

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master
Spécialité : Biochimie appliquée

THÈME

*Le trafic cellulaire de la protéine Tat du VIH-1 :
contribution à l'apparition de l'immunodéficience
associée au SIDA*

Travail réalisé par :

- **ABBAS Massissilia**
- **AIT HAMADOUCHE Ferroudja**

Présenté le 27/09/2017 devant le jury :

Président	Mr. OUELHADJ A.	Maître de conférences classe A à L'UMMTO
Promoteur	Mr. YEZID H.	Maître de conférences classe B à L'UMMTO
Examineur I	Mr. BOUAZZA B.	Maître de conférences classe A à L'UMMTO
Examinatrice II	Mme. HELLAL Z.	Maître assistante classe A à L'UMMTO

Promotion 2016/2017

Remerciements :

Ce mémoire est le résultat d'un travail de recherche de près de cinq mois.

En préambule, on veut adresser tous nos remerciements aux personnes avec lesquelles on a pu échanger et qui nous ont aidés pour la rédaction de ce mémoire.

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur Monsieur YEZID H., maître de conférences classe B à l'UMMTO, son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité

On tient à remercier avec plus grande gratitude Monsieur OUELHADJ A., maître de conférences classe A à l'UMMTO, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire

On remercie également Monsieur BOUAZZA B., maître de conférences classe A à l'UMMTO, et Madame HELLAL Z., maître assistante classe A à l'UMMTO, d'avoir accepté de se joindre à ce jury comme examinateurs.

** A nos familles et nos amis qui par leurs prières et leurs encouragements, on a pu surmonter tous les obstacles*

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Sommaire

Introduction générale:	01
Chapitre 1 : Généralités sur le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1).....	03
I .Historique	03
II. Présentation générale et mode de transmission du VIH-1	03
III. Origine simienne du VIH	04
IV. Classification du VIH-1.....	04
V. Structure du VIH-1	05
V.1.Génome du VIH-1.....	06
V.2.Les différentes protéines constituant le VIH-1	07
V.2.1.Les glycoprotéines de l'enveloppe	07
V.2.2.Les protéines de structures.....	07
V.2.3.Les protéines enzymatiques	08
V.2.4.Les protéines de régulation et accessoires.....	08
VI. Cycle de réplication du VIH-1	09
VI.1. Phase précoce.....	10
VI.2. Phase tardive	11
VII. Evolution clinique de l'infection VIH-1	13
VII.1.La phase de primo-infection.....	13
VII.2.La phase chronique (asymptomatique).....	14
VII.3.Le stade SIDA	14
VIII .L'immunopathologie d'une infection à VIH-1	15
IX. Les Traitements antirétroviraux	16
Chapitre II : Biologie structurale et fonctionnelle de la protéine Tat du VIH.....	18
I .Description de la protéine	18
II. Structure de Tat.....	18
II.1.Structure primaire.....	18
II.2.Structure tertiaire.....	20
II.3.Structure quaternaire	21
III .Les différents rôles de Tat au cours de l'infection VIH-1.....	23
III.1.Rôle dans la transactivation de la transcription	23
III.2.Autres fonctions	24

Chapitre3 : Le trafic Ins and Outs de la protéine Tat du VIH-1.....	27
I. mécanisme de la sécrétion de la protéine Tat du VIH-1 par les cellules infectées	27
I.1.Généralités sur la sécrétion des protéines.....	27
I.2. Généralités sur la sécrétion non conventionnelle	28
I.2.1.Les phosphoinositides (PtdIns) impliqués dans la sécrétion non-conventionnelle des protéines.....	28
II. Le mécanisme non conventionnel de l'externalisation de Tat.....	30
III. Entrée de Tat dans les cellules avoisinantes par endocytose.....	33
III.1.Généralités sur l'endocytose	33
III.1.1. Le mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine	33
III.1.2.La voie endocyttaire de dégradation	36
IV. Internalisation de Tat.....	37
IV.1.La translocation pH dépendante de Tat des endosomes vers le cytosol.....	38
Chapitre 4: implication de Tat dans l'apparition de l'immunodéficience associée à l'infection VIH-1	40
I. Induction de l'apoptose des Lymphocytes-T CD4 non-infectées par Tat du VIH-1	40
I.1. Généralités sur l'apoptose (la mort cellulaire programmée)	40
I.2. Implication de Tat dans l'induction de l'apoptose des cellules LT CD4	42
II. Inhibition de la phagocytose par Tat du VIH-1 au niveau des phagocytes non-infectées	44
II.1.Généralités sur la phagocytose	44
II.1.1.Les phagocytes.....	44
II.1.2. Récepteurs de surface, mécanisme de reconnaissance des ligands.....	45
II.1.3.Le mécanisme de phagocytose.....	46
II.2.Tat inhibe la phagocytose en empêchant le recrutement de Cdc42 sur la coupelle phagocytaire	48
II.2.1. Le rôle de Cdc42 et du PtdIns (4,5) P2 dans la phagocytose	48
II.2.2.mécanisme d'inhibition de la phagocytose par Tat VIH-1	49
Discussion et perspectives.....	51
Références bibliographiques	54

Liste des Figures

Figure 1: schéma représentatif de la structure du VIH-1..	05
Figure 2:Image d'une observation de la particule du VIH-1 au microscope électronique à transmission.....	06
Figure 3: Représentation schématique de l'organisation génique du VIH-1.	06
Figure 4:Représentation schématique du cycle de réplication du VIH-1.....	09
Figure 5 : Rôle de Tat et Rev dans l'expression des protéines virales.....	12
Figure 6: Représentation de la progression de l'infection à VIH-1: charge virale et concentration plasmatique en lymphocytes T CD4+	15
Figure 7: Les différents domaines fonctionnels de la protéine Tat.....	19
Figure 8:Etude de la variation de la structure primaire de Tat du VIH-1	20
Figure 9: Structures RMN de Tat du VIH-1	21
Figure 10 : Structure du complexe Tat/P-TEFb/ATP résolue par cristallographie aux rayons X	22
Figure 11 : Modèle du complexe d'activation de la transcription médiée par Tat-TAR.....	24
Figure 12:La voie de sécrétion classique des protéines	28
Figure 13:Localisation intracellulaire des différents phosphoinositides et les voies du trafic membranaire.....	29
Figure 14: La structure biochimique de phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PtdIns (4,5)P2)	30
Figure 15: Recrutement de la protéine Tat par la membrane plasmique lors de la sécrétion non conventionnelle	32
Figure 16:Sécrétion de Tat par la cellule infectée.....	32
Figure 17: Schéma représentant les différentes étapes de formation de la vésicule recouverte de clathrine	34
Figure 18: Les différentes représentations de Catherine.(A) : Structure en triskelion de la clathrine en microscopie électronique.(B) Deux triskélions, chaînes lourdes en gris ou rouge, chaînes légères en jaune (C) : Structure d'une vésicule tapissée de clathrine « cage de clathrine » modélisée.....	34
Figure 19: La voie d'endocytose	36
Figure 20:La translocation du Tat vers le cytosol	39
Figure 21:Les deux voies de signalisation de l'apoptose	41
Figure 22:Déclenchement de l'apoptose par la protéine Tat par perturbation du réseau micro tubulaire des cellules LTCD4.....	43
Figure 23:Le processus de phagocytose.....	47
Figure 24:Effets de Tat sur le recrutement de Cdc42 au niveau de la coupe phagocytaire	50

Liste des abréviations

AIF : ApoptiqueInducing Factor.

AND: Acide Desoxyribonucleique.

ARN: Acide Ribonucleique.

Bcl- 2 : B-cell lymphoma-2.

CA : Capside.

COPII : CoatProtein II.

