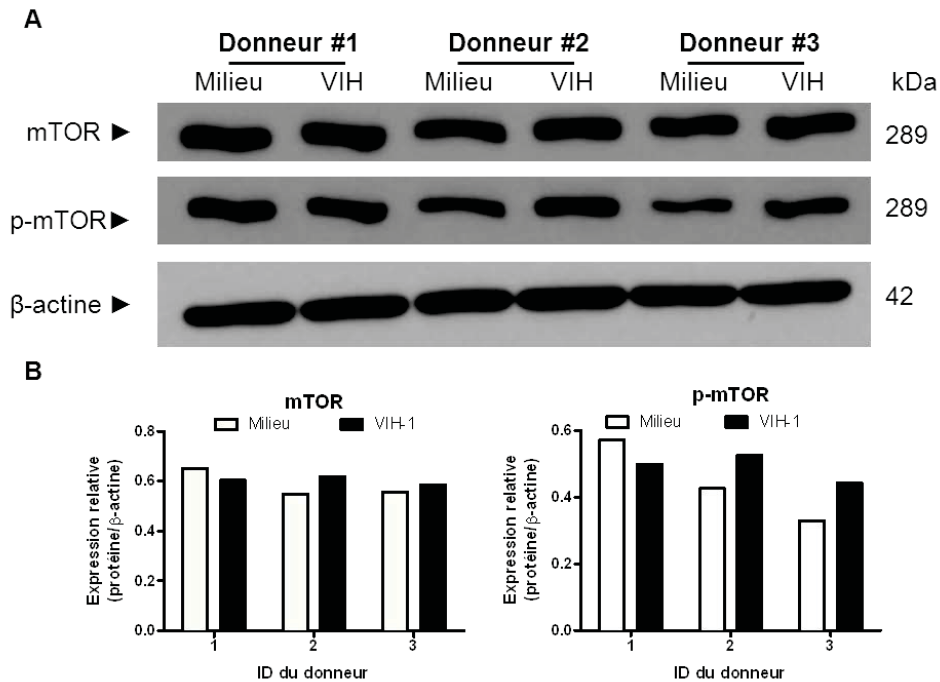


Figure 16. Effet d'une infection à VIH-1 et d'une stimulation par le LPS sur l'expression de diverses protéines de l'autophagie chez les MDDC. (A) Brièvement, à jour 6, les MDDC cultivées à raison de 2×10^6 cellules puits ont été infectées par une souche sauvage R5 NL43.Bal de VIH-1 (50 ng de p24 de VIH-1/ 10^6 cellules) pendant 15 min. Puis, les cellules ont été lavées pour éliminer les virus non liés. Les culots cellulaires ont été récoltés et lysés pendant 10 minutes à 4°C , dans tu tampon RIPA. L'évaluation de l'expression des marqueurs d'autophagie mTOR phosphorylé (p-mTOR) et mTOR total a été réalisée par immunobuvardage de type *Western*. La β -actine a été utilisée comme contrôle positif de gène exprimé de façon constitutive. **(B)** L'expression des marqueurs d'autophagie et de la β -actine a été quantifiée par l'évaluation densitométrique des bandes de protéines obtenues par immunobuvardage de type *Western*. Les valeurs indiquées dans le graphique représentent l'expression relative à la β -actine. Les résultats présentés ont été réalisés avec les cellules de 3 donneurs différents. **(C)** À jour 6, les MDDC cultivées à raison de 2×10^6 cellules puits ont été stimulées par le LPS ou le VIH pendant 12h. Puis, les cellules ont été lavées, récoltées et lysées pendant 10 minutes dans tu tampon RIPA. L'évaluation de l'expression des marqueurs d'autophagie mTOR phosphorylé (p-mTOR), mTOR total, ATG5 et LC3-I et LC3-II et p62 a été réalisée par immunobuvardage de type *Western*. La β -actine a été utilisée comme contrôle positif de gène exprimé de façon constitutive. **(D)** L'expression des marqueurs d'autophagie et de la β -actine a été quantifiée par l'évaluation densitométrique des bandes de protéines obtenues par immunobuvardage de type *Western*. Les valeurs indiquées dans le graphique représentent l'expression relative à la β -actine. Les résultats présentés ont été réalisés avec les cellules de 3 donneurs différents.

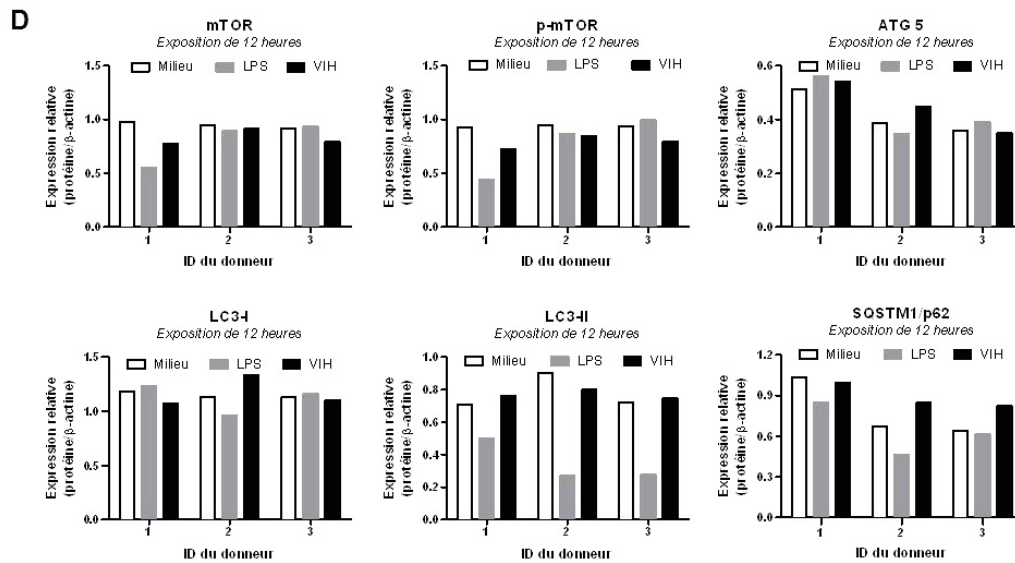
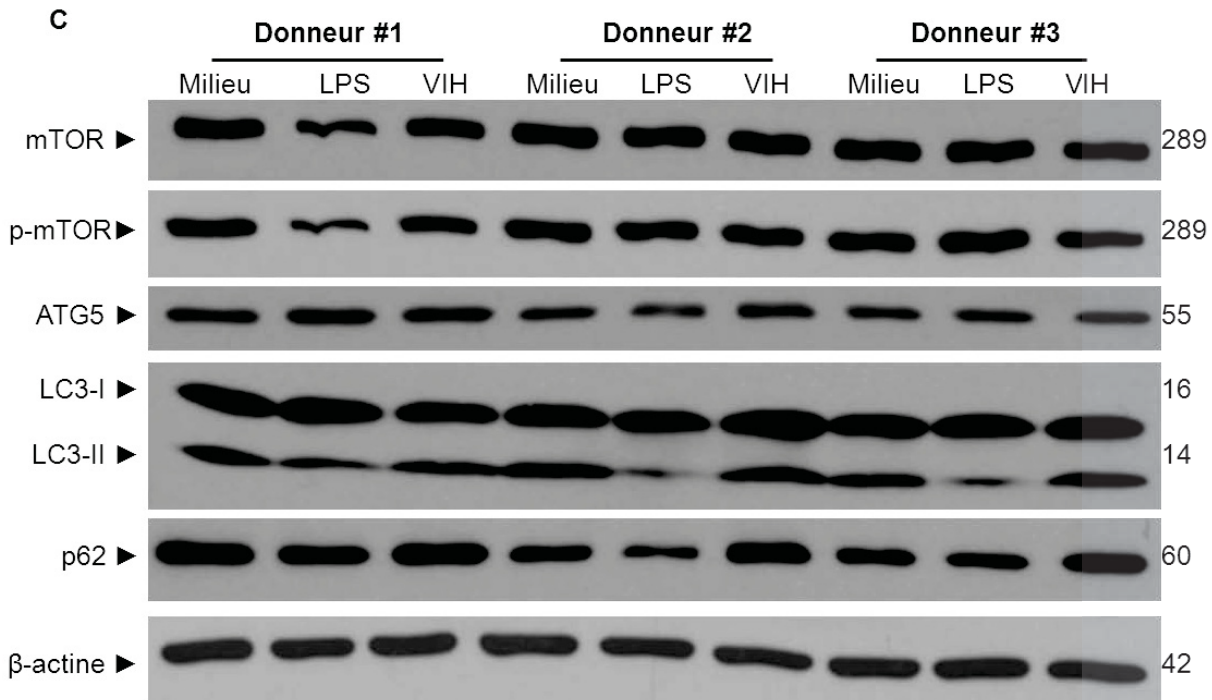


Figure 16. Effet d'une infection à VIH-1 et d'une stimulation par LPS sur l'expression de diverses protéines de l'autophagie chez les MDDC. (C-D) Voir page précédente.

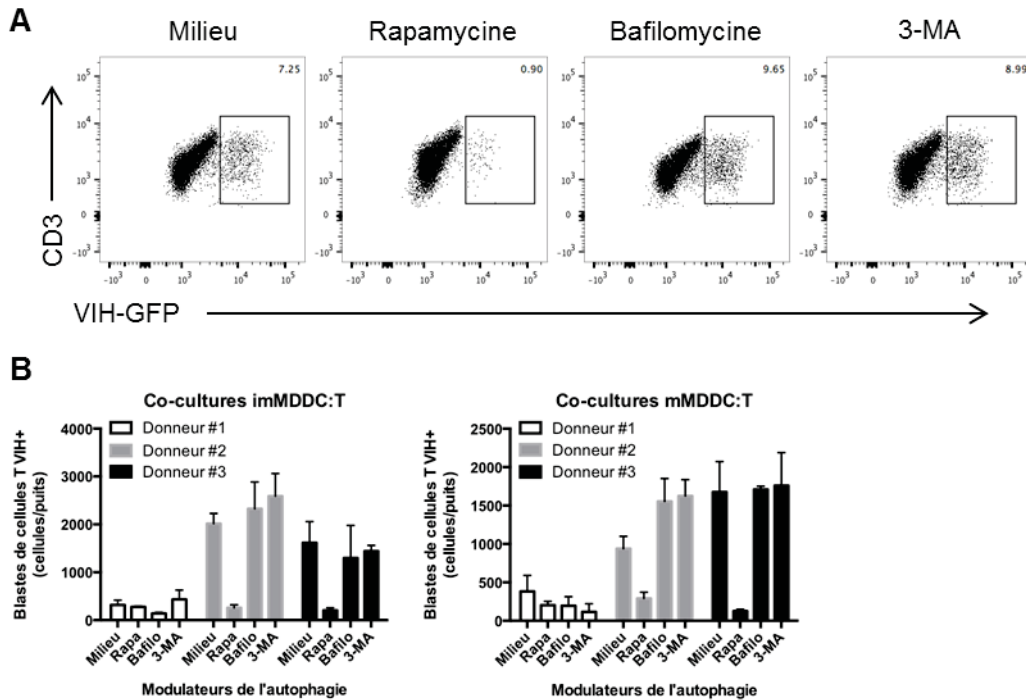


Figure 17. Le traitement des MDDC avec la rapamycine prévient la *trans* infection du VIH-1 aux cellules T CD4+. (A) Stratégie d'analyse FACS. Brièvement, les MDDC totales ont été maturées ou non avec du LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) puis traitées avec soit de la rapamycine (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), de la bafilomycine (50 nM) ou de la 3-MA (5 mM) pendant 2h. Puis, elles ont été lavées et exposées à une souche R5 NI43.BaL-GFP (50 ng de la protéine p24 de VIH-1/ 10^6 cellules pendant 3h. Le virus non-lié a été éliminé par de multiples lavages. Puis, les MDDC ont été mises en co-culture avec des cellules T CD4+ autologues chargées en CFSE et pré-activées avec des anticorps anti-CD3/CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pendant 5 jours à 37° C. Enfin, des analyses par FACS ont été effectuées pour évaluer le nombre de cellules infectées (GFP+). La stratégie utilisée est présentée ci-haut pour 1 donneur et est représentatif d'expériences réalisées sur 3 sujets sains (n=3). (B) La rapamycine diminue la *trans* infection du VIH-1 par les MDDC immatures et matures aux lymphocytes T CD4+ autologues. Les résultats obtenus pour 3 donneurs montrent que les MDDC traitées à la rapamycine ont une capacité réduite à transférer le virus aux cellules TCD4+ alors qu'on n'observe pas de changements significatifs pour les MDDC traitées à la bafilomycine ou le 3-MA.

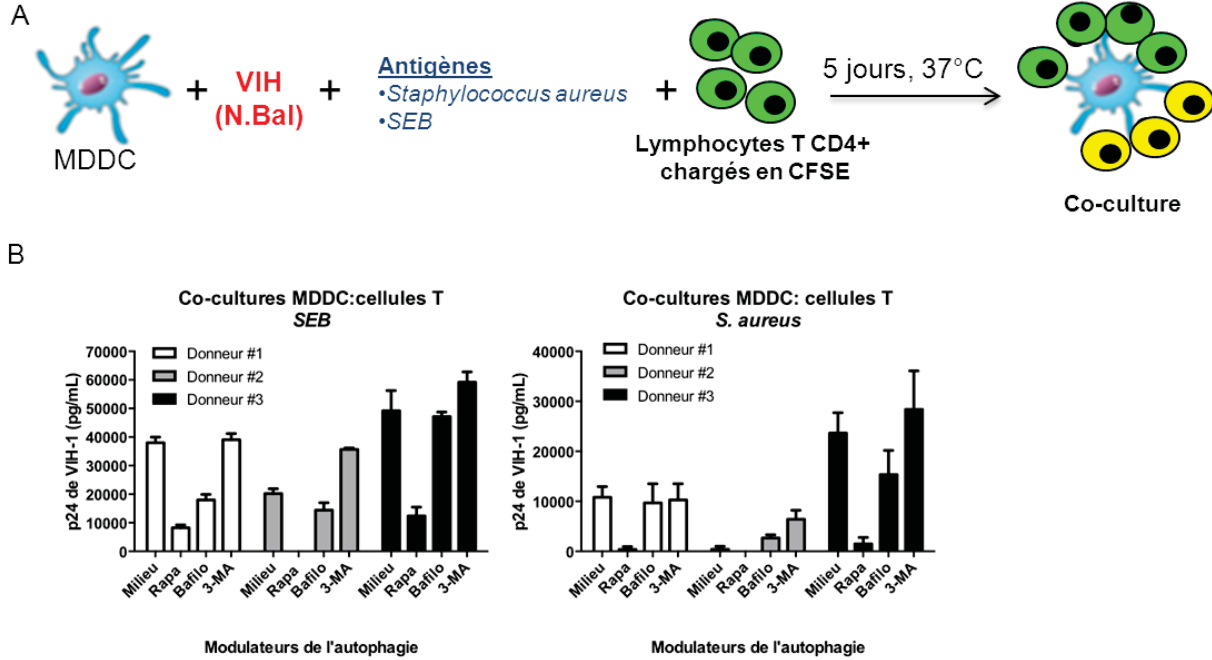


Figure 18. Un traitement des MDDC à la rapamycine diminue la *trans* infection du VIH-1 aux cellules T CD4+ dans le contexte d'une présentation antigénique. (A) Schéma expérimental. Les MDDC ont été traitées avec soit de la rapamycine (50 µg/mL), de la bafilomycine (50 nM) ou de la 3-MA (5 mM) pendant 2h. Puis, elles ont été lavées et exposées à une souche sauvage de R5 NI43.BaL (50 ng de la protéine p24 de VIH-1/10⁶ cellules pendant 3h. Le virus non-lié a été éliminé par de multiples lavages. Puis, les MDDC ont été chargées avec des peptides antigéniques de *S. aureus* ou SEB. Puis, elles ont été mises en co-culture avec des cellules TCD4+ autologues chargées en CFSE pendant 5 jours à 37° C. (B) La rapamycine décroît la *trans* infection des cellules TCD4+ par les MDDC. À jour 5, les surnageants des co-cultures ont été recueillis pour réaliser un ELISA de la protéine p24 de VIH-1 et ainsi évaluer sa réplication. Les résultats ont été obtenus à partir des 3 sujets différents.

