

Université de Montréal

Études de la pathogénèse du VIH chez différents modèles murins

par

Paul Brochu

Programme de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Mars 2005

© Paul Brochu, 2005



W

4

U58

2005

V.067

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

Études de la pathogénèse du VIH chez différents modèles murins

présenté par

Paul Brochu

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Michel Roger, président rapporteur

Paul Jolicoeur, directeur de recherche

Serge Montplaisir, membre du jury

Mémoire accepté le

SOMMAIRE

Les modèles murins sont de plus en plus utilisés pour l'étude du SIDA. Ces modèles ne sont toutefois pas pleinement adaptés à ce type de recherche, car ils ne permettent pas la réplication du VIH. Des chercheurs ont démontré que trois blocages (entrée, transcription, maturation) nuisent à cette réplication chez la souris. Après avoir surmonté les deux premiers obstacles, les recherches tentent maintenant de venir à bout du troisième blocage au niveau de la maturation. Chez la souris, il semble manquer une ou plusieurs protéines présentes chez l'humain permettant la maturation. L'objectif de cette première de trois études vise à trouver le ou les gènes humains permettant la maturation du VIH chez la souris. Des cellules de souris exprimant différents segments de chromosomes humains ont donc été analysées pour vérifier si elles possédaient ce ou ces gènes. Nos résultats démontrent que plusieurs gènes sont nécessaires à la réplication du VIH car une légère augmentation du taux de réplication a été observée chez ces cellules hybrides. Comme tous les gènes nécessaires ne sont pas exprimés dans ces premières cellules hybrides analysées, d'autres cellules hybrides devront être étudiées afin de déterminer le ou les gènes manquants.

Le deuxième objectif de ce projet est de trouver le type cellulaire responsable du développement de la maladie similaire au SIDA chez la souris. Le développement du SIDA a déjà été observé chez des souris Tg exprimant le VIH dans des cellules CD4⁺ (CD4C/HIV^{MutG}). Cependant, le récepteur CD4 étant présent sur plusieurs types cellulaires, il n'est pas possible présentement de déterminer lequel des types de cellules est responsable de la manifestation de la maladie. Il est intéressant de considérer la possibilité de limiter l'expression du VIH à un seul type cellulaire à la fois puisque ceci permettrait de vraiment déterminer le rôle de chaque type cellulaire dans le développement du SIDA. Étant donné que les macrophages possèdent le récepteur CD4 et font partie de la première ligne de défense de l'hôte, cela nous a mené à élaborer l'hypothèse suivante : l'expression du VIH dans cette population de cellules est suffisante pour engendrer le SIDA chez la souris. Dans le but de vérifier cette hypothèse, des souris

transgéniques CD68/HIV^{MutG} exprimant le VIH dans les cellules de la lignée des phagocytes mononucléaires, ce qui inclut entre autres les macrophages, ont été développées et analysées. Les analyses d'expression d'ARN ont illustré que le transgène VIH était exprimé à un haut niveau dans ces souris. Dans un premier temps, ces souris ne semblaient pas souffrir de la maladie similaire au SIDA humain observée chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutG}. Cependant, il reste encore quelques analyses à effectuer avant de déterminer si l'expression du VIH dans les cellules de la lignée des phagocytes mononucléaires est suffisante pour engendrer le SIDA.

La troisième étude a pour but de développer un modèle murin VIH développant la lipodystrophie suite à un traitement d'anti-protéases. La majorité des études portant sur la lipodystrophie chez la souris n'est pas effectuée chez des souris dans le contexte du VIH. Il est donc intéressant de considérer la souris transgénique CD4C/HIV^{MutG}, développant une maladie similaire au SIDA humain, comme un bon sujet pour étudier l'apparition de la lipodystrophie suite à un traitement d'AP. Le deuxième but de cette troisième étude est de vérifier si le traitement d'anti-protéases chez la souris transgénique VIH aura un effet sur la progression de la maladie. Nos résultats démontrent que le traitement d'anti-protéase pendant six mois ne provoque pas l'apparition de la lipodystrophie chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutG}. De plus, ces souris transgéniques développent une maladie similaire au SIDA humain suite à une plus longue latence. Pour cette raison, le deuxième objectif de cette troisième étude n'a pu être vérifié car il y avait un nombre insuffisant de souris malades pour vérifier l'effet du traitement sur la progression de la maladie. Suite à ces résultats, nous supposons que la durée du traitement à l'anti-protéase n'était pas assez longue pour arriver à des résultats concluants. Donc, ce modèle murin n'est pas encore tout à fait au point pour étudier la lipodystrophie.

Mots clés : VIH, SIDA, CD68, macrophages, anti-protéases, souris transgéniques, lipodystrophie, gag, maturation

ABSTRACT

Murine models are often used to study AIDS. These models are yet to be fully adapted to this type of research since they do not permit HIV replication. Recent studies have demonstrated that three blocks hamper HIV replication (entry, transcription, and maturation). After having overcome the first two obstacles, the last block still remains. In the mouse, one or more proteins that allow HIV maturation seem to be missing. The objective of the first of three studies aims to find the missing genes in the mouse that permit HIV maturation. Mouse cells containing different human chromosomal segments have hence been analysed to verify if they include these genes. Our results demonstrate that many genes are necessary for the maturation of HIV since we observed slight increases in HIV replication in these mouse hybrid cells. Since not all of the necessary genes may be present in these first hybrid cells, more hybrid cells will require further investigation in order to identify these missing genes.

This project's second objective is to find the type of cell responsible for the development of the AIDS-like disease in mouse. The development of this disease has already been observed in mice expressing HIV transgene in CD4+ cells (CD4C/HIV^{MutG}). However, the CD4 receptor is present on many cell populations and to date, it is not known which population is responsible for the appearance of this disease. It is interesting to consider the possibility of limiting the expression of HIV on one cell type at a time to allow us to determine the role of each cell type in disease development. In view of the fact that human macrophages express the CD4 receptor and that they are part of the host's first line of defence, this has brought us to elaborate the following hypothesis: HIV expression in macrophages is sufficient to initiate AIDS in mice. To verify this hypothesis, CD68/HIV^{MutG} transgenic mice expressing HIV in mononuclear phagocytes, which include macrophages, has been developed and analysed. RNA expression analyses have illustrated that the HIV transgene is expressed at high levels in these transgenic mice. At first, these mice did not seem to develop the AIDS-like disease observed in CD4C/HIV^{MutG} transgenic mice. However, more tests should be performed before we

can determine if HIV expression in mononuclear phagocytes is sufficient to cause some pathology.

The objective of the third study is to develop an HIV murine model that develops lipodystrophy following a protease inhibitor treatment. The majority of the recent studies regarding lipodystrophy in mouse is not carried out in mice in the context of HIV. Furthermore, studies on mice treated with protease inhibitors are rather rare. It is therefore interesting to consider the CD4C/HIV^{MutG} transgenic mice as an excellent model to study the manifestation of lipodystrophy following a protease inhibitor treatment. The second objective of this third study is to verify if this protease inhibitor treatment will have any effects on the progression of the disease. Our results demonstrate that the 6-month treatment does not cause lipodystrophy in the CD4C/HIV^{MutG} transgenic mice. Also, because of the low penetrance of the AIDS-like disease in the line of mice used for the study, we were unable to reach conclusive results. We believe that the length of the protease inhibitor treatment was not long enough for these mice that seem to develop disease at a lower rate and the length of treatment will need to be increased in future experiments. Therefore, this murine model is not yet optimized to study lipodystrophy.

Keywords: HIV, AIDS, CD68, macrophages, protease inhibitor, transgenic mice, lipodystrophy, gag, maturation

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
ABSTRACT	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ANNEXES	xiv
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xv
REMERCIEMENTS	xviii
INTRODUCTION	1
1. Le virus d'immunodéficience humaine	2
1.1. Le génome et la structure du VIH	3
1.2. Le cycle de réplication du VIH	7
1.2.1. Le rattachement, la pénétration et la décapsidation du VIH	7
1.2.2. La transcription inverse et l'incorporation des gènes viraux dans le génome cellulaire	9

1.2.3.	La transcription des protéines	10
1.2.4.	L'assemblage, le relâchement et la maturation des virions	11
2.	De l'infection au virus de l'immunodéficience humaine à la maladie du syndrome d'immunodéficience acquise	12
2.1.	L'infection au virus d'immunodéficience humain	12
2.2.	Le syndrome d'immunodéficience acquise	13
2.3.	Le traitement des personnes infectées par le VIH	14
2.3.1.	Les médicaments contre le VIH	15
2.3.2.	Les effets secondaires des médicaments contre le VIH	16
2.3.2.1.	La lipodystrophie	18
2.3.2.2.	Le traitement de la lipodystrophie	20
3.	Modèles d'études du syndrome d'immunodéficience acquise chez la souris	21
4.	Problématique de la recherche	24
4.1.	Les blocages de la réplication du VIH chez la souris à la phase de maturation du cycle de réplication	24
4.1.1.	Blocage au niveau de la pénétration	25
4.1.2.	Blocage au niveau de la transcription des protéines	26
4.1.3.	Blocage au niveau de l'assemblage/maturation	26
4.2.	La génération d'une souris transgénique pouvant exprimer le VIH dans les cellules CD68+	29
4.3.	Le développement de la lipodystrophie chez des souris transgéniques qui expriment le VIH et qui sont traitées avec des anti-protéases	30

MATÉRIEL ET MÉTHODES	34
RÉSULTATS	45
1. L'étude traitant des blocages de la réplication du VIH chez la souris aux phases d'assemblage et de maturation du cycle de réplication.	46
1.1. Production du pseudotype VSV-G/NL4	46
1.2. Infection des cellules hybrides B78MC9	46
1.3. Infection des cellules hybrides B78MC	51
1.4. Infections avec le pseudotype VSV-G/ ψ -mov/pbabe-cyclT/GFP	58
2. L'étude sur la souris Tg CD68/HIV	60
2.1. Construction du transgène CD68/HIV ^{MutG}	60
2.2. Analyse des souris transgéniques CD68/HIV ^{MutG}	60
3. L'étude de la lipodystrophie causée par le traitement à l'anti-protéase	64
3.1. Traitement à court terme chez la souris Tg E α HIV	64
3.2. Traitement à long terme chez la souris Tg CD4C/HIV ^{MutG}	67
DISCUSSION	75
1. L'étude traitant des blocages de la réplication du VIH chez la souris aux phases d'assemblage et de maturation du cycle de réplication.	76
1.1. Réplication du VIH dans les cellules B78MC9	76
1.2. Réplication du VIH dans les cellules B78MC	78
2. L'étude sur la souris Tg CD68/HIV	82

2.1.	Expression du transgène CD68/HIV ^{MutG} chez la souris transgénique CD68/HIV ^{MutG}	82
2.2.	Absence de la maladie similaire au SIDA	83
3.	L'étude de la lipodystrophie causée par le traitement à l'anti-protéase	85
3.1.	Baisse d'expression des protéines Gag suite au traitement des souris avec le ritonavir	85
3.2.	Le traitement de ritonavir n'a aucun effet sur la progression de la maladie similaire au SIDA humain	86
3.3.	Absence des symptômes de la lipodystrophie suite au traitement du ritonavir	87
	BIBLIOGRAPHIE	89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Quantité de virus produit par les cellules B78MC9	50
Tableau 2.	Comparaison des taux d'expression de Gag des cellules B78MC	53
Tableau 3.	Production virale dans le surnageant des cellules hybrides B78MC	57
Tableau 4.	Titration virale des surnageants des cellules hybrides B78MC par essai MAGI	59
Tableau 5.	Données sur les souris mortes durant le traitement à long terme	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Structure du VIH	4
Figure 2.	Récepteurs du VIH dans les cellules T ou les cellules de la lignée des macrophages/monocytes	8
Figure 3.	Niveau d'expression des protéines Gag VIH-1 dans la cellule hybride B78MC9 infectée par le VSV-G/NL4	47
Figure 4.	Détection de l'ARN du VIH dans les cellules B78MC9 infectée par le VSV-G/NL4	49
Figure 5.	Niveau d'expression des protéines Gag du VIH dans les cellules hybrides B78MC infectées par le VSV-G/NL4	52
Figure 6.	Expression de l'ARN du VIH dans les cellules B78, B78MC et 293T infectées par le VSV-G/NL4	56
Figure 7.	Construction finale du transgène hCD68/HIV ^{MutG}	61
Figure 8.	Expression de la protéine Nef dans les souris Tg hCD68/HIV ^{MutG}	63
Figure 9.	Expression des protéines Gag dans les tissus lymphoïdes d'une souris Tg E α HIV	65
Figure 10.	Expression de Gag dans les ganglions mésentériques chez des souris traitées avec le ritonavir	66
Figure 11.	Courbe de mortalité des souris traitées à long terme	69

- Figure 12.** Symptôme de la maladie similaire au SIDA humain chez la souris transgénique CD4C/HIVMutG 71
- Figure 13.** Comparaison des poids de souris entre les groupes Tg et nTg, traitées et non traitées 72
- Figure 14.** Comparaison des moyennes de différents constituants sériques 74

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1	Observations des souris traitées à l'AP à long terme	104
Annexe 2	Poids des souris traitées au ritonavir à long terme	107
Annexe 3	Analyse du sérum des souris traitées à l'AP à long terme	110

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP	Anti-protéase
APOBEC3G	« Apolipoprotein B mRNA editing Enzyme, Catalytic polypeptide-like 3G »
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNpII	Acide ribonucléique polymérase II
AZT	Zidovudine
BAC	« Bacterial Artificial Chromosome »
CANVAC	Réseau canadien pour l'élaboration de vaccins et d'immunothérapies
CTD	Domaine COOH-terminal
CTL-	Contrôle négatif
CTL+	Contrôle positif
CPM	Coups par minute
DME	« Dubelco Modified Eagle »
FCSI	« Fetal Calf Serum Inactivated »
FT	Facteurs de transcriptions
GFP	« Green Fluorescent Protein »
GM	Ganglions mésentériques
GP	Ganglions périphériques
g	Gramme
HAART	Traitement antiviraux hautement efficace
HBS	HEPES Buffered Saline
HDL	Lipoprotéine de haute densité
hp32	Protéine humaine 32
hrp	« Horse Radish Peroxidase »

hSR-A	« Human Scavenger Receptor A »
INI1	« Integrase Interactor 1 »
INNTI	Inhibiteur non-nucléosidique de la transcriptase inverse
INTI	Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramme
LTR	« Long Terminal Repeats »
L	Litre
MAGI	Indicateur d'activation multinucléaire galactosidase
MHC-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
mg	Milligramme
mm	Millimètre
mmol	Millimole
mL	Millilitre
min	Minute
M	Molaire
mp32	Protéine murine 32
MS	Forme multi-épissée
MutG	Mutant G
NK	« Natural Killer »
nTg	Non transgénique
nTx	Non traité
OMS	Organisme mondiale de la santé
PAGE	« Polyacrylamide Gel electrophoresis »
PBS	« Phosphate Buffer saline »
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
rAdT	poly(rA)-oligo(dT)
rpm	Tours par minute
RRE	« Rev Response Element »
SDS	« Sodium Dodecyl Sulfate »
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise

SIDAS	Syndrome d'immunodéficience acquise simien
SPF	« Specific Pathogen Free »
SS	Forme épissée
TAR	Élément de la réponse transactivatrice
TBS	« Tris Buffer Saline »
TCA	« Trichloroacetic Acid »
Tg	Transgénique
TI	Transcriptase inverse
Tx	Traité
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µmol/L	Micromole par litre
UNAIDS/OMS	Programme joint des nations unies sur le syndrome d'immunodéficience acquis
US	Forme non-épissée
VIH	Virus d'immunodéficience humaine
VIH-I	Virus d'immunodéficience humaine de type I
VSV-G	Glycoprotéine de surface du virus de la stomatite vésiculaire

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche le Dr Paul Jolicoeur pour m'avoir accueilli et encadré dans son laboratoire. Je voudrais également remercier les Drs Zaher Hanna, Denis Kay et Marc Cool pour leurs conseils précieux.

J'aimerais exprimer ma reconnaissance envers le Dre Claire Brochu, François Depault ainsi que Patrick Vincent pour la révision et la critique de ce mémoire. Je tiens à remercier le Monsieur Miguel Chagnon pour les analyses statistiques. J'aimerais exprimer ma gratitude envers nos assistants de recherche et nos techniciens Benoît Laganière, Patrick Couture, Ginette Massé, Isabelle Labrosse et Lin Jia pour leur appui technique. J'aimerais également remercier les techniciennes en santé animale Eve-Lyne Thivierge, Marie-Ève Higgins ainsi que Viviane Beaulieu pour leur aide avec les gavages de souris.

Finalement, je voudrais remercier mes parents, mon frère, Fany, Gilbert et Mélanie pour leurs encouragements tout au long de ce mémoire.

À mes parents Claude et Suzanne

et mon frère Jean-Louis...

INTRODUCTION

1. Le virus d'immunodéficience humaine

Le virus d'immunodéficience humaine (VIH) est l'un des sujets les plus étudiés présentement dans le monde de la médecine. Diagnostiqué il y a une vingtaine d'années, il constitue encore un grave problème socio-sanitaire au plan mondial car aucun remède n'existe pour guérir complètement la maladie qui en découle, le syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA). Cependant, la réaction de la communauté médicale et scientifique a révolutionné le VIH/SIDA, transformant un verdict de mort presque immédiat, en une maladie que l'on peut gérer. L'espérance et la qualité de vie des personnes séropositives au VIH se sont ainsi améliorées (Chapman, 2003).

Il existe deux types de VIH qui se transmettent de la même façon et qui causent la même maladie. Le VIH de type I (VIH-I) est responsable de la majorité des cas d'infection au VIH. D'autre part, le VIH de type II, plus commun en Afrique de l'ouest, semble moins pathogénique que le VIH-I car il se transmet moins facilement et prend plus de temps à provoquer la maladie. Ce mémoire traitera du VIH-I qui est le plus courant.

Le VIH-I appartient à la famille des rétrovirus et plus spécifiquement au groupe des lentivirus. On le retrouve partout dans le monde et plus particulièrement dans la région subsaharienne de l'Afrique. Le VIH se transmet par contact sexuel (liquides corporels) ou par contact sanguin (transfusion, échange de seringues ...). Une mère infectée peut aussi transmettre le VIH à son bébé pendant la grossesse, l'accouchement et l'allaitement (Cann, 1996). Il n'existe aucune preuve que le VIH puisse être transmis par contact non sexuel ou par des morsures de moustiques. À l'heure actuelle, le comité UNAIDS/OMS estiment qu'environ 40 millions de personnes sont porteuses du VIH dans le monde (OMS, 2003). Au Québec, Turmel (2003) mentionne que 18 000 personnes

étaient porteuses en 2002. En moyenne, plus de 10 millions de virions VIH sont produits quotidiennement chez une personne infectée. À cause de son fort taux de réplication et parce qu'il est continuellement en mutation, le VIH est un véritable fléau pour l'être humain. Plusieurs de ses caractéristiques lui donnent la capacité de survivre même en présence des réponses immunes humorales et cellulaires.

À cause de cette forte prévalence du VIH, de nombreuses recherches se concentrent sur ce phénomène. Entre autres, on s'interroge sur les effets secondaires néfastes de médicaments par ailleurs efficaces, sur le type de cellules responsables de la maladie du SIDA ainsi que sur le mode de réplication du VIH. Cette recherche présente trois études orientées vers ces préoccupations.

Dans un premier temps seront exposés la description du VIH quant à son génome, sa structure et sa réplication (section 1), puis celle du SIDA et de son traitement (section 2) et enfin, les modèles d'étude du SIDA chez la souris (section 3). Dans un deuxième temps, les problématiques, les questions de recherche et les hypothèses des trois études seront présentées (section 4).

1.1. Le génome et la structure du VIH

Le génome du VIH est de type ARN⁺. Il a une longueur de 9.5 kilobases (kb) codant 9 gènes viraux qui produisent à leur tour 15 protéines virales. Chaque bout de l'ARN est flanqué de séquences de bases répétitives (les LTRs ou «long terminal repeats»), qui agissent comme des interrupteurs afin de contrôler la production de nouveaux virions et qui peuvent être activées par des protéines virales ou cellulaires. Le génome possède trois différents cadres de lecture ouverts : gag, pol et env. Ces derniers encodent respectivement les protéines structurales, enzymatiques aussi que celles de l'enveloppe du virus. (Cann, 1996)

Le gène gag encode une protéine précurseur p55 qui, à la suite d'une série de clivage par la protéase virale, produit, entre autres, les protéines cylindriques denses p24, p17, p9 et p6. Deux mille copies p24 forment la capsid du virus (voir la Figure 1) qui

renferme les deux ARN viraux simple brin codant chacun des 9 gènes viraux ainsi que trois enzymes : la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. La protéine p17 forme la matrice qui est située entre la capsidie et l'enveloppe virale. Elle facilite le transport nucléaire du génome viral. La protéine p9 forme la nucléocapside qui entoure les brins d'ARN dans la capsidie. Elle reconnaît le signal d'encapsidation du VIH qui consiste en quatre structures en forme d'épingle à cheval au bout 5' de l'ARN viral et contrôle l'incorporation de l'ARN viral dans le virion. La nucléocapside facilite aussi la transcription inverse. Le polypeptide p6 sert de médiateur dans l'interaction entre p55 et la protéine accessoire virale Vpr, ce qui provoque l'incorporation de Vpr dans les virions. De plus, la portion p6 de gag contient un domaine tardif qui est requis pour le relâchement efficace des virions lors du bourgeonnement cellulaire. (Cann, 1996)

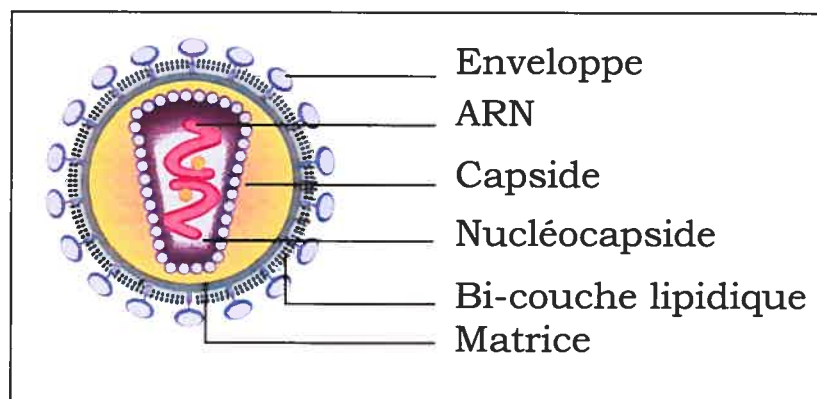


Figure 1 Structure du VIH

Le gène pol encode les enzymes viraux dont la protéase (p10), la transcriptase inverse (p66/55; sous-unités alpha et beta) et l'intégrase (p32). Ces enzymes viraux sont responsables, respectivement, du clivage de la polyprotéine précurseur Gag-Pol, la transcription inverse de l'ARN virale en ADN proviral et de l'intégration du provirus dans le génome de l'hôte. Ils sont essentiels à la réplication virale.

Le gène env encode l'enveloppe de glycoprotéines (gp) virales extracellulaires (gp120) et transmembranaires (gp41). L'enveloppe virale est composée d'une bicouche lipidique provenant de la cellule hôte et de 72 copies en moyenne d'un complexe de protéines virales nommées Env. Chaque complexe consiste en une coiffe produite à

partir de 3 ou 4 gp 120 et d'une tige produite à partir de 3 ou 4 gp41. Il permet d'ancrer la structure dans l'enveloppe virale. (Freed et Martin, 1995)

Le VIH possède également 2 gènes régulateurs : tat et rev, ainsi que 4 gènes auxiliaires : vif, vpr, vpu et nef qui contiennent l'information nécessaire pour la production de protéines qui contrôlent l'habilité du VIH à infecter une cellule. Les gènes régulateurs sont des gènes viraux importants impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes; tat encode une protéine transactivatrice (Tat) tandis que rev encode la protéine régulatrice de l'expression virale (Rev). Cette dernière protéine contrôle l'exportation nucléaire des messages viraux (ARNm) contenant des introns. Elle est en mouvement continue et transporte l'ARNm entre le noyau et le cytoplasme. Cette navette nécessite un signal de localisation nucléaire et un signal d'exportation nucléaire présent dans Rev (Hope, 1999). La protéine Rev est importante car elle agit également sur la transition de la phase précoce vers la phase tardive de l'expression des gènes viraux. Elle se trouve à l'intérieur du noyau de la cellule infectée et se lie à un complexe de 240 bases de l'ARN nommé RRE («Rev response element») qui est présent dans le second intron du VIH. Cette fixation de Rev au RRE facilite l'exportation de l'ARN viral partiellement épissé et non-épissé du noyau vers le cytoplasme. Rev est indispensable à la réplication du VIH : les provirus qui ne possèdent pas la fonction exercée par Rev sont transcriptionnellement actifs, par contre, ils n'expriment pas les gènes viraux latents et par conséquent, ne produisent pas de virions. (Strebel; 2003; Pollard et Malim; 1998; Emerman et Malim; 1998)

La protéine virale transactivatrice Tat stimule l'élongation de la transcription par des interactions avec l'élément de la réponse transactivatrice (TAR) situé au bout 5' des transcrits. La transcription est initiée sur les LTRs VIH avec le complexe holoenzyme de l'ARN polymérase II (ARNpII). En l'absence de Tat, l'élongation de la transcription est inefficace à cause de l'hypophosphorylation du domaine COOH-terminal (CTD) de l'ARNpII. L'élongation précoce synthétise le bout 5' de l'ARNm VIH ce qui forme une structure en épingle de cheval bombée. La protéine virale Tat associée à la cycline T et Cdk9 se fixe à TAR proche de l'ARNpII arrêté. Ensuite, le Cdk9 hyperphosphorylyse le

CTD, ce qui stimule une élongation transcriptionnelle efficace de l'ARNm viral. (Emerman et Malim; 1998)

Le gène nef encode la protéine Nef qui était initialement perçue comme une protéine régulant négativement l'expression de CD4 à la surface de la cellule (Ahmad et Venkatesan, 1988; Guy et al., 1987). Nef est aujourd'hui considérée comme une protéine qui a un effet indirect sur la transcription. Elle est la première protéine détectable suivant l'infection d'une cellule (Kim et al., 1989). Elle augmente le taux d'endocytose du CD4 et de la dégradation lysosomale de cette dernière (Aiken et al., 1994). Nef possède également la même fonction pour les molécules MHC de classe I (HLA-A et HLA-B) mais avec une affinité plus faible. La régulation négative du MHC-I diminue l'efficacité des cellules T cytotoxiques à éliminer les cellules infectées par le VIH (Schwartz et al., 1996). Nef masque donc les cellules infectées aux cellules T cytotoxiques. Les molécules du MHC-I restantes à la surface sont de type HLA-C et HLA-E et elles constituent un ligand pour les cellules NK. Cette liaison envoie un signal d'inhibition pour l'activité lytique des cellules NK. De plus, Nef est reconnue pour perturber l'activation des cellules T et pour stimuler l'infectivité du virus car les virions produits en présence de Nef sont jusqu'à 10 fois plus infectieux que les virus produits en l'absence de Nef (Luria et al., 1991; Miller et al., 1994).

Le gène vif encode un facteur d'infectivité virale qui est essentiel à la réplication du VIH dans les lymphocytes du sang périphériques, dans les macrophages et dans certaines lignées cellulaires. Par contre, dans la plupart des cellules, la présence de Vif n'est pas nécessaire pour permettre la réplication du VIH, ce qui suppose que ces cellules expriment une protéine pouvant compléter la fonction de vif (Hope et Trono, 2002).

Le gène vpr encode une protéine principalement responsable de la transcription. Par contre, vpr semble aussi permettre au VIH d'infecter des cellules qui ne se divisent pas (comme les macrophages) en facilitant la localisation nucléaire des complexes de préintégration (Heinzinger et al., 1994). De plus, vpr arrête le cycle cellulaire à la phase

G2; il n'y a donc pas de mitose (Chang et al., 2004; Bukrinsky et Zhao, 2004; Tungaturthi et al., 2003).

Le gène *vpu* encode une molécule chaperonne de la protéine Env et influence le relâchement de nouvelles particules virales. Elle est aussi impliquée dans la régulation négative du récepteur CD4 de la surface cellulaire. Cette régulation négative est importante au relâchement de nouveaux virions car lorsque le virus est attaché à la cellule via le CD4, le relâchement de virions se fait difficilement. La régulation négative du CD4 permet de relâcher l'enveloppe virale et de nouveaux virions. En l'absence de Vpu, un grand nombre de virions attachés à la surface des cellules infectées peut être observé (Willey et al., 1992).

1.2. Le cycle de réplication du VIH

Cette section présente le cycle de réplication du VIH dans sa cellule hôte. Ce cycle est divisé en quatre parties : 1) l'entrée dans la cellule, 2) la transcription inverse de l'ARN viral et son insertion dans le génome de l'hôte, 3) la transcription de protéines et finalement 4) l'assemblage, le relâchement et la maturation.

1.2.1. Le rattachement, la pénétration et la décapsidation du VIH

Le rattachement du VIH à sa cellule cible se fait par l'entremise des glycoprotéines de son enveloppe, les gp120, qui se lient au récepteur de la cellule (Chatterjee et al., 1992). L'interaction entre le récepteur et le ligand (gp120) ne nécessite aucune énergie et peut se faire à toutes les températures. Le récepteur de la cellule cible du VIH est l'antigène CD4 qui est présent dans les lymphocytes T et les cellules de la lignée des monocytes/macrophages, incluant les cellules dendritiques (Cann, 1996). Le récepteur CD4 ne semble pas suffisant pour permettre au virus de pénétrer dans la cellule. Ceci a été démontré en exprimant le récepteur CD4 humain sur des cellules de rongeurs qui ne sont pas normalement infectables par le VIH (Maddon et al., 1986). Par contre, un corécepteur de chémokines est aussi nécessaire. En effet, plusieurs groupes de chercheurs ont établi que la présence d'un membre de la famille des récepteurs de beta-chémokines, de petits modulateurs de la fonction immune de la cellule, permet l'infection

du VIH dans divers types cellulaires chez l'humain (Doranz et al., 1996; Choe et al., 1996; Alkhatib et al., 1996; Dragic et al., 1996; Deng et al., 1996). Les deux récepteurs de chémokines les plus importants sont le CXCR4 et le CCR5. Si l'isolat du virus est T-tropique, le virus peut entrer et se répliquer dans les cellules T mais non dans les macrophages et les monocytes; dans ce cas, le corécepteur CXCR4 est nécessaire pour l'infection. Par contre, si l'isolat du virus est M-tropique, le virus peut entrer et se répliquer dans les macrophages et les monocytes mais non dans les cellules T et c'est alors le corécepteur CCR5 qui est essentiel (Cann, 1996). Ceci est illustré dans la Figure 2.

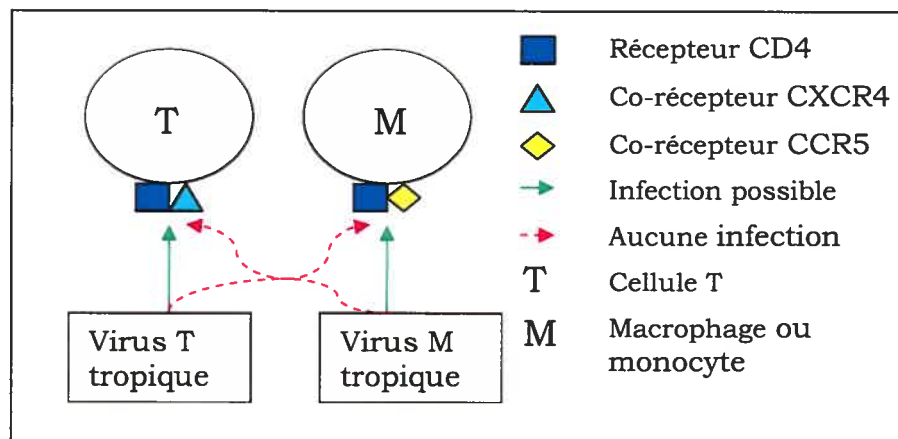


Figure 2 : Récepteurs du VIH dans les cellules T ou les cellules de la lignée des macrophages/monocytes

Il a aussi été démontré que le VIH pouvait infecter des cellules négatives pour les récepteurs CD4 et CCR5 en utilisant le CD8 comme récepteur (Saha et al., 2001; Cullen, 2001). Les conséquences de l'infection du VIH varient selon le type de cellules. L'infection *in vitro* des lymphocytes T CD4⁺ mène à une mort cellulaire. Par contre, l'infection des monocytes/macrophages produit une cytopathogénicité beaucoup plus réduite (Cann, 1996).