CPA: Cellule Présentatrice D'antigènes.

CTI: Complexe de transcription inverse.

DD : Death Domain.

DR: Death Receptor.

Egr1 :Early growth response protein.

FADD : Fas Associated Death Domain.

FOXO3a: Forkheadbox transcription factor O class 3a.

gp :glycoprotéine.

HAART :Highly active antiretroviral therapy.

INNTI: Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.

IP : Inhibiteur de la Protéase.

LB: Lymphocyte B.

LT CD4 :lymphocytesT CD4.

MA : Matrice.

MAPs : Microtubule-AssociatedProteins.

NC :Nucléocapside.

Nef :Negative regulatory factor.

NLS : Nucléair Localisation Signal.

NSF : N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein.

PBS: Primer Binding Site.

PP1 : Protéine Phosphatase 1.

PPT: Poly Purine Tract.

PTD :Protein Transduction Domain.

PtdIns (4,5) P2 : Phosphatidylinositol 4,5 Biphosphate.

PtdIns :Phosphatidylinositol.

RE : Réticulum endoplasmique.

Rev :Regulator of virion.

RT: Reverse Transcriptase.

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise.

SIV : Simian Immunodéficience Virus.

Tat : transactivateur de la transcription.

TNF R: Tumor Necrosis Factor Receptor.

TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand.

Vif: Viral infectivity factor.

VIH-1 : virus d'immunodéficience humain type 1

Vpr: Viral protein r.

Vpu:Viralprotein u.

*Introduction
générale*

Introduction générale

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un rétrovirus du genre lentivirus, il a été décrit et identifié pour la première fois au début des années 1980 comme l'agent causant le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), l'une des plus importantes maladies infectieuses auxquelles fait face l'humanité, et l'un des plus difficiles défis de santé publique du XXI^e siècle. Il se présente sous deux formes, le VIH de type 1 et le VIH de type 2, ce dernier est moins pathogène et moins répandu que le premier.

Nous ne limiterons dans ce travail à l'étude du VIH-1, puisqu'il représente le responsable de la majorité des cas d'infections au niveau mondial. La particularité de ce rétrovirus est qu'il s'attaque directement au système immunitaire, et provoque l'apparition de profonds dysfonctionnements immunologiques. Il infecte les LT CD4+, véritable chef d'orchestre des défenses anti-infectieuses. Afin de se répliquer, le VIH-1 est doté d'un génome contenu dans la capsid virale, il est composé de deux brins d'ARN simple brin de 10 kb de polarité positive. Il contient neuf gènes dont trois (*Gag*, *Pol* et *Env*) communs à l'ensemble des Retroviridae et sont nécessaires à l'accomplissement d'un cycle viral productif. Le gène *Gag* « groupe antigène » code pour les protéines de la capsid (CA) appelée également « core » : la matrice (MA), et la protéine de nucléocapsid (NC). Le gène *Pol* pour « polymérase » code pour les protéines enzymatiques nécessaires à la réplication virale : la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN). En plus des protéines de structure, le génome du VIH-1 code aussi pour six autres protéines dites de régulation et accessoires : Tat et Rev qui sont des protéines régulatrices essentielles et Vif, Vpr, Vpu et Nef sont dites « accessoires ». Ces protéines jouent un rôle important dans la réplication du virus.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'apport de la protéine régulatrice Tat (trans-activateur de la transcription) du VIH-1 et sa grande importance dans l'apparition et la progression de l'infection à VIH-1. Cette petite protéine virale de 14 kDa composée de six domaines, dont chacun joue un ou plusieurs rôles particuliers au cours des différents stades de l'infection. Notons que, outre son rôle majeur dans la transcription virale, elle exhibe plusieurs autres fonctions qui permettent l'expression du virus et son implication dans la pathogénicité. Fortement sécrétée par les cellules infectées, Tat entre dans les cellules non infectées et induit de nombreux processus biologiques tels que l'apoptose, la sécrétion de cytokines ainsi que l'inhibition de la phagocytose par blocage de la formation des pseudopodes nécessaires pour l'ingestion des microbes. Cette contribution à la pathogénie du

virus fait de Tat une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapies antivirales. Les connaissances acquises concernant la structure de Tat et ses modes de trafic cellulaire permettent de proposer de nouvelles approches pour identifier des inhibiteurs spécifiques aux fonctions de Tat.

Comment cette protéine contribue-t-elle à la pathogénicité du VIH-1 ? Et quelles sont les découvertes les plus récentes concernant sa grande mobilité et sa contribution à l'apparition de l'immunodéficience chez les sujets infectés ? Nous essayeront de répondre le long de cet exposé à ces deux questions majeures s'articulant autour de la protéine Tat du VIH-1.

*Chapitre 1 : Généralités
sur le Virus de
l'Immunodéficience
Humaine de type 1
(VIH-1)*

Chapitre 1: Généralités sur le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1)

I. Historique

Aux débuts des années 1980, les premiers cas du SIDA ont été décrits aux Etats-Unis ; de rares infections opportunistes ainsi que des cancers qui semblaient résistants à tout traitement se mirent à être développés par des individus ainsi que des toxicomanes à New York et en Californie ; des infections pulmonaires causées par un parasite (*Pneumocystis carinii*) et des tumeurs de la peau dites sarcome de kaposi. Toutes ces manifestations infectieuses et tumorales associées à une dépression sévère de l'immunité et le fait qu'elles soient circonscrites à des groupes humains identifiables laissent penser que cette immunodépression pourrait être d'origine infectieuse et transmissible (Levy et al., 2004).

En 1983, l'équipe du professeur Luc Montagnier et ses collègues découvre le virus à l'institut Pasteur de Paris. En 1984 cette découverte fut amplifiée par l'équipe du Docteur Robert Gallo de l'institut du cancer des Etats-Unis. D'un commun accord, le virus observé par les deux équipes est appelé virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Les tests permettant de mettre en évidence la présence d'anticorps à l'égard du VIH-1 dans le sang été mis aux points en 1985. Un retard de quelques mois dans la mise en place de ces tests dans plusieurs pays européens été à l'origine de plusieurs contaminations. Les caractéristiques des cellules infectées par le VIH-1 sont mises en évidence dès 1986, il s'agit d'une population de lymphocytes TCD4 exprimant le récepteur CD4 qui sert de récepteur au virus (Clavel et al., 1986). Il a été démontré que d'autres cellules exprimant le récepteur CD4 (tels les monocytes du sang et macrophages des tissus) ainsi que d'autres cellules ne le portant pas pouvaient aussi être infectées par le VIH-1 (Levy et al., 2004).

II. Présentation générale et mode de transmission du VIH-1

Le VIH-1 est un rétrovirus de la famille des *Lentivirus* d'un diamètre de 80 à 120 nm, et la taille du génome est d'environ 10 kb. Le taux de production viral journalier chez un individu infecté est estimé à 10^{10} virions /jour ; des milliards de virions émergent chaque jour au sein d'un même individu. Le virus de l'immunodéficience humaine est transmis essentiellement par contact sexuel, exposition au sang et aux dérivés sanguins contaminés et passage de la mère à l'enfant pendant la période prénatale. Le VIH-1 a été isolé dans la plupart des liquides biologiques humains : le sang, le sperme, le plasma, les sécrétions utérines, l'urine, le liquide céphalo-rachidien, les larmes et la salive.