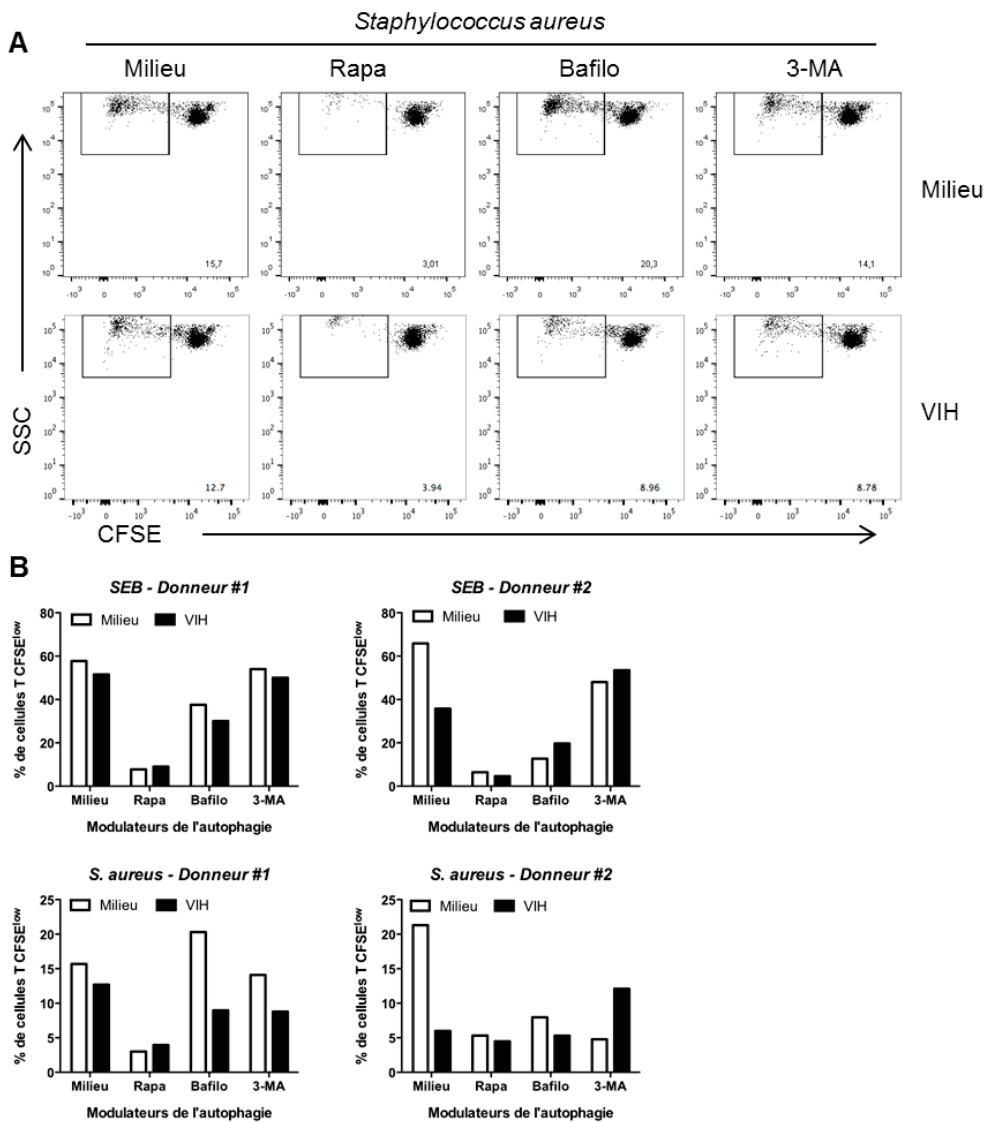


Figure 19. Les MDDC traitées à la rapamycine exhibent un potentiel immunogène altéré. (A) Schéma expérimental. Les MDDC ont été traitées avec soit de la rapamycine (50 µg/mL), de la bafilomycine (50 nM) ou de la 3-MA (5 mM) pendant 2h. Puis, elles ont été lavées et exposées à une souche sauvage de R5 N143.BaL (50 ng de la protéine p24 de VIH-1/10⁶ cellules pendant 3h. Le virus non-lié a été éliminé par de multiples lavages. Puis, les MDDC ont été chargées avec des peptides antigéniques de *S. aureus* ou *SEB*. Puis, elles ont été mises en co-culture avec des cellules TCD4+ autologues chargées en CFSE pendant 5 jours à 37° C. **(B)** À jour 5 de co-culture, les cellules ont été recueillies et analysées au FACS pour la capacité de cellules T à proliférer. Les résultats ont été obtenus à partir de 2 sujets différents.

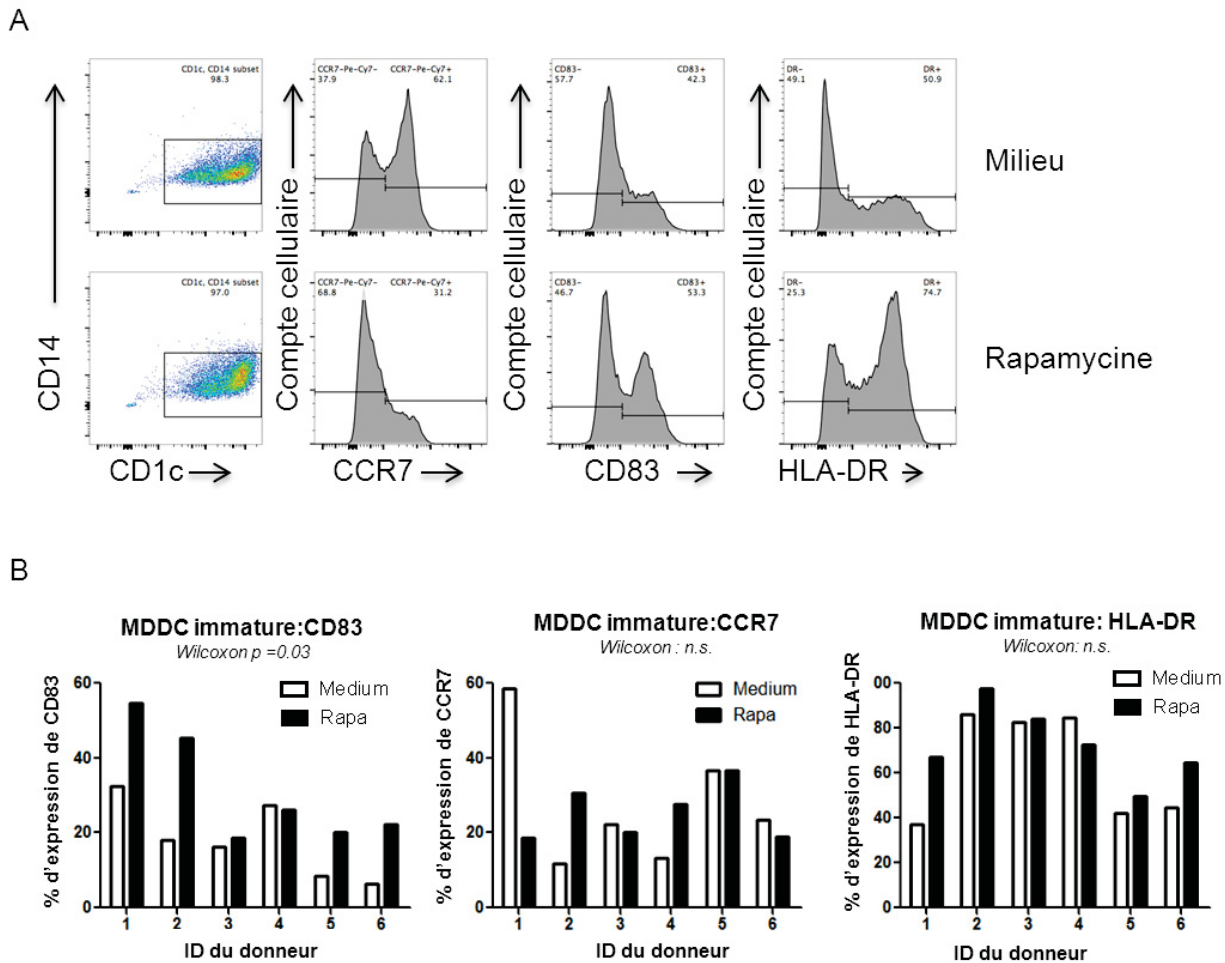
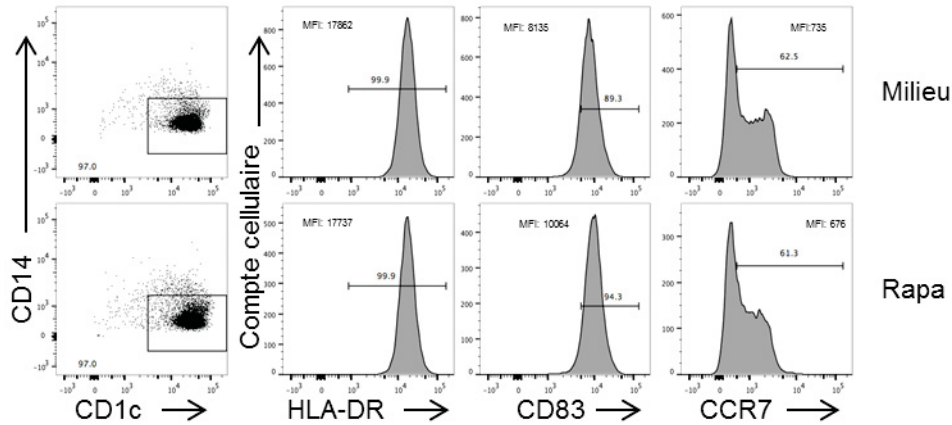


Figure 20. Impact de la rapamycine sur la maturation des MDDC. (A) Stratégie d’analyse FACS. Les MDDC ont été traitées durant 2h avec de la rapamycine (50 µg/mL). Ensuite, elles ont été lavées et marquées pour les molécules de maturation CD83, HLA-DR et CCR7. La stratégie d’analyse est illustrée pour 1 donneur et est représentative de 6 donneurs. **(B) Modulation des marqueurs de maturation des MDDC par module la rapamycine.** Les MDDC immatures régulent à la hausse le marqueur CD83 (Wilcoxon, $p=0.03$) mais ne module pas de manière significative l’expression de CCR7 ni de HLA-DR. Les expériences ont été réalisées sur 6 donneurs sains différents.

A



B

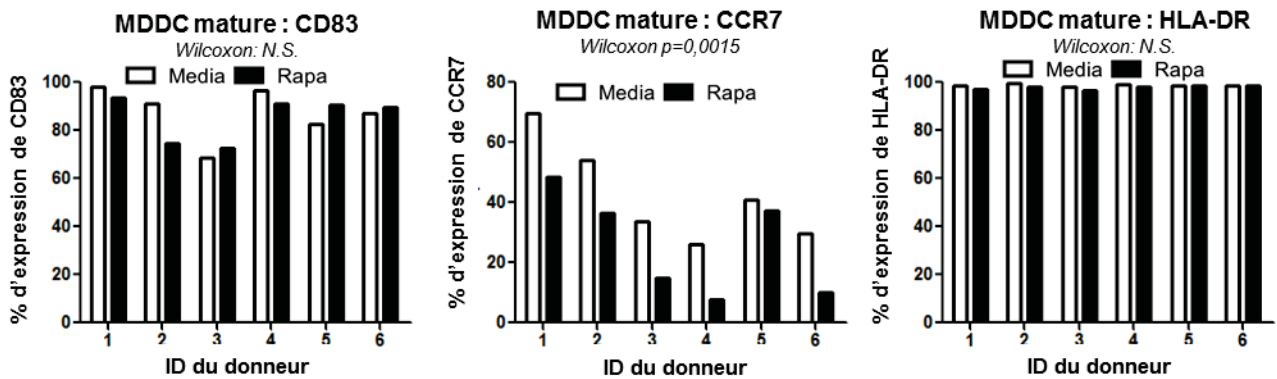


Figure 21. Impact de la rapamycine sur la maturation des MDDC matures. (A) Stratégie d'analyse en FACS. À jour 6, les MDDC ont été stimulées ou non par LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durant 18h. Puis, elles ont été lavées et traitées durant 2h avec de la rapamycine (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ensuite, elles ont été lavées et marquées pour les molécules de maturation CD83, HLA-DR et CCR7. La stratégie d'analyse est illustrée pour 1 donneur et est représentative des 6 donneurs. (B) Modulation des marqueurs de maturation des MDDC par module la rapamycine Les MDDC matures régulent à la baisse le récepteur de migration *trans*-endothéliale CCR7 (Wilcoxon, $p=0.0015$) mais ne module par l'expression de CD83 ni de HLA-DR. Les expériences ont été réalisées sur 6 donneurs sains différents.

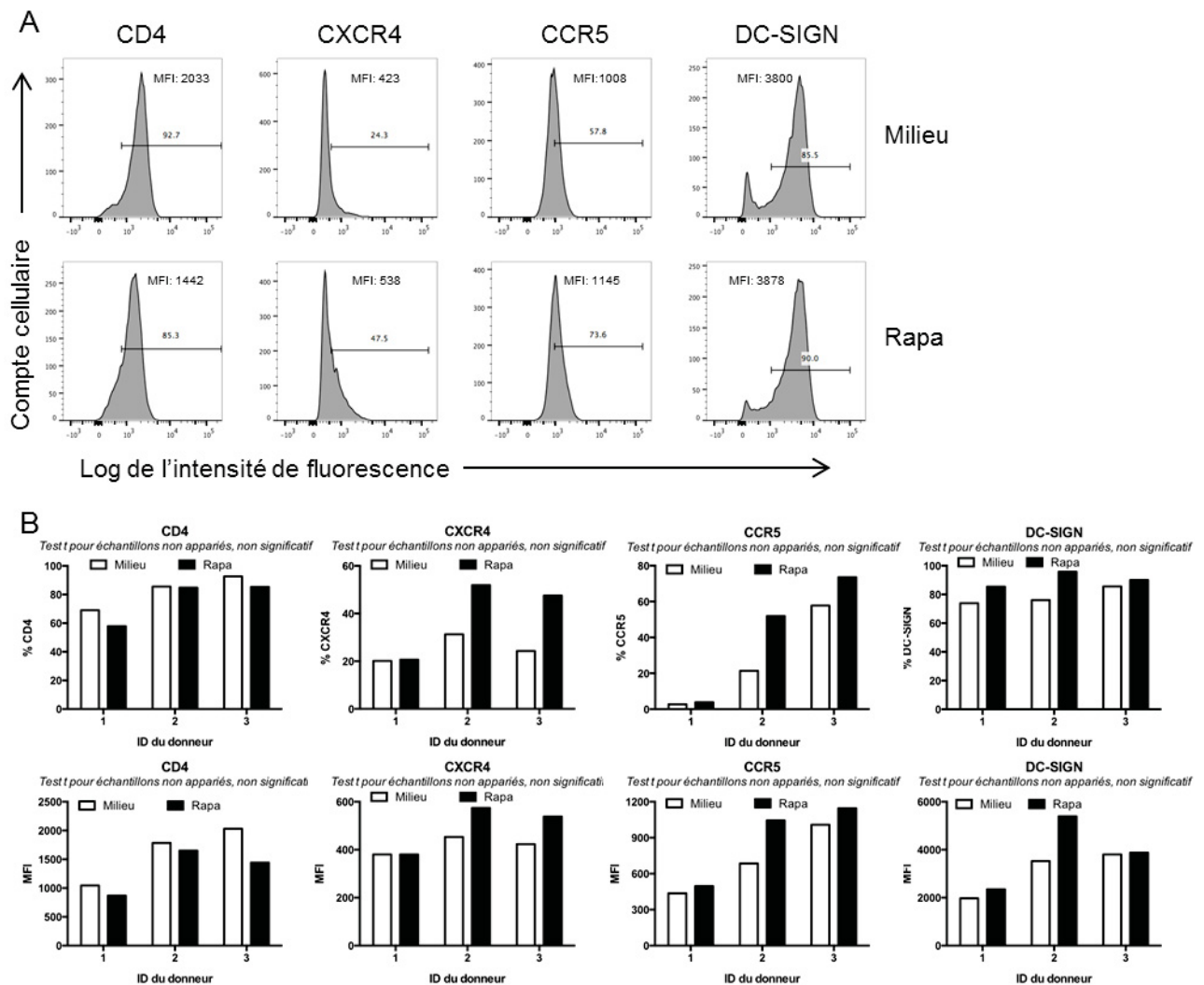


Figure 22. Effet de la rapamycine sur les récepteurs de fixation et d'entrée du VIH-1. (A) Stratégie d'analyse FACS. Les MDDC ont été traitées durant 2 heures avec de la rapamycine (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Puis, elles ont été lavées et marquées pour Des marqueurs reliés à l'entrée et la fixation du VIH-1 soit CD4, CXCR4, CCR5 et DC-SIGN. Les cellules ont ensuite été analysées par FACS. **(B)** La rapamycine ne module pas l'expression des récepteurs de fixation et d'entrée du VIH-1. Les analyses effectuées en cytométrie en flux montrent que la rapamycine ne régule pas de manière significative l'expression de CD4, CXCR4, CCR5 et DC-SIGN. Les expériences ont été réalisées sur 3 sujets sains différents.

