

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

LE RÔLE DE TRIM5ALPHA POUR L'AUTOPHAGIE DANS DES LIGNÉES
MYÉLOÏDES ET LYMPHOÏDES EXPOSÉES AU VIH

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
PAMÉLA LAVOIE

SEPTEMBRE 2020

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

À mes parents qui ont toujours cru en moi,

Chantal et Alain

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent à mon directeur de recherche, Dr Marc Germain, de m'avoir accueillie comme stagiaire, puis comme étudiante à la maîtrise. Un énorme merci pour ta patience, ta grande disponibilité et ton soutien constant. Je tiens aussi à remercier mon codirecteur, Dr Lionel Berthoux, pour ses précieux conseils et ses encouragements.

Je voudrais aussi remercier les membres actuels et anciens de leurs laboratoires, dont Kiran, Hema, Priya, Soumia, Natacha, Mélodie, Nour, Amita et Kevin. Merci également aux superbes personnes avec qui j'ai noué une belle amitié au cours de ma maîtrise, dont Laurence, Roxane et Pascal. Merci à tous pour vos conseils et les bons moments passés en votre compagnie.

I would like to express my extreme gratitude to my friends from the US for the daily laughs and constantly helping me (but mostly teasing me!) with my English speaking. Shout-out to the TRAP squad: Balmore, Noe, Alec, Alex, Brian, Adrian, Osvaldo, Josee and Josh.

Merci à mes chères amies, Élizabeth, Laurie B., Audrey, Camille et Laurie M., d'avoir toujours été là pour moi.

Finalement, je ne remercierai jamais assez mes parents, Chantal et Alain, pour leur soutien moral constant et leurs encouragements au travers de mes longues études. Merci également à mon conjoint, Louis-Philippe, pour ton écoute, et ce, même lorsque je te parle d'appareils et de techniques qui ne te disent absolument rien (et que je me répète encore et encore!).

RÉSUMÉ

Ces dernières années, l'autophagie a été grandement étudiée dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre le VIH. L'autophagie consiste en la dégradation de matériel intracellulaire par les lysosomes et ce matériel est livré par une structure nommée autophagosome. Il a été démontré que l'exposition au VIH-1 active l'autophagie dans les cellules humaines. TRIM5 α est une protéine intracellulaire antirétrovirale qui lie la capsid des rétrovirus et induit la dégradation des rétrovirus lorsqu'ils pénètrent dans une cellule. De plus, des études récentes suggèrent que cette protéine stimule l'autophagie dans les cellules humaines. Le but de cette étude est donc de déterminer l'impact de TRIM5 α sur l'autophagie dans des lignées cellulaires cibles du VIH-1, soit dans les THP-1 et les Jurkat. Pour ce faire, nous avons étudié le rôle de TRIM5 α sur le flux autophagique basal. Nous croyons que TRIM5 α tient un rôle dans l'initiation de l'autophagie dans les THP-1 et dans la régulation du flux autophagique. Puis, nous avons infecté ces cellules avec des vecteurs du VIH pour déterminer le rôle de TRIM5 α sur l'autophagie en présence de rétrovirus. Nous démontrons également que TRIM5 α tient un rôle dans le flux autophagique dans les THP-1 et les Jurkat lors d'infections rétrovirales. Les recherches sur TRIM5 α et l'autophagie pourraient conduire à identifier un moyen de rendre la protéine plus efficace dans son rôle de reconnaissance des rétrovirus qui mène à la dégradation de ces derniers. Les recherches sont également indispensables pour comprendre comment l'autophagie est impliquée lors d'une infection au VIH.

Mots-clés : TRIM5 α , VIH-1, autophagie, autophagie sélective

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	iv
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	viii
LISTE DES SYMBOLES.....	x
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Le virus de l'immunodéficience humaine	1
1.1.1 Historique.....	1
1.1.2 Description.....	2
1.1.3 Cellules cibles	4
1.1.4 Contrôleurs élites	6
1.1.5 Facteurs de restrictions	7
1.1.6 TRIM5 α humain et VIH-I.....	7
1.2 TRIM5 α	8
1.2.1 Historique.....	8
1.2.2 Structure.....	8
1.2.3 Rôles	8
1.3 Autophagie.....	10
1.3.1 Historique.....	10
1.3.2 Types d'autophagie.....	11
1.3.3 Conditions de la macroautophagie.....	12
1.3.4 Marqueurs autophagiques	13
1.3.5 Processus et protéines impliquées.....	14
1.3.6 Flux autophagique.....	16
1.3.7 Virophagie	17
1.4 Hypothèse et objectifs.....	18

CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	20
2.1 Culture cellulaire	20
2.2 Knockout de TRIM5 α	20
2.3 Validation du knockout.....	21
2.4 Production de vecteurs viraux	21
2.5 Sensibilité du rétrovirus à TRIM5 α	22
2.6 Traitements des cellules et infections virales	22
2.7 Analyse par Western-Blot.....	23
2.8 Analyses statistiques.....	24
CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	25
3.1 Validation KO et vecteurs viraux	25
3.1.1 KO.....	25
3.1.2 Restriction par du vecteur viral EC5-1TRIM5 α	28
3.2 Régulation de TRIM5 α par autophagie	29
3.2.1 THP-1.....	30
3.2.2 Jurkat.....	33
3.3 Régulations de TRIM5 α par autophagie suite à une infection	36
CHAPITRE IV	
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	40
4.1 Discussion.....	40
4.1.1 TRIM5 α régule l'initiation de l'autophagie dans les THP-1 et régule le flux autophagique.....	41
4.1.2 Les rétrovirus testés régulent l'initiation et la régulation du flux autophagie dépendamment de TRIM5 α	43
4.1.3 Perspectives	46
4.2 Conclusions	46
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	48

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Génome du VIH-1.....	2
1.2	Structure du VIH-1	3
1.3	Cycle viral du VIH.....	4
1.4	Les mécanismes d'inhibition rétrovirale par TRIM5alpha	9
1.5	Voie de l'autophagie.....	16
1.6	Virophagie.....	18
3.1	Validation du KO de TRIM5alpha en évaluant la restriction de N-MLV pour TRIM5alpha dans les THP-1	26
3.2	Validation de la restriction d'EC5-1 (virus du VIH atténué GFP+) dans les lignées cellulaires	29
3.3	Marqueur d'autophagie dans les THP-1 sans infection.....	30
3.4	Marqueur d'autophagie dans les Jurkat sans infection.....	33
3.5	Marqueur d'autophagie dans les THP-1 et Jurkat avec infection par EC5-1 et N-MLV.....	37
4.1	Schéma de l'autophagie dans les THP-1	42
4.2	Schéma de l'autophagie avec infection par EC5-1 dans les THP-1	44

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARN _g	ARN guide
ARN _m	ARN messenger
ARN _t	ARN de transfert
ATG	Autophagy-related
Baf	Bafilomycine A1
B-MLV	Virus de leucémie murine B-tropique
CA	Capside
CAG	Séquence ADN non humaine (contrôle)
CALCOCO2	Calcium binding and coiled-coil domain 2 (NDP52) (autophagie sélective)
Cas9	Protéine associée à CRISPR #9
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CMA	Autophagie impliquant les chaperones
CRISPR	Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (milieu de culture cellulaire)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Sérum bovin fœtal
GFP	Protéine fluorescente verte
HEK293T	Human embryonic kidney 293T
HTLV-III	Human T-Lymphotropic Retrovirus III
KO	Knockout

LAV	Lymphadenopathy Associated Virus
LC3	Microtubule-associated protein1A/1B-light chain 3 (substrat autophagique)
MOI	Multiplicity of infection
Nef	Negative factor (protéine virale)
NBR1	Neighbor of BRCA1 gene1 protein (récepteur autophagique sélectif)
N-MLV	Virus de leucémie murine N-tropique
p62	Sequestosome-1 (SQSTM1) (récepteur autophagique sélectif)
rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (milieu de culture cellulaire)
RT	Enzyme transcriptase inverse
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
T5KO	Knockout de TRIM5 α
TRIM5 α	Protéine à motif tripartite 5 alpha isoforme
VIH-I	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VSV-G	Protéine G du virus de la stomatite vésiculaire

LISTE DES SYMBOLES

°C	Degrés Celsius
g	Gramme
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
m	Milli
M	Molaire
n	Nano
μ	Micro

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le virus de l'immunodéficience humaine

1.1.1 Historique

Dans les années 1980-1981, avant même qu'il y ait un nom pour cette maladie, cinq hommes homosexuels ont été hospitalisés pour des infections pulmonaires rares à *Pneumocystis carinii*¹. Le U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) était alors alerté. Le diagnostic de pneumonie *Pneumocystis* a été confirmé pour les cinq patients et ils montraient tous des signes d'immunosuppression. D'autres cas similaires ont été observés dans plusieurs autres pays et le terme AIDS (syndrome d'immunodéficience acquise) fut adopté. C'est en 1983 que le virus du VIH-1 fut isolé pour la première fois, initialement appelé LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) ou HTLV-III (Human T-Lymphotropic Retrovirus III)².

1.1.1.1 Problématique actuelle

Depuis le début de l'épidémie au VIH, c'est plus de 40 millions de personnes qui sont mortes du SIDA et plus de 80 millions de personnes qui ont été infectées³. Les recherches effectuées et les thérapies antirétrovirales sont donc essentielles pour diminuer le nombre d'infections et de décès par an. De nos jours, avec les thérapies antirétrovirales, le taux de mortalité relié au SIDA a diminué, mais les recherches ne font qu'augmenter pour produire un vaccin ou tenter de trouver un remède permettant de guérir les patients atteints du VIH³. Le VIH représente un énorme défi pour les chercheurs étant donné sa grande vitesse de réplication, ses fréquentes mutations et sa capacité à éviter d'être dégradé par les cellules humaines (entre autres, en évitant d'être dégradé par le processus de l'autophagie)³.

1.1.2 Description

1.1.2.1 Structure

Le génome du VIH est composé de deux molécules d'ARN simple brin identiques, mais non complémentaires, qui sont enveloppés par un noyau à l'intérieur de la particule virale⁴. Il appartient au genre *Lentivirus*, dans la famille *Retroviridae*⁵. Son ARN code pour trois polyprotéines (*gag*, *pol* et *env*), deux protéines régulatrices (*tat* et *rev*) et quatre protéines accessoires (*vif*, *vpr*, *vpu* et *nef*)^{6,7} (Figure 1.1) Les deux extrémités du génome viral contiennent deux longues séquences répétitives terminales (LTR), 5'-LTR et 3'-LTR respectivement⁶.

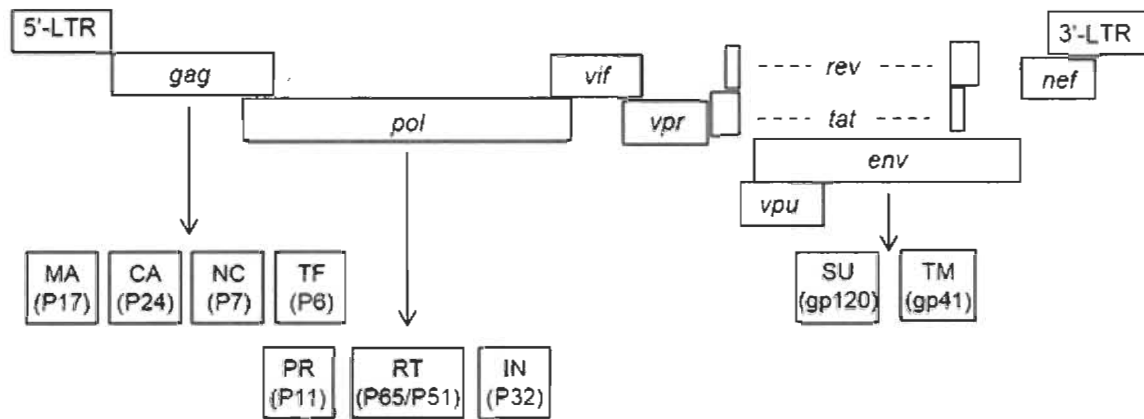


Figure 1.1 Génome du VIH-1.
(Adaptée de Nkeze *et al.*, 2015.)

Les rétrovirus ont la capacité de rétrotranscrire l'ARN en ADN suite à l'entrée du virus dans une cellule hôte grâce à l'enzyme Transcriptase Inverse (RT). L'ARN est protégé par une enveloppe (incluant les glycoprotéines de surface gp120 et gp41) composée d'une bicouche lipidique qui provient de la cellule hôte lors du bourgeonnement du virus⁸. À l'intérieur se trouve une capsid (CA) formée par la protéine p24. (Figure 1.2)

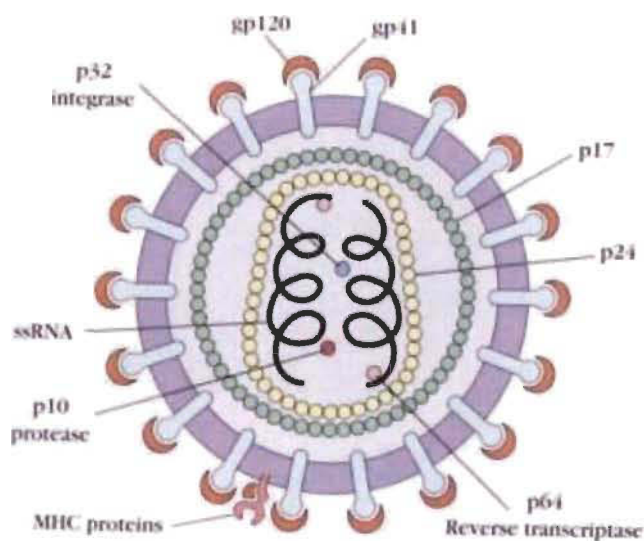


Figure 1.2 Structure du VIH-1.
(Adaptée de Dadar et Dhama, 2016.)

1.1.2.2 Cycle viral

Le cycle viral du VIH peut être divisé en deux phases, soit la phase précoce et la phase tardive. La phase précoce est caractérisée par l'attachement du virus à la cellule cible, par la fusion du virus, la décapsidation et transcription inverse, puis le transport nucléaire et l'intégration. La phase tardive est amorcée par la synthèse d'ARN, l'épissage, l'export nucléaire, la production de protéines, l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation du virus⁹ (Figure 1.3).

L'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles requiert une interaction avec les protéines de l'enveloppe du VIH-1, le récepteur cellulaire CD4 et un corécepteur (CCR5 ou CXCR4)^{10,11}. Le VIH est alors attaché à la cellule cible. Il est à noter que le virus utilise principalement le CCR5 au début de l'infection alors que le CXCR4 est favorisé plus tard dans l'évolution de la maladie¹². Suite à l'attachement du virus, une cascade de changements est initiée et aboutit à la fusion entre le virus et la membrane de la cellule hôte^{9,13}. La capsid du VIH est alors relâchée dans le cytoplasme de la cellule. Ainsi, plusieurs enzymes incluant la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN) sont libérés dans le cytoplasme en plus de l'ARN génomique viral qui est protégé par la capsid

virale (CA). Cette étape est suivie de la décapsidation de la CA afin de libérer l'ARN viral et le rendre accessible pour la prochaine étape, soit la transcription inverse. L'enzyme transcriptase inverse relâchée plus tôt dans le cytoplasme peut alors convertir l'ARN viral en ADN viral, ce qui va permettre au virus de s'intégrer au génome de la cellule hôte. Enfin, l'ADN viral est transporté jusqu'au noyau. Une fois à l'intérieur de ce dernier, l'intégrase permet l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte. Cette dernière étape met fin au cycle viral précoce du VIH. Le cycle tardif n'est pas expliqué en détail, puisqu'il n'est pas pertinent à la présente étude.

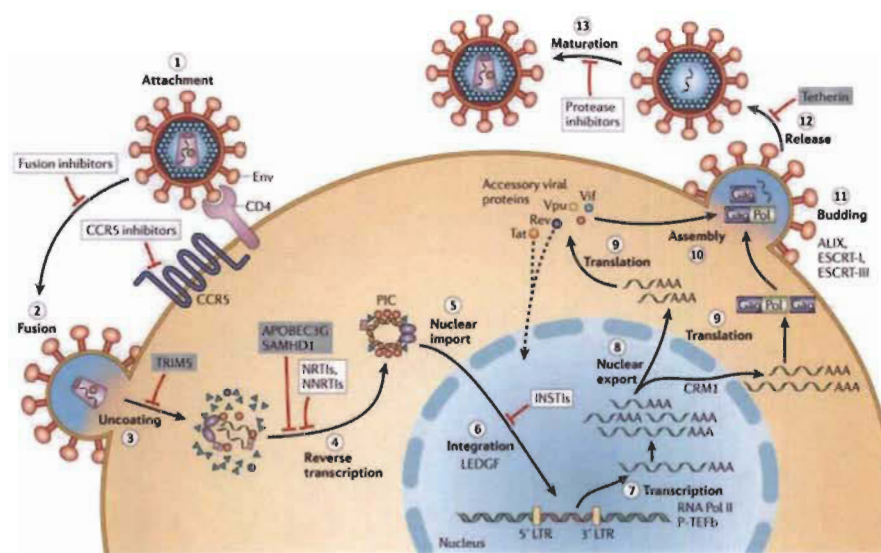


Figure 1.3 Cycle viral du VIH.
(Adaptée de Musumeci *et al.*, 2015.)