Une fois attaché à la cellule, la pénétration du virus est une étape qui nécessite de l'énergie et qui se fait rapidement. Suivant la liaison du gp120 au CD4, un changement conformationnel facilite l'interaction du gp120 avec le récepteur de chémokine ce qui expose le peptide fusogénique sur gp41 et lui permet de s'insérer dans la membrane

cellulaire (Sattentau et Moore, 1993). L'enveloppe du virion peut alors se fusionner à la membrane cellulaire : il en résulte un relâchement de la capsidie directement dans le cytoplasme de la cellule. Cette étape est indépendante du pH (Kielian et Jungerwirth, 1990).

1.2.2. La transcription inverse et l'incorporation des gènes viraux dans le génome cellulaire

Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, le VIH doit transformer son ARN en ADN afin de pouvoir se répliquer. Une copie d'ADN double brin est produite à partir de l'ARN génomique viral par le processus de la transcription inverse. La protéine cellulaire cyclophiline A semble être essentielle dans ce processus car l'abolition de son interaction avec Gag inhibe la réplication virale (Zav'yalov et al., 1995; Hope et Trono, 2000). Suite à l'entrée de la capsidie dans la cellule, la cyclophiline A semble favoriser la dissolution de la capsidie facilitant ainsi la transcription inverse (Franke et Luban, 1995). L'enzyme concernée, la transcriptase inverse, entre dans la cellule avec la capsidie suite à la décapsidation. Cette enzyme polymérase synthétise une double chaîne d'ADN à partir d'un gabarit d'ADN ou d'ARN et possède une activité associée ARNase.

L'ADN viral est par la suite transporté vers le noyau et intégré dans l'ADN cellulaire. Normalement, avec les rétrovirus simples, ce processus se produit seulement dans une cellule en division (Trono, 1995; Subbramanian et Cohen, 1994). Cependant, comme ceci a été mentionné plus haut, grâce à la protéine Vif du VIH, qui est un rétrovirus complexe, l'intégration est possible dans certaines cellules qui ne sont pas en division, dans les macrophages par exemple. Le site d'intégration est aléatoire. L'enzyme qui catalyse ce processus est l'intégrase qui coupe l'ADN viral et cellulaire afin de produire des bouts collants et cohésifs. Suite à cette intégration, le virus se comporte comme un gène cellulaire endogène. Il utilise donc la machinerie de l'hôte afin de produire ses propres protéines (Kulkosky et Skalka, 1994; Goldfarb, 1995; Miller et Bushman, 1995).

1.2.3 La transcription des protéines

La transcription de protéines est un processus complexe impliquant l'interaction entre des séquences régulatrices dans les LTRs et des protéines cellulaires ou virales. L'ARN polymérase II agit sur le promoteur de concert avec les facteurs de transcriptions (FT) accessoires qui se lient spécifiquement à des séquences adjacentes au promoteur et dans certains cas, directement à l'ARN polymérase. Les FT cellulaires comprennent entre autres EBP-1, NF κ B et SRI, CTF/NFI et LBP-I. Certains sites dans les LTRs fonctionnent comme des sites de liaison pour plusieurs FT généraux tels que le facteur de liaison TATA (TFIID). D'autres sites se lient à des FT spécifiques aux tissus, comme NF κ B. Ce dernier est un activateur particulièrement important dans les cellules T. La présence de plusieurs sites de liaison de FT dans les LTRs viraux explique pourquoi différents stimuli peuvent être activateurs. (Cann, 1996)

Afin d'obtenir un taux d'expression de gènes VIH élevé, la présence de la protéine Tat est nécessaire. Tat est un transactivateur de la transcription qui augmente la production d'ARNm jusqu'à 100 fois. Il s'exprime par les ARNm entièrement épissés précoces ou les ARNm incomplètement épissés tardifs. De plus, contrairement aux facteurs de transcription conventionnels qui interagissent avec l'ADN, Tat est une protéine fixatrice d'ARN (Feng et Holland, 1988; Roy et al., 1990). Comme mentionné plus haut, la fonction de Tat nécessite la présence de TAR qui est présent aux bouts 5' de tous les ARNm. Des expériences démontrent que la protéine Tat se lie directement avec d'autres protéines cellulaires sur la région TAR de l'ARN (Rana et Jeang, 1999; Karn, 1999).

De toute évidence, le promoteur du VIH ne permet pas d'assembler un complexe d'ARN polymérase efficace. Le taux d'initiation de la transcription est lent et l'efficacité d'élongation est faible. Plusieurs études semblent démontrer que la liaison de Tat à TAR permet de lier d'autres protéines au complexe transcriptionnel, ce qui augmenterait l'efficacité. Cette augmentation d'efficacité dépend de l'ARN de Tat et elle est unique dans l'expression de gènes eucaryotes. (Gatignol et al., 1996; Rana et Jeang, 1999)

Initialement, lors d'une infection par le VIH, de faibles quantités d'ARNm de Tat et de Rev s'accumulent à cause du faible taux d'activité endogène du promoteur en l'absence de Tat. Le faible taux de production de Tat engendre conséquemment la transcription additionnelle de d'autres protéines Tat. Ainsi, plus le taux de Tat augmente, plus il y a de transcription de tat. (Feng et Holland, 1988; Cann, 1996; Morrow et al., 1994)

Sur une période de quelques heures, alors que le taux de transcription de protéines demeure élevé, le message épissé de l'ARNm succède à ses messages bi-épissés afin de permettre la transcription de la protéine virale Env. Éventuellement, un ARNm non-épissé est produit, ce qui permet la traduction de Gag et Pol. C'est la protéine Rev qui est responsable de ce changement lors de la transcription. De plus, Rev se lie à l'ARN viral ce qui permet l'exportation des ARN contenant des introns, un processus normalement absent dans la cellule humaine. Les protéines virales sont ensuite produites dans le cytoplasme par la machinerie de synthèse de protéines cellulaires. (Morrow et al., 1994; Cann, 1996)

Même si la protéine Env devient apte à interagir avec les récepteurs suite à son oligomérisation, elle ne devient pas fusogénique avant un certain temps, après que le clivage se soit fait pour séparer la séquence de la protéine de surface de la séquence de la protéine transmembranaire. Le clivage s'effectue dans l'appareil de Golgi, probablement à l'aide de la protéase cellulaire furin ou par une activité enzymatique reliée. L'assimilation de Gag et du précurseur Gag-Pro-Pol est intimement liée à l'assemblage et au bourgeonnement et non à la transcription. L'activation et l'assimilation prématurée de Gag par la protéase virale pourraient empêcher l'assemblage approprié et seraient fatales au virus. (Cann, 1996)

1.2.4 L'assemblage, le relâchement et la maturation des virions

L'assemblage du VIH nécessite la présence de facteurs morphogéniques qui ne font pas partie structurellement du virus. Ce sont des chaperonnes et certaines d'entre elles ne sont pas encore identifiées. L'assemblage de la capsid se fait au niveau de la

membrane cellulaire. Pendant la traduction de protéines précédant l'assemblage, la région N-terminale de la protéine p55 est myristylée, ce qui permet son insertion dans la membrane cellulaire. Un regroupement de protéines Gag se forme en association avec la membrane à l'aide d'interactions protéine-protéine ou par association avec l'ARN viral. Le virion sphérique peut se former grâce à une courbure induite par l'association des protéines Gag ou à la nature hélicoïde de l'ARN. L'ARN devient alors fortement associé avec la « nucleocapsid moiety of Gag ». (Cann; 1996)

Les virions assemblés peuvent ensuite bourgeonner à travers la membrane. C'est alors que le virus acquiert sa bicouche lipidique provenant de la cellule hôte. Puisque 5% de la protéine Gag est sous forme de polyprotéine Gag-Pol contenant la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase, toutes les protéines nécessaires à une infection dans les particules virales sont maintenant disponibles. La grande concentration de protéase dans la capsid permet son activation ainsi que le clivage des protéines gag et pol et l'éventuelle formation d'un virus mature et infectieux. De plus, d'autres constituants macromoléculaires du cytoplasme sont alors incorporés dans le virion de façon non spécifique. (Morrow et al., 1994)

2. De l'infection au virus de l'immunodéficience humaine à la maladie du syndrome d'immunodéficience acquise

2.1. L'infection au virus d'immunodéficience humaine

L'infection primaire avec le virus d'immunodéficience humaine de type I (VIH-1) est couramment associée à un syndrome clinique ressemblant à une mononucléose aiguë apparaissant approximativement 3 à 6 semaines suivant l'infection. Ces symptômes comprennent la fièvre, des malaises, une perte de poids inexplicée, la pharyngite, la lymphadénopathie, le mal de tête, l'arthralgie, la diarrhée, l'éruption maculopapulaire et la méningoencéphalite (Cichocki, 2004; Cann, 1996). La sévérité et la persistance des symptômes peuvent varier considérablement mais en général, la plupart disparaissent après une ou deux semaines. Par contre, ces symptômes apparaissent moins qu'une fois sur deux. Un déclin significatif du taux de lymphocytes T CD4+ dans le sang

périphérique se produit de 2 à 8 semaines suivant l'infection (Cann, 1996). Ce taux peut augmenter encore durant la phase de latence du virus mais il est rare qu'il revienne à un taux similaire à celui présent lors de l'infection primaire. Le syndrome aigu associé à l'infection aiguë est accompagné par une augmentation drastique de la réplication virale (Cann, 1996). La pathogenèse reliée au VIH se présente généralement selon ces phases : 1) une infection primaire, 2) un syndrome aigu, 3) une réponse immune face au VIH, 4) une latence clinique (séquestration du VIH dans les tissus lymphoïdes), 5) une perte des cellules T CD4+ et une destruction des tissus lymphoïdes et finalement 6) la phase du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Le temps écoulé entre l'infection au VIH et l'apparition des signes cliniques définissant le SIDA varie beaucoup selon les individus. En moyenne, ce temps s'étale entre 8 à 12 ans. Par contre, certains individus, reconnus comme étant des non-progresseurs à long terme, vivent une phase de latence plus longue avant de développer le SIDA. Ce délai peut atteindre jusqu'à 20 ans. Heureusement, une médication adéquate permet d'allonger le temps d'apparition.

2.2. Le syndrome d'immunodéficience acquise

Le SIDA est un syndrome affectant le système immunitaire. Tout au long de la progression de la maladie, le virus se multiplie et endommage ou même tue les lymphocytes T CD4+. Cela affaiblit le système immunitaire et laisse l'individu vulnérable à une multitude d'infections opportunistes tels que la pneumonie, la leucoplasie, le muguet ainsi que d'autres maladies comme le cancer. Le taux de lymphocytes T CD4+ sert donc de marqueur pour la progression de l'infection : des taux peu élevés sont étroitement liés à la maladie et au risque de décès. Dans la plupart des pays industrialisés, les spécialistes cliniques de l'infection au VIH utilisent les taux de lymphocytes T CD4+ et la charge virale VIH comme critères premiers pour la mise en route et la prise en charge du traitement (OMS, 2003). La charge virale réfère au nombre de particules virales retrouvées par millilitre de sang. Plus la présence de particules virales VIH dans le sang est élevée, plus la probabilité de destruction des cellules CD4+ augmente et conséquemment, plus la progression vers le SIDA s'accélère (Bing et al., 2000). Lorsqu'on parle des taux de lymphocytes T CD4+ chez les gens atteints, le seuil est généralement de 200 lymphocytes par mm³ de sang (Bing et al., 2000; Sehgal et al.,

2002; OMS, 2003; NIAID/NIH, 2003). Chez les patients en santé, le compte de CD4 s'étend entre 450 et 1200 (NIAID/NIH, 2003).

Il est maintenant bien établi que l'ARN-VIH plasmatique est un marqueur prédictif de l'évolution de l'infection, indépendant et complémentaire du taux de CD4 (Mellors et al., 1997). Ce marqueur se révèle indispensable au suivi thérapeutique, apportant une information pertinente sur l'efficacité, la tolérance, voire l'observance d'un traitement antirétroviral. (Delfraissy, 1999)

2.3. Le traitement des personnes infectées par le VIH

Il n'existe pas vraiment de remèdes contre la maladie du SIDA. Les spécialistes cliniques tentent plutôt de combattre le VIH qui est la cause du SIDA. Par contre, le choix de médicaments est grandement limité par le fait que le VIH est un virus et que les antibiotiques n'ont aucun effet connu sur ce dernier. Comme le VIH est un virus à ARN, plusieurs mutations du virus se produisent durant la réplication à cause d'erreurs effectuées lors de la transcription inverse. Les nouveaux virions peuvent donc être considérés comme étant différents comparativement à leur virus mère. Ceci complique la création de nouveaux vaccins efficaces car ces derniers peuvent seulement permettre de protéger l'hôte contre les virus identiques à celui dont le vaccin est dérivé. À chaque réplication du virus, les chances qu'un nouveau vaccin ou médicaments soient nécessaires sont élevées. La lutte contre le VIH est donc extrêmement difficile. On peut comparer cette lutte à celle du virus de la grippe où la vaccination est recommandée une fois chaque année. Malgré la vaccination, plusieurs personnes contractent quand même la grippe car ce virus est lui aussi un virus à ARN qui mute continuellement. Mais il y a une grande différence entre le virus de la grippe et le VIH, parce que le virus de la grippe est plus faible et peut être éliminé par le corps après un certain temps. Pour sa part, le VIH est beaucoup plus résistant et par ce fait, plus morbide. Par contre, depuis l'introduction des thérapies antivirales, le taux de mortalité dû à l'infection au VIH a diminué (Palella et al., 1998; Detels et al., 1998; Hogg et al., 1999).

2.3.1. Les médicaments contre le VIH

Réduire la charge virale globale de l'organisme est l'objectif thérapeutique principal des antirétroviraux dont le rôle est de bloquer la réplication virale et d'empêcher l'extension de l'infection à de nouvelles cellules. Le premier médicament qui a permis de combattre le VIH est l'AZT est devenu disponible aux États-Unis en 1987. L'AZT, un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse (INTI), rend la TI inactive suite à son rattachement. Il y a seulement huit ans, le SIDA était perçu comme une condamnation à la mort. Jusqu'en 1996, la seule façon d'interrompre le processus de réplication était d'inhiber la transcriptase inverse avec l'AZT ou d'autres médicaments semblables. Mais avec le temps, le VIH a évolué : il échappe maintenant à cette thérapie et développe une résistance aux médicaments. La découverte d'une molécule pouvant intervenir à une autre phase du cycle viral a ensuite constitué une alternative pour diminuer la réplication virale (Balter et al., 1996).

De grandes percées en recherche fondamentale et clinique sur le SIDA ont été effectuées en 1996. On a assisté à l'arrivée sur le marché de nouveaux médicaments antirétroviraux plus puissants, possédant des mécanismes d'action différents et complémentaires (Olivier, 2003). Cette nouvelle classe de médicaments comprend les inhibiteurs de protéases VIH aussi connus sous le nom d'antiprotéases (AP). Les AP se lient aux protéases du VIH et les rend inactives. Les nouveaux virions restent donc immatures et par conséquent non virulents. Par la suite est arrivé un autre type d'inhibiteur de la transcriptase inverse : les non-nucléosidiques (INNTI). Ceux-ci se lient directement à la TI puis bloquent l'activité de la polymérase ADN et ARN-dépendante. Le site catalytique de cette enzyme est également perturbé. De nos jours, ces médicaments ne sont presque plus utilisés à des fins de monothérapies.

L'arrivée des AP a permis le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques telles que l'utilisation combinée d'antirétroviraux qui permettent une suppression prolongée de la réplication du VIH chez la plupart des personnes infectées. Ces cocktails de médicaments, qui comprennent en général deux inhibiteurs de TI puis un AP, sont reconnus comme étant des traitements antiviraux hautement efficaces

(HAART). Avec l'introduction de cette tri-thérapie, il est devenu possible d'observer que la concentration du VIH dans le sang atteint des niveaux non-déetectables. Cette thérapie HAART est alors devenue un standard dans le long combat contre le VIH (Carpenter et al., 1996; Hammer et al., 1997; HIV infection, 1997). Par contre, près du quart des patients ont par la suite cessé le traitement HAART initial soit à cause d'une incapacité d'abaisser le niveau de réplication virale sous le seuil de détection courant de 50 copies/mL, soit à cause d'effets toxiques ou de non efficacité dans les huit premiers mois de la thérapie (d'Arminio Monforte et al., 2000; Lucas, 1999).

Un nouveau médicament antirétroviral d'une nouvelle classe est devenu disponible sur le marché l'an dernier aux États-Unis (mars 2003) et au Canada (octobre 2003). Le Fuzeon® (T-20) fait partie de la classe des inhibiteurs de fusion qui s'attaquent à l'enveloppe du VIH, dont la protéine virale gp41 pour Fuseon®, et par conséquent empêchent le VIH d'entrer dans la cellule (Hosein, 2003; Chayer, 2003).

Il y a présentement deux autres classes d'antirétroviraux aux premiers stades expérimentaux : ce sont les inhibiteurs d'intégrase et les inhibiteurs de la transcription (antiviraux antisens) qui tentent de bloquer la réplication du VIH, le premier, au niveau de l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de l'hôte (Grossman, 2004a) et le deuxième, au niveau de la production d'ARNm viral (Grossman, 2004b).

Alors que le développement de nouveaux agents antirétroviraux se continue, des efforts sont maintenus afin de maximiser l'efficacité des traitements existants : ceci exige une meilleure compréhension du virus et une gestion plus efficace des effets secondaires (Montessori et al., 2004).

2.3.2. Les effets secondaires des médicaments contre le VIH

Lors de la sortie des premiers inhibiteurs de TI, les patients sont souvent très malades car ces médicaments sont toxiques. Les effets secondaires couramment observés sont des maux de tête, de l'insomnie, de la nausée, des problèmes gastro-intestinaux, de la myalgie, de l'anémie, de la granulocytopénie, de la neutropénie, de l'hépatotoxicité

occasionnelle, des neutropathies périphériques et des myosites. Avec l'arrivée des AP, les effets secondaires observés sont grandement diminués. Par exemple, les effets secondaires les plus visibles des AP sont des nausées, du vomissement, des maux d'estomac et de la diarrhée, qui peuvent être évités en augmentant progressivement la dose du médicament pendant les deux premières semaines (Price, 1998; Gallant, 1999). Dans des cas assez rares, on retrouve des niveaux élevés d'enzymes rénales, d'hyperglycémie et de diabète (Gallant, 1999). Nonobstant cela, après quelques mois de traitement, plusieurs patients deviennent résistants à la monothérapie avec les AP.

Lors des monothérapies antivirales, un déclin dramatique de virus circulant est souvent suivi par l'apparition de virus mutants résistant au médicament. Dans le cas de l'administration de plusieurs médicaments, en moins de quelques semaines ou de quelques mois, une virémie est habituellement de retour aux niveaux détectés lors du prétraitement. L'apparition de la résistance aux médicaments coïncide avec l'apparition de virus comportant des mutations spécifiques aux protéases ou affectant la transcriptase inverse (Cann, 1996). C'est pour ces raisons que les médecins ont commencé à prescrire les thérapies HAART. Ces traitements combinés semblent favoriser un niveau de virémie assez bas pendant un long laps de temps. La résistance à ces combinaisons médicamenteuses survient souvent suite à l'arrêt du traitement. Certains croient que la clé du succès thérapeutique réside dans le respect de la posologie et la poursuite du traitement puisqu'une diminution de la dose ou l'arrêt d'un ou de plusieurs médicaments antirétroviraux peut favoriser l'émergence de souches virales résistantes (Olivier, 1998). Donc, les patients qui continuent les traitements peuvent généralement vivre assez longtemps, sans avoir de problème. Par contre, certains patients qui deviennent asymptomatiques après quelques temps pensent qu'il est inutile de continuer le traitement. Quelques semaines suivant l'arrêt du traitement HAART, la virémie augmente souvent considérablement et le taux de CD4 chute. Le patient est alors de nouveau malade. Dans ces cas, un traitement HAART est réamorcé mais il est suggéré de ne pas inclure des médicaments déjà employés afin de diminuer les chances de développer une résistance aux médicaments (ARAS, 2004; Powderly, 2000; Erbeling, 1999). C'est pour cela que certains chercheurs croient que l'effet des antirétroviraux n'est

en fait qu'un simple effet virustatique. Ceci est démontré par le fait qu'un arrêt brusque de traitement conduit, dans les jours qui suivent, à une remontée de la réplication virale avec production de particules virales par les cellules circulantes. Ceci a été observé chez des patients dont le taux d'ARN-VIH plasmatique était indétectable depuis plusieurs mois (Jubault et al., 1998). D'autre part, plusieurs patients utilisant des inhibiteurs de protéase, seuls ou en combinaison avec d'autres antiviraux, commencent à développer des effets secondaires tardifs assez bouleversants, par exemple, la lipodystrophie.

2.3.2.1. La lipodystrophie

La lipodystrophie est un syndrome assez complexe dont la définition ne fait pas l'unanimité chez les spécialistes. Il existe deux types de lipodystrophie : la lipodystrophie héréditaire et la lipodystrophie associée au VIH. C'est de cette dernière dont il sera question ici. La lipodystrophie existe depuis longtemps, par contre, avant les années 90, elle n'avait pas été définie précisément. Une définition provisoire a été énoncée lors d'une réunion à San Diego en 1999 (Carr et al., 1999). Par la suite, Kingsley (2001) a proposé la première définition formelle de la lipodystrophie au congrès de l'association internationale des médecins soignant le SIDA, (IAPAC) à Chicago. Il a identifié trois classes de lipodystrophies en se basant sur des informations cliniques tirées des recherches au multi-centre SIDA (MACS) :

1. **La lipoatrophie périphérique** : Perte de gras sous-cutané légère, modérée ou élevée, dans deux ou plus des régions suivantes : bras, jambes, fesses ou visage.
2. **La lipoatrophie mixte** : Lipoatrophie périphérique avec accumulation du gras modéré ou élevé dans l'abdomen ou les seins, avec ou sans l'accumulation de gras sur la nuque (aussi nommée bosse de bison).
3. **La lipoatrophie périphérique ou lipoatrophie mixte avec des anormalités métaboliques du métabolisme du glucose ou des lipides.**

Ces changements corporels peuvent prendre plusieurs mois avant d'apparaître mais ils ne sont pas toujours accompagnés de changements métaboliques. Par contre, certains chercheurs, dont le groupe de Kotler et Engelson (1999), croient que les AP

causent des anomalies métaboliques qui engendrent par la suite une redistribution de gras. Ces effets lipodystrophiques apparaissent à différents degrés selon l'AP utilisé. Certains estiment que le médicament nommé indinavir amène des effets plus prononcés (De Luca et al., 1998). Des chercheurs ont même constaté, que suite à l'administration d'une seule dose d'indinavir à des sujets masculins en bonne santé, la capacité de l'insuline à faciliter l'entrée du glucose dans les cellules était considérablement entravée, vraisemblablement suite à la réduction de l'action de l'hormone sur les transporteurs du glucose (Noor et al., 2002). D'autres chercheurs jugent que le ritonavir provoque des effets encore plus drastiques (Bonfanti et al., 2003; Calza et al., 2004). En effet, le ritonavir stimulerait les niveaux sanguins des autres AP co-administrés, ce qui augmenterait les caractéristiques pharmacocinétiques de ces agents, augmentant ainsi les effets thérapeutiques bénéfiques mais souvent au prix d'effets secondaires additionnels, tels que la lipodystrophie ou bien une lipodystrophie plus prononcée (Moyle, 2002). Van der Valk et al. (2001) citent les résultats d'une recherche qui démontre que l'ajout de INTI à des régimes d'AP augmente le risque de développer la lipodystrophie. En résumé, plusieurs indices démontrent que certains antiviraux seraient responsables de l'apparition de la lipodystrophie.

Certaines personnes frustrées de l'apparition des symptômes de la lipodystrophie reliée au VIH ont de la difficulté à accepter ces changements et décident de changer leurs médicaments ou d'arrêter leur traitement. Ball (2003) souligne que l'arrêt du traitement peut devenir tragique car la virémie revient souvent : le patient peut ainsi devenir résistant aux médicaments en question. Il considère cet arrêt regrettable car les bénéfices de ces thérapies sont incontestables.

La cause de la lipodystrophie n'est pas encore connue; par contre, il semble certain que les AP ne sont les seuls responsables. Selon les groupes de Carr et al. (1999), Qaqish et al. (2000) et Brinkman et al. (1999), plusieurs personnes sur traitements avec des INTI ou des INNTI n'ayant jamais pris des AP ont développé de la lipodystrophie.

2.3.2.2. Le traitement de la lipodystrophie

Une des préoccupations premières des patients atteints de lipodystrophie est de se débarrasser de ce syndrome. Il n'existe présentement aucune thérapie médicamenteuse pour palier entièrement les changements esthétiques de la lipodystrophie associé au VIH. Les cliniciens doivent évaluer les risques et les bénéfices de chacun des médicaments et individualiser le traitement pour chaque patient (Benavides et Nahata, 2004). Certains utilisent la liposuction pour enlever l'excès de gras. Par contre, plusieurs spécialistes le déconseillent car le gras peut revenir par la suite et le procédé peut être potentiellement dangereux lors de l'extraction de gras abdominal ou viscéral (Hanna, 1999; Piliero, 2003; Wanke, 1999).

Le traitement à la leptine permet de renverser la résistance à l'insuline, le diabète mellitus (Shimomura et al., 1999) la dyslipidémie et la lipodystrophie chez la souris (Riddle et al., 2003). La Leptine est une hormone adipocyte importante dans la régulation de l'homéostasie de l'énergie qui semble être en baisse lors de la lipodystrophie sévère (Oral et al., 2002). Yamauchi et al. (2001) avancent qu'une combinaison de leptine et d'infusions d'adiponectine est nécessaire pour rétablir entièrement l'action de l'insuline. Le traitement à la leptine, chez des patients atteints de la lipodystrophie et d'un manque de leptine, a amélioré le contrôle de la glycémie (Petersen et al., 2002) et diminué le niveau de triglycérides (Oral et al., 2002). Ce dernier groupe a aussi conclu qu'une déficience en leptine contribuait à la résistance à l'insuline et aux autres anomalies métaboliques associées avec la lipodystrophie sévère.

Plusieurs personnes refusent d'utiliser d'autres médicaments pour contrer la lipodystrophie et décident d'arrêter complètement leur traitement anti-VIH. Souvent, les symptômes disparaissent peu après l'arrêt du médicament mais le patient risque de voir sa santé se détériorer et de développer une résistance aux médicaments.

3. Modèles d'études du syndrome d'immunodéficience acquise chez la souris

Les études cliniques chez les humains sont très fréquentes actuellement, en ce qui a trait au phénomène VIH/SIDA. Par contre, les études chez des individus non infectés se font plus difficilement à cause de restrictions éthiques. Les recherches s'effectuent donc auprès de patients infectés par le VIH. Ces études portent sur la maladie ainsi que sa progression avec et sans traitements antiviraux.

Pour leurs recherches, plusieurs scientifiques utilisent des animaux pour minimiser les restrictions éthiques. Très similaire à l'homme, la famille des singes constitue un excellent sujet d'expérimentation. Des chercheurs (Desrosiers, 1990; Desrosiers et Letvin, 1987) affirment que le modèle le plus près du SIDA humain est le SIDA simien (SIDAS) induit chez les primates avec le lentivirus relié au VIH-1, soit le virus d'immunodéficience simien. Selon Jolicoeur et al. (1999), les manifestations pathologiques du SIDAS sont similaires à celles du SIDA. Par contre, ils ajoutent que ce modèle a le désavantage d'être peu accessible et un virus différent du VIH-1 doit être utilisé. De plus, les coûts élevés d'exploitation et la longue gestation des bébés rendent difficiles l'expérimentation avec les singes. L'utilisation d'un nombre statistiquement suffisant de ces animaux dans une expérience est donc assez rare. Afin de contrer ce problème, plusieurs chercheurs se tournent vers l'utilisation de modèles animaux plus petits, tels que les rongeurs. Les rongeurs sont comparativement peu coûteux et leur temps de gestation est relativement court. Cela permet d'obtenir un grand nombre de sujets beaucoup plus rapidement. De plus, dû à leur petite taille, il est plus facile et moins coûteux de les héberger et de les manipuler. C'est pour ces raisons, entre autres, que les rongeurs, et plus particulièrement les souris, sont de plus en plus utilisés en laboratoire pour des études portant sur le VIH-1.

Au début, la souris était peu employée lors d'expériences sur le VIH car elle semblait naturellement protégée de toutes infections par ce virus. Morrow et al. (1987) ont tenté d'infecter des souris et des cellules murines avec un titre élevé de VIH sans toutefois obtenir une virémie détectable. Suite à la découverte du CD4 humain comme récepteur primaire du VIH (Klatzmann et al., 1984; Lores et al., 1992), plusieurs

chercheurs ont réalisé que l'expression du CD4 humain dans les cellules murines était insuffisante pour leur conférer une susceptibilité à l'infection au VIH (Maddon et al., 1986; Lores et al., 1992).

Plusieurs chercheurs ont tenté d'analyser la contribution individuelle de différents gènes du VIH chez la souris : Vpr (Rogel et al., 1995), Vpu (Willey et al., 1992), Tat (Viscidi et al., 1989) et les glycoprotéines gp120 et gp41 de l'enveloppe (Siliciano, 1996; van Maanen, 2003). Lindemann et al. (1994) ainsi que Brady et al. (1993) ont exprimé le gène nef chez la souris. Par contre, leurs souris n'ont démontré que des diminutions des niveaux des cellules T CD4+ matures et immatures ainsi qu'une variété de caractères incompatibles avec le développement du SIDA, par exemple, un niveau de cellules B élevé. Aucun de ces modèles n'a pu répéter toutes les caractéristiques de la maladie.

Au cours des années, des techniques ont été développées afin d'obtenir un modèle murin adéquat pouvant servir à étudier les différents aspects de l'infection au VIH et de la maladie du SIDA. Parmi ces modèles, on retrouve la xénogreffe humaine, qui consiste en la transplantation de tissus ou de cellules humaines dans des lignées de souris sévèrement immunodéficientes. Ce modèle fut considérablement utilisé pour étudier les différents aspects de la physiologie humaine normale, notamment l'hématopoïèse ainsi que la biologie des cellules souches (McCune, 1996). Des modèles sur les souris SCID-hu (immunodéficiência combinée sévère humaine) sont également employés avec succès, entre autres, pour les évaluations précliniques des composants antiviraux contre le VIH-1 (Rabin et al., 1996; McCune, 1996; Pettoello-Mantovani et al., 1998). Des chercheurs ont aussi utilisé ces modèles SCID pour étudier des infections au VIH-1 : aucune maladie ressemblant au SIDA humain et affectant de nombreux organes ne s'est toutefois développée dans ces conditions (McCune et al., 1991). Par contre, il y a eu plusieurs grandes percées avec l'arrivée de ces nouveaux modèles. En 1998, malgré le succès partiel des tentatives antérieures pour établir un modèle souris infectables au VIH-1, Hanna et al. (1998a) ont mis au point un modèle murin Tg pour l'étude du VIH. Ces souris sont les premières à développer des anomalies similaires au SIDA humain et connaître une mort prématurée. Ces souris transgéniques expriment les séquences

complètes du VIH-1 dans les cellules T CD4⁺ et dans les cellules de la lignée des macrophages/cellules dendritiques. De plus, elles développent des pathologies sévères semblables au SIDA humain: la cachexie/perte de poids, la diarrhée, l'atrophie musculaire, la mort prématurée, l'atrophie du thymus, la perte de cellules T CD4⁺, la pneumonie interstitielle et la néphrite tubulo-interstitielle (Hanna et al., 1998a, 1998b). Ceci représente un pas de géant dans la recherche sur le SIDA car il existe dorénavant un modèle murin qui peut aider à comprendre plus à fond ce syndrome.

Différents mutants contenant un ou plusieurs gènes du VIH ont ensuite été produits par ce même groupe de chercheurs (Hanna et al., 1998b). Ces derniers ont constaté que le mutant contenant uniquement le gène nef produisait un phénotype similaire à l'ensemble des gènes viraux, c'est-à-dire, un développement de pathologies sévères semblables au SIDA humain. Cela signifie que nef est probablement le gène responsable des effets néfastes du VIH. Il a de plus été démontré que nef était nécessaire et suffisante pour engendrer une maladie similaire au SIDA. Depuis cette découverte, plusieurs chercheurs tentent de disséquer le gène nef afin de déterminer quelles régions sont responsables de la maladie et plusieurs souris transgéniques VIH encodant une variation du génome viral ont été développées afin d'étudier certains aspects des maladies reliées au VIH (pour une revue de ces modèles, voir van Maanen et Sutton, 2003).

4. Problématiques de la recherche

Dans cette recherche, trois thèmes principaux seront étudiés :

1. Les blocages de la réplication du VIH chez la souris, à la phase de maturation du cycle de réplication.
2. La génération d'une souris transgénique pouvant exprimer le VIH dans les cellules CD68+.
3. Le développement de la lipodystrophie chez des souris transgéniques qui expriment le VIH et qui sont soignées avec des anti-protéases.

