

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude du trafic intracellulaire des hydrolases lysosomales dans les cellules exprimant la protéine Nef du virus de l'immunodéficience humaine de type 1

Bodart, Benoît

Award date:
2010

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**ÉTUDE DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DES HYDROLASES LYSOSOMALES
DANS LES CELLULES EXPRIMANT LA PROTEINE NEF DU VIRUS DE
L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Benoît Bodart

Janvier 2010

Facultés Universitaire Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone : + 32(0)81.72.44.18 – Téléfax : + 32(0)81.72.44.20
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Étude du trafic intracellulaire des hydrolases lysosomales dans les cellules exprimant la protéine Nef du virus de l'immunodéficience humaine de type 1

BODART Benoît

Résumé

Les virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1), de type 2 et le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) ont développé des stratégies de détournement du trafic intracellulaire de protéines membranaires par l'intermédiaire d'une petite protéine multifonctionnelle de 27-35 kDa nommée Nef. Cet effet de Nef sur le trafic est étayé par le fait que Nef induit une augmentation du nombre et de la taille de corps multivésiculaires dans les lymphocytes et dans les cellules HeLa.

En fait, les effets de la protéine Nef seraient dus en grande partie à son interaction avec des composants essentiels du trafic intracellulaire, en particulier avec les complexes AP (clathrin-adaptor proteins). Étant donné l'impact de l'expression de Nef sur le trafic intracellulaire d'un certain nombre de protéines et vu le rôle crucial des complexes AP dans le trafic intracellulaire des protéines lysosomales lors de leur biosynthèse, nous nous sommes demandé si l'expression de Nef ne pouvait pas interférer dans le trafic de ces hydrolases acides.

La première étape de ce mémoire a consisté à déterminer les conditions optimales de transfection pour les cellules HeLa, de manière à réaliser des expériences biochimiques avec un maximum de cellules exprimant la protéine Nef. Ensuite, après cette étape de mise au point, nos investigations sur les conséquences de l'expression de Nef sur le trafic biosynthétique des hydrolases lysosomales ont pu débuter.

L'ensemble de nos résultats semble indiquer que l'expression de Nef n'interfère pas de façon majeure avec le trafic des hydrolases lysosomales et des protéines membranaires, aussi bien dans les cellules HeLa que dans les cellules HEK 293 T. En effet, mis à part une légère diminution de l'abondance de la protéine LAMP-1 dans les cellules exprimant Nef WT, l'abondance, la maturation, l'activité enzymatique des hydrolases acides, et par conséquent le trafic biosynthétique des hydrolases étudiées ne semble pas être affecté dans ces mêmes cellules.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire
Janvier 2010

Promoteur : I. Hamer

Co-promoteurs : M. Jadot, S. Bénichou.

Introduction :	4
1. Structure du virus :	4
2. Cycle de réplication :	4
2.1. Entrée dans la cellule cible :	5
2.2. Pénétration :	5
2.3. Rétro-transcription :	5
2.4. Etape d'intégration :	6
2.5. Etape de transcription :	6
2.6. Etape de traduction :	7
2.7. Etape d'assemblage :	8
2.8. Etape de bourgeonnement :	9
2.9. Etape de maturation :	10
3. HIV-1 Nef :	10
3.1. Structure :	10
3.2. Fonctions de Nef :	11
3.2.1. Rôles de Nef sur le pouvoir infectieux du virus :	11
3.2.2. Rôles de Nef sur le trafic intracellulaire :	12
3.2.3. Impact de Nef sur l'ultrastructure des endosomes :	13
4. La biogenèse des lysosomes :	14
4.1. Caractéristiques des lysosomes :	14
4.2. Transport des hydrolases lysosomales :	14
4.2.1. La voie dépendante des récepteurs au mannose-6-phosphate (MPR) :	14
4.2.2. Les voies indépendantes des récepteurs mannose-6-phosphate :	16
4.3. Transport des protéines membranaires lysosomales :	17
5. Objectifs :	18
Matériels et méthodes :	19
1. Culture cellulaire :	19
2. Transfections :	19
3. Nucléofection :	20
4. Analyse en cytométrie de flux :	20
5. Western blot :	21
6. Fractionnement cellulaire :	21
7. Centrifugation Isopycnique dans un gradient de densité de saccharose :	22
8. Centrifugation Isopycnique dans un gradient de densité « autoformé » de Percoll :	22
9. Microscopie fluorescente confocale :	22
10. Marquage métabolique et immunoprécipitation :	23
11. Mesure de l'activité enzymatique des hydrolases lysosomales :	23
Résultats :	25
1. Transfections :	25
1.1. Choix de la lignée cellulaire et des agents de transfection :	25
1.1.1. Choix de la lignée cellulaire :	25
1.1.2. Critères de sélection des agents de transfection :	26
1.1.3. Mode d'action des agents de transfection :	26
1.1.4. Nef-GFP :	26
1.2. Efficacité de transfection :	26

1.3. Etude de l'influence des agents de transfection sur la morphologie et la densité des lysosomes :	28
1.3.1. Expériences de microscopie confocale :	28
1.3.2. Centrifugation isopycnique sur un gradient de saccharose :	29
1.3.3. Centrifugation isopycnique sur un gradient auto-formé de Percoll en condition isotonique :	31
2. Expression de CD8-Nef sauvage, CD8-Nef LL/AA et CD8-Stop :	33
3. Mesure de l'activité de plusieurs hydrolases lysosomales :	34
4. Abondance de la cathepsine D:	36
5. Abondance de la cathepsine B :	38
6. Cinétique de maturation de la cathepsine D :	40
7. Abondance des protéines membranaires LAMP-1 et LAMP-2 :	45
8. Impact éventuel de Nef sur le transport des protéines lysosomales dans des cellules HEK 293T :	47
8.1. Mesure de l'activité enzymatique des hydrolases lysosomales (HEK 293T) :	48
8.2. Abondance des cathepsines D et B (HEK 293 T) :	48
8.3. Abondance des protéines LAMP-1 et LAMP-2 (HEK 293 T) :	49
<i>Discussion et perspectives :</i>	<i>51</i>
<i>Bibliographie :</i>	<i>56</i>
<i>Figures :</i>	<i>61</i>

Je remercie très vivement Monsieur Jadot qui m'a permis d'effectuer ce mémoire au sein de son équipe, pour son écoute, ses questionnements et ses conseils avisés.

J'exprime toute ma gratitude envers ma promotrice Madame Hamer pour son enseignement, son aide, sa disponibilité et ses pistes précieuses pour la réalisation de ce mémoire.

Merci également à mon co-promoteur, Monsieur Bénichou pour sa collaboration, ses propositions, sources d'enrichissement.

Je remercie d'avance les membres du jury pour le temps consacré à la lecture de ce mémoire.

Toute ma gratitude va également à tout le personnel du laboratoire de chimie physiologique pour leurs recommandations lors des réunions du département, pour leur soutien. En particulier, je tiens à ne pas oublier Michel Savels pour le partage de son expertise informatique et sa gentillesse.

Merci aux doctorant(e)s, mémorantes du laboratoire de chimie physiologique pour leur soutien, leurs suggestions et leurs encouragements.

Je remercie tout spécialement ma femme pour ses encouragements, pour son support moral, son appui sans faille et pour m'avoir permis de réaliser cette aventure.

Enfin, un grand merci à tous les membres de ma famille pour leur appui.

Mes remerciements vont également aux responsables des unités de recherche de l'URBM pour l'utilisation du cytomètre de flux et l'URBC pour l'utilisation du microscope confocal et du Typhoon et en particulier à Catherine Demazy, Noëlle Ninane et Edouard Delaive pour leur gentillesse et le partage de leur expertise dans leur domaine respectif.

Merci à tous !

Introduction :

Le virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1) est un rétrovirus complexe de la famille des lentivirus. Isolé et identifié en 1983 par l'équipe de Françoise Barré-Sinoussi et de Luc Montagnier (prix Nobel de médecine 2008) (Barre-Sinoussi et al., 1983), ce virus est responsable du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise). A ce jour, aucun vaccin n'est capable de protéger efficacement contre une infection engendrée par ce rétrovirus (Barouch, 2008).

Le HIV-1 peut se répliquer dans les cellules exprimant le récepteur CD4, c'est-à-dire dans les cellules lymphocytaire T CD4+, les macrophages et les cellules dendritiques (Carter and Ehrlich, 2008). Les macrophages représentent les premières cibles cellulaires lors d'une infection par HIV-1, suivis par les lymphocytes T-CD4⁺, avec comme répercussion la disparition de ces cellules « T » menant à l'immunodéficience qui caractérise le SIDA. Au contraire des lymphocytes, les macrophages sont plus résistants aux effets du virus et sont plus aptes à échapper au système immunitaire de l'individu infecté. De plus, les macrophages sont capables de passer la barrière hémato-encéphalique (Carter and Ehrlich, 2008). C'est pourquoi, ils jouent un rôle crucial dans la pathogenèse et dans la transmission virale, ainsi que dans la dissémination du virus à travers tout l'organisme de l'hôte, y compris le cerveau.

A l'heure actuelle, il existe plus d'une vingtaine de médicaments antirétroviraux pour le traitement de l'infection HIV. Ils visent plusieurs étapes distinctes du cycle de réplication du virus. Cependant, une résistance à ces médicaments apparaît assez rapidement. C'est pourquoi il est toujours important d'approfondir nos connaissances sur la structure du virus, sur son cycle de réplication et sur les mécanismes régulateurs (Adamson and Freed, 2009).

1. *Structure du virus :*

Le virus HIV présente un diamètre d'environ 120 µm. L'enveloppe virale est composée d'une bicouche lipidique qui dérive de la membrane plasmique de la cellule-hôte. Elle contient donc des protéines de la cellule-hôte ainsi qu'en moyenne 72 copies des glycoprotéines d'enveloppe qui forment des spicules à la surface de la particule virale (ou virion). Ces spicules sont composées de 3 glycoprotéines de surface (gp120) associées chacune de façon non-covalente à 3 glycoprotéines transmembranaires (gp41). Sous l'enveloppe virale, la matrice est constituée de la protéine MA (p17) alors que le core de la particule virale est formé de 2000 copies de la protéine de capsid, CA (p24). La capsid contient le génome viral constitué de 2 molécules d'ARN simples brins, ainsi que d'autres protéines virales nécessaires à certaines étapes essentielles du cycle viral : les enzymes virales (la transcriptase inverse et l'intégrase), la protéine de nucléocapsid (NC, p7), ainsi que certaines protéines virales dites auxiliaires (Vpr et Nef, notamment) (Goff, 2007).

2. *Cycle de réplication :*

La réplication du HIV-1 peut être divisée en deux phases distinctes : les étapes précoces (de l'entrée du virus jusqu'à l'étape d'intégration du génome viral dans la chromatine de la cellule hôte) et les étapes tardives (comprenant les étapes de transcription, de traduction, d'assemblage et de bourgeonnement) (Bieniasz, 2009; Carter and Ehrlich, 2008).

Ces différentes étapes sont régulées à la fois par des protéines virales et par des protéines de la cellule hôte (voir figure 1). Celles-ci jouent un rôle important. En effet, bien que le HIV suive globalement le même cycle de réplication dans les lymphocytes T et dans les macrophages, différents aspects dans l'interaction virus / hôte sont spécifiques du type cellulaire. Par exemple, les mécanismes d'entrée du virus sont un peu différents dans les deux types cellulaires. De plus, les cellules lymphocytaires doivent être activées avant de pouvoir produire des virions, ce qui implique une division cellulaire. En revanche, les macrophages peuvent être infectés même s'ils ne se divisent pas. Jusqu'il y a peu, il était généralement admis que l'assemblage des virions se faisait au niveau de la membrane plasmique dans les lymphocytes T et au niveau des endosomes tardifs / corps multivésiculaires dans les macrophages. Cependant, des découvertes récentes semblent indiquer que, dans les deux types cellulaires, l'assemblage se déroule à la surface cellulaire et que l'apparition de protéines ou de particules virales dans les corps multivésiculaires résulte d'une endocytose.

2.1. Entrée dans la cellule cible :

Comme tous les rétrovirus enveloppés, l'infection par HIV-1 commence par l'interaction entre l'enveloppe virale et certaines protéines de surface de la cellule hôte (Carter and Ehrlich, 2008). La première interaction consiste en l'attachement de la glycoprotéine gp120 du HIV-1 au récepteur CD4 présent sur les lymphocytes et les macrophages. La deuxième interaction découlerait du changement de conformation de la protéine gp120 après sa liaison à CD4 et engagerait des molécules appelées « co-récepteurs ». Ces co-récepteurs, CCR5 et CXCR4, appartiennent à la super-famille des « récepteurs couplés aux protéines G » à sept domaines transmembranaires qui servent de récepteurs à chémokines. La liaison de CD4 provoque un changement de conformation majeur, d'abord de gp120, puis de gp41, conduisant à rapprochement plus étroit entre les membranes virale et cellulaire et facilitant ainsi la fusion des membranes (Liu et al., 2008). Il est à noter que des régions spécifiques de la membrane plasmique, nommées « radeaux lipidiques » riches en cholestérol et sphingolipides, seraient nécessaires pour les étapes d'entrée du virus et de fusion, en favorisant peut-être la mobilité des récepteurs et des co-récepteurs (Campbell et al., 2008).

2.2. Pénétration :

Le passage de la capsid virale à travers la membrane cellulaire dans le cytosol est appelé « pénétration ». Pour les virus enveloppés comme le HIV, la pénétration implique un mécanisme de fusion entre les bicouches lipidiques de l'enveloppe virale et la membrane plasmique de la cellule hôte, permettant au « core » viral d'accéder au cytoplasme et d'initier les étapes suivantes de l'infection. Au cours de son trajet intracellulaire, il doit d'abord franchir la barrière d'actine sous-corticale et ensuite se frayer un chemin parmi les éléments cytoplasmiques, probablement en s'associant au cytosquelette microtubulaire. Vient ensuite l'étape de la décapsidation, durant laquelle le complexe ribonucléique contenant notamment l'ARN et les enzymes virales évolue progressivement en un complexe de rétro-transcription (RTC), puis de pré-intégration (PIC) (Freed, 2001). Pendant ces étapes, la capsid va se désassembler tandis que les protéines de la matrice, la transcriptase inverse et l'intégrase resteraient associées aux complexes.

2.3. Rétro-transcription :

Une des caractéristiques essentielles des rétrovirus est le fait qu'ils peuvent convertir leur ARN simple brin en un ADN double brin, au cours d'une étape nommée « transcription inverse ou rétro-transcription », sous l'action de la transcriptase inverse (RT).

La transcriptase inverse (RT) codée par le virus assure la transcription inverse grâce à des activités ADN polymérase et RNase H. L'enzyme est un hétérodimère asymétrique de 2 sous-unités, p66 et p51. Les deux sous-unités présentent la même séquence N-terminale portant l'activité enzymatique mais la sous-unité p51 ne possède pas le domaine RNase H en position C-terminale.

Etant donné que le génome de HIV renferme deux copies d'ARN et que la transcription inverse de HIV-1 implique des sauts de la RT d'un brin vers l'autre, il arrive occasionnellement que le brin d'ADN naissant soit transféré entre ces génomes au cours de la transcription produisant des virions recombinants. D'autre part, la fréquence élevée de recombinaisons génétiques, ainsi que le taux élevé de mutations pendant la transcription inverse (de l'ordre de 3×10^{-5} par cycle de réplication) entraînent la génération de populations de virions très hétérogènes génétiquement. En conséquence, le HIV-1 est capable d'échapper rapidement à la réponse immunitaire et développer des résistances aux médicaments anti-viraux (Freed, 2001). Une fois la transcription inverse accomplie, le PIC ainsi formé utiliserait les microtubules pour atteindre l'enveloppe nucléaire. L'entrée dans le noyau du PIC se réaliserait par un mécanisme actif à travers les pores nucléaires, expliquant le fait que le HIV puisse infecter et se répliquer à l'intérieur des cellules comme les macrophages différenciés qui ne se divisent plus. Les mécanismes sous-jacents à cette translocation nucléaire ne sont pas encore compris. Plusieurs propositions ont été faites (impliquant MA, Vpr, l'intégrase ou une structure particulière de l'acide nucléique) mais aucune n'a vraiment été confirmée par la suite et certaines ont même été remises en question (Goff, 2007).

2.4. Etape d'intégration :

L'intégration de l'ADN viral double-brin dans la chromatine de la cellule hôte est catalysée par l'intégrase virale (IN) dont l'activité peut être régulée par de nombreuses protéines cellulaires. Il est maintenant établi que la présence d'un coactivateur transcriptionnel cellulaire, nommé « LEDGF/p75 » (Lens Epithelium-Derived Growth Factor/transcriptional co-activator 75) est essentielle pour une intégration efficace du HIV. LEDGF/p75 activerait l'intégration du HIV en permettant l'attachement de l'intégrase virale contenue dans le complexe PIC à la chromatine cellulaire (Goff, 2007).

2.5. Etape de transcription :

Après l'intégration de son ADN dans le chromosome de la cellule hôte, le provirus intégré va servir de modèle pour la synthèse des ARNs viraux qui coderont pour les protéines de structure, les enzymes, les protéines de régulation et les protéines dites accessoires du virus. Le génome du HIV-1 est un ARN qui contient 9 phases ouvertes de lecture qui produisent 15 protéines (voir figure 2). Ainsi, le génome de HIV renferme 3 gènes qui codent pour des protéines de structure : le gène *gag* (group-specific antigen) qui code pour le précurseur polypeptidique Pr55^{Gag} qui est ensuite clivé par la protéase virale pour générer la matrice (MA), la capsid (CA), la nucléocapsid (NC), la protéine nommée p6 et des peptides intercalaires (SP1 et SP2) ; le gène *pol* traduit sous la forme d'un précurseur protéique Gag-Pol qui permettra l'expression de la protéase virale (PR), la transcriptase inverse (RT) ainsi qu'à l'intégrase (IN). Enfin, le gène *env* code pour un précurseur de 160 kDa, qui après

clivage, génère les glycoprotéines de l'enveloppe gp120 et gp41. Le génome renferme également des gènes codant pour des protéines de régulation (Rev et Tat) mais également des gènes codant pour des protéines dites accessoires (ou auxiliaires) comme Nef, Vif, Vpr, et Vpu.

Ce processus de transcription est stimulé par l'activité de la protéine virale « Tat » qui joue le rôle d'activateur transcriptionnel en s'associant à la séquence TAR, présente sur tous les transcrits viraux. En présence de Tat, la synthèse des ARN messagers viraux est très fortement augmentée (Freed, 2001). En effet, selon un modèle généralement admis, le complexe ARN polymérase II est constitutivement lié au promoteur du HIV et initialise en permanence la synthèse de petits transcrits d'ARN. Cependant, en absence de Tat, ce processus est peu efficace et conduit seulement à la production de petits transcrits viraux abortifs. Quand Tat est exprimé, il se lie à une région localisée à l'extrémité 5' de tous les transcrits initiés contenant la séquence TAR (« Transactivation Response Region »). Ensuite, elle recrute la cycline T1 et la protéine kinase cycline dépendante CDK9. Ce recrutement provoquerait la phosphorylation de la queue cytoplasmique de l'ARN polymérase II, entraînant la libération du complexe ARN polymérase II, l'élongation de celui-ci le long de l'ADN proviral et par conséquent, l'augmentation du taux de transcription (Williams et al., 2006).

Les processus de transcription et de transport des ARNs viraux vers le cytoplasme sont spécifiques du HIV-1. Ces ARNs viraux sont de trois types : les ARNs non épissés utilisés comme ARN messagers pour la traduction de Gag et de Gag-Pol ; les ARNs épissés une fois qui codent pour les protéines Env, Vif, Vpu et Vpr ; et les petits ARNs complètement épissés qui sont traduits en protéines régulatrices précoces Rev, Tat et Nef. L'ARNm qui code Gag et Gag-Pol est identique à l'ARN génomique, à la différence près qu'il n'est pas dimérisé à son extrémité 5' (Goff, 2007).

La protéine Rev (Regulator of Expression of Viral proteins) exerce un rôle d'adaptateur dans le transport des ARNs non épissés et épissés une seule fois, du noyau vers le cytoplasme. Pour cela, Rev se fixe, d'une part à une séquence appelée RRE (Rev Response Element) située dans ces ARNs et d'autre part au récepteur CRM-1, le principal récepteur d'export nucléaire pour les ARNs de l'hôte et pour les petits ARNs nucléaires. (Goff, 2007). Finalement, dans le cytoplasme, les ARNs sont traduits en précurseurs polyprotéiques par les ribosomes.

2.6. Etape de traduction :

Des motifs présents dans les régions non codantes des ARNs des rétrovirus joueraient des rôles bien établis dans l'activation de la transcription, dans le conditionnement de l'ARN, dans la transcription inverse, mais également dans l'efficacité de la synthèse des protéines (Bolinger and Boris-Lawrie, 2009). Cette étape de traduction est effectuée par la machinerie cellulaire et se passerait dans le cytoplasme, sauf pour les protéines Env qui doivent entrer dans la lumière du réticulum endoplasmique pour y être glycosylées. Comme la plupart des rétrovirus, le HIV-1 renferme dans son génome des séquences « IRES » (Internal Ribosome Entry Site) situées dans la région 5' non traduite (5' UTR) en aval de la coiffe (Goff, 2007).

Les précurseurs polypeptidiques Gag, Gag-Pol et Env vont générer ensuite les protéines virales matures après clivage protéolytique. Le repliement de ces protéines est dicté par la structure de l'ARN. Pour traduire les produits du gène *pol*, il faut que le ribosome subisse un déplacement entre le cadre de lecture de *gag* et celui de *pol* (Watts et al., 2009).

La traduction des protéines Env nécessite la fixation de la particule SRP (signal recognition particle) sur le peptide signal de 30 acides aminés et la translocation de la machinerie de traduction ribosomale vers le réticulum endoplasmique rugueux (Watts et al., 2009).

2.7. Etape d'assemblage :

La protéine Gag joue un rôle central dans l'assemblage du HIV-1. Son expression suffit à générer dans les cellules appropriées ce que l'on appelle des « virus-like particles » morphologiquement identiques aux virions immatures. L'organisation fonctionnelle de la protéine Gag est typique des rétrovirus. En l'occurrence, en position N-terminale, elle est composée d'un domaine matrice (MA) contenant une tête globulaire myristoylée (responsable du ciblage de Gag vers les membranes) et une tige en hélice α .

En position centrale, elle est composée d'un domaine capsid (CA) qui est essentiel à la morphologie de la particule car il peut « s'homo-oligomériser » pendant la phase d'assemblage. Gag contient aussi un domaine nucléocapsid (NC) qui se lie à l'ARN, permettant « l'incorporation » du génome viral. Cette interaction entre une molécule d'ARN et plusieurs protéines Gag pourrait également aider à la formation de multimères de Gag. Finalement, Gag contient en position C-terminale un domaine p6, contenant des sites d'arrimage pour les protéines de la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), protéines cellulaires jouant un rôle important au cours des étapes d'assemblage, puis de bourgeonnement des particules virales.

Chaque domaine composant la protéine Gag, ainsi que leurs activités associées sont nécessaires pour la production de particules virales extracellulaires immatures. La protéase virale catalyse ensuite une série de clivages pendant et/ou après l'étape de bourgeonnement, induisant des changements de conformation structurels et morphologiques, en particulier dans les domaines de la capsid, permettant aux virions d'acquérir leur pouvoir infectieux.

Bien que de nombreux progrès aient été réalisés au cours de ces dernières années, il reste encore beaucoup de questions sans réponse concernant l'assemblage des virions (Bieniasz, 2009). Selon le modèle actuel, des monomères et/ou des oligomères de Gag diffuseraient ou seraient transportés à travers le cytoplasme jusqu'à la membrane plasmique. Là, les domaines MA de Gag se lieraient à la membrane grâce à leur ancre myristoylée N-terminale et à un patch d'acides aminés basiques qui se lie à des phospholipides acides, en particulier les phosphoinositides PI(4,5)P₂ qui sont concentrés dans la membrane plasmique. Le cholestérol semble également jouer un rôle important dans le ciblage de Gag et l'assemblage des particules. Les domaines MA pourraient donc se lier directement à la membrane mais aussi interagir avec d'autres protéines Gag déjà assemblées. Ensuite, grâce à ses propriétés intrinsèques à former des sphères, Gag dirigerait l'assemblage de la particule naissante en établissant de multiples interactions entre les domaines de Gag mais aussi avec des protéines de l'hôte (Ganser-Pornillos et al., 2008). Par conséquent, au moment du bourgeonnement, les virions immatures ressemblent à des sphères contenant des protéines Gag disposées de façon radiale : les domaines MA insérés dans la membrane virale interne tandis que les extrémités C-terminales de Gag se projettent vers le centre du virus. Les protéines Gag-Pol sont apparemment empaquetées dans les virions en interagissant avec le réseau formé par les molécules Gag. La protéase est libérée du précurseur Gag-Pol par autoprotéolyse à un stade terminal de l'assemblage (Ganser-Pornillos et al., 2008). Les protéines Env, essentielles pour le pouvoir infectieux des particules virales, seraient incorporées dans les virions en formant des complexes ternaires avec TIP47 (une protéine de la cellule hôte impliquée dans le transport rétrograde des récepteurs au mannose-6-phosphate des endosomes vers le TGN) et avec le domaine MA de la protéine Gag de HIV-1 (Lopez-Verges et al., 2006). La protéine

Nef serait incorporée dans les virions en association avec le « core » viral à raison de 5 à 10 molécules de Nef par virion (Welker et al., 1998).

L'identité du site d'achèvement de l'assemblage des particules d'HIV-1 fait toujours l'objet d'une controverse. Dans les lymphocytes, il est clair que HIV-1 s'assemble à la membrane plasmique et les virions sont libérés à partir de ce site. Dans les macrophages, plusieurs études avaient montré la présence d'un certain pourcentage de Gag et/ou de virions matures dans les endosomes tardifs, suggérant que Gag était d'abord envoyé vers les membranes des endosomes, et que les virions se formaient dans la lumière des endosomes.

Cette hypothèse a été complètement remise en question par plusieurs travaux récents. Premièrement, il semble que Gag nouvellement synthétisé apparaisse en premier lieu à la membrane plasmique, plus précisément dans les régions riches en phosphoinositides $PI(4,5)P_2$, et seulement plus tard dans les endosomes. Deuxièmement, la présence de Gag dans les endosomes peut être inhibée par le blocage de l'endocytose sans affecter le nombre de virions nouvellement formés. Troisièmement, des manipulations avec des inhibiteurs pharmacologiques qui bloquent le trafic à travers les endosomes n'affectent pas l'apparition de Gag à la membrane plasmique ou la libération de nouveaux virions. Réciproquement, lorsque Gag est ciblé de façon obligatoire vers les endosomes, des particules se forment mais ne quittent pas la cellule.

Toutes ces données suggèrent donc que l'assemblage du HIV-1 se déroule à la membrane plasmique, même dans les macrophages, et que l'apparition de Gag dans les endosomes pourrait être le résultat de l'endocytose, suite à un défaut de l'étape de bourgeonnement par exemple (Bieniasz, 2009). Plus récemment, deux groupes indépendants ont suggéré que les corps multivésiculaires avec lesquels Gag s'associe dans les macrophages ne sont pas des endosomes mais des domaines de la membrane plasmique séquestrés à l'intérieur de la cellule. Ces « pseudo-compartiments » restent accessibles à des traceurs imperméables aux membranes, et resteraient donc connectés à la surface cellulaire (Deneka et al., 2007; Welsch et al., 2007).

2.8. Etape de bourgeonnement :

La propriété que Gag possède de s'auto-assembler en sphères sur des surfaces membranaires contenant du $PI(4,5)P_2$ n'est pas suffisante pour assurer la fin du processus d'assemblage. En effet, celle-ci nécessite l'intervention du domaine L (Late budding) situé à l'extrémité C-terminale p6 du précurseur Gag. Ce domaine se lie, directement ou indirectement, avec des composants de la « machinerie » cellulaire ESCRT pour finaliser l'assemblage et permettre le bourgeonnement des particules virales (Bieniasz, 2009).

À la suite de cette étape de fission, correspondant à la séparation de l'enveloppe du virion naissant des membranes cellulaires, la cellule hôte bloque la libération des virions et empêche ainsi la diffusion de ceux-ci dans le milieu extracellulaire, en synthétisant une protéine appelée « tétherine ». La tétherine est une protéine membranaire intégrale qui est composée d'une queue cytoplasmique en position N-terminale reliée à un domaine transmembranaire et à un domaine extracellulaire. La tétherine possède également une ancre glycoposphatidylinositol (GPI) potentielle en position C-terminale. Elle empêche la dissémination des virions en entrecroisant les membranes cellulaires et les enveloppes virales (Neil et al., 2008). La protéine virale Vpu est capable d'empêcher l'action de la tétherine en réduisant sa concentration et l'empêchant d'interagir avec les virions. En effet, en absence de Vpu, les virions sont complètement matures mais s'accumulent à la membrane plasmique.

Des données récentes ont aussi démontré que les virus SIV (Simian Immunodeficiency Virus), qui pour la plupart n'expriment pas les protéines Vpu, peuvent utiliser les protéines Nef comme antagonistes à l'action de la tétherine (Zhang et al., 2009).

2.9. Etape de maturation :

Les virions qui bourgeonnent des cellules sont des particules immatures et non infectieuses. Ces virions doivent ensuite subir une étape de maturation leur permettant de devenir infectieux. Cela implique le clivage de Gag par la protéase virale pour donner naissance aux protéines et peptides intercalaires : MA, CA, SP1, NC, SP2 et p6. Ces protéines doivent ensuite se ré-assembler pour former les couches distinctes du virion mature : MA reste associée à la membrane virale interne, NC recouvre l'ARN viral et les complexes ainsi formés se condensent au centre du « core » et enfin, CA s'assemble de façon à former une capsid conique qui enveloppe la nucléocapsid et ses enzymes associées (RT et IN) (Ganser-Pornillos et al., 2008).