III. Origine simienne du VIH

Les virus de l'immunodéficience VIH-1 et VIH-2 sont le résultat de plusieurs transmissions inter-espèces du virus simiens (SIV) à l'homme. Les (SIV) provenant de différentes espèces de primates sont désignés à l'aide d'un code de trois lettres faisant référence au nom commun en anglais de leur espèce d'origine. Les virus de l'immunodéficience simienne (VIS) les plus proches de VIH-1 sont le VIScpz et VISgor qui infectent naturellement les chimpanzés (*Pan troglodytes*) et les gorilles (*Gorilla gorilla*) d'Afrique centrale (Lemey et al., 2003). Les VISsmm retrouvés chez les mangabeys enfumés (*Cercocebus atys*) d'Afrique de l'ouest sont les plus proches au VIH-2 (Korber et al., 2000).

IV. Classification du VIH-1

Le VIH-1 est un virus de la famille des *Retroviridae*, appartenant au genre *Lentivirus*. Ces derniers sont des virus enveloppés et leur génome se compose de deux copies d'ARN monocaténaire de polarité positive. Les Rétrovirus possèdent tous une transcriptase inverse (Geretti 2006). Ils sont classés en deux grandes catégories : les rétrovirus endogènes et les rétrovirus exogènes. D'après le Comité International de Taxonomie des Virus (CITV), les rétrovirus exogènes se divisent en deux sous-familles : les *Orthoretrovirinae* et les *Spumaretrovirinae*. C'est dans la sous-famille des *Orthoretrovirinae*, qui se divise en 6 genres, que l'on trouve le genre des *Lentivirus*, genre auquel appartiennent les VIH-1 et VIH-2. Le nom *Lentivirus* provient de leur capacité à produire une maladie chronique à évolution lente, car ils prennent du temps pour produire tous les effets indésirables dans un organisme (Geretti, 2006).

Le VIH-1 présente une grande variabilité génétique et est disséminé à travers le monde. En effet, il existe plusieurs variantes de VIH-1 classées en divers groupes :

- M pour Main ou Majoritaire. Il regroupe 9 sous-types de VIH (de A à K) classés en fonction de leurs séquences virales, ainsi que de nombreuses formes recombinantes circulantes (CRFs). Le sous-groupe C est prédominant à l'échelle mondiale, et le B en France, en Europe et en Amérique du Nord (Clavel et al., 1986).
- O, pour Outlier, est un groupe très rare retrouvé dans certains pays d'Afrique comme le Gabon et le Cameroun.
- N pour Non-M et Non-O, très rare aussi, est localisé principalement au Cameroun.

- P, individualisé en 2009. Ce nouveau variant a été isolé pour la première fois chez une patiente d'origine Camerounaise, qui était suivie en région parisienne depuis 2004 (Buonaguro et al., 2007).

V. Structure du VIH-1

Les virions du VIH-1 existent sous forme de particules sphériques en dehors de la cellule hôte. C'est un petit virus entouré par une enveloppe externe, constituée par une bicouche lipidique provenant de la cellule hôte (Cannon et al., 1997). Son enveloppe renferme une matrice, une capsidie contenant deux molécules d'ARN monocaténaire de polarité positive, montrée dans la figure 1.

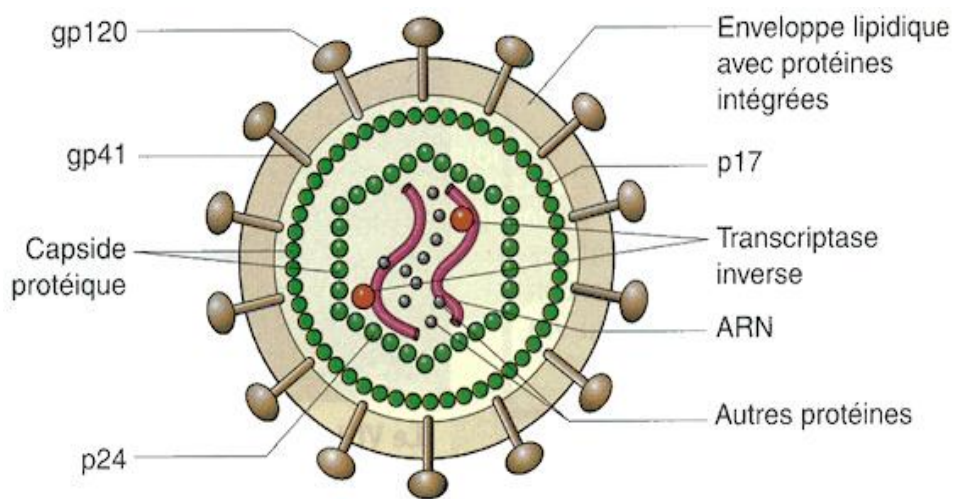


Figure 1 : Schéma représentatif de la structure du VIH-1 (Briggs and Krausslich 2011). Le virus du VIH-1 est constitué d'une bicouche phospholipidique contenant les protéines gp 120 et gp41 ainsi que d'autres protéines, le génome viral et la transcriptase inverse sont empaquetés dans la capsidie virale.

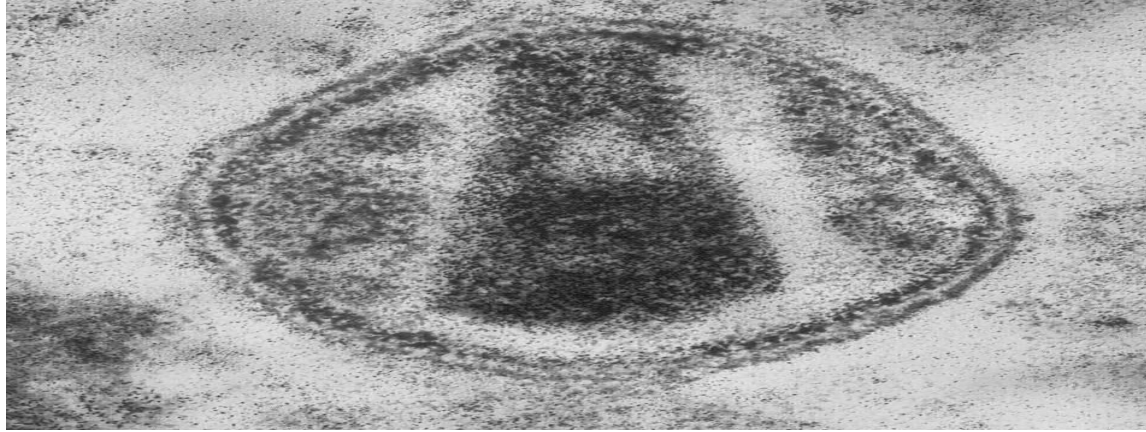


Figure2: Image d'une observation d'une particule du VIH-1 au microscope électronique à transmission (Briggs and Krausslich 2011).

V.1. Génome du VIH-1

Le génome du VIH-1 est constitué de deux copies linéaires d'ARN simple brin de polarité positive, associées à deux molécules de transcriptase inverse et de l'intégrase. Ce génome est constitué de neuf gènes, trois gènes, *Gag*, *Pol* et *Env*, codent respectivement pour les protéines enzymatiques et les protéines de structure de nouvelles particules virales, et six autres gènes, *Tat*, *Nef*, *Rev*, *Vif*, *Vpr* et *Vpu* codent pour les protéines accessoires et de régulation. La séquence LTR (Long Terminal Repeat) présente au deux extrémités de chaque brin de l'ARN viral, permet de contrôler la réplication virale (voir figure3) (Romani et al., 2010).