Dans un premier temps, la section 4.1 présentera une revue de littérature portant sur la problématique des blocages de la réplication du VIH chez la souris, puis la question et l'hypothèse qui sont retenues dans le cadre de ce mémoire, en ce qui a trait au blocage de la réplication du VIH chez la souris au niveau de la maturation. La section 4.2 fera ressortir la pertinence de mettre au point un modèle murin pouvant exprimer le VIH principalement dans les macrophages et présentera l'hypothèse de recherche s'y rapportant. Enfin, la section 4.3 fera part d'une revue de la littérature sur divers modèles murins étudiant les effets des anti-protéases (plus particulièrement, la lipodystrophie), puis des questions et hypothèses qui seront traitées dans cette recherche relativement au développement de la lipodystrophie chez les souris transgéniques qui expriment le VIH et qui sont soignées par des anti-protéases.

4.1. Les blocages de la réplication du VIH chez la souris à la phase de maturation du cycle de réplication

Un des problèmes découlant de l'usage d'un modèle murin dans les études sur le SIDA est que la souris semble être naturellement protégée contre l'infection au VIH. En effet, le récepteur CD4 chez la souris ne permet pas l'entrée du virus. Plusieurs chercheurs tentent maintenant de contourner ce problème.

Différentes phases du cycle de réplication du VIH présentent des blocages à la réplication du virus chez la souris. Plusieurs de ces blocages seront d'abord présentés

avant d'expliciter l'hypothèse de recherche qui est retenue ici quant au blocage de la réplication du VIH chez la souris à la phase de maturation du cycle de réplication.

4.1.1. Blocage au niveau de la pénétration

Plusieurs chercheurs ont tenté d'exprimer le récepteur CD4 humain à la surface des cellules murines (Maddon et al., 1986; Ashorn et al., 1990; Clapham et al., 1991; Lorès et al., 1992). Maddon et al. (1986) ont démontré que des cellules de souris génétiquement modifiées permettant d'exprimer le récepteur CD4 humain à leur surface ne pouvaient être infectées par le VIH. Cela signifie qu'il manque un facteur pour permettre l'infection chez la souris.

En 1995, Gallo a identifié trois facteurs qui inhibent l'entrée du VIH dans la cellule (Cocchi et al., 1995). Ces trois facteurs sont des chémokines (RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β) sécrétées par les lymphocytes T CD8+. Cette découverte a orienté les recherches sur le rôle des chémokines dans l'entrée du VIH.

En 1996, différents groupes ont démontré que plusieurs co-récepteurs additionnels au CD4 étaient nécessaires pour l'entrée du virus dans les cellules (Deng et al., 1996; Alkhtib et al., 1996; Berson et al., 1996; Bleul et al., 1996; Doranz et al., 1996; Dragic et al., 1996; Feng et al., 1996). Ils ont identifié certains co-récepteurs provenant de la famille des récepteurs de chémokines (le CXCR4 et le CCR5). Ces récepteurs de chémokines sont présents chez la souris mais n'interagissent pas correctement avec le récepteur CD4 et empêchent ainsi l'infection. Suite à cette découverte, plusieurs groupes ont produit des souris transgéniques exprimant les récepteurs humains manquants. Peu après, Bieniasz et al. (1997) ont démontré que ce n'était pas un défaut relié à la fonction du co-récepteur mais bien un niveau d'expression inadéquat du co-récepteur CXCR4 murin qui empêchait l'infection du VIH. Ils ont montré qu'un niveau suffisant d'expression du récepteur CXCR4 murin permettait l'infection du VIH chez la souris.

En 1997, Browning (1997) a produit la première souris Tg permettant l'infection par le VIH en incorporant les CD4 et CXCR4 humains. Par contre, suite à l'infection,

aucune réplication du VIH ne s'effectuait et aucun virus n'était produit. Ceci indique qu'il existe une autre barrière une fois que le virus est entré dans la cellule. Afin de trouver cette barrière, Wei et al. (1998) ont démontré que l'insertion du virus dans le génome de l'hôte est insuffisant car aucune transcription de l'ARNm virale n'était détectée. Ils ont suggéré que le blocage était probablement relié à la transcription.

4.1.2. Blocage au niveau de la transcription des protéines

Wei et al. (1998) ont réussi à défaire ce deuxième blocage lié à la transcription des protéines. Ils ont démontré que l'ajout de la cycline T1 humaine à des cellules murines infectées par le VIH permettait la production d'ARNm virale. Il semble que la forme murine du cofacteur essentiel de Tat, la cycline T1, est incapable d'interagir efficacement avec l'élément TAR lorsque lié avec tat (Bieniasz et al., 1998; Fujinaga et al., 1999; Garber et al., 1998; Kwak et al., 1999; Wei et al., 1998). La cycline T murine ne nécessite qu'une substitution de la tyrosine 261 à une cystéine pour être recrutée efficacement par TAR par les protéines Tat et par conséquent supporter la transactivation (Bieniasz et Cullen, 2000).

Par contre, l'incorporation de la cycline T1 humaine chez la souris ne permet pas la production d'un taux de VIH comparable à celui présent dans les cellules humaines (Mariani et al., 2000, 2001; Garber et al., 1998; Koito et al., 2002). Il existe donc un troisième blocage empêchant la réplication du VIH. Mariani et al. (2000) ont fait l'hypothèse que ce problème était lié à la protéine virale gag. Ils ont démontré que dans les cellules de souris, Gag est séquestré dans le cytoplasme et n'est jamais clivé en sa forme mature p24. Sans ce dernier, le VIH n'a pas de capsid et reste immature ou non infectieux. Ils ont donc conclu que le dernier obstacle était probablement celui de l'assemblage et du relâchement.

4.1.3. Blocage au niveau de l'assemblage/maturation

Sachant que le dernier blocage se situe au niveau de l'assemblage, il est difficile d'établir si les cellules de souris possèdent un facteur capable d'inhiber l'assemblage de la capsid ou si les cellules humaines fournissent un facteur essentiel à cet assemblage

(Cohen, 2001). Bieniasz et Cullen (2000) ont supposé l'absence d'un autre facteur sûrement présent dans les cellules humaines. Afin de prouver cette proposition, ils ont fusionné des cellules de souris infectées avec le VIH avec des cellules humaines. Ils ont dès lors constaté une augmentation considérable de la production de virus infectieux. Peu après, Mariani et al. (2001) ont effectué une expérience similaire à celle-ci pour arriver aux mêmes conclusions. Depuis que Bieniasz et Cullen (2000) ont publié leurs données, plusieurs groupes recherchent les facteurs manquants. La première proposition provient de Yung et al. (2001) qui ont découvert que INI1 (Integrase interactor 1) était une protéine qui facilitait l'assemblage ou le relâchement de virions. Cependant, ces chercheurs n'ont pas réussi à démontrer si l'incorporation de cette protéine chez la souris peut augmenter le taux de réplication du VIH.

En 2002, Zimmerman et al. (2002) pensent avoir découvert le facteur manquant. Ils démontrent qu'une protéine agit comme chaperonne de la protéine Gag. Cette molécule nommée HP68 a été initialement décrite comme un inhibiteur de l'ARNase L (Bisbal et al., 1995). Ces derniers avaient démontré dans un système acellulaire («cell-free system») et dans des cellules T humaines infectées avec le VIH-1 que HP68 était associé avec le Gag-VIH-1 dans la phase suivant la transcription. Zimmerman et al. (2002) ont par contre précisé que HP68 n'était peut-être qu'un facteur parmi d'autres nécessaires à l'assemblage de capsides HIV-1 immatures.

Deux autres molécules ont été proposées pour palier le manque de production virale chez la souris. La première, CEM 15, a été proposée simultanément par plusieurs groupes, à quelques mois d'intervalles (Lecossier et al., 2003; Zhang et al., 2003; Mariani et al., 2003; KewalRamani et al., 2003; Stopak et al., 2003). La protéine CEM15 est aussi connue sous le nom de APOBEC3G (« apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G ») un membre de la famille des déaminases de cytidine (Jarmuz et al., 2002). C'est une protéine exprimée sur le chromosome 22 humain qui est normalement inhibée par la protéine virale Vif dans les cellules non permissives. Sans la présence de Vif, l'ARN viral simple brin est muté par CEM15 ce qui amène une multitude de défauts au niveau des protéines structurales, enzymatiques et

régulatrices virales et résulte donc en un échec à différents points du cycle de vie du VIH (Lecossier et al., 2003). Cette inhibition de Vif sur CEM15 agit comme un mécanisme cellulaire de défense virale. Cet effet mutationnel pourrait être un des facteurs qui contribue à la variation génétique de la population lentivirale chez les primates (Zhang et al., 2003). Le problème retrouvé chez la souris est que Vif ne peut former un complexe stable avec CEM15 murin (Mariani et al., 2003) ce qui résulte en une inhibition de l'infection virale par CEM15. Suite à cette découverte, la deuxième protéine proposée par Zheng et al. (2003) est hp32. Ces derniers ont découvert chez la souris un épissage excessif des transcrits du VIH. Chez l'humain, ce processus est inhibé par la protéine humaine 32 (hp32). Zheng et al. (2003) ont établi que cette protéine, en plus de bloquer l'épissage, favorise l'accumulation de transcrits génomiques viraux et de protéines structurales, ce qui entraîne l'assemblage et le relâchement de virions infectieux. Ils ont aussi noté que son homologue murin, le mp32, ne pouvait bloquer le processus d'épissage ce qui cause un sur-épissage des transcrits génomiques viraux. Il en découle donc une diminution du niveau protéique de Gag. Chez la souris, Zheng et al. (2003) ont contourné ce problème en insérant un segment du chromosome 11 humain qui contient la région encodant hp32 dans les cellules de souris.

Par la suite, Sutton et al. (2003) ont utilisé une série de cellules hybrides souris/humaines qui contenaient chacun un seul chromosome humain. Ils ont par la suite infecté chacune des cellules hybrides avec un vecteur VIH contenant la cycline T1 humaine ainsi que la glycoprotéine de surface du virus de stomatite vésiculaire (VSV-G). L'utilisation du VSV-G est devenue un excellent outil permettant de contourner le blocage d'entrée chez la souris. Le VSV-G possède un très grand tropisme et lorsqu'il est transfecté avec le VIH, il permet d'infecter une grande panoplie de cellules incluant celles de la souris. Les auteurs ont conclu que le facteur manquant se situait sur le chromosome 2 car le seul hybride permettant un taux de réplication semblable à celui retrouvé chez les cellules humaines contenait le chromosome 2 humain. Le taux de réplication des autres hybrides était cependant assez faible. Suite à ces résultats, il reste à déterminer quel (s) gène (s) est ou sont responsables de la réplication du VIH dans les cellules de la souris.

La question étudiée dans cette première étude du mémoire est la suivante :

- Est-il possible d'augmenter le taux de réplication du VIH dans les cellules de souris à un niveau semblable à celui observé chez les cellules humaines?

L'hypothèse que nous soutenons est qu'il est possible d'augmenter le taux de réplication du VIH dans les cellules de souris.

4.2. La génération d'une souris transgénique pouvant exprimer le VIH dans les cellules CD68+.

Le modèle de la souris Tg CD4C/HIV démontre que l'expression des gènes VIH par le promoteur CD4C est nécessaire pour le développement d'une maladie similaire au SIDA humain (Hanna et al., 1998a, 1998b). Comme le récepteur CD4 est présent sur plusieurs types cellulaires il n'est pas possible présentement de déterminer quel type de cellule est responsable de la manifestation de la maladie. Il est ici intéressant de considérer la possibilité de limiter l'expression du transgène à un seul type cellulaire parce que cela permettrait de vraiment déterminer le rôle de ce type cellulaire dans le développement du SIDA. Lors d'une infection au VIH, les macrophages sont un des types de cellules affectés. Il serait intéressant de mettre au point un modèle murin qui permettrait de découvrir si l'expression du VIH dans les macrophages est suffisante pour causer la maladie du SIDA.

Gough et al. (2001) ont exprimé le récepteur hSR-A (« human scavenger receptor A ») sur des macrophages en utilisant le promoteur CD68 humain chez la souris. Le CD68 est exprimé dans le compartiment endosomal de toutes les cellules de la lignée des phagocytes mononucléaires incluant les monocytes, les macrophages, les microglies, les ostéoclastes et à un niveau plus restreint, les cellules dendritiques immatures (Pulford et al., 1990; Rabinowitz et al., 1992; Strobl et al., 1995). En exprimant le VIH sur des cellules de la lignée des phagocytes mononucléaires en utilisant le promoteur CD68 humain chez la souris, comme ont fait Gough et al. (2001), on pourra voir si l'expression du VIH dans ces cellules de la souris est suffisante pour développer une maladie similaire

au SIDA humain. Si cela est le cas, cela voudra dire qu'un ou plusieurs de ces types cellulaires exprimant le CD68 sont suffisants pour développer la maladie. D'autres souris transgéniques pourraient ensuite être développées afin de découvrir, entre toutes ces cellules, la ou lesquelles d'entre elles cause une maladie similaire au SIDA. Sinon, d'autres types cellulaires, qui n'expriment pas le récepteur CD68, devront alors être envisagés pour développer de nouvelles souris transgéniques. La présente recherche se limitera à expérimenter l'expression du VIH dans les cellules murines exprimant le CD68.

L'hypothèse de cette deuxième étude est donc que l'expression du VIH dans des cellules de la lignée des phagocytes mononucléaires en utilisant le promoteur CD68 humain chez la souris, permettra de développer une maladie similaire au SIDA humain.

4.3. Le développement de la lipodystrophie chez des souris transgéniques qui expriment le VIH et qui sont traitées avec des anti-protéases.

La lipodystrophie est très étudiée chez la souris. Plusieurs modèles de souris portant des transgènes spécifiques qui réduisent les masses de tissus adipeux ont été développés et démontrent des caractéristiques de la lipodystrophie. Par exemple, des chercheurs ont démontré que des souris exprimant les transgènes nSREBP-1c (Shimomura et al., 1998), mutation Fld (Reue et al., 2000) et A-ZIP/F (Moitra et al., 1998), développaient un syndrome ressemblant à la lipodystrophie congénitale généralisée. Pour leur part, Burant et al. (1997) ont observé des souris qui développaient une autre condition similaire à la lipodystrophie (syndrome de Lawrence). Ces modèles peuvent contribuer à la lutte contre la lipodystrophie associée au VIH. Leurs résultats peuvent aider à comprendre comment la lipodystrophie s'installe chez les patients atteints du VIH traités avec les anti-protéases (AP). Par contre, un modèle de souris VIH semble être un meilleur modèle pour étudier ce phénomène. Il se peut aussi qu'un mélange de modèles lipodystrophiques chez la souris, portant ou non le VIH, soit une meilleure solution.

La majorité des études portant sur la lipodystrophie chez les souris n'est pas faite sur des souris atteintes du SIDA. Elles se font même assez rarement chez des souris traitées avec des AP. Plusieurs chercheurs qui ont étudié des souris ainsi traitées n'ont pas vérifié si elles développaient une lipodystrophie (André et al., 1998; Pacifici et al., 1997; Pettoello-Mantovani et al., 1997; Leroux et al., 1995). Il faut dire qu'à cette époque, la lipodystrophie n'était pas encore très courante. Par contre, Lenhard (2000), qui a comparé différentes diètes chez des souris traitées aux AP, a remarqué plusieurs caractéristiques de la lipodystrophie chez des souris mais il n'a pas mentionné ce syndrome; les caractéristiques observées dépendaient toutefois du médicament utilisé comme AP.

Goetzman et al. (2003) ont observé chez des souris traitées pendant huit semaines avec le ritonavir (AP) une lipoatrophie ainsi qu'une augmentation des triglycérides sériques. Ils ont proposé que les mécanismes de PPAR et SREBP étaient contrecarrés par ce traitement. Ces derniers sont des régulateurs majeurs de l'expression génique des parcours métaboliques des acides gras. De plus, l'antagoniste de PPAR, soit PPAR α , est considéré comme le régulateur maître de l'adipogénèse (Lowell, 1999). Si le ritonavir inhibe bien PPAR, PPAR α ne peut fonctionner comme il faut. Ceci peut par conséquent engendrer des problèmes lipidiques tels que la lipoatrophie ainsi que l'augmentation des triglycérides. Goetzman et al. (2003) proposent que leur modèle de lipoatrophie induit par le ritonavir puisse ultérieurement être raffiné et utilisé dans des études scientifiques futures sur les effets métaboliques de cet AP.

L'hypothèse principale de cette troisième étude est que l'expression du VIH pourrait, suite à un traitement d'anti-protéase, favoriser la lipodystrophie en tant qu'effet secondaire de ces anti-protéases et indépendamment de leur inhibition de la protéase virale. La souris transgénique CD4C/HIV^{MutG} serait donc un bon modèle pour étudier la lipodystrophie associée à l'utilisation des AP chez les souris Tg exprimant le VIH ainsi que pour étudier les effets des AP sur la progression de la maladie similaire au SIDA.

Cette troisième étude s'intéresse aux questions suivantes :

- Est-ce que des troubles lipidiques apparaîtront suite à un traitement d'AP chez des souris sauvages et chez des souris transgéniques sensibilisées par le VIH (CD4C/HIV^{mutG}), tel que cela peut être observé chez des personnes séropositives ou sidatiques atteintes de la lipodystrophie suite au traitement aux AP.
- Est-ce qu'un traitement d'AP chez des souris transgéniques CD4C/HIV^{mutG} ne possédant pas de protéases virales (l'effecteur connu des AP), aura des effets sur la progression de la maladie suite à leur effet sur une cible cellulaire non-déterminée? Si oui, lesquels?

Les hypothèses secondaires sont les suivantes :

- Les souris Tg ainsi que leurs contrôles négatifs (souris nTg) traitées aux AP développeront la lipodystrophie.
- Si le traitement d'AP des souris Tg cause la lipodystrophie sans que leurs contrôles négatifs soient atteints, cela voudra dire que la présence du VIH sensibilise la souris à la lipodystrophie.
- Si les deux types de souris traitées développent la lipodystrophie, cela indiquera que les AP affectent un effecteur cellulaire distinct de leur effecteur naturel (protéase virale) et cause la lipodystrophie.
- Les signes développés chez les souris atteintes de la lipodystrophie seront similaires à ceux observés chez l'humain.

Ces expériences confirmeraient que la souris transgénique CD4C/HIV^{MutG} est un bon modèle pour étudier la lipodystrophie associée à l'utilisation des AP chez les souris Tg exprimant le VIH ainsi que les effets des AP sur la progression d'une maladie similaire au SIDA. De plus, s'il s'avère que des souris développent la lipodystrophie, il sera possible d'en décrire les caractéristiques murines dans ce modèle du SIDA.

Ce qui est intéressant avec la première question de cette troisième étude est que des souris CD4C/HIV^{MutG}, qui n'expriment pas de protéases virales Gag, seront traitées avec un AP. Ces souris seront idéales car, si le traitement affecte la progression de la maladie, cela indiquera que ce n'est pas dû à son interaction avec les protéases virales Gag. Cela confirmerait que l'AP a effectivement un effecteur cellulaire chez la souris et pourrait expliquer comment un traitement d'AP provoque ou accélère l'apparition de différentes maladies liées au SIDA dont la lipodystrophie.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

- Culture des cellules B78, B78MC et 293T :

Les cellules 293T sont une lignée de cellules humaines du rein. Les cellules B78 proviennent de myélomes de souris tandis que les cellules B78MC sont des cellules B78 contenant des segments de chromosomes humains. Les cellules 293T et B78 sont maintenues dans du milieu de culture DME contenant 10% FCSI (HyClone) tandis que les cellules B78MC sont maintenues dans du milieu DME contenant 10% FBSI (HyClone) ainsi que de l'hygromycine à 400 µg/mL (Roche). Toutes les cellules croissent dans une atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO₂.

- Production de virus :

Les virus (VSV-G/NL4 et VSV-G/pBabe-Cyc.T-GFP/ψ-Mov) sont produits en utilisant la méthode de transfection au calcium phosphate. La veille de l'expérience, les cellules 293T sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 100 mm à 6.5×10^5 cellules dans 10 mL de milieu de culture et incubées à 37°C. Avant la transfection, 2 mL du milieu de culture est enlevé puis 100 µL de Chloroquine (compagnie) 100X est rajouté aux cellules. Pour la transfection, le mélange de plasmides est préparé ainsi : 124 µL de chlorure de calcium 2M (Sigma), 5 à 10 µg de chaque plasmide et le tout est complété à 1 mL d'eau. Ce mélange est ajouté en barbotant à un volume égal de solution HBS 2X (« HEPES buffered saline ») (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄). Après deux minutes, le mélange est ajouté goutte par goutte aux cellules et incubées à 37°C pendant 4 à 6 heures. Le milieu de culture est ensuite aspiré et remplacé par du milieu de culture frais. Les cellules sont incubées pendant 48 heures à 37°C. Le surnageant est centrifugé pendant 5 à 10 minutes à 2000 rpm et passé à travers un filtre de 0.2 microns. Il est ensuite quantifié par rAdT (poly(rA)oligo(dT)) VIH (VSV-G/NL4) ou murin (VSV-G/pBalb-Cyc.T-GFP/ψ-Mov).

- rAdT VIH/murin :

La technique du rAdT, décrite par le groupe de Hoffman et al. (1985), est utilisée afin de déterminer le taux de transcriptase inverse. Le rAdT VIH est utilisé uniquement avec le VIH tandis que le rAdT murin est utilisé pour les autres rétrovirus. Les deux techniques se différencient seulement au niveau du pool de solutions. Le surnageant des cellules en culture est recueilli et centrifugé pendant 5 min à 2000 rpm afin d'enlever les débris cellulaires. Un mL du surnageant est prélevé et centrifugé pendant 30 min à 10 000 rpm. Il est ensuite aspiré et puis le culot est resuspendu dans 100 µL de Tris-HCl 0.01 M (Fischer Scientific) équilibré au pH 8.0. Ce mélange est incubé pendant une heure à 4°C et puis agité au Vortex. L'échantillon est divisé en deux (50 µL) et un même volume (50 µL) provenant du pool VIH (5 µL Tris-HCl pH 8.0; 0.5 µL DTT 1M (dissout dans 10 mM de sodium acétate pH 5.3) (Boehringer Mannheim); 2.5 µL MgCl₂ 0.2 M (Fisher Scientific); 15 µL KCl 1M (Fisher Scientific); 5 µL Triton X-100 1% (Fisher Scientific); 5 µL GSH 6 mM (Sigma); 5 µL EGTA 10 mM (Sigma); 10 µL oligo dT (20 µg/mL) (Amersham Bioscience); 1 µL poly A (2 mg/mL) (Amersham Bioscience); 0.1 µL dTTP (α-³²P) (Amersham Bioscience) et 0.9 µL d'eau) ou provenant du pool murin (5 µL Tris-HCl pH 8.8; 10 µL DTT 0.2 M (dissout dans 10 mM de sodium acétate pH 5.3); 3 µL MnCl₂ 0.02 M (Fisher Scientific); 2 µL NaCl 3M (EM Science); 5 µL oligo dT (20 µg/mL); 10 µL poly A (100 µg/mL); 0.1 µL dTTP (α-³²P); 5 µL TTP 0.2 mM (Boehringer Mannheim) et 9.9 µL d'eau) est rajouté. Le mélange est incubé pendant une heure à 37°C. Sur glace, 0.1 ml de pyrophosphate de sodium 0.1 M (Fisher Scientific) et 0.1 ml de TCA (acide trichloroacétique) 25% (ACP) sont ajoutés, agités au Vortex et incubés pendant une heure à 4°C (suite à cette incubation, les échantillons peuvent sortir du P3). Chaque échantillon est ensuite filtré et rincé avec du TCA 5% froid. Les filtres sont déposés dans des bouteilles de scintillation 20 mL (Fisher Scientific) et puis 5 mL de Cyto Scint (ICN) est ajouté. Chaque échantillon est compté au compteur Bêta LKB (Wallac).

- Essai MAGI :

Au premier jour, les cellules MAGI (indicateur d'activation multinucléaire de la galactosidase) (HeLa-CD4-LTR- β -gal-CXCR4) sont passées à 60 000 cellules dans des plaques de 24 puits. Au second jour, les dilutions de virus (1/10 : 1/100 : 1/1000) sont préparées dans du milieu de culture MAGI (Milieu de culture DME; 10% FCSI; 0.2 mg/mL G418 (Gibco-BRL); 0.1 mg/mL hygromycine B (Sigma); 31 μ g/mL puromycine) contenant du DEAE Dextran 10X. L'ancien milieu est aspiré et 250 μ L des dilutions de virus sont déposés dans chaque puits. Les cellules sont incubées pendant 2 heures en agitant au 45 min. Un mL de milieu de culture MAGI est ajouté et les cellules sont incubées pendant 48 heures à 37°C. Le milieu de culture est remplacé par le même volume de solution de fixation (PBS 1X; formaldéhyde (37%) 1%; glutaraldéhyde (25%) 0.2%) et incubé pendant 5 min. La solution de fixation est enlevée et les cellules sont rincées 2 fois au PBS. La solution de coloration (400 μ L) (PBS 1X; ferrocyanide de potassium 4 mM (Sigma); ferricianide de potassium 4 mM (Sigma); chlorure de magnésium 2 mM (Fischer Scientific); X-gal (X-gal; DMSO) 0.4 mg/mL (Gibco-BRL)) est ajoutée pour une durée de 2 heures à 37°C. Les cellules sont lavées trois fois au PBS et comptées au microscope. Les cellules positives, qui sont bleues, sont ensuite comptées. Finalement, le titre est calculé en soustrayant le compte de cellules du contrôle négatif de celui de l'échantillon et multiplié par la dilution et par la quantité de virus utilisée.

- Infection des cellules B78, B78MC et 293T avec le virus VSV-G/VIH :

La veille de l'infection, les cellules sont passées afin d'avoir un pétri confluent à 60-70% le jour de l'infection. Le lendemain, le milieu est aspiré et remplacé par un mélange d'un mL de virus contenant du polybrène (Sigma) à 8 μ g/mL. Les cellules sont incubées à 37°C pendant une heure en agitant au 15 à 20 min. Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS. Par la suite, du milieu frais est rajouté et les cellules sont incubées pendant 24 à 48 heures. Le surnageant est centrifugé pendant 10 min à 2000 rpm et le surnageant est conservé à -80°C. Les cellules sont lavées au PBS, traitées à la trypsine et puis récoltées. Elles sont ensuite divisées dans deux tubes qui seront utilisés pour les extractions de protéines et d'ARN.

- Extraction d'ARN :

Les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 13 000 rpm. Le surnageant est aspiré et les cellules sont resuspendues dans deux mL du réactif Trizol® (Invitrogen). Les cellules sont homogénéisées avec une pipette pasteur et puis sorties du P3 après 30 min. Du chloroforme (Fisher Scientific) est ajouté à une concentration de 0.2 mL par un mL du réactif Trizol. Le tout est mélangé vigoureusement et gardé à température de la pièce (RT) pendant trois min. Ce dernier est centrifugé pendant vingt min à 2000 rpm et gardé à 4°C. Le surnageant est récupéré et 0.5 mL d'isopropanol (Fisher Scientific) par un ml du réactif Trizol est ajouté. Ce dernier est gardé pendant 10 à 30 min à TI et ensuite centrifugé à 4°C pendant 30 min à 2000 rpm. Le culot est resuspendu dans 2 mL d'éthanol 75%, agité au Vortex et ensuite centrifugé à 4°C pendant 10 min à 2000 rpm. Le culot est séché, resuspendu dans 50 µL d'eau DEPC (diéthylpyrocarbonate) et incubé pendant 10 min à 55-60°C. L'ARN est finalement dosé sur gel d'ARN (agarose 1 %; MOPS 1X ; formaldéhyde 1.85 %).

- Buvarbage de type Northern :

L'ARN est migré sur gel d'ARN et transféré sur une membrane de Nylon (Osmonics). Le transfert se fait par une méthode en sandwich. Le montage de la sandwich va comme suit : pellicule de plastique, six papiers Whatman 3M, le gel d'ARN, la membrane de nylon, un papier Whatman 1M et une pile de papier absorbant (5 à 10 cm de hauteur). Le tout est submergé dans 100 à 150 mL de solution SSC 20X (175.3 mg/mL chlorure de sodium; 88.2 mg/mL citrate de sodium (Fisher Scientific) équilibré au pH 7.0). Le transfert se fait pendant la nuit. Au lendemain, la membrane est séchée et puis fixée pendant 3 min sous les lumières U.V. La membrane est ensuite incubée pendant 2 heures à 65°C dans 10 mL de tampon de pré-hybridation (SET 4X; Na-4-pyrophosphate 0.1%; SDS 0.2%; héparine 100 µg/mL). Par la suite, le tampon de pré-hybridation est enlevé et remplacé par la même quantité de tampon d'hybridation (SET 4X; Na-4-pyrophosphate 0.1%; SDS 0.2%; dextran sulfate 0.1 mg/mL; héparine 625 µg/mL). Une sonde radioactive reconnaissant le VIH totale est ajoutée et le tout est incubé pendant la nuit à 55°C. Le

lendemain, la membrane est lavée deux fois avec la solution de rinçage #1 (SSC 2X) pendant 30 min à 65°C, deux fois avec la solution de rinçage #2 chauffée (SSC 0.1X; SDS 0.15 %) pendant une heure à 65°C et une fois avec la solution de rinçage #3 (SSC 0.1X). La membrane est séchée et puis exposée pendant la nuit avec un film X-OMAT (Kodak).

Réactions de PCR (réaction en chaîne de polymérase) et séquence des amorces :

Pour les réactions de PCR, la température est maintenue à 94°C pendant 30 secondes, puis 30 secondes à 63°C et 1 min 40 secondes à 72°C durant 30 cycles. Les réactions sont effectuées dans un appareil « DNA Thermal Cycler » (Perkin Elmer). Les réactions PCR sont effectuées avec une préparation de polymérase PFU de haute fidélité (Stratagene) et ce en présence de DMSO 10%. Le premier intron du gène humain CD68 est amplifié par PCR à partir de l'ADN du BAC RPCI-11.C (Invitrogen) en utilisant les amorces suivantes : 5'-CCGGAATTCTGCTGGGGCTACTGGCAG-3' et 5'-TGATCTAGAGTCCCCTGGGCTTTTGGCAG-3'. Ces séquences d'amorces sont extraites de Gough *et al.* (2001).

- Clonage du promoteur hCD68 avec le HIV^{mutG} :

Le fragment BstX I (17659 à 14695) provenant du BAC RPCI-11.C correspond au promoteur du gène humain CD68 (hCD68pro). Le fragment EcoR I (14665) à Xba I (14553) obtenu par PCR correspond à l'intron 1 du gène humain CD68 (hCD68int1). Le fragment BssH II (711) à Sac I (9566) correspond à la séquence du HIV^{mutG} (Hanna *et al.*, 1998) contenant à l'extrémité 3' la séquence de polyadénylation du virus simien 40 (HIV^{mutG}). Les fragments hCD68pro, hCD68int1 et HIV^{mutG} ont été ligasés et insérés dans le vecteur Litmus 29 (New England BioLabs) digéré avec l'enzyme BssH II.

- Les souris :

Les souris utilisées sont des souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV mutant G (colonie fondatrice F27367) ou Ea/HIV (colonie fondatrice F76709). Ces souris sont issues

de croisement avec des souris de lignée C3H et proviennent de l'animalerie restreinte en pathogènes spécifiques (SPF). Les souris utilisées pour les gavages de Norvir® (Abbott) sont âgées entre 7 et 8 semaines lors du début du traitement.

- Gavage des souris :

Dans un premier temps, une expérimentation a été menée pour vérifier si le médicament avait un effet : un gavage à court terme des souris Tg eahiv a alors été fait pendant 21 jours. Dix souris (5 Tg : 5 non Tg (nTg)) sont gavées quotidiennement avec le médicament Norvir® à une concentration de 50 mg/kg/souris.

Le gavage expérimental à long terme dure 6 mois; des souris transgéniques CD4C/HIV^{MutG} sont utilisées. Quatre groupes de souris sont à l'étude : souris Tg ou nTg avec ou sans traitement. Chaque groupe contient 18 à 21 souris âgées de sept à huit semaines. Les groupes avec traitement reçoivent le médicament Norvir® à une concentration de 50 mg/kg/souris. Les groupes sans traitement reçoivent de l'eau stérile. Le gavage se fait avec une sonde de gavage (Fisher Scientific) de calibre 22. Une solution de Norvir® (6 mg/mL) est préparée quotidiennement. La préparation de la solution se fait comme suit : afin d'avoir 50 mg/kg/souris, une souris de 30 g (moyenne) nécessite 1.5 mg du médicament. Le service de santé animale de l'université Laval considère que 250 µL est un volume idéal de gavage. Pour recevoir 1.5 mg par dose de 250 µL, la solution doit être de 6 mg/mL. Les souris sont pesées au début de chaque semaine. Une prise de sang est effectuée au début du traitement ainsi qu'à tous les deux mois ainsi qu'à la fin du traitement. Deux échantillons de sang sont pris avec un capillaire hépariné (Fisher Scientific) et avec un capillaire normal. Le sang est gardé sur la glace pendant une heure dans un tube de 1.5 mL et puis centrifugé pendant 15 min. Le surnageant est transféré dans un tube de congélation 2 mL et entreposé à -80°C. Suite au traitement des souris, elles sont asphyxiées par CO₂ et puis leur sang est prélevé par ponction cardiaque. Le reste de la souris est préservé dans la formaldéhyde 3.7 % (Fisher Scientific) et gardé à 4°C.