1.1.3 Cellules cibles

Les cellules sanguines se divisent en trois catégories, soit les leucocytes, les érythrocytes et les thrombocytes. Les érythrocytes transportent de l'oxygène et les thrombocytes tiennent un rôle important pour la coagulation sanguine. Les cellules pertinentes à cette étude sont les leucocytes, puisque ce sont des cellules du système immunitaire en partie responsable de la protection du corps contre les virus et bactéries envahisseurs. Ils interviennent dans la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. La réponse immunitaire innée est la première réponse de

l'organisme lors de l'invasion par un pathogène. Diverses cellules sont principalement impliquées dans cette réponse (les macrophages, les monocytes, les cellules NK, les cellules dendritiques, etc.) et participent à l'élimination du pathogène. La réponse immunitaire adaptative fait suite à la réponse immunitaire innée. Celle-ci se base sur la reconnaissance et la mémorisation des agents pathogènes et implique principalement deux types de cellules, soit les lymphocytes T et les lymphocytes B.

Ce sont les cellules exprimant le CD4 et un des corécepteurs mentionnés précédemment (CCR5 ou CXCR4) qui peuvent être infectées par le VIH. Parmi ces cellules, on retrouve les lymphocytes T CD4+, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Lorsque l'enveloppe du virus reconnaît le CD4 et le corécepteur à la surface de la cellule, il s'y attache et fusionne avec la membrane de la cellule. Cette fusion permet de libérer la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule et la poursuite du cycle viral à l'intérieur de la cellule hôte.

1.1.3.1 Lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T CD4+, également appelés lymphocytes T auxiliaires, sont des leucocytes. Leur principal rôle est de diriger et d'activer les autres cellules de l'immunité. Ils aident à la maturation ces lymphocytes B et à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et des macrophages. Pour les activer, il faut qu'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) présente, via le CMH de classe II, des antigènes peptidiques. Ces CPA sont des macrophages, des monocytes, des cellules dendritiques, ou des lymphocytes B. Une fois activées, les lymphocytes T CD4+ sécrètent des cytokines pour réguler et aider à la réponse immunitaire.

Il est connu que les lymphocytes T CD4+ sont la cible privilégiée par le VIH. La pathogenèse de l'infection à VIH-1 se caractérise par une déplétion drastique du taux de lymphocytes T CD4+ comme observé initialement dans les premiers cas de patients infectés par le VIH. Le nombre total de lymphocytes T CD4 circulant dans le sang des patients VIH+ est l'outil le plus utilisé pour surveiller la gravité de la maladie¹⁴.

Leur fonction est vitale pour le système immunitaire adaptatif, pour moduler le système immunitaire inné et pour la survie de l'individu¹⁵.

1.1.3.2 Monocytes

Les monocytes sont de grosses cellules phagocytaires de la famille des leucocytes. Ils jouent un rôle autant dans le système immunitaire adapté qu'inné¹⁶. Alors que les cellules T CD4+ sont les principales cibles du VIH, les monocytes sont également infectés en grand nombre. Avec la progression de la maladie, les lymphocytes T CD4+ diminuent en nombre et les monocytes infectés deviennent un réservoir important du VIH^{17,18}. Les réservoirs latents du VIH sont les cellules qui sont infectées, mais ne produisent pas activement de nouveau VIH. Les réservoirs peuvent être réactivés et se remettre à produire activement du VIH.

Actuellement, ces réservoirs sont le principal obstacle dans la découverte d'un traitement ou vaccin efficace afin d'éradiquer le VIH, puisque les traitements ciblent uniquement les cellules qui produisent activement de nouvelles copies du VIH. Ces réservoirs sont toujours mal compris, difficiles à détecter et à éliminer¹⁸. Les patients vivant avec le VIH doivent prendre des médicaments antirétroviraux quotidiennement pour maintenir leur charge virale à un faible niveau. Les médicaments incluent principalement des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTI), des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTI) et/ou des inhibiteurs d'intégrase¹⁹. Si un patient cesse la prise de ses médicaments, les réservoirs latents peuvent recommencer à produire des copies du VIH et leur charge virale va augmenter à nouveau.

1.1.4 Contrôleurs élites

La majorité des patients ont une charge virale détectable et vont progresser vers le SIDA s'ils ne prennent aucun traitement. Cependant, une petite portion des patients a une charge virale très faible ou même indétectable pendant plusieurs années sans même prendre de médication²⁰⁻²². Ces rares patients sont appelés contrôleurs élites.

Les critères qui définissent les contrôleurs élites peuvent cependant varier d'une étude à une autre. Plusieurs facteurs peuvent être en cause en ce qui concerne la capacité de ces patients à maintenir une charge virale faible ou indétectable. La présence de certains facteurs de restriction pourrait être en cause pour expliquer la résistance contre le VIH chez les contrôleurs élites tels que TRIM5 α ²³, APOBEC3G²⁴ and SAMHD1²⁵.

1.1.5 Facteurs de restrictions

En cas d'infection, les cellules ont à leur disposition des protéines antivirales qui constituent une première ligne de défense pour bloquer les pathogènes entrants. Ces protéines antivirales capables de lutter contre les pathogènes sont appelées facteurs de restriction. Ils agissent à différentes étapes critiques du cycle viral (Figure 1.3) et leurs effets diffèrent d'un type cellulaire à l'autre²¹. Plusieurs protéines, incluant TRIM5 α , APOBEC3G, SAMHD1, tetherin et Mx2, jouent ce rôle dans les cellules humaines. Parmi ces facteurs de restriction, certaines études suggèrent que TRIM5 α pourrait être responsable de l'immunité naturelle chez certains des contrôleurs élites^{26,27}. Il est donc pertinent de continuer d'approfondir les recherches sur TRIM5 α et d'en découvrir plus sur ses différents rôles.

1.1.6 TRIM5 α humain et VIH-1

Une des stratégies du VIH-1 pour éviter la dégradation par TRIM5 α est la mutation de sa capsid ce qui empêche la reconnaissance par le facteur de restriction lorsqu'il pénètre dans les cellules de l'hôte²¹. TRIM5 α humain reconnaît faiblement le VIH-1. Les personnes infectées par le VIH présentent une grande variation de la progression de la maladie et de leur charge virale²⁸. Cette différence chez les patients s'observe par le niveau de virus circulant dans leur plasma dans la phase asymptomatique (ce qui précède la progression vers le SIDA). Alors que certains patients resteront dans la phase asymptomatique pendant plusieurs années, d'autres patients progressent rapidement vers le SIDA.

1.2 TRIM5 α

1.2.1 Historique

Tripartite motif-containing protein 5 alpha isoform (TRIM5 α) a été décrit initialement dans des études comparant la prolifération du VIH et du SIV (virus de l'immunodéficience simienne) dans les lignées cellulaires de singes²⁹. TRIM5 α fait partie de la famille des TRIMs (TRipartite Motif).

1.2.2 Structure

TRIM5 α contient un domaine RING en N-terminal, B-box 2 et coiled-coil. Le domaine RING est responsable de l'activité E3 ubiquitine ligase, le domaine B-box 2 est nécessaire pour la trimérisation des dimères de protéines et le coiled-coil sert à la dimérisation³⁰.

1.2.3 Rôles

TRIM5 α est une protéine intracellulaire cytoplasmique antirétrovirale qui reconnaît et lie la capsid des rétrovirus et induit la dégradation des rétrovirus lorsqu'ils pénètrent dans une cellule^{31,32}. Plusieurs mécanismes peuvent potentiellement être utilisés par TRIM5 α pour éliminer les rétrovirus entrants, soit la dégradation médiée par le protéasome, l'accélération de la décapsidation, l'altération du transport intracellulaire et la stimulation de l'autophagie (Figure 1.4).

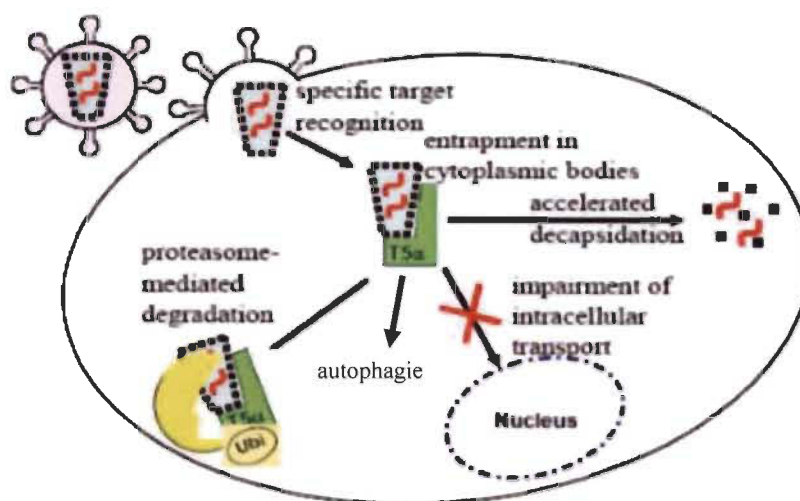


Figure 1.4 Les mécanismes d'inhibition rétrovirale par TRIM5alpha.
(Adaptée de Méridol et Berthoux, 2015.)

1.2.3.1 Mécanismes d'inhibition

Comme expliqué plus tôt, TRIM5 α lie spécifiquement la capsid des rétrovirus après leur entrée dans le cytoplasme dans la phase précoce du cycle viral. TRIM5 α permet ensuite le désassemblage des virus via divers mécanismes, dont la dégradation par le protéasome^{21,33}. Le protéasome est un complexe enzymatique formé de protéases qui sert à dégrader des protéines. Les protéines à dégrader sont marquées par une chaîne d'ubiquitine ce qui permet au protéasome de les reconnaître et d'entraîner leur dégradation³⁴. Dans le cas de TRIM5 α , pour que le protéasome soit recruté, le domaine RING qui est responsable de l'activité E3 ubiquitine ligase est nécessaire^{35,36}. Le domaine E3 peut s'auto-ubiquitiner, ce qui résulte en sa dégradation par le protéasome³⁷. Sans ce domaine (par suppression ou mutation du domaine RING), on observe une perte significative d'efficacité de la restriction causée par la perte de la dégradation par le protéasome³⁶. Un autre rôle de la ligase E3Ub associée au domaine RING est de stimuler la synthèse de chaînes d'ubiquitine (Ub). Ces chaînes Ub se lient à diverses protéines et conduisent à l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B et AP-1 dans le cadre de la restriction du VIH²¹.

En plus de la dégradation par le protéasome, TRIM5 α induit l'accélération de la décapsidation de la capsidite du rétrovirus après l'entrée du virus dans le cytoplasme (avant même l'étape de la transcription inverse du cycle viral)³⁸. Ce mécanisme est peu connu. En effet, on ignore toujours pourquoi la décapsidation accélérée de la capsidite nuit à l'infection et l'on ignore aussi comment TRIM5 α favorise ce rôle.

Un autre rôle connu de TRIM5 α est l'altération du transport cellulaire. TRIM5 α reconnaît la capsidite et cela peut éventuellement perturber le cycle viral, soit empêcher la fonction de la RT via le protéasome comme expliqué auparavant ou soit en masquant les motifs d'importation au noyau, donc cela empêche le trafic du complexe de pré-intégration (PIC) qui contient l'ADN vers le noyau de la cellule hôte³⁹. Le transport cellulaire du virus est alors altéré par TRIM5 α dû à son autre rôle de décapsidation. De plus, un autre rôle proposé, mais moins connu de cette protéine est qu'elle stimule l'autophagie dans les cellules humaines et entraîne les rétrovirus vers la dégradation autophagique via des interactions avec diverses protéines de l'autophagie^{21,32}.

1.3 Autophagie

1.3.1 Historique

C'est en 1967 que le phénomène d'autophagie est nommé par Russel L. Deter et Christian de Duve. Ces chercheurs observaient la dégradation des mitochondries à l'intérieur des lysosomes et ont observé des vacuoles autophagiques qui fusionnent avec les lysosomes⁴⁰. Plus récemment, l'autophagie a été grandement étudiée dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre le VIH. Les rôles de l'autophagie pendant une infection au VIH sont variés et diffèrent d'un type cellulaire à l'autre, mais les différentes études semblent indiquer que l'infection par le VIH peut déclencher et/ou restreindre l'autophagie⁴¹ dépendamment des lignées cellulaires étudiées.

1.3.2 Types d'autophagie

Il existe trois types d'autophagie qui ont tous en commun la dégradation de protéines cytosoliques : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les chaperones. Ce qui diffère entre ces types d'autophagie, c'est la manière dont les protéines sont acheminées à l'intérieur des lysosomes.

1.3.2.1 Macroautophagie

La macroautophagie implique la dégradation de larges protéines mal repliées, d'organites endommagés, de mitochondries, etc. Ce qui doit être dégradé est séquestré par une double membrane lipidique qui va ensuite former l'autophagosome et fusionner avec un lysosome pour former l'autophagolysosome (ou autolysosome)⁴². Il s'agit de la principale forme d'autophagie et la plus étudiée. C'est également la seule forme d'autophagie qui mène à la formation d'autophagosome. Le manque de nutriments est un activateur important de ce type d'autophagie, tout comme la présence d'organites endommagés (macroautophagie sélective). La macroautophagie sera nommée simplement "autophagie" tout au long de ce mémoire pour simplifier l'appellation.

1.3.2.2 Microautophagie

En ce qui concerne la microautophagie, le lysosome capture directement les composantes cytosoliques cibles par l'invagination de sa membrane⁴³. L'autophagosome n'est donc pas impliqué et le lysosome ne fusionne pas avec une autre vacuole. L'invagination se fait dans la lumière du lysosome et forme une petite vacuole. Cette vacuole se détache de la membrane externe pour ensuite être dégradée par les enzymes lysosomales.

1.3.2.3 Autophagie médiée par les chaperones

L'autophagie impliquant les chaperones (CMA, chaperone-mediated autophagy) conduit à la dégradation de protéines solubles spécifiques qui portent le motif particulier

KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln), ce qui leur permet d'interagir et d'être reconnu par la protéine membranaire lysosomale LAMP2A (Lysosome-associated membrane protein 2) et la protéine HSC70 (Heat shock cognate chaperone de 70 kDa)⁴⁴. La protéine mal repliée est alors dépliée et transloquée à l'intérieur du lysosome où elle est dégradée par les enzymes lysosomales.

1.3.3 Conditions de la macroautophagie

1.3.3.1 Basal

L'autophagie basale survient à tout moment dans une cellule. Ce processus est normal dans une cellule saine pour permettre le maintien et la survie de la cellule. L'autophagie basale implique divers adaptateurs pour dégrader le matériel intracellulaire pour l'acheminer à l'intérieur de l'autophagosome. De base, il y a toujours un minimum d'autophagie dans une cellule saine, mais le processus d'autophagie peut être induit de diverses façons. Ce processus est important pour le renouvellement des composantes cytoplasmiques essentielles à la cellule⁴⁵.

1.3.3.2 Sélectif

L'autophagie sélective reconnaît et dégrade des substrats spécifiquement reconnus (entre autres des protéines agrégées, des pathogènes intracellulaires ou des organites endommagés) par des récepteurs sélectifs d'autophagie tels que p62/SQSTM1, CALCOCO2 et NBR1^{46,47}. Les récepteurs sélectifs permettent d'acheminer le matériel à dégrader (tels que des protéines mal repliées, des bactéries, des organites endommagés, etc.) à l'intérieur de ce qui va former l'autophagolysosome. Pour se faire, il doit y avoir un signal de dégradation (des chaînes de poly-ubiquitine attachés à la surface des cargos à dégrader), puis la reconnaissance de cargo via un récepteur d'autophagie sélective et enfin, une liaison avec les protéines de la famille ATG8 lorsqu'ils sont localisés dans la membrane de l'autophagosome pour une éventuelle dégradation du cargo via la liaison avec les lysosomes^{46,48}.

1.3.3.3 Autophagie induite par un manque de nutriments

Dans des conditions de manque d'éléments nutritionnels, la cellule doit dégrader des macromolécules intracellulaires pour survivre. Ce manque de nutriments induit un stress pouvant survenir dans les systèmes biologiques. La dégradation induite par cet état de famine est régulée par des processus autophagiques qui dégradent le matériel intracellulaire et fournissent de l'énergie et des acides aminés pour soutenir les processus cellulaires de base⁴⁹. Tout comme les autres processus, le matériel est acheminé dans l'autophagosome pour dégradation et recyclage des substrats.

1.3.4 Marqueurs autophagiques

1.3.4.1 LC3

LC3 (Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B) est le marqueur le plus utilisé pour étudier l'autophagie. Il existe sous deux formes dans le cytosol, soit LC3-I et LC3-II. LC3-I est converti en LC3-II par l'ajout d'un groupement phosphatidylethanolamine. Cette conversion permet à LC3-II de s'insérer dans la membrane de l'autophagosome. Après fusion de l'autophagosome avec le lysosome et dégradation du matériel cytosolique, LC3-II est soit dégradé ou soit recyclé.