A l'heure actuelle, les industries pharmaceutiques continuent de développer de nouveaux médicaments antirétroviraux. Sur la base des dernières découvertes concernant le cycle de réplication du HIV, elles ont choisi pour cibles l'activité RNase H de la transcriptase inverse, la décapsidation du core viral, les protéines cellulaires impliquées dans l'intégration de l'ADN viral dans la chromatine hôte, l'assemblage, la maturation et le bourgeonnement des virus et les fonctions de plusieurs protéines accessoires (Adamson and Freed, 2009).

3. HIV-1 Nef :

3.1. Structure :

La protéine Nef codée par les lentivirus HIV-1, HIV-2 et SIV est une protéine dite accessoire de 27 à 35 kDa, exprimée en quantité abondante à un stade précoce du cycle de réplication virale. L'analyse de sa structure par rayons X et par résonance magnétique nucléaire a permis de découvrir que Nef était constituée d'un domaine d'ancrage N-terminal myristoylé flexible, d'une boucle contenant une région riche en résidus proline, d'une structure globulaire centrale bien ordonnée et conservée et enfin d'une boucle flexible C-terminale (voir figure 3). La N-myristoylation est critique pour son association membranaire et essentielle pour la plupart de ses fonctions. La richesse en surface flexible pourrait contribuer à la capacité de Nef d'interagir avec une multitude de protéines cellulaires (Kirchhoff et al., 2008). Plusieurs sites de liaison avec des partenaires cellulaires ont été cartographiés sur la protéine. Par exemple, on sait que grâce à son motif polyproline, Nef interagit avec plusieurs membres de la famille des Src kinases à domaine SH3 (Src Homology Domain), impliqués dans la transduction du signal. De plus, Nef renferme au moins 6 régions impliquées dans son internalisation et son trafic intracellulaire, dont un motif dileucine ¹⁶⁰EXXXLL¹⁶⁵ bien conservé, situé au centre de la boucle flexible C-terminale et responsable de l'association de Nef avec les protéines adaptatrices AP (Adaptor Protein) associées aux vésicules recouvertes de clathrine (Geyer et al., 2001). Dans les virions, Nef est clivée par la protéase virale entre le résidu W57 et L58, séparant ainsi le domaine d'ancrage et le core de la protéine. Toutefois, on ne sait pas si ce processus a une relevance fonctionnelle (Geyer et al., 2001). Enfin, une étude récente a montré que Nef se dimérisait dans les cellules hôtes (Liu et al., 2000; Poe and Smithgall, 2009).

3.2. Fonctions de Nef :

3.2.1. Rôles de Nef sur le pouvoir infectieux du virus :

Il a été démontré que Nef stimulait la réplication du HIV et augmentait son pouvoir pathogène *in vivo* (Kestler et al., 1991). En effet, des mutations et des délétions dans le gène codant pour la protéine HIV-1 Nef ont été observées dans des isolats de virus de plusieurs porteurs du HIV-1 dits « long-term non progressors ». Ceux-ci ne présentaient pas les manifestations cliniques qui caractérisent le SIDA, bien que, après un temps relativement long, certains individus montraient une diminution du nombre de lymphocytes T-CD4⁺ suite à la progression de l'infection (Jere et al., 2009). De plus, lors d'expériences sur des macaques « rhésus » où le gène *nef* a été délété du génome du virus SIVmac239, il a été démontré que la réplication virale et le pouvoir pathogène du virus étaient affectés (Kestler et al., 1991).

HIV-1 Nef pourrait contribuer à l'infection virale en activant les lymphocytes T-CD4⁺, les rendant dès lors plus susceptibles à l'infection. Pour cela, par son domaine riche en résidu proline, Nef modifierait les voies de transduction du signal en aval du récepteur T (TCR) des lymphocytes T. Ainsi, les protéines Vav, Pak-2 (p21-activated kinase), Rac, CDC42, DOCK2 seraient détournées de leurs fonctions dans la voie de transduction du signal dépendante du TCR. Un autre effet de l'interférence provoquée par Nef dans les voies de transduction du signal suite à l'engagement du TCR, serait l'amplification de l'expression de surface des protéines transmembranaires « Fas ligand » permettant aux cellules infectées par le HIV d'échapper à l'apoptose (Roeth and Collins, 2006).

L'étude approfondie des mécanismes d'action de cette protéine représente donc un intérêt évident dans le cadre de la lutte contre le HIV. Cependant, les mécanismes expliquant que cette protéine intervient dans le pouvoir infectieux demeurent encore inconnus.

Lorsque des lymphocytes T sont infectés avec des virus produits par des cellules transfectées avec le génome viral du HIV-1, il y a une stimulation de l'infectivité. Par contre, lorsque ces cellules sont transfectées avec un génome viral délété du gène *nef* (HIV- Nef), la production de virions est très faible (Miller et al., 1994). Etant donné que Nef est synthétisée abondamment dans les stades précoces de l'infection virale, elle pourrait agir lors des premières étapes du cycle de réplication du HIV. Par exemple, des études ont suggéré que Nef pouvait favoriser l'entrée du virus dans la cellule en aidant celui-ci à traverser le réseau cortical d'actine (Campbell et al., 2004). Il a également été proposé que Nef intervenait lors du processus de rétrotranscription de HIV-1 en interagissant par son extrémité N-terminale avec un complexe contenant plusieurs kinases (NAKC) (Wolf et al., 2008). Toutefois, ces deux hypothèses ont été remises en question, notamment par les études suivantes.

Si on cotransfecte les cellules productrices avec le génome viral de HIV Nef et un plasmide codant pour Nef sauvage, on restaure l'infectivité du virus dans les cellules cibles. Par contre, si on transfecte les cellules cibles infectées avec HIV- Nef avec le même plasmide, Nef n'a pas d'effet sur l'infectivité (Miller et al., 1995). De plus, l'incorporation d'un nombre plus important de molécules Nef dans les virions, rendue possible grâce à l'utilisation d'une protéine de fusion Nef-CS-Vpr, n'est pas accompagnée d'une augmentation de l'infectivité virale (Laguette et al., 2009). Enfin, d'autres expériences, réalisées avec des protéines de fusion Nef-cyclophiline A, révèlent que les virus contenant une construction incapable d'établir des interactions entre la cyclophiline A et Gag sont peu infectieux (Qi and Aiken,

2008). Tous ces résultats suggèrent que Nef augmente le pouvoir infectieux du HIV au moment de l'assemblage des virions dans les cellules productrices plutôt qu'après leur entrée dans les cellules cibles. Lors de l'assemblage des virions, Nef pourrait agir de différentes façons. Ainsi, Nef pourrait altérer la composition lipidique des membranes virales, augmenter l'incorporation des glycoprotéines de l'enveloppe virale ou stimuler la phosphorylation de MA grâce aux kinases qui lui sont associées. Il pourrait aussi favoriser l'incorporation ou, au contraire l'exclusion de protéines cellulaires dans les particules virales (Laguette et al., 2009). Cette dernière hypothèse est soutenue par le fait que, d'une part, le mécanisme permettant à Nef d'augmenter le pouvoir infectieux du HIV dépend du motif di-leucine situé en position 164-165 (Madrid et al., 2005) et que, d'autre part, ce motif est directement impliqué dans les perturbations du trafic intracellulaire de plusieurs protéines cellulaires induites par l'expression de Nef (Coleman et al., 2006b).

3.2.2. Rôles de Nef sur le trafic intracellulaire :

Il est bien connu que Nef perturbe le trafic intracellulaire des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II (MHC-I et II) impliqués dans l'immunité adaptative, le récepteur CD4 (cluster of differentiation 4), le récepteur de la transferrine et la lectine DC-SIGN (Dendritic Cell -Specific intracellular adhesion molecule Grabbing Non Integrin) impliquées dans la transmission virale, le TNF (tumor necrosis factor), CD28, CD3 et la glycoprotéine ENV du HIV-1 (Roeth and Collins, 2006). Parmi les protéines dont la présence à la surface cellulaire est affectée par la protéine Nef, le récepteur CD4 est sans doute la plus étudiée (Burtey et al., 2007; Chaudhuri et al., 2007; Craig et al., 1998; Piguet et al., 1998; Sol-Foulon et al., 2004). Dans les cellules lymphoïdes, Nef intervient dans le trafic intracellulaire de la glycoprotéine CD4 à deux niveaux : premièrement, la protéine virale re-dirige les protéines CD4 nouvellement synthétisées du TGN vers les compartiments endosomaux. Deuxièmement, Nef accélère l'internalisation de molécules CD4 ayant atteint la surface cellulaire (Benichou et al., 1994; Piguet et al., 1999). La dimérisation de Nef serait requise pour l'internalisation du récepteur CD4 (Liu et al., 2000; Poe and Smithgall, 2009).

En réalité, les effets de la protéine Nef sur le trafic intracellulaire seraient dus à ses interactions avec les protéines adaptatrices AP (clathrin-adaptor proteins) (Coleman et al., 2005 ; Craig et al., 2000 ; Janvier et al., 2003b). Ces complexes AP sont des complexes hétéro-tétramériques qui assurent le transport intracellulaire de protéines à l'intérieur de vésicules recouvertes de clathrine. AP-1 (composé des adaptines γ , $\sigma 1$, $\mu 1$, $\beta 1$) est impliqué dans le transport vésiculaire des protéines entre le TGN (Trans-Golgi network) et les compartiments endosomaux. AP-2 (composé des adaptines α , $\sigma 2$, $\mu 2$, $\beta 2$) participe au transport des protéines membranaires entre la membrane plasmique et les endosomes précoces. AP-3 (comprenant les adaptines δ , $\sigma 3$, $\mu 3$, $\beta 3$) contribue au transport de vésicules contenant des protéines entre le TGN et les endosomes plutôt tardifs mais pourrait également intervenir dans le transport vésiculaire depuis les endosomes tardifs vers les lysosomes (Braulke and Bonifacino, 2009). Quant au rôle d'AP-4 (composé des adaptines ϵ , $\sigma 4$, $\mu 4$, $\beta 4$), il est moins bien défini mais il semblerait que ces complexes régulent la formation de vésicules ne contenant pas de clathrine en provenance du TGN et à destination des compartiments lysosomaux (Braulke and Bonifacino, 2009).

L'interaction entre Nef et les complexes AP est assurée par le motif di-leucine ($^{160}[E]xxx[LL]^{165}$) présent dans la boucle flexible en position C-terminale de Nef (Coleman et al., 2005). Ce motif di-leucine interagirait directement avec les hémicomplexes AP-1 1, AP-2 2 et AP-3 3 (Janvier et al., 2003b). Nef « stabiliserait » les complexes AP sur les

membranes (Coleman et al., 2006a). Les interactions entre Nef et AP-2 nécessitent le motif dileucine mais aussi un motif diacide (DD) également situé dans la boucle flexible C-terminale (Chaudhuri et al., 2007; Lindwasser et al., 2008). Les deux motifs sont indispensables pour la diminution de l'expression de surface de CD4, de même que le motif ⁵⁷WL⁵⁸ situé dans la région pliée de Nef (Chaudhuri et al., 2007).

Les interactions entre Nef et les complexes AP, en particulier avec le motif di-leucine, sont nécessaires pour observer les effets de Nef sur l'expression de surface de nombreuses protéines. En effet, lorsque ces résidus leucine sont substitués par des alanines, les effets de Nef sur la diminution de l'expression de surface du récepteur CD4, de CD28, et du récepteur à la transferrine, ainsi que sur l'augmentation à la surface cellulaire de TNF, de la lectine DC-SIGN, sont complètement abolis (Coleman et al., 2006b).

Nef interagirait également avec la sous-unité H de la V-H⁺ATPase, un complexe supra-moléculaire responsable de l'acidification notamment des lysosomes (Marshansky and Futai, 2008). Cette interaction pourrait faciliter son association avec la machinerie liée à l'endocytose (Geyer et al., 2002).

3.2.3. Impact de Nef sur l'ultrastructure des endosomes :

Dans les lymphocytes T humains qui expriment HIV-1 Nef ou SIV Nef, on a observé une augmentation de la taille des endosomes tardifs/corps multivésiculaires (Sanfridson et al., 1997; Stumptner-Cuvelette et al., 2003). Dans les cellules HeLa, l'expression de Nef entraîne l'accumulation d'endosomes dilatés reliés entre eux par des tubules et contenant de nombreuses vésicules membranaires (Erdtmann et al., 2000). Selon ces auteurs, ces grandes structures prélysosomales pourraient servir de plateforme pour l'assemblage des virions.

Une étude très récente semble indiquer que l'apparition de ces grandes vacuoles dans les macrophages résulterait du blocage de l'autophagie par Nef (Kyei et al., 2009). Cette étude révèle que l'induction de l'autophagie dans des macrophages infectés avec HIV par incubation en présence de rapamycine augmente la production de particules virales. Cependant, si les macrophages sont infectés avec HIV Nef, la rapamycine n'a pas d'effet sur la quantité de virions libérés par les macrophages. En fait, Nef bloquerait la maturation des autophagosomes en autophagolysosomes en interagissant directement ou indirectement avec bécline-1. La Bécline-1 qui est une protéine régulatrice de la formation des autophagosomes qui fait partie du complexe PI3 kinase de classe III. Cette interaction Nef-Bécline 1 nécessite un motif diacide ¹⁷⁴DD¹⁷⁵, déjà connu pour participer à l'interaction entre Nef et le domaine V₁ de la H⁺-ATPase, responsable de l'acidification des endo/lysosomes. Par conséquent, l'explication la plus simple serait que Nef empêcherait l'assemblage ou l'activité de la H⁺-ATPase. Cependant, bien que HIV inhibe l'acidification des compartiments contenant les nouveaux virions, il semble que ce phénomène soit indépendant de Nef (Kyei et al., 2009). Donc, l'interaction de Nef et de bécline 1 agirait par un mécanisme autre que l'acidification. Etant donné que Nef affecte la distribution de la PI3 kinase de classe III (hVps34), l'interaction Nef-Bécline pourrait inhiber la maturation des autophagosomes en provoquant une redistribution de hVps34 sur des membranes (Kyei et al., 2009).

Vu le rôle pléiotropique de Nef sur le trafic intracellulaire de nombreuses protéines, nous nous sommes interrogés sur le rôle que cette protéine virale pouvait avoir sur la biogenèse des lysosomes et plus précisément sur le trafic intracellulaire des protéines lysosomales néosynthétisées.

4. La biogenèse des lysosomes :

4.1. Caractéristiques des lysosomes :

Les lysosomes sont des organites membranaires dont la fonction majeure est la digestion cellulaire d'une diversité de macromolécules incluant les protéines, les hydrates de carbone, les acides nucléiques, et les lipides. Ils peuvent assimiler leurs substrats par endocytose, par phagocytose ou par autophagie (Saftig and Klumperman, 2009).

Les lysosomes sont composés de deux grandes classes de protéines essentielles pour remplir leurs fonctions cataboliques : les hydrolases lysosomales, aussi appelées hydrolases acides, et les protéines intégrales membranaires. Les fonctions cataboliques des lysosomes sont assurées par l'action concertée d'une cinquantaine d'hydrolases lysosomales (les glycosidases, les protéases, les lipases, les nucléases, les phosphatases et les sulfatases) qui ciblent leurs substrats spécifiques pour les dégrader. Cependant, en plus du rôle dans le catabolisme, certaines hydrolases pourraient également être impliquées dans le « processing antigénique », la dégradation de la matrice extracellulaire et dans l'initiation de l'apoptose. Les cellules de mammifères contiennent 25 protéines membranaires lysosomales connues. Ces protéines sont principalement situées sur la membrane limitante des lysosomes et assurent diverses fonctions incluant l'acidification de la lumière des lysosomes, l'import des protéines dans le lysosome depuis le cytosol, la fusion membranaire ainsi que le transport des produits de dégradation vers le cytoplasme. Les protéines membranaires les plus abondantes sont les protéines LAMP-1 (Lysosome-associated membrane protein 1), LAMP-2, LIMP-2 (lysosome integral membrane protein-2) et LIMP-1 (également appelée CD63) (Saftig and Klumperman, 2009).

La biogenèse des lysosomes requiert un approvisionnement continu de composants nouvellement synthétisés. Les hydrolases et les protéines membranaires doivent être transportées le long de la voie de la biosynthèse qui comprend le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les endosomes (voir figure 4). Ce transport complexe nécessite tout un système de signaux, ainsi que la collaboration de nombreuses protéines qui reconnaissent ces signaux d'adressage. On sait que la plupart des hydrolases acides suivent la voie classique de transport dépendante des récepteurs au mannose-6-phosphate. En revanche, en ce qui concerne les protéines membranaires, on n'a pas encore une vue précise.

4.2. Transport des hydrolases lysosomales :

4.2.1. La voie dépendante des récepteurs au mannose-6-phosphate (MPR) :

La plupart des hydrolases lysosomales sont ciblées vers les lysosomes par la voie MPR. A l'instar des protéines secrétées à la surface cellulaire, les hydrolases acides sont synthétisées sous forme de précurseurs contenant en position N-terminale un peptide signal constitué d'une séquence de 20 à 25 acides aminés relativement hydrophobes. Ce peptide signal permet aux précurseurs d'être ciblés vers le réticulum endoplasmique et de rentrer dans la lumière du réticulum endoplasmique en passant par le translocon. Pendant ce passage à travers la membrane, le peptide signal est clivé et les résidus asparagine des séquences consensus Asn-X-Ser / Thr sont glycosylés. Cette addition d'oligosaccharides autorise un repliement correct, un contrôle de qualité, une libération et un transport de ces hydrolases. Ensuite, elles passent du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi où un signal mannose-6-phosphate est additionné par l'action séquentielle de deux enzymes : la N-acétylglucosaminyl-1-

phosphotransférase et la N-acétylglucosamine-1-phosphodiester α N-acétyl-glucosaminidase (Braulke and Bonifacino, 2009). Par la suite, dans le « Golgi tardif », le ou les résidu(s) mannose-6-phosphate est (sont) reconnu(s) par un des deux récepteurs au mannose-6-phosphate (cation dépendant ou cation indépendant) (Ghosh et al., 2003). Ces deux types de récepteurs sont des protéines multifonctionnelles membranaires intégrales de la famille des lectines « p-type » qui assurent notamment le transport des hydrolases lysosomales, mais également d'autres tâches (voir figure 5). Le récepteur au mannose-6-phosphate cation-indépendant (CI-MPR) contiendrait deux sites de liaison pour le mannose-6-phosphate, alors que le récepteur au mannose-6-phosphate cation-dépendant (CD-MPR) n'en contiendrait qu'un seul. De plus, ces deux récepteurs possèdent dans leur partie cytoplasmique des motifs d'adressage aux endo/lysosomes : le motif DXXLL pour le récepteur CI-MPR et deux séquences mal définies (situées en position 28-42 et 49-67) pour le récepteur CD-MPR (Ghosh et al., 2003). Grâce à ces motifs, les récepteurs mannose-6-phosphate interagissent avec les protéines AP-1 (adaptor protein 1) ou les GGAs pour assurer le transport des hydrolases acides du TGN vers les endosomes par l'intermédiaire de vésicules recouvertes de clathrine. Ainsi, lorsque le complexe AP-1 est incapable de se former suite à une interférence de l'expression de μ 1 par siRNA, la sécrétion de la forme immature de la cathepsine D dans le milieu de culture est stimulée (Hirst et al., 2009; Meyer et al., 2000).

Les GGAs (Golgi localised γ -ear containing ARF-binding protein) sont des protéines monomériques contenant trois domaines : le domaine VHS (Vps27, Hrs, STAM) qui lie les protéines cargo contenant un motif DXXLL ; un domaine GAT (GGA and TOM1) qui lie la protéine ARF (ADP-Ribosylation Factor) et l'ubiquitine ; et un domaine GAE (γ -adaptin ear) homologue de l'appendice C-terminale de la sous-unité γ de AP-1 (voir figure 6). Les GGAs seraient au nombre de trois : GGA1, GGA2, GGA3. Ces trois complexes co-localiseraient entre eux sur les membranes « juxta-nucléaires » et sur des membranes plus périphériques, mais également partiellement avec les complexes AP-1. Quelle serait la relation fonctionnelle entre ces deux types de complexes transportant les récepteurs au mannose-6-phosphate et quelles seraient leurs interactions éventuelles ? Trois modèles ont été proposés précédemment pour expliquer la relation fonctionnelle existant entre les complexes AP-1 et les GGAs. Le premier modèle postule que ces deux complexes collaborent dans les mêmes vésicules : les GGAs se lieraient aux cargos pour ensuite les transférer aux complexes AP-1. Le deuxième modèle propose que ces deux complexes adaptateurs fonctionnent dans deux voies parallèles de transport allant dans la même direction à savoir les compartiments endo-lysosomaux. Le dernier modèle suppose que ces complexes fonctionnent dans des voies complémentaires mais allant dans des directions opposées (Hirst et al., 2009).

Alors que les travaux de l'équipe de Stuart Kornfeld suggéraient que les AP-1 et les GGA fonctionnaient séquentiellement au sein de mêmes vésicules (Doray et al., 2002), les travaux plus récents de l'équipe de Margaret Robinson semblent indiquer au contraire qu'ils agissent plutôt indépendamment l'un de l'autre sur des vésicules recouvertes de clathrine distinctes mais qu'ils collaborent pour assurer un transport efficace des hydrolases lysosomales (Hirst et al., 2009).

Dans les endosomes, les hydrolases sont dissociées des récepteurs en réponse à un pH acide et sont ultérieurement délivrées dans les lysosomes, pendant que les récepteurs sont recyclés vers le TGN. Il existerait également plusieurs voies de recyclage de ces MPRs : des endosomes précoces vers le TGN et des endosomes tardifs vers le TGN. Les protéines AP-1 et PACS-1 participeraient au transport rétrograde des MPRs en agissant au niveau des endosomes précoces. Le recyclage des MPRs depuis les endosomes tardifs impliquerait TIP47 (tail- interacting protein of 47 kDa), Rab9, p40 et le complexe GARP (situé sur le

Golgi) (Saftig and Klumperman, 2009). Des études plus récentes menées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont permis de mettre en évidence l'existence d'un complexe protéique, appelé rétromère, qui jouerait également un rôle clé dans le recyclage du CI-MPR (Bonifacino and Rojas, 2006; Seaman, 2005).

4.2.2. Les voies indépendantes des récepteurs mannose-6-phosphate :

C'est en examinant l'activité hydrolytique de cellules provenant de patients souffrant de la mucopolysaccharidose de type II (ou I-Cell disease) que l'existence d'un transport indépendant des récepteurs MPR a été mise au jour (Owada and Neufeld, 1982). En effet, dans certaines cellules ou tissus de ces patients où l'enzyme N-acétylglucosaminyl-1-phosphotransférase est déficiente, l'abondance de plusieurs hydrolases lysosomales était normale alors que dans d'autres cellules la plupart des hydrolases nouvellement synthétisées étaient sécrétées (Owada and Neufeld, 1982; Saftig and Klumperman, 2009).

Un transport alternatif à la voie MPR pourrait être celui assuré par la sortiline, aussi appelée « neurotensine receptor 3 », faisant partie de la famille des récepteurs VPS10 (vacuolar protein sorting). Ce récepteur de 95 kDa est en fait une glycoprotéine transmembranaire qui assurerait le transport de la prosaposine, de la sphingomyélinase acide et de $G_{M2}AP$ (Braulke and Bonifacino, 2009). La prosaposine et $G_{M2}AP$ sont deux activateurs de l'hydrolyse des glycosphingolipides dans les lysosomes. La sortiline possède dans sa partie carboxy-terminale des motifs de reconnaissance par les protéines GGAs et AP-1 essentiels pour assurer le transport intracellulaire de ses substrats. La sortiline co-localiserait avec les récepteurs au mannose-6-phosphate cation-indépendant dans le TGN, augurant un transport identique à travers le système endo-lysosomal (Saftig and Klumperman, 2009). La cathepsine D pourrait emprunter cette voie indépendante des récepteurs au mannose-6-phosphate puisqu'il existe des interactions entre la procathepsine D et la prosaposine dans les compartiments précoces de la voie biosynthétique (RE et appareil de Golgi) (Rijnboutt et al., 1991). En fait, la prosaposine est un précurseur composé de quatre cofacteurs protéiniques, les saposines A-B-C-D. Ces saposines sont des protéines indispensables pour l'hydrolyse par des enzymes lysosomales de sphingolipides intégrés dans les membranes. Par conséquent, elles jouent un rôle d'activateurs de la dégradation des céramides, des glucocérebrosides, des sulphatides et des galactosylcéramides et peut-être d'autres complexes lipidiques (Schuette et al., 2001). Etant donné que la prosaposine serait attachée aux membranes de compartiments en transit, le transport de la procathepsine D serait en partie assuré par la prosaposine en formant un complexe (Gopalakrishnan et al., 2004; Lefrançois et al., 2003). Une autre voie alternative possible serait celle empruntée par la β -glucocérebrosidase, une hydrolase membranaire dont la déficience conduit à la maladie de Gaucher. Lors de son transport depuis le Golgi jusqu'aux lysosomes, la β -glucocérebrosidase serait associée avec la protéine LIMP-2 qui se lie aux complexes AP-3 et AP-1. D'après l'équipe de Saftig, il serait possible que l'association LIMP-2/ β -glucocérebrosidase dépendrait du pH, favorisant leur association dans le réticulum endoplasmique et dans les endosomes jusqu'aux lysosomes où elles se dissocieraient en réponse à un pH acide. En absence de LIMP-2, l'activité de la β -glucocérebrosidase serait sévèrement diminuée et la majorité de l'enzyme serait sécrétée. A l'heure actuelle, on ne sait pas si une autre protéine est associée à ce complexe LIMP-2/ β -glucocérebrosidase (Reczek et al., 2007). Par contre, il semblerait que la protéine LIMP-2 ne serait pas recyclée (Braulke and Bonifacino, 2009).

4.3. Transport des protéines membranaires lysosomales :

Le transport des protéines lysosomales membranaires n'est pas dépendant des récepteurs au mannose-6-phosphate. En effet, ces protéines portent dans leur queue cytoplasmique des signaux d'adressage responsables de leur ciblage du Golgi vers les lysosomes ou de leur endocytose à partir de la surface cellulaire. Ces signaux ont été caractérisés pour les protéines de la famille LAMP et LIMP mais font également parties intégrantes d'autres protéines. Ces signaux sont des signaux de type (G)YXXΦ (où X représente n'importe quel acide aminé et Φ, un résidu hydrophobe) ou de type (DE)XXXL(LI). Ces signaux ont la particularité d'interagir avec les complexes AP1, AP2 et AP3 dans des vésicules recouvertes de clathrine (Braulke and Bonifacino, 2009; Saftig and Klumperman, 2009).

Les protéines membranaires peuvent atteindre les lysosomes par deux voies : la voie directe où les protéines sont transportées du TGN vers les endo/lysosomes, et la voie indirecte où les protéines membranaires sont transportées du TGN vers la membrane plasmique, avant d'être envoyées vers les endosomes précoces, puis vers les endosomes tardifs pour finir dans les lysosomes (Braulke and Bonifacino, 2009). Les mécanismes impliqués ne sont pas encore clairement élucidés. On a cru pendant longtemps que les complexes AP-1 et AP-3 pouvaient jouer un rôle majeur dans le transport direct des protéines membranaires telles que LAMP-1 et -2 ainsi que LIMP-2. Dans le cas de LIMP-2, on a en effet montré que le motif dileucine interagissait avec des hémicomplexes AP-1 et AP-3 (Janvier et al., 2003b). Cependant, des études récentes ont montré qu'une déficience simultanée de AP-1 et de AP-3 affectait peu ou pas l'abondance des protéines LAMP-1/2 dans les lysosomes, ce qui semble indiquer que ces deux complexes ne jouent pas un rôle essentiel dans l'adressage lysosomal des protéines LAMPs (Janvier and Bonifacino, 2005; Reusch et al., 2002). Par contre, la déplétion du complexe AP-2 par un siRNA dirigé contre μ2 augmente significativement l'expression de surface de ces protéines. Ces résultats, quelque peu surprenants, suggèrent qu'une partie non négligeable des protéines LAMPs passerait d'abord par la membrane plasmique avant d'arriver aux lysosomes par la voie endocyttaire (Janvier and Bonifacino, 2005). Cependant, comme il reste des protéines LAMPs dans les lysosomes des cellules déficientes en AP-2 et en AP-3, on ne peut pas exclure l'existence d'autres mécanismes de transport des protéines membranaires, indépendants des complexes AP et peut-être même indépendants de la clathrine (Janvier and Bonifacino, 2005).

5. Objectifs :

Plusieurs travaux ont montré que l'expression de Nef, dans des cellules HeLa ou dans des lignées lymphocytaires, entraînait une augmentation du nombre et de la taille de corps multivésiculaires (Erdtmann et al., 2000; Madrid et al., 2005; Sanfridson et al., 1997; Stumptner-Cuvelette et al., 2003). Il se pourrait que cette modification des compartiments membranaires induite par Nef représente une des multiples stratégies mises au point par HIV pour accroître son pouvoir infectieux. On sait en effet que l'expression de Nef augmente l'infectivité du HIV et il semble de plus en plus évident que son action doit se dérouler au cours de l'assemblage des virions (Laguette et al., 2009; Qi and Aiken, 2008). Le mécanisme est encore inconnu mais on sait qu'il implique le motif dileucine en position 164-165 (Madrid et al., 2005).

Par ailleurs, on sait que l'expression de Nef interfère aussi avec le trafic intracellulaire de nombreuses protéines (dont le récepteur CD4) par un mécanisme dépendant du même motif dileucine. Dès lors, il est possible qu'en perturbant le trafic intracellulaire, Nef stimule l'incorporation dans les particules virales de facteurs cellulaires potentiellement capables d'accroître l'infectivité des virus matures. A l'inverse, Nef pourrait aussi promouvoir l'exclusion des facteurs cellulaires inhibant l'infectivité des virus, en les dirigeant loin des plateformes d'assemblage des virions (Laguette et al., 2009).