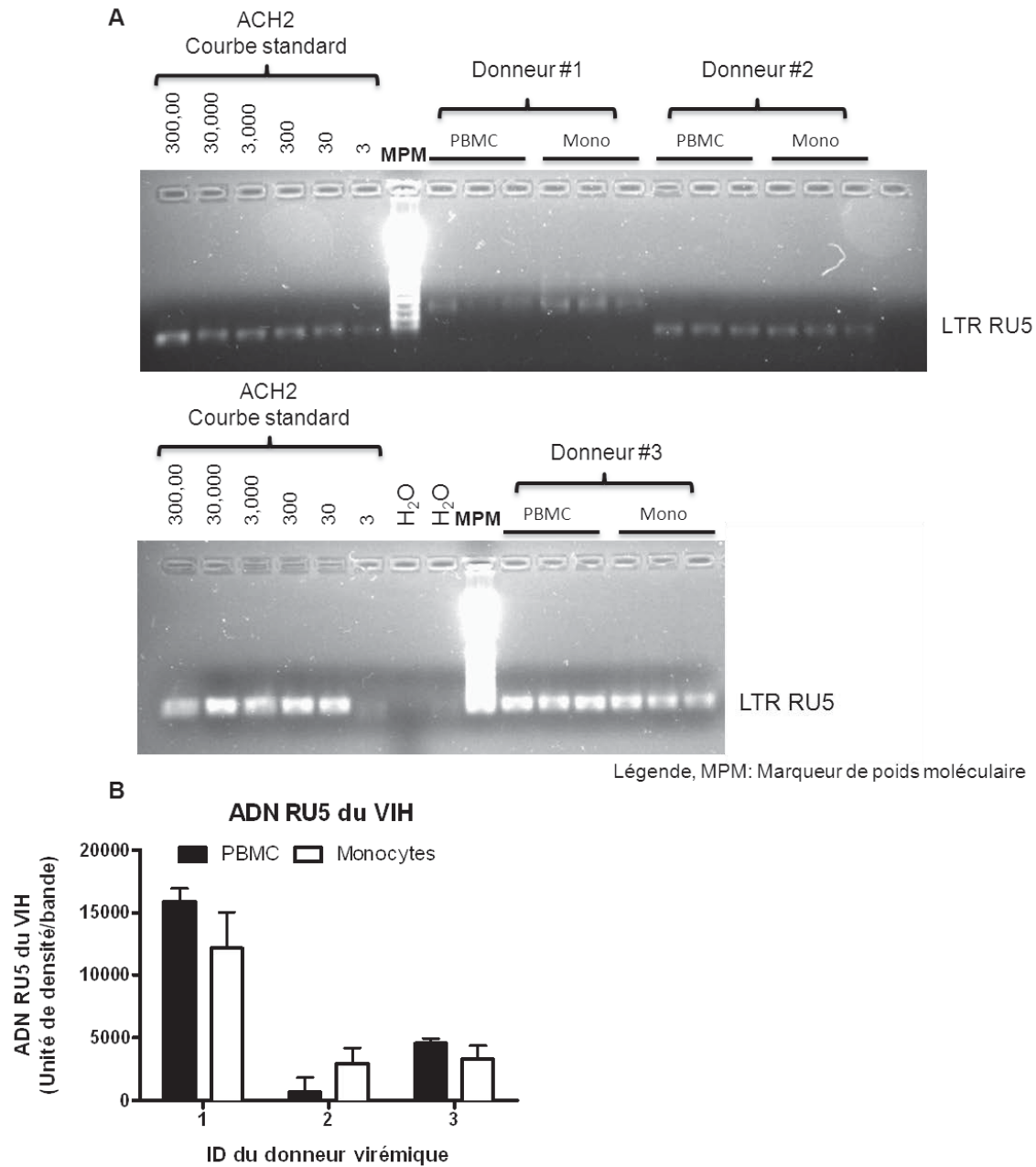


Figure 23. Détection de transcrits précoces d'ADN viral dans les monocytes de patients virémiques par PCR semi-quantitative. (A) Électrophorèse sur gel d'agarose. (B) Quantification de formes précoces de transcrits inverses du VIH dans les PBMC et les monocytes de sujets virémiques.

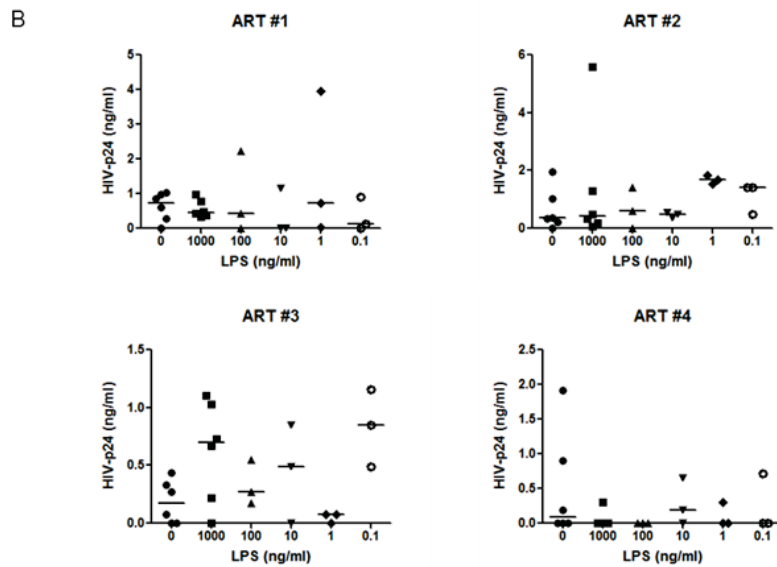
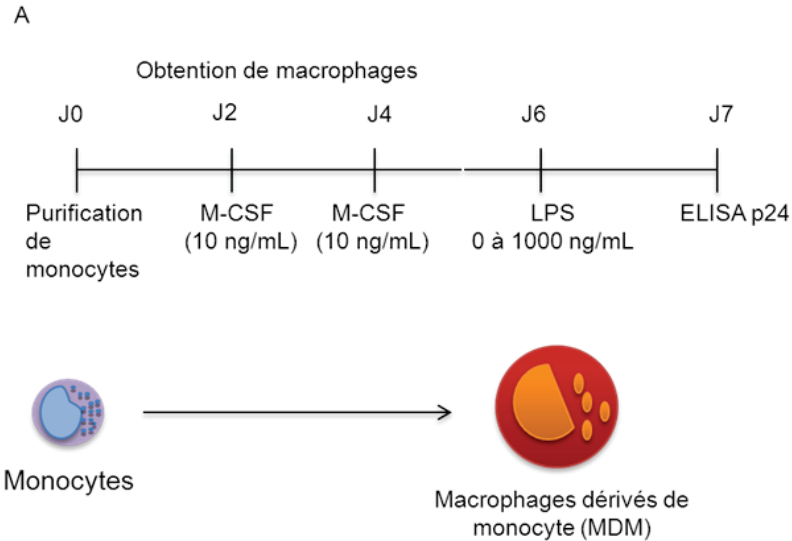


Figure 24. Quantification de la réplication du VIH-1 dans les macrophages dérivés des monocytes (MDM) des sujets infectés et sous ART. (A) Protocole expérimental. Les monocytes ont été purifiés à partir du sang périphérique de sujets infectés sous ART par sélection négative à l'aide de billes magnétiques, tel que décrit à la figure 1. Ils ont été mis en culture durant 6 jours en présence de M-CSF (10 ng/mL) pour polariser leur différenciation en macrophages. À jour 6, les MDM ont été stimulés ou non par différentes concentrations de LPS : 0,1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL ou 1000 ng/mL. Le lendemain, les surnageants des cultures ont été récoltés et les cellules ont subi une seconde stimulation par LPS (1 µg/ml) ou non. À jour 8, les surnageants des cultures ont encore été récoltés pour effectuer un ELISA de la protéine p24 de VIH-1. **(B)** Les MDM de patients infectés virémiques. Les surnageants de culture de MDM ont été récoltés à jour 8 et inactivés avec un tampon de neutralisation. Un ELISA de la protéine p24 a été réalisée pour quantifier la réplication virale dans les MDM.

5. Discussion, conclusions et perspectives

Les DCs sont des cellules présentatrices d'antigène indispensables pour l'induction des réponses T spécifiques à VIH-1. Elles possèdent aussi une capacité remarquable à capturer et transmettre le virus aux lymphocytes T CD4+. Sans équivoque, leurs fonctions sont exploitées par le VIH-1 afin que celui-ci assure sa dissémination à travers l'organisme. Il a été démontré que la voie de la présentation antigénique se trouve à l'intersection de celle de l'autophagie et que cette dernière est inhibée chez les DCs ce qui porte à croire que le virus exploite ces deux voies lors d'une infection à VIH-1.

5.1 Sommaire des résultats

Ce projet de maîtrise s'est construit autour de l'hypothèse selon laquelle le VIH-1 altère le processus d'autophagie dans les MDDC entraînant ainsi une défaillance de la présentation antigénique ainsi qu'un transfert plus efficace des virions aux lymphocytes T CD4+. Nos travaux de recherche se divisent en 2 volets, le premier se concentrant sur les effets du VIH- sur les propriétés fonctionnelles des DCs infectées *in vitro* et le second portant sur la persistance du VIH-1 dans les cellules myéloïdes des sujets infectés sous thérapie antirétrovirale.

Tout d'abord, en ce qui se rapporte à la première section, nous avons généré des DCs à partir du sang périphérique de sujets sains et validé leur pureté >95% en cytométrie en flux. Puis, nous avons étudié la capacité des MDDC à présenter des antigènes de *S. aureus*, *CMV* et *SEB* aux lymphocytes T CD4+ après une exposition à une souche R5 du VIH-1 *in vitro*. Les résultats ont montré que cette fonction des MDDC est défectueuse. Ensuite, nos analyses par FACS ont illustré une maturation incomplète des MDDC lorsque celles-ci sont exposées au VIH-1 contrairement à une stimulation par le LPS. Nous parlons ici d'une exposition au VIH-1 sans être capable de distinguer entre une infection productive et une pure préservation de la virulence des virions. Ceci parce que nous n'avons pas testé dans notre système la présence de l'ADN viral intégré. Dans ces conditions d'exposition au VIH-1, nous observons une

altération significative du potentiel immunogène des MDDC en réponse au lysat de *S. aureus* et à la protéine pp65 du *CMV* mais non pas en réponse au superantigène *SEB*. Ces résultats suggèrent une altération du processus d'apprêtement de l'antigène (dans le cas de *S. aureus*) ou du système moléculaire mis en place par les MDDC pour présenter le peptide pp65 du *CMV* aux cellules T. Tous ces phénomènes pourraient être en lien avec le processus d'autophagie, dont le rôle inhibiteur du VIH a été déjà rapporté [241].

L'autophagie est un processus catabolique qui peut être mesuré en quantifiant par immunobuvardage la lipidation de LC3-I en LC3-II [281]. De plus, une autophagie altérée se reflète par une accumulation de p62 et de d'autres protéines ubiquitinées [281]. Il est également possible de visualiser la formation des autophagosomes par microscopie électronique [281]. Nos données obtenues par immunobuvardage de type *Western* sont pour le moins contradictoires. Nous observons une augmentation de l'expression de la protéine mTOR et de sa forme phosphorylée phospho-mTOR à la suite d'une infection à VIH-1, ce qui stipule une activation de l'autophagie. Toutefois, une exposition à VIH-1 n'a pas modulé l'expression des protéines ATG5 ni de LC3-I et LC3-II. Il se pourrait que seul un faible pourcentage de cellules aient pu capturer le virus et ainsi expliquer partiellement l'obtention de ces données. Enfin, les MDDC infectées à VIH-1 augmentent l'expression de p62 ce qui laisse présager une accumulation de cette protéine et donc une interruption du flux autophagique. Puis, nos expériences d'immunobuvardage de type *Western* ont confirmé les informations dans la littérature stipulant que la rapamycine est un inhibiteur de la sérine/thréonine kinase mTOR, et par conséquent un activateur de la voie de l'autophagie. Nous avons ainsi pu témoigner d'une réduction de l'expression de cette protéine sous forme phosphorylée active (phospho-mTOR).

Par la suite, il s'est avéré que la rapamycine diminue la capacité des MDDC exposées au VIH-1 à *trans* infecter les lymphocytes T CD4⁺ activés par les anticorps anti-CD3/CD28. Ces résultats indiquent que l'activation de l'autophagie par la rapamycine pourrait contribuer à limiter la dissémination du virus à travers l'organisme. Cependant, à l'inverse de nos attentes, les inhibiteurs d'autophagie tels que la bafilomycine et le 3-MA ne propulsent pas la cadence de cette activité des MDDC. En effet, nos résultats obtenus en situation de présentation antigénique (*SEB* et *S. aureus*) ne montrent pas des changements significatifs dans la *trans*

infection en présence de ces drogues. Des études par Ahmed R *et al.* montrent que le traitement à la rapamycine restaure la capacité des DCs à induire des réponses T CD8+ spécifiques au VIH [282]. Ainsi, nous nous sommes posé la question si la rapamycine restaurerait la capacité des MDDC exposées au VIH-1 à provoquer la prolifération des lymphocytes T CD4+ spécifiques à un antigène. Suivant cela, nos expériences montrent que l'habileté des MDDC à présenter *SEB* ou *S. aureus* est fortement diminuée contrairement à ce qui était attendu. Néanmoins, ces données sont en accordance avec la littérature qui souligne les propriétés immunosuppressives de cette drogue [283-285]. De façon similaire à la *trans* infection, aucun effet significatif et consistant entre les donneurs n'a été observée sur le processus de présentation antigénique pour les inhibiteurs d'autophagie bafilomycine et 3-MA. Il est possible que nos conditions expérimentales n'aient pas été optimales pour observer les effets de la bafilomycine et du 3-MA sur la *trans* infection et la présentation antigénique, et ceci du point de vue de la durée d'exposition aux drogues, concentration, et/ou état de la privation de nutriments des cellules. Des études futures plus détaillées sont nécessaires pour conclure sur l'action de la bafilomycine et du 3-MA. Néanmoins, une exposition de 2h à la rapamycine à 50 µg/mL fut suffisante pour observer des effets significatifs et consistants entre les donneurs, soulignant ainsi l'importance d'utilisation de cette classe de drogue comme potentiel traitement alternatif pour limiter la dissémination du VIH-1 *in vivo*.

L'effet immunosuppresseur de la rapamycine pourrait s'expliquer par une maturation altérée des MDDC. En effet, nos analyses indiquent que les MDDC immatures traitées à la rapamycine expriment le marqueur de maturation CD83, une molécule inhibitrice. Ceci pourrait donc les importuner dans l'accomplissement de leurs fonctions. Au même titre, l'exposition à la rapamycine prévient la régulation à la hausse du CCR7 sur des MDDC matures, ce qui laisse prétendre que ces cellules ne peuvent pas migrer de façon optimale vers les tissus lymphatiques secondaires pour y présenter un antigène aux lymphocytes T CD4+ qui peuplent ces tissus.