1.3.4.2 Récepteurs sélectifs

p62 (SQSTM1)

P62 (aussi appelée p62/SQSTM1) est le récepteur sélectif d'autophagie le plus étudié et le plus connu. Il reconnaît le matériel à dégrader (protéines, bactéries, organites, etc.) et livre des cargaisons polyubiquitinées dans ce qui va former l'autophagosome⁴⁷. Une fois l'autophagolysosome formé, p62 est également dégradé par des enzymes hydrolases⁴⁵. Ces enzymes permettent de dégrader le contenu séquestré dans l'autophagolysosome. Cette dégradation du récepteur dans le processus de l'autophagie permet de l'utiliser comme marqueur de l'autophagie.

CALCOCO2 (NDP52)

CALCOCO2 (aussi appelée NDP52) est un autre récepteur sélectif d'autophagie qui peut être utilisé comme marqueur d'autophagie. La xénophagie est une forme d'autophagie sélective visant à dégrader des bactéries et des pathogènes viraux. CALCOCO2 est connu pour reconnaître et se lier aux bactéries ubiquitinées et à LC3 pour amener la dégradation de bactéries. Il est donc considéré comme un récepteur de xénophagie^{50,51}. CALCOCO2 joue deux fonctions dans l'autophagie, soit le rôle de la reconnaissance des pathogènes pour les acheminer vers l'autophagie grâce à son activité de récepteur sélectif d'autophagie et son rôle dans la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (assurée par sa fonction régulatrice et de maturation)^{52,53}. Il est également dégradé dans le processus de l'autophagie, ce qui en fait un marqueur autophagique possible pour étudier l'autophagie.

NBR1

NBR1 est un autre récepteur sélectif de l'autophagie dont la structure est similaire à p62⁵⁴. Il lie les protéines ubiquitinées pour permettre leur dégradation en se liant à LC3. Tout comme p62, il reconnaît le matériel à dégrader, l'amène jusqu'à l'autophagosome et est dégradé après fusion avec le lysosome ce qui permet de l'étudier comme marqueur autophagique⁵⁵.

1.3.5 Processus et protéines impliquées

L'autophagie consiste en la dégradation de matériel intracellulaire par les lysosomes, et ce matériel est livré par une structure nommée autophagosome⁵⁶⁻⁵⁸. (Figure 1.5) Le matériel à dégrader est reconnu par des récepteurs dont le sequestosome-1 (SQSTM1 aussi appelé p62), NBR1 et CALCOCO2. Ces récepteurs sélectifs lient et acheminent le matériel à dégrader (organites endommagés, protéines dégradées, bactéries, etc.) dans ce qui va former l'autophagosome⁵⁹. Dans le cas d'un manque de nutriments induisant un stress dans la cellule, la littérature suggère plutôt que les récepteurs sélectifs

d'autophagie sont dégradés via la microautophagie afin de permettre à la cellule de pratiquer la macroautophagie en masse dans un cas de manque de nutriments prolongés⁶⁰.

La formation de l'autophagosome débute avec la formation de phagophore et nécessite un complexe nommé ULK formé par des régulateurs d'autophagie dont ATG13, ULK1 et ULK2^{61,62}. Ce complexe permet de phosphoryler un autre complexe formé par, entre autres, PI3K-III (PIK3C3) et Beclin-1. Ensuite, la membrane est allongée pour former l'autophagosome. Ce processus est régulé par diverses protéines, dont Atg5 et Atg12 qui forment un complexe et interagissent de manière non covalente avec Atg16. Le complexe formé avec Atg16 permet de recruter les protéines de la famille Atg8 (dont LC3)⁶².

Ensuite, LC3-I est recruté et converti en LC3-II et s'incorpore à l'autophagosome. Alors que le complexe Atg5-Atg12-Atg16 se localise aux phagophores et se dissocie des autophagosomes une fois ces derniers formés, LC3-II reste associé aux autophagosomes. Le lysosome fusionne ensuite avec l'autophagosome pour finalement former l'autophagolysosome, où le matériel intracellulaire est dégradé ou recyclé⁶³. LC3-II est en partie recyclé et en partie dégradé alors que les récepteurs autophagiques (p62, NBR1 et CALCOCO2) sont entièrement dégradés par l'autophagosome⁶⁴. Ces protéines sont donc des marqueurs très utilisés pour étudier l'autophagie.

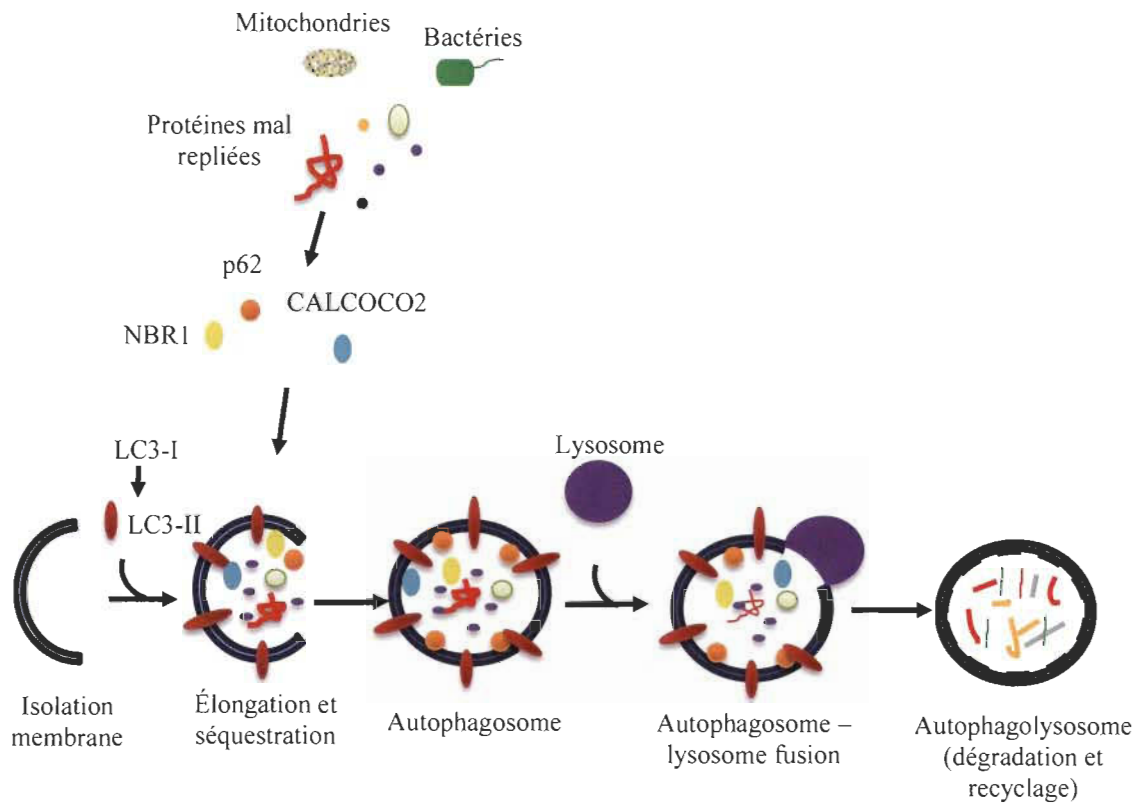


Figure 1.5 Voie de l'autophagie.

1.3.6 Flux autophagique

Le flux autophagique est la mesure de l'activité de dégradation autophagique qui permet de mesurer la vitesse de formation des autophagosomes par rapport à leur dégradation. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour mesurer le flux autophagique, mais aucune ne permet de déterminer le flux autophagique de façon absolument précise⁶⁵. Par contre, tous les experts s'entendent sur le fait que l'utilisation de marqueurs autophagiques tels que LC3-II doit être réalisée pour estimer le flux autophagique global et son débit⁶⁶. L'étude du flux autophagique permet de déterminer la quantité de protéines d'intérêt qui est dégradée par le processus autophagique. Nous pouvons arrêter le flux autophagique à un moment donné par un procédé pharmaceutique, puis déterminer l'accumulation de ce que l'on désire étudier, soit un organeite, une protéine, etc.

1.3.7 Virophagie

Un modèle propose que TRIM5 α est un récepteur d'autophagie sélective (voir sous-section 1.3.3.2 *Sélectif*) qui dirige le rétrovirus vers l'autophagie pour sa dégradation^{67,68}. Ce modèle est appelé virophagie. Le modèle supporte l'idée que TRIM5 α interagit avec divers marqueurs de l'autophagie tels que p62³². Il est suggéré que TRIM5 α reconnaît directement la capsidie rétrovirale et l'achemine vers les membranes de ce qui va former l'autophagosome puis être dégradé par fusion avec les lysosomes (Figure 1.6)⁶⁹.

Ce modèle présente plusieurs limitations d'où sa controverse dont le fait qu'il a été étudié dans une seule lignée cellulaire soit les cellules de Langerhans (des macrophages retrouvés dans le tissu cutané et les muqueuses) non pertinentes à l'étude des rétrovirus (comme le VIH) impliquant TRIM5 α . Ces cellules ne sont pas facilement infectées par le VIH. De plus, après l'entrée du virus dans les cellules de Langerhans, le virus se fait dégrader par les granules de Birbeck. Ces granules sont retrouvées uniquement dans les cellules de Langerhans. Ainsi, il est difficile de comparer les résultats trouvés dans l'article avec d'autres lignées cellulaires. Ce modèle est donc possible, mais il reste encore beaucoup à découvrir pour le confirmer dans les cellules infectées par le VIH.

Autre que ce modèle, certains liens entre le VIH et l'autophagie sont connus dans la littérature. Des études suggèrent que le VIH prend contrôle de l'autophagie pour éviter sa dégradation et son élimination. La protéine virale Nef se lie à Beclin 1 et bloque ainsi la maturation de l'autophagosome⁷⁰. Dans le cas des protéines de l'enveloppe du VIH, elles activent mTOR ce qui, à son tour, inhibe l'autophagie et entrave la dégradation et élimination du virus⁶⁸.

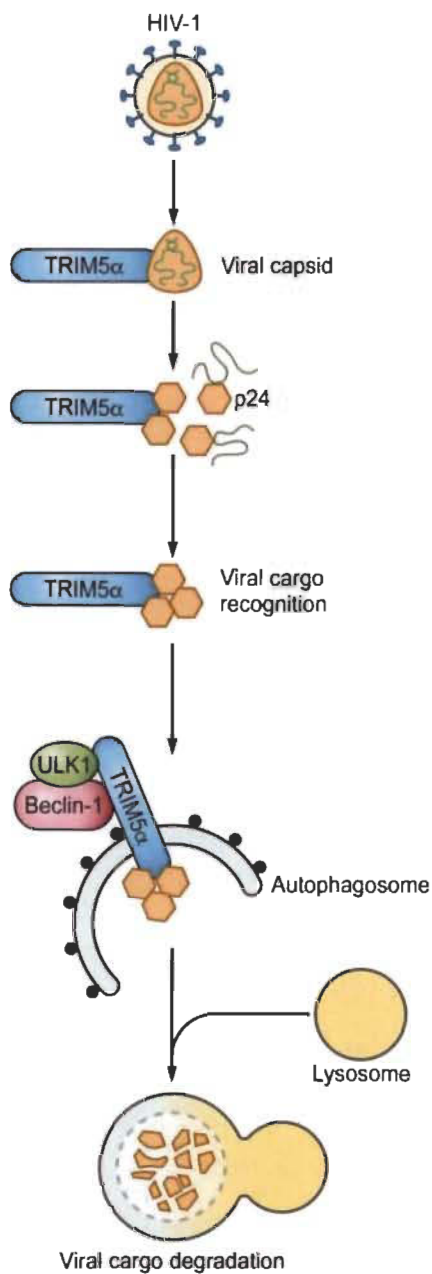


Figure 1.6 Virophagie.
(Adaptée de Sparrer, PLoS Pathogens, 2018.)

1.4 Hypothèse et objectifs

Plusieurs questions restent sans réponse concernant l'impact de l'autophagie et de TRIM5α sur le VIH²¹. Jusqu'à présent, il a été proposé que TRIM5α module l'autophagie et agit comme un récepteur sélectif d'autophagie³². De ce fait, la littérature suggère que le

knockdown de TRIM5 α inhiberait l'autophagie alors que la surexpression de TRIM5 α stimulerait l'autophagie⁷¹.

Quelques études ont proposé que TRIM5 α interagisse avec le récepteur sélectif d'autophagie p62^{32,72}. Il a aussi été proposé que TRIM5 α stimule l'immunité innée⁷³. Cependant, l'autre fonction de TRIM5 α , soit celle de lier la capsid des rétrovirus, ne nécessite pas l'intervention du processus de l'autophagie³¹. Il est donc pertinent de se demander pourquoi TRIM5 α interagit avec p62 et ainsi module l'autophagie, et si cette interaction a un impact lors d'une infection virale par un rétrovirus. Notre étude fait le lien entre TRIM5 α , l'autophagie et les rétrovirus. Ces expériences sont essentielles, puisque certaines des techniques ou certains des produits pharmaceutiques employés ne sont pas documentés dans les cellules cibles du VIH. De plus, les études récentes n'ont pas travaillé avec TRIM5 α endogène. L'étude simultanée de TRIM5 α en présence de virus et de l'impact sur le flux autophagique de façon n'a pas été étudiée par le passé d'où l'importance de ce projet. Notre hypothèse est que TRIM5 α est important pour l'initiation de l'autophagie lors d'une infection virale.

Objectif général : L'objectif de cette étude est donc de démontrer l'importance de TRIM5 α dans la régulation de l'autophagie basale et induite par le VIH.

Objectifs spécifiques :

1. **Déterminer l'impact de TRIM5 α endogène sur le flux autophagique basal.**
Nous avons donc réalisé le knockout du gène de TRIM5 α et mesuré le flux autophagique dans les cellules pertinentes à l'étude.
2. **Déterminer le rôle de TRIM5 α dans l'autophagie en présence de vecteurs viraux.** Pour cet objectif, nous avons infecté nos cellules avec des vecteurs viraux et analysé le flux autophagique dans les cellules knockout de TRIM5 α .

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

Les cellules THP-1, Jurkat, HEK293T (obtenues de J. Luban, University of Massachusetts Medical School) ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (HyClone). Les cellules CRFK ont été cultivées dans du milieu DMEM (HyClone). Tous les milieux de culture ont été supplémentés avec 8 % de sérum fœtal bovin (FBS) (HyClone), de la pénicilline-streptomycine (HyClone) et de la plasmocine (InvivoGen). Toutes les cellules sont maintenues à 37 °C avec 5 % de CO₂.

2.2 Knockout de TRIM5 α

Le knockout a été décrit dans l'article de Natacha Méridol²³. Le vecteur d'expression lentivirale plentiCRISPRv2 (pLCv2) a été fourni par Feng Zhang de Massachusetts Institute of Technology (Addgene plasmid 52961)⁷⁴. Le plasmide exprime simultanément l'ARN guide ciblant l'exon 1, la nucléase Cas9 et Puro^R pour permettre la sélection dans les cellules THP-1 et Jurkat. Les plasmides pLCv2-CAG (pour le contrôle)⁷⁵ ou pLCv2-T5gRNA2 (pour le KO de TRIM5 α , p Δ R8.9 et pMD2G ont été cotransfectés dans des cellules HEK293T à 90 % de confluence avec du polyéthylèneimine PEI (polysciences, Niles, IL). Le milieu de culture a été changé 6 heures après la transfection et les vecteurs viraux ont été récoltés 24 h plus tard, purifiés par centrifugation de 10 min à 3000 rpm et le surnageant contenant les vecteurs viraux (contenant le CRISPR-Cas9) ont été conservés à -80 °C. Les cellules cibles (THP-1 et Jurkat) ont été transduites par vecteur lentiviral tel que décrit par Merindol *et al.*^{23,76} Les cellules transduites avec succès ont été sélectionnées avec de la puromycine à 1 μ g/ml (Invivogen) et séquencées tel que décrit par Méridol *et al.*²³

2.3 Validation du knockout

Les cellules TRIM5 α knockout ont été validées par restriction du rétrovirus N-MLV par TRIM5 α (la validation par Western-Blot n'étant pas possible). Pour vérifier le KO, les cellules contrôles et les cellules KO de TRIM5 α ont été dénombrées, puis mises en plaque de 96 puits (10 000 cellules par puits). Les cellules ont été infectées par des dilutions de N-MLV (MOI variant de 0.1 à 2). Après 48 heures d'incubation, les cellules ont été fixées dans 3 % formaldéhyde (Fisher Scientific) et 10 000 cellules ont été analysées par le FC500 MPL cytometer (Beckman Coulter) en utilisant le programme FCS express 6 software (De novo software). Le pourcentage de cellules GFP positives a été déterminé et a permis de valider le KO de TRIM5 α .