Dans ce contexte, notre objectif a été d'examiner si l'expression de la protéine HIV-1 Nef n'engendrait pas aussi une perturbation du trafic intracellulaire des hydrolases lysosomales et des protéines lysosomales membranaires au cours de leur biosynthèse. Dans des cellules HeLa transfectées avec Nef, Nef a été détectée sur la face interne de la membrane plasmique, dans la région du Golgi, le long des compartiments endosomaux et sur des éléments tubulovésiculaires situés près du TGN. Il était donc raisonnable de penser que la biosynthèse des protéines lysosomales puisse être perturbée lorsque Nef est exprimée. Le cas échéant, cela pourrait signifier que l'expression de Nef favorise l'incorporation dans les virions de protéines ou de lipides permettant à Nef de potentialiser l'infectivité du HIV. En l'absence de Nef, ces composants cellulaires seraient dégradés dans les lysosomes.

La première étape de ce travail a consisté à optimiser les conditions de transfection de Nef dans les cellules HeLa de manière à augmenter la probabilité d'observer l'effet possible de l'expression Nef sur le trafic biosynthétique par des approches biochimiques. Pour cela, nous avons déterminé le taux d'expression de Nef-GFP par FACS.

Ensuite, nous avons étudié l'activité des hydrolases lysosomales ainsi que l'abondance des protéines LAMP-1/2 dans des cellules HeLa transfectées avec CD8-Nef (sauvage ou une forme mutante où le motif di-leucine a été substitué par deux résidus alanine). Ces protéines de fusion ont souvent été utilisées par le passé pour analyser les interactions de Nef avec la machinerie de transport vésiculaire (Bresnahan et al., 1998; Erdtmann et al., 2000; Janvier et al., 2001; Madrid et al., 2005). Ensuite, nous avons réalisé des marquages métaboliques avec de la méthionine radioactive afin d'étudier la cinétique de biosynthèse de la cathepsine D.

Matériels et méthodes :

1. Culture cellulaire :

Les cellules HeLa et HEK 293T ont été maintenues en culture dans des flacons de 75-cm² (Greiner) dans 20 ml de milieu « Dulbecco's modified Eagle medium » (DMEM) contenant 4.5 g / l de glucose, de la L-glutamine 2 mM (LONZA) et 10 % de sérum de veau fœtal (Sigma), et incubées à 37 °C sous une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

2. Transfections :

Les plasmides pCG-Nef GFP, pCN CD8-Stop, pCN CD8-Nef WT et pCN CD8-Nef LL / AA ont été fournis par le Dr. S. Bénichou, co-promoteur de ce travail (Institut Cochin, Paris) (Erdtmann et al., 2000; Laguette et al., 2009; Madrid et al., 2005).

Pour obtenir le plasmide pCG-Nef GFP, le gène *nef* a été amplifié à partir du clone proviral pNL4-3 (GenBank: M19921.1) puis inséré dans le vecteur rétroviral pCGGFP qui possède un promoteur CMV. La construction CD8-Stop, servant de contrôle, contient les domaines extracellulaire et transmembranaire de la chaîne de CD8 humain avec 3 acides aminés supplémentaires servant de stop à la portion transmembranaire. Pour obtenir les constructions CD8-Nef, les séquences de Nef WT et Nef LL / AA ont été amplifiées par PCR à partir d'un plasmide contenant le gène *nef* LAI (Genbank AF166101). HIV-1_{LAI} est un clone moléculaire obtenu à partir d'un patient français atteint du SIDA.

Des souches de *E. coli* cultivées dans du milieu LB (Becton Dickinson) ont servi à l'amplification des plasmides. Ces plasmides ont par la suite été purifiés avec le kit « Qiafilter plasmid purification kit » (Qiagen) selon les instructions de la firme.

Afin d'obtenir le taux d'expression de Nef le plus élevé, des transfections transitoires des cellules HeLa ont été réalisées avec de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), du Fugene 6 (Roche Applied Science), du Fugene HD (Roche Applied Science), ou du Superfect (Qiagen) en accord avec les instructions de ces différentes firmes. Différents ratios ADN / agent transfectant ainsi que différentes densités cellulaires ont été testées.

Pour les agents de transfection Superfect et Fugene 6, 6x10⁵ cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre, la veille du jour de la transfection de manière à atteindre environ 40 % de confluence.

Pour le Superfect, 5 µg d'ADN ont été mixés dans 150 µl de milieu DMEM sans sérum. Ensuite, 15-25 µl d'agent transfectant ont été ajoutés à ce mélange de façon à former des complexes ADN-Superfect. Après 15 min d'incubation à température ambiante, les complexes ont été dilués dans 1 ml de milieu DMEM sans sérum, puis ajoutés sur les tapis cellulaires préalablement lavés avec 4 ml de solution « Phosphate Buffer Saline » (PBS : KH₂PO₄ 1,06 mM, NaCl 154 mM, Na₂HPO₄ 3 mM à un pH de 7,4). Après une période d'incubation de 2 à 3 h à 37 °C, les cellules ont été lavées trois fois avec 4 ml de solution PBS et nourries avec 6 ml de milieu DMEM contenant du sérum de veau fœtal.

Pour le Fugene 6, 6, 10, ou 12 μl d'agent transfectant ont été mélangés à 200 μl de milieu DMEM sans sérum, et ensuite 2 μg d'ADN ont été ajoutés à la mixture. Après une période d'incubation de 15 min à température ambiante, les complexes formés par l'ADN et l'agent transfectant ont été ajoutés goutte-à-goutte sur les tapis cellulaires recouverts de 6 ml de milieu DMEM complétement avec du sérum.

Pour le Fugene HD, le jour précédant la transfection, 7×10^5 cellules ont étéensemencées sur une plaque multi-puits (MP6) de manière à atteindre une confluence de l'ordre de 90 %. Deux μg d'ADN ont été dilués dans 100 μl de milieu OPTI-MEM I (Gibco). Les complexes ont été formés par addition de 4, 6, ou 8 μl d'agent de transfection. Le milieu de culture a ensuite été enlevé et remplacé par 2 ml de milieu frais contenant du sérum. Ensuite, après une période d'incubation de 15 minutes, les complexes ont été ajoutés goutte-à-goutte sur les tapis cellulaires.

Pour la Lipofectamine 2000, le jour précédant la transfection, 1×10^6 cellules ont étéensemencées sur des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre, de manière à atteindre une confluence cellulaire de 80 à 90 %. Huit μg d'ADN ont été mélangés à 20 ou 25 μl d'agent transfectant dans 1 ml de milieu OPTI-MEM I. Après une période d'incubation de 20 min à température ambiante, les complexes formés par l'agent transfectant et l'ADN ont été ajoutés sur les cellules où le milieu de culture avait été préalablement remplacé par 5 ml de milieu OPTI-MEM. Ensuite, après incubation pendant 6 h à 37 °C dans une atmosphère de 5 % de CO_2 , le milieu OPTI-MEM a été remplacé par 6 ml de milieu DMEM complétement avec du sérum.

Finalement, quel que soit l'agent transfectant utilisé, les cellules ont toujours été incubées pour 48 h à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO_2 , avant analyse subséquente.

3. Nucléofection :

La transfection transitoire des cellules HeLa a aussi été obtenue avec le système de nucléofection Amaxa (Lonza). Cette technique consiste à transférer directement l'ADN dans le noyau des cellules. Un million de cellules ont été suspendues dans 100 μl de solution « Nucleofector R » (Lonza) auxquels 2 μg d'ADN ont été additionnés. La mixture a ensuite été transférée dans une cuvette qui est insérée dans l'appareil « Nucleofector I » (Amaxa biosystems). Puis, un programme, nommé I-13, a été appliqué et 500 μl de milieu RPMI 1640 (Lonza) préchauffé ont ensuite été ajoutés à la suspension le plus rapidement possible afin de réduire la mortalité cellulaire. Enfin, la totalité a été transférée dans une plaque de 6 puits contenant 3 ml de milieu DMEM préchauffé puis a été incubée à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO_2 pour une période de 48 h.

4. Analyse en cytométrie de flux :

Afin d'estimer l'efficacité de transfection, nous avons utilisé un plasmide contenant la séquence codante de la protéine hybride Nef-GFP. Les cellules ont été rincées avec une solution Hank's Balanced Salt Solution (Lonza) et détachées par trypsinisation (Trypsin / versene, Lonza) après 48 h de transfection. Par la suite, les cellules ont été suspendues dans du DMEM et lavées 2 fois dans une solution de PBS en centrifugeant à 1000 RPM pendant 5 min (centrifugeuse Beckman Coulter Allegra X22R) entre deux lavages et en homogénéisant dans cette même solution. Ensuite, les cellules ont été homogénéisées dans 1 ml de PBS

contenant 1 % d'albumine sérique bovine (w / v). Le pourcentage de cellules exprimant la GFP a été évalué par un cytomètre de flux FACSCalibur, équipé d'un logiciel CellQuest (Becton Dickinson).

5. *Western blot* :

Le contenu en protéines de nos échantillons a été mesuré par la méthode BCA (*bicinchoninic acid*) (Thermo Scientific, Pierce). Une quantité équivalente de protéines a été solubilisée dans une solution de Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 contenant du dithiothreitol 0,1 M (DTT), du glycérol 10 % et du sodium dodecyl sulfate (SDS) et ensuite chauffée pendant 5 min à 95 °C avant d'être chargée sur un gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS. Après électrophorèse, le transfert des protéines sur une membrane de polyvinylidène difluoride Hybond (PVDF) -LFP ou -P (GE Healthcare) a été effectué à froid pendant 90 min à 400 mA. Après une période de saturation d'une nuit à 4 °C, dans une solution de PBS contenant du Tween 20 0.1 % et de l'agent bloquant 2 % (GE Healthcare), les membranes ont été incubées pendant 2 h avec un anticorps primaire (voir tableau 1). Ensuite, les membranes ont été rincées de manière intensive à l'aide d'une solution de PBS / Tween 20 et incubées pendant 1 h avec un anticorps secondaire (voir tableau 2). Il est à noter que tous les anticorps primaires et secondaires ont été dilués dans une solution de PBS / Tween 20 0,1 % / agent bloquant 2 %. Les membranes ont été de nouveau rincées intensivement avec une solution de PBS / Tween 20 et analysées en chimioluminescence (ECL-HRP) ou en fluorescence (ECL-PLEX), après 3 rinçages au PBS sans Tween et séchage pendant 1 h à 37 °C.

6. *Fractionnement cellulaire* :

Les cellules HeLa, ensemencées sur un flacon de culture de 75-cm² ou sur une boîte de Pétri de 100 mm de diamètre, ont d'abord été lavées quatre fois dans une solution glacée de saccharose 0,28 M contenant du Tris-HCl 10 mM pH 7.4 et de l'EDTA (solution H). Les cellules ont ensuite été grattées dans 2 ml de la solution H et homogénéisées par 10 passages dans une aiguille de 25 G montée sur une seringue de 5 ml. L'homogénat cellulaire obtenu a été centrifugé à 2700 RPM pendant 10 min à 4 °C (Centrifugeuse Beckman Coulter Allegra X22R). 500 µl de surnageant ont été mis de côté pour un moment. Le culot contenant les cellules encore entières et les noyaux a été suspendu dans 2 ml de tampon H et homogénéisé par 10 nouveaux passages dans une aiguille de 25 G (montée sur une seringue de 5 ml), et ensuite soumis à une centrifugation de 2.100 RPM pendant 10 min à 4 °C. Après centrifugation, 1,5 ml du surnageant a été mélangé au premier surnageant mis de côté précédemment, pour former ce que l'on appelle le surnageant post-nucléaire (E). Le second culot, correspondant à la fraction nucléaire (N), a été remis en suspension dans un petit volume de tampon H. Ces extraits nucléaires ont alors été soumis à une centrifugation de 50.000 RPM (106120 g) pendant 14 min à 4 °C dans un rotor TLA 100.3 (Ultracentrifugeuse Beckman Optima TLX) de façon à sédimenter tous les compartiments membranaires de la cellule et à obtenir la fraction nommée « MLP ». Finalement, cette fraction membranaire post-nucléaire (MLP) a été mise en suspension dans un volume de 700 µl d'une solution glacée de saccharose 0,25 M.

7. Centrifugation Isopycnique dans un gradient de densité de saccharose :

Une fraction MLP de cellules HeLa (obtenue comme décrit dans le paragraphe ci-dessus), a été chargée sur un gradient de saccharose dont les limites de densités allaient de 1,06 g/ml à 1,32 g/ml. La solution a été soumise à une centrifugation de 37.000 RPM (correspondant à 1.069.120 g) toute une nuit à 4 °C dans un rotor SWi 55 Ti (Ultracentrifugeuse Beckman Coulter Optima LE-80K). Après cette centrifugation, les tubes ont été coupés en sections de même hauteur et 12 fractions ont été récoltées. Finalement, la mesure de l'activité enzymatique de la β -galactosidase a été évaluée sur chaque fraction par une méthode fluorimétrique utilisant le 4-méthylumbelliféryl- β -galactopyranoside comme substrat (Peters et al., 1972).

8. Centrifugation Isopycnique dans un gradient de densité « autoformé » de Percoll :

Une fraction MLP de cellules HeLa (700 μ l) a été mélangée avec 8 ml d'une solution de Percoll 18 % (Percoll 18 % v/v, saccharose 0,25 M, EDTA 2 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,4) puis déposée sur un « coussin » de saccharose 2,2 M et centrifugée à 17000 RPM (20000 g) pendant 1 h à 4 °C dans un rotor 50 Ti (Centrifugeuse Beckman Coulter L7-35). Sept fractions ont été collectées par pipetage, du dessus vers le bas du gradient autoformé de densité. Finalement, la mesure de l'activité enzymatique de la β -galactosidase a été évaluée sur chaque fraction par une méthode fluorimétrique.

9. Microscopie fluorescente confocale :

Les cellules HeLa et HEK 293 T ont été ensemencées sur des lamelles couvre-objets stérilisées à l'éthanol 70 % puis déposées dans le fond d'une plaque de 12 puits. Elles ont ensuite été lavées trois fois dans une solution de dPBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0,5 mM) puis fixées pendant 10 min à -20 °C dans une solution glacée de méthanol/acétone (50/50). Après retrait de la solution de fixation et séchage à l'air ambiant, les cellules ont de nouveau été lavées trois fois avec la solution de dPBS puis incubées pendant 30 min avec une solution de PBS contenant 2 % de BSA (solution de blocage). Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 1 h avec un anticorps primaire (voir tableau 3), lavées 3 fois 5 min avec du dPBS puis à nouveau incubées pendant 1 h avec un anticorps secondaire approprié (voir tableau 4). Tous les anticorps ont été dilués dans la solution de blocage composée de PBS / BSA 2 %. Dans la plupart des expériences de microscopie confocale, les noyaux ont été colorés pendant 30 min avec la sonde ToPro 3 (Thermo Scientific, Molecular Probes) préparée dans une solution de PBS contenant 2 mg/ml de RNase A. Après ce dernier marquage, les cellules ont été soumises à trois rinçages dPBS puis fixées sur une lame porte-objets avec du Mowiol 4-88 (Calbiochem). Les images de microscopie ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal (laser scanning confocal TCD Leica) couplé à un photomultiplicateur.

10. Marquage métabolique et immunoprécipitation :

Des cellules HeLa ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre puis transfectées avec du Fugene 6. 48 h post-transfection, elles ont été lavées à trois reprises avec une solution de PBS stérile (Gibco). Ensuite, elles ont été incubées avec 8 ml de milieu DMEM ne contenant pas de méthionine, pas de cystéine, ni de sérum, mais complémenté avec de la L-glutamine 2 mM pendant 1 h à 37 °C (Sigma), ceci constituant la période de jeûne. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant une période de 60 min à 37 °C sous une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ dans 8 ml de milieu contenant 25 µCi / ml de méthionine radioactive. Ce milieu sans méthionine froide contenait de la L-glutamine 2 mM, du sérum dialysé 10 % et 200 µCi / Pétri de Tran³⁵S label (soit 7,38 MBq/Pétri) (MP Biomedicals). Au temps de chasse de 0, 2, 4, 8, 16 et 30 h, les cellules ont été rincées à trois reprises avec du PBS et lysées dans 700 µl de PBS / Triton X-100 2 % (w / v) contenant des inhibiteurs de protéases (Complete, Roche). Ces mêmes cellules ont été en contact avec ce tampon de lyse pendant 10 min sous agitation, et les lysats ont été collectés avec un grattoir et transférés dans un tube de 1.5 ml à pas de vis. Après une agitation de 10 min en chambre froide, les lysats ont été centrifugés pendant 15 min à 13.000 RPM dans une centrifugeuse Eppendorf (modèle 5415 D). Ensuite, les surnageants ont été récoltés et congelés à -20 °C. Après décongélation, les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-cathepsine D (R&D systems, AF1014) préalablement fixé sur des billes magnétiques couplées à la protéine G (Invitrogen, Dynal). Les précipités ont par la suite été séparés sur gel SDS-PAGE 12 %. Après une période de fixation de 30 min dans une solution d'acide acétique 7 % /Méthanol 40 %, le gel a été séché pendant 1 h à 80 °C (sécheur BioRad, modèle 583). Après cette étape, le gel a été mis en contact avec un écran super sensible (Packard) pour « cyclone de type ST » pendant une nuit minimum. Finalement, l'écran a été analysé par autoradiographie à l'aide d'un scanner (Cyclone, Packard). La quantification a été réalisée grâce au logiciel Optiquant (Packard).

11. Mesure de l'activité enzymatique des hydrolases lysosomales :

48h post-transfection avec le Fugene 6, les cellules ont été rincées puis lysées dans 700 µl de PBS / Triton X-100 2 %, comme expliqué dans le paragraphe précédent, mais cette fois en absence d'inhibiteurs de protéases. Les dosages enzymatiques ont été réalisés sur les lysats décongelés en utilisant des substrats fluorescents : des dérivés méthylumbelliféryl pour le dosage de la β-Galactosidase, de la Glucocérébrosidase, de l'α-Mannosidase, de la β-Hexosaminidase et de la Phosphatase acide ; et des dérivés Amino-4-méthyl-coumarin pour le dosage des cathepsines B et C (voir tableau 5).

Pour toutes ces réactions :

- les substrats utilisés ont été préparés et stockés dans du diméthyl sulfoxyde et stockés à -20 °C avant usage,
- des tampons acides (acétate ou phosphate) ont été utilisés puisque les hydrolases ont une activité optimale à pH 4,5-6,
- le triton X-100 a été utilisé pour solubiliser les membranes,
- le tampon utilisé pour arrêter les réactions enzymatiques est le suivant : Tampon glycine 50 mM / EDTA 5mM / Triton X100 0,05 % pH 10,5,
- la fluorescence a été mesurée avec un fluorimètre Versa Fluor (BioRad) à des longueurs d'onde d'excitation de 360 nm et d'émission de 460 nm.

Pour le dosage des glycosidases et de la phosphatase acide, nous avons ajouté 20 μ l d'échantillon à 180 μ l de mixture avant d'incuber à 37 °C. Pour le dosage des cathepsines B et C, nous avons d'abord ajouté 25 μ l d'échantillon à 350 μ l de tampon activateur contenant du tampon acide (phosphate de sodium 0,373 M pH 6,0 et acétate de sodium 0,373 mM pH 5, pour la cathepsine B et la cathepsine C, respectivement), de l'EDTA 3.7 mM, du Triton X-100 0.05 % et de l'aminoéthane-thiol 3.7 mM (agent réducteur). C'est seulement à l'issue des 10 min d'activation que le substrat Z-Arg-Arg-7-Amido-4-méthylcoumarin (100 μ M) a été ajouté afin de mesurer l'activité des deux cathepsines (Voir tableau 5). Notez que pour la cathepsine B, des échantillons ont été préincubés en présence d'un inhibiteur « spécifique » : le CA-074 (10 μ M) pour nous assurer que l'activité mesurée correspondait bien à la cathepsine B et pas à la cathepsine L, par exemple.

Résultats :

Le virus HIV-1 a développé de nombreuses stratégies de détournement du trafic intracellulaire de plusieurs protéines de la cellule hôte. La protéine multifonctionnelle Nef contribue en grande partie à ces événements en interagissant avec des composants essentiels du trafic intracellulaire, en particulier avec les protéines adaptatrices AP (clathrin-adaptor proteins) (Coleman et al., 2006a; Madrid et al., 2005; Sol-Foulon et al., 2004).

Vu l'importance de ces mêmes complexes AP sur le trafic intracellulaire des protéines lysosomales, nous avons décidé d'étudier l'impact de l'expression de Nef sur la biogenèse des lysosomes en se focalisant sur le trafic intracellulaire de protéines lysosomales solubles, mais aussi de deux protéines lysosomales membranaires.

La première étape de ce mémoire a consisté à déterminer les conditions optimales de transfection pour les cellules HeLa en utilisant la construction hybride Nef-GFP de manière à réaliser ultérieurement des expériences biochimiques. Cette étape d'optimisation a été nécessaire car, contrairement à de nombreuses études concernant le rôle de Nef sur le trafic des protéines CD4, MHC-I, et autres, qui étaient basées sur des expériences de cytométrie de flux et de microscopie à fluorescence ; nous voulions réaliser des expériences biochimiques (mesures d'activités enzymatiques, western blotting, marquages métaboliques, ...) sur un nombre le plus élevé possible de cellules transfectées.

Différents agents de transfection (Fugene 6, Lipofectamine 2000, Fugene HD, Superfect) ont été testés, ainsi que la nucléofection. Pour chaque condition testée, l'efficacité de transfection a été examinée par microscopie confocale et quantifiée par cytométrie de flux. Ensuite, afin de compléter notre optimisation du processus de transfection, nous nous sommes attardés à étudier les effets éventuels des agents de transfection sur la morphologie des lysosomes par microscopie confocale et sur la densité des lysosomes par centrifugation isopycnique sur des gradients de densité.

Après cette étape primordiale de mise au point, nous avons pu débiter nos investigations sur les conséquences de l'expression de Nef sur les hydrolases lysosomales.

1. Transfections :

1.1. Choix de la lignée cellulaire et des agents de transfection :

1.1.1. Choix de la lignée cellulaire :

Le choix s'est porté sur les cellules HeLa car c'est une lignée cellulaire qui a été utilisée à de nombreuses reprises lors d'études visant notamment à mettre en évidence l'interaction entre Nef avec les complexes AP ou le rôle de Nef sur le trafic intracellulaire de CD4 et autres protéines de la cellule hôte (Bresnahan et al., 1998; Burtey et al., 2007; Chaudhuri et al., 2007; Janvier et al., 2003a). C'est aussi dans ces cellules que l'équipe du Dr. Bénichou a montré que l'expression de Nef provoquait un gonflement des endosomes (Erdtmann et al., 2000; Madrid et al., 2005).

1.1.2. Critères de sélection des agents de transfection :

Afin d'optimiser les conditions de transfection, nous avons défini prioritairement certains critères de sélection. Ainsi, l'efficacité de transfection a été évaluée sur base des critères suivants : le taux de transfection, la reproductibilité, l'absence de cytotoxicité et la simplicité du protocole.

1.1.3. Mode d'action des agents de transfection :

Le Superfect (Qiagen) est un dendrimère activé, qui s'assemble avec l'ADN en structures compactes grâce à des interactions entre les groupements phosphates des acides nucléiques chargés négativement et les groupements amines chargés positivement du dendrimère. Les complexes formés par l'ADN et le dendrimère possédant une charge nette positive, ils vont pouvoir se lier aux glycoprotéines membranaires chargées négativement exprimées à la surface cellulaire.

Le Fugene 6 et le Fugene HD (Roche) sont des mélanges de lipides et d'autres composants de nature non dévoilée par la firme. Ces réactifs formeraient des complexes avec l'ADN facilitant leur entrée dans la cellule.

La lipofectamine 2000 (Invitrogen) est un lipide cationique. Cette charge positive nette permet son interaction avec l'ADN, mais également avec la membrane cellulaire. Le complexe va alors entrer dans la cellule par endocytose. Et une fois à l'intérieur de la cellule, le complexe peut s'échapper de la voie endocyttaire, diffuser à travers le cytoplasme et entrer dans le noyau par des mécanismes encore inconnus.

La nucléofection (Lonza) pourrait être une méthode de choix pour l'expression de gènes car cette méthode permet le transfert direct de l'ADN dans le noyau. Le principe de la nucléofection est le suivant : les cellules sont resuspendues dans une solution de nucléofection puis soumises à un champ électrique de façon à permettre l'entrée de l'ADN dans le noyau.

1.1.4. Nef-GFP :

Afin de pouvoir évaluer les taux de transfection obtenus avec les différents agents de transfection, nous avons utilisé la construction Nef-GFP où la GFP (Green Fluorescent Protein) a été ajoutée en position C-terminale de la protéine Nef. Cette protéine de fusion a été largement utilisée par l'équipe du Dr. Bénichou (Coleman et al., 2006b; Craig et al., 2000; Janvier et al., 2003a; Madrid et al., 2005).

1.2. Efficacité de transfection :

Nous avons transfecté les cellules HeLa soit avec un plasmide « vide » (pcDNA3.1), soit avec la construction Nef-GFP et nous avons examiné la fluorescence par cytométrie de flux. Grâce au logiciel « CellQuest Pro » (Becton Dickinson), nous avons pu acquérir des données et réaliser des analyses statistiques. Les résultats sont présentés sous forme de graphiques à deux dimensions (Figure : 1), où l'axe des Y (SSC-H) représente la granularité relative de la cellule (ou sa complexité interne), tandis que l'axe des X (FL1-H) représente l'intensité relative de la fluorescence.

Avec les cellules contrôles non fluorescentes transfectées avec pcDNA3.1 en présence de Fugene 6, nous avons obtenu un nuage de points dans le coin inférieur gauche du graphique. À partir de ce nuage, nous avons tracé une ligne horizontale et une ligne verticale afin de définir des quadrants.

Ensuite, avec les cellules transfectées avec le plasmide codant pour la construction Nef-GFP, nous avons obtenu un nuage de points plus étalé le long de l'axe des X. En dessinant les repères aux mêmes endroits que pour les cellules contrôles, il nous a été possible de calculer le pourcentage de cellules fluorescentes, simplement en comparant les pourcentages d'événements dans le coin inférieur droit enregistrés dans les cellules transfectées avec Nef-GFP et dans les cellules transfectées avec pcDNA3.1.

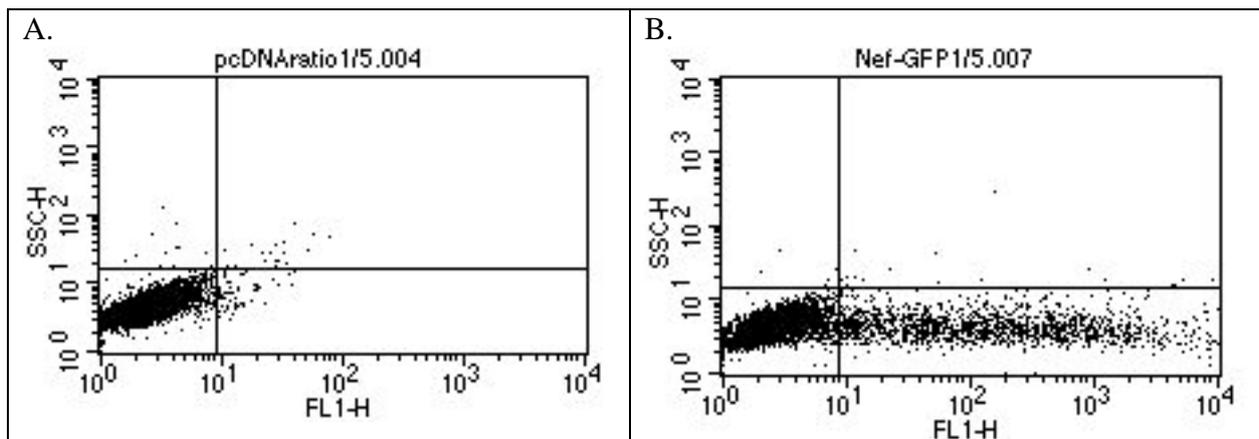


Figure 1 : Analyse en cytométrie de flux : les graphiques représentent la granularité relative de la cellule (SSC-H) en fonction de l'intensité relative de la fluorescence (FL1-H). (A) Cellules contrôles transfectées avec pcDNA3.1. (B) Cellules transfectées avec la construction Nef-GFP.

Nous avons appliqué cette procédure pour les différents agents et pour la nucléofection, 48 h après traitement. Avec le Superfect, quelles que soient les conditions testées, nous avons obtenu des taux de transfection très faibles. Tandis que nous avons obtenu en moyenne 41 % de taux de transfection avec le Fugene 6, et environ 60 % avec le Fugene HD, la Lipofectamine et la nucléofection (Figure 2).

Sur base des résultats en cytométrie de flux, nous avons donc écarté le « superfect ». Cette décision était d'autant plus facile à prendre que dans la fiche technique de cet agent de transfection, il est mentionné que le Superfect entraîne une augmentation du pH intralysosomale, provoquant ainsi l'inhibition des nucléases et assurant par conséquent, une meilleure stabilité de l'ADN exogène.

La technique de nucléofection a également été écartée parce que cette technique présentait plusieurs inconvénients. Premièrement, les images prises en microscopie à contraste de phase ont révélé une forte mortalité et la présence de nombreux débris cellulaires. De plus, cette technique nécessite plusieurs manipulations des cellules, c'est pourquoi nous avons été confrontés à des problèmes de contaminations et de reproductibilité.