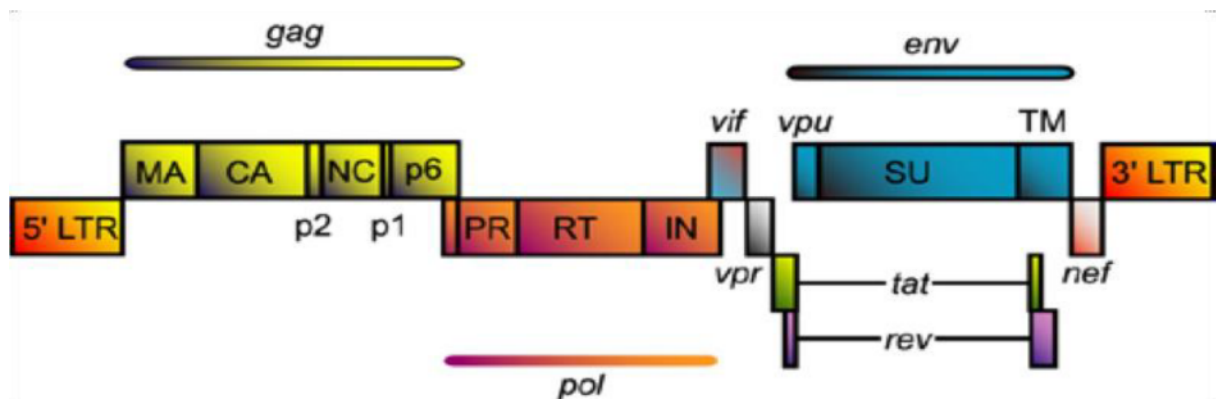


Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation génétique du VIH-1.(Stoltzfus and Madsen, 2006).Le génome du VIH-1 contient trois gènes principaux : *Gag*, *Pol* et *Env*, communs à tous les rétrovirus. Le VIH-1 contient deux gènes régulateurs : *Rev* et *Tat*, ainsi que quatre gènes, *Vif*, *Vpr*, *Vpu* et *Nef*, codants pour les protéines accessoires.

V.2.Les différentes protéines constituant le VIH-1

V.2.1.Les glycoprotéines de l'enveloppe

Les glycoprotéines gp 41 et gp 120 sont issues du clivage du précurseur gp 160 par la protéase cellulaire de type furine (Murphy et al., 1994).

La protéine gp120 : (120 KDa) est une protéine de surface qui interagit avec le récepteur CD4 des lymphocytes T, ainsi elle joue un rôle indispensable lors de la pénétration du virus dans la cellule cible (Perez et al., 1992).

La protéine gp 41 : est une glycoprotéine transmembranaire de 41 KDa, elle est impliquée dans le relargage de la capsid dans la cellule hôte, elle permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (Murphy et al., 1994).

V.2.2.Les protéines de structure

- **La protéine de la matrice MA (17 KDa)**

Elle issue de la maturation du gène *Gag*, elles tapissent la partie intra cytoplasmique de l'enveloppe virale avec la membrane lipidique interne (Massiah et al., 1994).

La protéine de la matrice MA possède une région (Aa 54 à68), qui est impliquée dans l'assemblage de la particule virale en permettant la formation d'oligomères de Gag (Cannon et al., 1997).

- **La protéine de la capsid CA (24KDa)**

Elle constitue la capsid du virus mature en lui conférant une structure conique (Ganser-Pornillos et al., 2007).

- **La protéine de la nucléocapsid NC (7KDa)**

Elle est caractérisée par la présence de domaines en doigt de zinc de type (CCHH) qui participent à l'encapsulation de l'ARN viral, et donc contribue à son infectivité (Levin et al., 2005).

- **Le peptide p6**

Il intervient dans les étapes finales du bourgeonnement membranaire des virions en recrutant des protéines cellulaires, telles que ALIX et TSG101, ces dernières sont impliquées dans le relargage des particules virales(Costa et al., 2004).

V.2.3. Les protéines enzymatiques

Le gène *Pol* code pour un précurseur protéique P180, qui est ensuite clivé en P66 et P51 (Transcriptase inverse), P32 (Intégrase) et P10 (Protéase).

La transcriptase inverse: elle catalyse la synthèse de l'ADN à partir de l'ARN viral (Ciuffi et al., 2005).

L'intégrase : a pour rôle de catalyser l'insertion du génome viral sous forme d'ADN double brin dans le génome de la cellule hôte (Leavitt et al., 1992).

La protéase PR : participe au changement de la morphologie des virions après l'étape de bourgeonnement et conduit à leurs maturation (Loeb et al., 1989).

V.2.4. Les protéines de régulation et accessoires

Tat (Transactivator of transcription) : transactivateur de la transcription, située au niveau du nucléole a pour rôle d'induire la transcription complète du génome viral (Bannwarth and Gatignol, 2005).

Rev (Regulator of virion) : impliquée dans la régulation de l'expression des protéines virales (Fisher et al., 1986).

Nef (Negative regulatory factor) : joue un rôle primordial dans la propagation des virus et l'évolution de l'infection vers le stade SIDA en diminuant l'expression du récepteur CD4 et des molécules du CMH de classe I (Quaranta et al., 2006).

Vif (Viral infectivity factor) : facteur d'inféctivité viral, la protéine Vif permet une meilleure maturation des virions et réduit le nombre de particules virales défectueuses (Bardy et al., 2001).

Vpr (viral protein r) : La protéine Vpr facilite le transfert du complexe viral de pré-intégration (PIC) du cytoplasme de la cellule hôte vers son noyau (Popov et al., 1998).

Vpu (viral protein u) : La protéine Vpu n'est exprimée que chez le VIH-1, chez le VIH-2, elle est remplacée par Vpx, qui assure des fonctions identiques. Vpu permet la libération des particules virales lors du bourgeonnement et aussi la dégradation du récepteur CD4 (Schubert et al., 1996).

VI. Cycle de réplication du VIH-1

Le VIH-1 est un virus peu stable, caractérisé par sa grande variabilité génétique à l'intérieur même des sous-groupes. Le taux de mutations est estimé à 1 par 10 000 virus produits. La réplication du VIH-1 dans l'organisme a lieu dans de nombreux tissus (Ganglions lymphatiques, intestin, thymus, cerveau, muscle...etc.) et /ou liquides biologiques (sang, liquide broncho alvéolaire...etc.), dans lesquels on retrouve les cellules cibles du VIH-1. Les étapes de la réplication sont communes à tous les *Rétrovirus*. Elle se déroule en deux phases : la phase précoce et tardive (illustrée dans la figure 4)