- Les anticorps :

Les anticorps p24 et nef sont des sérums obtenus par immunisation de lapins NZW/KBL (Charles River) de 2 à 2.5 kg avec la protéine GST-p24 et GST-nef (1 mg de protéine par immunisation), suivie de réimmunisations avec les protéines (3 réimmunisations à 4 semaines d'intervalle). Par la suite, les lapins ont été saignés et le sérum centrifugé. L'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin (Sigma) est couplé à HRP (peroxydase de raifort). L'anticorps conjugué au fluorochrome Alexa 680 produit chez la chèvre et dirigée contre les IgG de lapin provient de Molecular Probes.

- Extraction de protéines :

Les cellules sont centrifugées pendant cinq min à 13 000 rpm. Le culot est resuspendu dans 250 μ L de tampon de lyse RIPA (PBS 1X à pH 8.0; Igepal (Sigma) 1%; déoxycholate de sodium (Fisher Scientific) 1%; SDS (Fisher Scientific) 0.1%; différents inhibiteurs de protéases : Aprotinine 2 μ g/mL (Fisher Scientific); Leupeptine 2 μ g/mL (Fisher Scientific); Pepstatine 1 μ g/mL (Fisher Scientific) et TLCK 50 μ g/mL et différents inhibiteurs de phosphatases : fluorure de sodium (Fisher Scientific) 200 mM et orthovanadate de sodium (Fisher Scientific) 20 mM). Les échantillons sont incubés pendant 30 min à 4°C et centrifugés à 4°C pendant 30 min à 13 000 rpm. Une quantification par la méthode colorimétrique de micro-BCA (acide bicinchoninique, Sigma) est effectuée afin de déterminer la concentration protéique en suivant les directives du manufacturier.

- Électrophorèse, transfert de protéines et buvardage de type Western :

Électrophorèse :

Une même quantité de protéines (100 μ g) est dénaturée dans le tampon de chargement (Tris 200mM (Fisher Scientific) à pH 6.8; SDS 2%; glycérol 20%; bleu de bromophénol 0.015% (Sigma); β -mercaptoéthanol 1.43 M (Sigma)) en les chauffant pendant 5 min à 100°C. Elles sont ensuite chargées sur un gel PAGE-SDS 10% (électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS) et puis migrées avec un voltage

de 130V en utilisant un appareil électrophorétique de Bio-Rad ("Mini-PROTEIN II") jusqu'à la sortie du bleu de migration.

Transfert de protéines :

Les protéines contenues dans le gel sont ensuite transférées sur une membrane PVDF Immobilon (Millipore) par la méthode de transfert de protéines semi-sec sur l'appareil de Schleicher et Schuell. Le transfert se fait comme pour l'ARN en sandwich. Chaque feuille/membrane/gel est équilibrée pendant 5 minutes dans chacun des mélanges d'anode I (Tris-HCl 0.3 M à pH 10.4), d'anode II (Tris-HCl 25 mM à pH 10.4) et de cathode (Tris-HCl 25mM à pH 9.4; Glycine 40 mM). Le montage de la sandwich va comme suit : deux papiers absorbants trempés dans le tampon de l'anode I (Tris-HCl 0.3 M à pH 10.4); 1 papier absorbant, 1 papier Whatman 3M, la membrane PVDF (immergé pendant 10 secondes dans le méthanol) et le gel de protéine trempé dans le tampon de l'anode II (Tris-HCl 25 mM à pH 10.4); et 1 papier Whatman 3M ainsi que 3 papiers absorbants trempés dans le tampon de la cathode (Tris-HCl 25mM à pH 9.4; Glycine 40 mM). Le transfert s'effectue à un ampérage de 130 mA (par membrane de 54 cm²) pendant 45 minutes.

Le buvardage de type Western

La membrane est bloquée dans 50 mL de tampon tris salin (TBS)(Tris-HCl à 10 mM pH8.0; NaCl 150 mM) contenant du Tween (Sigma) à 0.2% (v/v) (TBST) et du lait écrémé 5% (TBST-L) pendant la nuit à 4°C avec une faible agitation. Le marquage avec l'anticorps (Ac) primaire est effectué en incubant la membrane dans 10 mL TBST-L et du sérum de souris dilué à 1/1000, deux heures à température ambiante avec une faible agitation. La membrane est ensuite lavée 3 à 4 fois dans 30 mL de TBST-L dans des intervalles de 5 min. Le marquage secondaire s'effectue de la même façon que le marquage primaire en incubant cependant 45 minutes. L'Ac secondaire couplé au HRP est dilué à 1/10000 tandis que l'Ac secondaire conjugué au fluorochrome est dilué à 1/5000. La membrane est lavée deux fois rapidement avec du TBST-L, trois fois avec du TBST à 5 min d'intervalle et trois fois avec du TBS à 5

min d'intervalle. Le marquage à l'Ac secondaire couplée à HRP est révélé avec le substrat luminogène de la trousse "Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus" (Perkin Elmer) puis exposé au contact d'un film X-OMAT. Le marquage à l'Ac secondaire conjugué au fluorochrome est révélé avec le système d'imagerie infrarouge "Odyssey" (Li-Cor) qui numérise l'image.

- Purification de la protéine GST-p24 :

Induction :

La journée précédant l'expérience, 0.2 mL de bactérie contenant le plasmide (NL4-p24/pGex.3x) est ajouté à 100 mL du milieu de culture LB et incubé à 37°C avec agitation. Le lendemain, le bouillon bactérien est transféré dans 900 mL du milieu de culture LB contenant de l'ampicilline 50 µg/mL et incubé pendant une heure à 37°C. Ensuite, 0.1 mM d'IPTG et le milieu de culture sont incubés pendant 4 heures à 37°C avec agitation. Ce dernier est centrifugé à 3500 rpm pendant 20 min à 4°C. Les bactéries sont resuspendues dans 200 mL de milieu de culture LB et puis divisées dans 4 tubes de 50 mL de type "Sorval". Ces tubes sont centrifugés à 8000 rpm pendant 10 min à 4°C dans la centrifugeuse Sorval RC 5B. Les culots sont par la suite congelés dans l'azote liquide. Deux tubes sont transférés à -80°C et deux tubes sont conservés pour les étapes subséquentes.

Lyse de bactéries : Les étapes qui suivent se font sur de la glace. Le culot est resuspendu dans 4 mL de tampon de lyse refroidi sur glace (Tris 100 mM pH 8.0; EDTA 1.5 mM; sucrose 10%) et 80 µL de lysozyme 5 mg/mL (Amersham Pharmacia Biotech) est rajouté. Le culot est incubé pendant 30 min sur de la glace et congelés dans l'azote liquide.

Purification de la protéine :

Suite à la décongélation des culots sur glace, 32.5 mL de tampon d'extraction (Tris 10 mM pH 8.0; EDTA 16 mM; sucrose 10%; NaCl 50 mM; DTT 1M; o-phenantroline 0.43 mM (Sigma)) et puis 750 µL de N-laurylsarcosine 10% (Sigma) est ajouté. Les culots bactériens sont soniqués sur de la glace 3 fois 45 secondes en alternant les positions élevées 2 et 3. Les échantillons sont centrifugés à 10 000 rpm pendant 15 min à 4°C. Les surnageant visqueux sont transférés dans de nouveaux tubes

contenant du Triton X-100 2%, mélangés et incubés pendant 15 min sur de la glace. Ensuite, du $MgCl_2$ à une concentration finale de 1.25 mM est rajouté et mélangé par inversion. Ensuite, du $CaCl_2$ à une concentration finale de 1.06 mM est ajouté, mélangé et incubé pendant 20 min sur de la glace. Les échantillons sont centrifugés à 10 000 rpm pendant 30 min à 4°C et le surnageant est divisé à part égale dans deux tubes de 50 mL. Des billes d'agarose-glutathione (4 mg préalablement dissout dans 500 μ L d'eau la veille) (Sigma) sont ajoutées dans chaque échantillon et le tout est incubé pendant la nuit à 4°C avec agitation. Le lendemain, ils sont centrifugés à 1000 rpm pendant 5 min à 4°C et les culots sont conservés. Ces derniers sont lavés avec du PBS-Triton X-100 1% et lavés deux fois avec du PBS 1X en utilisant les mêmes paramètres de centrifugation. Suite à la dernière centrifugation, les surnageant sont aspirés tout en conservant un ratio 50 :50 (billes d'agarose-glutathione : PBS). La quantification est par la suite effectuée sur un gel PAGE-SDS 10 % polyacrylamide. Une courbe de standard de 10, 20 et 50 μ g de BSA (New England BioLabs) est migrée côte à côte avec 15 μ L de la suspension GST-p24 afin de déterminer approximativement la concentration de l'échantillon de GST-p24.

- Tests de statistiques :

Les données ont été analysées par le T-test de Student à l'aide de Microsoft Excel (Seattle, WA). Les valeurs $p < 0.05$ ont été considérées comme étant significatives.

RÉSULTATS

1. L'étude traitant des blocages de la réplication du VIH chez la souris aux phases d'assemblage et de maturation du cycle de réplication.

Afin d'étudier les blocages au niveau de l'assemblage et de la maturation du VIH chez la souris, une série de cellules hybrides (souris/humaines) ont été utilisées (gracieuseté du Dr. Chevrette – groupe CANVAC). Ces cellules B78MC, des mélanomes murins, contiennent le gène de la cycline T1 humain ainsi qu'un complément de certains chromosomes humains insérés de façon aléatoire.

1.1. Production du pseudotype VSV-G/NL4 :

Afin de pouvoir infecter ces cellules murines dépourvues des récepteurs permettant l'infection par le VIH, un pseudotype de virus (VSV-G/NL4) a été produit car sa glycoprotéine de surface, VSV-G, possède un plus grand tropisme cellulaire. Pour ce faire, la technique de transfection calcium-phosphate a été utilisée (voir section matériel et méthodes). Suite à cette transfection, le surnageant et les cellules ont été récoltées. Le pseudotype, présent dans le surnageant, a été titré en effectuant un essai MAGI (Harada et al., 2004). Le titre obtenu pour le pseudotype était de 1.7×10^8 , ce qui correspond à un bon titre.

1.2. Infection des cellules hybrides B78MC9 :

Une infection de la première cellule hybride obtenue, B78MC9, a été effectuée avec ce nouveau pseudotype. Aux jours 4 et 11, les protéines d'un des 2 pétris récoltés ont été extraites et analysées par immunobuvardage de type Western (Figure 3). L'anticorps utilisé était un α -p24 produit chez le lapin et immunisé avec la protéine de fusion GST p24. Dans cette figure, les trois formes majeures de la protéine Gag (24, 41 et 55 KDa) sont exprimées dans la piste contenant le contrôle positif qui est extrait du VIH (piste 1). Une faible bande entre 41 et 55 KDa est également observée. Les pistes 2 et 3 représentent respectivement l'expression de protéines Gag des extraits de cellules B78 et B78MC9 infectées au jour 4 (Figure 3a). Les extraits cellulaires de B78 n'expriment qu'un faible taux de p24 tandis que les extraits cellulaires de B78MC9 expriment les trois niveaux de Gag. La Figure 3b démontre que les bandes à la hauteur

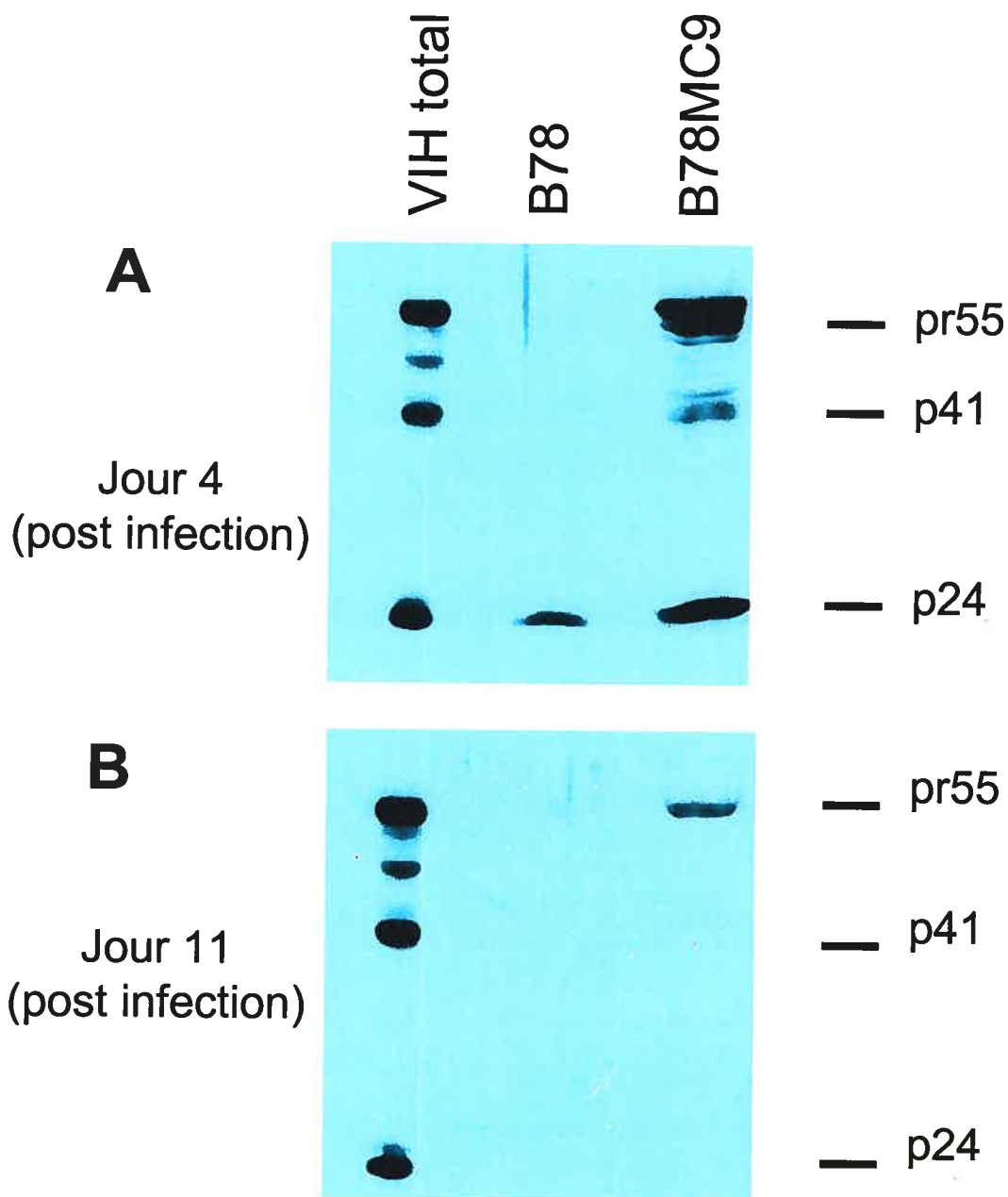


Figure 3 Niveau d'expression des protéines Gag VIH-1 dans la cellule hybride B78MC9 infectée par le VSV-G/NL4. Des cellules hybrides murine/humaine et des cellules humaines ont été infectées avec le pseudotype VSV-G/NL4. Les protéines virales provenant de 100 μ g de lysats cellulaires ont été visualisées par immunobuvardage de type Western et incubé avec l'anticorps p24. Le contrôle positif provient d'un extrait de VIH total. Immunobuvardage de type Western sur : A) des lysats de cellules prélevés au jour 4 suivant l'infection. B) des lysats de cellules prélevés au jour 11 suivant l'infection. Le contrôle positif est un extrait de VIH. On peut observer la protéine précurseuse de 55 KDa, 41 KDa et la protéine mature de 24 KDa.

de p24 et p41 ne sont plus observées pour les extraits cellulaires du jour 11. De plus, l'intensité de pr55 pour B78MC9 a grandement diminué. Afin de vérifier si la quantité de protéines dans chaque puits était similaire, un immunobuvardage de type Western a été tenté avec l'anticorps α -actine. Cependant, suite à des lavages de la membrane pour enlever l'anticorps α -p24, les protéines se sont détachées de la membrane due aux conditions très stringentes de la méthode de lavage. Suite à ce dernier test, aucune expression des protéines d'actine n'était détectée.

Par la suite, les ARN des deuxièmes pétris récoltés aux jours 4 et 11 ont été extraits et analysés par buvardage de type Northern en utilisant une sonde VIH radioactive. L'expression de l'ARN viral est démontrée dans la Figure 4. Les pistes 2 et 4 ainsi que 3 et 5 représentent respectivement l'expression d'ARN VIH des extraits cellulaires de B78 et B78MC9. Les trois formes majeures d'ARN sont observées dans les lignes de B78MC9 mais non dans celles de B78. Il y a donc un bon niveau d'expression du VIH dans cette cellule hybride B78MC9.

Suite à la production d'ARN et de protéines virales, un test supplémentaire a été effectué pour vérifier si l'assemblage et le bourgeonnement s'effectuaient et produisaient de nouveaux virus. Pour ce faire, les surnageants d'infection ont été analysés par la technique du rAdT qui détermine le taux de transcriptase inverse. Ce taux, qui est proportionnel à la quantité de virus dans le surnageant, est indiqué dans le Tableau 1. Le contrôle positif utilisé est un extrait du pseudotype VSV-G/NL4 tandis que le contrôle négatif est un surnageant de cellules B78 non infectées. Le compte rAdT pour les cellules B78MC9 au jour 4 est de 52,512 ce qui correspond à 20% de celui du contrôle positif (251,634), tandis que le compte des cellules B78 au même jour est de 20745 soit 8% de celui du contrôle positif. Les résultats des surnageants au jour 8 sont présentés afin de mieux documenter la baisse progressive d'expression des protéines Gag. Ces résultats démontrent une chute dramatique de la quantité de virus au courant d'une semaine (de 52,512 à 1,147 pour la cellule B78MC9 et de 20,745 à 1,892 pour la cellule B78).

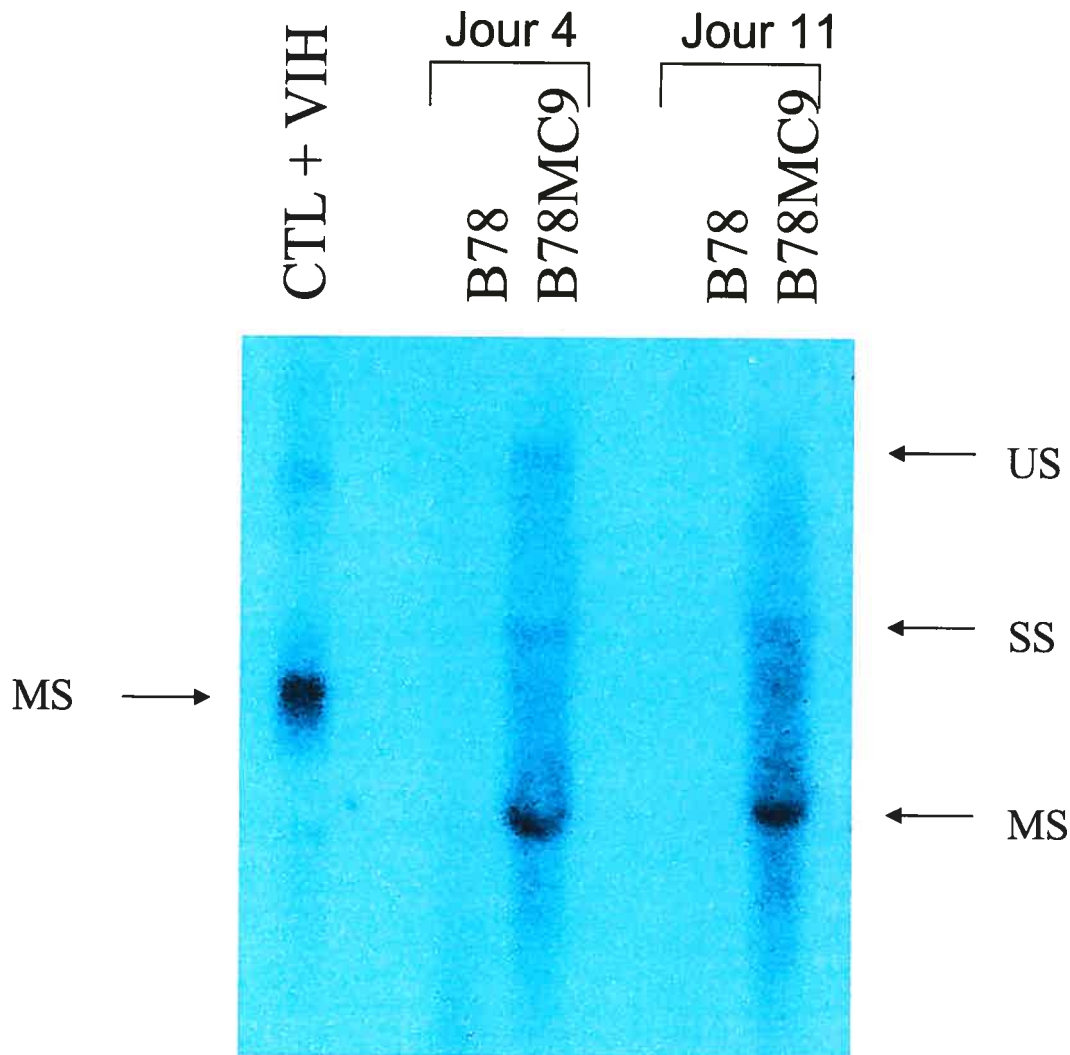


Figure 4 Détection de l'ARN du VIH dans les cellules B78MC9 infectée par le VSV-G/NL4. Des cellules hybrides murine/humaine et des cellules humaines ont été infectées avec le pseudotype VSV-G/NL4. L'ARN des cellules infectées a été purifié et 5 μ g a été analysé par immunobuvardage de type Northern à l'aide d'une sonde VIH total radioactive. Les trois formes majeures d'ARN du VIH, la forme non-épissée (US), la forme épissée (SS) et la forme multi-épissée (MS), sont exprimées. Le contrôle positif (CTL+) est de l'ARN provenant d'une cellule infectée avec une différente construction VIH. On s'attend à observer des longueurs de transcrits différents. Les pistes 2 et 3 représentent les extraits de cellules prélevés au jour 4 suivant l'infection tandis que les pistes 4 et 5 représentent celles prélevées au jour 11 suivant l'infection.

Tableau 1 Quantité de virus produit par les cellules B78MC9

Jour suivant l'infection	Cellules	rAdT
Jour 4	B78	20,745
	B78MC9	52,512
Jour 8	B78	3,684
	B78MC9	10,755
Jour 11	B78	1,892
	B78MC9	1,147
Contrôles	CTL+	251,634
	CTL-	1,446

Des cellules B78 et B78MC ont été infectées avec le pseudotype VSV-G/NL4. Les surnageants provenant de l'infection ont été centrifugés puis le culot a été analysé par la technique du rAdT qui détermine la quantité de virus dans les surnageants. Les contrôles permettent de vérifier si le test rAdT est fonctionnel. Le contrôle positif (CTL+) est le pseudotype VSV-G/NL4 et le contrôle négatif (CTL-) est du milieu de culture frais.

1.3. Infection des cellules hybrides B78MC :

Suite à la première expérimentation où des cellules B78 et B78MC9 ont été infectées, une nouvelle expérimentation a été reprise en incluant en plus des deux types de cellules huit nouveaux hybrides (B78MC5, 10, 11, 12, 16, 24, 30 et 91) contenant également la cycline T humaine. Cette fois-ci, un contrôle additionnel, la cellule 293T, a été utilisé. La cellule 293T ne possède pas les récepteurs permettant l'infection du VIH comme B78. Par contre, elle possède les molécules post-infection permettant la réplication du VIH. Les surnageants ont cette fois-ci été recueillis aux jours 2 et 4 et les extraits cellulaires au jour 4. Les journées ont été changées car les résultats de la première expérimentation montraient qu'après le jour 4 (et les passages de cellules), les taux d'expression recherchés diminuaient. L'expression des protéines Gag est illustrée dans la Figure 5. Les hybrides et le contrôle positif 293T expriment les trois formes majeures de Gag contrairement au contrôle négatif (B78) où aucun signal n'est observé. Les cellules avec la plus forte expression de protéines Gag sont B78MC10, 11 et 24. À l'inverse, les cellules avec la plus faible expression sont B78MC30 et 91. L'expression de Gag est démontrée quantitativement dans le Tableau 2. La section A de ce tableau montre l'intensité lumineuse émise par trois protéines Gag pour chaque échantillon ainsi que le pourcentage de cette intensité comparé à celui du contrôle 293T. Pour p55, cinq cellules hybrides expriment un niveau plus élevé que la cellule 293T (l'expression varie de 109 à 177%). Pour p41, c'est aussi le cas pour trois cellules hybrides où l'expression varie de 106 à 143% de celle de 293T. Pour ce qui est de la protéine p24, aucune cellule hybride n'exprime davantage que 293T (12 à 71%). Les cellules 10 et 24 (respectivement à 71.1% et 55.9%) ont les taux de p24 qui se rapprochent le plus de 293T (100%). Pour ce qui est du contrôle négatif B78, il ne montre aucun signal. Dans la section B, les taux d'intensité de Gag (p55, p41 et p24) sont rassemblés par cellules. Le taux de Gag est comparé au taux de p24 de la même cellule. Le ratio de chaque protéine Gag est calculé par rapport à la protéine p24 dans la même cellule. Les cellules hybrides affichant des taux d'intensité lumineuse les plus forts (B78MC9, 10, 11, 12 et 24) ont un ratio de protéines similaires entre les protéines p55, p41 et p24, cette dernière étant moins exprimée, et les deux autres beaucoup plus fortes, d'abord la p55 et enfin la p41. En général, le ratio de p24 :p41 :p55 de chaque hybride se ressemble, soit qu'il y a 1.5 à 2

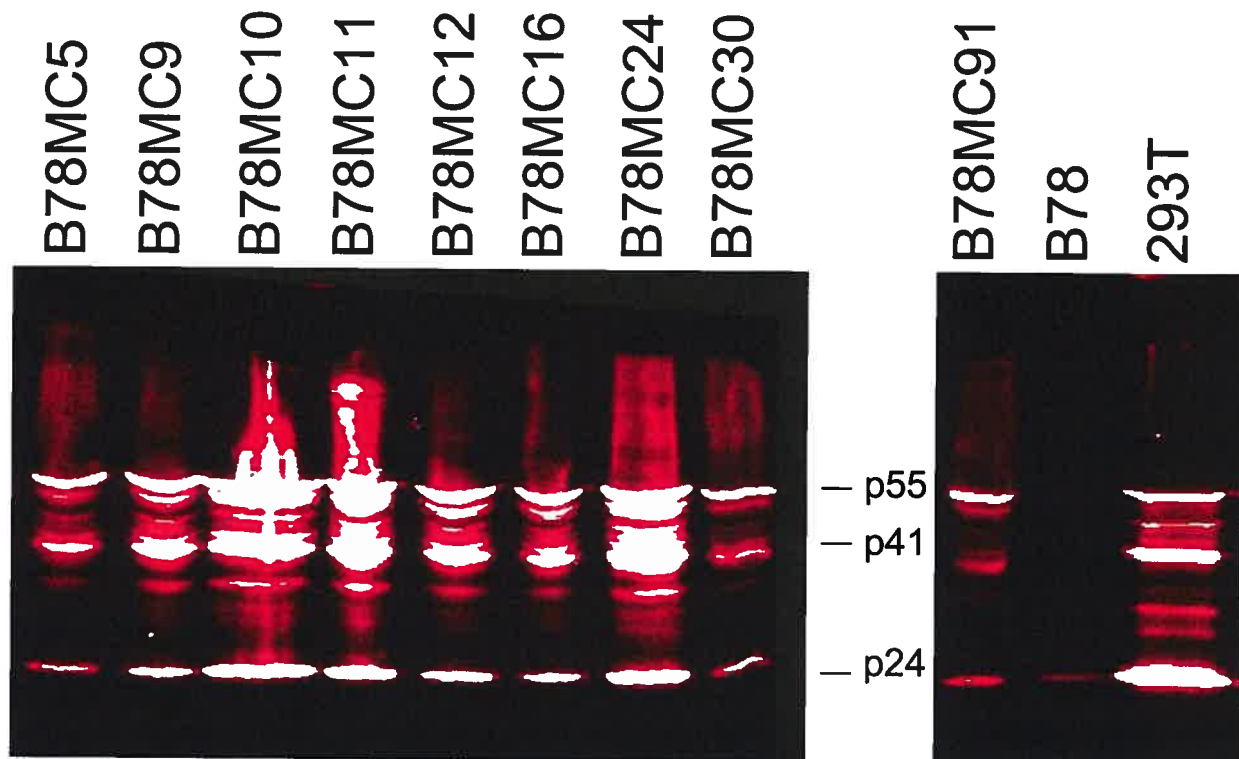


Figure 5 Niveau d'expression des protéines Gag du VIH dans les cellules hybrides B78MC infectées par le VSV-G/NL4. Neuf cellules hybrides murines/humaines, des cellules murines et des cellules humaines ont été infectées avec le pseudotype VSV-G/NL4. Les protéines virales retrouvées dans les lysats cellulaires du jour 2 ont été visualisées par immunobuvardage de type Western et incubé avec l'anticorps p24. Cent μ g de lysat de protéines ont été chargés sur le gel. Les trois formes majeures de Gag (p55, p41 et p24) sont exprimées.

Tableau 2 Comparaison des taux d'expression de Gag des cellules B78MC

A			B			
p55			Cellules	Gag	Intensité	% au p24
Cellules	Intensité	Cellule/293T				
B78MC5	599.3	84.6%	B78MC5	p55	599.3	203.8%
B78MC9	768.8	108.5%		p41	567.4	192.9%
B78MC10	1252.0	176.7%		p24	294.1	100.0%
B78MC11	961.6	135.7%				
B78MC12	797.5	112.5%	B78MC9	p55	768.8	167.7%
B78MC16	657.0	92.7%		p41	864.0	188.5%
B78MC24	964.4	136.1%		p24	458.3	100.0%
B78MC30	596.0	84.1%				
B78MC91	474.5	66.9%	B78MC10	p55	1252.0	118.3%
B78	46.0	6.5%		p41	1351.6	127.7%
293T	708.7	100.0%		p24	1058.6	100.0%
			B78MC11	p55	961.6	137.1%
				p41	995.2	141.9%
				p24	701.2	100.0%
			B78MC12	p55	797.52	146.2%
				p41	892.4	163.6%
				p24	545.5	100.0%
			B78MC16	p55	657.0	160.6%
				p41	649.5	158.8%
				p24	409.0	100.0%
			B78MC24	p55	964.4	115.8%
				p41	1218.1	146.3%
				p24	832.5	100.0%
			B78MC30	p55	596.0	215.8%
				p41	351.5	127.3%
				p24	276.1	100.0%
			B78MC91	p55	474.5	259.3%
				p41	139.2	76.1%
				p24	183.0	100.0%
			B78	p55	46.0	51.1%
				p41	28.1	31.2%
				p24	90.0	100.0%
			293T	p55	708.7	47.6%
				p41	943.0	63.4%
				p24	1487.9	100.0%

p41		
Cellules	Intensité	Cellule/293T
B78MC5	567.4	60.2%
B78MC9	864.0	91.6%
B78MC10	1351.6	143.3%
B78MC11	995.2	105.5%
B78MC12	892.4	94.6%
B78MC16	649.5	68.9%
B78MC24	1218.1	129.2%
B78MC30	351.5	37.3%
B78MC91	139.2	14.8%
B78	28.1	3.0%
293T	943.0	100.0%

p24		
Cellules	Intensité	Cellule/293T
B78MC5	294.1	19.8%
B78MC9	458.3	30.8%
B78MC10	1058.6	71.1%
B78MC11	701.2	47.1%
B78MC12	545.5	36.7%
B78MC16	409.0	27.5%
B78MC24	832.5	55.9%
B78MC30	276.1	18.6%
B78MC91	183.0	12.3%
B78	90.0	6.0%
293T	1487.9	100.0%

Tableau 2 Comparaison des taux d'expression de Gag des cellules B78MC. A) Les taux d'intensité pour chaque cellule sont séparés selon la protéine Gag (p55, p41 ou p24). Chaque intensité est par la suite comparée à celle de la cellules 293T dans la troisième colonne. B) Les taux d'intensité des protéines Gag sont séparés selon la cellule afin de déterminer le ratio entre les différentes protéines Gag selon la cellule hybride. Chaque intensité est par la suite comparée à celle de la protéines p24 dans la troisième colonne.

fois plus de pr55 et p41 que de p24. Par contre, le ratio de ces protéines dans les cellules 293T semble être l'inverse; il y a deux fois plus de p24 que de p41 ou de pr55. Afin de vérifier si la quantité de protéines dans chaque puits était similaire, un immunobuvardage de type Western a été tenté avec l'anticorps α -actine. Cependant, les protéines se sont également détachées de la membrane durant les lavages et aucune expression n'était détectée.