1.3. Etude de l'influence des agents de transfection sur la morphologie et la densité des lysosomes :

Parmi les agents de transfection testés, c'est avec la Lipofectamine 2000 que nous avons obtenu les meilleurs taux de transfection, avec une bonne reproductibilité (taux de transfection de l'ordre de 60 %, 48 h post-transfection). Toutefois, l'examen en contraste de phase nous a permis de voir une mortalité cellulaire élevée. De plus, nous avons décelé dans le cytoplasme, la présence de nombreuses vacuoles réfringentes qui pouvaient éventuellement correspondre à des lysosomes gonflés. En effet, des expériences biochimiques, réalisées précédemment au sein de notre laboratoire, avaient démontré que la densité médiane d'équilibration des lysosomes de cellules COS après centrifugation isopycnique d'une fraction membranaire post-nucléaire sur un gradient de saccharose diminuait de 1,17-1,18 g/ml à 1,13 g/ml après transfection avec la Lipofectamine (Deprez, 1994).

Comme le but de ce mémoire était d'examiner l'impact éventuel de Nef sur le trafic des protéines lysosomales, il nous a paru important de comparer la morphologie et la densité des lysosomes des cellules transfectées avec la Lipofectamine 2000, le Fugene 6 et le Fugene HD par rapport aux cellules non transfectées. Pour aborder cette question, nous avons réalisé des expériences de microscopie confocale, ainsi que des centrifugations isopycniques sur gradient de densité.

1.3.1. Expériences de microscopie confocale :

Pour évaluer l'influence des agents de transfection sur la taille des lysosomes et sur leur localisation intracellulaire, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre LAMP-1 (Lysosome-Associated Membrane Protein), une protéine membranaire des endosomes tardifs et des lysosomes, et nous avons observé les cellules en microscopie confocale.

Si nous regardons les images des cellules non transfectées, nous pouvons observer un marquage fluorescent juxtanucléaire (Figure 3 A).

Pour les cellules transfectées avec la Lipofectamine 2000, le signal de fluorescent est plus dispersé à travers le cytoplasme. Cette distribution plus aléatoire de la fluorescence suggère que la localisation des endosomes tardifs et/ou des lysosomes serait affectée par la Lipofectamine 2000 (Figure 3 B).

Pour les cellules traitées avec le Fugene HD, l'intensité de fluorescence semble être plus importante que celle observée avec les cellules non transfectées (Figure 3C). Cependant, nous pouvons noter que le signal est aussi restreint à une région entourant les noyaux, indiquant que la distribution cellulaire des endosomes tardifs/lysosomes n'est pas affectée par cet agent de transfection. L'augmentation du signal de fluorescence induite par le Fugene HD pourrait être due, soit à une augmentation du nombre de compartiments positifs pour LAMP-1, soit à un gonflement de ces compartiments. En effet, en cas de dilatation des lysosomes, les antigènes seraient plus accessibles aux anticorps, ce qui expliquerait l'augmentation d'intensité de fluorescence. Étant donné que nous n'avons pas réalisé d'expériences complémentaires (western blotting et centrifugation isopycnique), nous ne pouvons pas distinguer ces deux hypothèses.

Par la suite, nous avons réalisé un immunomarquage de LAMP-1 sur des cellules transfectées avec le Fugene 6. Comme dans l'expérience précédente, nous pouvons voir que, dans les cellules non transfectées, la fluorescence est située près du noyau. Cependant, l'intensité du signal est plus élevée que précédemment (Figure 4 A). Pour les cellules transfectées avec un plasmide vide en présence du Fugene 6, la distribution du marquage fluorescent est également périnucléaire. L'intensité de fluorescence semble être égale à celle observée avec les cellules non transfectées (Figure 4B). Cet agent de transfection ne semble donc pas interférer sur la taille et la localisation des lysosomes.

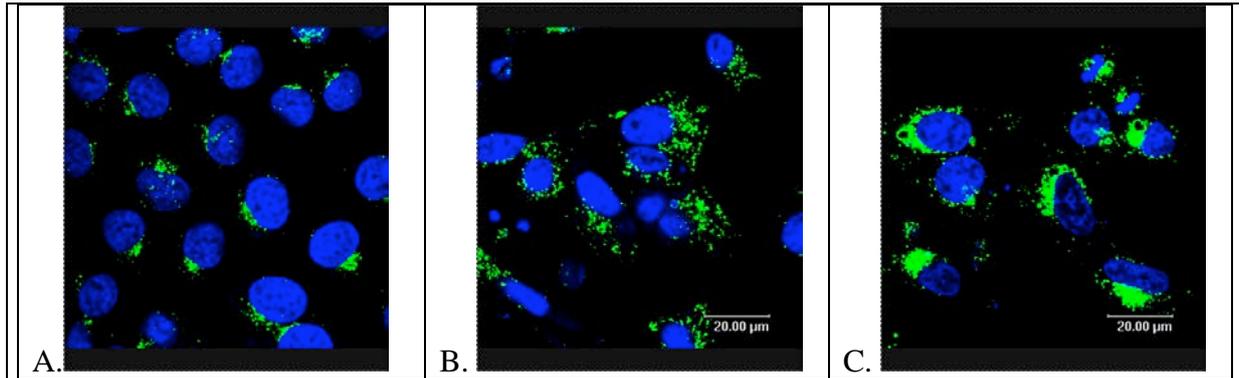


Figure 3: Marquage en immunofluorescence des compartiments endo-lysosomaux de cellules HeLa. 48 h post-transfection, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-LAMP-1 suivi par un marquage avec un anticorps secondaire conjugué à Alexa fluor 488, et avec la sonde nucléaire ToPro-3. Les cellules ont ensuite été analysées à l'aide du microscope fluorescent confocal. (A) Cellules non transfectées. (B-C) Cellules transfectées avec pcDNA 3.1 en présence de la lipofectamine 2000 (B) ou du Fugene HD (C).

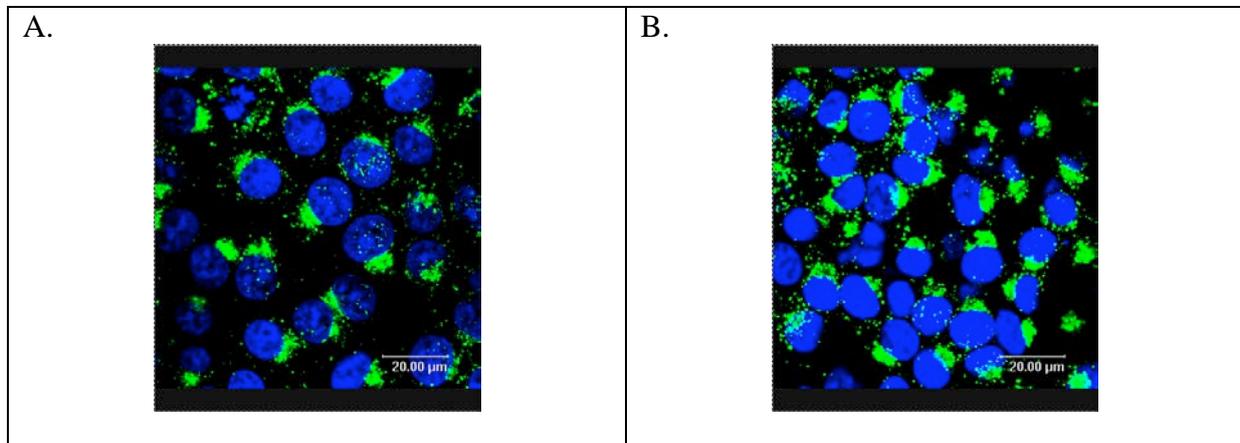


Figure 4: Marquage en immunofluorescence des compartiments endo-lysosomaux de cellules HeLa. 48 h post-transfection, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-LAMP-1 suivi par un marquage avec un anticorps secondaire conjugué à Alexa fluor 488, et avec la sonde nucléaire ToPro-3. Les cellules ont été ensuite analysées à l'aide du microscope fluorescent confocal. (A) Cellules non transfectées. (B). Cellules transfectées avec pcDNA 3.1 en présence du Fugene 6.

1.3.2. Centrifugation isopycnique sur un gradient de saccharose :

Afin d'investiguer si le Fugene 6, le Fugene HD et la Lipofectamine 2000 affectaient la densité des lysosomes, une expérience de centrifugation isopycnique sur gradient linéaire de saccharose a été menée. Cette technique permet la séparation d'organites subcellulaires provenant ici d'une fraction MLP (contenant les mitochondries, les endosomes, les lysosomes, les peroxysomes ainsi que des microsomes dérivés du réticulum endoplasmique et

de l'appareil de Golgi) en fonction de leur densité. Les organites s'arrêtent de migrer lorsque la densité du milieu devient égale à leur propre densité.

Après une nuit de centrifugation à 1×10^6 g, nous avons coupé les gradients en 12 fractions et mesuré l'activité de la β -galactosidase (marqueur des lysosomes) dans chacune des fractions.

Nos données montrent que la distribution de l'activité de la β -galactosidase dans les cellules non transfectées et celle mesurée dans les cellules transfectées avec l'un des trois agents de transfection se superposent largement (Figure 5). Les densités médianes d'équilibration, qui représentent la densité de saccharose où la somme des activités de la β -galactosidase atteint 50 %, sont très semblables : 1,12, 1,13, 1,13 et 1,13 g/ml pour les cellules non transfectées, pour les cellules transfectées avec Fugene 6, Lipofectamine 2000, Fugene HD, respectivement. Ces résultats suggèrent que les agents de transfection testés n'induisent pas de modifications de densité des lysosomes.

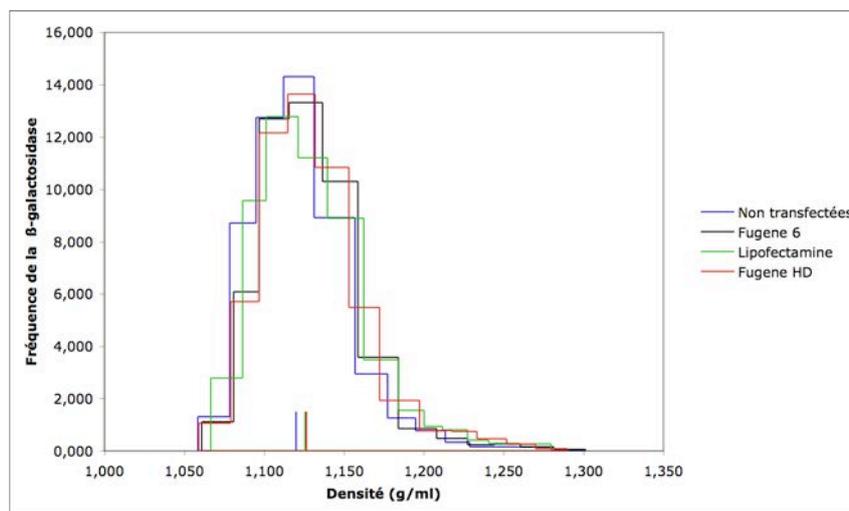


Figure 5 : Distribution de la β -Galactosidase après centrifugation isopycnique d'une fraction MLP sur un gradient de densité de saccharose. Les fractions MLP de cellules non transfectées (ligne bleue), de cellules transfectées avec pcDNA3.1 en présence du Fugene 6 (ligne noire), du Fugene HD (ligne rouge) et de la Lipofectamine 2000 (ligne verte), ont été déposées au sommet de gradients de densité de saccharose dont les densités allaient de 1,06 à 1,32 g/ml. Les échantillons ont été centrifugés pendant toute une nuit à 37.000 RPM dans un rotor SW 55 Ti. Après centrifugation, 12 fractions ont été récoltées et l'activité de la β -Galactosidase a été mesurée sur chaque fraction. Les histogrammes représentent la fréquence (pourcentage d'activité divisée par l'incrément de densité) en fonction de la densité de chaque fraction. Les traits présents à la base des histogrammes représentent les médianes d'équilibration.

Cependant, dans ces conditions, la densité médiane d'équilibration nous a paru relativement basse, même pour les cellules non transfectées (1,12 g/ml), comparées à celles de lysosomes de foie de rat (1,20 g/ml) (Jadot et al., 1986).

Nous avons décidé d'appliquer un protocole mis au point dans notre laboratoire sur des cellules HeLa (Boonen et al., 2008). Il consiste en une centrifugation isopycnique d'une fraction MLP sur un gradient auto-formé de Percoll en condition isotonique.

1.3.3. Centrifugation isopycnique sur un gradient auto-formé de Percoll en condition isotonique :

Le Percoll consiste en une solution contenant des particules colloïdales de silice, recouvertes de polyvinylpyrrolidone. Le principe d'un gradient auto-formé de Percoll est le suivant : lorsqu'une solution de Percoll est mélangée à du saccharose 0,25 M et est ensuite centrifugée, les particules de silice commencent à sédimenter. Il en résulte une distribution inégale de ces particules et ainsi la formation d'un gradient curvilinéaire dont le profil dépend du type de rotor, ainsi que de la vitesse et du temps de centrifugation.

Comme attendu, dans les cellules HeLa non transfectées, 57,7 % de l'activité de la β -galactosidase a été principalement détectée dans les fractions situées plutôt à la base du gradient de densité (Fractions 6 et 7) (Figure 6).

De même, pour les cellules transfectées avec le Fugene HD et la Lipofectamine 2000, 59,4 % et 53,5 % respectivement, de l'activité de la β -galactosidase ont été observées dans les mêmes fractions du gradient.

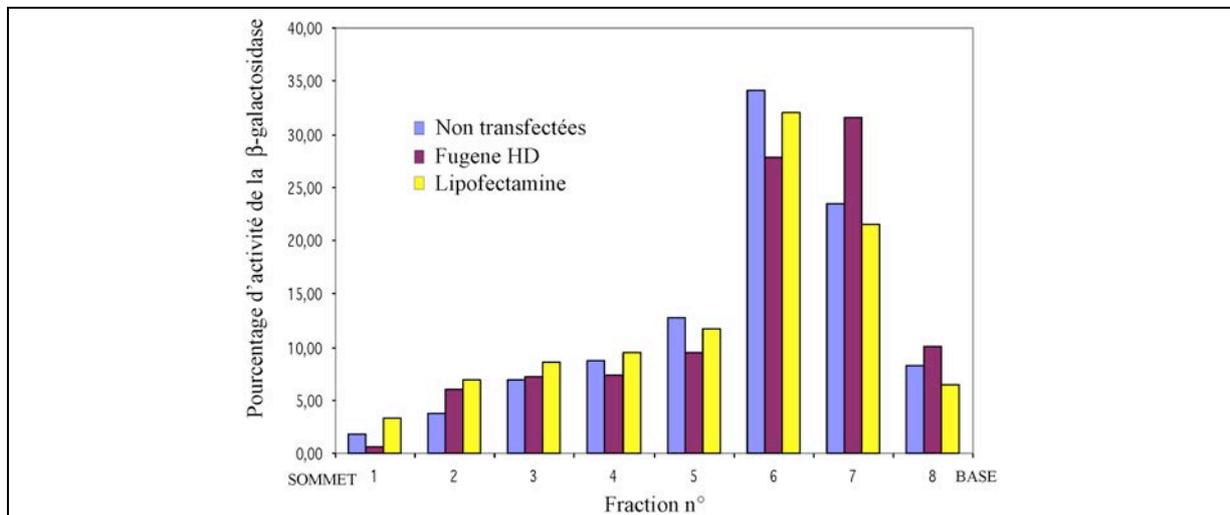


Figure 6 : Distribution de la β -Galactosidase après centrifugation isopycnique sur un gradient auto-formé de Percoll en condition isotonique.

Les fractions MLP de cellules HeLa non transfectées (barres bleues), de cellules transfectées avec pcDNA 3.1 en présence de Fugene HD (barres rouges), de la Lipofectamine 2000 (barres jaunes) ont été mélangées avec une solution de Percoll 18 %, préparée dans du saccharose 0,25 M puis centrifugées pendant 1h à 20.000 g dans un rotor 50 Ti. Les histogrammes représentent le pourcentage d'activité β -galactosidase dans les différentes fractions.

Ces deux expériences avaient pour but d'évaluer l'influence des agents de transfection sur la densité des lysosomes après centrifugation sur gradient de densité. Nos résultats semblent indiquer que la Lipofectamine ne modifie pas la densité des lysosomes des cellules HeLa, contrairement à ce qui avait été observé dans les cellules Cos précédemment dans notre laboratoire. De plus, la même conclusion peut être tirée pour les réactifs Fugene 6 et Fugene HD. Clairement, d'autres expériences seraient nécessaires pour déterminer si la Lipofectamine 2000 affecte ou non la densité des lysosomes, mais cela nous éloignerait du but de notre travail.

A ce stade du travail, nous avons décidé d'abandonner la Lipofectamine 2000 et le Fugene HD, parce que dans les deux cas, le taux de mortalité est relativement élevé. De plus, l'examen en microscopie à contraste de phase des cellules transfectées avec la Lipofectamine avait révélé la présence de nombreuses vacuoles réfringentes dans le cytoplasme.

Dès lors, nous avons choisi le Fugene 6 parce que, lors des transfections, nous avons observé un faible pourcentage de cellules mortes et une morphologie cellulaire semblable à celle des cellules non transfectées (Figure : 7 A et 7 B). Nous avons essayé d'augmenter l'efficacité de transfection en changeant la quantité d'ADN et le ratio ADN/agent de transfection mais nous n'avons pas obtenu plus de 50 % de cellules fluorescentes. Avec les conditions retenues (2 μ g ADN, ratio ADN/agent de transfection égal à 1/5, pour une boîte de pétri de 60 mm de diamètre), nous avons obtenu une moyenne de $40,7 \pm 8,9$ % (n=3) de cellules transfectées. Les images de microscopie à confocale obtenues avec des cellules transfectées avec Nef-GFP corroborent les résultats en cytométrie de flux, même si le pourcentage de cellules fluorescentes est plus faible ici (Figure 8). Lorsqu'on examine la distribution de Nef-GFP dans les cellules isolées, où celle-ci est plus étalée et d'intensité plus faible, on constate un marquage principalement autour du noyau, dans une région riche en organites subcellulaires (Golgi, endosomes de recyclage, endosome tardif et lysosomes). Sur certaines cellules, on peut détecter Nef-GFP sur la membrane plasmique. Cette distribution est conforme aux résultats publiés dans la littérature (Craig et al., 2000).

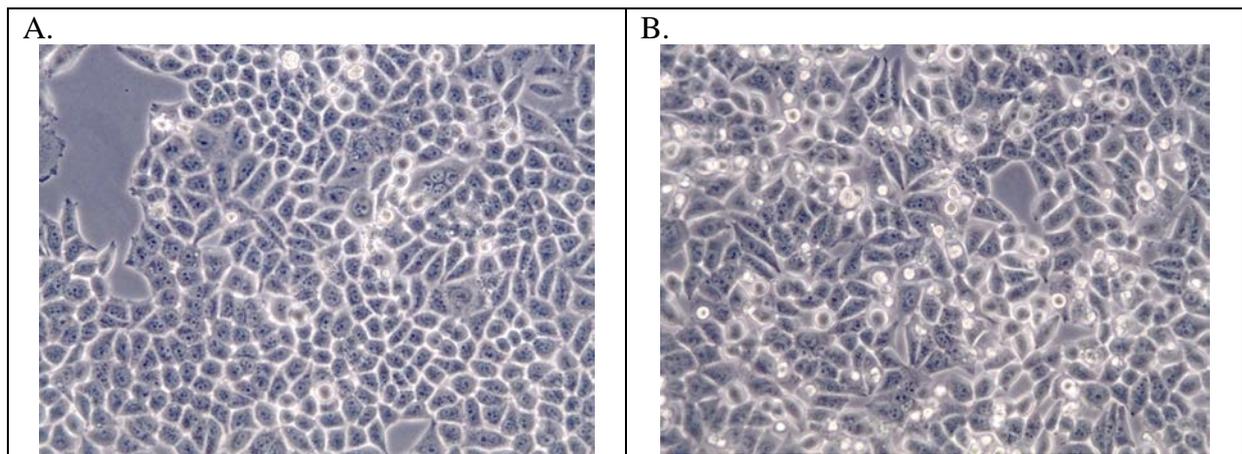


Figure 7 : (A) Analyse d'images prises en microscopie à contraste de phase de cellules HeLa non transfectées (A) ou de cellules transfectées avec pcDNA 3.1 en présence de Fugene 6 (48 h après la transfection) (B).

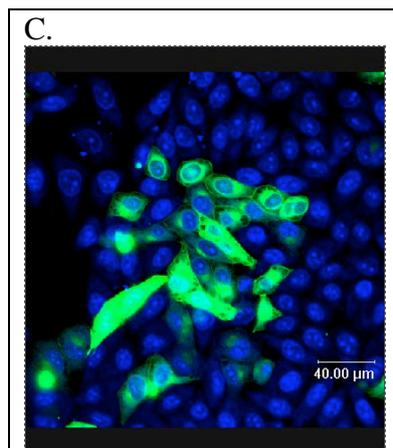


Figure 8 : Distribution de Nef-GFP dans les cellules HeLa transfectées avec Fugene 6. Les cellules HeLa ont été transfectées avec le plasmide pCG-Nef-GFP WT en présence de Fugene 6. 48 heures après la transfection, les cellules ont été fixées avec une solution glacée de méthanol/acétone (50/50), puis incubées avec la sonde ToPro-3. Ensuite, les cellules ont été observées au microscope confocal.

En conclusion, nos expériences d'optimisation nous ont poussé à poursuivre nos investigations avec le Fugene 6 car, contrairement à la Lipofectamine et au Fugene HD, cet agent est bien toléré par les cellules. À ce stade, nous espérons que le taux de transfection (en moyenne $40,7 \pm 8,9$ %, $n=3$) sera suffisant pour observer un impact éventuel de l'expression de Nef sur le trafic des protéines lysosomales par l'utilisation d'approches biochimiques.

2. Expression de CD8-Nef sauvage, CD8-Nef LL/AA et CD8-Stop :

Pour étudier l'impact éventuel de Nef sur le transport des protéines lysosomales, nous avons transfecté des cellules HeLa avec des constructions CD8-Nef où la séquence entière de Nef a été ajoutée à la partie luminaire et transmembranaire de CD8, favorisant l'association membranaire de Nef. Nef est normalement myristoylée et cela devrait suffire pour ancrer cette petite protéine dans les membranes cellulaires. Cependant, dans de nombreuses études, ces protéines chimériques CD8-Nef ont été employées pour examiner l'impact de Nef sur le trafic intracellulaire (Coleman et al., 2006b; Coleman et al., 2005; Janvier et al., 2003a). Nous avons aussi utilisé la construction CD8-Nef LL/AA où les deux résidus leucine du motif dileucine « ExxLL », permettant les interactions entre Nef et les protéines adaptatrices AP-1, AP-2 et AP-3, ont été remplacés par deux résidus alanine. Enfin, la construction CD8-Stop a servi de contrôle négatif. Elle a été obtenue en introduisant un codon stop entre la séquence de CD8 et celle de Nef (Janvier et al., 2003b). Avec ces 3 constructions, nous espérons mettre en évidence un effet potentiel de Nef sur le trafic des protéines lysosomales. Le cas échéant, les constructions CD8-Stop et CD8-Nef LL/AA devraient nous permettre de dire si cet effet dépend réellement de Nef (voir CD8-Nef WT vs CD8-Stop) et s'il dépend de la présence du motif dileucine (voir CD8-Nef WT vs CD8-Nef LL/AA).

Bien que les expériences de FACS aient montré que, en moyenne, 41% des cellules HeLa transfectées avec Nef-GFP étaient fluorescentes, avant de nous lancer dans des expériences lourdes et coûteuses, il nous a paru absolument nécessaire de vérifier l'expression de ces protéines chimériques CD8-Nef. Comme les anticorps anti-Nef, disponibles dans le commerce, ne donnent pas de résultats satisfaisants (communication du Dr. Bénichou), nous avons effectué ce contrôle avec un anticorps dirigé contre CD8. Nous avons donc déposé sur

gel de polyacrylamide de 12 %, 25 µg de protéines provenant de cellules HeLa non transfectées, ou de cellules HeLa transfectées avec CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA. Après transfert électrophorétique sur une membrane de PVDF, les protéines CD8 ont été détectées par Western blot (Figure 9). Dans les cellules transfectées avec le plasmide codant pour la protéine CD8-Stop, nous pouvons observer 3 bandes de poids moléculaires apparents très différents : 55, 34 et 20 kDa. Ce profil est conforme à la figure présentée dans la fiche technique de l'anticorps anti-CD8 . Dans les cellules transfectées avec CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA, deux bandes sont visibles : une bande d'environ 34 kDa et une autre plus intense d'un poids moléculaire apparent d'environ 45 kDa. Etant donné que la bande de 34 kDa est également présente dans les cellules non transfectées et dans les cellules transfectées avec CD8-Stop, il s'agit sans doute d'une bande non spécifique. Par contre, la bande de 45 kDa correspond vraisemblablement à la protéine chimérique CD8-Nef, car elle est présente au poids moléculaire théorique attendu (44,7 kDa pour 402 acides aminés) et, de plus, elle n'apparaît pas dans les cellules transfectées avec CD8-Stop (Bresnahan et al., 1998; Sawai et al., 1994).

Par conséquent, ce Western blot prouve que les protéines chimériques CD8-Nef WT et CD8-Nef LL/AA sont bien exprimées dans les cellules HeLa après transfection en présence de Eugene 6.

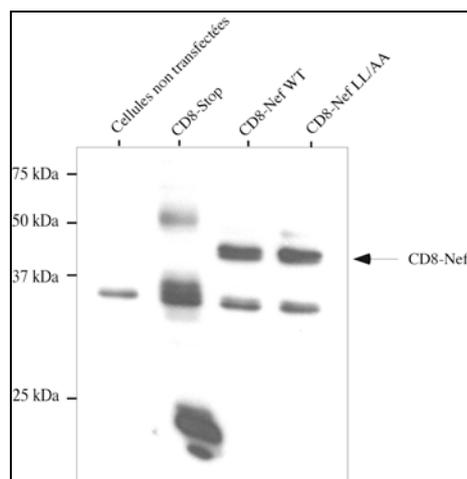


Figure 9 : Expression de CD8 dans les cellules HeLa transfectées avec CD8-Stop, CD8-Nef sauvage ou CD8-Nef LL/AA. 25 µg de protéines provenant de cellules HeLa non transfectées ou transfectées avec les plasmides pCN CD8-Stop, pCN CD8-Nef sauvage ou pCN CD8-Nef LL/AA ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 12 %. Après électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF et la protéine CD8 a été détectée par la technique d'ECL-HRP.

3. Mesure de l'activité de plusieurs hydrolases lysosomales :

Après ces mises au point, nos investigations sur les conséquences de l'expression de Nef dans les cellules HeLa ont débuté par la mesure de l'activité enzymatique d'un certain nombre d'hydrolases lysosomales appartenant à différentes classes : des glycosidases (la β -galactosidase, l' α -mannosidase et la β -hexosaminidase) qui sont toutes transportées par la voie des récepteurs au mannose 6 phosphate (MPR); des protéases (les cathepsines B et C) qui suivent la même voie et, enfin, la phosphatase acide et la β -glucocérébrosidase. Ces deux dernières enzymes ont comme particularité d'être synthétisées comme précurseurs membranaires et d'emprunter une voie différente de la voie MPR (Sleat et al., 1996). Tous les

dosages enzymatiques ont été réalisés sur 3 échantillons indépendants par des techniques fluorimétriques sensibles. Ensuite, l'activité calculée en U/ml a été rapportée à la quantité de protéines calculée en mg/ml. Les activités spécifiques sont donc exprimées en U/mg de protéines (Tableau 1). Les résultats montrent que pour chaque enzyme, les valeurs d'activité spécifiques sont très similaires quelque soit le plasmide utilisé pour la transfection.

	pcDNA 3.1.	CD8-Stop	CD8-Nef	CD8-Nef LL/AA
β -galactosidase	1,91 \pm 0,19	1,79 \pm 0,20	1,88 \pm 0,13	1,87 \pm 0,25
β -glucosidase	0,024 \pm 0,001	0,024 \pm 0,002	0,024 \pm 0,003	0,024 \pm 0,004
β -hexosaminidase	1,58 \pm 0,08	1,68 \pm 0,09	1,66 \pm 0,06	1,66 \pm 0,05
α -mannosidase	0,603 \pm 0,004	0,622 \pm 0,021	0,617 \pm 0,021	0,610 \pm 0,021
Cathepsine B	0,569 \pm 0,121	0,640 \pm 0,192	0,671 \pm 0,098	0,716 \pm 0,122
Cathepsine C	1,390 \pm 0,104	1,523 \pm 0,087	1,572 \pm 0,086	1,577 \pm 0,139
Phosphatase acide	17,06 \pm 0,54	17,02 \pm 0,18	17,00 \pm 0,73	16,96 \pm 0,66

Tableau 1. Activités spécifiques de plusieurs hydrolases lysosomales mesurées dans des lysats de cellules HeLa transfectées avec pcDNA 3.1, CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA. Les dosages enzymatiques ont été réalisés 48 h post-transfection. Les valeurs représentent la moyenne \pm un écart-type (n=3) des activités enzymatiques exprimées en U/mg de protéines (où l'unité U correspond à la quantité d'enzyme capable de produire 1 nmole de méthylumbellifénone ou de 7-amino-méthyl-4-coumarin par minute).

Si nous rapportons les activités spécifiques des hydrolases mesurées dans les cellules CD8-Nef sauvage et de CD8-Nef LL/AA aux activités spécifiques mesurées dans les cellules transfectées avec CD8-Stop, nous constatons qu'il n'y a pas de différence significative entre les cellules exprimant CD8-Nef et les cellules contrôles (Figure 10).