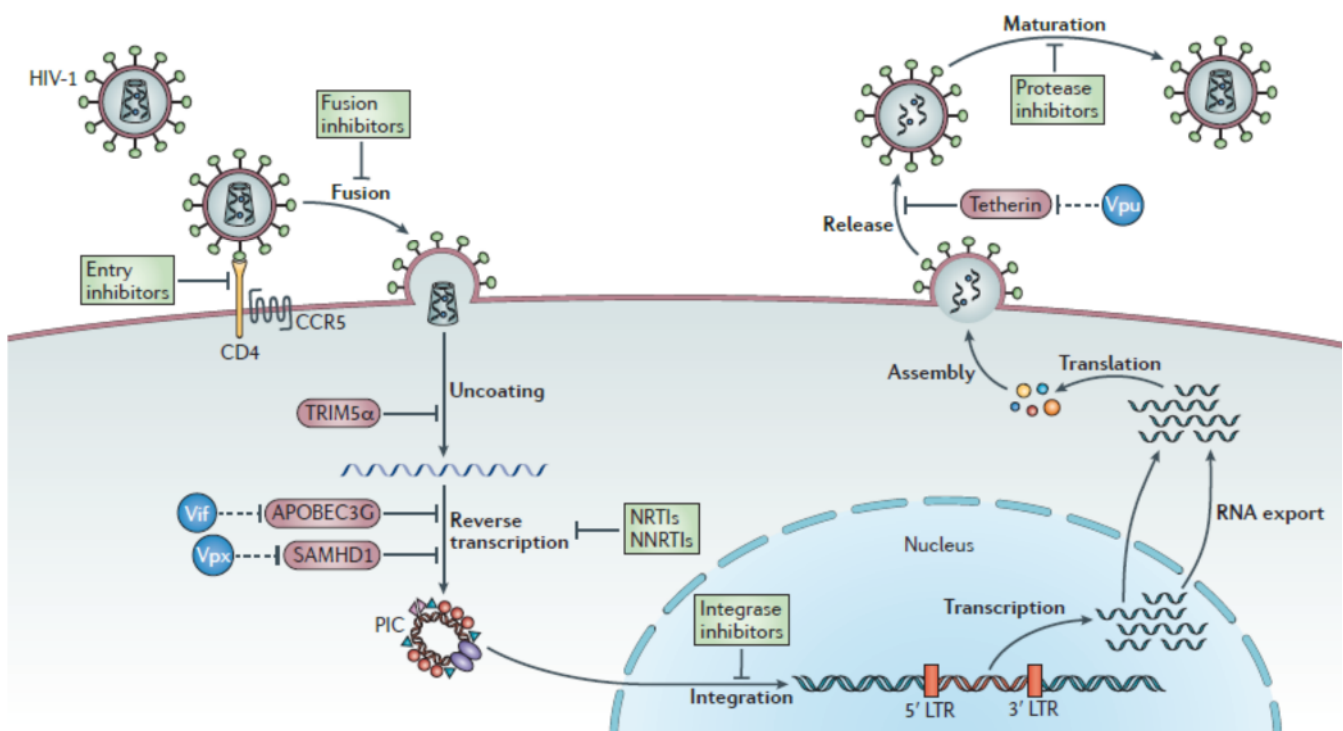


Figure 4 : Représentation schématique du cycle de réplication du VIH-1 (Miyachi et al., 2009). La Figure illustre les étapes principales du cycle de réplication du VIH-1: *Liaison du virus au récepteur CD4 en présence du co-récepteur; *Fusion du virus avec la membrane de la cellule hôte; *Décapsidation et libération de l'ARN du VIH-1 et des protéines virales dans le cytoplasme; *Transcription inverse de l'ARN viral en ADN double brin; *Formation du complexe de pré-intégration (PIC) et translocation vers le noyau. *Une fois dans le noyau, l'ADN viral est intégré dans l'ADN hôte et ensuite transcrit pour former de nouveaux ARN viraux qui sont transportés vers la surface de la cellule pour former de nouveaux virus immatures. *bourgeonnement des nouveaux virus. *Enfin, pendant la maturation, l'enzyme protéase clive la polyprotéine structurale pour former des protéines Gag matures, ce qui entraîne la production de nouveaux virions infectieux. Les principales familles de médicaments antirétroviraux (en vert) et les étapes du cycle de vie qu'ils bloquent sont indiquées. Les facteurs clés de restriction du VIH (motifs tripartites contenant 5 α (TRIM5 α), APOBEC3G, SAMHD1 et Tetherine (en rouge) et leurs antagonistes viraux correspondants (Vif, Vpx et Vpu (en bleu). CCR5, CC-chimiokine 5; LTR, longue répétition terminale; INTI, inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse; NNRTI, inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.

VI.1. Phase précoce

A. Mécanismes d'entrée

Le processus d'entrée du virus dans la cellule cible, constitue la première étape de l'infection virale. Elle se fait via la reconnaissance de la gp120 du récepteur cellulaire CD4. Ce récepteur est présent à la surface des lymphocytes T auxiliaires, des macrophages, des cellules dendritiques. Cette interaction gp120/CD4 induit un changement de conformation de la gp120, qui va permettre son interaction avec un corécepteur transmembranaire qui est l'un des récepteurs aux chimiokines CCR5 ou CXCR4. La formation de ce complexe trimérique entraîne un second changement conformationnel de la gp120 qui va exposer le domaine fusogène situé à l'extrémité N-terminale de la gp41. Il y a alors fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, provoquant la libération de la capsidie dans le cytoplasme de la cellule cible (Clapham and McKnight, 2002).

B. Décapsidation

Une fois dans le cytoplasme, la capsidie se désagrège de façon partielle afin de libérer le génome viral. Durant ce désassemblage, a également lieu la formation du Complexe de transcription inverse (CTI) (Clapham and McKnight, 2002).

C. Transcription inverse

La transcription inverse est le mécanisme au cours duquel l'ARN viral simple brin est converti en ADN double brin. Cette étape est assurée par une enzyme virale, la reverse transcriptase (RT), dotée d'une activité ADN polymérase sur une matrice d'ARN ou d'ADN ainsi que d'une activité RNase H, qui dégrade les séquences ARN dans les hétéro-duplex ARN-ADN. Le produit final est un ADN double brin, constitué de deux extrémités U3-R-U5 qui forment les séquences LTRs. Ces LTRs jouent un rôle dans l'intégration, ils sont aussi importants pour la régulation de l'expression des gènes viraux (Hu and Hughes, 2012).

D. Transport intracellulaire et import nucléaire

Les protéines virales et cellulaires qui composent le CTI lui permettent de se déplacer vers le noyau le long du réseau intracellulaire des microtubules (Bukrinskaya et al., 1998). Au cours de cette migration, le CTI évolue en un complexe de pré-intégration (CPI) qui est dépourvu de RT et de protéine de la capsidie (Iordanskiy and Bukrinsky, 2009).

Ce complexe est capable de traverser la membrane nucléaire pour permettre à l'ADN proviral d'accéder aux chromosomes de la cellule hôte.

E. Intégration

C'est l'intégrase virale (IN) qui assure l'étape d'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire de l'hôte. Une fois intégré, le provirus se comporte comme n'importe quel gène cellulaire de l'hôte (Van Maele and Debyser, 2005).

VI.2. Phase tardive

Cette phase correspond aux étapes du cycle viral lui permettant d'obtenir des virions complets et infectieux, qui seront capables de bourgeonner et subir une maturation après libération dans le milieu extracellulaire.

A. Transcription et traduction : Une fois dans le noyau, l'ADN viral est intégré de façon stable. Le provirus peut alors choisir deux chemins : la latence (dormance), associée à une chromatine fermée et l'absence de facteurs de transcription, ou bien de transactivation active (Bushman et al., 2005). Dans ce cas, les gènes viraux vont être transcrits par l'ARN polymérase II cellulaire en même temps que le génome de la cellule hôte.

Lors de ce processus de transcription, une première phase de transcription appelée Tat-indépendante, permet la production de faibles quantités d'ARN messagers viraux de taille limitée, causée par la faible processivité de l'ARN polymérase II. Ces ARNs sont multi-épissés et sont exportés vers le cytoplasme via la voie normale d'export des ARNm. Ils codent pour les protéines régulatrices Tat, Nef et Rev. Ces protéines sont ensuite importées dans le noyau. La seconde phase de transcription, appelée 'Tat-dépendante' peut alors avoir lieu en présence de la protéine Tat. Cette dernière va se fixer au niveau de la séquence régulatrice TAR (trans-activation response) de l'ARN viral transcrit (voir le détail du mécanisme dans le chapitre suivant). Cela permet le recrutement de plusieurs facteurs cellulaires et la transcription, en augmentant la processivité de l'ARN polymérase II (Zhou and Sharp, 1995). Tat permet alors la production d'ARNs mono épissés (d'environ 4 kb), codants pour les protéines Env, Vif, Vpu et Vpr) et non épissés (environ 9,2 kb), codants pour les précurseurs protéiques Gag, Pol et Pro. Ces ARNs sont alors exportés vers le cytoplasme par la voie d'export Rev-dépendante. Ces ARNs sont ensuite traduits et permettent la production de polyprotéines qui s'assemblent pour former de nouvelles particules virales, qui deviendront infectieuses après maturation. Enfin, les transcrits non épissés servent également d'ARN génomique viral après dimérisation, ils sont encapsidés dans les nouveaux virions (voir figure 5) (Zhou and Sharp 1995).