Enfin, le second volet se penchait plutôt sur la contribution des cellules myéloïdes à la persistance virale sous thérapie antirétrovirale. Nos résultats obtenus par PCR semi-quantitative RU5 ont permis de détecter la présence de transcrits précoces du VIH-1 chez les monocytes des sujets infectés et sous ART. D'un autre côté, chez les MDM d'individus du

même groupe, il a été possible de détecter une activité de réplication du VIH-1 à de faible niveau. Ceci laisse croire que le virus pourrait s'intégrer dans les monocytes lors de leur différenciation en macrophages pour assurer sa survie.

5.2 Étude de l'impact d'une infection *in vitro* à VIH-1 sur les fonctions des MDDC

5.2.1 Conséquence de l'infection à VIH-1 sur l'habileté à présenter l'antigène

En premier lieu, nous avons émis l'hypothèse que l'infection à VIH-1 avait un effet délétère sur les fonctions des MDDC. Les DCs représentent une population cellulaire très diversifiée et bénéficient d'une distribution ubiquitaire favorisant la pléthore de leurs activités immunitaires. Elles participent à la capture, l'apprêtement et la présentation antigénique afin de créer un pont entre l'immunité innée et adaptative. Il ne serait pas surprenant que le VIH-1 renverse ces aptitudes dans le but d'assurer sa survie et sa dissémination à travers l'organisme. Les résultats générés appuient notre hypothèse. Nous avons démontré que l'habileté des MDDC à présenter *SEB*, *CMV* et *S. aureus* se détériore à la suite d'une exposition au VIH-1. Il est bien caractérisé dans la littérature que la protéine virale Nef interfère avec l'expression du CMH que l'on retrouve en quantité abondante à la surface des MDDC [30]. Un des mécanismes proposés est qu'il médie la réduction du niveau de CMH de classe II mature à la surface cellulaire tout en augmentant la quantité de CMH de classe II immature qui est dysfonctionnelle due à son association avec la chaîne invariante [286]. Il a aussi été suggéré que Nef agit sur le trafic des molécules de CMH internalisées en retardant leur transport vers la surface et en détournant plutôt leur trajectoire vers la machinerie du lysosome pour une dégradation [287]. De plus, plusieurs travaux exposent au grand jour que le VIH-1 diminue l'expression de la famille des récepteurs CD1 (complexe mineur d'histocompatibilité), incluant CD1a, CD1b, CD1c, CD1d et CD1e, des glycoprotéines associées au CMH de classe I et jouant un rôle dans la présentation de lipides antigéniques [288]. Des études menées par une équipe nipponne ont dévoilé que Nef modulait à la baisse l'expression de CD1a [289]. C'est *via* son association avec la *p21-activated kinase 2* (PAK2) et la *SH3-protein hemopoietic cell kinase* (HCK) qu'elle entraînerait une diminution importante de CD1a empêchant une présentation antigénique adéquate aux cellules T (non publiée mais présenté à un congrès). D'autre part, la protéine Vpu inhibe la présentation d'un antigène lipidique aux cellules NK en

interagissant avec CD1d. Vpu retient CD1d dans les compartiments endosomaux précoces abrogeant ainsi son recyclage à la surface cellulaire [290].

L'ensemble de ces facteurs favorise une défektivité de la présentation antigénique par les MDDC. Il illustre également comment le VIH-1 échappe à la réponse immunitaire de l'hôte notamment en empêchant sa destruction par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, en supprimant une stratégie de défense coordonnée par les lymphocytes T CD4⁺ et en diminuant l'activation des cellules NK. En bref, ces éléments soutiennent les résultats que nous avons générés.

5.2.2 Le VIH-1 échoue à induire la maturation des MDDC

En deuxième lieu, nous avons étudié le phénotype de maturation des MDDC subséquent à une infection à VIH-1. Nos résultats ont montré que le virus était incapable de provoquer une maturation complète des MDDC. Celles-ci modulaient à la baisse l'expression des récepteurs CD83 et CCR7 mais celle de HLA-DR était tout de même stable avec une légère tendance vers la diminution. Cela confirme les données dans la littérature et supportent notre hypothèse. Le processus de maturation des DCs est le contrecoup d'une infection. Il est enclenché subséquentement à divers événements biologiques tels que la liaison d'un ligand avec son PRR exprimé par la DC, la détection de cytokines pro-inflammatoires ou la capture d'un produit dérivé d'une bactérie ou d'un virus. La DC subit alors une série de transformations phénotypiques. Cette évolution est accompagnée d'une perte de fonction de capture d'antigène au profit d'une habileté à le présenter aux lymphocytes T et d'induire leur prolifération. Parmi les gènes modulés, on recense CD83, une glycoprotéine membranaire de la superfamille des Ig. Pendant longtemps, cette molécule a été considérée comme un simple marqueur de maturation permettant de discriminer les DCs matures des immatures, alors que le mystère planait autour de sa fonction véritable. Une récente étude a permis de clarifier partiellement son rôle qui gravite autour de l'induction puissante de la prolifération de cellules T allogéniques [291, 292]. En effet, une régulation à la baisse de CD83 par interférence ARN (ARNi) a entraîné une diminution de la capacité des DCs à induire une prolifération des lymphocytes T allogéniques et à activer des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à des antigènes

tumoraux. De plus, une expression plus grande des molécules de co-stimulations par les DCs aux lymphocytes T naïves et mémoires a été observée [292]. Il ne serait donc pas étonnant que le VIH-1 inhibe l'expression de CD83 pour diminuer la capacité des DCs à provoquer la prolifération des cellules T CD4+ et ainsi échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. D'autre part, nos expériences montrent que les MDDC infectées à VIH-1 étaient incapables de réguler à la hausse CCR7. L'équipe de Christophe Caux *et al.* a montré que la maturation des DCs induisait une augmentation de l'expression de ce récepteur de chimiokine afin de permettre la migration des DCs vers les tissus en périphérie et induire une réponse immunitaire adaptative [139]. Le CCR7 intervient sur deux modules de signalisations indépendants dont un qui implique les membres des MAPK et l'autre qui sollicite la voie de Rho/Pyk2/cofiline [293]. Néanmoins, ce sujet sème la controverse puisque plusieurs équipes soutiennent que cette modulation à la hausse de CCR7 n'est pas directement liée à la maturation des MDDC et ne peut pas être citée comme une évidence du déroulement de cet événement biologique. Une étude dirigée par Bouchon *et al.* montre que la protéine adaptatrice de signalisation DAP12 (*DNAX activation protein 12*) provoque une hausse de l'expression de CCR7 sans toutefois permettre une maturation complète des MDDC [294]. Cette abortion du processus de maturation donnerait naissance au phénomène de tolérance. Il aurait fallu étudier d'autres molécules comme les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 [295, 296]. Malgré une baisse de l'expression de CD83 et de CCR7, celle de HLA-DR est régulée à la hausse. En fait, son niveau d'expression est sensiblement le même que pour les cellules non-infectées que celles stimulées par le LPS qui agit en tant que contrôle positif. Ces résultats concordent avec des travaux menés par l'équipe de Anne Hosmalin, effectués par contre sur des DCs de la rate de patients infectés [297]. Les mécanismes moléculaires régissant cette modulation demeurent toutefois inconnus. La maturation des MDDC apparaît donc comme un prérequis pour esquisser le scénario d'une défense antivirale efficace. Bien évidemment le VIH-1 contourne cet événement biologique pour annuler une réponse immunitaire et se propager chez l'hôte.

5.3 Le VIH-1 module l'expression de certaines protéines de l'autophagie

Dernièrement, des études ont rapporté que le VIH-1 inhibe l'autophagie chez les DCs *via* une activation exhaustive de la sérine thréonine kinase mTOR par la protéine de l'enveloppe virale gp120 [241]. La protéine mTOR joue un rôle crucial dans l'autophagie, son

activation empêche le déroulement de l'autophagie. Nos résultats en immunobuvardage sont mitigés. En effet, ces derniers ne montrent pas de tendance corroborant la littérature, c'est-à-dire une augmentation de l'expression relative de mTOR et de phospho-mTOR à la suite d'une infection à VIH-1. Ceci est la phase qui initie l'autophagie. Par contre, nous observons une augmentation de p62 qui indique un blocage du flux autophagie et donc un frein aux évènements tardifs du processus catabolique. Ces données sont en accord avec les recherches menées par Blanchet *et al.* [298], mais ne constituent pas une suite logique avec ceux obtenus avec mTOR. Étant donné que mTOR est à la croisée de plusieurs voies métaboliques qui régulent des phénomènes importants, il ne serait pas surprenant que la cellule ait compensé l'inhibition de l'autophagie en modulant des voies alternatives. En bref, il est difficile de conclure sur les résultats mixtes obtenus. Plusieurs éléments techniques devraient être améliorés avant de répéter l'expérience tels le temps d'exposition au VIH-1, la quantité de virus utilisée, *etc.*

5.4 La rapamycine inhibe l'expression de la protéine mTOR

La sérine/thréonine kinase mTOR, pour *mammalian target of rapamycin*, tire son nom du fait qu'elle est ciblée par l'antibiotique rapamycine. Nous avons décidé de visualiser par *western blot* la modulation de son expression et du même coup valider notre stock de ce macrolide et optimiser le protocole expérimental. L'expression de la protéine mTOR ainsi que de sa forme phosphorylée phospho-mTOR a diminué à la suite d'un traitement de 2h avec la rapamycine. Ceci confirme les données dans la littérature et nous a permis d'incorporer l'élément de l'autophagie dans les expériences subséquentes via l'utilisation de la rapamycine. Il a été démontré que la voie de l'autophagie était contournée par le VIH-1 pour que ce dernier promeuve sa réplication.

5.5 L'exposition des MDDC à la rapamycine prévient la *trans* infection de VIH-1 aux lymphocytes T CD4+

L'infection en *cis* survient lorsque les nouveaux virions produits dans les DCs vont infecter productivement les lymphocytes alentour [270]. À l'opposé, la *trans* infection est le phénomène par lequel une cellule présentatrice d'antigène va transférer le virus à une cellule T

CD4⁺ soit à travers une structure appelée synapse virologique, soit via la voie de sécrétion des exosomes [270, 299, 300]. Nous nous sommes interrogés si l'autophagie avait un rôle sur cette fonction des DCs dont le VIH-1 exploite pour maintenir sa survie chez l'hôte. En accord avec notre hypothèse, la rapamycine a décriu la *trans* infection de VIH-1 dans le contexte d'une présentation antigénique (*SEB* et *S. aureus*). Par contre, la 3-MA et la bafilomycine n'ont pas réussi à augmenter ce processus. Il faut cependant souligner que notre approche expérimentale ne nous permet pas de discriminer entre une réelle *trans* infection et une infection productive par les DCs ce qui a un impact non-négligeable sur nos résultats. Plusieurs études ont montré qu'une transmission du VIH de cellule en cellule est plus efficace et rapide qu'une infection avec des particules libres du virus [301-303]. Des expériences avec des *transwells* seraient appropriées pour différencier entre ces deux modes d'infection. Des travaux menés par Fabian Blanchet et Vicent Piguet démontrent que l'inhibition précoce de l'autophagie par l'interaction de mTOR avec les protéines de l'enveloppe virale entraîne une croissance immédiate de la *trans* infection du VIH des DCs aux cellules T CD4⁺ [304]. En ce sens, une restauration de l'autophagie par la rapamycine devrait diminuer une *trans* infection du VIH et c'est ce que nous observons avec nos résultats.

Afin d'enquêter plus méticuleusement sur le rôle de la rapamycine dans l'habileté de *trans* infection des MDDC en faisant abstraction de leur potentiel immunogène, nous avons co-cultivé des MDDC avec des cellules T CD4⁺ activés avec des Acs anti-CD3/CD28. Sous ces conditions expérimentales, nous avons obtenu les mêmes résultats que dans le contexte d'une présentation antigénique. Les mécanismes moléculaires par lesquels la rapamycine régule la *trans* infection par les DCs reste à être élucidés.

Étant donné que la *trans* infection par les DCs implique des molécules comme DCIR ou DC-SIGN, il serait intéressant de se pencher sur leur lien avec l'autophagie dans le contexte d'une infection à VIH-1 et examiner leur contribution à la dissémination virale. DC-SIGN facilite la transmission virale des DCs aux cellules en se liant directement à la glycoprotéine de l'enveloppe virale gp120 [176, 305]. En parallèle, l'expression de DCIR est augmentée chez les lymphocytes T CD4⁺ à la suite d'une infection à VIH-1, favorisant ainsi la propagation du virus [306].

La voie de sécrétion des exosomes et leur connexion avec l'autophagie serait également une autre voie à explorer puisqu'il été démontré que les exosomes dérivés de DCs

immatures peuvent favoriser la *trans* infection du VIH-1 [307]. De plus, il existerait un *crosstalk* très intime entre l'autophagie et la voie de sécrétion des exosomes [308, 309]. Il se pourrait fort bien que l'équilibre entre les deux soit débalancé par une infection à VIH-1 afin de perturber l'homéostasie cellulaire. Notamment, au lieu de fusionner avec les lysosomes, les autophagosomes peuvent s'associer aux corps multivésiculaires (MVB; *Multivesicular bodies*) qui forment les exosomes pour recycler ces derniers mais également pour dégrader les protéines cargo [308]. De plus, l'autophagie régule la formation des MVB et leur relâche [310]. Somme toute, nos résultats ont fourni des évidences mécanistiques d'un lien entre l'autophagie et la *trans* infection du VIH-1.

5.6 Le traitement des MDDC à la rapamycine altère la prolifération des cellules T CD4+ spécifiques aux antigènes

5.6.1 La rapamycine altère le potentiel immunogène des MDDC

Étant indéniablement les meilleures CPA du système immunitaire, l'habileté des DCs à induire une prolifération antigénique des lymphocytes T est constamment louangée. Or, lorsque survient une infection à VIH-1, cette virtuosité des DCs est compromise et empêche la coordination d'une réponse immunitaire efficiente. À cela s'ajoute une rapide inhibition de la voie de l'autophagie. Nous avons donc étudié le potentiel immunogène des MDDC en relation avec le processus d'autophagie lors d'une infection à VIH-1. Contre toutes attentes, nos résultats indiquent que la rapamycine qui active l'autophagie *via* l'inhibition de mTOR agit sur les MDDC en altérant leur capacité exceptionnelle à induire la prolifération des cellules T CD4+ en réponse aux antigènes *SEB* et *S. aureus*. En contrepartie, la bafilomycine et la 3-MA n'affectent pas ce processus de manière significative. Ces données sont cependant en accord avec la littérature qui met au grand jour les propriétés immunosuppressives de la rapamycine [311]. En effet, cette drogue a récemment été introduite en clinique pour contrer les rejets de greffes et aussi pour traiter certaines formes de cancers [312, 313]. Son utilisation à la suite d'une transplantation a démontré un taux élevé de survie post-opératoire pour un large éventail d'organes incluant les reins, le pancréas et la peau chez une variété de modèles *in vivo* comme la souris, le porc et le rat [312, 314, 315]. La qualité immunosuppressive de la rapamycine

provient de son mode d'action inhibiteur de mTOR, qui est à la croisée d'un vaste réseau de voies métaboliques. Cette sérine/thréonine kinase contrôle entre autres la prolifération cellulaire, la synthèse protéique, la survie cellulaire, *etc.* Il a été montré dans un modèle *in vitro* de souris que les DCs traitées à la rapamycine exprimaient de faible niveau de CMH de classe II et de molécules de co-stimulation (en particulier CD86). De cela résulte une activation affaiblie des cellules T CD4+ qui meurent par apoptose [316]. Une autre étude menée chez la souris par l'équipe d'Angus Thomson montre que la contribution des DCs traitées la rapamycine à l'expansion des cellules T effectrices est nettement réduite [317]. Ces DCs participent plutôt à l'induction de la tolérance en activant des Treg [317].

5.6.2. La rapamycine interfère avec le processus de maturation des MDDC

Le processus de maturation des MDDC implique un changement phénotypique de la cellule qui passe de phagocytaire à présentatrice d'antigène professionnelle. Cela est accompagné de pertes et de gains de fonctions. De nombreuses études ont rapporté que la rapamycine interfère avec certaines fonctions des MDDC comme la phagocytose ou encore la capture d'antigène [318, 319]. Toutefois, son rôle exact sur la maturation des MDDC demeure inconnu.