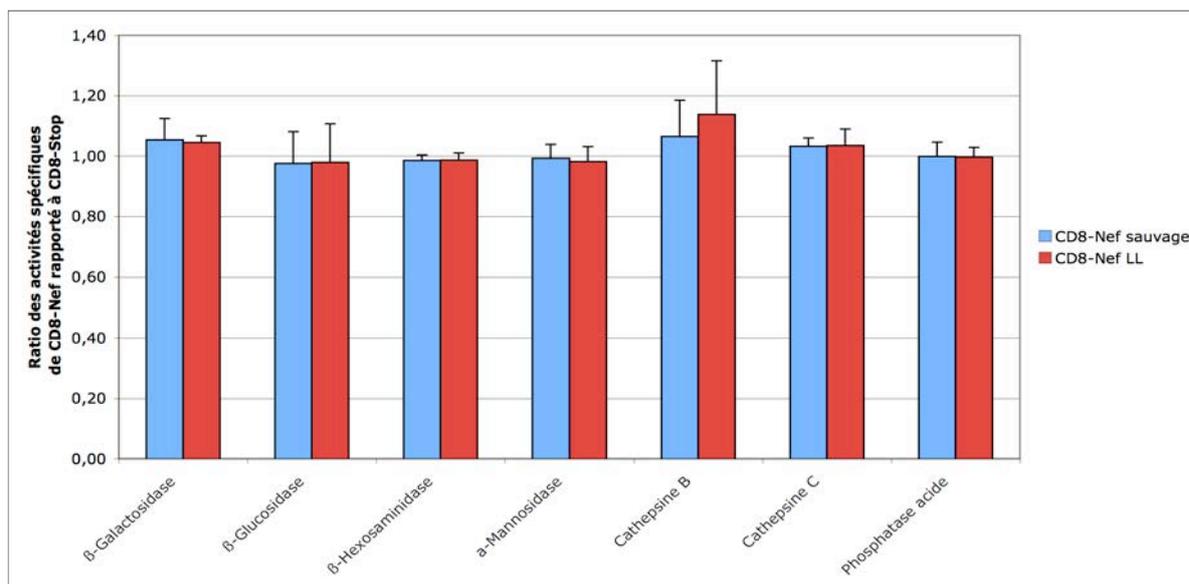


Figure 10. Activités spécifiques de plusieurs hydrolases lysosomales mesurées dans des lysats de cellules HeLa transfectées avec CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA. Les dosages enzymatiques ont été réalisés 48 h post-transfection. Les résultats représentent les activités spécifiques mesurées dans les cellules exprimant CD8-Nef (WT ou L/AA) divisées par les activités spécifiques mesurées dans les cellules exprimant CD8 seul (moyenne \pm un écart-type (n= 3).

Après avoir effectué des dosages enzymatiques sur des lysats cellulaires, nous avons réalisé des Western blots avec des anticorps dirigés contre les cathepsines D ou B afin d'analyser le degré de maturation de ces deux protéines dans des cellules HeLa exprimant Nef par rapport à des cellules contrôles. On sait en effet que ces protéases sont synthétisées sous forme de précurseur puis sont envoyées du réseau trans-Golgien vers les compartiments endo-lysosomaux où elles sont clivées lors de deux étapes successives afin de donner naissance à des protéines matures composées d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère (Mach et al., 1992; Zaidi et al., 2008).

4. Abondance de la cathepsine D:

La cathepsine D est une aspartate protéase de la « superfamille » des pepsines. La biosynthèse de la cathepsine D commence dans le cytoplasme par la synthèse d'une pré-pro-enzyme. Cette pré-pro-enzyme va perdre son peptide signal et acquérir des chaînes d'oligosaccharides sur certains résidus Asn lors de sa translocation à travers la membrane du réticulum endoplasmique, générant ainsi un précurseur inactif de 52kDa. Cette pro-cathepsine D rentre ensuite dans l'appareil de Golgi où les chaînes d'oligosaccharides vont subir de profonds remaniements. Enfin, elle va être transportée vers les compartiments endo/lysosomaux où elle sera clivée une première fois pour donner une chaîne polypeptidique active de taille intermédiaire (48 kDa) puis deux autres fois pour se transformer en une protéine mature constituée d'une chaîne lourde de 34 kDa et d'une chaîne légère de 14 kDa.

Afin d'étudier l'abondance relative de ces 3 formes de cathepsine D (précurseur, intermédiaire et mature) dans des cellules HeLa exprimant ou non Nef, nous avons d'abord appliqué la technique de Western blotting suivie d'une détection des protéines par ECL-Plex. Ce système de détection permet en effet une quantification plus fiable que le système ECL-HRP puisque le signal est linéaire sur une large gamme. Malheureusement, nos premiers essais réalisés sur 25 µg de protéines provenant de lysats totaux ont été décevants. C'est pourquoi nous avons décidé de réessayer sur des fractions enrichies en organites membranaires, obtenues par centrifugation à haute vitesse (3×10^6 g/min) de surnageants postnucléaires (fractions MLP). Sur base de la mesure de l'activité β -galactosidase, nous pouvons dire que ces fractions MLP renferment environ 65 % de lysosomes mais elles renferment également des vésicules dérivant du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi ainsi que des endosomes. Lorsque nous regardons le profil des Western blots obtenus à partir des fractions MLP préparées à partir d'homogénats de cellules HeLa transfectées avec les différents plasmides, nous pouvons observer une bande majeure avec un poids moléculaire apparent proche de 30 kDa, qui correspond à la forme mature de la cathepsine D, ainsi qu'un groupe de bandes mineures présentant une mobilité électrophorétique plus faible (environ 50 kDa) (Figure 11). Ce groupe de bandes à peine visibles correspond probablement aux formes précurseur et intermédiaire de la cathepsine D. C'est donc la forme mature qui prédomine et, à première vue, il n'y a pas de variation d'intensité quelque soit le plasmide utilisé lors des transfections. Afin de vérifier que la même quantité de protéines ait été réellement déposée partout, nous avons hybridé la membrane avec un anticorps dirigé contre Tom40 (pour *Translocase of the Outer Membrane*), une protéine membranaire mitochondriale. Notez que nous avons d'abord essayé de détecter l' α -tubuline mais le signal n'était pas satisfaisant probablement parce que cette protéine cytosquelettique est peu abondante dans les fractions MLP. Une fois le contrôle de charge effectué, nous avons quantifié les bandes de cathepsine D mature et de Tom40. Si on compare les intensités obtenues avec les cellules exprimant CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA par rapport aux intensités obtenues avec les cellules

exprimant CD8-Stop, on obtient 94 et 111 %, respectivement. Ces résultats suggèrent que l'expression de Nef n'a pas d'impact sur l'abondance de la forme mature de la cathepsine D. Nous avons essayé de reproduire ces résultats sur de nouvelles fractions MLP. Cependant, comme la propreté du blot laissait à désirer, nous avons réhybridé la membrane avec les anticorps et détecté la cathepsine D non plus avec le système ECL-Plex mais bien avec le système ECL-HRP. Dans cette expérience, nous avons ajouté un contrôle négatif : une fraction MLP provenant des cellules non transfectées traitées avec du NH₄Cl 10 mM. Le chlorure d'ammonium est une base faible qui s'accumule dans les compartiments endo/lysosomaux et qui augmente leur pH intraluminal. L'alcalinisation des endosomes empêche la dissociation des complexes formés entre les hydrolases et les récepteurs au mannose-6 phosphate et donc inhibe le recyclage des récepteurs. Ce traitement NH₄Cl provoque donc une inhibition du transport de la majorité des hydrolases acides vers les endo/lysosomes avec comme corollaire une augmentation de leur sécrétion dans le milieu extracellulaire (Gonzalez-Noriega et al., 1980). Les résultats de ce Western blot confirment les résultats précédents. C'est la forme mature de 34 kDa qui est de loin la plus abondante (les bandes précurseurs et intermédiaires sont à peine visibles) et il n'y a pas de diminution d'intensité de la forme mature dans les cellules transfectées avec CD8-Nef WT par rapport aux cellules contrôles. Comme attendu, sur la piste des cellules traitées avec le NH₄Cl, nous pouvons observer une nette réduction de l'intensité de la bande de 34 kDa, associée à une augmentation de l'intensité des bandes présentes aux alentours de 50 kDa. Une analyse quantitative, réalisée avec le logiciel NIH Image J, a révélé que les pourcentages de cathepsine D mature dans les fractions MLP des cellules transfectées avec CD8-Nef wt et CD8-Nef LL/AA représentaient 97 et 83 %, respectivement, de la valeur obtenue avec la fraction MLP des cellules transfectées avec CD8-Stop.

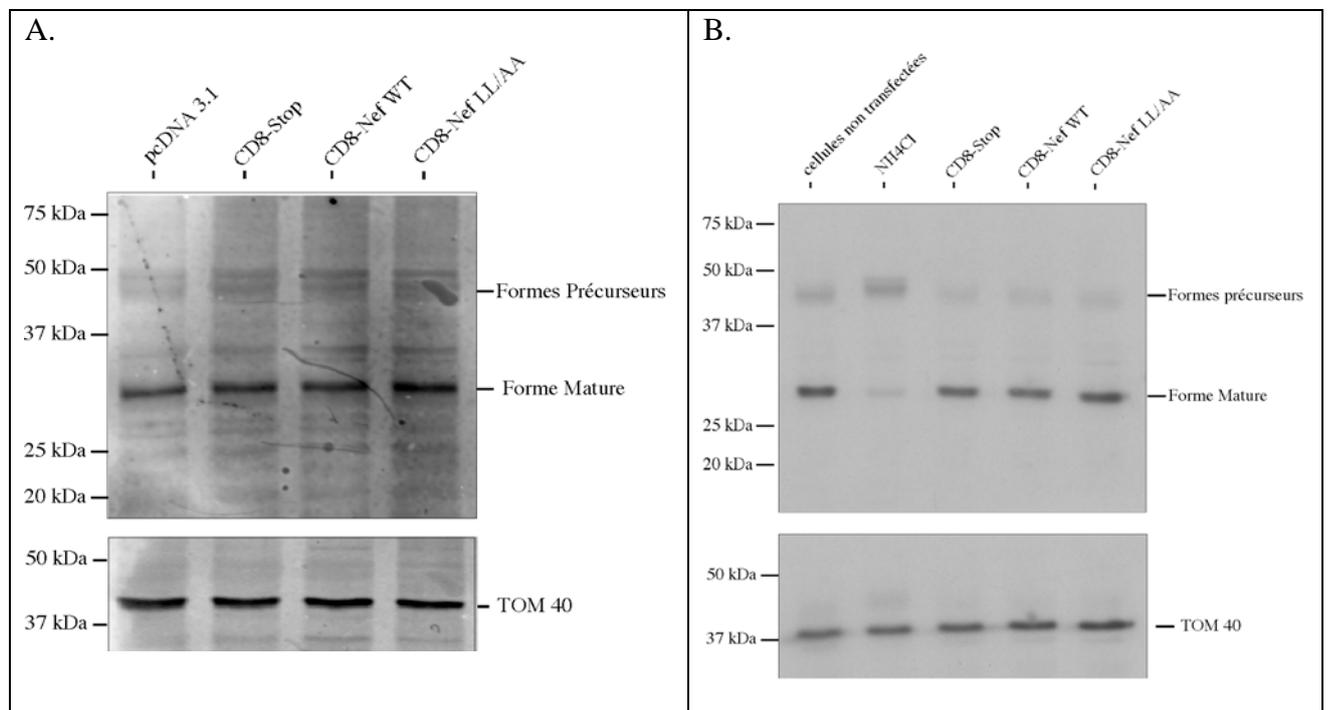


Figure 11 : Abondance de la cathepsine D dans des cellules HeLa non transfectées (traitées ou non avec NH₄Cl 10 mM) ou transfectées transitoirement avec pcDNA 3.1, CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA. 25 µg de protéines provenant de fractions MLP obtenues à partir de cellules HeLa (transfectées ou non) ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 12 % en présence de DTT. Après électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF. La cathepsine D et Tom40 ont été détectées par ECL-Plex (A) ou par ECL-HRP (B).

Prises ensemble, les données de ces 2 expériences de Western blotting suggèrent que dans les cellules HeLa, les formes précurseurs et intermédiaires des protéines cathepsine D nouvellement synthétisées ne s'accumulent pas. Au contraire, elles semblent être rapidement clivées en deux chaînes dont une seule est visible sur ce type de gel. De plus, ces données semblent indiquer que l'expression de Nef sauvage dans les cellules HeLa n'a pas d'influence sur l'abondance de la forme mature de la cathepsine D et donc vraisemblablement pas d'impact majeur sur sa biosynthèse.

5. Abondance de la cathepsine B :

La cathepsine B est une cystéine protéase de la famille des papaines. Elle est synthétisée sous forme de préprocathepsine B. Après clivage du peptide signal et N-glycosylation, la forme précurseur apparaît. Dans les cellules HepG2, cette pro-cathepsine B a un poids moléculaire apparent de 44 kDa. Elle donne ensuite une forme intermédiaire active de 33 kDa qui sera convertie dans les endo/lysosomes en une forme mature, composée d'une chaîne lourde de 24-27 kDa (ces deux formes diffèrent par le degré de N-glycosylation) et une chaîne légère de 5 kDa, généralement invisible sur les gels d'électrophorèse (Mach et al., 1992). Afin d'étudier l'impact de Nef sur l'une ou l'autre étape de la maturation de la cathepsine B, nous avons analysé les mêmes fractions MLP que celles utilisées pour la détection de la cathepsine D.

Sur le Western blot, réalisé en ECL-Plex avec un anticorps anti-cathepsine B, nous pouvons observer 3 fines bandes aux alentours de 45-50 kDa (Figure 12 A). Elles pourraient éventuellement correspondre à des formes précurseurs mais nous pensons qu'il s'agit plutôt de bandes non spécifiques. Nous pouvons aussi observer une bande aux alentours de 40 kDa et une autre, plus intense, aux alentours de 30 kDa. La première correspond très vraisemblablement à la forme intermédiaire tandis que la seconde correspond à la chaîne lourde de la forme mature. De façon intéressante, l'intensité de la forme mature de la cathepsine B semble plus faible dans les cellules transfectées avec CD8-Nef WT qu'avec les cellules transfectées avec pcDNA 3.1, CD8-Stop et CD8-Nef LL/AA. En calculant le pourcentage de forme mature par rapport à la somme de la forme mature et la forme intermédiaire, nous obtenons 76 %, 76 %, 67 % dans les cellules exprimant respectivement, CD8-Stop, CD8-Nef WT et CD8-Nef LL/AA.

Une deuxième expérience de Western blotting a été réalisée sur une autre série d'échantillons. Après une tentative décevante de détection en ECL-Plex, nous avons essayé une détection de la cathepsine B par chemiluminescence classique (ECL-HRP) (Figure 12 B). Nous retrouvons à peu près le même profil que dans la première expérience : un triplet à 45 ka, une bande intermédiaire de 35 kDa et une bande plus intense de 30 kDa correspond à la forme mature. Comme attendu, dans les cellules traitées avec le chlorure d'ammonium, la forme mature est à peine visible et, au contraire, on voit apparaître deux bandes de mobilité électrophorétique inférieure à celle du triplet détecté dans les autres conditions. La bande d'environ 45 kDa pourrait correspondre à la forme précurseur de la cathepsine B. Par contre, il nous est impossible d'identifier la bande de 52 kDa.

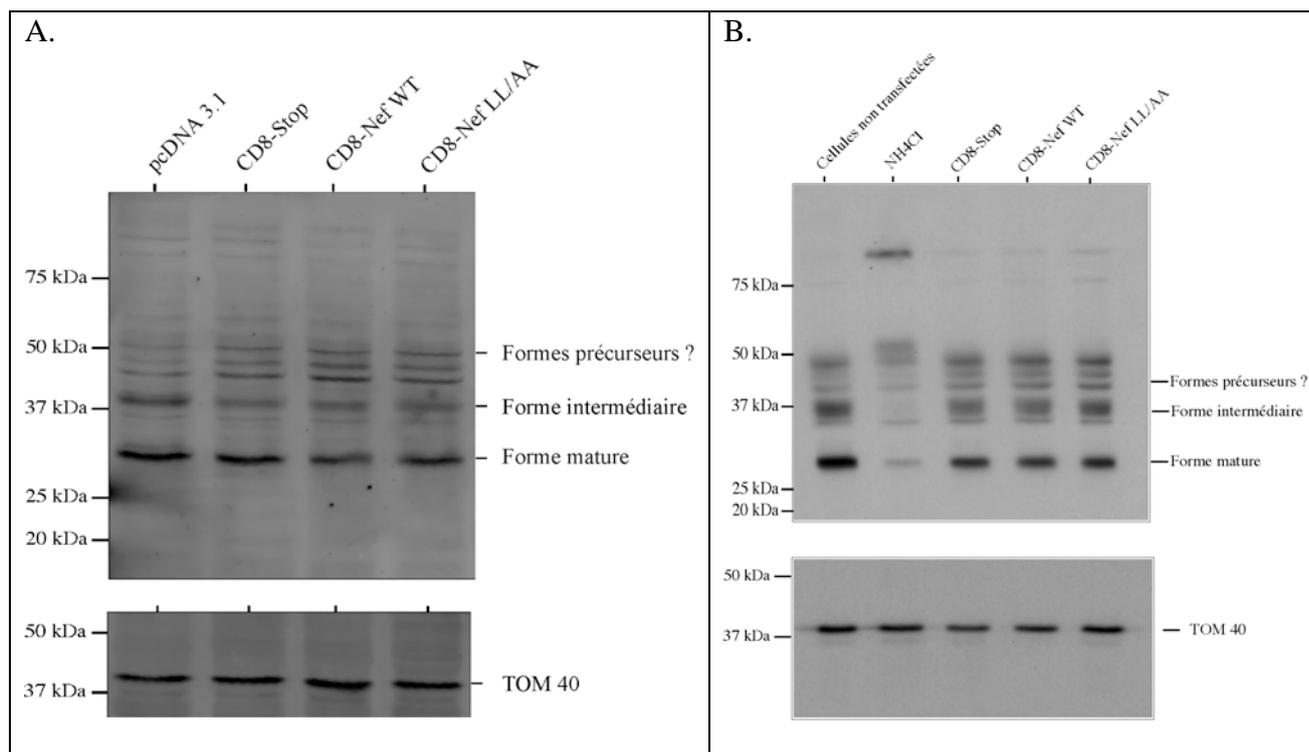


Figure 12 : Abondance de la cathepsine B dans des cellules HeLa non transfectées (traitées ou non avec NH_4Cl 10 mM) ou transfectées transitoirement avec pcDNA 3.1, CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA. 25 μg de protéines provenant de fractions MLP obtenues à partir de cellules HeLa (transfectées ou non) ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 12 % en présence de DTT. Après électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF. La cathepsine B et Tom40 ont été détectées par ECL-Plex (A) ou par ECL-HRP (B).

Pour les quantifications, nous n'avons pas tenu compte des triplets qui correspondent probablement à des bandes non spécifiques. La différence de poids moléculaire entre les bandes observées dans cette région avec les cellules traitées avec NH_4Cl et les triplets observés en absence de traitement supporte cette hypothèse. Dès lors, si nous comparons le pourcentage de forme mature par rapport à la somme des formes intermédiaires et matures, nous obtenons 66 %, 64 %, 55 % dans les cellules transfectées avec CD8-Stop, CD8-Nef WT et CD8-Nef LL/AA, respectivement.

Comme l'expérience n'a été menée que 2 fois, nous ne pouvons pas dire si oui ou non l'expression de Nef perturbe le transport et la maturation de la cathepsine B. Cependant, le fait qu'il n'y ait pas de diminution évidente de l'abondance des formes matures des cathepsines B et D en Western blot ne signifie pas que Nef n'affecte pas le transport des protéines nouvellement synthétisées.

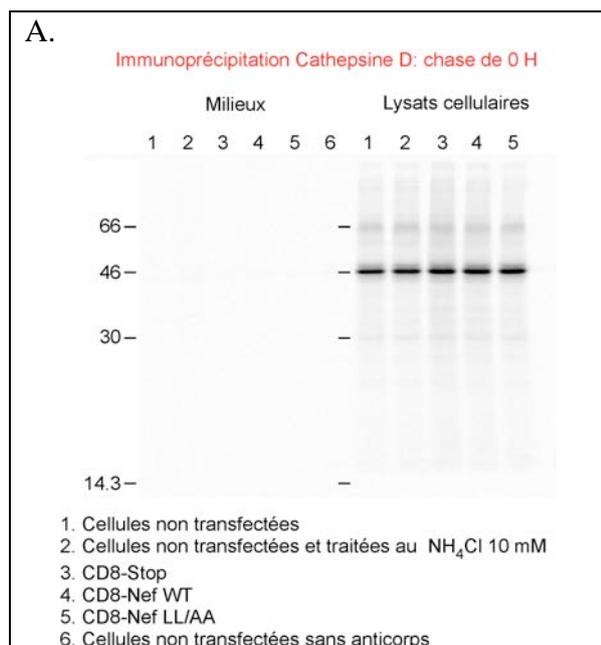
6. Cinétique de maturation de la cathepsine D :

Afin de déterminer si l'expression de Nef retardait le transport et la maturation des molécules de cathepsine D néosynthétisées, nous avons réalisé une cinétique de marquage métabolique avec du Tran³⁵S label, un extrait bactérien de méthionine et de cystéine marquées avec du S35. Ensuite, nous avons immunoprécipité la cathepsine D dans les milieux de culture ainsi que dans les lysats de cellules HeLa non transfectées (traitées ou non avec du NH₄Cl 10 mM) et de cellules transfectées avec les constructions CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA. Concrètement, après une période d'une heure de jeûne, les cellules ont été marquées pendant 1 heure avec 25 µCi/ml de Tran³⁵S label. Ensuite, elles ont été incubées pendant des temps de chasse de 0, 4, 8, 16 et 30 h afin de permettre la maturation des protéines néosynthétisées. A l'issue de cette période de chasse, les milieux de culture (8 ml) ont été récoltés afin d'évaluer le taux de sécrétion de la forme précurseur de la cathepsine D. Ce test est important car on peut s'attendre à une sécrétion accrue des précurseurs des hydrolases acides lorsque les complexes AP-1 ne peuvent pas exercer leur fonction (Meyer et al., 2000). Enfin, les cellules ont été rincées puis lysées dans 700 µl de PBS contenant du Triton X-100 2% et des inhibiteurs de protéases.

Après la collecte des échantillons, nous avons réalisé des immunoprécipitations sur 1 ml de milieu de culture ou sur le lysat total en ajoutant 2.5 µg d'anticorps anti-cathepsine D (R&D Systems) et 25 µl de billes magnétiques couplées à la protéine G. Pour nous assurer de la spécificité des bandes immunoprécipitées avec l'anticorps, nous avons chaque fois effectué un contrôle négatif sans anticorps.

Sur le gel d'autoradiographie obtenu après 1 h de marquage et 0 h de chasse, nous ne pouvons observer qu'une seule bande à 46 kDa et uniquement dans les lysats cellulaires (Figure 13 A). Il s'agit plus que probablement de la forme précurseur de la cathepsine D. Comme attendu, dans ces conditions de marquage, la forme mature n'est pas décelable dans les lysats cellulaires. On sait en effet qu'il faut environ 2 h aux précurseurs de la cathepsine D pour atteindre les compartiments endo/lysosomaux. Après 1 h de marquage, il est vraisemblable que les premiers précurseurs radiomarqués arrivent seulement dans l'appareil de Golgi. Cela explique aussi pourquoi nous ne détectons pas de forme précurseur dans le milieu de culture même en présence de NH₄Cl.

La quantification de l'intensité des bandes avec le logiciel Optiquant confirme notre première impression : il n'y a pas de différence d'abondance de la pro-cathepsine D dans les cellules transfectées avec CD8-Nef WT par rapport aux cellules transfectées avec CD8-Stop (Figure 13 B).



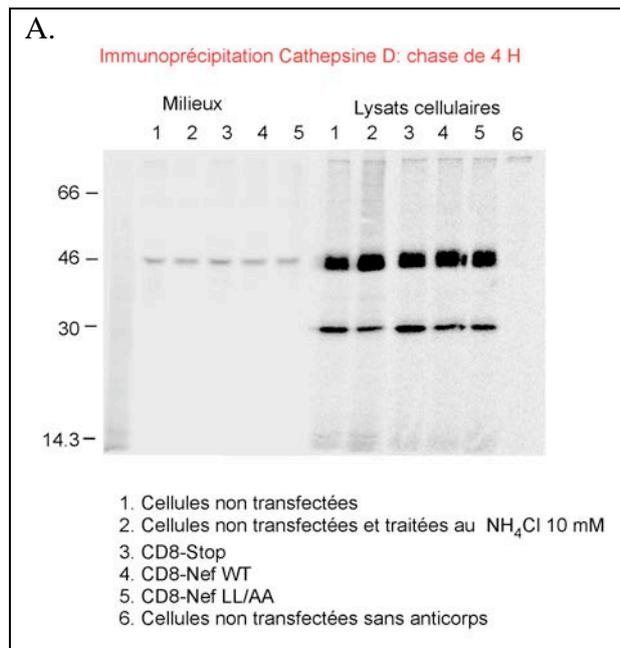
B.

	Milieux	Lysats cellulaires			
	Précurseur	Préc/Interm	Mature	Somme	%
Non transfectées	0	594.994	0	594.994	0
NH_4Cl	0	664.383	0	664.383	0
CD8-Stop	0	831.698	0	831.698	0
CD8-Nef WT	0	793.085	0	793.085	0
CD8-Nef LL/AA	0	734.313	0	734.313	0

Figure 13 : Cinétique de maturation de la cathepsine D. (A.) Des cellules HeLa non transfectées (traitées ou non avec du NH_4Cl) ou transfectées transitoirement avec CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA, ont été marquées métaboliquement en présence de $25 \mu\text{Ci/ml}$ de Tran^{35}S label. Juste après cette période de marquage, les milieux de culture ont été collectés et les cellules lysées dans du PBS/Triton X-100 2 %. La cathepsine D a ensuite été immunoprécipitée avec $2,5 \mu\text{g}$ d'anticorps anti-cathepsine D (R&D Systems) et $25 \mu\text{l}$ de billes magnétiques couplées à la protéine G. Enfin, les protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 12 % en présence de DTT et la cathepsine D a été détectée par autoradiographie à l'aide d'un scanner (Cyclone, Packard). (B). La quantification de l'intensité des bandes présentes dans les lysats cellulaires a été réalisée à l'aide du logiciel Optiquant.

Après 4 h de chase, nous pouvons noter l'apparition dans les milieux de culture d'une bande aux alentours de 46 kDa (Figure 14 A). Elle correspond à la forme précurseur, sécrétée dans le milieu de culture. Selon la littérature, le pourcentage de sécrétion en absence de tout traitement est de l'ordre de 5 à 15 % dans des fibroblasts humains (Gieselmann et al., 1985). Quelque soient les conditions, nous n'observons pas d'augmentation d'intensité, même, ce qui est curieux, dans le milieu de culture des cellules incubées en présence de NH_4Cl . Dans les lysats cellulaires, nous pouvons découvrir la présence de deux bandes quelque soit le traitement. L'une forme un doublet et se trouve aux alentours de 46 kDa et l'autre présente un poids moléculaire apparent d'environ 30 kDa. Le doublet correspond aux formes précurseur et intermédiaire tandis que la bande de plus grande mobilité électrophorétique correspond à la forme mature de la cathepsine D. Dans les cellules traitées avec le NH_4Cl , la forme mature paraît être moins abondante que dans les autres conditions. Connaissant l'effet négatif du NH_4Cl sur le transport des hydrolases lysosomales, ce n'est pas surprenant. Cependant, nous nous attendions à une inhibition complète de la maturation de la cathepsine D. La quantification de l'intensité des différentes bandes de la cathepsine D nous a permis de

calculer le pourcentage de la forme mature dans chaque condition, en effectuant le ratio entre l'intensité de la bande correspondant à la forme mature et la somme des 3 bandes. Comme les chiffres le montrent, nous constatons une diminution du pourcentage de forme mature de la cathepsine D dans les cellules transfectées avec CD8-Nef WT (27,6 %) par rapport aux cellules transfectées avec CD8-Stop (37,5 %). Quoique faible, cette différence pourrait être potentiellement intéressante. Malheureusement, nous observons le même pourcentage avec les cellules transfectées avec CD8-Nef LL/AA (27,5 %). Autrement dit, si Nef ralentit quelque peu la maturation de la cathepsine D, ce serait par un mécanisme indépendant du motif dileucine.



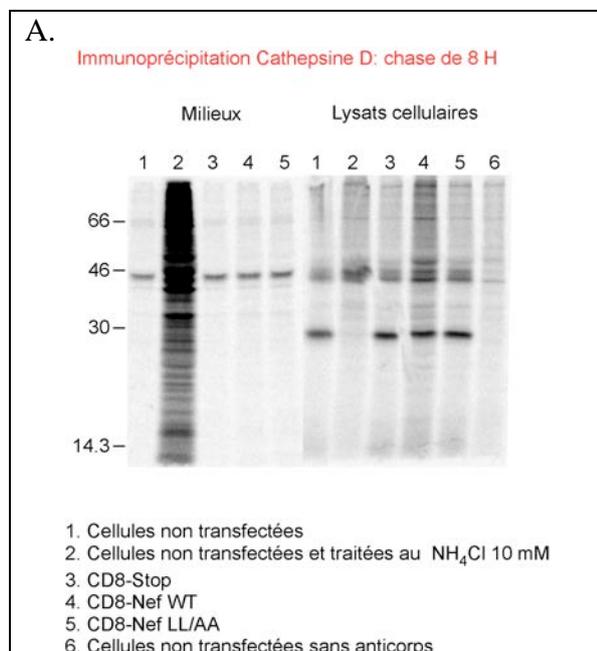
B.