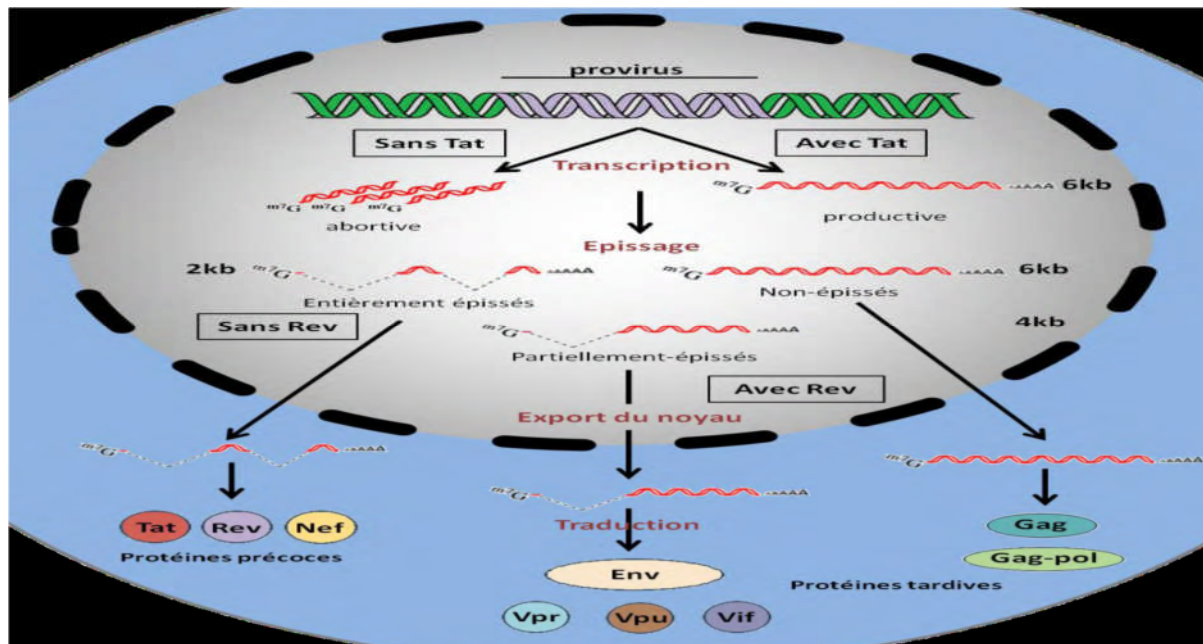


Figure 5 : Rôle de Tat et Rev dans l'expression des protéines virales (Pollard and Malim 1998). Les protéines virales Tat et Rev jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes du VIH-1. Tat stimule la transcription des gènes viraux. Rev permet l'expression des gènes tardifs du VIH-1 issus de l'expression des ARNs non-épissés et partiellement épissés (Pollard and Malim, 1998).

B. Assemblage et Bourgeonnement

L'assemblage des particules virales est un processus complexe qui résulte d'un ensemble d'interactions protéine-protéine, protéine-ARN et protéine-lipide. La polyprotéine Gag (pr55) est l'acteur principal de cet assemblage. Gag est constitué de quatre domaines majeurs : la matrice (MA) situé sur la région N-terminale, la capsid (CA), la (NC) délimité par les peptides « spacer » SP1 et SP2, et la protéine P6 sur la partie C-terminale. Chacun de ces domaines assure un rôle précis pour catalyser l'assemblage des composants viraux. La protéine de la matrice (MA) qui est myristoylée sur son extrémité N-terminale, est impliquée dans l'interaction de Gag avec la membrane plasmique et le domaine intra-cytoplasmique de la gp41. Le domaine CA permet l'assemblage multimérique des protéines Gag qui vont former la structure sphérique du nouveau virion immature. Ce domaine interagit également avec le précurseur Gag-Pol qui comporte les enzymes virales. La nucléocapside (NC) qui interagit avec l'ARN viral non épissé est importante pour l'encapsidation des deux copies d'ARNs qui constitueront le génome du virus. La protéine P6 se lie à la protéine Vpr. L'ensemble de ces interactions permettent l'assemblage des différents composants viraux et conduisent à la formation de particules virales immatures qui bourgeonnent au niveau de la membrane plasmique (Jouvenet et al., 2011).

Afin de réaliser la dernière étape du bourgeonnement et la libération des virions, le VIH-1 détourne la machinerie cellulaire ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), qui joue un rôle majeur dans le transport vésiculaire. Pour cela, le domaine p6 de Gag interagit directement avec la sous-unité TSG101 du complexe ESCRT-I et avec la protéine ALIX (facteurs de la machinerie ESCRT, ESCRT-1 (avec TSG101) et ALIX) (Jouvenet et al., 2011). Ces interactions aboutissent à la formation de la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) qui va catalyser la fission des membranes virales et cellulaires suivi de la libération des virions immatures dans l'espace extracellulaire (Jouvenet et al., 2011).

C. Maturation des virions

La maturation des virions s'effectue en même temps ou immédiatement après le bourgeonnement. Le précurseur Gag-Pro-Pol possède une sous-unité inactive qu'est la protéase virale (PR). L'étape de maturation débute lorsque plusieurs domaines Gag-Pro-Pol s'autoclivent. L'autoclivage permet la production d'une protéase mature (PR) sous forme de dimère qui va générer les protéines MA, NC, CA et p6 à partir de Gag et Gag-Pro-Pol et les protéines enzymatiques IN, PR et RT à partir de Gag-Pro-Pol. Ces protéines virales se réarrangent pour donner une particule virale mature, comportant son core conique caractéristique et la condensation de l'ARN génomique par la NC. En plus de la maturation du virus, cette dernière étape est également essentielle à l'infectivité de la particule virale (Chu et al., 2012).

VII. Evolution clinique de l'infection VIH-1

L'immunopathologie du VIH-1 est caractérisée par trois phases distinctes : la phase de primo-infection (ou phase aigüe), la phase chronique (ou asymptomatique) et la phase SIDA.

VII.1. La phase de primo-infection

Après infection, le VIH-1 atteint les organes lymphoïdes secondaires et déclenche une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Cette phase est caractérisée par un nombre de plus en plus élevé de cellules infectées à cause d'une production massive du virus, ainsi qu'une chute des LT CD4. Deux à quatre semaines après infection une grande partie du virus est éliminée grâce aux réponses cellulaires des LTCD8 et LTCD4, ainsi qu'à la production accrue des anticorps spécifiques anti-VIH-1, cela permet une remontée du taux de LTCD4.

La phase de primo-infection est souvent accompagnée de symptômes qui peuvent passer inaperçus comme la fièvre, céphalées et myalgie qui coïncide avec une virémie plasmatique élevée (réplication intense du virus dans les organes lymphoïdes secondaires). La majorité des virus isolés lors de la primo-infection sont des isolats R5 et les virus X4 n'apparaissent que plus tard pendant l'infection (Deeks et al., 2015).

VII.2. La phase chronique (asymptomatique)

Dans cette phase, malgré que le système immunitaire continue de s'endommager sérieusement, les sujets infectés par le virus restent asymptomatiques. La chronicité de l'infection peut durer en moyenne dix ans, au cours de cette période, le virus subit des mutations qui lui permettent d'échapper aux réponses du système immunitaire et continuer à se répliquer dans les organes lymphoïdes (Girard et al., 2011).