La Figure 6 montre l'expression de l'ARN VIH des cellules infectées. Une fois de plus, la sonde VIH radioactive a été utilisée. L'ARN de 293T est partiellement dégradé mais les trois formes majeures d'ARN du VIH (les deux formes épissées et la forme non-épissée) sont cependant observables. La cellule B78 (CTL-) est la seule à ne pas exprimer d'ARN VIH. Pour les cellules hybrides, un signal est observé dans tous les cas. Par contre, l'intensité varie significativement selon les cellules utilisées. L'expression des cellules B78MC10, 11 et 24 est la plus forte. À l'opposé, le signal pour B78MC5, 30 et 91 est faible. Finalement, l'expression d'ARN VIH pour chaque cellule hybride paraît proportionnelle au taux d'expression des protéines décrites précédemment.

Pour déterminer la production virale, un test rAdT a été effectué pour chaque cellule (Tableau 3). Pour les surnageants du jour 2 (Tableau 3a), la quantité de virus dans les cellules hybrides n'est pas élevée comparativement au surnageant de 293T. Les cellules B78MC10 et 24 ont pour leur part le plus haut taux de virus, respectivement, à 11.2% et à 16.3% par rapport au taux présent dans les cellules 293T. Ceci représente cependant une faible quantité de virus. Pour ce qui est des surnageants au jour 4 (Tableau 3b), la quantité de virus des cellules 293T est considérablement réduite par rapport au jour 2 (432,777 au lieu de 1,248,416) tandis que celle des cellules hybrides a majoritairement augmenté. La quantité de virus pour B78MC24 est comparable à celle de 293T (soit de 71%). La quantité de virus pour les cellules B78MC10 et 11 a diminué. Ces surnageants, deux des trois plus forts au jour 2, sont au jour 4 les seuls qui montraient une diminution du taux de virus.

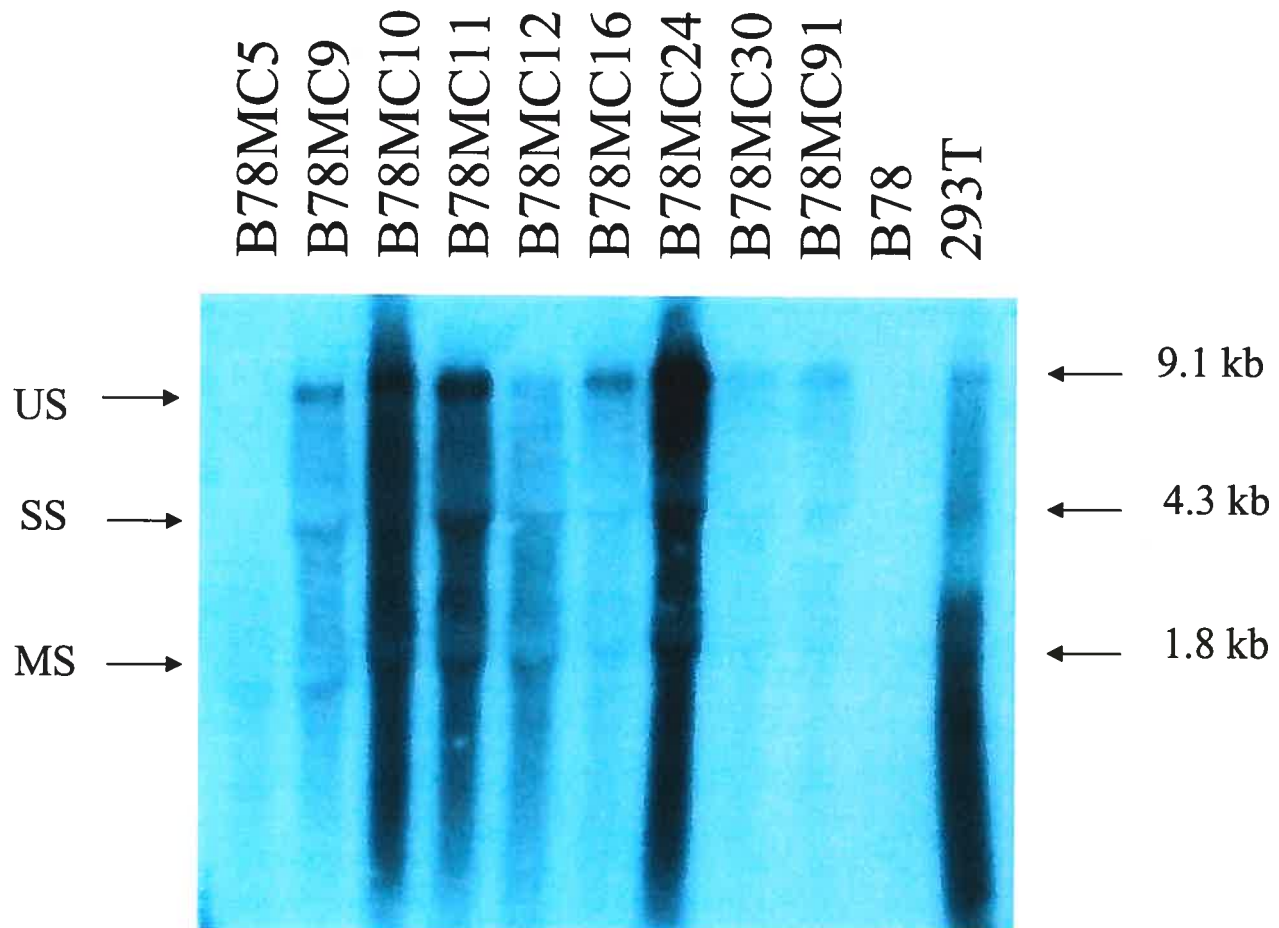


Figure 6 Expression de l'ARN du VIH dans les cellules B78, B78MC et 293T infectées par le VSV-G/NL4. Des cellules murines, hybrides murine/humaine et humaines ont été infectées avec le pseudotype VSV-G/NL4. L'ARN des cellules récoltées au jour 2 suivant l'infection a été purifié et 5 μ g d'ARN a été analysé par immunobuvardage de type Northern à l'aide d'une sonde VIH total radioactive. Les trois formes majeures d'ARN du VIH, la forme non-épissée (US), la forme épissée (SS) et la forme multi-épissée (MS), sont exprimées.

Tableau 3 Production virale dans le surnageant des cellules hybrides B78MC

Jour 2			Jour 4		
Cellule	Pointage moyen (CPM)	Production virale relative	Cellule	Pointage moyen (CPM)	Production virale relative
B78MC5	30,721	2,5%	B78MC5	92,161	21,3%
B78MC9	84,538	6,8%	B78MC9	157,141	36,3%
B78MC10	139,338	11,2%	B78MC10	102,892	23,8%
B78MC11	104,931	8,4%	B78MC11	78,528	18,1%
B78MC12	11,016	0,9%	B78MC12	93,976	21,7%
B78MC16	8997	0,7%	B78MC16	14,745	3,4%
B78MC24	203,118	16,3%	B78MC24	307,108	71,0%
B78MC30	16,343	1,3%	B78MC30	64,403	14,9%
B78MC91	14,282	1,1%	B78MC91	27,092	6,3%
B78	4871	0,4%	B78	2760	0,6%
293T	1,248,416	100,0%	293T	432,777	100,0%
			CTL+	752,429	
			CTL-	2,133	

Des cellules B78 et B78MC ont été infectées avec le pseudotype VSV-G/NL4. Les virus provenant des surnageants de cellules ont été centrifugés et analysés par la technique du rAdT qui détermine la présence de virus VIH. Le contrôle positif (CTL+) est un culot du pseudotype VSV-G/NL4 tandis que le contrôle négatif (CTL-) est un culot de cellules B78 non infectées. Le compte de virus a été comparé au compte de la cellule 293T.

Un essai MAGI a été effectué sur cette production de virus des hybrides pour vérifier si ces virus étaient infectieux. Le Tableau 4 présente le titre des surnageants provenant des cellules hybrides et de la cellule 293T. Ces résultats démontrent qu'il y a présence de virus infectieux mais le titre demeure faible, les plus hauts étant ceux de B78MC24, 10 et 9 avec des taux de 1.1×10^3 , 9.5×10^2 et 9.0×10^2 respectivement.

1.4. Infections avec le pseudotype VSV-G/ ψ -mov/pbabe-cyclT/GFP :

Le groupe du Dr. Chevette possède encore plusieurs hybrides. Cependant, ces nouveaux hybrides ne contiennent pas le gène de la cycline T humaine mais une variété de différents gènes humains qui pourraient être importants dans les dernières étapes de la réplication du VIH. Afin de pouvoir analyser si ces cellules possèdent un ou des facteurs critiques, un nouveau virus a été préparé, soit le pseudotype VSV-G/ ψ -mov/pbabe-cyclT/GFP. Le vecteur ψ -mov encode Gag/Pol ainsi qu'un signal d'encapsidation qui sont nécessaires pour former un virus fonctionnel. Ce pseudotype exprime la cycline T humaine ainsi que la protéine GFP qui peut servir à la sélection de cellules puisque qu'en sa présence, les cellules infectées deviennent vertes. Des cellules B78 ont été infectées pour tester ce pseudotype de virus. Un faible pourcentage de cellules infectées a été observé au microscope à contraste de phases. Un tri de cellules vertes a été effectué et les cellules GFP positives ont été mises en culture. Par faute de temps, ces cellules GFP positives ont été congelées et seront étudiées ultérieurement.

Tableau 4 Titration virale des surnageants des cellules hybrides B78MC par essai MAGI

Cellules	Titre	Cellule/293T
Contrôle + 293T	2,7E+06 1,1E+04	25238,1% 100,0%
B78MC24	1,1E+03	10,2%
B78MC10	9,5E+02	9,0%
B78MC9	9,0E+02	8,6%
B78MC30	6,0E+02	5,7%
B78MC11	5,8E+02	5,5%
B78MC91	5,0E+02	4,8%
B78MC5	3,3E+02	3,1%
B78MC12	1,8E+02	1,7%
B78MC16	1,0E+02	1,0%

Un mL du surnageant de chaque cellule infectée par le pseudotype VSV-G/NL4 a été utilisé pour infecter des cellules MAGI. Le nombre de cellules infectées a été calculé et le titre a été comparé à celui de la cellule 293T infectée.

2. L'étude sur la souris Tg CD68/HIV.

La présente étude a produit des souris CD68/HIV^{MutG} qui expriment le transgène HIV^{MutG} sous le contrôle du promoteur du gène CD68. Ce promoteur est présent dans les cellules de la lignée des phagocytes mononucléaires incluant les monocytes, les macrophages, les microglies, les ostéoclastes et à un niveau plus restreint, les cellules dendritiques immatures. Ces souris ont été générées, d'une part, à partir des souris élaborées par le groupe de Gough et al. (2001) et, d'autre part, d'un fragment du transgène utilisé dans la souris CD4C/HIV^{MutG} (Hanna et al, 1998). Le groupe de Gough et al. (2001) a utilisé deux segments du promoteur du gène CD68 humain, soit le promoteur du gène CD68 de 2.9kb ainsi que l'intron 1 de 111bp de ce même gène, afin de réguler l'expression du gène du récepteur éboueur de classe A (SR-A) dans les cellules mentionnées plus hauts. Afin de pouvoir produire ces souris, le transgène CD68/HIV^{MutG} devait d'abord être généré. Ce transgène comprend trois fragments : le promoteur du CD68, l'intron de ce même gène et le HIV^{MutG} (Figure 7).

2.1. Construction du transgène CD68/HIV^{MutG} :

Dans un premier temps, le promoteur ainsi que l'intron 1 du gène CD68 devaient être amplifiés à partir du BAC #186B7 de la librairie RPCI-11.C provenant de la compagnie Research Genetics. Cependant, seul l'intron 1 n'a pu être amplifié par PCR. La stratégie a donc changé et une série de clonage a été effectuée afin d'obtenir le promoteur du gène CD68. Une fois le promoteur obtenu, un dernier clonage a été effectué pour rassembler les trois fragments du transgène final (pour les étapes du clonage, voir section matériel et méthodes). Le transgène a ensuite été micro-injecté dans des embryons de souris ce qui a donné naissance à 7 souris transgéniques hCD68/HIV^{MutG} fondatrices. À la génération F2, seuls 4 souris fondatrices ont donné naissance à une progéniture assez large pour permettre des analyses.

2.2. Analyse des souris transgéniques CD68/HIV^{MutG} :

L'expression d'ARN viral de 2 à 3 descendants F2 par souris fondatrice a été analysée. Les souris provenant des fondatrices F115707 et F115709 ont obtenu les plus hauts niveaux d'expression. Ces résultats ont été confirmés par immunobuvardage de

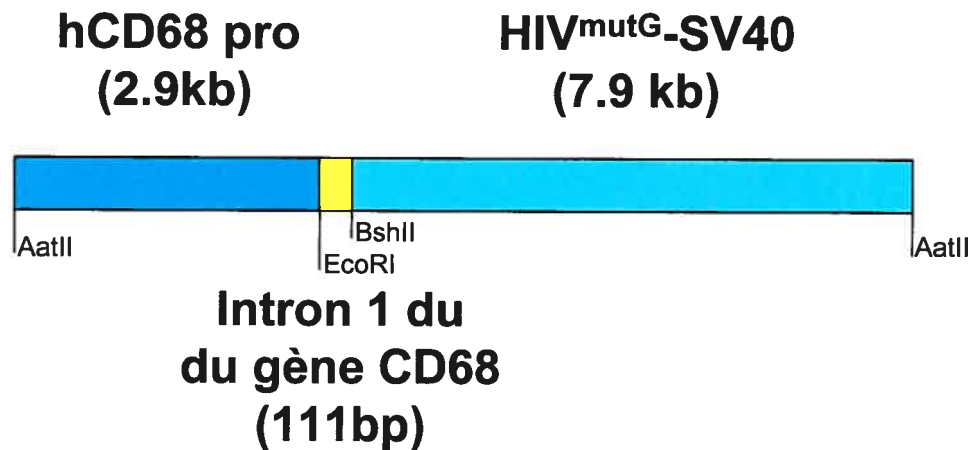


Figure 7 Construction finale du transgène hCD68/HIV^{MutG}. Cette construction s'est basée sur celle développée par le groupe de Gough et al (2001). Cette construction finale a été produite dans le vecteur d'expression Litmus 29 (New England BioLabs) et le transgène a été excisé du vecteur avant d'être inséré par micro-injection afin de produire des souris Tg hCD68/HIV^{MutG}.

type Western suite à l'extraction puis l'analyse des rates des souris ainsi que de leurs ganglions mésentériques. La Figure 8 montre l'expression de la protéine virale Nef (27 kDa). Les niveaux d'expression pour les souris des fondatrices F115705 et F115704 sont très faibles sauf pour la souris 115851 qui démontre une expression légèrement plus forte. L'expression pour les souris des fondatrices F115707 et F115709 semble être plus forte que celles des deux dernières fondatrices. Lorsque l'on compare l'expression de Nef entre les différents tissus de la souris fondatrice F115707, l'expression semble plus forte dans la rate que dans les ganglions mésentériques, tandis que ce ratio est inversé pour les descendants de la fondatrice F115709. L'expression de Nef dans les ganglions mésentériques de la souris 115893 est la plus élevée, même comparée au contrôle positif (Mut G). Il y a également une bande d'environ 66 kDa qui est présente à chacun des échantillons. Il est à noter que cette bande est toujours présente suite à l'utilisation de l'anticorps α -Nef dans notre laboratoire. Cette bande semble donc non spécifique. Pour ce qui est de la santé des souris, après 6 mois de vie, la progéniture des souris fondatrices semble en bonne santé. Cependant, faute de temps, l'apparition de la maladie n'a pas encore été déterminée.

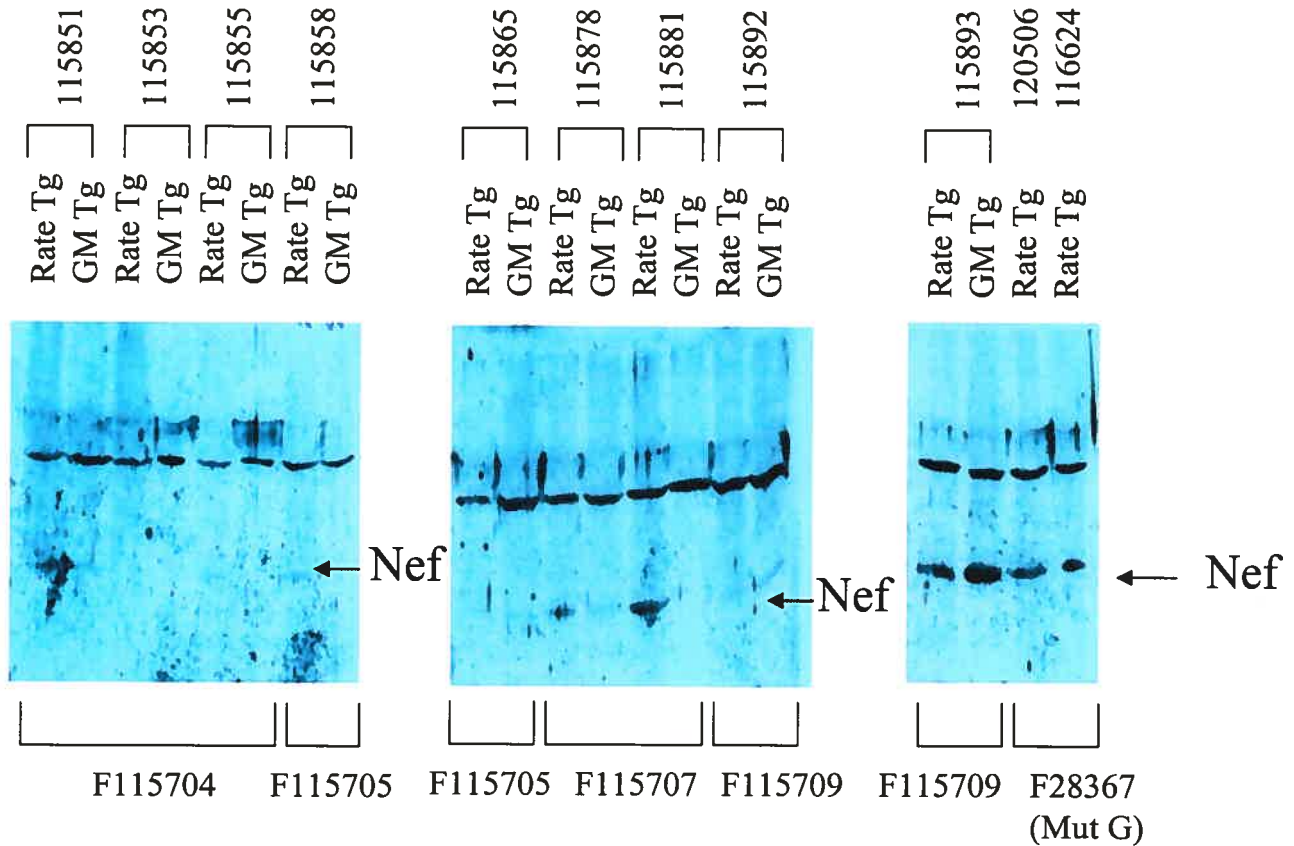


Figure 8 Expression de la protéine Nef dans les souris Tg CD68/HIV^{MutG}. Cent µg de lysats cellulaires des rates et ganglions mésentériques (GM) ont été analysés par immunobuvardage de type Western et incubé avec l'anticorps Nef. Ces protéines proviennent de rates et ganglions mésentériques de progénitures F1 de quatre des sept souris Tg fondatrices produites. Les deux contrôles positifs de Nef proviennent d'extraits cellulaires de la rate de deux souris Tg CD4C/HIV^{MutG}.

3. L'étude de la lipodystrophie causée par le traitement à l'anti-protéase

Dans cette troisième étude, on cherche à déterminer si un traitement d'AP chez des souris transgéniques CD4C/HIV^{mutG} a des effets sur la progression de la maladie et provoque des troubles lipidiques. Mais avant de pouvoir effectuer le traitement d'AP chez ces souris, l'efficacité du ritonavir à bloquer le clivage de Gag doit dans un premier temps être vérifiée chez une autre souris Tg (E α HIV) qui exprime l'effecteur connu des AP (Gag) car la souris Tg CD4C/HIV^{mutG} n'exprime pas. Également, cette expérience préliminaire permettra de déterminer la dose de ritonavir à injecter aux souris. La raison de vérifier la dose de l'AP chez des souris possédant des protéases virales est que si cette dose est suffisante pour affecter le clivage de ces protéases virales, elle le sera pour affecter d'autres protéines ou complexes si cela est le cas.

3.1. Traitement à court terme chez la souris Tg E α HIV :

Avant de commencer le traitement, une analyse de l'expression de ces protéines Gag dans les tissus riches en cellules lymphoïdes de la souris Tg E α HIV (les ganglions périphériques, les ganglions mésentériques, la rate et le thymus) est effectuée pour déterminer les tissus qui expriment le plus le transgène (Figure 9). Les protéines de ces organes des souris sont extraites puis analysées par immunobuvardage de type Western (Figure 10) en utilisant l'anticorps α -p24. Cet anticorps a été fabriqué dans notre laboratoire dans le but d'identifier la présence de Gag chez ces souris Tg E α HIV. Pour ce faire, des protéines recombinantes GST-p24 sont produites pour l'immunisation de lapins afin d'obtenir un anti-sérum spécifique contrant p24 (voir la section Matériel et méthodes). Un excellent titre a été obtenu et l'anticorps est ensuite dilué 1/1000 pour la technique d'immunobuvardage de type Western. Dans la Figure 10, les ganglions mésentériques montrent la plus forte expression de Gag et serviront d'organes cibles lors de la prochaine expérience.

Un traitement de l'AP ritonavir à court terme (21 jours) est effectué sur 10 souris (5 Tg E α HIV : P1, P3, P5, P9 et P10; 5 nTg : P2, P4, P6, P7 et P8) âgées de 1 mois. La dose administrée aux souris traitées est de 50 mg/kg par souris. Pendant ce traitement, une souris Tg (P10) est morte sans raison connue. Deux des 4 souris Tg restantes (P1 et

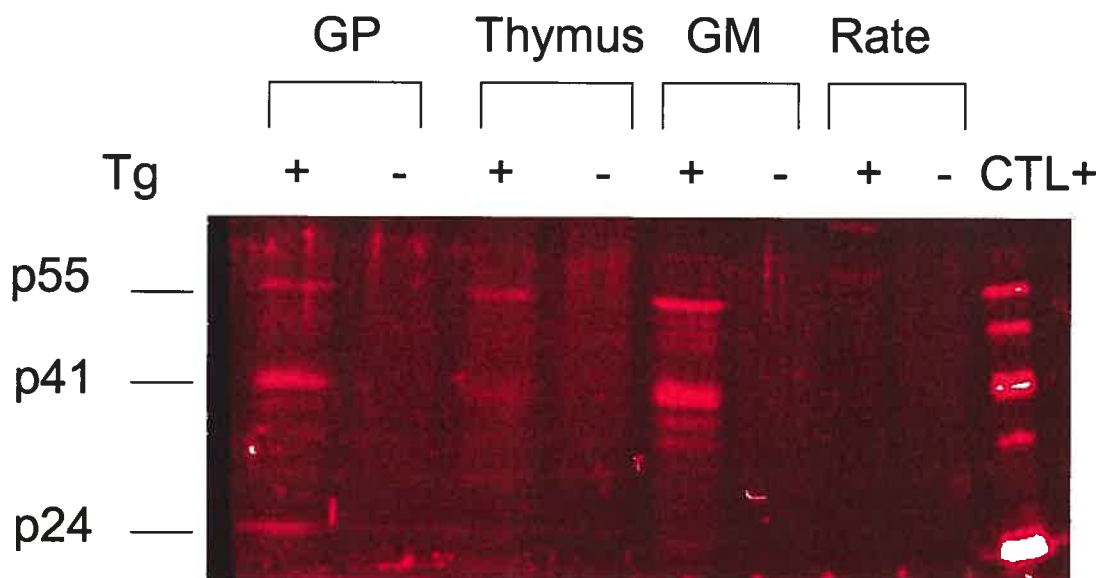


Figure 9 Expression des protéines Gag dans les tissus lymphoïdes d'une souris Tg E α HIV. Cent μ g de protéines de différents organes (ganglions périphériques (GP), thymus, ganglions mésentériques (GM) et rate) de la souris Tg E α HIV ont été analysés par immunobuvardage de type Western et incubées avec l'anticorps p24 pour déterminer l'expression des protéines Gag. Le contrôle positif (CTL+) est un extrait total de protéines du VIH.

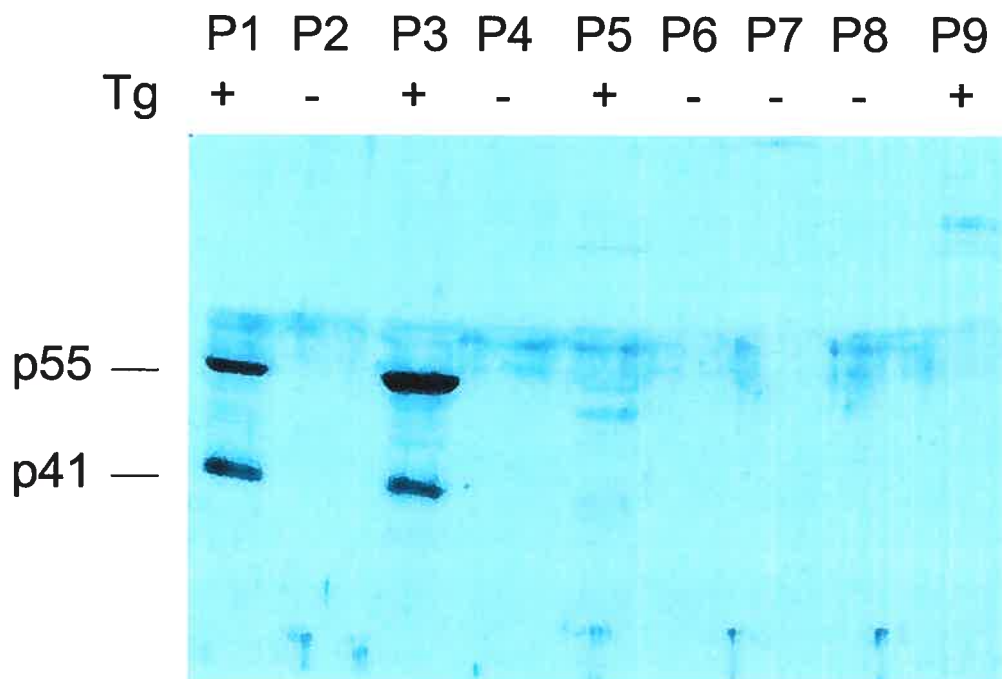


Figure 10 Expression de Gag dans les ganglions mésentériques chez des souris traitées avec le ritonavir. Des souris transgéniques (Tg) E α HIV et des souris non transgéniques (nTg) ont été traitées avec l'anti protéase ritonavir (50 mg/kg/souris) à court terme (21 jours). Cent μ g de lysats cellulaires des ganglions mésentériques ont par la suite été analysés par immunobuvardage de type Western et incubés avec l'anticorps p24.

P3) expriment Gag fortement dans ce tissu, une troisième l'exprime à peine (P5) et la dernière (P9) ne l'exprime pas (Figure 10). Pour la souris P3 qui exprime Gag, le ratio p41/p55 est différent de celui observé lors de l'expression de Gag dans les différents tissus de la souris Tg E α HIV non traitée (voir la Figure 9). Cette souris non traitée exprimait de 2 à 3 fois plus de p41 que de p55 tandis que l'inverse est observé chez la souris traitée P3 qui exprime de 2 à 3 fois plus de p55 que de p41. Pour ce qui est de la souris traitée P1, elle exprime ces deux protéines Gag dans une proportion similaire. Ces résultats permettent de déterminer que le traitement d'AP a un effet chez les souris Tg E α HIV, ce qui donne le feu vert pour démarrer le traitement d'AP chez la souris CD4C/HIV^{MutG}.

3.2. Traitement à long terme chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutG} :

Dans l'expérience suivante, des souris Tg CD4C/HIV^{MutG} sont traitées à long terme (6 mois) avec l'AP ritonavir. Âgées de 1 mois au début de l'expérience, les souris de l'expérimentation sont divisées en 4 groupes de 17 à 21 souris :

- Groupe 1 : souris Tg traitées (Tx);
- Groupe 2 : souris Tg non traitées (nTx);
- Groupe 3 : souris nTg Tx;
- Groupe 4 : souris nTg nTx.

Les souris des deux groupes nTx sont gavées avec de l'eau pour qu'elles subissent le même stress relié à la manipulation.

Onze souris meurent à différents moments de l'expérience. Le Tableau 5 explique en détail le type de souris (Tg et nTg, Tx ou nTx) ainsi que le moment et la raison supposée du décès. De toutes les souris Tg, 22% meurent en montrant des symptômes reliés au SIDA. La Figure 11 présente une courbe de mortalité chez les quatre groupes de souris. Pour ce qui est des souris Tg, il n'y a pas de différence significative entre les fonctions de survie des groupes Tx et nTx, sur une période de 6 mois. Il en est de même chez les souris nTg. Une différence significative est constatée lorsque les fonctions de survie des souris Tg et des souris nTg sont comparées : les souris Tg sont plus malades. Ce résultat était prévisible puisqu'il est normal que les souris Tg

Tableau 5 Données sur les souris mortes durant le traitement à long terme.

Souris	Tg/nTg	TTT/nTTT	Durée	Raison
127484	nTg	TTT	5 mois	malade
127493	Tg	nTTT	5 mois	?
127507	Tg	nTTT	0.5 mois	malade
127509	Tg	nTTT	3 mois	?
127629	Tg	TTT	4 mois	malade
127630	Tg	nTTT	5 mois	malade
127631	Tg	TTT	5 mois	malade
127644	Tg	nTTT	6 mois	malade
127645	Tg	nTTT	6 mois	malade
131270	nTg	TTT	2 mois	malade
131272	Tg	TTT	4 mois	malade

Quatre groupes de souris ont été traités avec l'AP ritonavir. Ces groupes comprennent les souris Tg/TTT, les Tg/nTTT, les nTg/TTT et les nTg/nTTT. La durée signifie le nombre de mois que la souris a été sous traitement avant son décès. La dernière colonne indique la cause de mortalité : malade signifie que la souris est morte de la maladie similaire au SIDA humain et le ? signifie que la souris est morte pour des raisons inconnues.