B.	Milieux	Lysats cellulaires			
	Précurseur	Préc/Interm	Mature	Somme	%
Non transfectées	471.874	2.204.064	1.250.750	3.454.814	36,0
NH_4Cl	483.615	4.232.587	791.138	5.023.725	15,7
CD8-Stop	629.275	2.325.209	1.396.683	3.721.892	37,5
CD8-Nef WT	533.167	2.504.537	952.445	3.456.982	27,6
CD8-Nef LL/AA	550.654	2.129.296	808.048	2.937.344	27,5

Figure 14 : Cinétique de maturation de la cathepsine D. (A.) Des cellules HeLa non transfectées (traitées ou non avec du NH_4Cl) ou transfectées transitoirement avec CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA, ont été marquées métaboliquement en présence de $25 \mu\text{Ci/ml}$ de Tran^{35}S label. Après une période de chase de 4h, les milieux de culture ont été collectés et les cellules ont été lysées dans du PBS/Triton X-100 2 %. La cathepsine D a ensuite été immunoprécipitée avec $2,5 \mu\text{g}$ d'anticorps anti-cathepsine D (R&D Systems) et $25 \mu\text{l}$ de billes magnétiques couplées à la protéine G. Enfin, les protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 12 % en présence de DTT et la cathepsine D a été détectée par autoradiographie à l'aide d'un scanner (Cyclone, Packard). (B.) La quantification de l'intensité des bandes présentes dans les milieux de culture et dans les lysats cellulaires a été réalisée à l'aide du logiciel Optiquant.

Par rapport au temps de chase de 4h, après 8h d'incubation en absence de méthionine radioactive, nous constatons une augmentation de l'abondance de la pro-cathepsine D dans les milieux de culture (Figure 15 A). Cependant, il ne semble pas y avoir de différence entre les cellules qui expriment CD8-Nef (sauvage ou muté) et CD8-Stop. Dans les lysats cellulaires, nous pouvons constater que, dans toutes les conditions analysées, excepté dans les cellules non transfectées et traitées avec le NH_4Cl , il y a une diminution de l'abondance des formes

précurseurs et intermédiaires (46 kDa) avec une augmentation concomitante de l'abondance des formes matures (30 kDa). Dans les cellules incubées en présence de chlorure d'ammonium, la bande mature est à peine visible. Malheureusement, pour une raison technique qui nous échappe, nous ne pouvons pas vérifier si l'inhibition de la maturation de la cathepsine D s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion parce que le bruit de fond dans cette deuxième piste est trop élevé. Quand on compare l'intensité de la forme mature dans les lysats cellulaires, il ne semble pas y avoir de différence entre les cellules transfectées avec CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA. Toutefois, si nous examinons les chiffres obtenus après quantification avec le logiciel Optiquant, nous constatons que le pourcentage de maturation de la cathepsine D est réduite de 26 % dans les cellules exprimant CD8-Nef WT par rapport aux cellules qui expriment CD8-Stop. Cette différence est probablement due au bruit de fond présent dans cette piste. De plus, nous n'avons aucune certitude sur l'identité des 3 bandes de 46 kDa parce qu'elles sont visibles également en absence d'anticorps. Enfin, si nous comparons uniquement les valeurs d'intensité de la forme mature dans les 3 conditions, nous constatons une légère augmentation dans les cellules exprimant CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA par rapport aux cellules exprimant CD8-Stop (Figure 15 B).



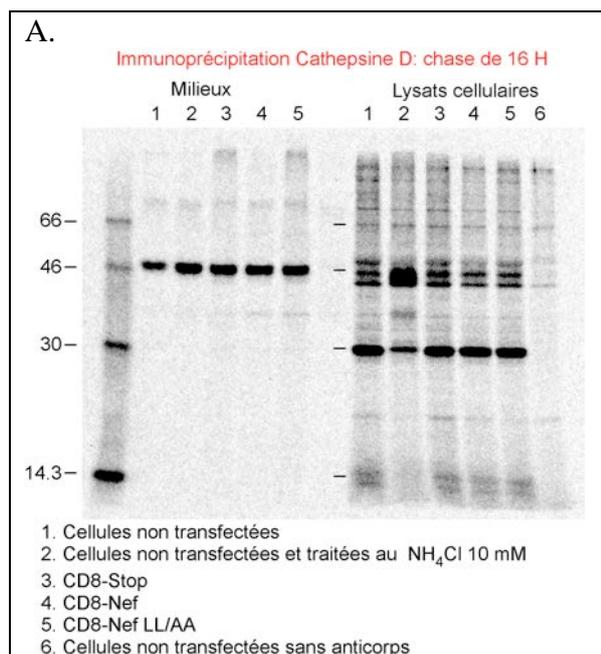
B.	Milieux	Lysats cellulaires			
	Précurseur	Préc/Interm	Mature	Somme	%
Non transfectées	481.577	528.390	1.172.487	1.700.877	69,0
NH ₄ Cl	Pas réalisé	2.260.551	120.741	2.381.292	5,0
CD8-Stop	540.179	924.268	1.472.618	2.396.886	61,0
CD8-Nef WT	550.575	3.297.784	1.800.689	5.098.473	35,0
CD8-Nef LL/AA	588.569	1.418.064	1.765.638	3.183.702	55,0

Figure 15 : Cinétique de maturation de la cathepsine D. A. Des cellules HeLa non transfectées (traitées ou non avec du NH₄Cl) ou transfectées transitoirement avec CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA, ont été marquées métaboliquement en présence de 25 µCi/ml de Tran³⁵S label, 48 h post-transfection. Après une période de chase de 8h, les milieux de culture ont été collectés et les cellules ont été lysées dans du PBS/Triton X-100 2%. La cathepsine D a ensuite été immunoprécipitée avec 2,5 µg d'anticorps anti-cathepsine D (R&D Systems) et 25 µl de billes magnétiques couplées à la protéine G. Enfin, les protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 12 % en présence de DTT et la cathepsine D a été détectée par autoradiographie à l'aide d'un scanner (Cyclone, Packard). (B). La quantification de l'intensité des bandes présentes dans les milieux de culture et dans les lysats cellulaires a été réalisée à l'aide du logiciel Optiquant.

Au temps de chasse de 16h, la quantité de formes précurseurs dans le milieu de culture augmente dans les cellules incubées en présence de NH_4Cl par rapport aux cellules contrôles (Figure 16 A). Dans les cellules transfectées, la quantité de formes précurseurs se situe entre les deux et il ne semble pas y avoir d'augmentation de la sécrétion de la pro-cathepsine D par les cellules exprimant CD8-Nef.

Dans les lysats cellulaires, dans la région proche de 45 kDa, à l'exception des cellules traitées avec le chlorure d'ammonium où nous observons une bande épaisse (doublet ?), nous détectons une triade de bandes bien nettes. Bien qu'elle n'apparaisse que faiblement en absence d'anticorps, nous nous interrogeons sur leur spécificité parce que premièrement, des bandes similaires étaient déjà apparues sur les Western blots réalisés avec l'anticorps anti-cathepsine D et deuxièmement, si nous tenons compte de leur intensité, nous obtenons des pourcentages de maturation de la cathepsine D inférieurs à ceux calculés après 8 h de chasse. Par ailleurs, si nous nous penchons sur les valeurs d'intensité des bandes de 30 kDa correspondant à la chaîne lourde de la cathepsine D, nous n'obtenons pas de différence entre les cellules exprimant CD8-Nef WT et les cellules exprimant CD8-Stop (645.038 et 660.110 pixels, respectivement). Enfin, nous enregistrons une légère diminution dans les cellules exprimant CD8-Nef LL/AA (459.654) et, comme attendu, une diminution plus nette de la forme mature dans les lysats des cellules incubées en présence de NH_4Cl . Notez que des résultats similaires ont été observés après un temps de chasse de 30h (Résultats non montrés).

Nous avons également réalisé des tests d'immunoprécipitation de la cathepsine B. Malheureusement, les anticorps que nous avons testés (Calbiochem IM27 L et R&D Systems AF 953) ne permettent pas d'immunoprécipiter la forme mature de la cathepsine B. Vu les résultats des Western blots, cela vaudrait la peine de réessayer avec un autre anticorps.



B.

	Milieux	Lysats cellulaires			
	Précurseur	Préc/Interm	Mature	Somme	%
Non transfectées	256.651	1.295.512	973.533	2.269.045	42,9
NH ₄ Cl	1.174.243	2.178.092	901.155	3.079.247	29,0
CD8-Stop	639.116	511.891	660.110	1.172.001	56,3
CD8-Nef WT	640.554	451.050	645.038	1.096.088	58,8
CD8-Nef LL/AA	484.087	305.126	459.654	764.781	60,1

Figure 16 : Cinétique de maturation de la cathepsine D. A. Des cellules HeLa non transfectées (traitées ou non avec du NH₄Cl) ou transfectées transitoirement avec CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA, ont été marquées métaboliquement en présence de 25 µCi/ml de Tran³⁵S label. Après une période de chase de 16h, les milieux de culture ont été collectés et les cellules ont été lysées dans du PBS/Triton X-100 2%. La cathepsine D a ensuite été immunoprécipitée avec 2,5 µg d'anticorps anti-cathepsine D (R&D Systems) et 25 µl de billes magnétiques couplées à la protéine G. Enfin, les protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 12 % en présence de DTT et la cathepsine D a été détectée par autoradiographie à l'aide d'un scanner (Cyclone, Packard). (B). La quantification de l'intensité des bandes présentes dans les milieux de culture et dans les lysats cellulaires a été réalisée à l'aide du logiciel Optiquant.

7. Abondance des protéines membranaires LAMP-1 et LAMP-2 :

Après avoir analysé l'impact de Nef sur le transport et la maturation des hydrolases acides, nous nous sommes intéressés aux deux protéines membranaires lysosomales les plus abondantes : LAMP-1 et LAMP-2. Ce sont des protéines transmembranaires contenant un grand domaine luminal fortement glycosylé, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique renfermant les motifs d'adressage aux lysosomes. La glycosylation peut représenter jusqu'à 60 % de la masse totale des protéines (Eskelinen et al., 2003).

Regardons d'abord les résultats obtenus avec LAMP-1 sur des fractions MLP de cellules non transfectées (traitées ou non avec du NH₄Cl) ou de cellules transfectées transitoirement avec CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA (Figure 17A). Nous observons deux bandes plus ou moins diffuses présentant toutes deux un poids moléculaire apparent légèrement inférieur à 100 kDa, conformément aux valeurs publiées dans la littérature (Fukuda, 1991).

Pour cette expérience, comme nous avons utilisé un gel d'acrylamide de 8%, nous ne pouvions pas utiliser Tom40 comme contrôle de charge. Nous avons donc choisi de détecter une autre protéine mitochondriale, mt Hsp70 (*Heat shock protein 70*) qui, comme son nom l'indique, a un poids moléculaire de 70 kDa.

Comme attendu, il n'y a pas de différence dans l'abondance de LAMP-1 entre les cellules traitées et non traitées avec le chlorure d'ammonium (Figure 17 A). Il est en effet connu que cette base faible perturbe le trafic intracellulaire des hydrolases lysosomales mais pas des protéines membranaires lysosomales. La quantification de l'intensité des bandes montre que dans les cellules transfectées avec CD8-Nef WT, l'abondance de LAMP-1 est diminuée de 7 % par rapport aux cellules transfectées avec CD8-Stop. Par contre, il y a une légère augmentation de 8 % dans les cellules transfectées avec CD8-Nef LL/AA par rapport à CD8-Nef WT. Etant donné que la diminution est tellement faible et que de surcroît, l'expérience a été réalisée en ECL classique (ECL-HRP), il faudrait évidemment refaire des expériences avant de pouvoir tirer des conclusions sur l'impact éventuel de Nef sur le trafic intracellulaire de LAMP-1. Néanmoins, ce résultat préliminaire constitue peut-être une piste à développer.

En ce qui concerne LAMP-2, nous obtenons une bande moins étalée que pour LAMP-1. Curieusement, nous constatons une diminution de l'abondance de LAMP-2 dans les cellules transfectées par rapport aux cellules non transfectées que ce soit en présence ou en absence de NH₄Cl. Ce résultat mériterait aussi qu'on s'y attarde mais cela sort du cadre de ce mémoire. Maintenant, si nous examinons l'intensité de la bande correspondant à LAMP-2 dans les cellules transfectées, nous n'observons pas de diminution dans les cellules exprimant CD8-Nef WT par rapport aux cellules exprimant CD8-Stop. Au contraire, il y a même une légère augmentation (+ 6 %) et elle apparaît également dans les cellules transfectées avec CD8-Nef LL/AA (+ 9 %).

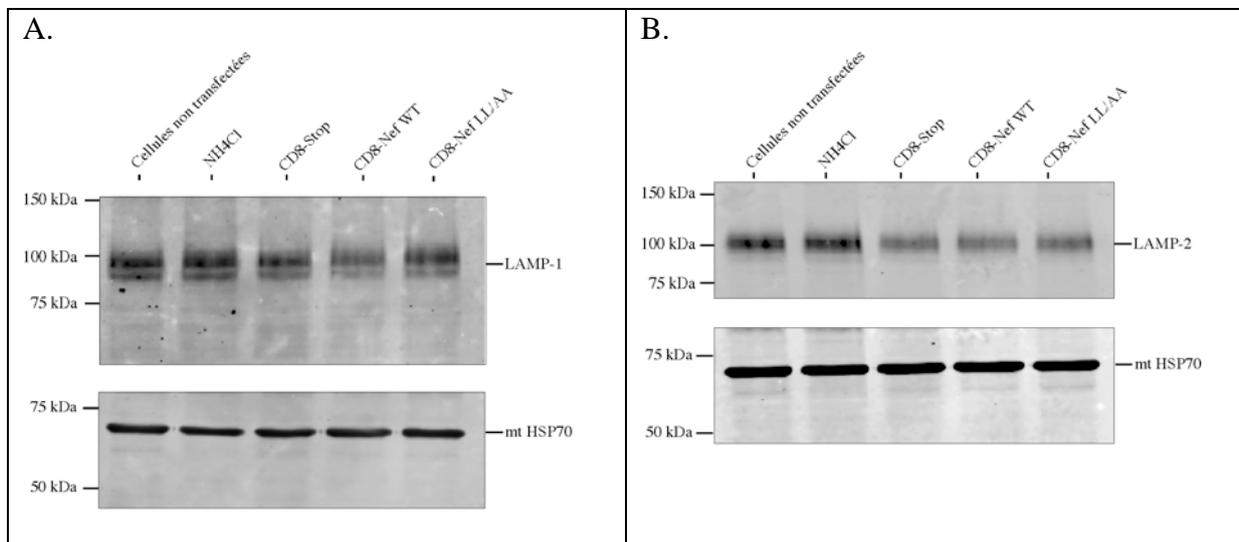


Figure 17 : Abondance des protéines LAMP-1 (A) et LAMP-2 (B) dans des fractions MLP provenant de cellules HeLa non transfectées (traitées ou non avec NH₄Cl 10 mM) ou transfectées transitoirement avec CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA. Les fractions MLP ont été préparées 48 h post-transfection. 25 µg de protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 8 % en présence de DTT. Après électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF. Les protéines LAMP-1 ont été détectées par ECL- HRP tandis que les protéines LAMP-2 et mtHSP70 ont été détectées par ECL- Plex.

8. Impact éventuel de Nef sur le transport des protéines lysosomales dans des cellules HEK 293T :

A ce stade de notre projet, nous avons fait le bilan de tous les résultats obtenus avec les cellules HeLa. Nous nous sommes demandé si l'absence de différence significative enregistrée dans les dosages enzymatiques, les Western blottings, les marquages métaboliques entre les cellules transfectées avec CD8-Nef sauvage et les cellules transfectées avec CD8-Stop, n'était pas due à une trop faible expression des protéines hybrides. Aussi avons-nous décidé de refaire un certain nombre d'expériences sur des cellules HEK 293T, qui ont la réputation de se transfecter très facilement. Pour nous rassurer, nous avons quand même évalué, par cytométrie de flux, le pourcentage de cellules fluorescentes après transfection avec la construction Nef-GFP en présence de Fugène 6.

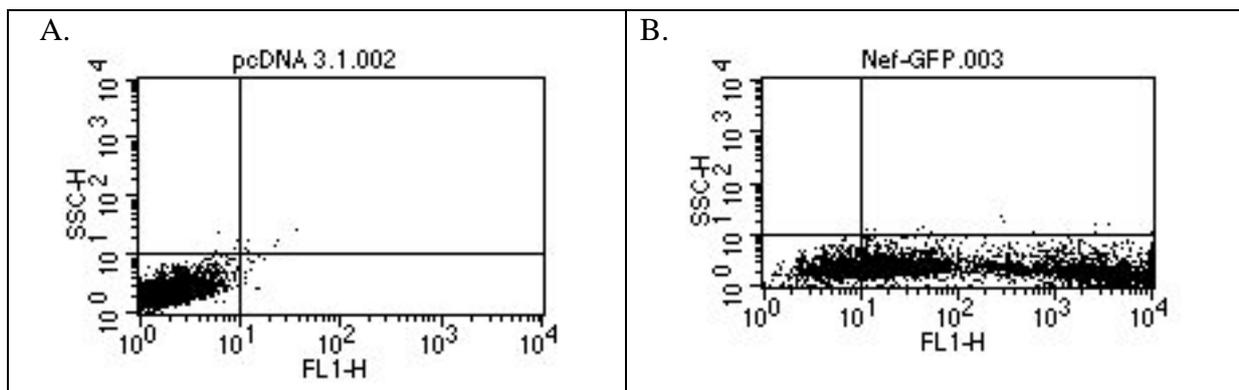


Figure 18 : Analyse en cytométrie de flux des cellules HEK 293T transfectées avec pcDNA 3.1 (A) ou avec Nef-GFP (B). Les cellules ont été trypsinisées, lavées et resuspendues dans du PBS/BSA avant analyse avec un cytomètre de flux de type FACSCalibur.

Sans surprise, nous avons obtenu 84.7 % alors que, pour rappel, nous avons obtenu maximum 50 % de cellules HeLa fluorescentes. Par conséquent, en passant des cellules HeLa aux cellules HEK 293T, nous augmentons la probabilité d'observer un effet éventuel de Nef sur le trafic des protéines lysosomales. Notez que les cellules HEK 293T ont déjà été utilisées par le passé pour démontrer l'impact de Nef sur le trafic intracellulaire (Laguette et al., 2009 ; Kyei et al., 2008 ; Qi et al., 2007 ; Coleman et al., 2006 ; Coleman et al., 2005 ; Zheng et al., 2003). Nous avons commencé nos investigations en mesurant l'activité spécifique de deux hydrolases acides.

8.1. Mesure de l'activité enzymatique des hydrolases lysosomales (HEK 293T) :

Nous avons mesuré l'activité spécifique de la β -galactosidase et de la cathepsine B (c'est-à-dire une glycosidase et une protéase, respectivement) sur des lysats de cellules transfectées avec CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence notable de ces activités enzymatiques parmi ces différentes populations cellulaires (Tableau 2).

	CD8-Stop	CD8-Nef	CD8-Nef LL/AA
β -galactosidase	3,01	2,89	2,93
Cathepsine B	0,27	0,32	0,33

Tableau 2. Activités spécifiques de la β -galactosidase et de la cathepsine B sur des lysats de cellules HEK 293T transfectées avec CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA. Les valeurs représentent la quantité de méthylumbellifère (β -galactosidase) ou d'amidométhylcoumarin (cathepsine B) produite par min divisée par la quantité de protéines et sont exprimées en U/mg protéines.

8.2. Abondance des cathepsines D et B (HEK 293 T) :

Après avoir mesuré l'activité spécifique de deux hydrolases lysosomales, nous avons examiné l'abondance de la cathepsine D sur des lysats totaux de cellules HEK 293T transfectées avec l'un des 3 plasmides habituels en utilisant l' α -tubuline comme contrôle de charge (Figure 19 A). Comme le montre le Western blot (Figure 19 A), seule la forme mature de la cathepsine D est visible (bande à 30 kDa). Cependant, il n'y a pas de différence d'abondance de cette enzyme dans les cellules exprimant CD8-Nef WT, CD8-Nef LL/AA ou CD8-Stop.

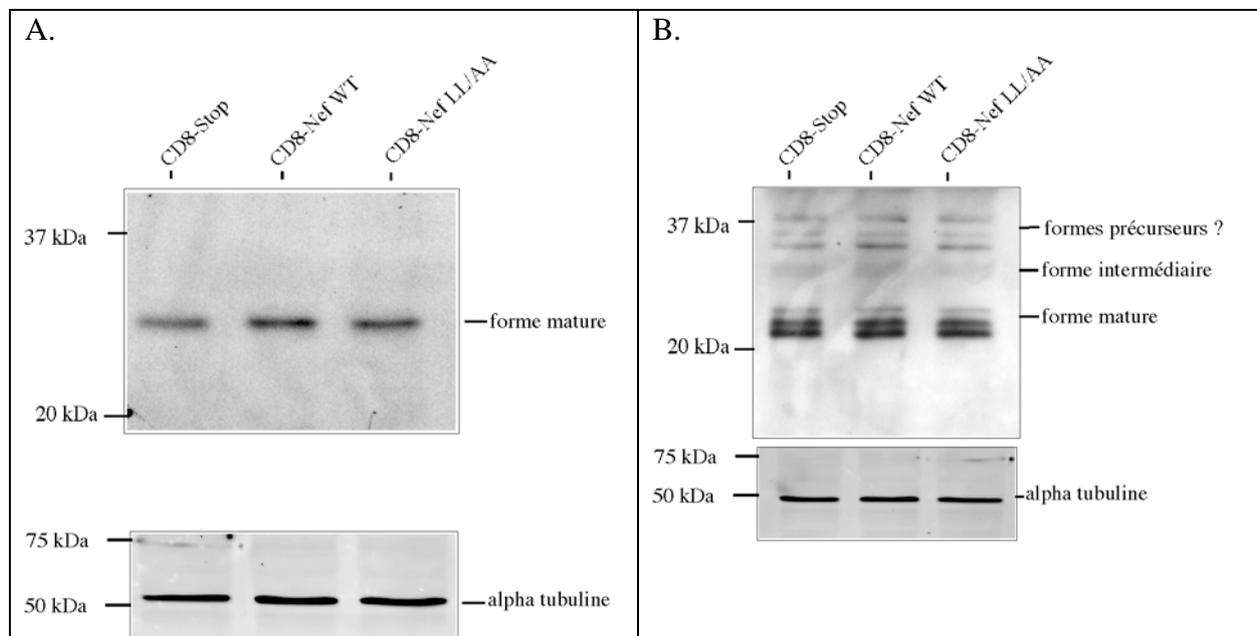


Figure 19 : Abondance de la cathepsine D (A) et de la cathepsine B (B) dans des cellules HEK 293T exprimant CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA. Les fractions MLP ont été préparées 48 h post-transfection. 25 μ g de protéines provenant de lysats totaux ont été chargées sur un gel SDS-PAGE 12 % en présence de DTT. Après électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF. A. La cathepsine D et l' α -tubuline ont été détectées par ECL-HRP. B. La cathepsine B et l' α -tubuline ont été détectées par ECL-HRP et ECL-Plex, respectivement.

Nous avons également testé l'abondance de la cathepsine B. Sur le Western blot (Figure 19 B), nous observons 3 bandes, probablement non spécifiques, entre 35 et 37 kDa (voir discussion plus haut) puis une bande à peine visible à 30 kDa (probablement la forme intermédiaire) et, enfin, un triplet avec 2 bandes majeures autour de 25 kDa. Ce triplet correspond à la forme mature de la cathepsine B. On sait en effet, que dans certaines lignées cellulaires, l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde de la cathepsine B est clivée (Schmid et al., 1999). Comme en témoigne le Western blot réalisé avec l'anticorps anti- tubuline, la quantité de protéines chargées est bien la même partout. Dès lors, nous pouvons conclure que l'expression de Nef sauvage n'a pas d'effet sur l'abondance de la cathepsine B mature, même sur les cellules HEK 293T qui expriment deux fois plus de protéines chimériques que les cellules HeLa.

8.3. Abondance des protéines LAMP-1 et LAMP-2 (HEK 293 T) :

Nous avons décidé de tester l'abondance des protéines LAMP-1 et -2 sur des lysats de cellules HEK 293T transfectées avec les plasmides CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA. Comme dans les cellules HeLa, la bande correspondant à LAMP-1 est diffuse (Figure 20 A). C'est dû à la présence de nombreuses chaînes d'oligosaccharides sur le core de la protéine. Ici aussi, nous constatons une diminution de l'abondance de LAMP-1 dans les cellules transfectées avec CD8-Nef WT par rapport aux cellules transfectées avec CD8-Stop ou CD8-Nef LL/AA. Toutefois, il y a aussi moins de protéines chargées sur cette piste. Lorsque nous rapportons l'intensité de LAMP-1 sur l'intensité du α -tubuline, il reste malgré tout une légère réduction de la quantité de LAMP-1 dans les cellules exprimant CD8-Nef WT (- 17 %) par rapport aux cellules exprimant CD8-Stop. En revanche, dans les cellules exprimant CD8-Nef LL/AA, l'abondance de LAMP-1 est équivalente à celle mesurée dans les cellules contrôles (+ 2 %).

Pour rappel, dans les cellules HeLa, nous avons obtenu une diminution de 7 % dans les cellules exprimant CD8-Nef WT par rapport aux cellules exprimant CD8-Stop. Comme le pourcentage de cellules transfectées est plus élevé dans les cellules HEK 293T par rapport aux cellules HeLa, nous pouvions espérer un effet plus marqué de l'expression de Nef sur l'abondance de LAMP-1. Bien sûr, cette expérience n'a été faite qu'une seule fois mais elle mériterait d'être refaite et, le cas échéant, de réaliser des expériences plus pointues pour voir si l'expression n'interfère quand même pas avec le trafic intracellulaire de LAMP-1.

En ce qui concerne LAMP-2, nous ne décelons pas de différence d'abondance quelque soit le plasmide utilisé (Figure 20 B). Cela pourrait paraître surprenant que Nef interfère avec le trafic intracellulaire de LAMP-1 et pas celui de LAMP-2. Toutefois, il a été montré que LAMP-2 pouvait être directement acheminé du TGN vers les lysosomes, en empruntant des vésicules décorées de complexes AP-4 mais contenant peu de clathrine (Aguilar et al., 2001).

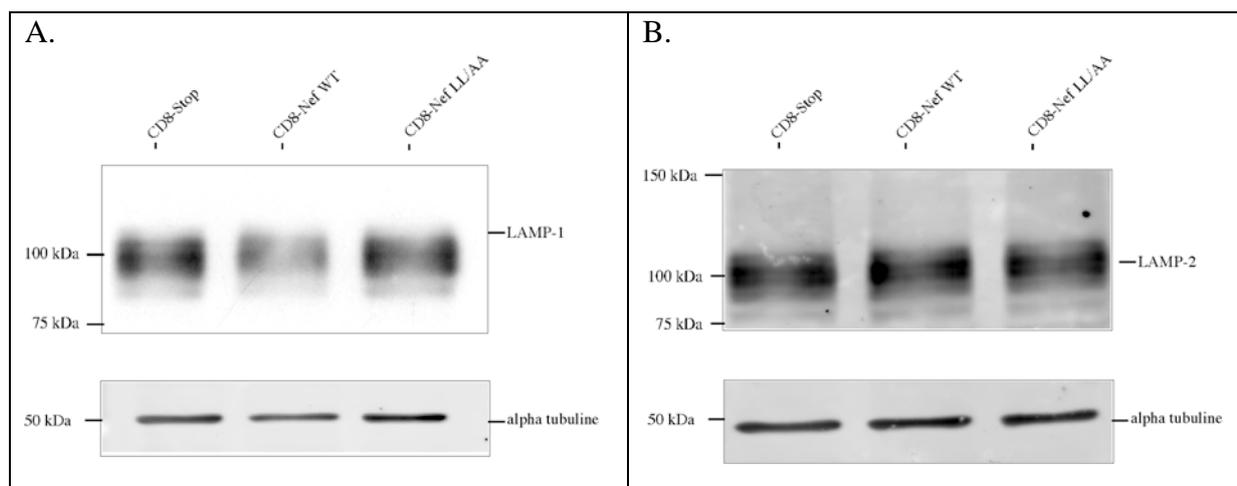


Figure 20 : Abondance des protéines LAMP-1 (A) et LAMP-2 (B) dans des cellules HEK 293T exprimant CD8-Stop, CD8-Nef WT ou CD8-Nef LL/AA. Les fractions MLP ont été préparées 48 h post-transfection. 25 μ g de protéines provenant de lysats totaux ont été chargées sur un gel SDS-PAGE 8 % en présence de DTT. Après électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF. LAMP-1 a été détectée par ECL-HRP tandis que LAMP-2 et l' α -tubuline ont été détectées par ECL-Plex.

Discussion et perspectives :

Nef est une protéine produite très tôt au cours du cycle de réplication du virus. Une de ses principales fonctions connues, est la diminution de l'expression de surface d'immunorécepteurs tels que CD4, les complexes MHC I et II, CD28 et DC-SIGN. L'impact de l'expression de Nef sur le trafic intracellulaire de ces protéines repose sur sa capacité à interagir avec des protéines adaptatrices (AP-1, AP-2 et AP-3, -COP et PACS-1) faisant partie de la machinerie de transport dépendant de la clathrine. A l'heure actuelle, il est clairement établi que le motif dileucine situé dans la boucle flexible C-terminale joue un rôle capital dans la diminution de l'expression de surface de CD4.

Nef est également connu pour augmenter le pouvoir infectieux du virus HIV. Apparemment, ce serait au cours de l'assemblage des virions que Nef exercerait ce rôle (Laguette et al., 2009; Qi and Aiken, 2008). Selon cette hypothèse, grâce à ses capacités d'interférer sur le trafic intracellulaire, Nef pourrait faciliter l'incorporation dans les virions de facteurs cellulaires nécessaires à l'infectivité des virus matures ou, au contraire, éloigner de la plateforme d'assemblage des virions, des facteurs cellulaires réduisant l'infectivité virale (Laguette et al., 2009; Qi and Aiken, 2008).