Malgré la réplication virale intense, le renouvellement constant des cellules immunitaires permet le contrôle de la charge virale. Les lymphocytes T CD4 semblent se renouveler rapidement malgré leur destruction par le virus, cela continue jusqu'à épuisement des organes lymphoïdes centraux ne permettant plus leur régénération. Le taux de LT CD4 diminue progressivement tandis que la charge virale augmente, conduisant ainsi le patient au stade de l'immunodéficience ou SIDA (Naif, 2013).

VII.3. Le stade SIDA

Lorsque le nombre de cellules LT CD4 passe en dessous du seuil critique (moins de 200 LT CD4+/ μ l de sang), le système immunitaire est dit effondré. Cela entraîne une très forte augmentation de la virémie. L'organisme n'est donc plus capable de se défendre face aux pathogènes qu'il rencontre, ce qui ouvre la voie à l'apparition de maladies opportunistes. Ce sont des infections graves provoquées par des microorganismes, habituellement non pathogène, qui profite de l'opportunité de l'immunodéficience et aboutit à des pathologies sévères tel que la tuberculose, l'herpe et la salmonellose qui en cas de non traitement entraîne la mort de l'individu en une période de 1 à 3 ans (montrée dans la figure 6) (Rosenberg et al., 1997).

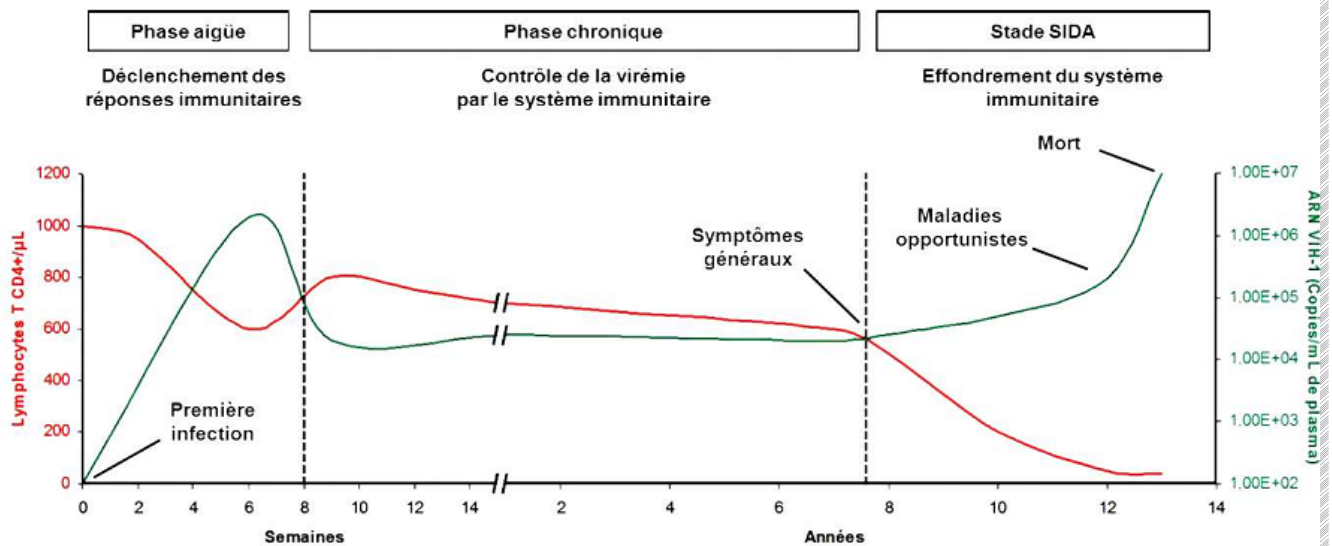


Figure 6: représentation de la progression de l'infection à VIH-1: charge virale et concentration plasmatique des lymphocytes T CD4+ (Fauci and Desrosiers, 1997). L'évolution de la charge virale plasmatique (en vert) et de la concentration des lymphocytes T CD4+ circulants (en rouge) au cours du temps.

VIII. Immunopathologie de l'infection VIH-1

Le système immunitaire est un réseau complexe de cellules dont la fonction principale est de protéger l'organisme contre les agressions externes. Il peut être divisé en deux composantes: innée et adaptative, qui fonctionnent en complète synergie. Lors de l'intrusion d'un pathogène, les cellules de l'immunité innée sont les premières à intervenir. Elles répondent de manière rapide mais peu spécifique. Cette première ligne de défense peut parfois s'avérer insuffisante et nécessite la mise en place d'une réponse adaptative plus spécifique et ciblée dotée d'une mémoire. Pour cela, des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dont les monocytes, les macrophages, et les cellules dendritiques, jouent le rôle de relais de l'information. Elles sont capables de capturer et dégrader le pathogène puis de présenter les antigènes apprêtés aux cellules de l'immunité adaptative que sont les LT et les LB. La réponse LT existe sous deux types de réponses effectrices : une réponse à médiation cellulaire assurée par les LT CD8+ cytotoxiques qui détruisent de manière spécifique les cellules cibles et une autre à médiation humorale exécutée par les lymphocytes B qui secrètent des anticorps solubles capables de neutraliser spécifiquement un pathogène. Ces deux réponses sont régulées par les LT CD4+ (LT helpers).

Malgré la présence de ces deux lignes de défense immunitaire, le VIH-1 parvient à instaurer une persistance à long terme dans l'organisme hôte. Il n'est jamais éliminé de l'organisme. La particularité de ce virus est qu'il s'attaque directement au système

immunitaire, et provoque l'apparition de profonds dysfonctionnements immunologiques. Il infecte les LT CD4+. Progressivement, l'infection entraîne la destruction de ces cellules et entraîne un déficit immunitaire sévère, c'est-à-dire que l'organisme perd une grande partie de ses capacités à lutter contre de multiples agents infectieux (virus, bactéries, champignons) et certains cancers. Arrivé au stade d'immunodépression, certains agents infectieux ordinaires se mettent à provoquer des infections dites opportunistes dont les conséquences peuvent être dramatiques et causer le décès du patient (Abdul-Aziz et al., 2016).

IX. Traitements antirétroviraux

Depuis la découverte du VIH-1, beaucoup de travaux se sont focalisés sur le développement d'inhibiteurs du VIH-1. Les différentes options thérapeutiques disponibles, ont pu transformés cette infection, d'une infection fatale à une maladie chronique gérable qui a peu d'effet sur l'espérance de vie, notamment dans les pays de l'hémisphère nord (Barre-Sinoussi et al., 2013).

Au moment des premiers rapports sur le SIDA, Les cliniciens se limitaient à traiter les infections opportunistes associées à la maladie avec des succès bien limité. Ce n'est que lorsque le VIH-1 a été identifié en tant que virus responsable de la maladie et son cycle de vie bien caractérisé que les communautés scientifiques ont commencé à étudier les approches antirétrovirales. La première étape de la thérapie contre le VIH-1 a vu le jour en 1987, lorsqu'un essai clinique a montré qu'AZT (Zidovudine) (en monothérapie) a pu diminuer la mortalité chez les patients atteints du SIDA par blocage de l'étape de la transcription inverse du cycle de réplication du VIH-1. Cependant, la résistance virale est rapidement apparue, et donc de nouveaux médicaments ont été développés en se basant sur de nouvelles cibles au fur et à mesure de l'évolution des connaissances en relation avec le cycle de réplication du VIH-1 (Van Epps and Kalayjian, 2017).