Nos résultats obtenus montrent que les MDDC immatures prétraitées avec la rapamycine régulent à la hausse le marqueur de maturation CD83 alors qu'aucun changement significatif n'est observé pour CCR7 ou HLA-DR. Ceci suggère une maturation précoce des MDDC et pourrait ainsi altérer leurs fonctions migratoires et de présentation antigénique.

En contraste, nos résultats démontrent que les MDDC maturées par LPS et traitées avec la rapamycine régule à la baisse l'expression du récepteur de migration *trans*-endothéliale CCR7 de manière significative mais les marqueurs CD83 et HLA-DR ne sont pas affectés. Ces résultats sont d'une importance remarquable *in vivo*. En effet, le recrutement des DCs aux sites d'inflammation ainsi qu'aux organes lymphoïdes secondaires s'effectue via le récepteur CCR7 et est crucial pour l'initiation d'une réponse antigène spécifique par le système immunitaire. Les MDDC seraient donc coincées dans les organes périphériques et incapables de migrer vers les ganglions lymphatiques pour présenter un antigène. Nos résultats sont à l'opposé des études conduites par Piemonti *et al.* En effet, leurs travaux montrent que la rapamycine augmente plutôt la migration des MDDC maturées par LPS que des MDDC

immatures vers les organes lymphoïdes en réponse au ligand CCL19 [320]. Ceci pourrait être due à une inhibition de la production d'IL-10 autocrine [320]. Nos données illustrent que pour seulement 2 des 6 donneurs, les MDDC immatures accroissent leur expression du récepteur CCR7 alors que la tendance générale observée pour les MDDC matures est une diminution de l'expression de ce récepteur. Nos travaux abondent néanmoins dans le même sens que la littérature mettant en avant-plan les qualités immunosuppressives de la rapamycine. En effet, l'incapacité de ces cellules à migrer vers les ganglions lymphatiques empêche l'activation des cellules T spécifiques dans ces tissus et donc une réponse immunitaire affaiblie.

5.7. La rapamycine ne module pas l'expression des molécules de fixation et d'entrée du VIH-1 chez les MDDC

La fixation et l'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte représentent les premières étapes du cycle viral et sont donc critiques pour la survie du virus. Le récepteur CD4 ainsi qu'un des deux co-récepteurs CCR5 ou CXCR4 sont requis pour cette étape. Le VIH-1 a également mis à profit des facteurs de la cellule hôte pour se propager. C'est le cas notamment du récepteur de lectine de type C DC-SIGN qui peut directement internaliser le virion et le transférer aux cellules T. Nous avons donc décidé d'investiguer sur l'effet de la rapamycine sur l'expression de ces diverses molécules.

Nos résultats montrent que la rapamycine ne régule pas de manière significative l'expression de ces récepteurs. Aucune étude n'a encore rapporté l'effet de la rapamycine sur l'expression de CD4 sur les DCs, par contre il a été montré que cette drogue exerçait une répression de l'expression de CD4 sur les lymphocytes T CD4+. De plus, une étude dirigée par Redfield *et al.* révèle que l'utilisation d'une faible dose de rapamycine variant entre 1 à 10 nM réduisait l'expression de CCR5 chez les DCs. Il se pourrait que le protocole expérimental, n'ait pas donné suffisamment de temps à la DC d'activer l'autophagie. Il aurait fallu mettre les MDDC traitées à la rapamycine en culture durant deux jours au minimum pour permettre à la machinerie transcriptionnelle de transcrire et de traduire l'ensemble des gènes de l'autophagie. Ensuite, nous n'observons pas non plus de changement significatif dans l'expression du corécepteur CXCR4. Puis, nos résultats indiquent que la rapamycine n'affecte pas de manière significative l'expression du récepteur DC-SIGN. Cela diverge de ce qui est présenté dans la

littérature. Une étude conduite par Zhou T. démontre que l'expression de ce récepteur de lectine de type C chez les DCs était modulée à la baisse et de manière dose-dépendante suivant une exposition à la rapamycine. Ce phénomène serait associé à la suppression de l'expression du gène PU.1, un facteur de transcription [321]. Enfin, il serait intéressant de considérer la comparaison de cellules infectées à VIH-1 *versus* non infectées lors de la reproduction de cette expérience et de réaliser des études de dose-réponse ainsi qu'une analyse cinétique.

5. 8 Contribution des cellules myéloïdes à la persistance du VIH-1

5.8.1 Détection de transcrits précoces d'ADN viral chez les monocytes de sujets infectés à VIH-1

Les monocytes expriment le récepteur CD4 et les co-récepteurs CXCR4 et CCR5 et pourraient être susceptibles à une infection par le VIH-1 [322]. Ils représentent des réservoirs potentiels de VIH-1 puisqu'ils sont résistants aux effets cytopathiques du virus [323]. Toutefois, plusieurs études ont rapporté que les monocytes du sang périphérique supportaient mal une réplication virale [121, 277, 324]. En effet, la réplication du VIH dans les monocytes semble posséder certains défauts post-entrée tels qu'une transcription inverse ralentie, un import nucléaire retardé, un pool de nucléotides limité et une intégration désuète qui empêche la complétion du cycle viral [323]. Nos résultats obtenus par PCR montrent que des transcrits précoces d'ADN viral sont détectés dans les monocytes de patients virémiques. Toutefois, cette quantité de provirus est inférieure à ce qui est retrouvée dans les PBMC pour 2 de ces 3 donneurs ce qui concorde avec la littérature. La présence d'ADN proviral dans les monocytes suggère une contribution des monocytes à la propagation du VIH-1. Pendant longtemps, un paradigme proposait que les monocytes entraient dans les tissus et se différenciaient de manière irréversible en macrophage ou en DC. Or, une récente étude menée par Randolph et *al.* a bouleversé cette vision bien établie dans la communauté scientifique. Ces travaux effectués sur un modèle *in vivo* de souris montrent que les monocytes qui traversent la barrière *trans*-endothéliale peuvent rester des monocytes et s'accumuler dans les tissus ou recirculer dans les organes lymphoïdes sans se différencier [279]. De façon importante, ces monocytes capturent et présentent des antigènes et on pourrait ainsi imaginer que les monocytes

circulants capturent aussi le VIH. Ainsi, comme il a déjà été démontré que les monocytes, plus particulièrement ceux qui expriment CD16, forment des conjugués avec les cellules T CD4+ pour initier une réplication virale, nos résultats appuient l'idée d'une dissémination du VIH-1 dans les tissus par les monocytes [277].

5.8.2 Les MDM de patients VIH+ sous ART supportent la réplication virale

La plasticité des monocytes donne naissance aux macrophages. Les macrophages sont une importante cible du VIH-1 et représentent également un réservoir viral important [325]. Nos résultats ont démontré que malgré un traitement aux antirétroviraux, les MDM de patients infectés poursuivent une activité de réplication virale à faible niveau. Ceci illustre la contribution des cellules myéloïdes à la persistance du VIH-1 dans l'organisme et la dissémination virale dans les tissus. Les mécanismes de latence sont très complexes et demeurent nébuleux. Compte tenu de la faible fréquence des MDM infectés, des questions se posent sur la contribution relative des monocytes CD16+ *versus* CD16- à ce réservoir viral potentiel. Ces résultats préliminaires ouvrent une voie nouvelle de recherche au laboratoire qui vise la compréhension de ces mécanismes de persistance du VIH-1 et l'identification des stratégies thérapeutiques pour réactiver les réservoirs du VIH-1 dans ces cellules.

5.9 Conclusion générale et perspectives

En bref, nos études menées sur le rôle de l'autophagie lors de l'infection à VIH-1 nous ont permis de constater qu'une altération de ce mécanisme entraînait une altération du processus de maturation des MDCC. Lorsque ces cellules sont infectées à VIH-1, elles deviennent moins efficaces à induire la prolifération de cellules T CD4+ spécifiques à *S. aureus*, *CMV* et *SEB*. La rapamycine diminue la *trans* infection des virions par les MDCC aux cellules T mais ne rétablit pas le potentiel immunogène de ces cellules. De plus, cette drogue augmente l'expression du marqueur CD83 sur les MDCC immatures et diminue celle de CCR7 sur les MDCC matures. Il serait intéressant de poursuivre cette expérience sur un modèle *in vivo* afin d'évaluer l'impact réel de cette réduction, particulièrement au niveau de la

migration *trans*-endothéliale et subséquemment sur la présentation antigénique. Un design expérimental avec des *transwells* serait une alternative possible.

La suite prévue de ce projet est de transposer ces mêmes expériences sur des cellules triées, c'est-à-dire les sous-populations de monocytes exprimant ou non CD16 et qui se différencieront en DCs. Ainsi, nous caractériserons les différences fonctionnelles des populations de DC et déterminerons si elles conservent les mêmes atouts que leurs précurseurs. Un focus spécial sera fait sur l'autophagie. De plus, nous évaluerons la contribution des MDDC CD16+ versus CD16- à la pathogénèse de l'infection à VIH-1.

D'autre part, nous avons souligné l'apport des cellules myéloïdes à la dissémination et la persistance du VIH-1 dans l'organisme. Nous avons détecté des transcrits précoces d'ADN viral dans les monocytes et avons observé une répllication faible du VIH-1 dans les MDM de patients sous ART. Pour conclure, nos travaux suggèrent l'utilisation de la rapamycine pour limiter la dissémination virale lors d'une stratégie antivirale. Elle devra être combinée à un autre élément afin de restaurer le potentiel immunogène des MDDC. Enfin, les cellules myéloïdes doivent être ciblées au moment de la conceptualisation d'un traitement anti-VIH.

Bibliographie

1. Gottlieb, M.S., et al., *Pneumocystis carinii* Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. *New England Journal of Medicine*, 1981. **305**(24): p. 1425-1431.
2. 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.
3. Brennan, R.O. and D.T. Durack, *Gay compromise syndrome*. *Lancet*, 1981. **2**(8259): p. 1338-9.
4. Masur, H., et al., *An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction*. *N Engl J Med*, 1981. **305**(24): p. 1431-8.
5. 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.
6. Gallo, R.C., et al., *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. *Science*, 1983. **220**(4599): p. 865-7.
7. Poiesz, B.J., et al., *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(12): p. 7415-9.
8. Coffin, J., et al., *What to call the AIDS virus?* *Nature*, 1986. **321**(6065): p. 10.
9. Nyamweya, S., et al., *Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis*. *Rev Med Virol*, 2013. **23**(4): p. 221-40.
10. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *Origins of HIV and the AIDS pandemic*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2011. **1**(1): p. a006841.
11. Peeters, M., M. D'Arc, and E. Delaporte, *Origin and diversity of human retroviruses*. *AIDS Rev*, 2014. **16**(1): p. 23-34.
12. 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.
13. De Leys, R., et al., *Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin*. *J Virol*, 1990. **64**(3): p. 1207-16.
14. Yamaguchi, J., et al., *Identification of HIV type 1 group N infections in a husband and wife in Cameroon: viral genome sequences provide evidence for horizontal transmission*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2006. **22**(1): p. 83-92.
15. Vallari, A., et al., *Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2010. **26**(1): p. 109-15.
16. Viswapoka, U., et al., *Circulating and unique recombinant forms of HIV type 1 containing subsubtype A2*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2006. **22**(7): p. 695-702.
17. Lau, K.A. and J.J. Wong, *Current Trends of HIV Recombination Worldwide*. *Infect Dis Rep*, 2013. **5**(Suppl 1): p. e4.
18. Frankel, A.D. and J.A. Young, *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 1-25.

19. Turner, B.G. and M.F. Summers, *Structural biology of HIV*. J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 1-32.
20. Robinson, H.L., *New hope for an AIDS vaccine*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(4): p. 239-50.
21. Hallenberger, S., et al., *Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160*. Nature, 1992. **360**(6402): p. 358-61.
22. Greene, W.C. and B.M. Peterlin, *Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy*. Nat Med, 2002. **8**(7): p. 673-80.
23. Jeang, K.T., *HIV-1: molecular biology and pathogenesis*. Adv Pharmacol, 2000. **48**: p. xvii-xix.
24. Peterlin, B.M. and D. Trono, *Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 97-107.
25. Strebel, K., *HIV accessory proteins versus host restriction factors*. Curr Opin Virol, 2013. **3**(6): p. 692-9.
26. Feng, S. and E.C. Holland, *HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar*. Nature, 1988. **334**(6178): p. 165-7.
27. Marciniak, R.A. and P.A. Sharp, *HIV-1 Tat protein promotes formation of more-processive elongation complexes*. EMBO J, 1991. **10**(13): p. 4189-96.
28. Pollard, V.W. and M.H. Malim, *The HIV-1 Rev protein*. Annu Rev Microbiol, 1998. **52**: p. 491-532.
29. Garcia, J.V. and A.D. Miller, *Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef*. Nature, 1991. **350**(6318): p. 508-11.
30. Schwartz, O., et al., *Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein*. Nat Med, 1996. **2**(3): p. 338-42.
31. El-Far, M., et al., *Down-regulation of CTLA-4 by HIV-1 Nef protein*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54295.
32. Goila-Gaur, R. and K. Strebel, *HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity*. Retrovirology, 2008. **5**: p. 51.
33. Andrew, A. and K. Strebel, *HIV-1 Vpu targets cell surface markers CD4 and BST-2 through distinct mechanisms*. Mol Aspects Med, 2010. **31**(5): p. 407-17.
34. Hussain, A., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein interacts with CD74 and modulates major histocompatibility complex class II presentation*. J Virol, 2008. **82**(2): p. 893-902.
35. Yu, X.F., et al., *A naturally immunogenic virion-associated protein specific for HIV-2 and SIV*. Nature, 1988. **335**(6187): p. 262-5.
36. Kappes, J.C., et al., *Identification of a novel retroviral gene unique to human immunodeficiency virus type 2 and simian immunodeficiency virus SIVMAC*. J Virol, 1988. **62**(9): p. 3501-5.
37. Tristem, M., et al., *Origin of vpx in lentiviruses*. Nature, 1990. **347**(6291): p. 341-2.
38. Franchini, G., et al., *The human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) contains a novel gene encoding a 16 kD protein associated with mature virions*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1988. **4**(4): p. 243-50.
39. Wu, X., et al., *Localization of the Vpx packaging signal within the C terminus of the human immunodeficiency virus type 2 Gag precursor protein*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6161-9.