Par ailleurs, il a été montré que l'expression de Nef dans des lymphocytes T entraînait une augmentation importante du nombre de compartiments denses aux électrons (Sanfridson et al., 1997; Stumptner-Cuvelette et al., 2003). Ceux-ci contiennent de la cathepsine D, LAMP-2 et certains possèdent aussi des récepteurs au mannose-6-phosphate. Il s'agirait donc d'endosomes tardifs et de lysosomes. Dans les cellules HeLa, l'expression de Nef induit une accumulation d'endosomes multivésiculaires ou MVBs dilatés près du noyau (Sanfridson et al., 1997; Stumptner-Cuvelette et al., 2003) ou près du Golgi (Erdtmann et al., 2000). Contrairement aux lymphocytes, il ne s'agirait pas d'endosomes tardifs puisqu'ils ne renferment pas LAMP-1 et ne seraient pas acides (Sanfridson et al., 1997; Stumptner-Cuvelette et al., 2003). Par contre, des expériences de microscopie à fluorescence confocale ont montré une bonne colocalisation entre Nef et des marqueurs des endosomes précoces/endosomes de recyclage (Madrid et al., 2005). De plus, l'expression de Nef perturbe le recyclage du récepteur à la transferrine et semble indiquer que Nef agit plutôt dans les compartiments précoces de la voie endocytaire (Madrid et al., 2005).

C'est donc dans ce contexte que nous nous sommes demandé si l'expression de Nef dans des cellules HeLa ne pouvait pas avoir un impact sur le trafic intracellulaire de protéines lysosomales au cours de leur biosynthèse. On sait en effet que la plupart des hydrolases lysosomales nouvellement synthétisées sont transportées du TGN vers les endosomes grâce à des vésicules recouvertes de clathrine et que les hydrolases sont empaquetées dans ces vésicules suite à la liaison de leurs résidus mannose 6-P sur des récepteurs membranaires dont la queue cytoplasmique est reconnue par des protéines adaptatrices AP-1 et/ou GGA. De même, le transport des protéines membranaires telles que LAMP-1 et LAMP-2 pourrait nécessiter l'intervention des complexes AP-1, AP-2, AP-3 et AP-4.

Concrètement, nous avons d'abord essayé d'optimiser les conditions de transfection des cellules HeLa afin de réaliser ensuite des expériences biochimiques sur un maximum de cellules exprimant Nef. Pour cela, nous avons transfecté des cellules avec Nef-GFP en utilisant 4 agents de transfection (la Lipofectamine 2000, le Fugene HD, le Fugene 6 et le

Superfect) et, ensuite, nous avons calculé le pourcentage de cellules transfectées en examinant l'intensité de fluorescence de ces cellules par cytométrie de flux.

C'est la Lipofectamine 2000 et le Fugene HD qui ont donné les taux de transfection les plus élevés (environ 63% de cellules fluorescentes) mais tous deux induisaient une importante mortalité cellulaire. De plus, l'examen par microscopie à contraste de phase, a révélé la présence de nombreuses vacuoles réfringentes dans le cytoplasme des cellules traitées avec la Lipofectamine. Sur base d'expériences réalisées précédemment dans notre laboratoire, nous avons craint que la lipofectamine ne provoque un allègement des lysosomes (Deprez, 1994). Cependant, des expériences de centrifugation isopycniqne sur des gradients de saccharose ou de Percoll ne nous ont pas permis de montrer une différence de densité d'équilibration des lysosomes entre les cellules transfectées et les cellules contrôles.

Le Fugene 6 a donné des taux de transfection moins élevés (en moyenne 41%) que la Lipofectamine 2000 et le Fugene HD. Toutefois, comme le Fugène 6 semble être bien toléré par les cellules, nous avons décidé de poursuivre notre projet sur des cellules HeLa transfectées avec cet agent de transfection.

Pour étudier l'impact éventuel de l'expression de Nef sur le transport des protéines lysosomales, nous avons transfecté les cellules HeLa avec les constructions chimériques CD8-Nef sauvage ou CD8-Nef LL/AA, qui ont souvent été utilisées pour étudier le rôle de Nef, et plus précisément du motif dileucine, sur le trafic intracellulaire (Bresnahan et al., 1998; Coleman et al., 2006b; Erdtmann et al., 2000; Janvier et al., 2003b). Après avoir vérifié l'expression de CD8-Nef par Western blotting à l'aide d'un anticorps anti-CD8, nous avons mesuré l'activité spécifique d'un certain nombre d'hydrolases lysosomales : la α -galactosidase, l' α -mannosidase et la α -hexosaminidase, les cathepsines B et C (toutes ces hydrolases sont transportées par la voie des récepteurs au mannose 6 phosphate) ainsi que la phosphatase acide et la β -glucocérébrosidase. Ces deux dernières enzymes ont, comme particularité, d'être synthétisées comme précurseurs membranaires et d'emprunter une voie différente de la voie MPR. Ces expériences ont montré que l'expression de CD8-Nef (sauvage ou muté) ne modifiait pas l'activité spécifique de ces hydrolases lysosomales.

Ensuite, nous avons entrepris d'évaluer en Western blotting, le degré de maturation des cathepsines D et B. On sait en effet, que ces enzymes sont synthétisées sous forme de préproenzymes inactives, qu'elles perdent rapidement leur peptide signal et qu'elles ne deviennent actives que lorsque leur propeptide est clivé dans les endosomes. Enfin, leur maturation s'achève quand la chaîne polypeptidique est clivée en deux chaînes, une chaîne lourde d'une trentaine de kDa et une chaîne légère souvent indétectable sur gel. Les Western blots ne permettent pas de voir une diminution de l'abondance de la forme mature ni de la cathepsine B ni de la cathepsine D dans les cellules transfectées avec CD8-Nef WT par rapport aux cellules transfectées avec CD8-Stop. L'expression de CD8-Nef ne semble donc pas interférer, de façon importante du moins, sur le processus de transport et de maturation de ces deux cathepsines.

Cependant, il était possible que l'expression de Nef entraîne un retard dans la cinétique de biosynthèse de ces cathepsines. Afin de répondre à cette question, nous avons mené une expérience de marquage métabolique avec du Tran³⁵S label suivie d'une immunoprécipitation de la cathepsine D et d'une autoradiographie. Les cellules ont été transfectées avec les constructions CD8-Stop, CD8-Nef WT et CD8-Nef LL/AA en présence de Fugene 6, environ

42 h avant le marquage métabolique (1h avec 25 μ Ci/ml). Ensuite, les cellules ont été rincées et incubées dans un milieu complet contenant un excès de méthionine froide. Après 4, 8, 16 et 30 h, les milieux de culture ont été collectés et les cellules ont été lysées dans du PBS/Triton X-100/inhibiteurs de protéases. Dans ces conditions, nous n'avons observé ni une augmentation de la sécrétion du précurseur de la cathepsine D dans le milieu de culture, ni un ralentissement de l'apparition de la forme mature dans les lysats des cellules exprimant CD8-Nef par rapport aux cellules contrôles.

Ce résultat est quand même étonnant. En effet, des études ont montré que, dans des cellules déficientes en sous-unité μ 1 du complexe AP-1, les récepteurs MPR sont redistribués vers les endosomes et la cathepsine D est sécrétée en grande quantité dans le milieu de (Hirst et al., 2009; Meyer et al., 2000). Ces résultats soulignent l'importance du complexe AP-1 dans le recyclage des récepteurs MPR des endosomes vers le TGN.

Comment expliquer nos résultats alors qu'il est bien connu que Nef interagit avec les complexes AP-1 grâce à des interactions entre son motif dileucine et les hémicomplexes μ 1 (Chaudhuri et al., 2007; Janvier et al., 2003b) ? Il y a une différence majeure entre les deux types d'expériences. Dans les expériences de Meyer et al. (2000), ils ont eu recours à la technique des siRNA pour réduire l'expression de μ 1. Or, en l'absence de μ 1, les complexes AP-1 ne sont pas formés. Par contre, Nef stabilise les complexes AP-1 sur les membranes mais il n'empêche pas la formation des complexes.

Par ailleurs, des travaux de Stuart Kornfeld et de Margaret Robinson ont montré que les protéines adaptatrices GGA coopéraient avec les complexes AP-1 pour assurer l'emballage des hydrolases lysosomales dans les vésicules recouvertes de clathrine (Doray et al., 2002; Hirst et al., 2009). Alors que le groupe de Kornfeld avait proposé que les deux types de protéines adaptatrices agissaient séquentiellement, les travaux plus récents de l'équipe de Robinson semblent indiquer que AP-1 et GGA peuvent agir conjointement au sein des mêmes vésicules de transport. Dans ce cas, on peut imaginer que la stabilisation de AP-1 sur les membranes n'ait pas de conséquence négative sur le transport des hydrolases puisque les GGAs peuvent compenser l'absence d'AP-1 fonctionnel.

Enfin, la cathepsine D n'est peut-être pas l'enzyme idéale pour étudier l'impact d'un facteur sur le transport biosynthétique des hydrolases lysosomales puisqu'on sait que la cathepsine D peut emprunter des voies indépendantes des récepteurs au mannose 6-P. Ainsi, il a été montré que la procathepsine D pouvait s'associer aux membranes et interagir avec la prosaposine dans les compartiments de la voie biosynthétique, du réticulum endoplasmique jusqu'aux endosomes (Rijnboutt et al., 1992). Plus récemment, il a été montré que la prosaposine interagissait avec la sortiline, une protéine transmembranaire qui assure la même fonction que les récepteurs MPR mais pour un nombre restreint de protéines, en recrutant GGA2 à la membrane (Gopalakrishnan et al., 2004; Lefrancois et al., 2003). On peut imaginer que la cathepsine D suit préférentiellement cette voie lorsque les complexes AP-1 ne peuvent pas fonctionner normalement. Notez que nous avons fait quelques essais avec la cathepsine B, qui, à notre connaissance, suit principalement la voie classique du transport des hydrolases acides dépendante des MPR. Malheureusement, les anticorps dont nous disposons ne nous ont pas permis d'immunoprécipiter la forme mature de la cathepsine B mais uniquement sa forme précurseur.

Après l'étude sur les hydrolases lysosomales, nous avons concentré nos efforts sur la mesure de l'abondance des protéines membranaires lysosomales LAMP-1 et LAMP-2. L'expression de CD8-Nef WT dans les cellules HeLa ne provoque pas de diminution majeure de

l'abondance des protéines LAMP-1 et LAMP-2, comme en témoignent les Western blots. Toutefois, nous avons constaté une légère diminution de LAMP-1.

Les protéines membranaires lysosomales peuvent atteindre les endo/lysosomes soit par la voie directe, allant du TGN vers les endosomes, soit par la voie indirecte passant par la membrane plasmique. Vu la distribution intracellulaire des complexes AP, on peut facilement imaginer que la voie directe pourrait dépendre d'AP-1 et d'AP-3 tandis que la voie indirecte pourrait faire intervenir AP-2 en plus d'AP-1 et AP-3. En réalité, il est très difficile de savoir quelles sont les protéines adaptatrices impliquées dans le transport des protéines membranaires lysosomales. En effet, une étude utilisant des siRNA a montré qu'une déficience simultanée de AP-1 et de AP-3 affectait peu ou pas l'abondance des protéines LAMP-1/2 dans les lysosomes tandis que la déplétion du complexe AP-2 ou de la clathrine augmentait significativement l'expression de surface de ces protéines (Janvier and Bonifacino, 2005; Reusch et al., 2002). Ces résultats semblent indiquer que les complexes AP-1 et AP-3 ne jouent pas un rôle essentiel dans l'adressage lysosomal des protéines LAMPs et qu'une partie non négligeable de ces protéines passerait d'abord par la membrane plasmique avant d'arriver aux lysosomes grâce à des vésicules recouvertes de clathrine (Janvier and Bonifacino, 2005). Cependant, comme il reste des protéines LAMPs dans les lysosomes des cellules déficientes en AP-2 et en AP-3, on ne peut pas exclure l'existence d'autres mécanismes de transport des protéines membranaires, indépendants des complexes AP.

Nos résultats de Western blotting ne nous permettent pas de dire si l'expression de Nef perturbe ou pas la distribution des protéines LAMPs. Pour cela, on aurait pu envisager de faire une centrifugation sur un gradient de Percoll en condition isotonique. Cette technique permet de séparer les lysosomes qui migrent dans le fond du tube, de la membrane plasmique et de la plupart des organites membranaires qui, eux, restent dans les fractions moins denses du gradient. On pourrait aussi faire une expérience d'immunofluorescence avec un anticorps anti-LAMP-1 ou anti-LAMP-2 pour examiner la proportion de protéines LAMPs à la surface cellulaire par rapport à la région périnucléaire où doivent se trouver les lysosomes. Mais pour observer uniquement les cellules qui expriment CD8-Nef, il faudrait également faire un marquage avec un anticorps anti-Nef ou anti-CD8. Nous avons essayé de faire cette expérience. Malheureusement, l'anticorps anti-CD8 que nous avons utilisé en Western blotting n'a pas marché en immunofluorescence. Nous n'avons donc pas pu repérer les cellules exprimant CD8-Nef. Toutefois, nous n'avons observé de marquage de LAMP-2 à la surface d'aucune cellule. Ceci suggère que l'expression de CD8-Nef n'a pas d'impact sur le trafic des protéines membranaires lysosomales. Si ce résultat se confirme à l'avenir, ce serait un argument pour dire que des protéines adaptatrices autres que les complexes APs interviennent dans ce transport des protéines LAMPs.

A ce stade de notre projet, nous nous sommes demandé si l'absence d'effet visible de l'expression de Nef sur le transport des protéines lysosomales n'était pas due à un trop faible taux de transfection des cellules HeLa. Dès lors, nous avons décidé de refaire un certain nombre d'expériences sur des cellules HEK 293T qui sont connues pour être faciles à transférer. De fait, nous avons obtenu 85 % de cellules fluorescentes après transfection des HEK 293T avec la construction Nef-GFP en présence de Fugene 6. Pour rappel, nous avons obtenu en moyenne 41 % de cellules HeLa fluorescentes.

Malgré le fait que nous ayons doublé le pourcentage de cellules exprimant Nef, nous n'avons pas observé de différence ni au niveau des activités spécifiques des deux hydrolases que nous avons testées (-hexosaminidase et cathepsine B) ni au niveau de la maturation des cathepsines D et B, 48h après transfection. Toutefois, on constate à nouveau une diminution, plus marquée cette fois, de l'abondance de LAMP-1 dans les cellules qui expriment CD8-Nef

WT par rapport aux cellules qui expriment CD8-Stop ou CD8-Nef LL/AA. Et, de nouveau, l'abondance de LAMP-2 est inchangée. Cela vaudrait la peine d'approfondir la question parce qu'il est possible que Nef perturbe le trafic intracellulaire de LAMP-1 mais pas de LAMP-2. Il a été montré *in vitro* que LAMP-2 mais pas LAMP-1 interagissait avec la sous-unité $\mu 4$ du complexe AP-4 (Aguilar et al., 2001). Sur base de ces observations, certains auteurs ont avancé l'hypothèse que le complexe AP-4 était impliqué dans le transport de LAMP-2. Cependant, elle n'a pas été confirmée puisque la déplétion de AP-4 induite par des ARN antisens n'a pas d'impact sur le transport lysosomal de LAMP-2 (Simmen et al., 2002) et que dans les MDCK et dans des MelJuSo, il n'y a pas de colocalisation entre LAMP-2 et AP-4 (Barois and Bakke, 2005).

En conclusion, notre étude dans les cellules HeLa et dans les cellules HEK 293T suggère que HIV-Nef n'interfère pas de façon majeure avec le trafic des hydrolases lysosomales et des protéines membranaires. En effet, mise à part une légère diminution de l'abondance de la protéine LAMP-1 dans les cellules exprimant CD8-Nef WT, l'abondance, la maturation, l'activité enzymatique des hydrolases acides, et par conséquent le trafic des hydrolases étudiées ne semblent pas être affectés dans ces cellules. Cela vaudrait la peine d'entreprendre les mêmes expériences sur d'autres lignées cellulaires, en particulier des lymphocytes T et des macrophages. D'abord, parce que ce sont des cellules hôtes du HIV mais aussi parce que dans des lignées de lymphocytes T, notamment des cellules Jurkat, la surexpression de Nef entraîne une augmentation du nombre d'endosomes tardifs et des lysosomes et pas une perturbation des compartiments précoces de la voie endocytaire, comme cela a été décrit pour les cellules HeLa (Madrid et al., 2005). Les macrophages seraient aussi intéressants parce il a été démontré que l'induction de l'autophagie par la rapamycine stimulait la production de particules virales dans les macrophages mais pas dans les cellules HeLa. Or, si les virus survivent dans les macrophages lorsque l'autophagie est activée, c'est grâce à Nef qui bloque la maturation terminale des autophagosomes. Par conséquent, il est possible que Nef perturbe le trafic dans d'autres lignées cellulaires mais pas dans les cellules HeLa ou HEK 293T. Cela ne veut pas dire pour autant que ce sera facile à mettre en évidence parce qu'aussi bien les lymphocytes que les macrophages sont des cellules difficiles à transfecter.

Bibliographie :

- Adamson, C.S., and E.O. Freed. 2009. Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. *Antiviral Res.*
- Aguilar, R.C., M. Boehm, I. Gorshkova, R.J. Crouch, K. Tomita, T. Saito, H. Ohno, and J.S. Bonifacino. 2001. Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J Biol Chem.* 276:13145-52.
- Barois, N., and O. Bakke. 2005. The adaptor protein AP-4 as a component of the clathrin coat machinery: a morphological study. *Biochem J.* 385:503-10.
- Barouch, D.H. 2008. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature.* 455:613-9.
- Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 220:868-71.
- Benichou, S., M. Bomsel, M. Bodeus, H. Durand, M. Doute, F. Letourneur, J. Camonis, and R. Benarous. 1994. Physical interaction of the HIV-1 Nef protein with beta-COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic. *J Biol Chem.* 269:30073-6.
- Bieniasz, P.D. 2009. The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe.* 5:550-8.
- Bolinger, C., and K. Boris-Lawrie. 2009. Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome. *Retrovirology.* 6:8.
- Bonifacino, J.S., and R. Rojas. 2006. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:568-79.
- Boonen, M., R. Rezende de Castro, G. Cuvelier, I. Hamer, and M. Jadot. 2008. A dileucine signal situated in the C-terminal tail of the lysosomal membrane protein p40 is responsible for its targeting to lysosomes. *Biochem J.* 414:431-40.
- Braulke, T., and J.S. Bonifacino. 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1793:605-14.
- Bresnahan, P.A., W. Yonemoto, S. Ferrell, D. Williams-Herman, R. Geleziunas, and W.C. Greene. 1998. A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Curr Biol.* 8:1235-8.
- Burtey, A., J.Z. Rappoport, J. Bouchet, S. Basmaciogullari, J. Guatelli, S.M. Simon, S. Benichou, and A. Benmerah. 2007. Dynamic interaction of HIV-1 Nef with the clathrin-mediated endocytic pathway at the plasma membrane. *Traffic.* 8:61-76.
- Campbell, E.M., R. Nunez, and T.J. Hope. 2004. Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol.* 78:5745-55.
- Campbell, T.D., M. Khan, M.B. Huang, V.C. Bond, and M.D. Powell. 2008. HIV-1 Nef protein is secreted into vesicles that can fuse with target cells and virions. *Ethn Dis.* 18:S2-14-9.
- Carter, C.A., and L.S. Ehrlich. 2008. Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. *Annu Rev Microbiol.* 62:425-43.
- Chaudhuri, R., O.W. Lindwasser, W.J. Smith, J.H. Hurley, and J.S. Bonifacino. 2007. Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *J Virol.* 81:3877-90.

- Coleman, S.H., D. Hitchin, C.M. Noviello, and J.C. Guatelli. 2006a. HIV-1 Nef stabilizes AP-1 on membranes without inducing ARF1-independent de novo attachment. *Virology*. 345:148-55.
- Coleman, S.H., R. Madrid, N. Van Damme, R.S. Mitchell, J. Bouchet, C. Servant, S. Pillai, S. Benichou, and J.C. Guatelli. 2006b. Modulation of cellular protein trafficking by human immunodeficiency virus type 1 Nef: role of the acidic residue in the ExxxLL motif. *J Virol*. 80:1837-49.
- Coleman, S.H., N. Van Damme, J.R. Day, C.M. Noviello, D. Hitchin, R. Madrid, S. Benichou, and J.C. Guatelli. 2005. Leucine-specific, functional interactions between human immunodeficiency virus type 1 Nef and adaptor protein complexes. *J Virol*. 79:2066-78.
- Craig, H.M., M.W. Pandori, and J.C. Guatelli. 1998. Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:11229-34.
- Craig, H.M., T.R. Reddy, N.L. Riggs, P.P. Dao, and J.C. Guatelli. 2000. Interactions of HIV-1 nef with the mu subunits of adaptor protein complexes 1, 2, and 3: role of the dileucine-based sorting motif. *Virology*. 271:9-17.
- Deneka, M., A. Pelchen-Matthews, R. Byland, E. Ruiz-Mateos, and M. Marsh. 2007. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol*. 177:329-41.
- Deprez, V. 1994. Transfection de cellules Cos-7 et de cellules Clone 9 par l'ADNc codant pour la cathepsine C. *Master Thesis, FUNDP, Namur*.
- Doray, B., P. Ghosh, J. Griffith, H.J. Geuze, and S. Kornfeld. 2002. Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. *Science*. 297:1700-3.
- Erdtmann, L., K. Janvier, G. Raposo, H.M. Craig, P. Benaroch, C. Berlioz-Torrent, J.C. Guatelli, R. Benarous, and S. Benichou. 2000. Two independent regions of HIV-1 Nef are required for connection with the endocytic pathway through binding to the mu 1 chain of AP1 complex. *Traffic*. 1:871-83.
- Eskelinen, E.L., Y. Tanaka, and P. Saftig. 2003. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*. 13:137-45.
- Freed, E.O. 2001. HIV-1 replication. *Somatic Cell Molecular Genetics*. 26:13-33.
- Fukuda, M. 1991. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem*. 266:21327-30.
- Ganser-Pornillos, B.K., M. Yeager, and W.I. Sundquist. 2008. The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol*. 18:203-17.
- Geyer, M., O.T. Fackler, and B.M. Peterlin. 2001. Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep*. 2:580-5.
- Geyer, M., H. Yu, R. Mandic, T. Linnemann, Y.H. Zheng, O.T. Fackler, and B.M. Peterlin. 2002. Subunit H of the V-ATPase binds to the medium chain of adaptor protein complex 2 and connects Nef to the endocytic machinery. *J Biol Chem*. 277:28521-9.
- Ghosh, P., N.M. Dahms, and S. Kornfeld. 2003. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:202-12.
- Gieselmann, V., A. Hasilik, and K. von Figura. 1985. Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro. *J Biol Chem*. 260:3215-20.
- Goff, S.P. 2007. Host factors exploited by retroviruses. *Nat Rev Microbiol*. 5:253-63.
- Gonzalez-Noriega, A., J.H. Grubb, V. Talkad, and W.S. Sly. 1980. Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *J Cell Biol*. 85:839-52.
- Gopalakrishnan, M.M., H.W. Grosch, S. Locatelli-Hoops, N. Werth, E. Smolenova, M. Nettersheim, K. Sandhoff, and A. Hasilik. 2004. Purified recombinant human

- prosaposin forms oligomers that bind procathepsin D and affect its autoactivation. *Biochem J.* 383:507-15.
- Hirst, J., D.A. Sahlender, M. Choma, R. Sinka, M.E. Harbour, M. Parkinson, and M.S. Robinson. 2009. Spatial and functional relationship of GGAs and AP-1 in Drosophila and HeLa cells. *Traffic.* 10:1696-710.
- Jadot, M., S. Misquith, F. Dubois, S. Wattiaux-De Coninck, and R. Wattiaux. 1986. Intracellular pathway followed by invertase endocytosed by rat liver. *Eur J Biochem.* 161:695-700.
- Janvier, K., and J.S. Bonifacino. 2005. Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol Biol Cell.* 16:4231-42.
- Janvier, K., H. Craig, D. Hitchin, R. Madrid, N. Sol-Foulon, L. Renault, J. Cherfils, D. Cassel, S. Benichou, and J. Guatelli. 2003a. HIV-1 Nef stabilizes the association of adaptor protein complexes with membranes. *J Biol Chem.* 278:8725-32.
- Janvier, K., H. Craig, S. Le Gall, R. Benarous, J. Guatelli, O. Schwartz, and S. Benichou. 2001. Nef-induced CD4 downregulation: a diacidic sequence in human immunodeficiency virus type 1 Nef does not function as a protein sorting motif through direct binding to beta-COP. *J Virol.* 75:3971-6.
- Janvier, K., Y. Kato, M. Boehm, J.R. Rose, J.A. Martina, B.Y. Kim, S. Venkatesan, and J.S. Bonifacino. 2003b. Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes. *J Cell Biol.* 163:1281-90.
- Jere, A., M. Fujita, A. Adachi, and M. Nomaguchi. 2009. Role of HIV-1 Nef protein for virus replication in vitro. *Microbes Infect.*
- Kestler, H.W., 3rd, D.J. Ringler, K. Mori, D.L. Panicali, P.K. Sehgal, M.D. Daniel, and R.C. Desrosiers. 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell.* 65:651-62.
- Kirchhoff, F., M. Schindler, A. Specht, N. Arhel, and J. Munch. 2008. Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 65:2621-36.
- Kyei, G.B., C. Dinkins, A.S. Davis, E. Roberts, S.B. Singh, C. Dong, L. Wu, E. Kominami, T. Ueno, A. Yamamoto, M. Federico, A. Panganiban, I. Vergne, and V. Deretic. 2009. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol.* 186:255-68.
- Laguet, N., S. Benichou, and S. Basmaciogullari. 2009. Human immunodeficiency virus type 1 Nef incorporation into virions does not increase infectivity. *J Virol.* 83:1093-104.
- Lefrancois, S., J. Zeng, A.J. Hassan, M. Canuel, and C.R. Morales. 2003. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *Embo J.* 22:6430-7.
- Lindwasser, O.W., W.J. Smith, R. Chaudhuri, P. Yang, J.H. Hurley, and J.S. Bonifacino. 2008. A diacidic motif in human immunodeficiency virus type 1 Nef is a novel determinant of binding to AP-2. *J Virol.* 82:1166-74.
- Liu, J., A. Bartesaghi, M.J. Borgnia, G. Sapiro, and S. Subramaniam. 2008. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature.* 455:109-13.
- Liu, L.X., N. Heveker, O.T. Fackler, S. Arold, S. Le Gall, K. Janvier, B.M. Peterlin, C. Dumas, O. Schwartz, S. Benichou, and R. Benarous. 2000. Mutation of a conserved residue (D123) required for oligomerization of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein abolishes interaction with human thioesterase and results in impairment of Nef biological functions. *J Virol.* 74:5310-9.

- Lopez-Verges, S., G. Camus, G. Blot, R. Beauvoir, R. Benarous, and C. Berlioz-Torrent. 2006. Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:14947-52.
- Mach, L., K. Stuwe, A. Hagen, C. Ballaun, and J. Glossl. 1992. Proteolytic processing and glycosylation of cathepsin B. The role of the primary structure of the latent precursor and of the carbohydrate moiety for cell-type-specific molecular forms of the enzyme. *Biochem J*. 282 (Pt 2):577-82.
- Madrid, R., K. Janvier, D. Hitchin, J. Day, S. Coleman, C. Noviello, J. Bouchet, A. Benmerah, J. Guatelli, and S. Benichou. 2005. Nef-induced alteration of the early/recycling endosomal compartment correlates with enhancement of HIV-1 infectivity. *J Biol Chem*. 280:5032-44.
- Marshansky, V., and M. Futai. 2008. The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol*. 20:415-26.
- Meyer, C., D. Zizioli, S. Lausmann, E.L. Eskelinen, J. Hamann, P. Saftig, K. von Figura, and P. Schu. 2000. mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *Embo J*. 19:2193-203.
- Miller, M.D., M.B. Feinberg, and W.C. Greene. 1994. The HIV-1 nef gene acts as a positive viral infectivity factor. *Trends Microbiol* 2:294-298.
- Miller, M.D., M.T. Warmerdam, K.A. Page, M.B. Feinberg, and W.C. Greene. 1995. Expression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nef gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 or viral entry. *J Virol*. 69:579-84.
- Neil, S.J., T. Zang, and P.D. Bieniasz. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 451:425-30.
- Owada, M., and E.F. Neufeld. 1982. Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose 6-phosphate recognition? Evidence from I-cell disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 105:814-20.
- Peters, T.J., M. Muller, and C. De Duve. 1972. Lysosomes of the arterial wall. I. Isolation and subcellular fractionation of cells from normal rabbit aorta. *J Exp Med*. 136:1117-39.
- Piguet, V., Y.L. Chen, A. Mangasarian, M. Foti, J.L. Carpentier, and D. Trono. 1998. Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *Embo J*. 17:2472-81.
- Piguet, V., F. Gu, M. Foti, N. Demaux, J. Gruenberg, J.L. Carpentier, and D. Trono. 1999. Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. *Cell*. 97:63-73.
- Poe, J.A., and T.E. Smithgall. 2009. HIV-1 Nef dimerization is required for Nef-mediated receptor downregulation and viral replication. *J Mol Biol*. 394:329-42.
- Qi, M., and C. Aiken. 2008. Nef enhances HIV-1 infectivity via association with the virus assembly complex. *Virology*. 373:287-97.
- Reczek, D., M. Schwake, J. Schroder, H. Hughes, J. Blanz, X. Jin, W. Brondyk, S. Van Patten, T. Edmunds, and P. Saftig. 2007. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell*. 131:770-83.
- Reusch, U., O. Bernhard, U. Koszinowski, and P. Schu. 2002. AP-1A and AP-3A lysosomal sorting functions. *Traffic*. 3:752-61.
- Rijnboutt, S., H.M. Aerts, H.J. Geuze, J.M. Tager, and G.J. Strous. 1991. Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 266:4862-8.