2.4 Production de vecteurs viraux

Le plasmide incapable de répllication pNL4-3_{GFP} Δ Env Δ Nef⁷⁷ (appelé simplement NL4-3_{GFP}) a été produit tel que décrit par Merindol *et al.* dans lequel une suppression a provoqué un changement de cadre dans le gène *env* et dans lequel *gfp* remplace le gène *nef*²³. Les séquences de capsides de EC5-1 ont été amplifiées et insérées dans pNL4-3_{GFP} en utilisant l'ADN ligase T4 (New England Biolabs) tel que décrit par Merindol *et al.*²³ Des bactéries JM109 ont été électroporées telles que décrites par Merindol *et al.*²³, avec le plasmide et mises en culture sur géloses de LB Broth (Miller). Le plasmide a été purifié en utilisant le Qiagen MidiPrep kit. Le plasmide a été digéré pendant une heure à 37 °C par l'enzyme HindIII (Thermo Fisher) puis migré sur gel de 1 % d'agarose pour vérifier si le plasmide comprend les bonnes constructions. Le plasmide NL4-3_{GFP} a aussi été digéré et migré comme contrôle positif. Le plasmide NL4-3_{GFP} contenant EC5-1 a été cotransfecté avec le plasmide pMD2G (VSV-G) dans des cellules HEK293T à 90 % de confluence avec du polyéthylèneimine PEI (polysciences, Niles, IL)⁷⁸. Pour le contrôle négatif, le plasmide pMD2G (VSV-G) a été transfecté dans les HEK293. Le milieu de culture a été changé 6 heures après la transfection et le virus et le contrôle négatif ont été récoltés 24 h, 48 h et 72 h plus tard, purifiés par centrifugation de 10 min à 3000 rpm et les surnageants contenant le virus ou le contrôle ont été conservé

à -80 °C. La multiplicité d'infection (MOI) du rétrovirus a été déterminée par titration dans des cellules de chats permissives aux virus (CRFK). Pour le virus N-MLV, les plasmides pMD2G (VSV-G), pCNCG (GFP) et pCIG3-N ont été cotransfectés dans des cellules HEK293T à 90 % de confluence comme décrit pour EC5-1 précédemment. La MOI a également été déterminée pour N-MLV dans les CRFK. Dans le cas du virus B-MLV, le plasmide pCIG3-B remplace pCIG3-N et le reste de la technique demeure la même.

2.5 Sensibilité du rétrovirus à TRIM5 α

Pour mesurer la sensibilité de EC5-1_{GFP} à TRIM5 α , les cellules contrôles et les cellules KO de TRIM5 α ont été dénombrées, puis mises en plaque de 96 puits (10 000 cellules par puits). De l'IFN- β recombinant humain a été ajouté (concentration finale de 10 ng/ml) (PeproTech). Seize heures plus tard, les cellules ont été infectées par des dilutions de EC5-1 (MOI variant de 0.1 à 2). Après 48 heures d'incubation, les cellules ont été fixées dans 3 % formaldéhyde (Fisher Scientific) et 10 000 cellules ont été analysées par le FC500 MPL cytometer (Beckman Coulter) en utilisant le programme FCS express 6 software (De novo software). Le pourcentage de cellules GFP positives a été déterminé. Une fois le virus considéré bel et bien restreint dans les cellules, il peut être utilisé pour les traitements cellulaires.

2.6 Traitements des cellules et infections virales

Les cellules THP-1 et Jurkat CAG et T5KO ont été dénombrées, puis mises en plaques de 6 puits (500 000 cellules par puits). Le virus EC5-1 ou du contrôle négatif (PMD2G) ont été ajoutés dans les puits. Dans les THP-1, le MOI est de 0.5 et, dans les Jurkat, le MOI est de 0.05. Le volume des puits a été complété à 2 ml/puits avec du RPMI (250 000 cellules/ml). Les plaques ont été incubées pendant 7 heures. De la bafilomycine A1 (Sigma-Aldrich) ou de l'éthanol 70 % (contrôle) ont été ajoutés dans les puits et l'incubation a été poursuivie pendant une heure. Cent μ l de chaque puit est prélevé et transféré dans une plaque 96 puits pour poursuivre l'infection pendant

40 heures supplémentaires. Les cellules en plaque 6 puits ont été récoltées et lavées au Phosphate Buffred Saline (PBS) (Hyclone). Les cellules ont ensuite été lysées dans un tampon de lyse à 2 % SDS et chauffées à 95 °C pendant 10 minutes. Quarante-huit heures après le début de l'infection, les cellules en plaque 96 puits ont été fixées dans 3 % formaldéhyde (Fisher Scientific) et 10 000 cellules ont été analysées par le FC500 MPL cytometer (Beckman Coulter) en utilisant le programme FCS express 6 software (De novo software). Le pourcentage de cellules GFP positives a été déterminé et devait être d'environ 10 % après 48 h pour déterminer que toutes les cellules étaient exposées au virus au moment de la récolte des cellules. Si 10 % des cellules expriment la GFP après 48 heures d'infection, cela correspond à une exposition de 100 %, puisqu'une seule petite partie des vecteurs sont infectieux (de 1 sur 100 à 1 sur 10 millions dépendamment des études). Cependant, une bonne portion des virions non-infectieux parviennent tout de même à rentrer dans les cellules⁷⁹.

2.7 Analyse par Western-Blot

Au moment désiré, les cellules ont été récoltées, lavées au PBS et lysées dans 30 µl de tampon de lyse (2 % SDS, 0.0625M Tris-HCl). Six µl de chaque échantillon ont été analysés par SDS-PAGE sur gel de 12 % acrylamide (Biorad 1610158) suivi par le transfert sur membrane de nitrocellulose (Biorad) et blocage dans 5 % de lait en poudre. Les anticorps primaires utilisés sont p62 (dilution de 1/5000) (Abcam), LC3 (dilution de 1/5000) (Novus), CALCOCO2 (dilution de 1/1000) (Santa Cruz), NBR1 (dilution de 1/100) (Santa Cruz). L'anticorps anti-bêta-actine conjugué HRP est également utilisé à 1/10000 (Abcam). Les anticorps secondaires utilisés sont l'anti-souris (dilution de 1/3000) (Cell Signaling Technology) et l'anti-lapin (dilution de 1/3000) (Cell Signaling Technology). L'échelle de marqueur moléculaire utilisé est le BLUelf Prestained Protein Ladder (GeneDireX). Les membranes ont été développées en utilisant le SuperSignal West Femto Kit (Thermo Fisher) et les images ont été visualisées en utilisant le Chemidoc imaging system (Biorad). La quantification des western-blot est réalisée avec Image J.

2.8 Analyses statistiques

Toutes les statistiques ont été calculées avec le logiciel R. Les tests utilisés sont Anova ou le pairwise T test. Une différence significative a été considérée pour des valeurs de $p < 0.05$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Validation KO et vecteurs viraux

3.1.1 KO

Afin de démontrer l'importance de TRIM5 α dans le processus d'autophagie basal (sans infection) et lors d'une infection virale, nous avons tout d'abord généré des knockout de TRIM5 α par CRISPR-Cas9 tel que décrit par Méridol *et al.*²³ dans les THP-1 (monocytes) et les Jurkat (lymphocytes T CD4+). Les monocytes et les lymphocytes T CD4+ sont principalement infectés par le VIH, donc ces cellules sont pertinentes à l'étude de ce virus. Dans le cas des cellules knockout pour TRIM5 α (T5KO), l'ARN guide permet de guider l'enzyme Cas9 jusqu'à la séquence ciblée (dans ce cas-ci, le gène de TRIM5 α) et la nucléase peut alors cliver la séquence. Ces cellules n'expriment donc pas la protéine TRIM5 α . Pour ce qui est des cellules contrôles CAG, CRISPR-Cas9 recherche une séquence qui n'existe pas dans les cellules humaines, c'est-à-dire une séquence qui existe uniquement dans les cellules de poulets qui cible un promoteur de β -actine de poulet modifié nommée CAG⁷⁵. Ainsi, CRISPR-Cas9 ne clive pas de séquences d'ADN dans les cellules CAG et l'enzyme Cas9 est produite ce qui en fait un bon contrôle pour nos expériences.

Étant donné que l'anticorps de TRIM5 α ne donne pas de bons résultats par Western-Blot, nous avons validé le knockout de TRIM5 α par restriction de deux virus de la leucémie murine, soit N-MLV et B-MLV (N-tropic et B-tropic) (Figure 3.1).

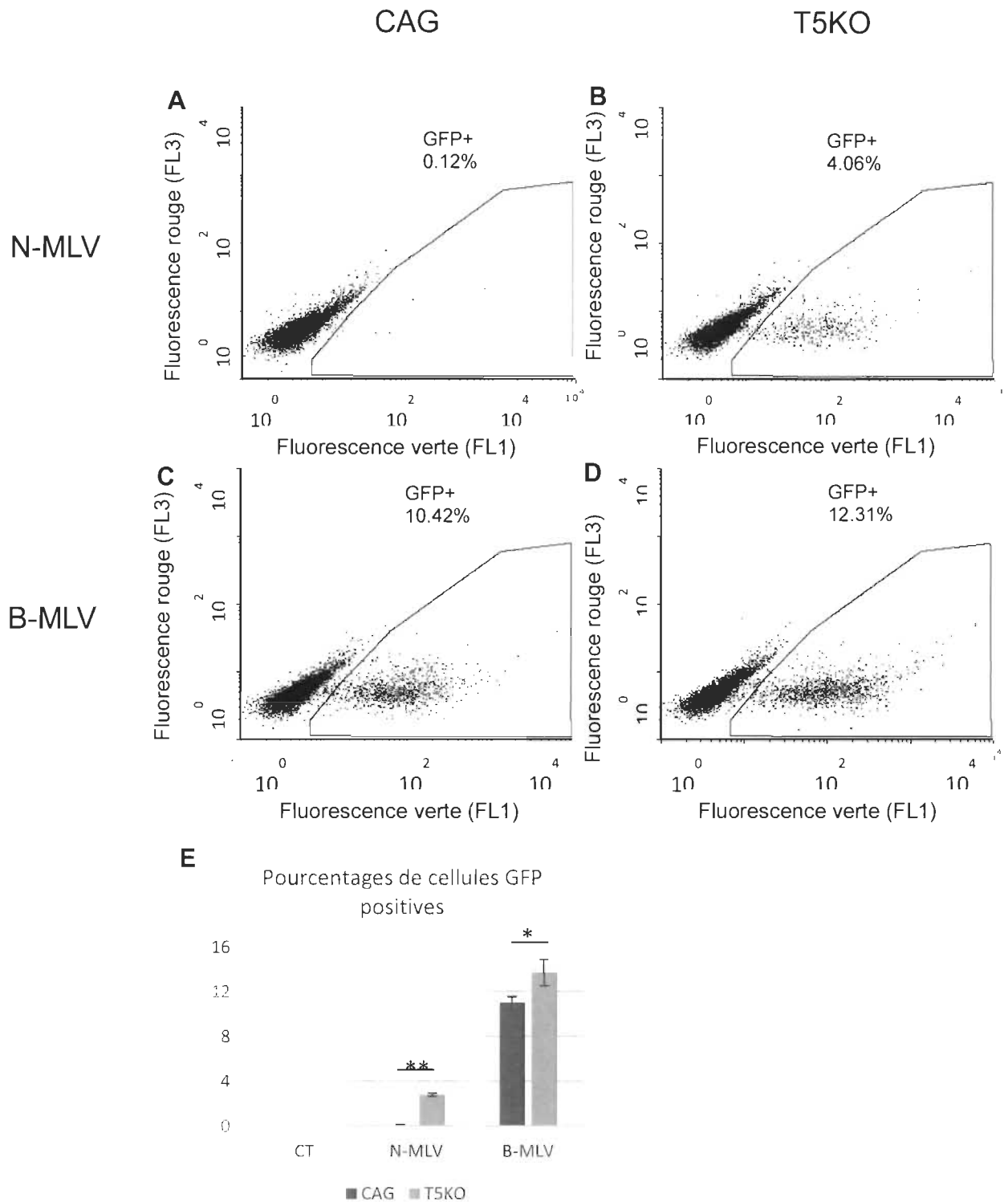


Figure 3.1 Validation du KO de TRIM5alpha en évaluant la restriction de N-MLV pour TRIM5alpha dans les THP-1.

THP-1 infectées par N-MLV ou B-MLV pendant 48 heures puis l'infectivité a été mesurée par FACS (A) THP-1 CAG infectées par

N-MLV sensible à TRIM5 α . (B) THP-1 T5KO infectées par le virus N-MLV. (C) THP-1 CAG infectées par B-MLV non sensible à TRIM5 α . (D) THP-1 T5KO infectées par B-MLV. (E) Quantification de A à D.

N-MLV est restreint par TRIM5 α humain, alors que B-MLV ne l'est pas⁸⁰. En temps normal, TRIM5 α reconnaît la capsidie des virus, mais B-MLV y échappe par une altération d'un acide aminé de sa capsidie⁸⁰. Les particules virales sont produites avec l'enveloppe VSV-G qui contient le génome viral ainsi que le génome permettant d'exprimer la GFP. La protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G) est une protéine de fusion virale qui permet l'entrée du vecteur viral par fusion avec la membrane de la cellule hôte^{81,82}. Dans le cas du virus B-MLV, le génome viral est différent, mais le reste de la technique demeure la même. Ainsi, les vecteurs B-MLV et N-MLV codent tous les deux pour la protéine fluorescente verte (GFP) ce qui permet de dénombrer par analyse par FACS le nombre de cellules infectées après 48 heures d'incubation avec le virus (GFP+ étant la mesure d'infectivité)⁸³.

Lorsque le virus infecte la cellule, s'il n'est pas restreint, il intègre le génome de la cellule et dans ce cas-ci, la protéine GFP (initialement présente dans le génome du virus) est alors produite par la cellule. Les pourcentages de cellules GFP+ présentés sont le pourcentage de cellules infectées après 48 heures d'incubation avec le virus.

N-MLV est restreint par TRIM5 α alors que B-MLV sert de contrôle, puisqu'il n'est pas sensible à TRIM5 α . Dans la figure 1A, les cellules CAG qui expriment TRIM5 α étaient incubées en présence du vecteur N-MLV. On a observé un très faible nombre de cellules GFP+ (0.12 %), soit un très faible nombre de cellules qui ont été infectées, puisque TRIM5 α étant normalement produit dans les cellules permettant de restreindre N-MLV. Par contre, dans la figure 1B, un peu plus de cellules T5KO étaient GFP+ (4.06 %). N-MLV étant sensible à TRIM5 α et la protéine étant absente dans la très grande majorité des cellules considérées T5KO, le virus peut alors infecter les cellules sans être restreint par TRIM5 α . Nous avons remarqué une augmentation de cellules infectées de 33.8 fois en absence de TRIM5 α .

B-MLV n'est pas sensible à TRIM5 α (il sert donc de contrôle), ce qui explique le pourcentage plus élevé de cellules infectées que TRIM5 α soit présent ou non dans les cellules. Donc, dans la figure 1C, plus de cellules étaient GFP+ (10.42 %) dans les CAG et, dans la figure 1D, encore un peu plus de cellules ont été infectées (12.31 %). Cela représente une augmentation de cellules infectées de 1.18 fois en absence de TRIM5 α . On observait donc un peu plus de cellules infectées dans les T5KO, car même si la théorie affirme que B-MLV n'est pas restreint par TRIM5 α , il l'est tout de même très légèrement de façon significative (c'est pourquoi un peu moins de cellules ont été infectées dans les CAG).

Un Western-Blot n'étant pas possible pour l'anticorps de TRIM5 α , cette expérience a donc validé que les cellules T5KO sont bel et bien knockout du gène cible, puisque la déplétion de TRIM5 α a causé une augmentation importante du nombre de cellules infectées par un virus sensible à TRIM5 α (N-MLV), indiquant que TRIM5 α est absent de ces cellules. Le knockout a également été confirmé par TIDE assay dans l'article de Natacha Mérindol²³.

3.1.2 Restriction par du vecteur viral EC5-1TRIM5 α

Une fois le KO validé, nous avons vérifié que le vecteur du VIH pertinent à l'étude, soit EC5-1_{GFP}, est bel et bien restreint par TRIM5 α . Les séquences de la capsidie d'un contrôleur élite EC5-1 (qui est connue par TRIM5 α) ont été amplifiées et insérées dans le plasmide incapable de réplication pNL4-3_{GFP} dans lequel la perte de nucléotides a provoqué un changement de cadre de lecture dans le gène *env* et le gène *gfp* remplace le gène *nef*. Le génome du vecteur produit se retrouve dans une enveloppe VSV-G⁷⁸. Le vecteur du VIH alors produit est nommé simplement EC5-1 pour faciliter l'appellation. Le vecteur viral EC5-1 produit est donc incapable de réplication et exprime la GFP lorsqu'intégré dans le génome de la cellule hôte. Comme pour la figure 3.1, les cellules ont été incubées 48 heures avec le virus, mais cette fois-ci seulement avec le virus à l'étude (EC5-1). Le pourcentage de cellules infectées a été déterminé à plusieurs volumes de virus.