40. Accola, M.A., et al., *A conserved dileucine-containing motif in p6(gag) governs the particle association of Vpx and Vpr of simian immunodeficiency viruses SIV(mac) and SIV(aggm)*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 9992-9.
41. Selig, L., et al., *Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses*. J Virol, 1999. **73**(1): p. 592-600.
42. Kewalramani, V.N. and M. Emerman, *Vpx association with mature core structures of HIV-2*. Virology, 1996. **218**(1): p. 159-68.
43. 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.
44. Hrecka, K., et al., *Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 658-61.
45. Romani, B. and E.A. Cohen, *Lentivirus Vpr and Vpx accessory proteins usurp the cullin4-DDB1 (DCAF1) E3 ubiquitin ligase*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(6): p. 755-63.
46. Bukrinsky, M. and A. Adzhubei, *Viral protein R of HIV-1*. Rev Med Virol, 1999. **9**(1): p. 39-49.
47. Engelman, A. and P. Cherepanov, *The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(4): p. 279-90.
48. Stevenson, M., *HIV-1 pathogenesis*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 853-60.
49. Clapham, P.R. and A. McKnight, *HIV-1 receptors and cell tropism*. Br Med Bull, 2001. **58**: p. 43-59.
50. Gartner, S., et al., *Virus isolation from and identification of HTLV-III/LAV-producing cells in brain tissue from a patient with AIDS*. JAMA, 1986. **256**(17): p. 2365-71.
51. Moris, A., et al., *Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1643-51.
52. Klatzmann, D., et al., *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 767-8.
53. Koot, M., et al., *Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS*. Ann Intern Med, 1993. **118**(9): p. 681-8.
54. Watkins, B.A., et al., *Syncytium formation induced by human immunodeficiency virus type 1 isolates correlates with affinity for CD4*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 10): p. 2513-22.
55. 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.
56. Schuitemaker, H., et al., *Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population*. J Virol, 1992. **66**(3): p. 1354-60.
57. Myszka, D.G., et al., *Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9026-31.
58. Rizzuto, C.D., et al., *A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding*. Science, 1998. **280**(5371): p. 1949-53.
59. Chang, D.K., S.F. Cheng, and W.J. Chien, *The amino-terminal fusion domain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41 inserts into the sodium dodecyl sulfate*

- micelle primarily as a helix with a conserved glycine at the micelle-water interface.* J Virol, 1997. **71**(9): p. 6593-602.
60. Furuta, R.A., et al., *Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41.* Nat Struct Biol, 1998. **5**(4): p. 276-9.
 61. Collett, M.S., et al., *RNase H hydrolysis of the 5' terminus of the avian sarcoma virus genome during reverse transcription.* Nature, 1978. **272**(5649): p. 181-4.
 62. Charneau, P. and F. Clavel, *A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract.* J Virol, 1991. **65**(5): p. 2415-21.
 63. Haffar, O.K., et al., *Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex.* J Mol Biol, 2000. **299**(2): p. 359-68.
 64. Sundquist, W.I. and H.G. Krausslich, *HIV-1 assembly, budding, and maturation.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7): p. a006924.
 65. Kotler, D.P., et al., *Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome.* Ann Intern Med, 1984. **101**(4): p. 421-8.
 66. Brenchley, 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.
 67. Grossman, Z., et al., *Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys.* Nat Med, 2006. **12**(3): p. 289-95.
 68. Kahn, J.O. and B.D. Walker, *Acute human immunodeficiency virus type 1 infection.* N Engl J Med, 1998. **339**(1): p. 33-9.
 69. Scarlatti, G., et al., *In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression.* Nat Med, 1997. **3**(11): p. 1259-65.
 70. Douek, D.C., L.J. Picker, and R.A. Koup, *T cell dynamics in HIV-1 infection.* Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 265-304.
 71. Kunkel, E.J., et al., *Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes.* Am J Pathol, 2002. **160**(1): p. 347-55.
 72. Simmons, A., V. Aluvihare, and A. McMichael, *Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators.* Immunity, 2001. **14**(6): p. 763-77.
 73. Chun, T.W., et al., *Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4+ T cells using a combination of cytokines.* J Exp Med, 1998. **188**(1): p. 83-91.
 74. Cicala, C., et al., *HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(14): p. 9380-5.
 75. Wang, L., et al., *Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat.* J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25564-9.
 76. Demarchi, F., M.I. Gutierrez, and M. Giacca, *Human immunodeficiency virus type 1 tat protein activates transcription factor NF-kappaB through the cellular interferon-inducible, double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR.* J Virol, 1999. **73**(8): p. 7080-6.
 77. Unutmaz, D., et al., *Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes.* J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1735-46.

78. Lewis, P., M. Hensel, and M. Emerman, *Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle*. EMBO J, 1992. **11**(8): p. 3053-8.
79. Vieillard, V., J.L. Strominger, and P. Debre, *NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 10981-6.
80. Brechley, J.M. and D.C. Douek, *HIV infection and the gastrointestinal immune system*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(1): p. 23-30.
81. Brechley, J.M., et al., *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. Nat Med, 2006. **12**(12): p. 1365-71.
82. Chomont, N., et al., *HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 893-900.
83. Chun, T.W., et al., *Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection*. Nature, 1997. **387**(6629): p. 183-8.
84. Ford, E.S., C.E. Puronen, and I. Sereti, *Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(3): p. 206-14.
85. van Grevenynghe, J., et al., *Lymph node architecture collapse and consequent modulation of FOXO3a pathway on memory T- and B-cells during HIV infection*. Semin Immunol, 2008. **20**(3): p. 196-203.
86. Dion, M.L., et al., *HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation*. Immunity, 2004. **21**(6): p. 757-68.
87. Bofill, M., et al., *Laboratory control values for CD4 and CD8 T lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis*. Clin Exp Immunol, 1992. **88**(2): p. 243-52.
88. Haase, A.T., *Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 625-56.
89. Corbett, E.L., et al., *The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic*. Arch Intern Med, 2003. **163**(9): p. 1009-21.
90. Jung, A.C. and D.S. Paauw, *Diagnosing HIV-related disease: using the CD4 count as a guide*. J Gen Intern Med, 1998. **13**(2): p. 131-6.
91. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
92. Ginhoux, F. and S. Jung, *Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 392-404.
93. Ziegler-Heitbrock, L., *Monocyte subsets in man and other species*. Cell Immunol, 2014. **289**(1-2): p. 135-9.
94. van Furth, R. and Z.A. Cohn, *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. J Exp Med, 1968. **128**(3): p. 415-35.
95. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
96. Becker, S., M.K. Warren, and S. Haskill, *Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures*. J Immunol, 1987. **139**(11): p. 3703-9.
97. Romani, N., et al., *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 83-93.
98. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating*

- factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha.* J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
99. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood.* Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
 100. Ancuta, P., et al., *Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets.* BMC Genomics, 2009. **10**: p. 403.
 101. Passlick, B., D. Flieger, and H.W. Ziegler-Heitbrock, *Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood.* Blood, 1989. **74**(7): p. 2527-34.
 102. Goyert, S.M., et al., *The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors.* Science, 1988. **239**(4839): p. 497-500.
 103. Shimazu, R., et al., *MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.* J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1777-82.
 104. Ravetch, J.V. and S. Bolland, *IgG Fc receptors.* Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 275-90.
 105. Weber, C., et al., *Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations.* J Leukoc Biol, 2000. **67**(5): p. 699-704.
 106. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.* Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
 107. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages.* Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2053-8.
 108. Thieblemont, N., et al., *CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection.* Eur J Immunol, 1995. **25**(12): p. 3418-24.
 109. Saleh, M.N., et al., *CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor.* Blood, 1995. **85**(10): p. 2910-7.
 110. Frankenberger, M., et al., *Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis.* Blood, 1996. **87**(1): p. 373-7.
 111. Ancuta, P., A. Moses, and D. Gabuzda, *Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions.* Immunobiology, 2004. **209**(1-2): p. 11-20.
 112. Ancuta, P., et al., *Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes.* J Exp Med, 2003. **197**(12): p. 1701-7.
 113. Bazan, J.F., et al., *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif.* Nature, 1997. **385**(6617): p. 640-4.
 114. Ancuta, P., et al., *CD16+ monocyte-derived macrophages activate resting T cells for HIV infection by producing CCR3 and CCR4 ligands.* J Immunol, 2006. **176**(10): p. 5760-71.
 115. King, I.L., T.L. Dickendesher, and B.M. Segal, *Circulating Ly-6C+ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease.* Blood, 2009. **113**(14): p. 3190-7.
 116. Belge, K.U., et al., *The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF.* J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3536-42.

117. Ancuta, P., L. Weiss, and N. Haeffner-Cavaillon, *CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics*. Eur J Immunol, 2000. **30**(7): p. 1872-83.
118. Ziegler-Heitbrock, L., *The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(3): p. 584-92.
119. Sonza, S., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes*. J Virol, 1996. **70**(6): p. 3863-9.
120. Collman, R., et al., *Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Monocyte-tropic and lymphocyte-tropic strains of HIV-1 show distinctive patterns of replication in a panel of cell types*. J Exp Med, 1989. **170**(4): p. 1149-63.
121. Triques, K. and M. Stevenson, *Characterization of restrictions to human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes*. J Virol, 2004. **78**(10): p. 5523-7.
122. O'Brien, W.A., et al., *Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in blood mononuclear phagocytes are slowed by limitations of nucleotide precursors*. J Virol, 1994. **68**(2): p. 1258-63.
123. Han, J., et al., *CD14(high)CD16(+) rather than CD14(low)CD16(+) monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2009. **52**(5): p. 553-9.
124. Ancuta, P., et al., *Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2516.
125. Pulliam, L., et al., *Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia*. Lancet, 1997. **349**(9053): p. 692-5.
126. Fischer-Smith, T., et al., *CNS invasion by CD14+/CD16+ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection*. J Neurovirol, 2001. **7**(6): p. 528-41.
127. Ellery, P.J., et al., *The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6581-9.
128. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
129. Stoitzner, P., *The Langerhans cell controversy: are they immunostimulatory or immunoregulatory cells of the skin immune system?* Immunol Cell Biol, 2010. **88**(4): p. 348-50.
130. Conti, L., et al., *Role of the cytokine environment and cytokine receptor expression on the generation of functionally distinct dendritic cells from human monocytes*. Eur J Immunol, 2008. **38**(3): p. 750-62.
131. Cella, M., et al., *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*. Nat Med, 1999. **5**(8): p. 919-23.
132. Siegal, F.P., et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Science, 1999. **284**(5421): p. 1835-7.
133. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
134. Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin, *Intracellular pattern recognition receptors in the host response*. Nature, 2006. **442**(7098): p. 39-44.

135. Figdor, C.G., Y. van Kooyk, and G.J. Adema, *C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 77-84.
136. Joffre, O.P., et al., *Cross-presentation by dendritic cells*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(8): p. 557-69.
137. Yanagihara, S., et al., *EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 3096-102.
138. Guermontprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 621-67.
139. Dieu, M.C., et al., *Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 373-86.
140. Ngo, V.N., H.L. Tang, and J.G. Cyster, *Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells*. J Exp Med, 1998. **188**(1): p. 181-91.
141. Marsland, B.J., et al., *CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells*. Immunity, 2005. **22**(4): p. 493-505.
142. Mantovani, A., et al., *Chemokines and chemokine receptors during activation and deactivation of monocytes and dendritic cells and in amplification of Th1 versus Th2 responses*. Int J Clin Lab Res, 1998. **28**(2): p. 77-82.
143. Grakoui, A., et al., *The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation*. Science, 1999. **285**(5425): p. 221-7.
144. Dustin, M.L., *T-cell activation through immunological synapses and kinapses*. Immunol Rev, 2008. **221**: p. 77-89.
145. Tseng, S.Y., et al., *T cell-dendritic cell immunological synapses contain TCR-dependent CD28-CD80 clusters that recruit protein kinase C theta*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 4852-63.
146. Roach, T., et al., *CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion*. Curr Biol, 1997. **7**(6): p. 408-17.
147. Yokosuka, T., et al., *Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2*. J Exp Med, 2012. **209**(6): p. 1201-17.
148. Huppa, J.B. and M.M. Davis, *T-cell-antigen recognition and the immunological synapse*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 973-83.
149. Simon, J.H., et al., *Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype*. Nat Med, 1998. **4**(12): p. 1397-400.
150. Sheehy, A.M., et al., *Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein*. Nature, 2002. **418**(6898): p. 646-50.
151. 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.
152. Harris, R.S., et al., *DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection*. Cell, 2003. **113**(6): p. 803-9.
153. Bennett, R.P., et al., *Nuclear Exclusion of the HIV-1 host defense factor APOBEC3G requires a novel cytoplasmic retention signal and is not dependent on RNA binding*. J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 7320-7.

154. 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.
155. Li, N., W. Zhang, and X. Cao, *Identification of human homologue of mouse IFN-gamma induced protein from human dendritic cells*. *Immunol Lett*, 2000. **74**(3): p. 221-4.
156. Liao, W., et al., *Dendritic cell-derived interferon-gamma-induced protein mediates tumor necrosis factor-alpha stimulation of human lung fibroblasts*. *Proteomics*, 2008. **8**(13): p. 2640-50.
157. Manel, N. and D.R. Littman, *Hiding in plain sight: how HIV evades innate immune responses*. *Cell*, 2011. **147**(2): p. 271-4.
158. Goldstone, D.C., et al., *HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase*. *Nature*, 2011. **480**(7377): p. 379-82.
159. 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. 223-8.
160. Ryoo, J., et al., *The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction*. *Nat Med*, 2014. **20**(8): p. 936-41.
161. Meroni, G. and G. Diez-Roux, *TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases*. *Bioessays*, 2005. **27**(11): p. 1147-57.
162. Stremlau, M., et al., *The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys*. *Nature*, 2004. **427**(6977): p. 848-53.
163. Perez-Caballero, D., et al., *Human tripartite motif 5alpha domains responsible for retrovirus restriction activity and specificity*. *J Virol*, 2005. **79**(14): p. 8969-78.
164. Stremlau, M., et al., *Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(14): p. 5514-9.
165. Hofmann, W., et al., *Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection*. *J Virol*, 1999. **73**(12): p. 10020-8.
166. Kootstra, N.A., et al., *Abrogation of postentry restriction of HIV-1-based lentiviral vector transduction in simian cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(3): p. 1298-303.
167. Munk, C., et al., *A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(21): p. 13843-8.
168. Varthakavi, V., et al., *Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(25): p. 15154-9.
169. Neil, S.J., et al., *HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane*. *PLoS Pathog*, 2006. **2**(5): p. e39.
170. 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.
171. Van Damme, N., et al., *The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein*. *Cell Host Microbe*, 2008. **3**(4): p. 245-52.

172. Dube, M., et al., *Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment*. PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000856.
173. Mangeat, B., et al., *HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation*. PLoS Pathog, 2009. **5**(9): p. e1000574.
174. Lore, K., et al., *Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells*. J Exp Med, 2005. **201**(12): p. 2023-33.
175. Haase, A.T., *Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission*. Nature, 2010. **464**(7286): p. 217-23.
176. 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.
177. Steinman, R.M., *DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells*. Cell, 2000. **100**(5): p. 491-4.
178. Turville, S.G., et al., *Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 975-83.
179. Lewin, S.R., et al., *Finding a cure for HIV: will it ever be achievable?* J Int AIDS Soc, 2011. **14**: p. 4.
180. Chomont, N., et al., *Maintenance of CD4+ T-cell memory and HIV persistence: keeping memory, keeping HIV*. Curr Opin HIV AIDS, 2011. **6**(1): p. 30-6.
181. Trono, D., et al., *HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals*. Science, 2010. **329**(5988): p. 174-80.
182. Manel, N., et al., *A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells*. Nature, 2010. **467**(7312): p. 214-7.
183. Banchereau, J. and A.K. Palucka, *Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 296-306.
184. Gilboa, E., S.K. Nair, and H.K. Lyerly, *Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines*. Cancer Immunol Immunother, 1998. **46**(2): p. 82-7.
185. Schoenborn, J.R. and C.B. Wilson, *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. Adv Immunol, 2007. **96**: p. 41-101.
186. Meixlsperger, S., et al., *CD141+ dendritic cells produce prominent amounts of IFN-alpha after dsRNA recognition and can be targeted via DEC-205 in humanized mice*. Blood, 2013. **121**(25): p. 5034-44.
187. Schlitzer, A., et al., *IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 970-83.
188. Palucka, K. and J. Banchereau, *Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 38-48.
189. Segura, E., et al., *Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 653-60.
190. Yu, C.I., et al., *Human CD1c+ dendritic cells drive the differentiation of CD103+ CD8+ mucosal effector T cells via the cytokine TGF-beta*. Immunity, 2013. **38**(4): p. 818-30.
191. Klechevsky, E., et al., *Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 497-510.

192. Garcia, F., et al., *A dendritic cell-based vaccine elicits T cell responses associated with control of HIV-1 replication*. *Sci Transl Med.* **5**(166): p. 166ra2.
193. Deter, R.L. and C. De Duve, *Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes*. *J Cell Biol*, 1967. **33**(2): p. 437-49.
194. Nakatogawa, H., et al., *Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(7): p. 458-67.
195. Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod, *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*. *J Pathol*, 2010. **221**(1): p. 3-12.
196. Hands, S.L., C.G. Proud, and A. Wytttenbach, *mTOR's role in ageing: protein synthesis or autophagy?* *Aging (Albany NY)*, 2009. **1**(7): p. 586-97.
197. Peterson, T.R., et al., *DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival*. *Cell*, 2009. **137**(5): p. 873-86.
198. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling at a glance*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 20): p. 3589-94.
199. Hara, K., et al., *Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action*. *Cell*, 2002. **110**(2): p. 177-89.
200. Guertin, D.A., et al., *Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1*. *Dev Cell*, 2006. **11**(6): p. 859-71.
201. Sancak, Y., et al., *The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1*. *Science*, 2008. **320**(5882): p. 1496-501.
202. Zheng, X.F., et al., *TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin*. *Cell*, 1995. **82**(1): p. 121-30.
203. Sarbassov, D.D., et al., *Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB*. *Mol Cell*, 2006. **22**(2): p. 159-68.
204. Feldman, M.E., et al., *Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2*. *PLoS Biol*, 2009. **7**(2): p. e38.
205. Garcia-Martinez, J.M., et al., *Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR)*. *Biochem J*, 2009. **421**(1): p. 29-42.
206. Choo, A.Y., et al., *Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(45): p. 17414-9.
207. Brachmann, S., et al., *PI3K and mTOR inhibitors: a new generation of targeted anticancer agents*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(2): p. 194-8.
208. Richter, J.D. and N. Sonenberg, *Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins*. *Nature*, 2005. **433**(7025): p. 477-80.
209. Ma, X.M. and J. Blenis, *Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(5): p. 307-18.
210. Porstmann, T., et al., *SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth*. *Cell Metab*, 2008. **8**(3): p. 224-36.
211. Huffman, T.A., I. Mothe-Satney, and J.C. Lawrence, Jr., *Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(2): p. 1047-52.
212. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. *Science*, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.