- Rijnboutt, S., W. Stoorvogel, H.J. Geuze, and G.J. Strous. 1992. Identification of subcellular compartments involved in biosynthetic processing of cathepsin D. *J Biol Chem.* 267:15665-72.
- Roeth, J.F., and K.L. Collins. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70:548-63.
- Saftig, P., and J. Klumperman. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:623-35.
- Sanfridson, A., S. Hester, and C. Doyle. 1997. Nef proteins encoded by human and simian immunodeficiency viruses induce the accumulation of endosomes and lysosomes in human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:873-8.
- Sawai, E.T., A. Baur, H. Struble, B.M. Peterlin, J.A. Levy, and C. Cheng-Mayer. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a cellular serine kinase in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:1539-43.
- Schmid, J.A., L. Mach, E. Paschke, and J. Glossl. 1999. Accumulation of sialic acid in endocytic compartments interferes with the formation of mature lysosomes. Impaired proteolytic processing of cathepsin B in fibroblasts of patients with lysosomal sialic acid storage disease. *J Biol Chem.* 274:19063-71.
- Schuette, C.G., B. Pierstorff, S. Huettler, and K. Sandhoff. 2001. Sphingolipid activator proteins: proteins with complex functions in lipid degradation and skin biogenesis. *Glycobiology.* 11:549-556.
- Seaman, M.N. 2005. Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol.* 15:68-75.
- Simmen, T., S. Honing, A. Icking, R. Tikkanen, and W. Hunziker. 2002. AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol.* 4:154-9.
- Sleat, D.E., I. Sohar, H. Lackland, J. Majercak, and P. Lobel. 1996. Rat brain contains high levels of mannose-6-phosphorylated glycoproteins including lysosomal enzymes and palmitoyl-protein thioesterase, an enzyme implicated in infantile neuronal lipofuscinosis. *J Biol Chem.* 271:19191-8.
- Sol-Foulon, N., C. Esnault, Y. Percherancier, F. Porrot, P. Metais-Cunha, F. Bachelierie, and O. Schwartz. 2004. The effects of HIV-1 Nef on CD4 surface expression and viral infectivity in lymphoid cells are independent of rafts. *J Biol Chem.* 279:31398-408.
- Stumptner-Cuvelette, P., M. Jouve, J. Helft, M. Dugast, A.S. Glouzman, K. Jooss, G. Raposo, and P. Benaroch. 2003. Human immunodeficiency virus-1 Nef expression induces intracellular accumulation of multivesicular bodies and major histocompatibility complex class II complexes: potential role of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Biol Cell.* 14:4857-70.
- Watts, J.M., K.K. Dang, R.J. Gorelick, C.W. Leonard, J.W. Bess, Jr., R. Swanstrom, C.L. Burch, and K.M. Weeks. 2009. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature.* 460:711-6.
- Welker, R., M. Harris, B. Cardel, and H.G. Krausslich. 1998. Virion incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Nef is mediated by a bipartite membrane-targeting signal: analysis of its role in enhancement of viral infectivity. *J Virol.* 72:8833-40.
- Welsch, S., O.T. Keppler, A. Habermann, I. Allespach, J. Krijnse-Locker, and H.G. Krausslich. 2007. HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathog.* 3:e36.
- Williams, S.A., L.F. Chen, H. Kwon, C.M. Ruiz-Jarabo, E. Verdin, and W.C. Greene. 2006. NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *Embo J.* 25:139-49.

- Wolf, D., V. Witte, P. Clark, K. Blume, M.G. Lichtenheld, and A.S. Baur. 2008. HIV Nef enhances Tat-mediated viral transcription through a hnRNP-K-nucleated signaling complex. *Cell Host Microbe*. 4:398-408.
- Zaidi, N., A. Maurer, S. Nieke, and H. Kalbacher. 2008. Cathepsin D: a cellular roadmap. *Biochem Biophys Res Commun*. 376:5-9.
- Zhang, F., S.J. Wilson, W.C. Landford, B. Virgen, D. Gregory, M.C. Johnson, J. Munch, F. Kirchhoff, P.D. Bieniasz, and T. Hatziioannou. 2009. Nef Proteins from Simian Immunodeficiency Viruses Are Tetherin Antagonists. *Cell Host Microbe*.

Figures:

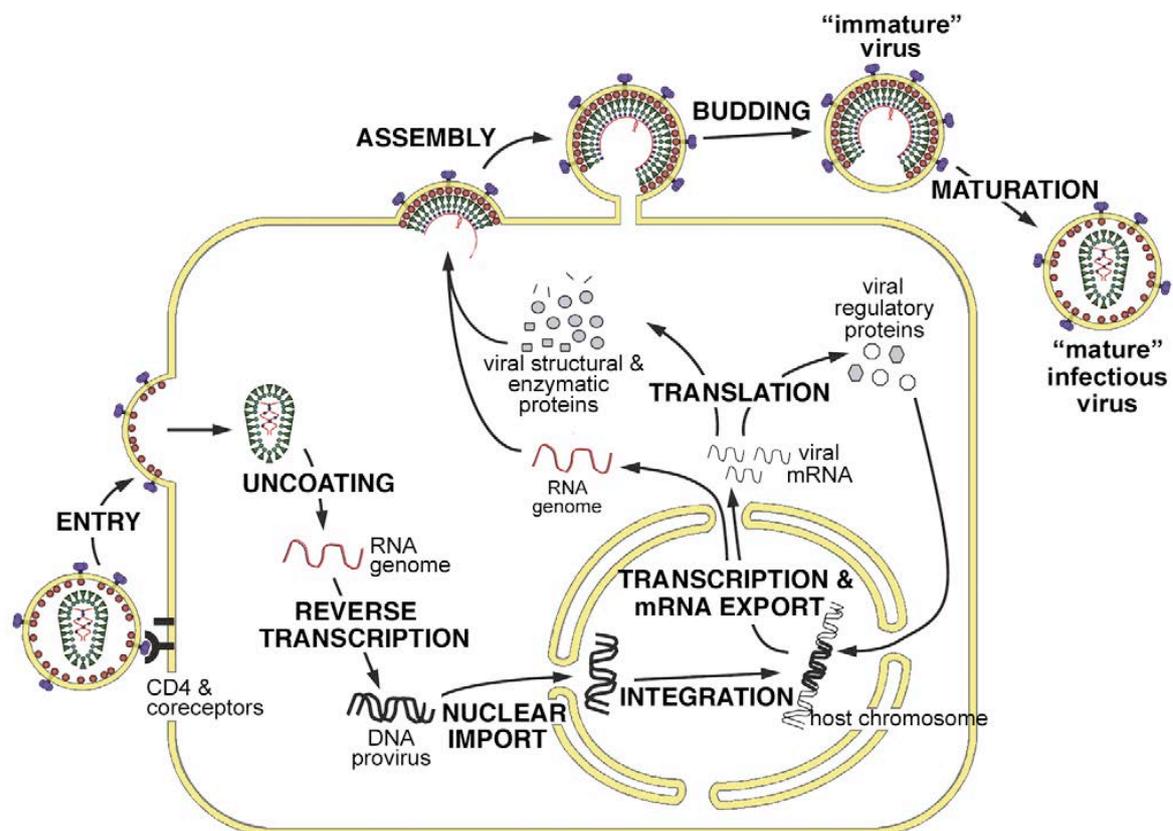


Figure 1 : Représentation schématique du cycle de réplication du virus HIV-1 (Ganser-Pornillos et al., 2009). Pour les détails du cycle de réplication : voir dans le texte.

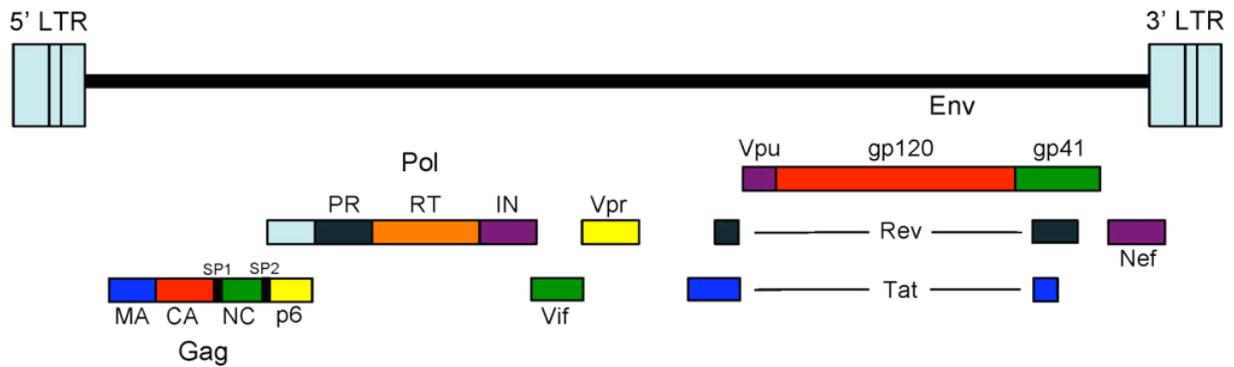


Figure 2 : Organisation du génome de HIV-1. Le génome d'HIV-1 est un ARN qui contient 9 phases ouvertes de lectures qui produisent 15 protéines : la matrice (MA), la capside (CA), la nucléocapside (NC), les peptides intercalaires, la protéine p6, la protéase virale (PR), la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN), les glycoprotéines gp120 et gp41, Rev, Tat, Nef, Vif, Vpr, Vpu. Nous pouvons voir également sur cette figure : les LTR (Long Terminal Repeats) (Adamson and Freed 2009).

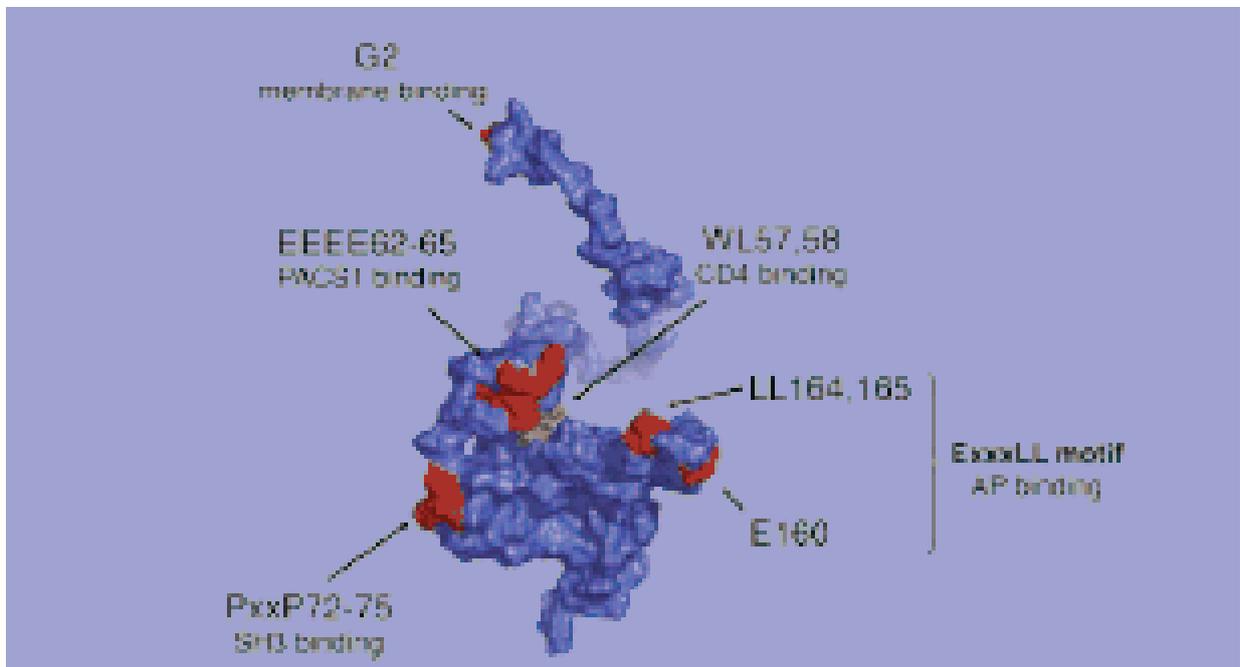


Figure 3 : Représentation tridimensionnelle de la structure de HIV-1 Nef réalisée avec le logiciel PyMOL. Cette représentation est un assemblage de deux structures obtenues en résonance magnétique nucléaire. En rouge, nous pouvons observer les résidus importants pour les effets de Nef sur le trafic intracellulaire (Chaudhuri et al., 2007).

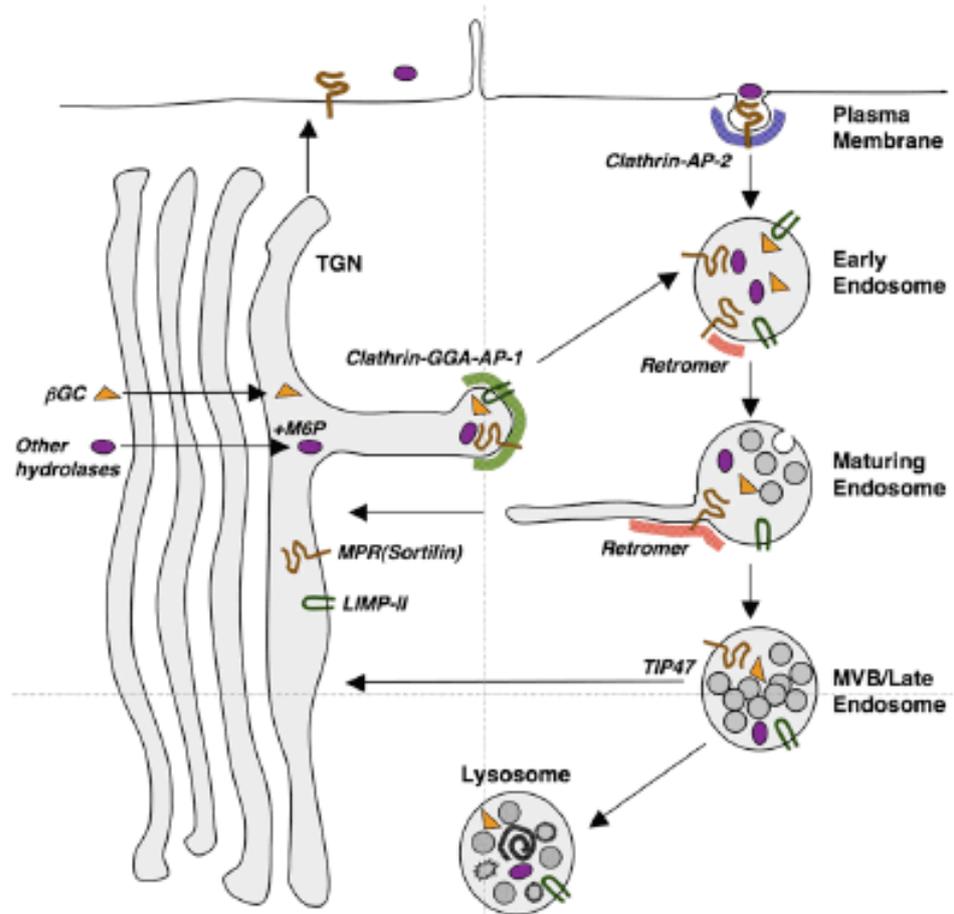


Figure 4 : Transport des hydrolases lysosomales. Sur cette figure, nous pouvons voir le trafic des hydrolases lysosomales assuré par les récepteurs au mannose-6-phosphate, la sortiline et le transport indépendant des récepteurs au mannose-6-phosphate de la β -glucocérébrosidase (β GC) assuré par LIMP-II. Sur cette figure, le transport rétrograde des récepteurs au mannose-6-phosphate est également illustré et serait assuré par les rétromères et TIP 47 (Braulke and Bonifacino, 2009).

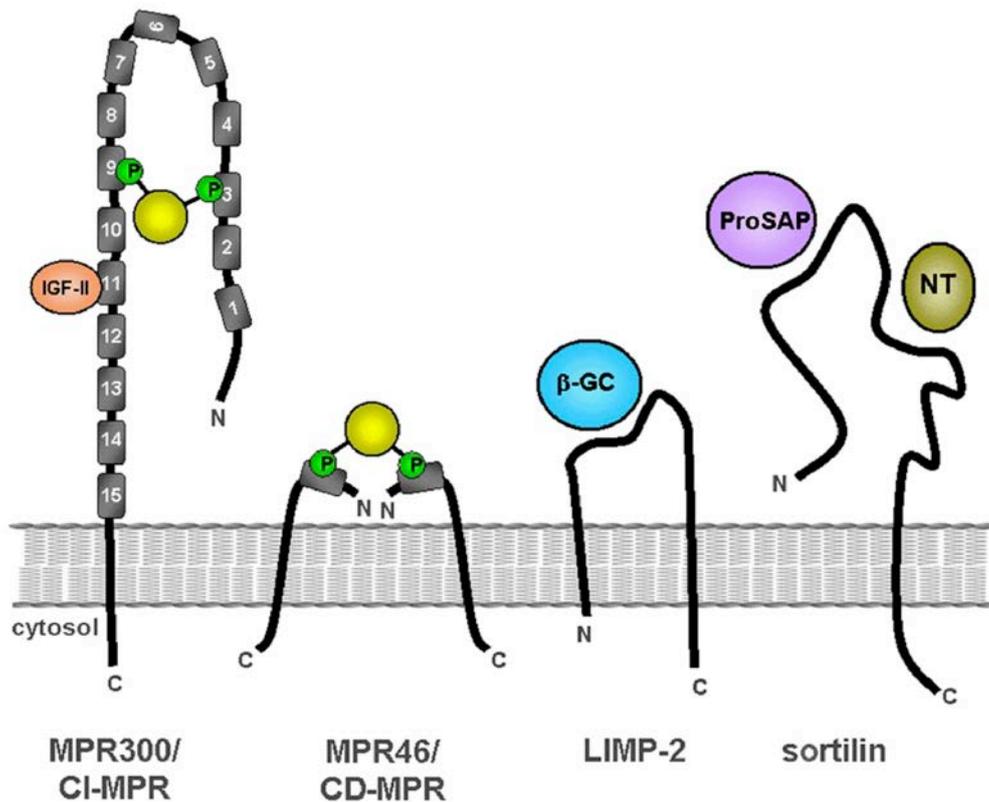


Figure 5 : Représentation schématique de récepteurs impliqués dans le transport d'hydrolases lysosomales. Le récepteur au mannose-6-phosphate cation indépendant (MPR300 / CI-MPR) est une glycoprotéine multifonctionnelle de 300 kDa, qui contient 2 sites distincts de liaison pour le mannose-6-phosphate. Le récepteur mannose-6-phosphate cation dépendant (MPR46 / CD-MPR) qui contient un site de liaison au mannose-6-phosphate.

La protéine LIMP-2 (Lysosomal Integral Membrane Protein) est une protéine transmembranaire de type III, fortement glycosylée qui lie la protéine lysosomale, la β -glucocérébrosidase (β -GC) et fonctionne comme un récepteur alternatif à la voie MPR.

La sortiline est une protéine transmembranaire multifonctionnelle de type I, qui sert au transport de la prosaposine (ProSAP), et la neurotensine (NT) (Braulke and Bonifacino, 2009).

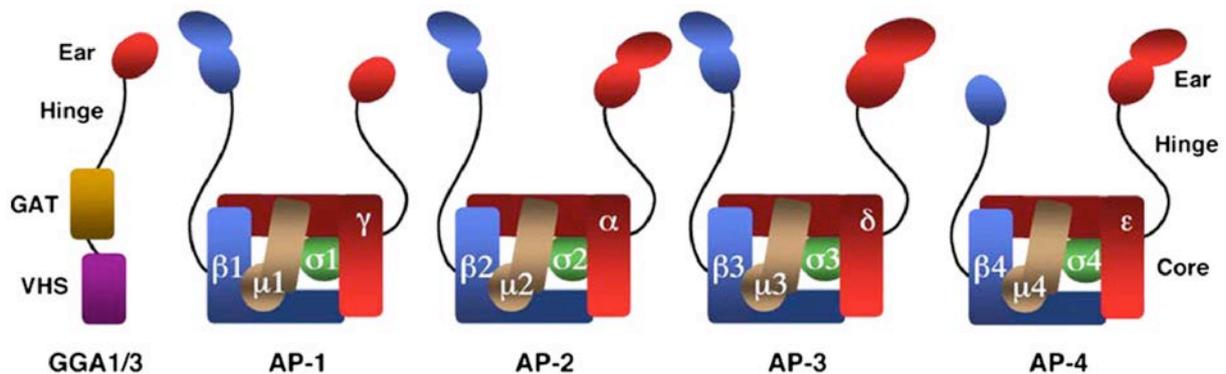


Figure 6 : Représentations schématiques des protéines GGAs et des complexes AP (adaptor protein). Les trois GGAs comprennent trois domaines : le domaine VHS, le domaine GAT et le domaine GAE (Gamma-Adaptin Ear). Les quatre complexes hétérotétramérique AP sont composés de sous-unités homologues. Ces sous-unités sont assemblées en un complexe organisé en un domaine central, un domaine charnière et un domaine nommé « Ear » (Braulke and Bonifacino, 2009).

Nom de l'anticorps :	Application :	Dilution	Firme :	Référence
Chèvre polyclonal Anti-cathepsine D	ECL-HRP	1/1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-6487
	ECL-PLEX	1/500		
Lapin polyclonal anti-CD8- α humain	ECL-HRP	1/200	Santa Cruz Biotechnology	sc-7188
	ECL-PLEX			
Lapin polyclonal anti-Tom 40	ECL-HRP	1/1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-11414
	ECL-PLEX	1/500		
Souris monoclonal Anti-cathepsine B	ECL-HRP	1/1000	Calbiochem	IM27L
	ECL-PLEX	1/500		
Souris monoclonal Anti-Lamp-1	ECL-HRP	1/2000	Developmental Studies Hybridoma Bank	H4B3
	ECL-PLEX	1/750		
Souris monoclonal Anti-Lamp-2	ECL-PLEX	1/750	Developmental Studies Hybridoma Bank	H4B4
Lapin polyclonal Anti-mtHSP70	ECL-HRP	1/1000	Enzo Life Sciences	ALX-804-077
Souris monoclonal Anti- α -tubuline	ECL-PLEX	1/7200	Sigma-Aldrich	T5168

Tableau 1 : Anticorps primaires utilisés lors des Western Blot.

Nom de l'anticorps :	Application :	Dilution	Firme :	Référence
Chèvre Anti-souris-peroxydase	ECL-HRP	1/2000	Dako Cytomation	P0447
Lapin Anti-chèvre- peroxydase	ECL-HRP	1/2000	Dako Cytomation	P 0160
Chèvre Anti-lapin-peroxydase	ECL-HRP	1/2000	Dako Cytomation	P0448
Chèvre Anti-souris-CY3	ECL-PLEX	1/2500	GE Healthcare	PA43002
Chèvre Anti-lapin-CY5	ECL-PLEX	1/2500	GE Healthcare	PA45011
Chèvre Anti-lapin-CY3	ECL-PLEX	1/2500	GE Healthcare	PA43004
Âne Anti-chèvre-Alexa 633	ECL-PLEX	1/2500	Molecular Probes	A21082

Tableau 2 : Anticorps secondaires utilisés lors des Western Blot.

Nom de l'anticorps :	Application :	Dilution	Firme :	Référence
Souris monoclonal Anti-Lamp-1	Microscopie confocale	1/200	Developmental Studies Hybridoma Bank	H4A3
Lapin polyclonal anti- CD8- α humain	Microscopie confocale	1/50	Santa Cruz Biotechnology	sc-7188

Tableau 3 : Anticorps primaires utilisés lors des expériences de microscopie confocale.

Nom de l'anticorps :	Application :	Dilution	Firme :	Référence
Chèvre Anti-souris-Alexa 488	Microscopie confocale	1/1000	Molecular Probes	A31562
Chèvre Anti-lapin-Alexa 488	Microscopie confocale	1/1000	Molecular Probes	A31627
Chèvre Anti-lapin-Alexa 633	Microscopie confocale	1/1000	Molecular Probes	A21070

Tableau 4 : Anticorps secondaires utilisés lors des expériences de microscopie confocale.

Nom	Substrat	Tampon-Conc	pH	Addition
β -Galactosidase	4-méthylumbelliféryl- β -galactopyranoside 0,5 mM	Acétate 50 mM	5	Triton X-100 0,05 %
β -Glucocérébrosidase	4-méthylumbelliféryl- β -glucopyranoside 0,1 mM	Acétate 50 mM	4,5	Triton X-100 0,02 % Taurocholate de Na 0,1 %
α -Mannosidase	4-méthylumbelliféryl- α -mannopyranoside 0,5 mM	Acétate 50 mM	4,5	Triton X-100 0,02 %
β -Hexosaminidase	4-méthylumbelliféryl-N-acétyl- β -glucosaminide 1 mM	Acétate 100 mM	5	Triton X-100 0,05 %
Phosphatase acide	4-méthylumbelliféryl-phosphate 1 mM	Acétate 100 mM	5	Triton X-100 0,05 %
Cathepsine C	H-Gly-Arg-7-Amido-4- méthylcoumarin 0,1 mM	T. Activateur composé de : - T. acétate de Na 100 mM pH 5,0 + EDTA 1 mM + Aminoéthane-Thiol 1 mM +Triton X-100 0,05 %	5	
Cathepsine B	Z-Arg-Arg-7-Amido-4- méthylcoumarin 0,1 mM	T. Activateur composé de : - T. phosphate 100 mM pH 6,0 + EDTA 4 mM + Aminoéthane-Thiol 1 mM +Triton X-100 0,05 %	6	

Tableau 5 : Conditions utilisées pour évaluer la mesure de l'activité enzymatique des hydrolases lysosomales.

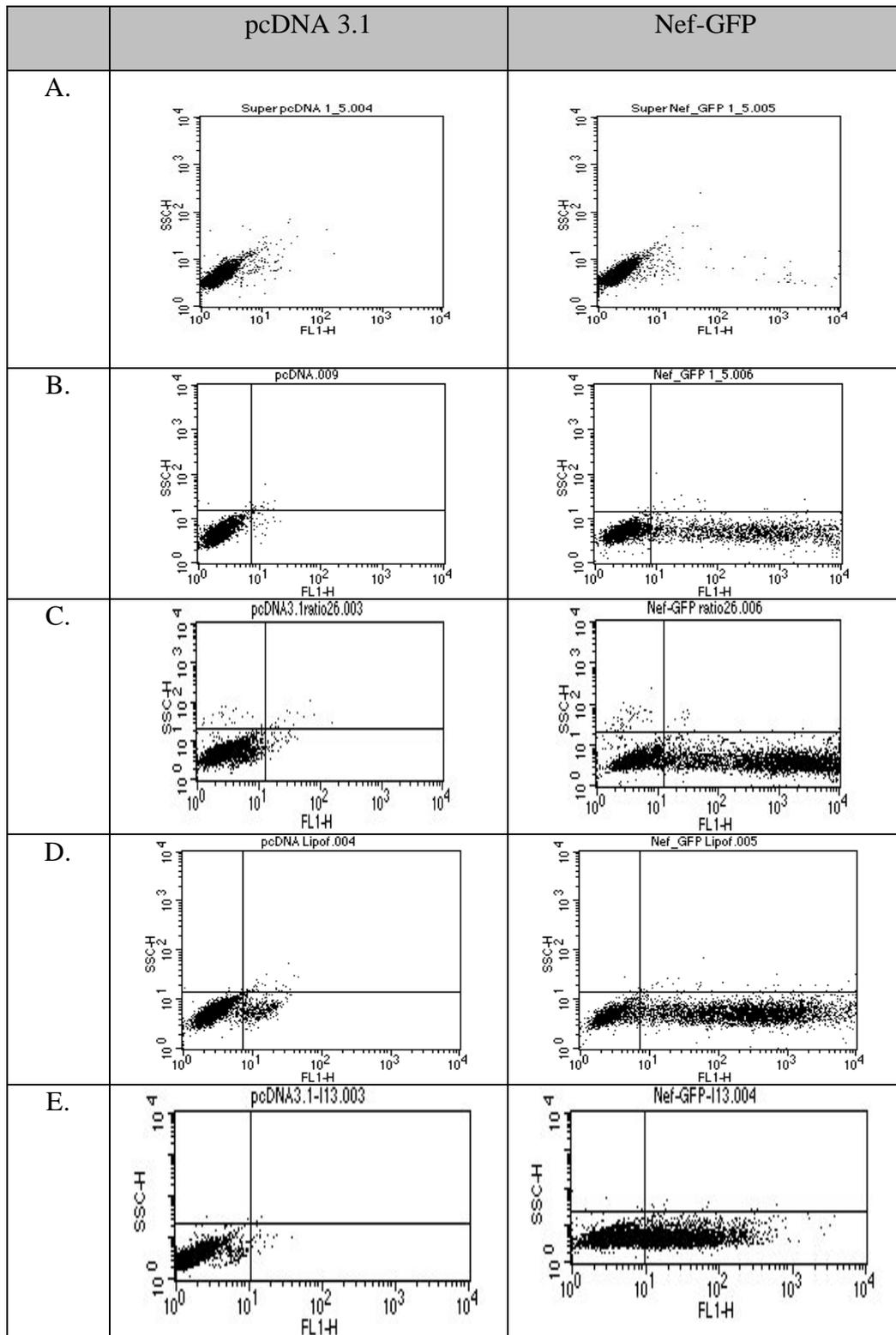


Figure 2 : Analyse en cytométrie de flux de l'expression de Nef-GFP 48 h post-transfection. Les graphiques représentent la granularité (SSC-H) en fonction de la fluorescence dans les cellules transfectées avec pcDNA3.1 (gauche) et Nef-GFP (droite) en utilisant le Superfect (A), le Fugene 6 (B), le Fugene HD (C), la Lipofectamine (D) et la nucléofection (E). La fluorescence a été analysée 48 h post-transfection sur des cellules trypsiniées puis lavées et resuspendues dans du tampon PBS contenant 1 % d'albumin sérique bovine.