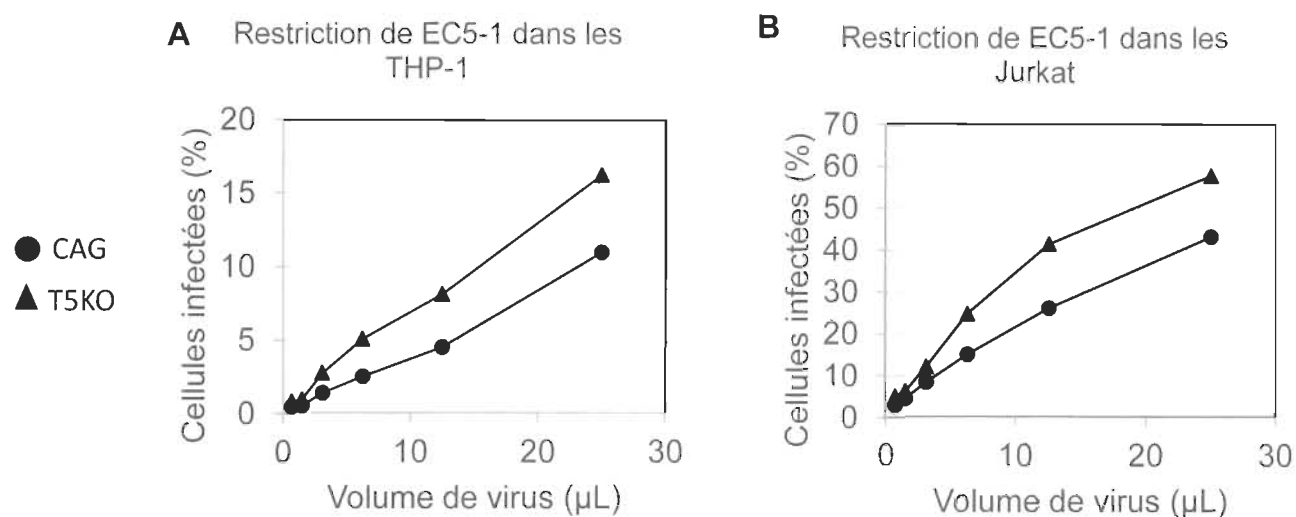


Figure 3.2 Validation de la restriction d'EC5-1 (virus du VIH atténué GFP+) dans les lignées cellulaires.

THP-1 et Jurkat infectées par EC5-1 pendant 48 heures puis l'infectivité a été mesurée par FACS. (A) THP-1 CAG et T5KO infectées par EC5-1. (B) Jurkat CAG et T5KO infectées par EC5-1.

Dans la figure 3.2, les cellules THP-1 et Jurkat ont été infectées par le virus EC5-1 pour valider sa restriction dans les cellules. Dans les deux lignées cellulaires et à divers volumes de virus, les cellules T5KO sont toujours plus infectées par le rétrovirus que les CAG. En effet, EC5-1 étant restreint par TRIM5 α , les cellules CAG exprimant la protéine permettent de restreindre plus efficacement le virus comparativement aux cellules T5KO qui n'expriment pas TRIM5 α et donc ne restreint pas le virus.

Cette figure permet donc de valider que EC5-1 est restreint par TRIM5 α . Le rétrovirus peut alors être utilisé pour étudier le lien entre TRIM5 α , l'autophagie et l'infection virale.

3.2 Régulation de TRIM5 α par autophagie

Dans le but d'étudier l'impact de TRIM5 α sur le flux autophagique, nous avons incubé nos cellules sans virus, puis nous les avons lysées et les lysats ont été utilisés et analysés par western-blot pour étudier plusieurs marqueurs de l'autophagie, soit LC3 qui

est présent dans la membrane de l'autophagosome, p62, NBR1 et CALCOCO2 qui sont des marqueurs sélectifs d'autophagie.

3.2.1 THP-1

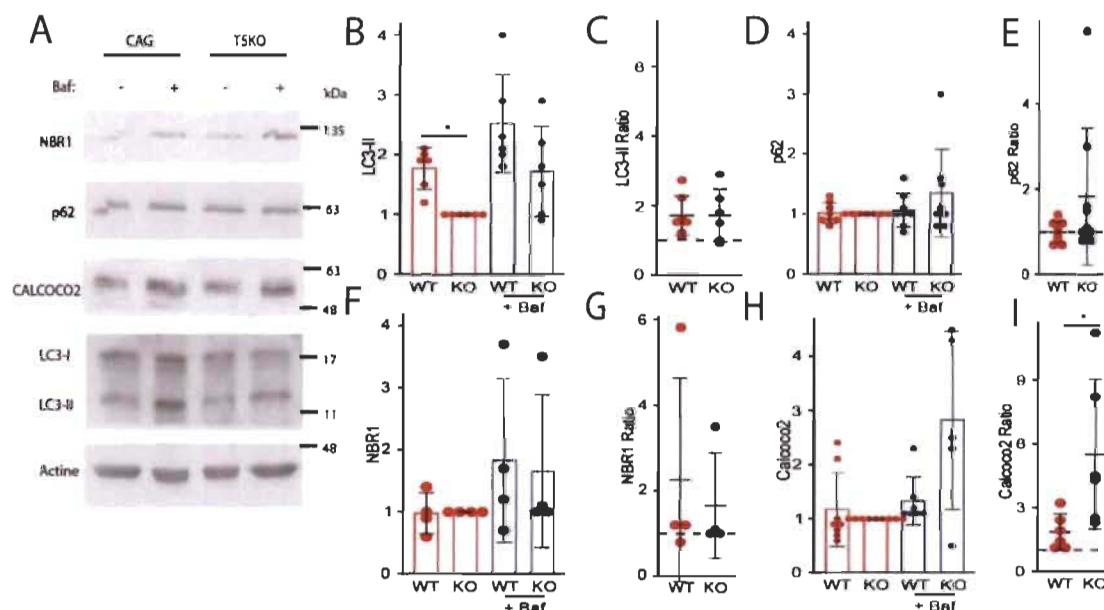


Figure 3.3 Marqueur d'autophagie dans les THP-1 sans infection.

Les THP-1 sont traitées avec la bafilomycine pendant une heure, puis les marqueurs autophagiques sont analysés par Western-Blot. (A) Exemple de Western-Blot dans les THP-1. (B) Quantification du marqueur LC3-II dans les THP-1. (C) Ratio baf+/baf- de LC3-II dans les THP-1. (D) Quantification du marqueur p62 dans les THP-1. (E) Ratio baf+/baf- de p62 dans les THP-1. (F) Quantification du marqueur NBR1 dans les THP-1. (G) Ratio baf+/baf- de NBR1 dans les THP-1. (H) Quantification du marqueur CALCOCO2 dans les THP-1. (I) Ratio baf+/baf- de CALCOCO2 dans les THP-1.

Dans le but de déterminer l'impact de TRIM5 α endogène sur le flux autophagique basal, nous avons quantifié le marqueur le plus étudié dans le domaine de l'autophagie, soit LC3-II dans les cellules contrôles et knockout de TRIM5 α dans les THP-1. La différence du niveau de LC3-II entre les échantillons en présence et en absence d'un inhibiteur lysosomal (bafilomycine A1) représente la quantité de LC3 qui est délivrée aux autophagolysosomes pour dégradation (c'est-à-dire un flux autophagique)⁸⁴. Si l'on bloque la dégradation de LC3-II avec la bafilomycine A1, il s'accumule.

Nous avons observé que le substrat autophagique LC3-II s'accumule en présence de bafilomycine comme le démontre l'exemple de western-blot et la quantification de multiples expériences (Figure 3.3A-B). Le flux autophagique a été calculé en divisant l'intensité de la bande de LC3-II en présence de bafilomycine par celle sans bafilomycine (Figure 3.3C).

Nous avons observé une différence dans le niveau de LC3-II dans les cellules CAG et les cellules knockouts TRIM5 α (T5KO). En effet, le niveau de LC3-II était plus bas dans les T5KO que les cellules CAG dans les mêmes conditions sans aucun traitement (sans virus et sans bafilomycine) dans les THP-1 (Figure 3.3B). Ces résultats suggèrent que la perte de TRIM5 module l'autophagie dans les THP1. Cependant comme une baisse de LC3-II pourrait être la conséquence d'une inhibition de l'initiation de l'autophagie ou d'une augmentation du flux autophagique, nous avons déterminé le flux autophagique dans les cellules contrôles et les cellules knockout de TRIM5 α . Dans la figure 3.3C, le flux autophagique (le ratio de baf+/baf-) est inchangé si l'on compare les cellules CAG avec les cellules T5KO. Le ratio est d'environ 2 dans les deux lignées cellulaires, ce qui veut dire qu'il y a deux fois plus de LC3-II après traitement avec la bafilomycine qu'avant le traitement. Ainsi, lorsque la bafilomycine inhibe le flux autophagique, le LC3-II qui aurait normalement été dégradé dans l'autophagolysosome est récupéré (ce qui est appelé le turnover de LC3⁸⁴). On a observé que le ratio, soit le flux autophagique, était inchangé dans tous les cas dans les THP-1. Cela veut dire que TRIM5 α n'influence pas le flux autophagique de LC3-II. Ainsi, TRIM5 α régule l'initiation de l'autophagie dans les THP-1 et non le flux autophagique si l'on se fie uniquement à ce marqueur.

Dans tous les cas, en ce qui concerne le marqueur LC3-II les observations que nous avons faites dans les THP-1 sont consistantes avec le rôle proposé de TRIM5 α dans la littérature (la littérature suggère que TRIM5 α stimule l'autophagie⁷¹), mais il est difficile de tirer des conclusions en observant un seul marqueur de l'autophagie.

Comme le marqueur LC3 est insuffisant pour tirer des conclusions, nous avons étudié d'autres marqueurs, soit des récepteurs sélectifs de l'autophagie (p62, NBR1 et

CALCOCO2). Nous débutons avec le marqueur p62, car il est la seconde protéine la plus utilisée pour étudier l'autophagie (en plus de LC3).

Lorsque l'on inhibe l'autophagie (dans ce cas-ci, avec la bafilomycine), les niveaux de substrats devraient augmenter puisque leur dégradation dans l'autophagolysosome est arrêtée. Cependant, on n'a observé aucune variation significative dans la figure 3.3D et E. Le niveau de p62 basal et le ratio baf+/baf- de p62 (le flux autophagique de p62) n'est pas affecté par TRIM5 α . De plus, la bafilomycine n'occasionne pas une augmentation du niveau de p62 dans les cellules, ce qui suggère que la protéine p62 ne tient pas un rôle majeur d'autophagie sélective dans les THP-1.

En ce qui concerne p62, les observations sont différentes de ce qui a été observé dans d'autres types cellulaires⁶⁶, puisque p62 n'est pas augmenté par la bafilomycine. Dans nos cellules hématopoïétiques, p62 ne semble pas être dégradé par autophagie, ce qui rend impossible son utilisation comme marqueur de flux autophagique. C'est pourquoi nous avons mesuré les niveaux d'autres marqueurs d'autophagie sélective, soit NBR1 et CALCOCO2.

NBR1 étant un autre récepteur sélectif ayant un rôle similaire à p62, ses niveaux devraient également être augmentés par un inhibiteur de l'autophagie comme la bafilomycine. Par contre, aucune variation significative de NBR1 n'a été observée, puisque les niveaux de NBR1 basal et les ratios baf+/baf- de NBR1 (le flux autophagique de NBR1) ne sont pas affectés par TRIM5 α (Figure 3.3F-G). De plus, la bafilomycine n'a pas occasionné une augmentation du niveau de NBR1 dans les cellules (Figure 3.4F). Tout comme p62, le niveau de NBR1 n'est pas induit par la bafilomycine. Cela suggère que p62 et NBR1 ne sont pas dégradés par le processus de l'autophagie dans les THP-1.

Nous avons donc décidé d'étudier un autre récepteur sélectif, soit CALCOCO2 afin d'observer si le phénomène est le même pour tout ce qui concerne l'autophagie sélective dans ces lignées cellulaires. En utilisant un inhibiteur de l'autophagie, on devrait également causer l'accumulation du récepteur sélectif CALCOCO2. Tout comme nous avons observé pour p62 (Figure 3.3D et E), le niveau basal de CALCOCO2 est inchangé

pour les cellules contrôles CAG et T5KO (Figure 3.3H et I). Cependant, l'ajout de bafilomycine A1 a causé une augmentation importante de CALCOCO2 dans les cellules T5KO chez les THP-1 (Figure 3.3H). De plus, l'absence de TRIM5 α a stimulé le flux autophagique dans les THP-1 indépendamment de l'initiation (Figure 3.3I). L'initiation de l'autophagie serait affectée s'il y avait une augmentation ou diminution entre les niveaux basaux de CALCOCO2 dans les CAG et T5KO, mais l'on observe qu'en l'absence de TRIM5 α et sans bafilomycine, le niveau de CALCOCO2 est le même que dans les CAG. De plus, comme le flux autophagique est significativement augmenté dans les T5KO, cela nous permet de dire que la présence de TRIM5 α module le flux autophagique dans les THP-1.

Suite à ces observations faites dans les THP-1 (monocytes), nous avons voulu vérifier si les phénotypes sont similaires dans une autre lignée hématopoïétique cibles du VIH, soit des lymphocytes T CD4⁺. Nous avons donc étudié le rôle de l'autophagie et de TRIM5 α dans les Jurkat (lymphocytes T CD4⁺).

3.2.2 Jurkat

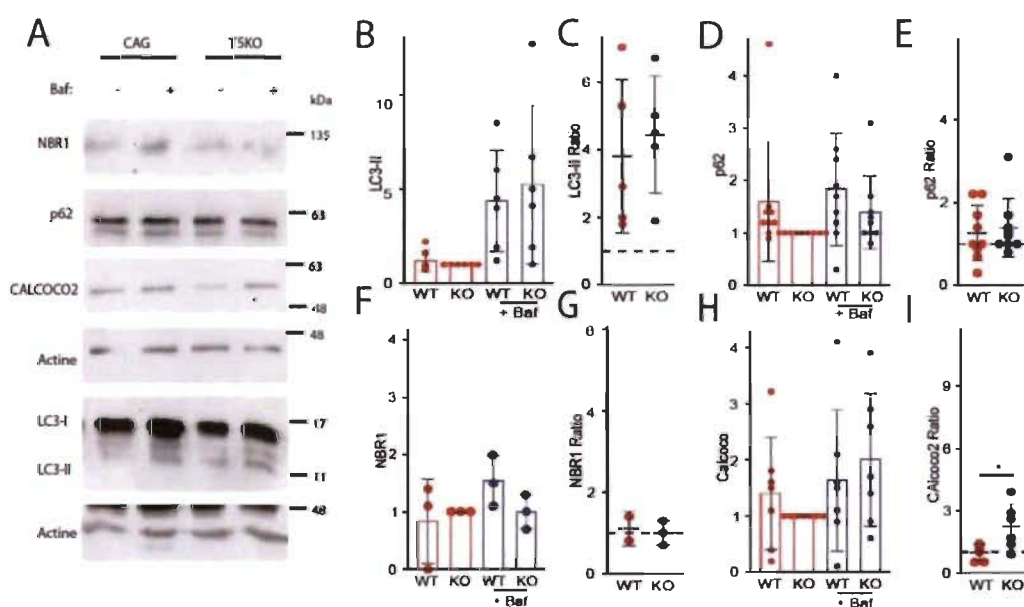


Figure 3.4 Marqueur d'autophagie dans les Jurkat sans infection.

Les Jurkat sont traitées avec la bafilomycine pendant une heure, puis les marqueurs autophagiques sont analysés par Western-Blot. (A) Exemple de

Western-Blot dans les Jurkat. (B) Quantification du marqueur LC3-II dans les Jurkat. (C) Ratio baf⁺/baf⁻ de LC3-II dans les Jurkat. (D) Quantification du marqueur p62 dans les Jurkat. (E) Ratio baf⁺/baf⁻ de p62 dans les Jurkat. (F) Quantification du marqueur NBR1 dans les Jurkat. (G) Ratio baf⁺/baf⁻ de NBR1 dans les Jurkat. (H) Quantification du marqueur CALCOCO2 dans les Jurkat. (I) Ratio baf⁺/baf⁻ de CALCOCO2 dans les Jurkat.

Dans le cas des Jurkat, nous avons également inhibé l'autophagie à l'aide de la bafilomycine dans le but de causer une accumulation du marqueur LC3-II qui peut alors être mesurée et quantifiée. Nous avons observé que TRIM5 α régule l'initiation de l'autophagie dans les THP-1 (Figure 3.3), mais ce n'est pas le cas dans les Jurkat, puisque nous n'avons pas observé de variation du niveau de LC3-II entre les CAG et les T5KO (Figure 3.4B). De plus, le flux autophagique est resté inchangé entre les CAG et les T5KO qu'il y ait présence ou absence de TRIM5 α (Figure 3.4C), puisque le flux autophagique est en moyenne d'environ 4 pour les CAG et les T5KO. Cela veut dire qu'il y a quatre fois plus de LC3-II lorsque le flux autophagique est inhibé par la bafilomycine et que le LC3-II normalement dégradé ne l'est pas, mais nous n'avons pas observé de différence causée par l'absence de TRIM5 α . La perte de TRIM5 α n'affecte donc pas l'autophagie basale ni le flux autophagique si l'on se fie uniquement à ce marqueur dans les Jurkat.

Il est alors pertinent de se demander si les récepteurs sélectifs sont augmentés lorsque l'autophagie est inhibée par la bafilomycine chez les Jurkat. Comme dans le cas des THP-1 (Figure 3.3D), la bafilomycine n'a pas augmenté le niveau de p62 dans ces cellules (Figure 3.4D). Le flux autophagique dans les CAG et T5KO était d'environ 1, ce qui veut dire que la quantité de p62 après l'ajout de bafilomycine était la même que sans bafilomycine (Figure 3.4E). Ainsi, l'inhibition du flux autophagique n'a pas causé l'accumulation de p62 dans ces cellules, donc p62 n'est pas dégradé par le processus de l'autophagie dans les Jurkat. Ainsi, le niveau de p62 basal et le ratio baf⁺/baf⁻ de p62 (le flux autophagique) n'est pas affecté par TRIM5 α (Figure 3.4D et E).