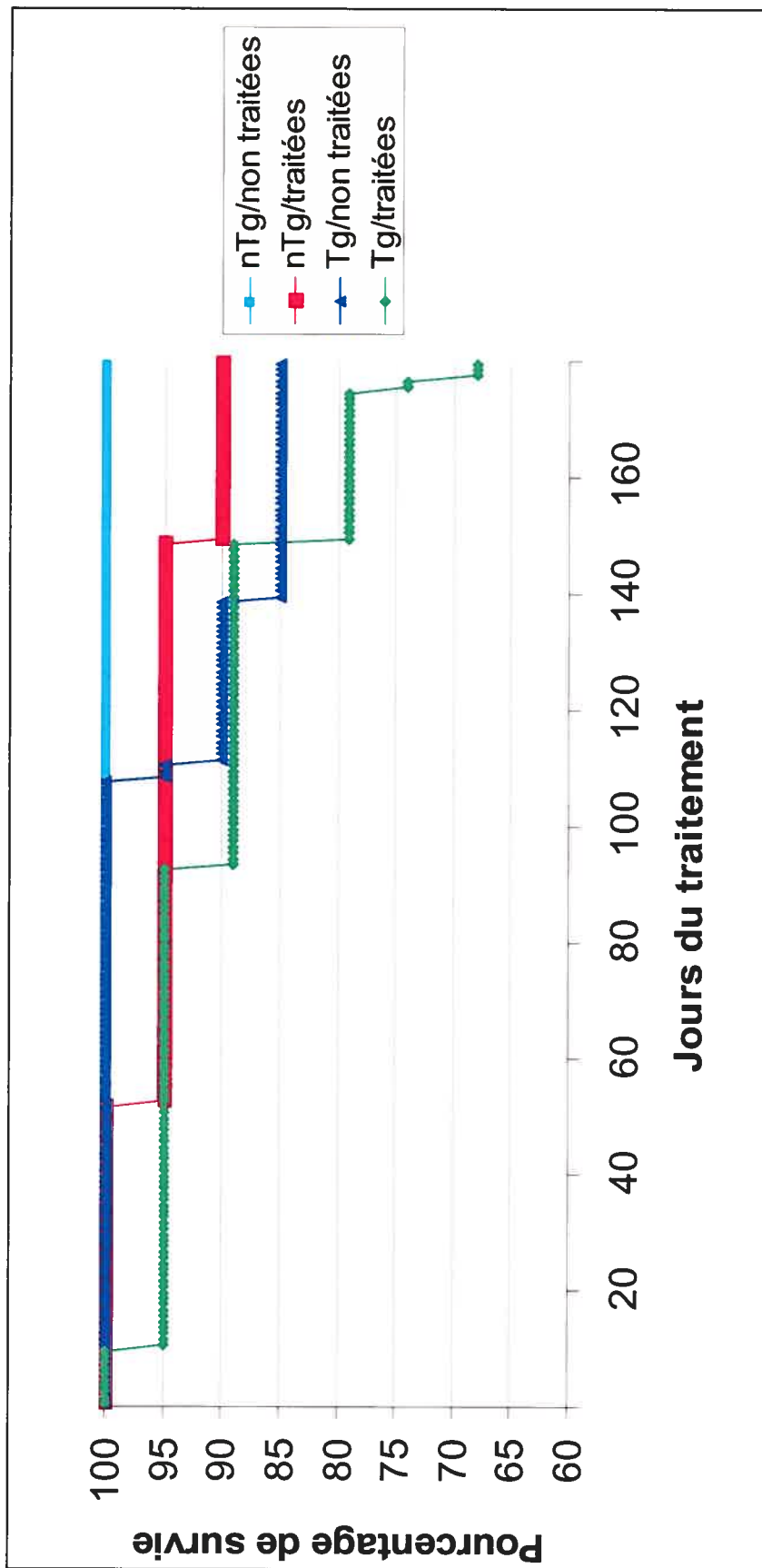


Figure 11 Courbe de mortalité des souris traitées à long terme. Des souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV/MutG et des souris non transgéniques (nTg) ont été traitées pendant 6 mois avec le ritonavir (50 mg/kg/souris). Cette figure représente le pourcentage de souris vivantes durant le traitement de chaque groupe.

CD4C/HIV^{MutG} deviennent malades tel que décrit dans l'introduction (Hanna et al., 1998). Selon les tests statistiques, le traitement ne semble pas avoir d'effet sur la mort des souris durant l'expérience. Les souris Tg semblent mourir de la maladie similaire au SIDA : ils ont le dos courbé, le poil hérissé et une mobilité réduite. Quatre des neuf souris connaissent une chute de poids les jours précédant leur mort et témoignent de signes de maladies rénales et spléniques (L'annexe 1 contient les observations corporelles et la condition des reins et de la rate). Un exemple de souris Tg et nTg est illustré dans la Figure 12. Des caractères représentatifs comme le dos rond, le poil hérissé (Figure 12c), la décoloration et la présence de granules sur le rein (Figure 12d) sont très visibles chez la souris transgénique. Par contre, chez la souris nTg décédée, aucun de ces symptômes n'est apparent dans les organes (Figure 12a, b). Quant aux souris qui survivent au traitement complet de six mois, six souris ont des signes précoces de la maladie : le dos très rond, le poils hérissé ou une mobilité réduite. Cependant, ces souris se montrent assez fortes et survivent jusqu'à la fin de l'expérience. Aucune d'entre elles ne présente de chute de poids avant le sacrifice. Quatre d'entre elles sont Tg, dont trois sous traitement d'AP, tandis que deux d'entre elles sont nTg, dont une sous traitement. Aucune conclusion valable ne peut toutefois être tirée de ces observations.

Pendant le traitement, le poids de chaque souris est déterminé au début de chaque semaine (voir l'annexe 2). La Figure 13 présente l'analyse de ces poids entre les quatre groupes de souris. Il s'avère que le groupe de souris nTg Tx présente des valeurs significativement plus élevées que celles des groupes de souris Tg Tx et nTg nTx. En moyenne, les souris nTg Tx ont 4.14 mg de plus que les souris Tg Tx et 1.98 mg de plus que les souris nTg nTx. Cela signifie que les souris nTg sont sensibles au traitement d'AP et que ce dernier cause une augmentation du poids chez les souris nTg.

À la fin de l'expérience, des échantillons de sérum sont prélevés sur les souris à l'exception de sept d'entre elles car leur sang avait coagulé au moment de leur mort. Ces échantillons sont par la suite analysés afin de déterminer la quantité des constituants sanguins tels que l'albumine, l'urée, la créatinine, le glucose et des constituants lipidiques tels que le cholestérol, les triglycérides et les lipoprotéines de haute densité (HDL) (voir

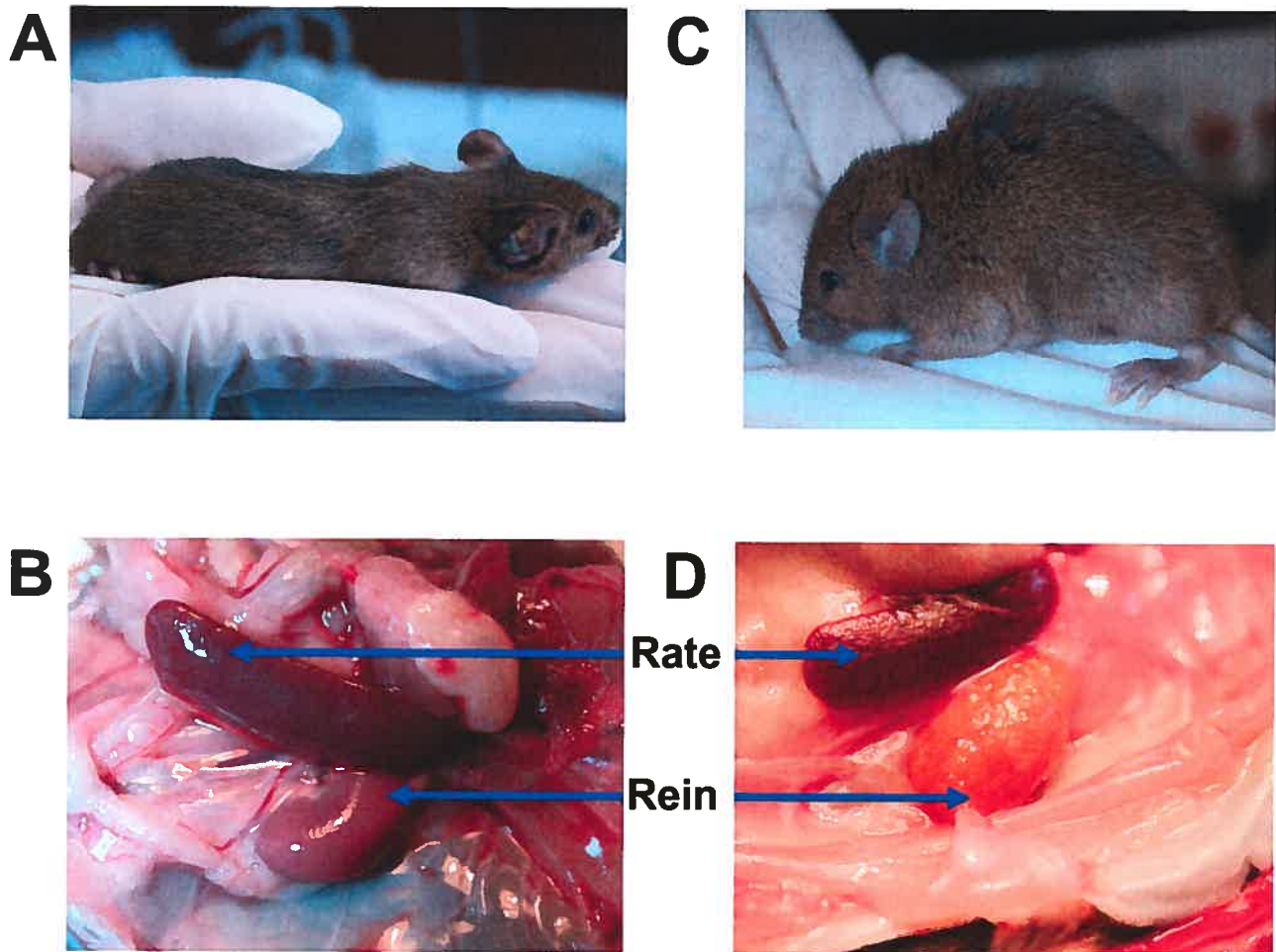


Figure 12 Symptôme de la maladie similaire au SIDA humain chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutG}. Ces souris ont été traitées avec l'anti protéase ritonavir à long terme (6 mois). A) Souris non traitée non transgénique en santé ne démontrant aucun des effets retrouvés chez la souris Tg malade. B) Rate et rein de la souris en santé. Une coloration et une taille normale du rein et de la rate sont observées. C) Souris malade démontrant un phénotype typique des la maladie similaire au SIDA humain chez la souris. D) Rate et rein d'une souris malade. Il est à noter que la rate est de petite taille et que le rein est décoloré avec des granules à sa surface.

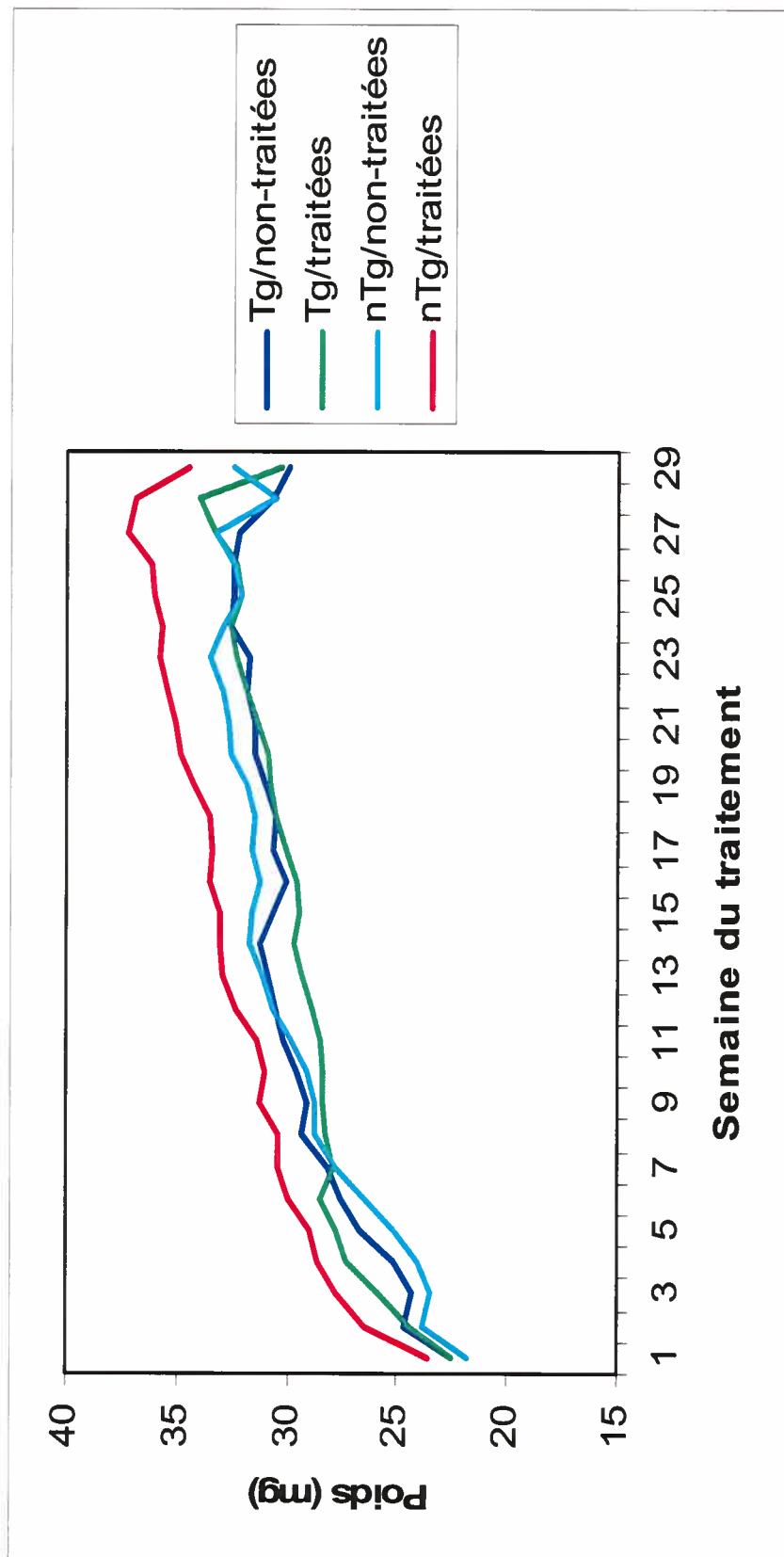


Figure 13 Comparaison des poids de souris entre les groupes Tg et nTg, traitées et non traitées. Des souris transgénique (Tg) CD4C/HIVMutG et des souris non transgéniques (nTg) ont été traitées pendant 6 mois avec le ritonavir (50 mg/kg/souris). Le poids de chaque souris a été déterminé au début de chaque semaine du traitement à long terme et la moyenne de ces poids est indiquée selon le groupe de souris. Les souris qui ne recevaient pas le traitement au ritonavir étaient traitées avec un placebo (eau).

l'annexe 3). La Figure 14 présente les résultats de ces analyses, selon le groupe de souris et le type de constituant analysé. Lorsque les taux de l'ensemble des constituants sériques des souris Tg et nTg sans traitement sont comparés, la seule différence significative concerne l'albumine qui présente en moyenne une augmentation de 2.49 g/L pour la souris Tg, alors que le taux d'albumine de la souris nTg n'augmente pas. Des différences significatives s'observent toutefois entre les souris Tg traitées et non traitées pour deux constituants non-lipidiques : la créatinine et l'albumine. Le traitement cause une augmentation de 28.43 $\mu\text{mol/L}$ du taux de créatinine alors que pour l'albumine, le traitement cause une diminution de 5.42 g/L chez les souris Tg. Pour les souris nTg, la seule différence dans les constituants non-lipidiques est un accroissement significatif du taux d'urée qui augmente en moyenne de 0.75 mmol/L chez les souris traitées alors que les souris non traitées conservent le même taux. Pour ce qui est du glucose, aucune différence n'est observée chez les souris Tg et nTg traitées.

Suite au traitement d'AP, deux constituants lipidiques du sérum démontrent une augmentation significative : le taux de cholestérol des souris Tg (qui augmente en moyenne de 1.13 mmol/L) et nTg (augmentation moyenne de 1.53 mmol/L) ainsi que le taux d'HDL des souris nTg (augmentation moyenne de 1.4 mmol/L). Par contre, aucune différence significative du taux de triglycérides n'est observée pour les souris Tg et nTg.

En résumé, chez les souris Tg traitées ou non traitées, une augmentation de la mortalité est observée lorsque comparé aux souris nTg. De plus, chez les souris Tg, le traitement d'AP cause également une augmentation significative des niveaux de créatinine et de cholestérol et une diminution de l'albumine. Pour ce qui est des souris nTg, le traitement d'AP cause une augmentation de l'urée, du cholestérol et du HDL. Une augmentation du poids est également observée chez ces souris nTg Tx.

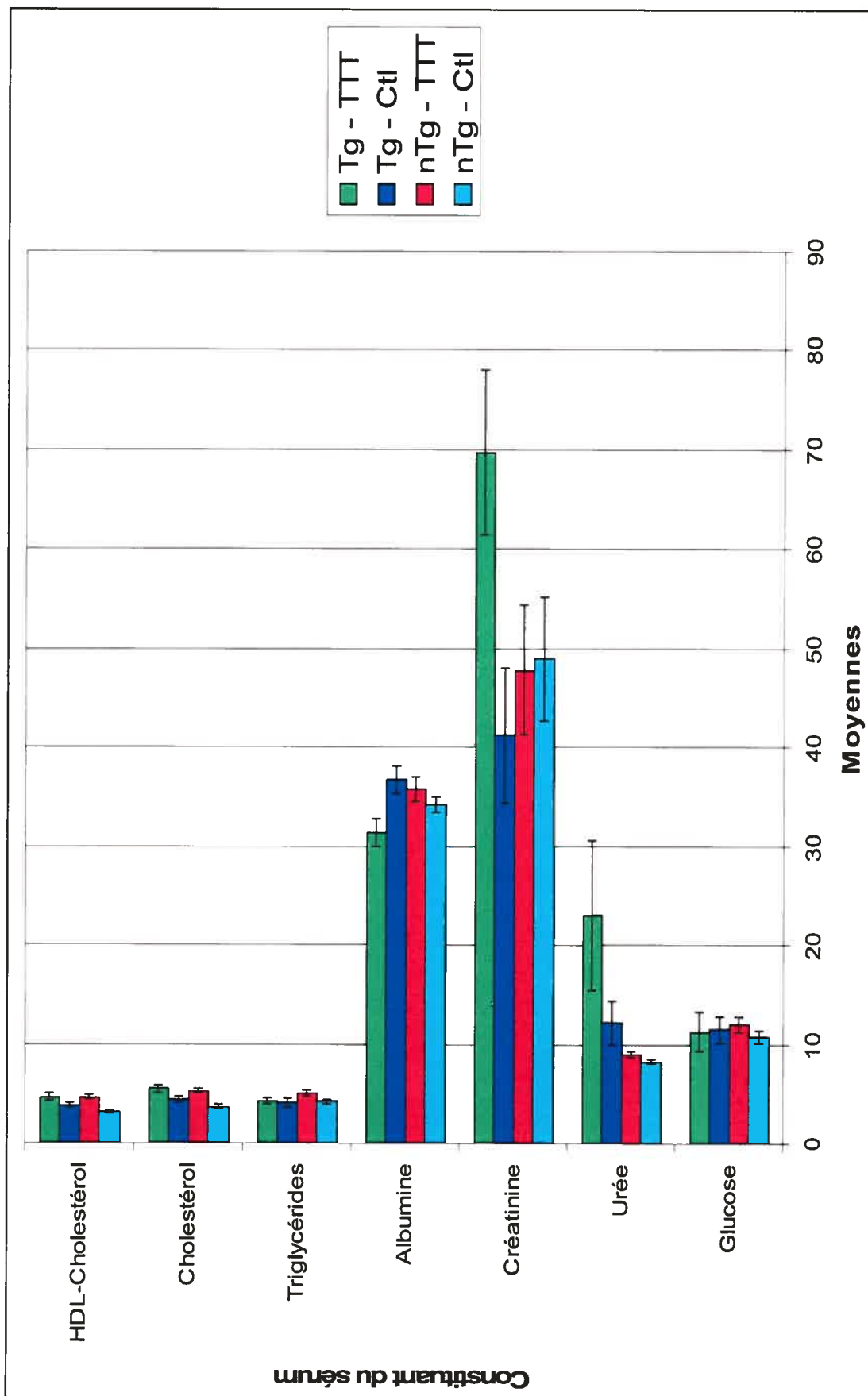


Figure 14 Comparaison des moyennes de différents constituants sériques. Des souris transgéniques (Tg) CD4C/HIVMutG et des souris non transgéniques (nTg) ont été traitées pendant 6 mois avec le ritonavir (50 mg/kg/souris). Un échantillon de sérum a été prélevé au sacrifice de la souris. La moyenne de la quantité de chaque constituant sérique est indiquée selon le groupe. TTT = traitement au ritonavir, nTTT = traitement à l'eau.

DISCUSSION

1. L'étude traitant des blocages de la réplication du VIH chez la souris aux phases d'assemblage et de maturation du cycle de réplication.

L'étude du blocage de l'assemblage et de la maturation de Gag a nécessité la conception d'un modèle pour observer le processus de réplication du VIH. Les cellules B78MC ont été utilisées conjointement avec le pseudotype VSV-G/NL4. Ces cellules semblent idéales pour étudier le troisième blocage car elles possèdent la cycline T humaine (voir introduction) capable de permettre la transcription virale du VIH dans les cellules murines. Avec les deux premiers blocages contournés (grâce à VSV-G et la cycline T), il était plus facile d'analyser le troisième blocage qui semble se situer au niveau de l'assemblage et de la maturation.

1.1. Réplication du VIH dans les cellules B78MC9 :

Lors de la première expérience effectuée sur la cellule B78MC, l'infection semble avoir eu lieu au jour 4 car les trois isoformes de Gag (p24, p41 et p55) sont bien exprimés pour la cellule B78MC9 et le contrôle positif (VIH total). Pour le contrôle négatif (B78), la réplication ne s'est pas effectuée car aucune des protéines précurseurs Gag (P41/55) ne sont exprimées. Cependant, une bande à la hauteur de p24 fut observée à tous les échantillons suivant l'infection. Cette présence de p24 au jour 4, particulièrement pour la cellule B78, provient probablement de résidus de virus utilisés pour l'infection des cellules car normalement, l'infection de la cellule B78 ne devrait point permettre la production de Gag (Figure 3a). Le niveau d'expression de p24 pour la cellule B78MC9 aurait probablement été plus faible si le virus initialement utilisé pour l'infection n'avait pas été encore présent au jour 4. Une nouvelle série d'infection nécessiterait donc plusieurs lavages de cellules afin d'éliminer toute trace du virus initial. Suite à ces lavages additionnels, la quantité de virus quelques jours après la transfection devrait être plus représentative de la réplication virale. Au jour 11, la présence de Gag a pratiquement disparu à l'exception d'une petite quantité de la protéine précurseur p55 (Figure 3B). Il est à noter qu'entre les jours 4 et 11, deux passages de cellules avaient été effectués. Ceci semble avoir éliminé le virus initialement utilisé lors de l'infection. La baisse d'expression de Gag au jour 11 peut être expliquée par le caractère transitoire de la

transfection. Suite à la duplication des cellules, les cellules filles ne contiennent plus de VIH car le transfectant n'est pas conservé. Pour cette raison, suite à plusieurs passages de cellules, la protéine Gag devrait ne plus être exprimée par les cellules. Le stade avancé de ce processus est bien visible ici.

La Figure 4 présente les niveaux d'ARN de la cellule B78MC9 aux jours 4 et 11. Ces niveaux d'ARN semblent relativement identiques pour les jours 4 et 11. Le contrôle B78, comme attendu, ne montre aucune expression virale. La présence d'ARN au jour 11 (Figure 4) nous semblent surprenante. Les deux différents passages de cellules entre les jours 4 et 11 devraient, en théorie, faire chuter le niveau d'expression d'ARN au jour 11. Pourtant, on constate un taux d'ARN identique entre les jours 4 et 11. Ce résultat surprenant peut avoir été causé par un chargement inégal d'ARN entre les jours 4 et 11 (un excès d'ARN au jour 11).

Pour ce qui est de l'analyse de la production de virus par rAdT (Tableau 1), ces résultats reflètent les résultats obtenus lors de l'analyse de protéines (Figure 3). Une forte baisse de la réplication est observée au jour 11 comparativement au jour 4. Les deux passages cellulaires effectués ont permis de diluer le virus initialement utilisé lors de l'infection. D'un autre côté, le surnageant de B78MC9 démontre une quantité de virus au jour 4 équivalent à 20% du contrôle positif. À première vue, la production de virus dans les cellules B78MC9 semble intéressante. Cependant, comme le virus initial ayant servi pour l'infection semble encore présent, ce compte ne peut être tenu pour exact. Un fait intéressant est que le taux de virus des cellules B78MC9 est trois fois plus élevé que celui des cellules B78. Il y a donc de fortes chances que les cellules B78MC9 permettent la réplication du VIH mais à un niveau réduit. Les résultats de ces analyses quantitatives du virus démontrent un niveau de réplication certain, mais plus faible que celui retrouvé chez le contrôle positif. Il aurait été préférable d'effectuer ce genre d'expérience en triplicata afin de minimiser la marge d'erreur. L'expérimentation unique ne permet pas d'éliminer les erreurs de manipulation pouvant survenir ou les erreurs provenant des limites de ces expériences. Une de ces limites est l'utilisation de la lignée cellulaire B78MC. Cette lignée de cellules de mélanome murin n'est pas une cible normalement

visée pas le VIH pour son infection. Ces cellules ne possèdent pas les mêmes fonctions biologiques que les cellules cibles du VIH. Chaque type de cellules exprime certaines protéines qui lui sont propres. Par exemple, le VIH pourrait nécessiter pour sa réplication une protéine qui n'est pas exprimé chez les cellules B78MC. On devrait plutôt utiliser une lignée de lymphocytes T pour ce genre d'expérience. Par contre, ces cellules (B78MC) étant déjà disponibles, il a été décidé tout de même de les utiliser afin de déterminer quelle partie de chromosome humain était nécessaire pour franchir le troisième blocage de la réplication du VIH. Une fois cette information obtenue, ce fragment sera introduit dans des cellules T CD4+.

1.2. Réplication du VIH dans les cellules B78MC :

Pour ce qui est de la deuxième série d'infection, qui cette fois-ci inclut les huit nouveaux hybrides B78MC, plusieurs lavages ont été effectués pour éliminer toute trace du virus initialement utilisé lors de l'infection. Ces lavages semblent avoir corrigés le problème constaté lors des premières infections avec la cellule B78MC9. En effet, l'expression de p24 lors de l'analyse de protéine Gag (Figure 5) ou l'expression du VIH lors de l'analyse d'ARN virale (Figure 6) sont indétectable dans le contrôle négatif B78, ce qui suggère que les niveaux de p24 observés chez les autres échantillons (B78MC) soient plausibles.

Mariani et al. (2000) ainsi que Bieniasz et Cullen (2000) ont étudié le deuxième bloque chez la souris, celui de la transcription. Ils ont démontré que l'ajout de la cycline T1 humaine rétablit l'expression provirale. Nos résultats sur la gamme de cellules hybrides corroborent bien ce fait. Toutes les cellules hybrides possédant la cycline T expriment Gag (ARN et protéines : Figures 5 et 6). Cependant, certaines d'entre elles expriment Gag à des niveaux comparables aux cellules humaines (B78MC9, 10, 11, 12 et 4). Par contre, il est clair que le ratio des niveaux de protéines Gag des cellules hybrides diffère de celui de la cellule 293T (Figure 5). Les cellules hybrides semblent accumuler les protéines précoces (p41 et p55). Cette accumulation suggère que le clivage ne s'effectue pas normalement (Mariani et al., 2000; Bieniasz et Cullen; 2000). Mariani et

al. (2000) ont indiqué qu'il y avait une accumulation de protéines virales assemblées de façon aberrantes dans les structures vésiculaires cytoplasmiques. Ils ont par la suite démontré que Gag était incapable de cibler la membrane cellulaire et par le fait même, limite la production virale. Il est donc crucial de rechercher l'élément responsable de ce ciblage afin d'augmenter la réplication virale.

Nos résultats ont bien démontré qu'il y avait production de protéines virales dans les cellules hybrides B78MC. Ces résultats confirment que la présence de la cycline T humaine est essentielle dans ces cellules afin de permettre la transcription de protéines virale VIH. Toutefois, la restriction intéressante est celle bloquant la production de virus. Les résultats de rAdT présentés dans le Tableau 3 confirment que la production de nouveaux virus se fait mais à un niveau restreint. Au jour 2, la production virale relative (CPM cellules B78MC/CPM cellules 293T) demeure faible (0.7-16.3%) pour l'ensemble des cellules B78MC. Au jour 4, la production virale relative augmente de façon drastique pour la plupart des cellules B78MC. Cette augmentation drastique est cependant tempérée par la faible valeur de CPM du contrôle 293T observé au jour 4. Cette faible valeur CPM du contrôle surestime la production virale relative de l'ensemble des cellules B78MC. Cependant, il est indéniable que la valeur de CPM pour les cellules B78MC augmente, en général, entre les jours 4 et 11. Afin de vérifier le taux de virus infectieux parmi ceux présent dans le surnageant, un essai MAGI a été effectué. Selon cet essai, une faible proportion des virus produits serait infectieux (Tableau 4). Ces résultats démontrent que le blocage au niveau de l'assemblage et de la maturation est encore très présent. Cependant, les analyses de la production virale et de l'infectivité n'ont pas été effectuées en triplicata afin d'obtenir un résultat concluant. Bien que les valeurs des deux analyses (rAdT et MAGI) soient très faibles (même proche des valeurs des contrôles négatifs pour certains), il est difficile de déterminer si ces résultats sont valables. La marge d'erreur pour l'essai MAGI est assez élevée car cette technique est très sensible. Premièrement, plusieurs dilutions sont effectuées avant l'infection. De plus, les valeurs de l'essai MAGI sont déterminées à la suite d'un compte visuel de cellules bleues au microscope. N'importe quelle erreur de manipulation peut avoir de grandes influences sur le résultat

final. Comme mentionné précédemment, ces analyses devraient être fait en triplicata afin de diminuer cette marge d'erreur qui est très élevée pour les essais MAGI.

L'intérêt de nos résultats est qu'ils démontrent que certaines des cellules hybrides produisent une quantité de virus détectable dans le surnageant. Même si la majeure partie de ces virus ne sont pas infectieux, il n'en demeure pas moins que jusqu'à 10% des virus le sont, comparé aux infections dans les cellules humaines. En regardant les niveaux d'expression des protéines Gag dans les cellules B78MC, il est clair que leurs taux d'expression diffèrent. Cela peut-être expliqué par le fait que ces cellules ne contiennent pas uniquement la cycline T. Ces hybrides contiennent un nombre divers de fragments chromosomaux humains dont la cycline T. Il est donc évident que d'autres gènes humains facilitent ou sont nécessaires pour la réplication du VIH. Il reste maintenant à les identifier.

Les deux groupes mentionnés précédemment affichent des résultats différents de ceux présenté dans ce mémoire quant à la réplication du VIH dans les cellules murines : Bieniasz et Cullen (2000) montrent une différence de 10,000 fois pour la quantité de virus infectieux produits tandis que Mariani et al. (2000) montrent une différence de 35 fois. Pour ce qui est de nos résultats, nos cellules hybrides démontrent une différence d'au moins 10 fois. Par contre, le titre de virus infectieux pour ces cellules hybrides demeure bas. Le titre du virus produit de la cellule 293T n'est pas élevé comme celui du pseudotype. Il est donc possible que cette cellule ne soit pas le meilleur contrôle possible. Il serait intéressant de refaire cette expérience avec d'autres cellules humaines afin de vérifier si le titre peut être amélioré.

Peu après le début de nos travaux, Sutton et al. (2003) a publié des résultats de recherches qui ressemblent beaucoup à ceux présentés dans ce mémoire. Cependant, ils ont utilisé systématiquement plusieurs cellules hybrides contenant chacune un seul chromosome humain. Ils ont démontré que seule la cellule hybride contenant le chromosome humain 2 permettait la réplication du VIH à un niveau comparable à celui observé chez la cellule humaine. Ce qui est remarquable, c'est que les niveaux de p24

dans leurs cellules murines sont comparables à ceux des cellules humaines et que les virus présents dans le surnageant de cellules murines étaient capables d'infecter des cellules à une fréquence similaire au virus provenant du surnageant des cellules humaines infectées (Sutton et al., 2003). Tel que présenté dans l'introduction, plusieurs groupes ont identifié différents gènes ou protéines qui augmentent le taux de réplication du VIH chez la souris (Ini1, HP32, HP68 et APOBEC3G). Par contre, aucun groupe ne présente des taux de réplication comparables à ceux observés chez la cellule humaine. De plus, ce qui est étonnant est qu'aucuns des gènes identifiés précédemment sont localisés sur le chromosome 2.

Il est possible que plusieurs gènes soient nécessaires à l'assemblage et à la réplication du VIH. Cependant, depuis les travaux de Sutton et al. (2003), il est évident que certains de ces gènes nécessaires à la réplication se localisent sur le chromosome 2. Il est même possible que tous ces gènes nécessaires à la réplication se trouvent sur le chromosome 2. Il nous reste maintenant à répéter cette expérience en se limitant cette fois-ci au chromosome 2. Dans notre laboratoire, les hybrides qui contiennent les fragments du chromosome humain 2 seront étudiés en détail. C'est à ce point que le nouveau pseudotype contenant VSV-G et la cycline T sera utile (voir résultats). La présence de la cycline T dans les cellules hybrides ne sera plus requise.