213. Jacinto, E., et al., *Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1122-8.
214. Axe, E.L., et al., *Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 2008. **182**(4): p. 685-701.
215. Polson, H.E., et al., *Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation*. Autophagy, 2010. **6**(4): p. 506-22.
216. Otomo, C., et al., *Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(1): p. 59-66.
217. Jager, S., et al., *Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 20): p. 4837-48.
218. Funderburk, S.F., Q.J. Wang, and Z. Yue, *The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond*. Trends Cell Biol, 2010. **20**(6): p. 355-62.
219. Cheong, H., et al., *Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy*. Nat Biotechnol. **30**(7): p. 671-8.
220. Fabrizio, P., et al., *Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast*. Science, 2001. **292**(5515): p. 288-90.
221. Jia, K., D. Chen, and D.L. Riddle, *The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate C. elegans larval development, metabolism and life span*. Development, 2004. **131**(16): p. 3897-906.
222. Vellai, T., et al., *Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in C. elegans*. Nature, 2003. **426**(6967): p. 620.
223. Deretic, V., *Autophagy as an immune defense mechanism*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(4): p. 375-82.
224. Delgado, M.A., et al., *Toll-like receptors control autophagy*. EMBO J, 2008. **27**(7): p. 1110-21.
225. Sanjuan, M.A., et al., *Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis*. Nature, 2007. **450**(7173): p. 1253-7.
226. Xu, Y., et al., *Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 135-44.
227. Huang, J., et al., *Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(15): p. 6226-31.
228. Scherz-Shouval, R., et al., *Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4*. EMBO J, 2007. **26**(7): p. 1749-60.
229. Djavaheri-Mergny, M., et al., *NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy*. J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 30373-82.
230. Gannage, M. and C. Munz, *Macroautophagy in immunity and tolerance*. Traffic, 2009. **10**(6): p. 615-20.
231. Nedjic, J., et al., *Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance*. Nature, 2008. **455**(7211): p. 396-400.
232. Pua, H.H., et al., *Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4046-55.
233. Miller, B.C., et al., *The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development*. Autophagy, 2008. **4**(3): p. 309-14.

234. Cadwell, K., et al., *A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells*. Nature, 2008. **456**(7219): p. 259-63.
235. Giancchetti, E., D.V. Delfino, and A. Fierabracci, *Recent insights on the putative role of autophagy in autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(3): p. 231-41.
236. Shapira, Y., N. Agmon-Levin, and Y. Shoenfeld, *Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity*. J Autoimmun, 2010. **34**(3): p. J168-77.
237. Fierabracci, A., et al., *The putative role of endoplasmic reticulum aminopeptidases in autoimmunity: insights from genomic-wide association studies*. Autoimmun Rev, 2012. **12**(2): p. 281-8.
238. Chang, H.D. and A. Radbruch, *Targeting pathogenic T helper cell memory*. Ann Rheum Dis, 2011. **70 Suppl 1**: p. i85-7.
239. Nagafuchi, S., *The role of B cells in regulating the magnitude of immune response*. Microbiol Immunol, 2010. **54**(8): p. 487-90.
240. Caza, T.N., G. Talaber, and A. Perl, *Metabolic regulation of organelle homeostasis in lupus T cells*. Clin Immunol, 2012. **144**(3): p. 200-13.
241. Blanchet, F.P., et al., *Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 654-69.
242. Killian, M.S., *Dual role of autophagy in HIV-1 replication and pathogenesis*. AIDS Res Ther, 2012. **9**(1): p. 16.
243. Zhou, D., K.H. Kang, and S.A. Spector, *Production of interferon alpha by human immunodeficiency virus type 1 in human plasmacytoid dendritic cells is dependent on induction of autophagy*. J Infect Dis, 2012. **205**(8): p. 1258-67.
244. Vezina, C., A. Kudelski, and S.N. Sehgal, *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle*. J Antibiot (Tokyo), 1975. **28**(10): p. 721-6.
245. Araki, K., et al., *mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation*. Nature, 2009. **460**(7251): p. 108-12.
246. Lamming, D.W., et al., *Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 980-9.
247. Keating, R., et al., *The kinase mTOR modulates the antibody response to provide cross-protective immunity to lethal infection with influenza virus*. Nat Immunol, 2013. **14**(12): p. 1266-76.
248. Hudson, C.C., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(20): p. 7004-14.
249. Di Benedetto, F., et al., *First report on a series of HIV patients undergoing rapamycin monotherapy after liver transplantation*. Transplantation, 2010. **89**(6): p. 733-8.
250. Bove, J., M. Martinez-Vicente, and M. Vila, *Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(8): p. 437-52.
251. Heredia, A., et al., *Induction of G1 cycle arrest in T lymphocytes results in increased extracellular levels of beta-chemokines: a strategy to inhibit R5 HIV-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4179-84.
252. Heredia, A., et al., *Reduction of CCR5 with low-dose rapamycin enhances the antiviral activity of vicriviroc against both sensitive and drug-resistant HIV-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(51): p. 20476-81.

253. Li, X., et al., *Mammalian target of rapamycin inhibition in macrophages of asymptomatic HIV+ persons reverses the decrease in TLR-4-mediated TNF-alpha release through prolongation of MAPK pathway activation.* J Immunol, 2011. **187**(11): p. 6052-8.
254. Shi, L.Z., et al., *HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells.* J Exp Med, 2011. **208**(7): p. 1367-76.
255. Gosselin, A., et al., *Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection.* J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1604-16.
256. Chapuis, F., et al., *Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro.* Eur J Immunol, 1997. **27**(2): p. 431-41.
257. De Smedt, T., et al., *Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo.* J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1413-24.
258. Cella, M., et al., *Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells.* Nature, 1997. **388**(6644): p. 782-7.
259. Sallusto, F., et al., *Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation.* Eur J Immunol, 1998. **28**(9): p. 2760-9.
260. Steinman, R.M. and M.D. Witmer, *Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(10): p. 5132-6.
261. Thorsby, E., *Structure and function of HLA molecules.* Transplant Proc, 1987. **19**(1 Pt 1): p. 29-35.
262. Steinman, R.M., *Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation.* Mt Sinai J Med, 2001. **68**(3): p. 160-6.
263. Hewson, T., et al., *Interactions of HIV-1 with antigen-presenting cells.* Immunol Cell Biol, 1999. **77**(4): p. 289-303.
264. Wacleche, V.S., et al., *The colocalization potential of HIV-specific CD8+ and CD4+ T-cells is mediated by integrin beta7 but not CCR6 and regulated by retinoic acid.* PLoS One. **7**(3): p. e32964.
265. Fleischer, B. and H. Schrezenmeier, *T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells.* J Exp Med, 1988. **167**(5): p. 1697-707.
266. Granucci, F., et al., *Early events in dendritic cell maturation induced by LPS.* Microbes Infect, 1999. **1**(13): p. 1079-84.
267. Ancuta, P., et al., *Opposite effects of IL-10 on the ability of dendritic cells and macrophages to replicate primary CXCR4-dependent HIV-1 strains.* J Immunol, 2001. **166**(6): p. 4244-53.
268. Choi, J., et al., *Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP.* Science, 1996. **273**(5272): p. 239-42.
269. Kondylis, V., et al., *Endosome-mediated autophagy: an unconventional MIIC-driven autophagic pathway operational in dendritic cells.* Autophagy. **9**(6): p. 861-80.
270. Wu, L. and V.N. KewalRamani, *Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 859-68.
271. Yoshimori, T., et al., *Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells.* J Biol Chem, 1991. **266**(26): p. 17707-12.

272. Seglen, P.O. and P.B. Gordon, *3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(6): p. 1889-92.
273. Bakri, Y., et al., *The maturation of dendritic cells results in postintegration inhibition of HIV-1 replication*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3780-8.
274. Schmid, D. and C. Munz, *Immune surveillance via self digestion*. Autophagy, 2007. **3**(2): p. 133-5.
275. Crotzer, V.L. and J.S. Blum, *Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation*. J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3335-41.
276. Sehgal, S.N., *Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression*. Clin Biochem, 1998. **31**(5): p. 335-40.
277. Ancuta, P., et al., *CD16+ monocytes exposed to HIV promote highly efficient viral replication upon differentiation into macrophages and interaction with T cells*. Virology, 2006. **344**(2): p. 267-76.
278. Collman, R.G., et al., *HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(5): p. 631-4.
279. Jakubzick, C., et al., *Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes*. Immunity, 2013. **39**(3): p. 599-610.
280. Kim, J.H., et al., *Consequences of human immunodeficiency virus type 1 superinfection of chronically infected cells*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1993. **9**(9): p. 875-82.
281. Tanida, I. and S. Waguri, *Measurement of autophagy in cells and tissues*. Methods Mol Biol. **648**: p. 193-214.
282. Araki, K., B. Youngblood, and R. Ahmed, *The role of mTOR in memory CD8 T-cell differentiation*. Immunol Rev. **235**(1): p. 234-43.
283. Morelon, E., et al., *Sirolimus: a new promising immunosuppressive drug. Towards a rationale for its use in renal transplantation*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(1): p. 18-20.
284. Dumont, F.J. and Q. Su, *Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin*. Life Sci, 1996. **58**(5): p. 373-95.
285. Sehgal, S.N., et al., *Rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide*. Med Res Rev, 1994. **14**(1): p. 1-22.
286. Stumptner-Cuvelette, P., et al., *HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12144-9.
287. Chaudhry, A., et al., *HIV-1 Nef promotes endocytosis of cell surface MHC class II molecules via a constitutive pathway*. J Immunol, 2009. **183**(4): p. 2415-24.
288. Barral, D.C. and M.B. Brenner, *CD1 antigen presentation: how it works*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(12): p. 929-41.
289. Shinya, E., et al., *Endogenously expressed HIV-1 nef down-regulates antigen-presenting molecules, not only class I MHC but also CD1a, in immature dendritic cells*. Virology, 2004. **326**(1): p. 79-89.
290. Moll, M., et al., *Inhibition of lipid antigen presentation in dendritic cells by HIV-1 Vpu interference with CD1d recycling from endosomal compartments*. Blood, 2010. **116**(11): p. 1876-84.

291. Lechmann, M., et al., *CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation*. Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 273-5.
292. Aerts-Toegaert, C., et al., *CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses*. Eur J Immunol, 2007. **37**(3): p. 686-95.
293. Riol-Blanco, L., et al., *The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4070-80.
294. Bouchon, A., et al., *A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1111-22.
295. Freeman, G.J., et al., *Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation*. Science, 1993. **262**(5135): p. 909-11.
296. Linsley, P.S. and J.A. Ledbetter, *The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 191-212.
297. McIlroy, D., et al., *Low CD83, but normal MHC class II and costimulatory molecule expression, on spleen dendritic cells from HIV+ patients*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998. **14**(6): p. 505-13.
298. Blanchet, F.P. and V. Piguët, *Immunoamphisomes in dendritic cells amplify TLR signaling and enhance exogenous antigen presentation on MHC-II*. Autophagy, 2010. **6**(6): p. 816-8.
299. McDonald, D., et al., *Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions*. Science, 2003. **300**(5623): p. 1295-7.
300. Arrighi, J.F., et al., *DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells*. J Exp Med, 2004. **200**(10): p. 1279-88.
301. Sato, H., et al., *Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles*. Virology, 1992. **186**(2): p. 712-24.
302. Carr, J.M., et al., *Rapid and efficient cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus infection from monocyte-derived macrophages to peripheral blood lymphocytes*. Virology, 1999. **265**(2): p. 319-29.
303. Dimitrov, D.S., et al., *Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 2182-90.
304. Blanchet, F.P. and V. Piguët, *Immunoamphisomes in dendritic cells amplify TLR signaling and enhance exogenous antigen presentation on MHC-II*. Autophagy. **6**(6): p. 816-8.
305. Gurney, K.B., et al., *Binding and transfer of human immunodeficiency virus by DC-SIGN+ cells in human rectal mucosa*. J Virol, 2005. **79**(9): p. 5762-73.
306. Lambert, A.A., et al., *HIV-1 induces DCIR expression in CD4+ T cells*. PLoS Pathog, 2010. **6**(11): p. e1001188.
307. Wiley, R.D. and S. Gummuluru, *Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(3): p. 738-43.
308. Baixauli, F., C. Lopez-Otin, and M. Mittelbrunn, *Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 403.

309. Szatmari, Z., et al., *Rab11 facilitates cross-talk between autophagy and endosomal pathway through regulation of Hook localization*. Mol Biol Cell, 2014. **25**(4): p. 522-31.
310. Fader, C.M. and M.I. Colombo, *Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation*. Autophagy, 2006. **2**(2): p. 122-5.
311. Calne, R.Y., et al., *Rapamycin for immunosuppression in organ allografting*. Lancet, 1989. **2**(8656): p. 227.
312. Eng, C.P., et al., *Inhibition of skin graft rejection in mice by rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide*. Transplant Proc, 1991. **23**(1 Pt 1): p. 868-9.
313. Kahan, B.D., J.Y. Chang, and S.N. Sehgal, *Preclinical evaluation of a new potent immunosuppressive agent, rapamycin*. Transplantation, 1991. **52**(2): p. 185-91.
314. Kahan, B.D., et al., *Synergistic effects of cyclosporin analogs--A, D, G, IMM-125--with rapamycin and/or brequinar*. Transplant Proc, 1994. **26**(5): p. 3021-4.
315. Stepkowski, S.M., et al., *Rapamycin, a potent immunosuppressive drug for vascularized heart, kidney, and small bowel transplantation in the rat*. Transplantation, 1991. **51**(1): p. 22-6.
316. Fischer, R., et al., *Use of rapamycin in the induction of tolerogenic dendritic cells*. Handb Exp Pharmacol, 2009(188): p. 215-32.
317. Turnquist, H.R., et al., *Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7018-31.
318. Hackstein, H., et al., *Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells*. Blood, 2002. **100**(3): p. 1084-7.
319. Monti, P., et al., *Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells*. Transplantation, 2003. **75**(1): p. 137-45.
320. Sordi, V., et al., *Differential effects of immunosuppressive drugs on chemokine receptor CCR7 in human monocyte-derived dendritic cells: selective upregulation by rapamycin*. Transplantation, 2006. **82**(6): p. 826-34.
321. Chen, J., et al., *Effects of rapamycin on DC-SIGN expression and biological functions in DC*. Front Biosci (Landmark Ed), 2014. **19**: p. 557-65.
322. Gartner, S., et al., *The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection*. Science, 1986. **233**(4760): p. 215-9.
323. Arfi, V., et al., *Characterization of the early steps of infection of primary blood monocytes by human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2008. **82**(13): p. 6557-65.
324. Crowe, S., T. Zhu, and W.A. Muller, *The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(5): p. 635-41.
325. Chun, T.W. and A.S. Fauci, *Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 10958-61.

ANNEXE

Liste des présentations et publications

Liste des présentations orales

2014 Tep, Tévy-Suzy, Wacleche, Vanessa Sue, El-Far, Mohamed, Chouikh, Younes, Routy, Jean-Pierre, Ancuta, Petronela. « Rôle de l'autophagie dans la contribution des cellules dendritiques dérivées des monocytes CD16⁺ lors de la pathogénèse à VIH-1 ». **Journée des étudiants du Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQ-S) SIDA**, 31 octobre 2014. Montréal, Qc, Canada.

2014 Tep, Tévy-Suzy, Wacleche, Vanessa Sue, El-Far, Mohamed, Chouikh, Younes, Routy, Jean-Pierre, Ancuta, Petronela. *Exploring the role of autophagy in regulating the contribution of CD16⁺ monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 pathogenesis*. **Northern Immunological Mountain Society (NIMS) Congress**, 12-14 septembre 2014. Bolton Valley, VT, USA.