Par la suite, nous avons étudié un autre récepteur sélectif dans les Jurkat, soit NBR1. Nous observons les mêmes résultats que dans les THP-1 (Figure 3.3G et H), soit que

la bafilomycine n'a pas causé d'augmentation du niveau de NBR1 dans les Jurkat (Figure 3.4F) et que le flux autophagique n'est pas affecté par la présence ou l'absence de TRIM5 α (Figure 3.4G).

Les résultats de p62 et NBR1 étant à nouveau différents de ce qui a été observé dans d'autres types cellulaires, nous avons donc étudié CALCOCO2 à nouveau, puisque c'est ce récepteur qui semblait dégradé par autophagie dans les THP-1 et nous avons voulu vérifier si c'est également le cas dans les Jurkat. Pour répondre à la question, nous avons analysé le récepteur CALCOCO2 qui a montré que le niveau basal est inchangé (Figure 3.4H), mais le flux autophagique (Figure 3.4I) est augmenté dans les T5KO par rapport aux CAG. Ainsi, nous avons observé les mêmes résultats que dans les THP-1 (Figure 3.3H et I), soit que le niveau basal de CALCOCO2 est inchangé entre les CAG et les T5KO, mais que le flux autophagique est augmenté dans les T5KO en l'absence de TRIM5 α (Figure 3.4I). Ces observations suggèrent que la présence de TRIM5 α module le flux autophagique dans les THP-1.

Jusqu'à présent, les deux lignées ont en commun que p62 et NBR1 ne sont pas des substrats majeurs de l'autophagie. Pour la suite de mon travail, nous nous sommes donc concentrés uniquement sur les marqueurs LC3 et CALCOCO2 étant donné que ce sont les seules protéines qui ont des variations en présence de bafilomycine ou en absence de TRIM5 α . Une autre ressemblance entre les lignées que nous avons observée est que le flux autophagique de CALCOCO2 est augmenté dans les T5KO par rapport aux CAG. Cependant, nous avons observé des différences au niveau du marqueur LC3 entre les deux lignées. TRIM5 α semble réguler l'initiation de l'autophagie dans les THP-1 si l'on se fie uniquement à LC3-II, mais ce n'est pas le cas dans les Jurkat. Nos observations sont donc différentes d'une lignée cellulaire à l'autre d'où l'intérêt d'étudier les deux lignées cellulaires dans des conditions d'infections.

3.3 Régulations de TRIM5 α par autophagie suite à une infection

Le modèle de la virophagie suggère que TRIM5 α pourrait agir comme récepteur sélectif d'autophagie. Nous avons donc émis l'hypothèse que TRIM5 α est important pour l'initiation de l'autophagie lors d'une infection virale. Pour valider cette hypothèse, nous avons infecté nos cellules et étudié le rôle de TRIM5 α sur l'autophagie. Notre étude a permis d'observer l'interaction possible entre TRIM5 α , l'autophagie et le VIH. Jusqu'à présent, la littérature suggère que TRIM5 α est lié à l'autophagie et que les virus échappent au processus autophagique des cellules hôtes, mais nous nous questionnons sur le rôle du virus par rapport à TRIM5 α et l'autophagie^{56,85}. Ainsi, toujours dans le but d'étudier l'autophagie et TRIM5 α , mais cette fois-ci dans un contexte d'infection par le VIH, nous avons infecté les cellules contrôles et knockouts par le rétrovirus EC5-1_{GFP} ou par le rétrovirus N-MLV_{GFP}. Ces virus sont VSV-G et le gène *Env* est absent (N-MLV ne contient pas le gène *Nef*), réduisant ainsi la possibilité que le vecteur lui-même module l'autophagie, puisqu'il a été suggéré dans la littérature que *Env* et *Nef* inhibent l'autophagie^{86,87}. Pour déterminer l'effet d'une infection sur l'autophagie, nous avons infecté des cellules CAG et T5KO pendant huit heures, dont la dernière heure en présence de bafilomycine pour mesurer le flux autophagique. Les marqueurs autophagiques ont ensuite été analysés et quantifiés séparément dans les THP-1 et Jurkat par Western-Blot pour permettre l'analyse de l'autophagie basale (sans bafilomycine) et du flux autophagique (ratio avec bafilomycine/sans bafilomycine) en présence ou absence de virus.

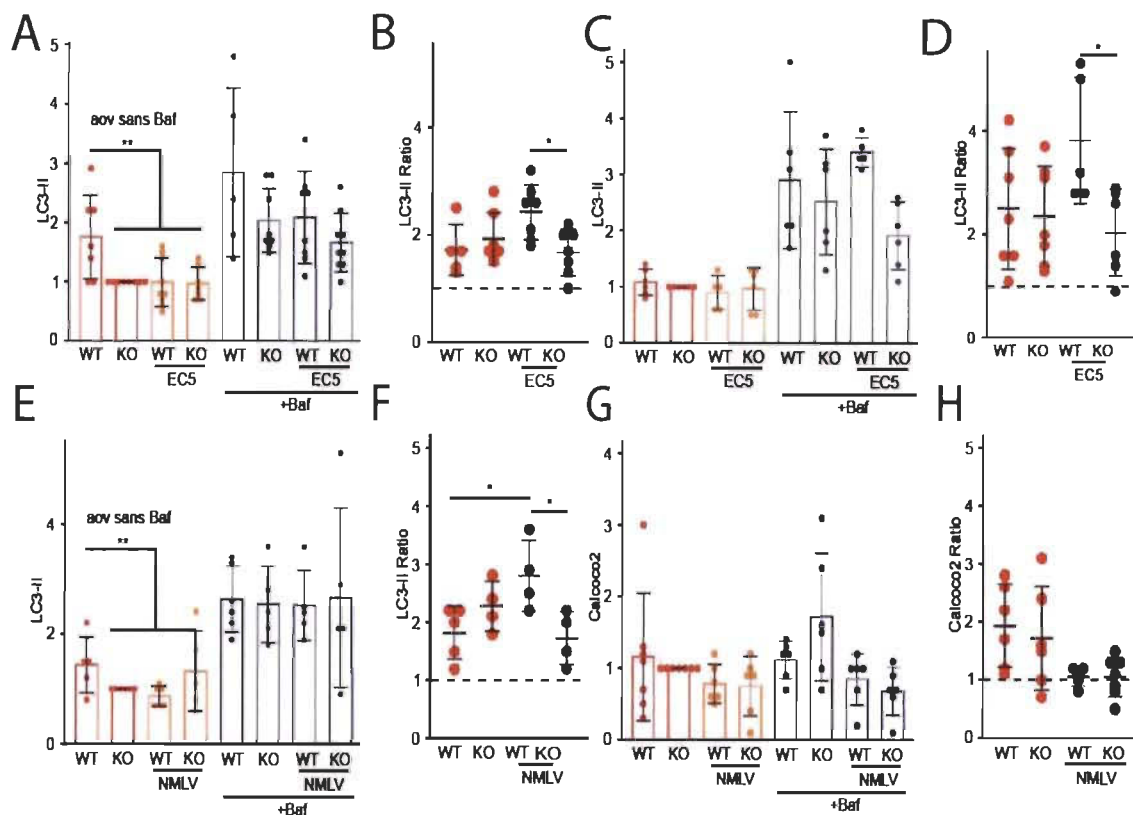


Figure 3.5 Marqueur d'autophagie dans les THP-1 et Jurkat avec infection par EC5-1 et N-MLV.

Les THP-1 et Jurkat sont infectées avec EC5-1 ou N-MLV pendant huit heures au total et traitées avec la bafilomycine pendant la dernière heure, puis les marqueurs autophagiques sont analysés par Western-Blot (A) Quantification du marqueur LC3-II dans les THP-1 avec infection par EC5-1. (B) Ratio baf+/baf- de LC3-II dans les THP-1 avec infection par EC5-1. (C) Quantification du marqueur LC3-II dans les Jurkat avec infection par EC5-1. (D) Ratio baf+/baf- de LC3-II dans les Jurkat avec infection par EC5-1 (E) Quantification du marqueur LC3-II dans les THP-1 avec infection par N-MLV. (F) Ratio baf+/baf- de LC3-II dans les THP-1 avec infection par N-MLV. (G) Quantification du marqueur CALCOCO2 dans les THP-1 avec infection par N-MLV. (H) Ratio baf+/baf- de CALCOCO2 dans les THP-1 avec infection par N-MLV.

Nous avons étudié uniquement LC3-II et CALCOCO2, puisque nous avons déterminé, au préalable, dans un contexte sans infection que p62 et NBR1 ne sont pas des substrats importants de l'autophagie dans les THP-1 et les Jurkat. Pour répondre au second objectif, nous avons infecté les cellules avec des vecteurs viraux, puis analysé les marqueurs pertinents. L'expérience a montré une diminution significative du niveau de LC3-II dans les T5KO en l'absence de virus (Figure 3.5A) (tout comme il était le cas dans

la figure 3.3B). En présence du virus EC5-1, on observe cette même diminution du niveau de LC3-II que ce soit dans les CAG ou dans les T5KO. Ce qui suggère que l'absence de TRIM5 α diminue le niveau basal de LC3-II dans les THP-1 sans virus et que la présence de virus cause cette même diminution dans les THP-1.

En analysant le flux autophagique, l'expérience a montré une augmentation significative du flux autophagique dans les CAG infectées par EC5-1 comparativement aux T5KO infectées (Figure 3.5B). Ces observations suggèrent que le vecteur EC5-1 et TRIM5 α augmentent le flux autophagique et que si l'on perd TRIM5 α , on perd ces effets dans les THP-1. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'infection virale par EC5-1 module l'autophagie d'une façon dépendante de TRIM5 α dans les THP-1.

Pour ce qui est des Jurkat, l'infection a été répétée dans cette lignée cellulaire. L'expérience a montré que les échantillons traités par la bafilomycine sont significativement augmentés (Figure 3.5C). Uniquement le flux autophagique est augmenté significativement dans les CAG infectés comparativement aux T5KO infectés (Figure 3.5D) comme il était également le cas dans les THP-1 (Figure 3.5B). On peut donc émettre la même conclusion que pour les THP-1, c'est-à-dire que l'infection virale par EC5-1 stimule l'autophagie d'une façon dépendante de TRIM5 α dans les Jurkat. Cependant, comparativement aux observations faites dans les THP-1, le niveau basal de LC3-II sans l'ajout de bafilomycine (que ce soit dans les CAG ou dans les T5KO et en présence ou absence de virus) est constant. Cela suggère que ni TRIM5 α ni le virus ne jouent un rôle dans le niveau basal de LC3-II.

Pour confirmer nos résultats obtenus avec EC5-1 et possiblement obtenir de plus grands écarts dans les quantifications, nous avons infecté les cellules avec un virus encore plus restreint par TRIM5 α qu'EC5-1, soit N-MLV. Les cellules CAG et T5KO ont été infectées par le rétrovirus N-MLV_{GFP} pendant huit heures et traitées à la bafilomycine pendant la dernière heure tout comme c'était le cas avec EC5-1.

LC3-II a été quantifié et analysé suite à l'infection par N-MLV. Nous avons observé la même variation dans le cas d'infections par EC5-1, c'est-à-dire qu'on a observé

une diminution du niveau de LC3-II dans les cellules T5KO et en présence de virus (Figure 3.5E). Dans la figure 3.5F, le flux autophagique de LC3-II est augmenté entre les cellules CAG et les cellules CAG infectées par N-MLV. De plus, le flux autophagique est diminué entre CAG infectées par N-MLV et T5KO infectées par N-MLV. Ces résultats suggèrent que l'absence de TRIM5 α et/ou la présence de virus diminuent le niveau basal de LC3-II et que l'infection virale par N-MLV stimule l'autophagie d'une façon dépendante de TRIM5 α dans les THP-1.

En ce qui concerne CALCOCO2, la figure 3.5G a montré que le niveau basal ne varie pas lorsqu'infecté par N-MLV. Cependant, ces résultats diffèrent des observations faites dans des conditions sans infection (Figure 3.3H). Ces observations pourraient être causées par le fait que le temps d'incubation n'est pas le même. Dans le cas sans infection, les cellules sont incubées seulement une heure alors que lors d'une infection, nous avons incubé les cellules pour un total de huit heures. Il est donc possible que la durée de l'expérience ait un impact sur l'autophagie dont nous ignorons les causes. En ce qui concerne le flux autophagique, la figure 3.5H a montré que le flux autophagique de CALCOCO2 est constant en l'absence ou présence de virus et de TRIM5 α . Encore une fois, ces observations sont différentes de ce qui a été précédemment observé dans d'autres lignées cellulaires^{66,88}. Nos infections virales par N-MLV n'ont pas affecté l'expression du marqueur CALCOCO2 et l'absence de TRIM5 α non plus. De plus, la bafilomycine n'a pas causé d'accumulation de CALCOCO2 comparativement à ce que nous avons observé précédemment (Figure 3.3H et I).

Si l'on se fie uniquement à LC3-II, les résultats suggèrent que, dans le cas d'une infection, TRIM5 α stimule le flux autophagique et qu'en l'absence de TRIM5 α , on observe une diminution significative du flux autophagique. Cependant, si l'on observe CALCOCO2, dans le cas d'une infection, le flux autophagique du récepteur est inchangé. Ces résultats suggèrent que TRIM5 α stimule l'initiation (uniquement dans les THP-1) et le flux autophagique (dans les THP-1 et Jurkat) dans une situation d'infection, mais qu'il ne régule pas les récepteurs autophagiques sélectifs.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 Discussion

Le SIDA est l'une des plus grandes pandémies connues dans l'histoire de l'homme³. À ce jour, aucun traitement permettant de guérir du VIH n'a été découvert. Des études récentes ont fait des progrès dans l'exploration des rôles de l'autophagie dans l'infection par le VIH^{41,68,89} et de l'implication possible de TRIM5 α ⁶⁹. L'un des rôles connus de TRIM5 α est de lier les rétrovirus entrants et d'entraîner leur dégradation par diverses méthodes³⁸. Cependant, le TRIM5 α endogène humain ne limite pas le VIH-1 de façon significative⁹⁰. Malgré cela, des chercheurs ont mis en lumière le fait que, chez certains progressseurs lents, la capsid du rétrovirus présente des mutations qui la rendent plus sensible à TRIM5 α ²⁶. Les recherches sur TRIM5 α sont donc indispensables pour peut-être trouver un moyen de rendre la protéine plus efficace dans son rôle de reconnaître la capsid des rétrovirus et d'induire la dégradation du VIH-1. Actuellement, les rôles de TRIM5 α et de l'autophagie dans des cellules infectées par le VIH ne sont pas tous identifiés, et encore moins compris. Les recherches sur TRIM5 α sont donc indispensables pour trouver un moyen de rendre la protéine plus efficace dans son rôle qui consiste à reconnaître la capsid des rétrovirus et d'induire la dégradation du VIH-1. Toutes ces recherches pourraient ainsi mener à la découverte d'une nouvelle approche antivirale pour lutter de façon préventive ou précoce contre le VIH-1 ou d'autres virus. Cette nouvelle approche antirétrovirale pourrait permettre de réduire la quantité de virus chez les patients, d'améliorer leur qualité de vie et d'augmenter leur espérance de vie.

Dans le cadre de mon projet, nous avons émis l'hypothèse que TRIM5 α est important pour l'initiation de l'autophagie lors d'une infection virale. Pour confirmer notre hypothèse, nous avons divisé le projet en deux objectifs soit : de déterminer l'impact de TRIM5 α endogène sur le flux autophagique basal et de déterminer le rôle de TRIM5 α

dans l'autophagie en présence de vecteurs viraux. Nos résultats démontrent que TRIM5 α joue un rôle dans l'initiation de l'autophagie ou/et dans la régulation du flux autophagique dépendamment de la lignée cellulaire. De plus, nos résultats suggèrent que les rétrovirus testés (EC5-1 et N-MLV) stimulent l'initiation et le flux autophagique d'une manière dépendante de TRIM5 α .