En conclusion, avec toutes les percées effectuées ces dernières années, nous sommes confiants que l'élément humain responsable de la réplication du VIH chez la souris sera identifié d'ici peu. À ce rythme, un bon modèle murin du SIDA sera finalement à portée de la main permettant ainsi d'approfondir nos connaissances sur cette maladie. Il sera alors plus facile d'explorer le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

2. L'étude sur la souris Tg CD68/HIV

2.1. Expression du transgène CD68/HIV^{MutG} chez la souris transgénique CD68/HIV^{MutG} :

Bien qu'il y ait eu plusieurs complications lors du clonage du promoteur hCD68 et que cette stratégie a dû être modifiée à plusieurs reprises, les différents fragments du transgène CD68 ont finalement été assemblés. Des souris Tg exprimants les gènes du HIV^{MutG} dans les cellules de la lignée des phagocytes mononucléaires ont été produites et analysées. Les analyses d'ARN viral ont démontré des niveaux d'expression VIH qui sont comparables à ceux du hSR-A publiés par le groupe de Gough (2001). Ceci indique que l'expression des gènes sous le promoteur hCD68 fonctionne bien. Des analyses par Western confirment que la protéine Nef est bien produite. L'expression de la protéine Nef varie cependant d'une souris à l'autre, la souris provenant du fondateur F115709 étant celle démontrant le meilleur taux d'expression. Lors de cette analyse de protéine, une bande non attendue est exprimée à la hauteur de 66kDa. La provenance de cette bande est présentement inconnue, mais nous envisageons plusieurs hypothèses. Premièrement, cette bande pourrait être le résultat du sérum albumine bovin provenant du surnageant des cellules en cultures ou du milieu dans lequel les organes ont baignés lors de la dissection des souris. Si cela est le cas, une diminution de cette bande devrait être observée lorsque les échantillons sont lavés avec du PBS avant la lyse des tissus. Cette diminution pourrait également s'observer si du milieu sans sérum était utilisé. Une deuxième possibilité est que cette bande non spécifique provient d'une protéine de structure du cytosquelette qui est très abondante dans les cellules tels que la tropomyosine, l'actine, la cortactine, la myosine ou la tuberculine. Cependant, celle qui possède le poids le plus proche de cette bande est la cortactine qui se situe normalement à la hauteur de 61.5 kDa. Troisièmement, l'hypothèse la plus logique serait que cette protéine non spécifique est celle qui possède une séquence d'acide aminé similaire à Nef ou à GST (car l'Ac est produit contre la protéine GST-Nef) et qui est reconnu par l'Ac. Une nouvelle expérience pourrait être effectuée en incluant cette fois-ci un contrôle négatif anti-GST afin de voir si cette bande réapparaîtrait. Mais finalement, l'importance

de cette analyse de protéine est d'observer l'expression de Nef dans nos souris Tg CD68/HIVMutG.

2.2. Absence de la maladie similaire au SIDA :

Âgée entre 3 à 6 mois, la progéniture des souris fondatrices ne semble pas démontrer des signes de maladie au niveau macroscopique. Ces souris sont très actives, possèdent un beau poil et ne démontrent pas de dos courbé. De plus, leur thymus, leurs reins et leurs rates sont de tailles normales et démontrent une surface identique aux souris nTg. Suite à ces observations, la possibilité que l'expression du transgène CD68/HIV^{MutG} au niveau des cellules CD68+ ne soit pas suffisante pour permettre l'apparition de la maladie semble pertinente. Cependant, il ne serait pas approprié d'exclure immédiatement ces souris comme modèle d'étude avant d'effectuer des expériences plus élaborées. Parmi ces expériences, l'analyse des cellules lymphoïdes par cytométrie de flux afin de déterminer s'il y a régulation négative des CD4 pourrait être effectué. Il est possible que ces souris ne démontrent pas de symptômes de maladie mais qu'elles présentent des phénotypes au niveau cellulaire. Par la suite, des analyses histologiques pourront être effectuées afin de vérifier la présence de maladies microscopiques au niveau des ganglions mésentériques, des cellules de la rate, du poumon, des reins ou même du cœur qui sont souvent affectées lors de la maladie chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutG} (Hanna et al., 1998; Kay et al., 2002). Il est également possible de répéter les expériences présentées ci haut lorsque ces souris atteindront l'âge de un an. Il est également possible que l'expression du VIH dans ce type de cellules nécessite une plus longue période de temps pour engendrer la maladie.

Alors que ces souris Tg CD68/HIV^{MutG} expriment beaucoup le transgène HIV^{MutG} dans les macrophages, il serait intéressant d'analyser ces organes plus en détail. Le rôle premier des macrophages est l'immunité primaire non spécifique, non-adaptative (Abbas et al., 2000). Une expérience supplémentaire serait d'étudier la capacité des macrophages Tg versus nTg à éliminer des bactéries pathogènes dans les souris. Lors de cette expérience, des bactéries seraient injectées intrapéritonéalement. Après quelques semaines d'incubation dans les souris, ces dernières seraient sacrifiées et les macrophages

péritonéaux seraient prélevés. Par la suite, un traitement avec un détergent faible permettrait de lyser les macrophages sans tuer les bactéries qui sont plus résistantes. Le lysat cellulaire serait étalé sur des plaques d'agar afin de déterminer la présence de bactéries. Si les macrophages n'ont pas éliminés les bactéries, des colonies bactériennes seront observées sur les pétris. Si les macrophages Tg éliminent moins les bactéries que les macrophages nTg, cela signifierait que la présence du transgène HIV^{MutG} joue un rôle négatif dans l'élimination du pathogène. Si les macrophages Tg sont capables d'éliminer autant que les macrophages nTg, cela signifierait que l'expression du transgène HIV^{MutG} dans les macrophages n'est pas suffisante.

Cette dernière observation peut par la suite mener à une multitude de projets où l'on croiserait des souris CD68/HIV^{MutG} et diverses souris exprimant ce même transgène sous le contrôle d'autres promoteurs spécifiques pour différentes sous-populations de cellules lymphoïdes. Le récepteur CD4 est exprimé dans de nombreuses sous-populations cellulaires et il est donc difficile de prédire lesquels de ces sous-populations seront responsables de la maladie. Il semble bien que la communauté scientifique oriente ses prochaines expérimentations sur des promoteurs exprimés dans différentes populations de cellules CD4+. Le groupe de Fallas (2004) a créé une souris exprimant les molécules d'histocompatibilité de classe II HLA-DOA et HLA-DOB sous le contrôle du promoteur du récepteur CD11c. Le CD11c est principalement exprimé dans les cellules dendritiques (Brocker et al, 1997) mais aussi dans certaines populations de cellules NK (« natural killer »), de cellules B et de cellules T (Jomantaite et al, 2004). Un autre promoteur envisageable serait celui du récepteur CD83 qui est principalement exprimé dans les cellules dendritiques matures, sur les cellules T activées et à un faible taux dans les centres germinatifs des lymphocytes B (Wolenski et al, 2003). Des souris exprimant le HIV^{MutG} sous le contrôle du promoteur d'un de ces récepteurs pourraient être produites. Par la suite, ces souris pourront être croisées avec la souris Tg hCD68 et même entre elles afin de trouver une combinaison provoquant le phénotype recherché.

3. L'étude de la lipodystrophie causée par le traitement à l'anti-protéase

Cette dernière étude visant à explorer les possibilités qu'un traitement d'AP chez des souris Tg exprimant le VIH agit non seulement sur les protéines Gag mais également sur d'autres effecteurs et que ce traitement soit capable de provoquer la lipodystrophie chez ces souris Tg. Voilà pourquoi des souris Tg exprimant uniquement Nef sont utilisées. Un traitement contrôle fut initialement effectué sur la souris Tg E α HIV qui exprime plusieurs protéines Gag (Figure 9). Le but de ce traitement est de vérifier si les AP affectent le clivage des protéines Gag chez les souris Tg E α HIV. Une réduction des niveaux d'expressions de Gag suite au traitement indiquerait que la dose du médicament est suffisante et pleinement fonctionnelle. Si c'est le cas, cela signifie que la dose d'AP administrée est adéquate et que l'étude avec les souris CD4C/HIV^{MutG} peut être effectuée. Cependant, les souris Tg E α HIV expriment rarement des niveaux détectables de p24 mais plutôt de hauts niveaux de p41 et p55. Les protéines p41 et p55 devraient être affectées si le traitement fonctionne bien. Dans des recherches récentes utilisant un traitement d'AP chez les rongeurs, deux médicaments provoquent les symptômes reliés à la lipodystrophie à une fréquence élevée : le Norvir® (ritonavir) et le Fortovase® (saquinavir) (Ye et al., 1998; Lenhard et al., 2000; Dressman et al., 2003; Goetzman et al., 2003). Finalement, le ritonavir est choisi car il provoque plus fortement et plus fréquemment cet effet secondaire chez les rongeurs. Cet effet est recherché car si les symptômes de la lipodystrophie apparaissent fréquemment, il est plus aisé de déterminer si le SIDA sensibilise l'organisme à développer la lipodystrophie suite au traitement au AP. Dans la littérature, la dose de ritonavir la plus élevée utilisée chez les rongeurs est de 50 mg/kg/souris (Ye et al., 1998). Cette dose fut utilisée dans la présente recherche.

3.1. Baisse d'expression des protéines Gag suite au traitement des souris avec le ritonavir :

Durant le traitement, une des souris est morte avant l'analyse. Deux des 4 souris Tg expriment soient de faibles niveaux des protéines Gag (Figure 10; P5) ou aucune expression de Gag (Figure 10; P9). Une explication possible de cette observation est que

le clivage de Gag ait été bloqué en grande partie pour une souris (P5) et complètement bloqué pour l'autre (P9). Cependant, cette hypothèse est peu probable car si cela était le cas, une bande à la hauteur de la protéine précurseur pr160 serait visible. Une explication possible de ce résultat est que, lors de la dissection, les ganglions mésentériques aient été mal identifiés et que l'organe récolté soit d'une autre origine. Pour ce qui est des deux autres souris Tg traitées à l'AP, une réduction de l'expression de Gag est également observée mais elle s'avère moins prononcée que pour les deux autres souris Tg. Une inversion du ratio de p41 et de p55 est également visible chez la souris P3. Cette inversion du ratio indique que le clivage de p55 a été réduit, probablement due au traitement d'AP. Ces réductions de l'expression de Gag observées ne sont pas celles attendues, mais elles sont jugées suffisantes pour commencer l'expérience de traitement sur les souris Tg CD4C/HIV^{MutG}.

3.2. Le traitement de ritonavir n'a aucun effet sur la progression de la maladie similaire au SIDA humain :

Par la suite, les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} ont été traitées avec l'AP. Les analyses préliminaires du traitement des souris Tg CD4C/HIV^{MutG} à long terme ne semble pas avoir d'effets sur la progression de la maladie au niveau de la mortalité. Il est important de noter que la maladie similaire au SIDA est due à la maladie rénale et que c'est normal ou même attendu que la mortalité ne soit pas modifiée par les AP. Le traitement d'AP démontre également que les souris Tg utilisées dans cette recherche, qu'elles soient traitées ou non, sont plus résistantes à développer la maladie similaire au SIDA humain que les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} utilisées dans la recherche de Hanna et al. (1998). Lorsque ces souris ont été produites, elles ne survivaient pas longtemps; la plupart des souris mouraient à partir de trois mois. Lors du traitement à l'AP décrit dans cette étude, seulement 22% des souris Tg meurent à l'intérieur de sept mois. Afin de contourner ce nouveau problème, il serait possible de prolonger le traitement jusqu'à un an. En effet, plus il y a de mortalité liée à la maladie, plus il peut s'avérer facile de déterminer si un traitement d'AP affecte la progression de cette maladie. Lorsque les souris deviennent malades (poils hérissés, chute de poids, mobilité réduite), la mort survient dans les prochains jours ou dans les deux prochaines semaines.

3.3. Absence des symptômes de la lipodystrophie suite au traitement du ritonavir :

La comparaison des poids corporels démontre une augmentation pour les souris nTg traitées comparativement aux souris nTg non traitées (différence de 1.98 mg). Cette observation semble indiquer que les souris nTg traitées sont sensibles au traitement mais cela n'est pas suffisant pour conclure que ces souris développent la lipodystrophie. Ce résultat contredit notre hypothèse de départ qui prétend que les souris nTg développeront la lipodystrophie suite au traitement d'AP. Il est possible que la dose administrée à ces souris (50 mg/kg/souris) ne fût pas suffisante pour engendrer la lipodystrophie (lipoatrophie périphérique). Il se peut également que les souris C3H utilisées pour cette expérience soient résistantes à la lipodystrophie. Une répétition de cette même expérience en augmentant la dose de l'AP pourrait être envisagée. De plus, cette expérience pourrait être répétée sur des souris Tg CD4C/HIV^{MutG} provenant d'une autre souche. Il serait également intéressant de vérifier l'autre AP provoquant la lipodystrophie à une fréquence élevée : le saquinavir.

D'après les observations effectuées, l'expérimentation menée dans cette étude ne semble pas établir que l'ensemble des souris traitées à l'AP ritonavir développe les effets corporels de la lipodystrophie. Dans certains cas, les souris nTg font un gain pondéral de poids mais il est non suffisant pour être décrit comme étant un début de lipodystrophie. De plus, les changements corporels observés habituellement lors d'une lipodystrophie ne sont pas observés chez ces souris. Il aurait peut-être été pertinent d'évaluer l'ampleur de certains dépôts de gras tels que les « fat pads » épидидymaux, inguinaux et interscapulaires de chacune des souris comme l'ont fait les groupes de Burant et al. (1997) et de Reue et al. (2000). Ce dernier groupe a observé une diminution du poids dans les tissus adipeux blancs et bruns chez leur modèle de souris lipodystrophiques (mutation fld).

En regardant les résultats sériques observés dans cette étude, il semble que le traitement ait provoqué certaines anomalies métaboliques pour ce qui a trait à la créatinine, au cholestérol, à l'albumine, à l'urée et aux HDL. Cependant, ces anomalies

métaboliques ne comprennent pas une augmentation du niveau des triglycérides qui se manifeste dans la lipodystrophie. Comme le prétend Kolter (1999), il se peut que les AP causent des anomalies métaboliques qui engendrent par la suite une redistribution de gras. Si cela est le cas chez ces souris, il va falloir augmenter la durée de l'expérience afin que des changements corporels aient le temps d'apparaître.

L'hypothèse principale de cette troisième étude stipule que la souris transgénique CD4C/HIV^{MutG} est un bon modèle pour étudier la lipodystrophie associée à l'utilisation des AP chez les souris Tg exprimant le VIH ainsi que les effets des AP sur la progression d'une maladie similaire au SIDA. Cependant, l'expérience présentée ici n'est pas au point pour être considéré comme pleinement satisfaisante. Tel qu'observé dans la Figure 10, le clivage de Gag n'est pas complètement bloqué, suggérant que la dose de ritonavir utilisée n'est probablement pas optimale pour cette souche. L'utilisation de souris Tg produites sur un fond génétique différent pourrait être envisagé. Aussi, le traitement pourrait être amélioré par trois nouvelles conditions expérimentales : allonger la durée de l'expérimentation, changer la dose du traitement et améliorer l'observation des changements corporels de la souris par une meilleure discrimination des déterminants corporels liés à la lipodystrophie chez la souris. L'hypothèse secondaire, soutenant que les souris Tg non traitées aux AP seraient plus malades que les souris traitées, n'a pu être confirmée. En effet, ces deux groupes de souris ne présentent aucune différence au niveau de l'apparition de la maladie. Aucune des autres hypothèses secondaires n'a pu être vérifiée, car les signes de la lipodystrophie n'ont pas été observés. De plus, il est impossible de déterminer si l'AP interagit avec un autre effecteur. Il reste maintenant à répéter cette expérience en apportant les changements présentés plus hauts. Si ces changements permettent d'observer la lipodystrophie chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutG} suite au traitement d'AP, d'autres expérimentations futures permettront de déterminer les autres effecteurs qui interagissent avec les AP. De plus, cela nous permettra d'approfondir nos connaissances sur l'apparition de la lipodystrophie suite à un traitement d'AP chez un modèle murin.

BIBLIOGRAPHIES

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman et J.S. Pober. (2000). *Cellular and Molecular Immunology* (4th edition). W.B. Saunders Company, Philadelphia. Chap. 13.
- Ahmad, N. et Venkatesan, S. (1988). Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science.*, 241, 1481-1485.
- Aiken, C., Konner, J., Landau, N.R., Lenburg, M.E. et Trono, D. (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell.*, 76, 853-864.
- Alberta Reappraising AIDS Society (2004). "Concerns about HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy)". Sur le site : ARAS [en ligne] http://www.aras.ab.ca/haart.html#adverse_general. (Page consultée le 17 mars 2004)
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C.C., Feng, Y., Kennedy, P.E., Murphy, P.M., et Berger, E.A. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*, 272, 1955-1958.
- Ashorn, P.A., Berger, E.A., et Moss, B. (1990). Human immunodeficiency virus envelope glycoprotein/CD4-mediated fusion of non-primate cells with human cells. *J. Virol.*, 64, 2149-2156.
- Ball, S.C. (2003). Patients who want to stop their medications: Treatment interruption in HIV infection. *AIDS Reader*, 13, 317-319, 324, 342.
- Balter, M. (1996). AIDS research: new hope in HIV disease. *Science*, 274, 1988-1990.
- Benavides, S. et Nahata, M.C. (2004). Pharmacological therapy for HIV-associated lipodystrophy. *Annals of Pharmacotherapy*, 38, 448-457.
- Berson, J.F., Long, D., Doranz, G.J., Rucker, J., Jirik, F.R., et Doms, R.W. (1996). A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Virol.*, 70, 6288-6295.
- Bieniasz, P.D. et Cullen, B.R. (2000). Multiple blocks to human immunodeficiency virus type 1 replication in rodent cells. *J. Virol.*, 74, 9868-9877.
- Bieniasz, P.D., Fridell, R.A., Anthony, K., et Cullen, B.R. (1997). Murine CXCR-4 is a functional coreceptor for T-cell-tropic and dual-tropic strains of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, 71, 7097-7100.
- Bieniasz, P.D., Grdina, T.A., Bogerd, H.P., et Cullen, B.R. (1998). Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat. *EMBO J*, 17, 7056-7065.

Bing, E.G., Hays, R.D., Jacobson, L.P., Chen, B., Gange, S.J., Kass, N.E., Chmiel, J.S. et Zucconi, S.L. (2000). Health-related quality of life among people with HIV disease: results from the Multicenter AIDS Cohort Study. *Qual. Life Res.*, 9, 55-63.

Bisbal, C., Martinand, C., Silhol, M., Lebleu, B. et Salehzada, T. (1995). Cloning and characterization of a RNase L inhibitor, A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *J.Biol. Chem.*, 270, 13308-13317.

Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., et Springer, T.A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 382, 829-832.

Bonfanti, P., Gulisano, C., Ricci, E., Timillero, L., Valsecchi, L., Carradori, S., Pusterla, L., Fortuna, P., Miccolis, S., Magnani, C., Gabbuti, A., Parazzini, F., Martinelli, C., Faggion, I., Landonio, S., Quirino, T. et Vigevani, G. (2003). Risk factors for lipodystrophy in the CISA cohort. *Biomed Pharmacother.*, 57, 422-427.

Brady, H.J., Pennington, D.J., Miles, C.G. et Dzierzak, E.A. (1993). CD4 cell surface downregulation in HIV-1 Nef transgenic mice is a consequence of intracellular sequestration. *EMBOJ*, 12, 4923-4932.

Brinkman, K., Smeitink, J.A., Romijn, J.A. et Reiss, P. (1999). Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet*, 354, 1112-1115.

Brocker, T., Riedinger, M. et Karjalainen, K. (1997). Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med.*, 185, 541-550.

Browning, J., Horner, J.W., Pettoello-Mantovani, M., Raker, C., Yurasov, S., DePinho, R.A., et Goldstein, H. (1997). Mice transgenic for the human CD4 and CCR5 are susceptible to HIV infection. *PNAS*, 94, 14637-14641.

Bukrinsky, M. et Zhao, Y. (2004). Heat-shock proteins reverse the G2 arrest caused by HIV-1 viral protein R. *DNA Cell Biol.*, 23, 223-225.

Burant, C.F., Sreenan, S., Hirano, K., Tai, T.A., Lohmiller, J., Lukens, J., Davidson, N.O., Ross, S. Graves, R.A. (1997). Troglitazone action is independent of adipose tissue. *J Clin Invest*, 100, 2900-2908.

Calza, L., Manfredi, R. et Chiodo, F. (2004). Dyslipidaemia associated with antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother.*, 53, 10-14.

Cann, A. (1996). Principles of molecular virology (3rd edition). Academic press, San Diego. Chap. 4, 7 et 11.

Carpenter, C.C., Fischl, M.A., Hammer, S.M., Hirsch, M.S., Jacobsen, D.M., Katzenstein, D.A., Montaner, J.S., Richman, D.D., Saag, M.A., Schooley, R.T., Thompson, M.A., Vella, S., Yeni, P.G. et Volberding, P.A. (1996). Antiretroviral therapy for HIV infection in 1996 : recommendations of an international panel. *JAMA*, 276, 146-154.

Carr, A., Mauss, S. et Mulligan, K. (1999). Reaching a consensus – Lipodystrophy case definition. The first international workshop on adverse drug reactions and lipodystrophy in HIV. San Diego, June 28, 1999.

Chang, F., Re. F., Sebastian. S., Sazer. S. et Luban, J. (2004). HIV-1 Vpr induces defects in mitosis, cytokinesis, nuclear structure, and centrosomes. *Mol Biol Cell*, 15, 1793-1801.

Chapman, A. (2003). "Le VIH comme maladie épisodique : réviser le programme RPC-I. Mémoire préparé à l'intention du sous-comité de la condition des personnes handicapées". Ottawa : Société canadienne du sida.

Chatterjee, S., Basak, S. et Khan, N.C. (1992). Morphogenesis of human immunodeficiency virus type 1. *Pathobiology*, 60, 181-186.

Chayer, R.-L. (2003). Le dernier médicament anti-VIH de Roche bat un record de cherté. Sur le site : Le National. [en ligne] <http://www.le-national.com/roche032003.html> (Page consultée le 3 mars 2004)

Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P.D., Wu, L., Mackay, C.R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. et Sodroski, J. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*, 85, 1135-1148.

Cichocki, M. (2004). HIV/AIDS Fact sheet. Sur le site : About. [en ligne] <http://aids.about.com/cs/aidsfactsheets/a/hivbasics.htm> (Page consultée le 3 mars 2004)

Clapham, P.R., Blanc, D., et Weiss, R.A. (1991). Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by simian immunodeficiency virus. *Virology*, 181, 703-715.

Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Suresh, K.A., Gallo, R.C. et Lusso, P.. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, 270, 1811-1815.

Cullen, B.R. (2001). A new entry route for HIV. *Nat. Med.*, 7, 20-21.

d'Arminio Monforte, A., Lepri, A.C., Rezza, G., Pezzotti, P., Antinori, A., Phillips, A.N., Angarano, G., Colangeli, V., De Luca, A., Ippolito, G., Caggese, L., Soscia, F., Filice, G., Gritti, F., Narciso, P., Tirelli, U. et Moroni, M. (2000). Insights into the reasons for discontinuation of the first highly active antiretroviral therapy (HAART) regimen in a cohort of antiretroviral naïve patients (ICONA). *AIDS*, 14, 499-507.

De Luca, A., Murri, R., Damiano, A., Ammassari, F. et Antinori, A. (1998). Buffalo hump in HIV-1 infection. *Lancet*, 352: 320.

Delfraissy, J.F. (1999). L'ARN-VIH plasmatique : État des connaissances pour 1999. Sur le site : Le National. [en ligne] <http://www.le-national.com/virologie.html> (Page consultée le 5 avril 2004)

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R., et Landau, N.R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 381, 661-666.

Desrosiers, R.C. (1990). The simian immunodeficiency viruses. *Annu. Rev. Immunol.*, 8, 557-578.

Desrosiers, R.C. et Letvin, N.L. (1987). Animal models for acquired immunodeficiency syndrome. *Rev Infect Dis.*, 9, 438-446.

Detels, R., Munoz, A., McFarlane, G., Kingsley, L.A., Margolik, J.B., Giorgi, J., Schragar, L.K. et Phair, J.P. (1998). Effectiveness of potent antiretroviral therapy on time to AIDS and death in men with known HIV infection duration. *JAMA*, 280, 1497-1503.

Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collman, R.G., et Doms, R.W. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*, 85, 1149-1158.

Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P., et Paxton, W.A.. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokines receptor CC-CKR5. *Nature*, 381, 667-673.

Dressman, J., Kincer, J., Matveev, S.V., Guo, L., Greenberg, R.N., Guerin, T., Meade, D., Li, X.A., Zhu, W., Uittenbogaard, A., Wilson, M.E. et Smart, E.J. (2003). HIV protease inhibitors promote atherosclerotic lesion formation independent of dyslipidemia by increasing CD36-dependent cholesteryl ester accumulation in macrophages. *J Clin Invest.*, 111, 389-397.

Emerman, M. et Malim, M.H. (1998). HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*, 280, 1880-1884.

Erbelding, E.J. (1999). Resistance testing: a primer for clinicians. *Hopkins HIV Rep.*, 11, 1 et 8-9.

Fallas, J.L., Tobin, H.M., Lou, O., Guo, D., Sant'Angelo, D.B. et Denzin, L.K. (2004). Ectopic expression of HLA-DO in mouse dendritic cells diminishes MHC class II antigen presentation. *J Immunol.*, ;173, 1549-1560.

Feng, S. et Holland, E.C. (1988). HIV-1 tat transactivation requires the loop sequence within TAR. *Nature*, 334, 165-167.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., et Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G-protein-coupled receptor. *Science*, 272, 872-877.

Franke, E.K. et Luban, J. (1995). Cyclophilin and gag in HIV-1 replication and pathogenesis. *Adv Exp Med Biol.*, 374, 217-228.

Freed, E.O. et Martin, M.A. (1995). The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem.*, 270, 23883-23886.

Fujinaga, K., Taube, R., Wimmer, J., Cujec, T.P., et Peterlin, B.M. (1999). Interactions between human cyclin T , Tat, and the transactivation response element (TAR) are disrupted by a cysteine to tyrosine substitution found in mouse cyclin T. *PNAS*, 96, 1285-1290.

Gallant, J.E. (1999). The new drugs and how to use them. *Hopkins HIV Rep*, 11, 2 et 7.

Garber, M.E., Wei, P., KewalRamani, V.N., Mayall, T.P., Herrmann, C.H., Rice, A.P., Littman, D.R., et Jones, K.A. (1998). The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. *Genes Dev.*, 12, 3512-3527.

Gatignol, A., Duarte, M., Daviet, L., Chang, Y.N. et Jeang, K.T. (1996). Sequential steps in Tat trans-activation of HIV-1 mediated through cellular DNA, RNA, and protein binding factors. *Gene Expr.*, 5, 217-228.

Goetzman, E.S., Tian, L., Nagy, T.R., Gower, B.A., Schoeb, T.R., Elgavish, A., Acosta, E.P., Saag, M.S. et Wood, P.A. (2003). HIV protease inhibitor ritonavir induces lipoatrophy in male mice. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 19, 1141-1150.

Goldfarb, D.S. (1995). HIV-1 virology. Simply Marvelous nuclear transport. *Curr Biol.*, 5, 570-573.

Gough, P.J., Gordon, S. et Greaves, D.R. (2001). The use of human CD68 transcriptional regulatory sequences to direct high-level expression of class A scavenger receptor in macrophages in vitro and in vivo. *Immunology*, 103, 351-361.

Grossman (2004a). The HIV life cycle: Step 3: integration. Sur le site : aidsmed. [en ligne] <http://www.aidsmeds.com/lessons/LifeCycle3.htm>

Grossman (2004b). The HIV life cycle: Step 4: transcription. Sur le site : aidsmed. [en ligne] <http://www.aidsmeds.com/lessons/LifeCycle4.htm>

Guy, B., Kieny, M.P., Riviere, Y., Le Peuch, C., Dott, K., Girard, M., Montagnier, L. et Lecocq, J.P. (1987). HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature*, 330, 266-269.

Hammer, S.M., Squires, K.E., Hughes, M.D., Grimes, J.M., Demeter, L.M., Currier, J.S., Eron, J.J. Jr., Feinberg, J.E., Balfour, H.H. Jr., Deyton, L.R., Chodakewitz, J.A. et Fischl, M.A. (1997). A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. *N Engl J Med*, 337, 725-733.

Hanna, L. (1999). Body fat changes: more than lipodystrophy. *BETA*, 12, 23-32.

Hanna, Z., Kay, D.G., Cool, M., Jothy, S., Rebai, N. et Jolicoeur, P. (1998a). Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease. *J Virol.*, 72, 121-132.

Hanna, Z., Kay, D.G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S. et Jolicoeur, P. (1998b). Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell*, 95, 163-175.

Harada, S., Akaike, T., Yusa, K. et Maeda, Y. (2004). Adsorption and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 are modified by the fluidity of the plasma membrane for multiple-site binding. *Microbiol Immunol.*, 48, 347-355.

Heinzinger, N.K., Bukinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., Kewalramani, V., Lee, M.A., Gendelman, H.E., Ratner, L., Stevenson, M. et Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci*, 91, 7311-7315.

HIV infection: concensus on how to treat gradually emerging with the publication of more guidelines. *Drug Ther Perspect* 1997; 9, 8-11.

Hoffman, P.M., Festoff, B.W., Giron, L.T. Jr., Hollenbeck, L.C., Garruto, R.M., Ruscetti, F.W. (1985). Isolation of LAV/HTLV-III from a patient with amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.*, 313, 324-325.

Hogg, R.S., Yip, B., Kully, C., Craig, K.J.P., O'Shaughnessy, M.V., Schechter, M.T. et Montaner, J.S. (1999). Improved survival among HIV-infected patients after initiation of triple-drug antiretroviral regimens. *CMAJ*, 160, 659-665.

- Hope, T.J. (1999). The ins and outs of HIV Rev. *Arch. Biochem. Biophys.*, 365, 186-191.
- Hope, T.J. et Trono, D. (2000). Structure, expression, and regulation of the HIV genome. HIV InSite Knowledge Base Chapter. Sur le site: InSite. [en ligne] <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-02-01-02> (Page consultée le 17 mai 2004)
- Hosein, S.R (2003). Le T-20 (Fuzeon) est commercialisé au Canada. Sur le site: CATIE. [en ligne] <http://www.catie.ca/aidsinfo.nsf/259950eff0886a40852563ad00138c36/c1284bc17467932b85256dcd006de652?OpenDocument> (Page consultée le 17 mars 2004)
- Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J. et Navaratnam, N. (2002). *Genomics*, 79, 285-296.
- Jolicoeur, P., Kay, D.G., Cool, M., Jothy, S., Rebai, N. et Hanna, Z. (1999). A novel mouse model of HIV-1 disease. *Leukemia*, 13, S78-S80.
- Jomantaite, I., Dikopoulos, N., Kroger, A., Leithauser, F., Hauser, H., Schirmbeck, R. et Reimann, J. (2004). Hepatic dendritic cell subsets in the mouse. *Eur J Immunol.*, 34, 355-365.
- Jubault, V., Burgard, M., Le Corfec, E., Costagliola, D., Rouzioux, C. et Viard, J.P. (1998). High rebound of plasma and cellular HIV load after discontinuation of triple combination therapy. *AIDS*, 12, 2358-2359.
- Karn, J. (1999). Tackling Tat. *J Mol Biol.*, 293, 235-254.
- Kay, D.G., Y. Ping, Z. Hanna, S. Jothy, E. Tremblay et P. Jolicoeur (2002). Cardiac Disease in Transgenic Mice Expressing Human Immunodeficiency Virus-1 Nef in Cells of the Immune System. *American Journal of Pathology*, 161, 321-335.
- KewalRamani, V. N. et Coffin, J.M. (2003). Weapons of mutational destruction. *Science*, 301, 923-925.
- Kielian, M. et Jungerwirth, S. (1990). Mechanisms of enveloped virus entry into cells. *Mol Biol Med.*, 7, 17-31.
- Kim, S.Y., Byrn, R., Gropman, J. et Baltimore, D. (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol*, 63, 3708-3713.
- Kingsley, L.A. (2001). Body habitus changes in HIV-associated syndrome (HIV-LS). *IAPAC*, Aug 7, 246-250.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C. et Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, 312, 767-768.