2014 Tévy-Suzy Tep, Vanessa Sue Wacleche, Sandrina DaFonseca, Mohammad-Ali Jenabian, Jean-Pierre Routy and Petronela Ancuta. *CD16⁺ Monocyte-derived dendritic cells contribute to HIV pathogenesis by a superior trans infection ability and an impaired immunogenic potential: autophagy impairment?* **Canadian Society for Immunology (CSI) Congress**, 6-9 mars 2014, Québec, Qc, Canada.

Liste des présentations par affiche

2015 Tévy-Suzy Tep, Vanessa Sue Wacleche, Mohamed El-Far, Younes Chouikh, Annie Gosselin, Mohammad-Ali Jenabian, Jean-Pierre Routy and Petronela Ancuta*. *HIV-1 impairs the immunogenic potential of dendritic cells by interfering with the autophagy process*. **Keystone Symposia on Dendritic Cells and Macrophages Reunited**. 8 au 13 Mars 2015, Montréal, Qc, Canada.

2015 Tep T-S, Wacleche VS, Gosselin A, El-Far M, Chouick Y, Jenabian M-A, Routy J-P and Ancuta P. *Pathogenicity of CD16⁺ Monocyte-Derived Dendritic Cells during HIV-1 Infection*. **24th Annual CAHR meeting**, 30 avril au 3 mai 2015, Toronto, ON, Canada. Affiche présentée par VSW.

2014 Tep TS, Wacleche VS, El-Far M, Chouick Y, Routy JP and Ancuta P. *Role of Autophagy in the Contribution of CD16⁺ Monocyte-Derived Dendritic Cells to HIV-1 Pathogenesis*. 5 décembre 2014. **Journée des étudiants CRCHUM**, Montréal, Qc, Canada.

2014 Tep, Tévy-Suzy, Wacleche, Vanessa Sue, El-Far, Mohamed, Chouikh, Younes, Routy, Jean-Pierre and Ancuta, Petronela. *Role of Autophagy in the Contribution of CD16+ Monocyte-Derived Dendritic Cells to HIV-1 Pathogenesis.*, **Montreal Immunology Meetings (MIM)**, 24 octobre 2014, Montréal, Qc, Canada

2014 Tep, Tévy-Suzy, Wacleche, Vanessa Sue, El-Far, Mohamed, Chouikh, Younes, Routy, Jean-Pierre, Ancuta, Petronela. *Exploring the role of autophagy in regulating the contribution of CD16+ monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 pathogenesis.* **Colloque annuel du CRHUM**, 15 octobre 2014. Montréal, Qc Canada.

2014 Tévy-Suzy Tep, Vanessa Sue Wacleche, Sandrina DaFonseca, Mohammad-Ali Jenabian, Jean-Pierre Routy and Petronela Ancuta. *CD16+ Monocyte-Derived Dendritic Cells Contribute to HIV Pathogenesis By a Superior Trans-Infection Ability and an Impaired Immunogenic Potential: Autophagy Impairment.* **23rd Annual CAHR meeting**, 1^{er} au 4 mai 2014, St. John's, Newfoundland, Canada.

2014 Tévy-Suzy Tep, Vanessa Sue Wacleche, Sandrina DaFonseca, Mohammad-Ali Jenabian, Jean-Pierre Routy et Petronela Ancuta. «Infection à VIH et cellules dendritiques dérivées des monocytes CD16⁺: rôle de l'autophagie ». *3 mars 2014. Journée de la recherche du département de microbiologie, infectiologie et immunologie de l'Université de Montréal*, Montréal, Qc, Canada.

2013 Tévy-Suzy Tep, Vanessa Sue Wacleche, Sandrina DaFonseca, Mohamed El-Far, Mohammad-Ali Jenabian, Jean-Pierre Routy et Petronela Ancuta « L'autophagie régule les fonctions des cellules dendritiques dans la présentation antigénique et la *trans* infection VIH-1». 5 décembre 2013. **Journée des étudiants CRCHUM**, Montréal, Qc, Canada

2013 Tévy-Suzy Tep, Vanessa Sue Wacleche, Sandrina DaFonseca, Mohamed El-Far, Mohammad-Ali Jenabian, Jean-Pierre Routy et Petronela Ancuta « L'autophagie régule les fonctions des cellules dendritiques dans la présentation antigénique et la *trans* infection VIH-1». **Colloque du CHUM**, 24 octobre 2013. Montréal, Qc, Canada.

Liste de publications

El-Far M, Ancuta P, Routy JP, Zhang Y, Bakeman W, Bordi R, DaFonseca S, Said EA, Gosselin A, Tep TS, Eichbaum Q, van Grevenynghe J, Schwartz O, Freeman GJ, Haddad EK, Chomont N, Sékaly RP. *Nef promotes evasion of human immunodeficiency virus type 1-infected cells from the CTLA-4-mediated inhibition of T-cell activation.* **J Gen Virol.** 2015 Jun; 96(Pt 6), p.1463-77.

Exemple de résumé soumis pour une conférence

RÔLE DE L'AUTOPHAGIE DANS LA CONTRIBUTION DES CELLULES DENDRITIQUES DÉRIVÉES DES MONOCYTES CD16+ LORS DE LA PATHOGÉNÈSE À VIH-1

Tep, Tévy-Suzy^{1,2}, Wacleche, Vanessa Sue^{1,2}, El-Far, Mohamed², Chouick, Younes², Routy, Jean-Pierre³, Ancuta, Petronela^{1,2}

- 1- Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal.
- 2- CRCHUM, Montréal.
- 3- Centre de recherche de l'Université McGill, Montréal.

Introduction: Les monocytes CD16+ prennent de l'expansion lors de la pathogénèse de l'infection à VIH-1 et représentent une source de cytokines pro-inflammatoires. Les monocytes sont des précurseurs des cellules dendritiques (DC). Toutefois, les caractéristiques fonctionnelles des DC dérivées des monocytes (MDDC) CD16+ demeurent inconnues. Afin de déterminer si les MDDC CD16+ contribuent à la pathogénèse du VIH, nous avons investigué l'habileté de *trans* infection et le potentiel immunogénique des MDDC CD16+ *versus* CD16- en relation avec le processus d'autophagie.

Méthodes: Les monocytes ont été isolés du sang périphériques de donneurs sains par sélection négative à l'aide de billes magnétiques (Miltyeni). Les sous-populations CD16+ et CD16- ont été triées en cytométrie en flux. Ces cellules ont été mises en culture en présence de GM-CSF et IL-4 afin de générer des MDDC. Pour évaluer la *trans* infection et le potentiel immunogénique, les MDDC ont été pré-traités avec un activateur, la rapamycine ou un inhibiteur d'autophagie, la bafilomycine ou la 3-MA. Ensuite, ces MDDC ont été mis en co-culture avec des lymphocytes T CD4+ chargées en CFSE, en présence ou absence de VIH (NL4. 3BaL) et d'antigènes (*SEB*, *CMV*, *C. albicans*, *S. aureus*) ou CD3/CD28.

Résultats: Les analyses FACS montrent que les MDDC CD16+ *versus* CD16- présentent un potentiel immunogénique détérioré. Elles ont une capacité réduite à induire la prolifération des cellules T CD4+ spécifiques et une capacité de sécrétion d'IL-17A et F altérée. La rapamycine diminue la *trans* infection de VIH et altère la prolifération des cellules T CD4+ spécifiques aux antigènes. Parallèlement, la bafilomycine et la 3-MA n'ont pas affecté ces processus de manière significative.

Conclusion: La régulation différentielle de l'autophagie dans les CDDM CD16+ et CD16- explique leur contribution distincte à la pathogénèse de l'infection à VIH. Ces résultats pourraient orienter la production d'un vaccin anti-VIH basée sur des MDDC CD16- et la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques visant l'augmentation de l'autophagie chez les sujets infectés par le VIH.

Exemple d'affiche présentée à un congrès

Role of Autophagy in the Contribution of CD16+ Monocyte-Derived Dendritic Cells to HIV-1 Pathogenesis

Tévy-Suzy Tep^{1,2}, Vanessa Sue Wacleche^{1,2}, Mohamed El-Far², Younes Chouiki², Jean-Pierre Routy^{3,4} and Petronela Ancuta^{1,2}

¹Department of microbiology, infectious and immunology, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, ²CHUM-Research Center, Montréal, QC, Canada, ³McGill University Health Center, Montréal, QC, Canada.

ABSTRACT

Introduction: CD16+ monocytes are highly expanded during HIV infection and represent a source of pro-inflammatory cytokines. Monocytes are precursors for dendritic cells (DC), however, dendritic cells (DC) are CD16- monocyte-derived. DC (MDDCs) and monocyte-derived DC (MDDCs) contribute to HIV pathogenesis. We investigated the trans-infection ability and the immunogenic potential of CD16+ versus CD16- MDDC in relationship with the autophagy process.

Methodology: Monocytes were isolated from PBMC of healthy donors by negative selection using magnetic beads. The CD16- and CD16+ subsets were sorted by flow cytometry. MDDCs were obtained upon monocyte culture in presence of GM-CSF/IL-4. The trans-infection ability (intra-cellular HIV-p24) and immunogenic potential (CFSE dilution assay) were evaluated by co-culture of MDDCs with autologous CFSE-labeled CD4+ T-cells. The effect of rapamycin (N-4,384) and siRNA (siRNA: CHM, C. siRNA: S. aureus) or CD3/CD28. MDDCs were pretreated with autophagy activator rapamycin or inhibitors bafilomycin and 3-MA.

Results: FACS analysis shows that CD16+ vs. CD16- MDDC exhibit an altered immunogenic potential. They have an altered ability to induce the proliferation of antigen-specific CD4+ T-cells and an impaired secretion of both IL17-A and F. Rapamycin decreased HIV trans-infection and also impedes on the antigen-specific proliferation of CD4+ T-cells. bafilomycin and 3-MA did not significantly affect these processes.

Conclusion: Thus, the expansion of CD16+ monocytes in peripheral blood of HIV-infected subjects may favor the generation of MDDC prone to HIV pathogenesis. New therapeutic strategies aimed at restoring autophagy in CD16+ MDDC may promote potent antiviral responses while limiting HIV dissemination.

Acknowledgements: The authors thank Dominique Gaudet (Flow Cytometry Core Facility, CHUM-Research Center, Montréal, QC, Canada) for expert technical support with flow cytometry. This work was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-264646, MOP-211460) and a postdoctoral fellowship from the Fonds de la recherche en santé Québec (FRSQ) (VSW). We thank Dr. Robert Johnson for expert technical support with HIV-1 trans-infection assays. We thank Dr. Robert Johnson for expert technical support with HIV-1 trans-infection assays. We thank Dr. Robert Johnson for expert technical support with HIV-1 trans-infection assays. We thank Dr. Robert Johnson for expert technical support with HIV-1 trans-infection assays.



RESULTS



Figure 1. Isolation of CD16+ and CD16- monocytes. PBMC were stained with anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, and anti-CD45. CD16+ monocytes were selected by flow cytometry (CD14+ CD16+ CD19-). CD16- monocytes were selected by flow cytometry (CD14+ CD16- CD19-). CD45 was used as a marker for live cells. The purity of CD16+ and CD16- monocytes was confirmed by flow cytometry (CD14+ CD16+ CD19- vs. CD14+ CD16- CD19-). The purity of CD16+ and CD16- monocytes was confirmed by flow cytometry (CD14+ CD16+ CD19- vs. CD14+ CD16- CD19-).

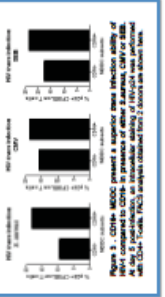


Figure 2. CD16- MDDC present a superior trans-infection ability and immunogenic potential. A: HIV-1 trans-infection ability of CD16+ and CD16- MDDCs. CD16- MDDCs showed a superior trans-infection ability compared to CD16+ MDDCs. B: CFSE dilution assay. CD16- MDDCs showed a superior immunogenic potential compared to CD16+ MDDCs. C: Cytokine production. CD16- MDDCs showed a superior ability to induce the proliferation of CD4+ T-cells compared to CD16+ MDDCs.

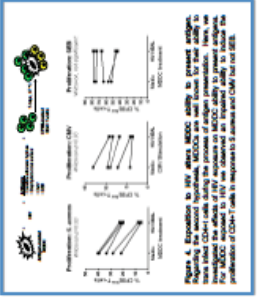


Figure 3. Rapamycin treatment increases MDDC trans-infection and immunogenicity. CD16- MDDCs were treated with rapamycin (100 nM) for 24 hours before being co-cultured with CD4+ T-cells. HIV-1 trans-infection and immunogenicity were measured at 72 hours post-infection.

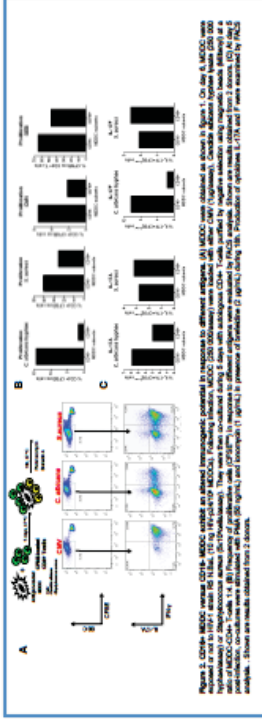


Figure 4. CD16- MDDC exhibit an altered immunogenic potential in response to rapamycin. A: MDDCs were cultured with rapamycin (100 nM) for 24 hours before being co-cultured with CD4+ T-cells. HIV-1 trans-infection and immunogenicity were measured at 72 hours post-infection. B: CFSE dilution assay. CD16- MDDCs showed a superior immunogenic potential compared to CD16+ MDDCs. C: Cytokine production. CD16- MDDCs showed a superior ability to induce the proliferation of CD4+ T-cells compared to CD16+ MDDCs.

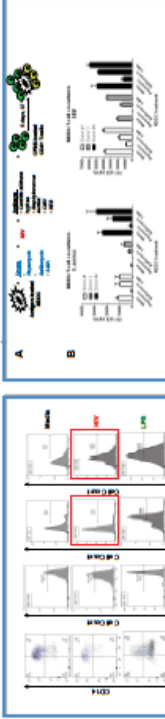


Figure 5. Rapamycin treatment increases MDDC trans-infection and immunogenicity. CD16- MDDCs were treated with rapamycin (100 nM) for 24 hours before being co-cultured with CD4+ T-cells. HIV-1 trans-infection and immunogenicity were measured at 72 hours post-infection.

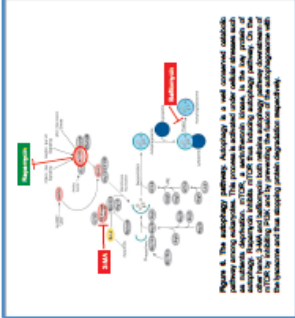


Figure 6. The autophagy pathway. Autophagy is a well conserved cellular process that allows the degradation and recycling of cellular components. In CD16+ MDDCs, autophagy is involved in the regulation of HIV-1 trans-infection and immunogenicity. The diagram illustrates the interaction between CD16+ MDDCs and CD4+ T-cells, involving autophagy and trans-infection.

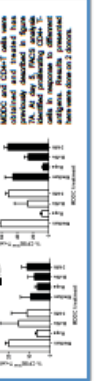


Figure 7. Rapamycin treatment increases MDDC trans-infection and immunogenicity. CD16- MDDCs were treated with rapamycin (100 nM) for 24 hours before being co-cultured with CD4+ T-cells. HIV-1 trans-infection and immunogenicity were measured at 72 hours post-infection.

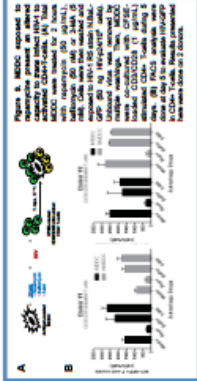


Figure 8. MDDC trans-infection and immunogenicity are altered in response to rapamycin. CD16- MDDCs were treated with rapamycin (100 nM) for 24 hours before being co-cultured with CD4+ T-cells. HIV-1 trans-infection and immunogenicity were measured at 72 hours post-infection.