4.1.1 TRIM5 α régule l'initiation de l'autophagie dans les THP-1 et régule le flux autophagique

Pour répondre au premier objectif qui était de déterminer le rôle de TRIM5 α sur le flux autophagique basal, nous avons analysé par western-blot différents marqueurs autophagiques lorsque l'autophagie est inhibée et en absence de TRIM5 α . Dans les THP-1, en absence de TRIM5 α , il y a moins de LC3-II si l'on compare avec les cellules contrôles CAG qui expriment TRIM5 α . On observe la même diminution de LC3-II dans les cellules CAG et les cellules KO en présence de rétrovirus. Le flux autophagique n'est pas affecté, donc cela suggère seulement une diminution de l'initiation du processus autophagique, soit une inhibition de la formation de l'autophagosome (Figure 3.3). Mais nous n'avons pas observé cette variation du niveau de LC3-II entre les CAG et les T5KO chez les Jurkat (Figure 3.4). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que LC3-II est régulé de base au niveau transcriptionnel, donc il pourrait y avoir un effet transcriptionnel différent d'un type cellulaire à l'autre. Une autre explication à ce phénomène est qu'il pourrait y avoir une augmentation de l'initiation de l'autophagie dans les cellules contrôles CAG de THP-1 ou une inhibition de l'initiation de l'autophagie dans les T5KO de THP-1. Il serait aussi possible que TRIM5 α interagisse avec LC3-II dans les THP-1, c'est-à-dire que l'absence de TRIM5 α bloque la transcription de LC3 ou qu'à l'inverse la présence de TRIM5 α stimule la transcription de LC3 qui est par la suite convertie en LC3-II (Figure 4.1). Une autre différence notable que nous avons observée est celle du flux autophagique basal qui varie entre les THP-1 et les Jurkat. Le flux autophagique dans les THP-1 était de 1,7 (écart type de 0,6) alors qu'il était de 3,8 (écart type de 2,3) dans les Jurkat. En effet, en ajoutant la bafilomycine, nous avons observé une plus grande augmentation du niveau de LC3-II dans les Jurkat que dans les

THP-1 d'où le flux autophagique plus élevé dans les Jurkat. Il est donc possible que le flux autophagique soit variable dépendamment de la lignée hématopoïétique, soit les monocytes (THP-1) versus les lymphocytes T CD4+ (Jurkat) dans notre étude. Cela pourrait potentiellement expliquer la différence d'effet de TRIM5 α sur l'initiation de l'autophagie entre les deux lignées cellulaires. CALCOCO2 est aussi affecté par TRIM5 α . En effet, nous avons observé que le flux autophagique est significativement augmenté dans les T5KO indépendamment de l'initiation, puisque les niveaux basaux de CALCOCO2 n'étaient pas affectés. Ainsi, à l'inverse, la présence de TRIM5 α inhibe le flux autophagique dans ces cellules (Figure 4.1).

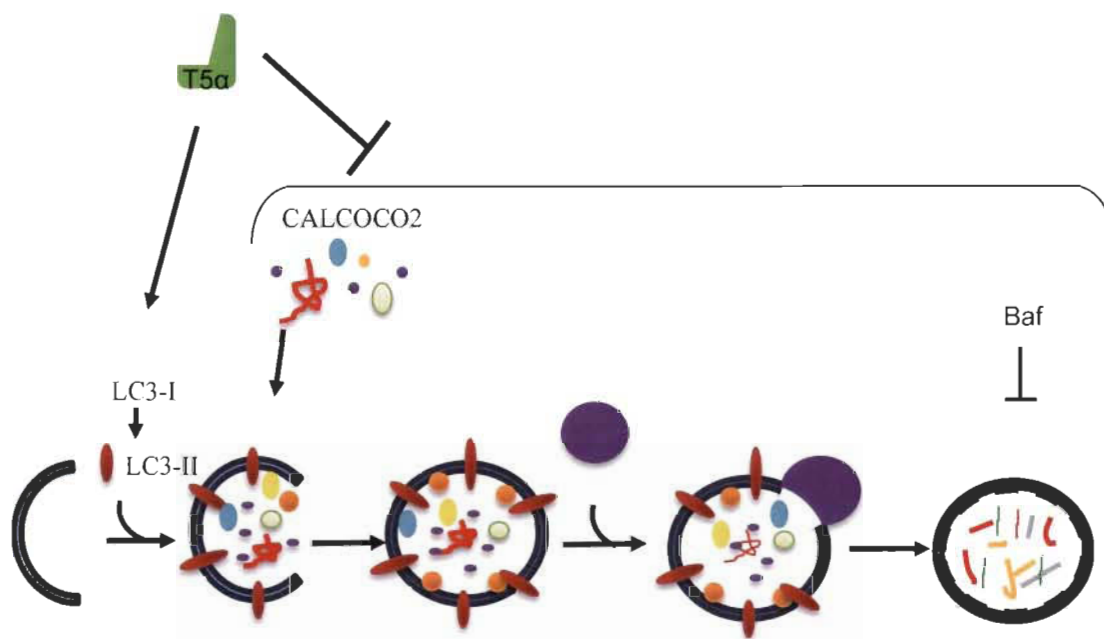


Figure 4.1 Schéma de l'autophagie dans les THP-1.

Davantage d'expériences doivent être réalisées pour permettre de bien comprendre pourquoi le niveau de LC3-II dans l'autophagie basale est inchangé dans les Jurkat et expliquer les différences observées entre les deux lignées en ce qui concerne l'autophagie et le rôle de TRIM5 α .

4.1.2 Les rétrovirus testés régulent l'initiation et la régulation du flux autophagique dépendamment de TRIM5 α

Dans le cas d'une infection, nos résultats suggèrent que les rétrovirus testés sensibles à TRIM5 α , soit EC5-1 et N-MLV, stimulent l'initiation de l'autophagie et le flux autophagique dépendamment de TRIM5 α (Figure 4.2). En effet, nous avons démontré que TRIM5 α affecte l'autophagie de base et celle induite par des rétrovirus sensibles à TRIM5 α (Figure 3.5), puisque nous observons une diminution significative du niveau de LC3-II dans les T5KO en l'absence de virus et l'on observe cette même diminution du niveau de LC3-II en présence de virus. Nous avons également montré que TRIM5 α est requis pour l'activation du flux autophagique par des rétrovirus (Figure 3.5), puisque le flux autophagique est augmenté dans les cellules contrôles CAG infectées comparativement aux cellules T5KO.

Par rapport aux résultats disponibles dans la littérature, nos données sont nouvelles, mais vont dans le même sens que le modèle proposé de la virophagie^{67,68}, puisque nous suggérons que le virus module l'autophagie dépendamment de TRIM5 α . Il est reconnu que les virus tentent d'échapper au processus d'autophagie ou d'en prendre le contrôle pour assurer leur survie⁴¹. Les trois rôles plus connus de TRIM5 α afin d'éliminer les rétrovirus entrants sont la dégradation médiée par le protéasome, l'accélération de la décapsidation et l'altération du transport intracellulaire. Au cours des dernières années, le rôle de TRIM5 α dans la stimulation de l'autophagie a été proposé^{21,32}, mais peu exploré et nos résultats sont prometteurs puisqu'ils supportent ce rôle potentiel.

Dans les lignées hématopoïétiques (cellules à l'origine des cellules sanguines, soit les lignées myéloïdes et lymphocytaires), nous avons démontré que ni la protéine p62 ni la protéine NBR1 ne sont des substrats autophagiques majeurs dans ces cellules même dans le cas d'une infection. Cela ne correspond pas aux interactions entre p62 et TRIM5 α observées dans d'autres lignées cellulaires. Il est possible que p62 ne soit pas un substrat autophagique majeur dans ces cellules, soit les lignées myéloïdes et lymphocytaires. La littérature démontre que p62 et NBR1 peuvent interagir ensemble, mais que dans des cellules déficientes p62, NBR1 peut tout de même exercer son rôle de récepteur sélectif

d'autophagie^{54,91}. Cependant, dans notre situation même si p62 n'est pas un substrat de l'autophagie dans ces cellules, NBR1 ne vient pas compenser son rôle.

Nos résultats avec CALCOCO2 sont en contradiction de nos résultats observés avec LC3-II, puisque les niveaux de CALCOCO2 ne sont pas affectés par l'absence de TRIM5 α ni par l'infection par un vecteur du VIH. Cette observation pourrait s'expliquer par un changement dans ce qui est dégradé, c'est-à-dire qu'il est impliqué en absence de virus comme démontré précédemment, mais qu'il n'est pas un substrat important en présence de virus. Une étude a suggéré que CALCOCO2 pourrait être inhibé par le virus de la peste porcine classique⁸⁸. Nous n'avons pas observé cette inhibition avec le vecteur du VIH, mais il n'est pas impossible que ce virus ait un effet différent sur CALCOCO2 dans les cellules pertinentes à l'étude du VIH. Peu de recherches ont été effectuées sur le VIH et l'étude de l'autophagie avec des marqueurs autophagiques autres que LC3 et p62 qui sont les plus utilisés.

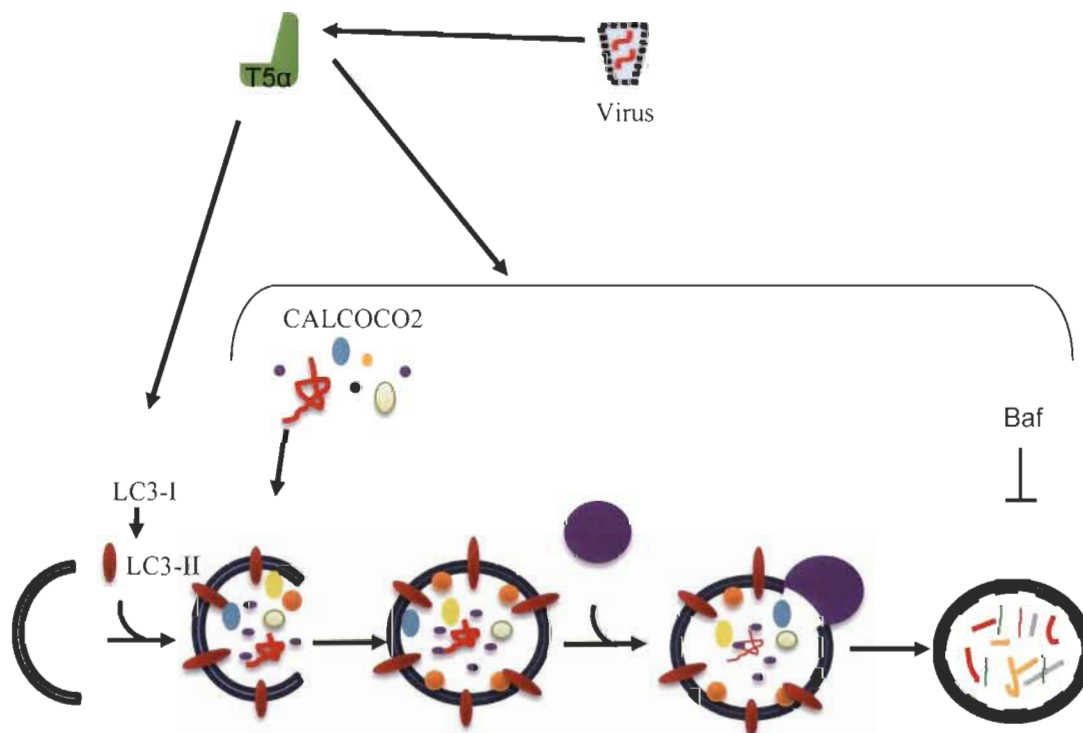


Figure 4.2 Schéma de l'autophagie avec infection par EC5-1 dans les THP-1.

Il serait pertinent d'étudier d'autres marqueurs sélectifs d'autophagie pour voir si ceux-ci sont des substrats autophagiques majeurs dans les monocytes et lymphocytes. Les marqueurs LC3 et p62 sont ceux les plus étudiés dans un contexte de flux autophagique, mais il pourrait être intéressant de voir si d'autres marqueurs sélectifs d'autophagie comme l'optineurine (OPTN), TAX1BP1, etc., sont plus impliqués et compensent pour le rôle de p62 dans d'autres lignées cellulaires comme les HeLa⁷².

Notre projet présente certaines limitations. Nous avons tenté d'induire le flux autophagique pour déterminer le rôle potentiel de TRIM5 α dans le cadre d'une induction de l'autophagie, mais sans succès. Nous avons essayé une privation en nutriments avec le milieu de culture EBSS (Earle's balanced salt solution) comme il est réalisé dans diverses études pour observer l'effet sur LC3-II⁹². Cependant, nos cellules éclataient au moment de la récolte par centrifugation. Même à de faibles centrifugations, le stress subit aux cellules était trop important et entraînait rapidement la mort des cellules lors de la récolte. Cette expérience a été répétée avec de plus courts temps de traitements, mais sans succès. Nous avons alors essayé une autre méthode, soit celle de l'induction de l'autophagie avec la Torin 1⁹³. La Torin 1 avait peu d'effets sur nos cellules, même en testant à diverses concentrations et avec divers temps de traitements. L'induction de l'autophagie a donc été abandonnée pour notre projet, mais pourrait être relancée dans le futur avec d'autres produits pharmaceutiques comme Tat-beclin 1⁹⁴. Notre projet est également limité par le choix de nos lignées cellulaires. Nous n'avons pas utilisé des cellules primaires (macrophages et lymphocytes) qui seraient plus pertinentes à l'étude du VIH. Étant donné que nous avons choisi d'étudier le rôle de TRIM5 α par knockout du gène, cela ne serait pas possible dans des cellules primaires qui ont une courte durée de vie. Par contre, l'utilisation de knockout par CRISPR-Cas9 génère d'autres potentiels problèmes. Lorsque produit de façon excessive, l'ARN guide pourrait avoir des effets hors cibles⁹⁵, mais pour éviter cela, nous avons fréquemment jeté et décongelé de nouvelles cellules pour éviter cette non-spécificité à long terme. Un aspect important à prendre en considération pour le projet est le fait que notre vecteur pourrait moduler l'autophagie malgré le fait que les gènes *env* et *nef* ne sont pas exprimés, puisqu'il est possible que l'activation de différentes voies de l'immunité par le vecteur active l'autophagie sans

impliquer TRIM5 α . Le sujet de l'immunité innée devrait être étudié pour vérifier s'il a un impact sur les résultats que nous avons observé. En plus des vecteurs sensibles à TRIM5 α utilisés, il serait pertinent d'étudier des vecteurs non-sensibles à TRIM5 α tels que B-MLV ou NL4-3 avec capsid sauvage. Ainsi, nous pourrions vérifier si la modulation de l'activité autophagique est vraiment reliée à la restriction par TRIM5 α . On s'attendrait à ce qu'il n'y ait pas de modulation de l'autophagie qui dépend de TRIM5 α , donc pas de différence entre les cellules KO et CAG, mais l'hypothèse reste à confirmer dans des expériences futures.

4.1.3 Perspectives

À plus long terme, nos résultats apportent un nouvel intérêt pour le processus d'autophagie pour lutter contre les rétrovirus. Toutes les recherches effectuées sur l'autophagie et le VIH pourraient peut-être, un jour, permettre de développer un traitement pour guérir du VIH ou pour prévenir les infections aux rétrovirus. Mes résultats suggèrent que le VIH inhibe l'autophagie. Donc si un traitement permettant de stimuler l'effet de TRIM5 α sur le virus afin de diminuer la quantité de virus était développé et était administré de façon précoce aux patients ayant été exposés au VIH, cela pourrait agir comme un traitement préventif pour prévenir le risque d'infection par le VIH⁹⁶. De plus, si le traitement était administré de façon précoce aux patients séropositifs, il pourrait permettre d'améliorer la santé des personnes atteintes en réduisant la quantité de virus dans leur sang, en réduisant le risque qu'ils transmettent le VIH à d'autres individus et en réduisant le risque de progresser vers le SIDA⁹⁷. Il est donc très important de continuer les recherches sur TRIM5 α et l'autophagie, puisqu'un traitement au VIH aurait de nombreux bénéfices pour les patients.

4.2 Conclusions

Mes travaux de maîtrise s'inscrivent dans un projet de recherche plus large des Drs Marc Germain et Lionel Berthoux visant à étudier l'interaction entre TRIM5 α et

l'autophagie dans l'activation de la réponse immunitaire innée au VIH-1. Mes recherches concernent plus particulièrement le lien entre TRIM5 α , l'autophagie et le VIH-1, sans étudier de la réponse immunitaire innée. Mes résultats suggèrent que TRIM5 α tient un rôle dans l'initiation de l'autophagie ou/et dans la régulation du flux autophagique dépendamment de la lignée cellulaire et que les rétrovirus testés stimulent l'initiation et le flux autophagique d'une manière dépendante de TRIM5 α . Tous ces résultats vont dans le même sens que le quatrième rôle suggéré de TRIM5 α , soit de stimuler l'autophagie. Encore peu d'études ont été faites afin d'approfondir ce rôle et son implication afin d'éliminer ou restreindre des virus entrants. Ce projet a donc permis d'approfondir les connaissances sur ce quatrième rôle de TRIM5 α .

Il serait pertinent de poursuivre les recherches dans d'autres lignées cibles du VIH, soit des macrophages et des cellules dendritiques. Tout comme il serait également pertinent de vérifier si les observations faites dans les THP-1 et Jurkat s'appliquent à d'autres monocytes et lymphocytes T CD4+. D'autres recherches pourraient également se pencher sur la question de vecteurs du VIH non-restreints par TRIM5 α et de comparer les résultats obtenus avec les nôtres.