- Koito, A., Shigekane, H. et Matsushita, S. (2002). Ability of small animal cells to support the postintegration phase of human immunodeficiency virus type-1 replication. *Virology*, 305, 181-191.
- Kotler, D.P. et Engelson, E.S. (1999). Summary Report on the Third International Conference on Nutrition and HIV Infection, Cannes, April 1999. *Medscape HIV/AIDS eJournal*, 5,1-10.
- Kulkosky, J. et Skalka, A.M. (1994). Molecular mechanism of retroviral DNA integration. *Pharmacol Ther.*, 61, 185-203.
- Kwak, Y.T., Ivanov, D., Guo, J., Nee, E., et Gaynor, R.B. (1999). Role of the human and murin cyclin T proteins in regulating HIV-1 tat-activation. *J. Mol. Biol.*, 288, 57-69.
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F. et Hance, A.J. (2003). Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the vif protein. *Science*, 300, 1112.
- Lenhard, J.M., Croom, D.K., Weiel, J.E., Spaltenstein, A., Reynolds, D.J. et Furfine, E.S. (2000). Dietary fat alters HIV protease inhibitor-induced metabolic changes in mice. *J Nutr.*, 130, 2361-2366.
- Leroux, J.C., Cozens, R., Roesel, J.L., Galli, B., Kubel, F., Doelker, E. et Gurny, R. (1995). Pharmacokinetics of a novel HIV-1 protease inhibitor incorporated into biodegradable or enteric nanoparticles following intravenous and oral administration to mice. *J Pharm Sci.*, 84, 1387-1391.
- Lindemann, D., Wilhelm, R., Renard, P., Althage, A., Zinkernagel, R. et Mous, J. (1994). Severe immunodeficiency associated with a human immunodeficiency virus 1 NEF/3'-long terminal repeat transgene. *J Exp Med.*, 179, 797-807.
- Lores, P., Boucher, V., Mackay, C., Pla, M., Von Boehmer, H., Jami, J., Barre-Sinoussi, F. et Weill, J.C. (1992). Expression of human CD4 in transgenic mice does not confer sensitivity to human immunodeficiency virus infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.*, 8, 2063-2071.
- Lowell, B.B. (1999). PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell*, 99, 239-242.
- Lucas, G.M., Chiasson, R.E. et Moore, R.D. (1999). Highly active antiretroviral therapy in a large urban clinic: risk factors for virologic failure and adverse drug reactions. *Ann. Intern. Med.*, 131, 81-87.
- Luria, S., Chambers, I. et Berg, P. (1991). Expression of the type 1 human immunodeficiency virus Nef protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukin 2 mRNA. *Proc Natl Acad Sci*, 88, 5326-5330.

Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A., et Axel, R. (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*, 47, 333-348.

Mariani, R., Chen, D., Schröfelbauer, B., Navarro, F., König, R., Booolman, B., Münk, C., Nymark-McMahon, H. et Landau, N.R. (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by vif. *Cell*, 114, 21-31.

Mariani, R., Rasala, B.A., Rutter, G., Wieggers, K., Brandt, S.M., Krausslich, H.-G. et Landau, N.R. (2001). Mouse-human heterokaryons support efficient human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J. Virol.*, 75, 3141-3151.

Mariani, R., Rutter, G., Harris, M.E., Hope, T.J., Krausslich, H.-G., et Landau, N.R. (2000). A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells. *J. Virol.*, 74, 3859-3870.

McCune, J.M. (1996). Development and applications of the SCID-hu mouse model. *Semin Immunol.*, 8, 187-196.

Mellors, J.W., Munoz, A., Giorgi, J.V., Margolick, J.B., Tassoni, C.J., Gupta, P., Kingsley, L.A., Todd, J.A., Saah, A.J., Detels, R., Phair, J.P. et Rinaldo, C.R. Jr. (1997). Plasma viral load and CD4 lymphocytes as the prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann. Intern. Med.*, 126, 6946-954.

Miller, M.D. et Bushman, F.D. (1995). HIV integration. In1 for integration? *Curr Biol.*, 5, 368-370.

Miller, M.D., Warmerdam, M.T., Gaston, I., Greene, W.C. et Feinberg, M.B. (1994). The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med.*, 79, 101-113.

Moitra, J., Mason, M.M., Olive, M., Krylov, D., Gavrilo, O., Marcus-Samuels, B., Feigenbaum, L., Lee, E., Aoyama, T., Eckhaus, M., Reitman, M.L. et Vinson, C. (1998). Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev.*, 12, 3168-3181.

Montessori, V., Press, N., Harris, M., Akagi, L. et Montaner, J.S.G. (2004). Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. *CMAJ*, 170, 229-238.

Morrow, W.J., Wharton, M., Lau, D. et Levy, J.A. (1987). Small animals are not susceptible to human immunodeficiency virus infection. *J Gen Virol*, 68, 2253-2257.

Morrow, C.D., Park, J. et Wakefield, J.K. (1994). Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. *Am J Physiol.*, 266, C1135-1156.

Moyle, G. (2002). Overcoming obstacles to the success of protease inhibitors in highly active antiretroviral therapy regimens. *AIDS Patient Care STDS*, 12, 585-597.

National Institute of Allergy and Infectious Diseases: National Institutes of Health (2003). "HIV Infection and AIDS: An Overview". Sur le site NIAID:NIH. [en ligne] <http://www.niaid.nih.gov/factsheets/hivinf.htm> (Page consultée le 22 octobre 2003)

Noor, M.A., Seneviratne, T., Aweeka, F.T., Lo, J.C., Schwarz, J.M., Mulligan, K., Schambelan, M. et Grunfeld, C. (2002). Indinavir acutely inhibits insulin-stimulated glucose disposal in humans: a randomized, placebo-controlled study. *AIDS*, 29,16, F1-F8.

Olivier, C. (1998). Guide de la thérapie antirétrovirale chez les adultes infectés par le virus d'immunodéficience humaine (VIH). Info médicaments numéro 14. [en ligne] <http://www.cocqsida.com/infav982.pdf> (Page consultée le 3 mars 2004)

Oral, E.A., Simha, V., Ruiz, E., Andewelt, A., Premkumar, A., Snell, P., Wagner, A.J., DePaoli, A.M., Reitman, M.L., Taylor, S.I., Gordon, P., et Garg, A. (2002). Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med*, 346, 570-578.

Organisation mondiale de la santé (2003). Relevé épidémiologique hebdomadaire. OMS/WHO, 50, 78, 425-432.

Pacifici, R., Di Carlo, S., Bacosi, A., Pichini, S. et Zuccaro, P. (1997). Cytokine production in saquinavir treated mice. *Int J Immunopharmacol.*, 19, 243-248.

Pallela, F.J., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., Aschman, D.J. et Holmberg, S.D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.*, 338, 853-860.

Petersen, K.F., Oral, E.A., Dufour, S., Befroy, D., Ariyan, C., Yu, C., Cline, G.W., DePaoli, A.M., Taylor, S.I., Gordon, P. et Shulman, G.I. (2002). Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J. Clin. Invest.*, 109, 1345-1350.

Pettoello-Mantovani, M., Kollmann, T.R., Katopodis, N.F., Raker, C., Kim, A., Yurasov, S., Wiltshire, H. et Goldstein, H. (1998). Thy/liv-SCID-hu mice: a system for investigating the in vivo effects of multidrug therapy on plasma viremia and human immunodeficiency virus replication in lymphoid tissues. *J Infect Dis.*, 177, 337-346.

Piliero, P.J., Hubbard, M., King, J. et Faragon, J.J. (2003). Use of ultrasonography-assisted liposuction for the treatment of HIV-associated enlargement of the dorsocervical fat pad". *Clinical Infectious Disease*, 37, 1374-1377.

Pollard, V.W. et Malim, M.H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52, 491-532.

Powderly, W.G. (2000). Current approaches to treatment for HIV-1 infection. *J Neurovirol.*, 6 Suppl 1, S8-S13.

Price, J. (1998). Protease problems. *STEP Perspect*, 98, 3-5.

Pulford, K.A.F., Sipos, A., Cordell, J.L., Stross, W.P. et Mason, D.Y. (1990). Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. *Int. Immunol.*, 2, 973-980.

Qaqish, R.B., Fisher, E., Rublein, J. et Wohl, D.A. (2000). HIV-associated lipodystrophy syndrome. *Pharmacotherapy*, 20, 13-22.

Rabin, L., Hincenbergs, M., Moreno, M.B., Warren, S., Linnquist, V., Datema, R., Charpiot, B., Seifert, J., Kaneshima, H. et McCune, J.M. (1996). Use of standardized SCID-hu Thy/Liv mouse model for preclinical efficacy testing of anti-human immunodeficiency virus type 1 compounds. *Antimicrob Agents Chemother.*, 40, 755-762.

Rabinowitz, S., Horstmann, H., Gordon, S. et Griffiths, G. (1992). Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. *J. Cell Biol.*, 116, 95-112.

Rana, T.M. et Jeang, K.T. (1999). Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch Biochem Biophys.*, 365, 175-85.

Reue, K., Xu, P., Wang, X.P. et Slavin, B.G. (2000). Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, and increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (fld) gene. *J Lipid Res.*, 41, 1067-1076.

Riddle, T.M., Fichtenbaum, C.J., et Hui, D.Y. (2003). Leptin replacement therapy but not dietary polyunsaturated fatty acid alleviates HIV protease inhibitor-induced dyslipidemia and lipodystrophy in mice. *JAIDS*, 33, 564-570.

Rogel, M.E., Wu, L.I. et Emerman, M. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J Virol.*, 69, 882-888.

Roy, S., Delling, U., Chen, C.H., Rosen, C.A. et Sonenberg, N. (1990). A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev.*, 8, 1365-1373.

Saha, K., Zhang, J., Gupta, A., Dave, R., Yimen, M. et Zerhoouni, B. (2001). Isolation of primary HIV-1 that target CD8⁺ T Lymphocytes using CD8 as a receptor. *Nat. Med.*, 7, 65-72.

Sattentau, Q.J. et Moore, J.P. (1993). The role of CD4 in HIV binding and entry. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 342, 59-66.

Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. et Heard, J.M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med.*, 2, 338-42.

Sehgal, S., Datta, U., Mujtaba, S., Sood, A. et Vinayak, V.K. (2002). Cellular and serological markers of disease activity in Indian patients with HIV/AIDS. *Methods Cell Sci.* 24, 107-14.

Siliciano, R.F. (1996). The role of CD4 in HIV envelope-mediated pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 205, 159-179.

Shimomura, I., Hammer, R.E., Ikemoto, S., Brown, M.S., et Goldstein, J.L. (1999). Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature*, 401, 73-76.

Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W. et Greene, W.C. (2003). HIV-1 blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol. Cell*, 12, 591-601.

Strebel K. (2003). Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *AIDS*, 17 Suppl 4, S25-34.

Strobl, H., Scheinecker, C., Csmarits, B., Majdic, O. et Knapp, W. (1995). Flow cytometric analysis of intracellular CD68 molecule expression in normal and malignant hematopoiesis. *Br. J. Haematol.*, 90, 774-782.

Subbramanian, R.A. et Cohen, E.A. (1994). Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *J Virol.*, 68, 6831-6835.

Sutton, R.E., Coskkun, A.K. et Nguyen, V. (2003). Development of a mouse model for HIV/AIDS. *Res. Initiat. Treat. Action*, 8, 22-24.

Trono, D. (1995). HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell*, 82, 189-192.

Tungaturthi, P.K., Sawaya, B.E., Singh, S.P., Tomkowicz, B., Ayyavoo, V., Khalili, K., Collman, R.G., Amini, S. et Srinivasan, A. (2003). Role of HIV-1 Vpr in AIDS pathogenesis: relevance and implications of intravirion, intracellular and free Vpr. *Biomed. Pharmacother.*, 57, 20-24.

Turmel, B., Venne, S., Meunier, L., Minzunza, S., Lortie, M.-J. et Parent, R. (2003). Portrait des infections transmissibles sexuellement et par le sang (ITSS), de l'hépatite C, de l'infection par le VIH et du sida au Québec. La direction des communications du ministère de la Santé et des Services sociaux. Gouvernement du Québec. Décembre 2003.

van der Valk, M., Gisolf, E.H., Reiss, P., Wit, F.W., Japour, A., Weverling, G.J. et Danner, S.A. (2001). Increased risk of lipodystrophy when nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors are included with protease inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *AIDS*, 15, 847-855.

van Maanen, M. et Sutton, R.E. (2003). Rodent models for HIV-1 infection and disease. *Curr HIV Res.*, 1, 121-130.

Viscidi, R.P., Mayur, K., Lederman, H.M. et Frankel, A.D. (1989). Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by Tat protein from HIV-1. *Science*, 246, 1606-1608.

Wanke, C.A. (1999). Epidemiological and clinical aspects of the metabolic complications of HIV infection. The fat redistribution syndrome. *AIDS*, 13, 1287-1293.

Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.-M., Fischer, W.H. et Jones, K.A. (1998). A novel CDK9-associated c-type cyclin interacts directly with HIV-1 tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, 92, 451-462.

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

Wolenski, M., Cramer, S.O., Ehrlich, S., Steeg, C., Grossschupff, G., Tenner-Racz, K., Racz, P., Fleischer, B. et von Bonin, A. (2003). Expression of CD83 in the murine immune system. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 192, 189-192.

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M.L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P. et Kadowaki, T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med.*, 7, 941-946.

Ye, J.M., Samaras, K., Bonner, K.M., Cooney, G.J., Chisholm, D.J. et Kraegen, E.W. (1998). Ritonavir has paradoxical effects on lipid metabolism and insulin sensitivity in rats compared with humans. *AIDS*, 12, 2236-2237.

Yung, E., Sorin, M., Pal, A., Craig, E., Morozov, A., Delattre, O., Kappes, J., Ott, D. et Kalpana, G.V. (2001). Inhibition of HIV-1 virion production by a transdominant mutant of integrase interactor 1. *Nat. Med.*, 7, 920-926.

Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R.J., Zhang, C., Arunachalam, S.C. et Gao, L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*, 424, 94-98.

Zav'yalov, V.P., Denesyuk, A.I., Lundell, J. et Korpela, T. (1995). Some new aspects of molecular mechanisms of cyclosporin A effect on immune response. *APMIS*, 103, 401-415.

Zheng, Y.-H., Yu, H.-F. et Peterlin, B.M. (2003). Human p32 protein relieves a post-transcriptional block to HIV replication in murine cells. *Nat. Cell Biol.*, 5, 611-618.

Zimmerman, C., Klein, K.C., Kiser, P.K., Singh, A.R., Firestein, B.L., Riba, S.C. et Lingappa, J.R. (2002). Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV capsids. *Nature*, 415, 88-92.

# souris	Tg	Poids Final	Dos				Poils		Mobilité	Rate					Reins			
			N	LR	R	TR	N	H		TP	LP	N	LG	TG	P	N	G	Gr
127616	-	34,74	X				X		OK			X				X		
127617	-	28,29	X				X		OK			X				X		
127618	-	25,92				X	X		OK			X				X		
127619	-	32,19			X		X		OK		X					X		
127630	+	19,52				X	X		OK		X				X			X
127501	-	39,00	X				X		OK			X				X		
127504	+	35,51			X		X		OK			X				X		X
127487	-	27,32			X		X		OK			X				X		
127493	+	25,13			X		X		OK		X					X		
127494	-	29,10	X				X		OK			X			LP			
127505	-	37,70	X				X		OK				X			X		
127506	-	34,29		X			X		OK				X			X		
127508	-	36,48	X				X		OK			X				X		
127509	+	15,08	X				X		Réduite			X				X		
127482	-	36,87	X				X		OK			X				X		
127486	+	31,19			X		X		OK			X				X		
127392	+	37,19			X		X		OK		X					X		
127642	-	32,49		X			X		OK				X			X		
127643	+	32,73			X		X		OK			X				X		
127644	+	24,30				X		X	Réduite				X			X		
127645	+	30,12				X	X		Réduite				X			X		
127646	+	30,69			X			X	OK			X				X		
131245	-	37,03		X			X		OK			X				X		
131246	-	36,23	X				X		OK		X					X		
131247	+	34,72		X			X		OK			X				X		
131248	+	34,91			X		X		OK			X				X		
131252	+	34,19	X				X		OK			X				X		
131253	-	32,49		X			X		OK			X				X		
131254	+	30,03				X	X		OK			X			X			
131255	-	30,79		X			X		OK			X			X			
131135	-	29,84		X			X		OK			X			X			
131270	-	19,14		X				X	Réduite		X				X			X

N : Normal **TP** : Très petit **H** : Hérissé
LR : Légèrement rond **LP** : Légèrement petit **Gr** : Granuleux
R : Rond **TG** : Très grand **P** : Petit
TR : Très rond **LG** : Légèrement grand **G** : Gros

# souris	Tg	Poids Final	Dos				Poils		Mobilité	Rate					Reins			
			N	LR	R	TR	N	H		TP	LP	N	LG	TG	P	N	G	Gr
131271	+	26,37		X			X		OK				X		X			X
131272	+	16,11				X		X	Réduite		X				X			X
131273	+	26,71			X		X		OK				X		X			X
131136	+	27,45			X		X		OK			X				X		
131256	+	26,91				X	X		OK			X				X		
131257	-	26,19		X			X		OK			X				X		
131258	+	26,47			X		X		OK			X				X		
131266	-	38,18		X			X		OK		X					X		
131267	-	34,25					X		OK		X					X		
131268	-	32,72					X		OK			X				X		
131274	+	39,84					X		OK			X				X		
131275	+	38,83					X		OK			X			X			X
131269	-	30,05		X			X		OK			X				X		
131276	+	35,02	X				X		OK			X				X		
131277	+	32,12		X			X		OK			X				X		
131137	-	28,51		X			X		OK			X				X		

N : Normal **TP** : Très petit **H** : Hérissé
LR : Légèrement rond **LP** : Légèrement petit **Gr** : Granuleux
R : Rond **TG** : Très grand **P** : Petit
TR : Très rond **LG** : Légèrement grand **G** : Gros

Annexe 2 Poids des souris traitées au ritonavir à long terme

# souris	Tg	Traitement	Poids (mg)																															Poids Finals (mg)
			Mois 1			Mois 2			Mois 3			Mois 4			Mois 5			Mois 6			Mois 7													
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27				
127615	+	Eau	21	21	21	21	22	24	26	28	28	26	29	30	29	30	26	26	26	27	27	28	29	29	30	29	29	30	30	30	30	30,31		
127630	+	Eau	20	20	21	21	23	23	24	26	26	25	27	29	27	27	25	24	25	25	24	24	23	23	22							19,52		
127504	+	Eau		30	31	32	30	31	31	37	37	36	36	37	38	38	35	34	35	35	36	37	37	36	37	36	36	36	36		35,51			
127493	+	Eau		25	25	28	25	25	25	26	27	28	29	28	28	28	27	25	25	25	25	26	28	28	26							25,13		
127509	+	Eau		22	25	25	29	26	26	29	29	29	29	30	30	30															15,08			
127486	+	Eau		25	25	25	30	33	32	30	30	32	32	31	32	32	32	29	30	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31		31,19			
127392	+	Eau		30	30	30	32	32	33	36	34	36	37	37	38	38	38	35	36	35	35	36	37	37	37	37	38	37	38		37,19			
127643	+	Eau	22	25	23	27	30	30	31	32	32	32	32	32	32	32	31	32	32	32	33	33	33	34	34	34	31	32	32	32	32	32,73		
127644	+	Eau	21	23	21	26	30	30	31	30	29	32	32	31	32	32	31	31	32	32	33	34	34	34	33	33	33	33	33	30		24,30		
127645	+	Eau	21	26	26	27	31	31	32	31	30	31	32	32	32	33	31	31	31	32	32	32	33	33	33	33	33	34	33	32		30,12		
127646	+	Eau	21	22	21	28	30	30	31	31	30	31	32	31	30	27	27	28	28	28	29	30	27	28	28	29	29	29	29	30		30,69		
131136	+	Eau	24	25	21	20	22	22	22	24	26	26	26	26	27	27	26	26	27	29	28	28	28	28	28	28	28	28	28		27,45			
131256	+	Eau	23	22	20	20	20	21	21	22	23	24	24	24	25	26	26	27	27	26	26	26	28	28	28	28	28	28	27	28		26,91		
131258	+	Eau	23	25	21	21	22	24	26	26	26	26	26	27	27	26	26	27	29	28	28	26	26	27	26	27	26	27	26		26,47			
131274	+	Eau	26	30	30	29	31	31	32	32	32	32	33	33	34	35	35	35	37	37	38	38	38	38	38	39	39	40			39,84			
131275	+	Eau	26	30	30	29	28	30	30	34	33	33	34	35	35	37	38	37	38	38	39	38	39	40	40	40	39	39			38,83			
131276	+	Eau	22	22	22	22	23	27	27	28	26	27	28	28	31	32	33	33	35	33	33	35	34	34	36	34	34	33			35,05			
131277	+	Eau	23	22	25	22	24	27	27	27	27	28	27	28	29	30	29	31	30	29	29	31	31	31	32	32	31	31			32,12			
		Moyenne	23	25	24	25	27	28	28	29	29	30	30	31	31	31	30	31	31	31	31	31	31	32	32	32	32	32	31	29,91				
127393	+	ritonavir	25	30	31	33	31	31	31	28	29	31	31	31	32	32	28	27	28	28	27	28	28	29	28	29	28	29	30		27,27			
127394	+	ritonavir	22	25	27	31	31	31	31	26	30	30	30	30	32	32	24	32	32	32	33	33	34	34	34	34	34	34	33		32,66			
127483	+	ritonavir	22	25	28	33	33	32	32	31	32	32	32	32	32	32	34	34	34	34	34	34	35	35	36	37	36	35	36		35,78			
127485	+	ritonavir	20	25	29	32	32	32	32	30	32	32	32	32	32	32	31	31	31	31	31	32	31	32	33	32	32	32	33		31,01			
127629	+	ritonavir	20	22	24	26	30	29	26	28	25	24	24	24	24	24	22	23													18,25			
127631	+	ritonavir	20	21	21	24	24	24	23	26	24	25	25	25	25	26	25	24	25	25	24	23	23	23							22,15			
127635	+	ritonavir	20	22	24	24	28	28	27	27	25	25	25	25	26	26	26	26	27	27	28	29	31	29	29	29	30	29	29		29,81			
127636	+	ritonavir	20	22	24	28	28	29	25	27	25	25	25	25	26	26	26	26	27	27	28	28	28	29	30	30	29	29	28		29,62			
127637	+	ritonavir	20	21	23	26	26	30	28	28	25	26	26	26	28	29	29	29	29	28	29	28	28	28	29	29	29	28	29		30,07			

# souris	Tg Traitement	Mois 1			Mois 2			Mois 3			Mois 4			Mois 5			Mois 6			Mois 7			Poids (mg)							
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
127498	+	ritonavir	25	30	31	33	32	32	33	36	35	34	32	32	32	33	33	34	35	35	35	37	38	38	39	38	38	38	37,99	
127503	+	ritonavir	22	25	32	32	32	33	36	35	35	35	34	35	35	36	34	34	32	28	29	29	29	29	30	28	28	27	26,55	
127611	+	ritonavir	28	31	31	32	31	33	35	35	35	37	37	38	38	38	39	39	40	42	43	43	43	44	45	46	46	47	46,15	
127614	+	ritonavir	25	25	30	28	30	31	32	34	34	34	34	34	31	32	32	33	33	34	35	35	36	37	36	37	37	37	35,46	
131247	+	ritonavir	24	25	26	27	27	28	28	29	28	28	29	30	31	31	32	32	33	33	33	33	33	33	32	33	34	34	34,72	
131248	+	ritonavir	24	25	27	29	29	30	30	30	29	29	30	31	32	33	34	34	34	34	34	34	34	35	34	34	34	34	34,91	
131252	+	ritonavir	23	23	22	24	24	26	25	25	28	28	28	30	31	32	33	34	33	34	34	35	34	34	34	34	34	35	34,19	
131254	+	ritonavir	23	23	22	24	24	26	24	25	26	27	26	27	29	28	29	30	31	30	29	30	30	30	30	29	29	30,03		
131271	+	ritonavir	21	23	22	20	22	22	22	22	24	23	23	24	24	26	27	26	23	25	26	26	27	27	26	26	26	26,37		
131272	+	ritonavir	23	22	22	20	21	22	22	22	23	23	23	24	24	24	23	23	28									16,11		
131273	+	ritonavir	23	23	22	20	22	23	23	23	23	23	24	25	25	26	26	26	23	25	26	26	26	26	26	26	26	26,71		
		Moyenne	23	24	26	27	28	29	28	28	28	28	29	29	30	30	30	31	31	31	31	31	32	32	32	32	33	34	30,29	
127616	-	Eau	22	25	25	26	26	30	30	30	30	32	34	32	30	32	32	32	31	32	34	35	32	35	34	34	35	35	34,74	
127617	-	Eau	20	24	20	21	23	25	26	28	29	29	27	28	27	27	27	25	27	26	27	27	27	28	28	28	29	28	28,29	
127618	-	Eau	22	21	22	22	24	23	27	27	26	26	26	28	28	28	26	26	27	27	28	27	28	28	29	27	25	26	25,92	
127619	-	Eau	21	21	20	20	21	23	26	28	29	27	27	29	29	31	30	31	32	32	33	33	35	34	35	32	33	31	32	32,19
127501	-	Eau		33	31	32	33	35	36	38	38	38	39	39	40	40	37	37	38	38	39	39	39	39	39	39	39	40	39,00	
127487	-	Eau		20	20	25	22	24	26	28	28	29	28	29	30	31	29	28	28	29	30	30	31	29	28	29	31	29	27,32	
127494	-	Eau		22	22	27	24	26	28	26	27	29	27	29	29	30	28	28	28	28	29	28	30	30	30	29	29	30	29,10	
127505	-	Eau		25	22	22	29	26	28	30	30	31	33	34	35	36	34	34	35	36	37	37	39	38	39	38	37	37	37,70	
127506	-	Eau		25	26	26	28	25	28	30	28	29	32	32	34	34	32	33	32	32	33	34	34	35	34	35	32	34	35	34,29
127508	-	Eau		22	22	22	29	27	27	29	30	29	31	33	35	36	33	33	33	33	34	35	36	36	36	38	36	35	37	36,48
127482	-	Eau		28	28	30	31	33	32	32	31	36	36	37	37	37	37	35	35	36	36	35	36	36	38	38	37	37	36,87	
127642	-	Eau	21	22	23	26	29	30	31	33	33	32	32	35	34	34	34	34	34	34	35	36	34	35	36	33	32	33	33	32,45
131257	-	Eau	23	22	22	20	21	22	23	23	24	24	25	25	26	26	27	28	27	27	28	28	28	26	27	27	25	26	26,19	
131266	-	Eau	23	26	23	22	22	25	26	28	27	28	30	30	31	33	33	33	35	34	35	36	37	37	38	38	38	39	38,18	
131267	-	Eau	24	26	25	24	22	28	28	29	27	27	29	30	30	32	33	33	35	34	34	34	34	35	35	34	34	35	34,25	
131268	-	Eau	22	25	25	25	22	27	27	28	28	28	29	29	31	31	31	33	32	33	33	33	33	34	34	34	33	33	32,72	

Annexe 3 Analyse du sérum des souris traitées à l'AP à long terme

# souris	Tg	Poids	Unités	Glucose mmol/L	Urée mmol/L	Créatinine umol/L	Albumine g/L	Triglycérides mmol/L	Cholestérol mmol/L	HDL-Chol mmol/L
127392	+	27,27	1	3,7	8,6	58	35	2,05	4,58	3,92
127393	+	32,66	2	4,7	9,0	34	32	3,52	4,51	2,18
127394	-	39,04	3	5,4	7,5	45	25	2,93	4,29	3,77
127395	+	35,78	4	6,4	8,1	48	28	2,49	4,46	3,64
127482	-	17,8	5	7,5	6,6	32	34	3,72	5,03	4,47
127483	+	31,01	6	4,3	8,6	99	27	3,97	4,07	2,91
127484	-	27,69	7	5,4	12,0	46	25	3,27	3,53	2,74
127485	+	18,25	8	3,7	9,3	52	28	2,89	4,64	4,16
127486	+	29,81	9	7,7	9,6	72	30	3,55	4,45	3,5
127487	+	29,62	10	9,2	8,9	63	36	2,86	3,14	2,74
127492	+	30,07	11	6,4	9,7	32	35	2,91	3,74	3,04
127494	+	37,99	12	6,5	8,4	37	34	4,08	3,41	2,85
127498	-	41,39	13	8,0	10,2	64	24	3,66	3,91	3,47
127499	-	40,42	14	10,6	9,6	38	38	4,71	5,95	5,12
127500	-	41,37	15	7,4	10,3	80	35	4,82	5,35	4,85
127501	+	26,55	16	10,3	8,1	85	32	4,49	4,96	4,1
127502	-	36,43	17	7,8	8,5	32	35	3,55	5,92	5,36
127503	-	33,13	18	2,7	77,8	97	28	3,94	8,8	7,12
127504	-	31,41	19	6,2	16,7	89	32	4,63	6	5,24
127505	-	34,48	20	6,2	8,1	55	30	3,13	3,63	2,85
127506	-	36,01	21	9,0	7,6	18	31	4,59	3,34	3,1
127508	-	44,6	22	7,7	8,4	68	35	4,32	3,37	2,43
127608	-	37,15	23	13,3	8,1	106	34	6,11	5,22	4,41
127609	+	46,15	24	16,5	9,6	83	39	6	6,63	5,72
127610	-	36,75	25	12,2	9,2	16	36	7,62	6,95	6,5
127611	-	40,15	26	10,8	7,3	63	32	5,73	5,89	4,85
127612	+	35,46	27	16,1	7,8	72	32	3,02	3,4	2,98
127613	+	30,31	28	10,5	6,7	6	26	3,61	4,09	3,79
127614	-	34,74	29	14,3	17,9	37	32	4	7,33	6,62
127615	-	28,29	30	14,5	11,4	89	38	6,05	4,12	3,24
127616	-	25,92	31	14,6	9,4	70	36	5,63	3,94	2,79
127617	-	32,19	32	12,0	7,9	75	35	5,89	2,21	1,73
127618	-	39,00	33	13,4	9,3	78	35	4,57	3,54	2,9
127619	+	35,51	34	10,6	10,0	85	40	5,37	2,8	2,23
127628	-	27,32	35	13,6	8,4	16	36	6,35	5,82	5,48
127629	-	29,10	36	6,4	133,3	140	18	3,6	4,7	3,97

# souris	Tg	Poids	Unités	Glucose mmol/L	Urée mmol/L	Créatinine umol/L	Albumine g/L	Triglycérides mmol/L	Cholestérol mmol/L	HDL-Chol mmol/L
127632	-	37,70	37	14,6	8,6	21	37	5,37	5,97	5,42
127633	-	34,29	38	15,5	9,2	26	40	5,85	5,78	5,63
127634	-	36,48	39	15,8	7,5	23	39	5,67	6	5,29
127635	-	36,87	40	12,2	7,8	53	33	3,17	3,82	3,02
127636	+	31,19	41	36,1	10,4	80	41	4,71	4,1	
127637	+	37,19	42	12,2	11,3	89	41	5,88	4,58	3,77
127642	-		43	9,8	7,5	10	25	4,99	3,46	3,31
127643	+	32,73	44	12,7	8,7	21	35	5,57	5,21	4,88
127645	+		45	0,6	39,7	51	29	1,09	3,29	2,71
127646	+	30,69	46	12,3	10,4	23	37	4,78	5,22	4,38
131135	-	37,03	47	10,3	8,2	96	37	4,03	3,98	3,03
131136	-	36,23	48	15,3	8,9	27	46	3,49	3,97	3,65
131137	+	34,72	49	11,2	8,9	59	36	3,92	3,26	2,77
131245	+	34,91	50	15,7	8,9	53	38	7,12	5,73	4,98
131246	+	34,19	51	15,9	8,7	80	33	5,45	5,11	4,54
131247	-	32,49	52	15,9	18,3	127	34	7,51	7,35	5,8
131248	+	30,03	53	12,4	11,7	97	41	6,94	6,8	5,7
131252	-	30,79	54	13,6	8,9	26	35	3,37	4,88	4,16
131253	-	29,84	55	13,2	9,9	31	47	6,1	5,43	4,79
131254	+	26,37	56	10,1	9,6	15	34	3,36	3,93	3,64
131255	+	26,71	57	13,2	11,2	51	45	5,52	5,3	4,17
131256	+	27,45	58	15,3	6,5	20	35	3,19	2,75	2,63
131257	+	26,91	59	14,7	7,4	23	36	4,02	3,14	2,87
131258	-	26,19	60	14,0	7,2	22	33	2,97	2,25	2
131266	+	26,47	61	11,4	8,3	23	38	4,28	4,96	4,72
131267	-	38,18	62	11,3	8,1	20	37	3,45	4,62	4,35
131268	-	34,25	63	16,2	7,4	15	30	2,61	3,81	3,71
131269	-	32,72	64	11,6	8,3	66	36	4,15	3,79	3,21
131271	+	39,84	65	13,0	25,8	44	34	3,95	7,53	6,13
131273	+	38,83	66	11,5	29,0	93	34	3,85	7,87	6,96
131274	-	30,05	67	15,8	8,1	23	42	4,97	5,64	5,14
131275	+	35,02	68	14,9	11,9	29	42	3,21	5,72	5,27
131276	+	32,12	69	12,5	9,4	29	36	5,43	3,42	2,91
131277	-	28,51	70	15,0	12,4	25	44	6,22	4,61	4,17
			Moyennes	11,31	13,03	52,44	34,45	4,43	4,73	4,06