En temps normal, le VIH échappe à la reconnaissance par TRIM5 α sauf chez certains progressseurs lents chez qui TRIM5 α reconnaît la capsid virale mutée et leur permet d'avoir une charge virale basse ou indétectable sans la prise d'aucun traitement. Il est donc pertinent de comprendre comment la stimulation de l'autophagie via TRIM5 α par le VIH contribue à son élimination dans la cellule et toutes les recherches sur le sujet dans le futur permettront de comprendre mieux ce rôle. L'étude de cette nouvelle voie thérapeutique pourrait possiblement permettre de développer un traitement pour guérir du VIH.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Centers for Disease, C. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**, 250-252 (1981).
- 2 Barre-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871, doi:10.1126/science.6189183 (1983).
- 3 Becerra, J. C., Bildstein, L. S. & Gach, J. S. Recent Insights into the HIV/AIDS Pandemic. *Microb Cell* **3**, 451-475, doi:10.15698/mic2016.09.529 (2016).
- 4 German Advisory Committee Blood, S. A. o. P. T. b. B. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemother* **43**, 203-222, doi:10.1159/000445852 (2016).
- 5 Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoj, B. & Butto, S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita* **46**, 5-14, doi:10.4415/ANN_10_01_02 (2010).
- 6 Vogt, V. M. in *Retroviruses* (eds J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus) (1997).
- 7 Seelamgari, A. *et al.* Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci* **9**, 2388-2413, doi:10.2741/1403 (2004).
- 8 Freed, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* **13**, 484-496, doi:10.1038/nrmicro3490 (2015).
- 9 Musumeci, D., Riccardi, C. & Montesarchio, D. G-Quadruplex Forming Oligonucleotides as Anti-HIV Agents. *Molecules* **20**, 17511-17532, doi:10.3390/molecules200917511 (2015).
- 10 Lee, B., Sharron, M., Montaner, L. J., Weissman, D. & Doms, R. W. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5215-5220, doi:10.1073/pnas.96.9.5215 (1999).
- 11 Goodsell, D. S. Illustrations of the HIV life cycle. *Curr Top Microbiol Immunol* **389**, 243-252, doi:10.1007/82_2015_437 (2015).

- 12 Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A. & Mackay, C. R. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1925-1930, doi:10.1073/pnas.94.5.1925 (1997).
- 13 Engelman, A. & Cherepanov, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol* **10**, 279-290, doi:10.1038/nrmicro2747 (2012).
- 14 Vidya Vijayan, K. K., Karthigeyan, K. P., Tripathi, S. P. & Hanna, L. E. Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections. *Front Immunol* **8**, 580, doi:10.3389/fimmu.2017.00580 (2017).
- 15 Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. & Xia, B. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* **2012**, 925135, doi:10.1155/2012/925135 (2012).
- 16 Leon, B. & Ardavin, C. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol Cell Biol* **86**, 320-324, doi:10.1038/icb.2008.14 (2008).
- 17 Campbell, J. H., Hearps, A. C., Martin, G. E., Williams, K. C. & Crowe, S. M. The importance of monocytes and macrophages in HIV pathogenesis, treatment, and cure. *AIDS* **28**, 2175-2187, doi:10.1097/QAD.0000000000000408 (2014).
- 18 Wong, M. E., Jaworowski, A. & Hearps, A. C. The HIV Reservoir in Monocytes and Macrophages. *Front Immunol* **10**, 1435, doi:10.3389/fimmu.2019.01435 (2019).
- 19 Kemnic, T. R. & Gulick, P. G. in *StatPearls* (2020).
- 20 Baker, B. M., Block, B. L., Rothchild, A. C. & Walker, B. D. Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. *Expert Opin Biol Ther* **9**, 55-69, doi:10.1517/14712590802571928 (2009).
- 21 Merindol, N. & Berthoux, L. Restriction Factors in HIV-1 Disease Progression. *Curr HIV Res* **13**, 448-461 (2015).
- 22 Pereyra, F. *et al.* Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J Infect Dis* **200**, 984-990, doi:10.1086/605446 (2009).
- 23 Merindol, N. *et al.* HIV-1 capsids from B27/B57+ elite controllers escape Mx2 but are targeted by TRIM5alpha, leading to the induction of an antiviral state. *PLoS Pathog* **14**, e1007398, doi:10.1371/journal.ppat.1007398 (2018).

- 24 Kikuchi, T. *et al.* Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. *J Virol* **89**, 4992-5001, doi:10.1128/JVI.03464-14 (2015).
- 25 Riveira-Munoz, E. *et al.* Increased expression of SAMHD1 in a subset of HIV-1 elite controllers. *J Antimicrob Chemother* **69**, 3057-3060, doi:10.1093/jac/dku276 (2014).
- 26 Battivelli, E. *et al.* Gag cytotoxic T lymphocyte escape mutations can increase sensitivity of HIV-1 to human TRIM5alpha, linking intrinsic and acquired immunity. *J Virol* **85**, 11846-11854, doi:10.1128/JVI.05201-11 (2011).
- 27 Granier, C. *et al.* Pressure from TRIM5alpha contributes to control of HIV-1 replication by individuals expressing protective HLA-B alleles. *J Virol* **87**, 10368-10380, doi:10.1128/JVI.01313-13 (2013).
- 28 Gurdasani, D. *et al.* A systematic review of definitions of extreme phenotypes of HIV control and progression. *AIDS* **28**, 149-162, doi:10.1097/QAD.000000000000049 (2014).
- 29 Shibata, R., Sakai, H., Kawamura, M., Tokunaga, K. & Adachi, A. Early replication block of human immunodeficiency virus type 1 in monkey cells. *J Gen Virol* **76 (Pt 11)**, 2723-2730, doi:10.1099/0022-1317-76-11-2723 (1995).
- 30 Ganser-Pornillos, B. K. & Pornillos, O. Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5. *Nat Rev Microbiol* **17**, 546-556, doi:10.1038/s41579-019-0225-2 (2019).
- 31 Imam, S. *et al.* TRIM5alpha Degradation via Autophagy Is Not Required for Retroviral Restriction. *J Virol* **90**, 3400-3410, doi:10.1128/JVI.03033-15 (2016).
- 32 Mandell, M. A. *et al.* TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Dev Cell* **30**, 394-409, doi:10.1016/j.devcel.2014.06.013 (2014).
- 33 Kutluay, S. B., Perez-Caballero, D. & Bieniasz, P. D. Fates of retroviral core components during unrestricted and TRIM5-restricted infection. *PLoS Pathog* **9**, e1003214, doi:10.1371/journal.ppat.1003214 (2013).
- 34 Tanaka, K. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **85**, 12-36, doi:10.2183/pjab.85.12 (2009).
- 35 Diaz-Griffero, F. *et al.* Rapid turnover and polyubiquitylation of the retroviral restriction factor TRIM5. *Virology* **349**, 300-315, doi:10.1016/j.virol.2005.12.040 (2006).

- 36 Rold, C. J. & Aiken, C. Proteasomal degradation of TRIM5alpha during retrovirus restriction. *PLoS Pathog* **4**, e1000074, doi:10.1371/journal.ppat.1000074 (2008).
- 37 Xu, L. *et al.* BTBD1 and BTBD2 colocalize to cytoplasmic bodies with the RBCC/tripartite motif protein, TRIM5delta. *Exp Cell Res* **288**, 84-93, doi:10.1016/s0014-4827(03)00187-3 (2003).
- 38 Stremlau, M. *et al.* Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5514-5519, doi:10.1073/pnas.0509996103 (2006).
- 39 Wu, X., Anderson, J. L., Campbell, E. M., Joseph, A. M. & Hope, T. J. Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7465-7470, doi:10.1073/pnas.0510483103 (2006).
- 40 Deter, R. L. & De Duve, C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol* **33**, 437-449, doi:10.1083/jcb.33.2.437 (1967).
- 41 Nardacci, R. *et al.* Role of autophagy in HIV infection and pathogenesis. *J Intern Med* **281**, 422-432, doi:10.1111/joim.12596 (2017).
- 42 Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* **221**, 3-12, doi:10.1002/path.2697 (2010).
- 43 Huang, J. & Klionsky, D. J. Autophagy and human disease. *Cell Cycle* **6**, 1837-1849, doi:10.4161/cc.6.15.4511 (2007).
- 44 Yang, Z. & Klionsky, D. J. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* **335**, 1-32, doi:10.1007/978-3-642-00302-8_1 (2009).
- 45 Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* **21**, 2861-2873, doi:10.1101/gad.1599207 (2007).
- 46 Zaffagnini, G. & Martens, S. Mechanisms of Selective Autophagy. *J Mol Biol* **428**, 1714-1724, doi:10.1016/j.jmb.2016.02.004 (2016).
- 47 Lippai, M. & Low, P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *Biomed Res Int* **2014**, 832704, doi:10.1155/2014/832704 (2014).

- 48 Mancias, J. D. & Kimmelman, A. C. Mechanisms of Selective Autophagy in Normal Physiology and Cancer. *J Mol Biol* **428**, 1659-1680, doi:10.1016/j.jmb.2016.02.027 (2016).
- 49 Baba, M., Osumi, M., Scott, S. V., Klionsky, D. J. & Ohsumi, Y. Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J Cell Biol* **139**, 1687-1695, doi:10.1083/jcb.139.7.1687 (1997).
- 50 Jo, C. *et al.* Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52. *Nat Commun* **5**, 3496, doi:10.1038/ncomms4496 (2014).
- 51 Boyle, K. B., Ravenhill, B. J. & Randow, F. CALCOCO2/NDP52 initiates selective autophagy through recruitment of ULK and TBK1 kinase complexes. *Autophagy* **15**, 1655-1656, doi:10.1080/15548627.2019.1628548 (2019).
- 52 Verlhac, P. *et al.* Autophagy receptor NDP52 regulates pathogen-containing autophagosome maturation. *Cell Host Microbe* **17**, 515-525, doi:10.1016/j.chom.2015.02.008 (2015).
- 53 Viret, C., Rozieres, A. & Faure, M. Novel Insights into NDP52 Autophagy Receptor Functioning. *Trends Cell Biol* **28**, 255-257, doi:10.1016/j.tcb.2018.01.003 (2018).
- 54 Kirkin, V. *et al.* A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* **33**, 505-516, doi:10.1016/j.molcel.2009.01.020 (2009).
- 55 Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I. & Johansen, T. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle* **8**, 1986-1990, doi:10.4161/cc.8.13.8892 (2009).
- 56 Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728-741, doi:10.1016/j.cell.2011.10.026 (2011).
- 57 Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445-544 (2012).
- 58 Rogov, V., Dotsch, V., Johansen, T. & Kirkin, V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell* **53**, 167-178, doi:10.1016/j.molcel.2013.12.014 (2014).
- 59 Xu, Z., Yang, L., Xu, S., Zhang, Z. & Cao, Y. The receptor proteins: pivotal roles in selective autophagy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **47**, 571-580, doi:10.1093/abbs/gmv055 (2015).

- 60 Mejlvang, J. *et al.* Starvation induces rapid degradation of selective autophagy receptors by endosomal microautophagy. *J Cell Biol* **217**, 3640-3655, doi:10.1083/jcb.201711002 (2018).
- 61 Rubinsztein, D. C., Shpilka, T. & Elazar, Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol* **22**, R29-34, doi:10.1016/j.cub.2011.11.034 (2012).
- 62 Nakatogawa, H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, doi:10.1038/s41580-020-0241-0 (2020).
- 63 Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I. & Codogno, P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res* **20**, 748-762, doi:10.1038/cr.2010.82 (2010).
- 64 Johansen, T. & Lamark, T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**, 279-296 (2011).
- 65 Loos, B., du Toit, A. & Hofmeyr, J. H. Defining and measuring autophagosome flux-concept and reality. *Autophagy* **10**, 2087-2096, doi:10.4161/15548627.2014.973338 (2014).
- 66 Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**, 1-222, doi:10.1080/15548627.2015.1100356 (2016).
- 67 Ribeiro, C. M. *et al.* Receptor usage dictates HIV-1 restriction by human TRIM5alpha in dendritic cell subsets. *Nature* **540**, 448-452, doi:10.1038/nature20567 (2016).
- 68 Choi, Y., Bowman, J. W. & Jung, J. U. Autophagy during viral infection – a double-edged sword. *Nat Rev Microbiol* **16**, 341-354, doi:10.1038/s41579-018-0003-6 (2018).
- 69 Sparrer, K. M. J. & Gack, M. U. TRIM proteins: New players in virus-induced autophagy. *PLoS Pathog* **14**, e1006787, doi:10.1371/journal.ppat.1006787 (2018).
- 70 Dinkins, C., Arko-Mensah, J. & Deretic, V. Autophagy and HIV. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 712-718, doi:10.1016/j.semcdb.2010.04.004 (2010).
- 71 Mandell, M. A., Kimura, T., Jain, A., Johansen, T. & Deretic, V. TRIM proteins regulate autophagy: TRIM5 is a selective autophagy receptor mediating HIV-1 restriction. *Autophagy* **10**, 2387-2388, doi:10.4161/15548627.2014.984278 (2014).

- 72 O'Connor, C. *et al.* p62/sequestosome-1 associates with and sustains the expression of retroviral restriction factor TRIM5alpha. *J Virol* **84**, 5997-6006, doi:10.1128/JVI.02412-09 (2010).
- 73 Fletcher, A. J. *et al.* Trivalent RING Assembly on Retroviral Capsids Activates TRIM5 Ubiquitination and Innate Immune Signaling. *Cell Host Microbe* **24**, 761-775 e766, doi:10.1016/j.chom.2018.10.007 (2018).
- 74 Sanjana, N. E., Shalem, O. & Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* **11**, 783-784, doi:10.1038/nmeth.3047 (2014).
- 75 Sawicki, J. A., Morris, R. J., Monks, B., Sakai, K. & Miyazaki, J. A composite CMV-IE enhancer/beta-actin promoter is ubiquitously expressed in mouse cutaneous epithelium. *Exp Cell Res* **244**, 367-369, doi:10.1006/excr.1998.4175 (1998).
- 76 Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* **8**, 2281-2308, doi:10.1038/nprot.2013.143 (2013).
- 77 He, J. *et al.* CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* **385**, 645-649, doi:10.1038/385645a0 (1997).
- 78 Masroori, N. *et al.* Gene Knockout Shows That PML (TRIM19) Does Not Restrict the Early Stages of HIV-1 Infection in Human Cell Lines. *mSphere* **2**, doi:10.1128/mSphereDirect.00233-17 (2017).
- 79 Klasse, P. J. Molecular determinants of the ratio of inert to infectious virus particles. *Prog Mol Biol Transl Sci* **129**, 285-326, doi:10.1016/bs.pmbts.2014.10.012 (2015).
- 80 Perron, M. J. *et al.* TRIM5alpha mediates the postentry block to N-tropic murine leukemia viruses in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11827-11832, doi:10.1073/pnas.0403364101 (2004).
- 81 Pham, Q. T., Bouchard, A., Grutter, M. G. & Berthoux, L. Generation of human TRIM5alpha mutants with high HIV-1 restriction activity. *Gene Ther* **17**, 859-871, doi:10.1038/gt.2010.40 (2010).
- 82 Ci, Y., Yang, Y., Xu, C. & Shi, L. Vesicular stomatitis virus G protein transmembrane region is crucial for the hemi-fusion to full fusion transition. *Sci Rep* **8**, 10669, doi:10.1038/s41598-018-28868-y (2018).
- 83 Besnier, C. *et al.* Characterization of murine leukemia virus restriction in mammals. *J Virol* **77**, 13403-13406, doi:10.1128/jvi.77.24.13403-13406.2003 (2003).

- 84 Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313-326, doi:10.1016/j.cell.2010.01.028 (2010).
- 85 Espert, L. *et al.* Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. *PLoS One* **4**, e5787, doi:10.1371/journal.pone.0005787 (2009).
- 86 Campbell, G. R., Rawat, P., Bruckman, R. S. & Spector, S. A. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Inhibits Autophagy through Transcription Factor EB Sequestration. *PLoS Pathog* **11**, e1005018, doi:10.1371/journal.ppat.1005018 (2015).
- 87 Dinkins, C., Pilli, M. & Kehrl, J. H. Roles of autophagy in HIV infection. *Immunol Cell Biol* **93**, 11-17, doi:10.1038/icb.2014.88 (2015).
- 88 Fan, S. *et al.* Dual NDP52 Function in Persistent CSFV Infection. *Front Microbiol* **10**, 2962, doi:10.3389/fmicb.2019.02962 (2019).
- 89 Saribas, A. S., Khalili, K. & Sariyer, I. K. Dysregulation of autophagy by HIV-1 Nef in human astrocytes. *Cell Cycle* **14**, 2899-2904, doi:10.1080/15384101.2015.1069927 (2015).
- 90 Stremlau, M. *et al.* The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427**, 848-853, doi:10.1038/nature02343 (2004).
- 91 Lamark, T. *et al.* Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bemlp domain-containing proteins. *J Biol Chem* **278**, 34568-34581, doi:10.1074/jbc.M303221200 (2003).
- 92 Zhu, W. *et al.* Differences in the starvation-induced autophagy response in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. *Anim Cells Syst (Seoul)* **21**, 190-198, doi:10.1080/19768354.2017.1330763 (2017).
- 93 Liu, Q. *et al.* Development of ATP-competitive mTOR inhibitors. *Methods Mol Biol* **821**, 447-460, doi:10.1007/978-1-61779-430-8_29 (2012).
- 94 Shoji-Kawata, S. *et al.* Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature* **494**, 201-206, doi:10.1038/nature11866 (2013).
- 95 Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P. & Timlin, J. A. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv* **25**, 1234-1257, doi:10.1080/10717544.2018.1474964 (2018).

- 96 Gunthard, H. F. *et al.* Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2016 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA* **316**, 191-210, doi:10.1001/jama.2016.8900 (2016).
- 97 in *Guideline on When to Start Antiretroviral Therapy and on Pre-Exposure Prophylaxis for HIV WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee* (2015).