Le traitement de l'infection au VIH-1 a évolué en une bithérapie puis finalement à une trithérapie nommée HAART (Highly active antiretroviral therapy). La HAART se définit par un traitement comprenant au moins trois antirétroviraux, constitué en général de deux inhibiteurs nucléosidiques (NRTI) de la transcriptase inverse (RT) et un inhibiteur non nucléoside de la RT (NNRT) ou un inhibiteur de la protéase (PI).

Il existe actuellement plusieurs classes de médicaments antirétroviraux composés d'une variété de molécules, et parmi celles ci on distingue:

- **Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI)** : l'AZT ou Zidovudine fait partie de cette classe de médicaments, ou encore l'Abacavir, le d4T ou Stavudine ...etc.
- **Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)** ; par exemple Névirapine, Delavirdine.
- **Inhibiteurs de la protéase (IP)**; comme le Saquinavir, Atazanavir, Arunavir.
- **Inhibiteurs de l'entrée et de la fusion.** utilisés plus tard dans la maladie, lorsque le patient a déjà pris plusieurs autres médicaments ; exemple, l'Enfuvirtide ou T20.
- **Inhibiteurs de l'intégrase** : utilisés plus tard dans la maladie, lorsque le patient a déjà pris plusieurs autres médicaments. Dolutégravir, Raltégravir.
- **Inhibiteurs des récepteurs CCR5**, comme le Maraviroc.

Ces antirétroviraux ralentissent la progression de l'infection au VIH-1 en s'attaquant au virus afin de réduire le plus possible la charge virale, c'est-à-dire le nombre du virus (VIH-1) présent dans le sang ; pour améliorer la fonction immunitaire et réduire considérablement le risque de développement du SIDA. Bien que ce traitement fournit un contrôle viral réussi, le VIH-1 reste persistant et pas complètement éradiqué, et les tests et les traitements restent insuffisants. Un grand nombre de scientifiques se sont mis à travailler sur le développement de vaccins efficace contre le VIH-1 notamment en ciblant quelques protéines virales tel que gp120 et Tat (voir la partie discussion).

*Chapitre II : Biologie
structurale et
fonctionnelle de la
protéine Tat du VIH-1*

Chapitre II : Biologie structurale et fonctionnelle de la protéine Tat du VIH-1

L'expression du virus de l'immunodéficience (VIH-1) dans l'hôte est assurée par l'intervention d'un certain nombre de protéines virales, parmi celles-ci on trouve la protéine Tat qui est l'une des protéines régulatrices les plus importantes pour l'expression des gènes viraux dans la cellule hôte, et capable de moduler différents processus cellulaires. De plus, Tat est sécrétée par la cellule infectée et peut être internalisée par les cellules voisines; Par conséquent, elle affecte les cellules infectées et non infectées afin d'amplifier le pouvoir pathogène du virus (Musinova et al., 2016).

I .Description de la protéine Tat du VIH-1

La protéine Tat (Transactivator of Transcription) est une petite protéine virale basique de 14 kDa (Poids Moléculaire apparent). Elle est codée par deux exons qui se trouvent de part et d'autre du gène *Env* dont la longueur varie entre 99 et 103 acides aminés selon les isolats viraux (Debaisieux et al., 2012). La forme prédominante est constituée de 101 résidus (Clark et al., 2017).Le premier exon code pour les acides aminés 1 à 72 et le second pour les résidus 73 à 86 ou 73 à 100.Seuls les 67 premiers acides aminés, correspondant à l'extrémité 5' du premier exon, sont indispensables pour une complète activité de la protéine. A titre de comparaison, la protéine Tat du VIH-2 possède 130 acides aminés et Tat de SIV provenant des singes verts d'Afrique et des mandrills contient 100 résidus et 110 résidus respectivement (Hetzer et al., 2005).

II .Structure de Tat

II.1.Structure primaire

Malgré le taux de mutation élevé du VIH-1, Tat est relativement bien conservée chez tous les *Lentivirus* de primates. La séquence principale de Tat peut être divisée en six domaines montrés sur la Figure 7. Le domaine I amino-terminal, (résidus 1 à 21) (Clark et al., 2017), où apparaît une périodicité de résidus acides, polaires, et hydrophobes (riche en proline) qui contribue à la formation d'une hélice, caractéristique de nombreux activateurs de la transcription chez les eucaryotes. Le domaine II est riche en résidus cystéine (en position 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37), la substitution d'une seule d'entre elles (à l'exception de la cystéine 31) abolit totalement l'activité de la protéine Tat, indiquant par là l'importance de ces résidus. Leur substitution par des acides aminés non cystéiniques réduit de manière significative l'activité de Tat, suggérant que toute la séquence est importante pour la fonction de la protéine, son rôle le plus probable étant d'en stabiliser la structure.(Clark et al., 2017).

Le domaine III ou 'cœur' (résidus 38 à 49) est très conservé et essentiel à la fonction transactivatrice de Tat dont les premiers 48 acides aminés sont suffisants pour la liaison à la cycline T1 (CycT1), qui est un composant de la transcription positive et au facteur d'allongement (P-TEFb). Le domaine IV (résidus 49 à 57) est une région basique formée d'acides aminés chargés positivement (riche en Arginine). Elle aurait deux fonctions essentielles: permettre le transport de la protéine du cytoplasme vers le noyau (contient le domaine de la transduction de protéines: PTD), le signal de localisation nucléaire et permet l'interaction de Tat avec la séquence TAR de la région LTR de l'ARN viral (Clark et al., 2017). Le domaine V (résidus 58 à 73) est riche en résidus glutamine et est impliquée dans la polymérisation des microtubules et l'apoptose des cellules T. Les premiers 72 acides aminés sont codés par le premier exon tandis que le 2ème exon code pour la partie C-terminale de la protéine. Cette dernière interagit avec les intégrines grâce à la présence du motif RGD (Clark et al., 2017).

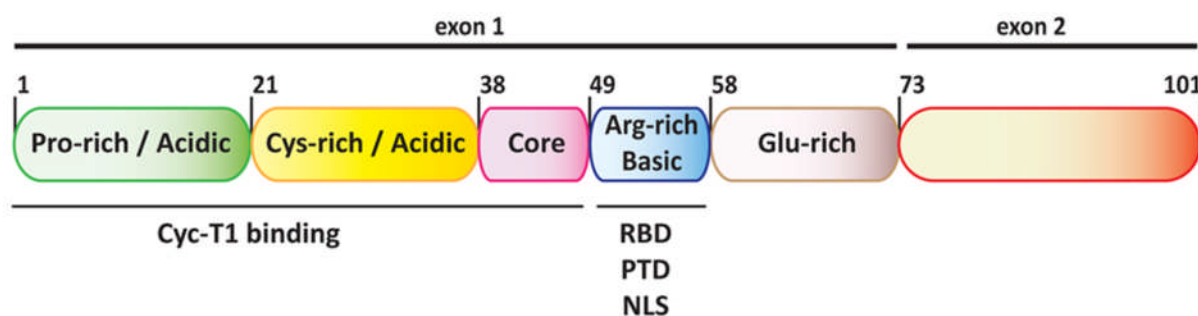


Figure 7: Les différents domaines fonctionnels de Tat (Clark et al., 2017). Tat est subdivisé en six domaines fonctionnels. Les 5 premiers domaines, codés par le premier exon, sont suffisants pour la trans-activation de la transcription virale et modulent la plupart des interactions avec les cellules. Le domaine basique riche en arginine fonctionne comme un domaine de liaison à l'ARN (RBD), un domaine de transduction de protéines (PTD) et un signal de localisation nucléaire (NLS). Les seconds codes d'exon pour le domaine C-terminal qui contient un motif tri-peptide RGD, n'apparaissent pas, il est nécessaire pour les fonctions de Tat dans la culture cellulaire mais pourrait contribuer à la pathogénèse virale *in-vivo*.

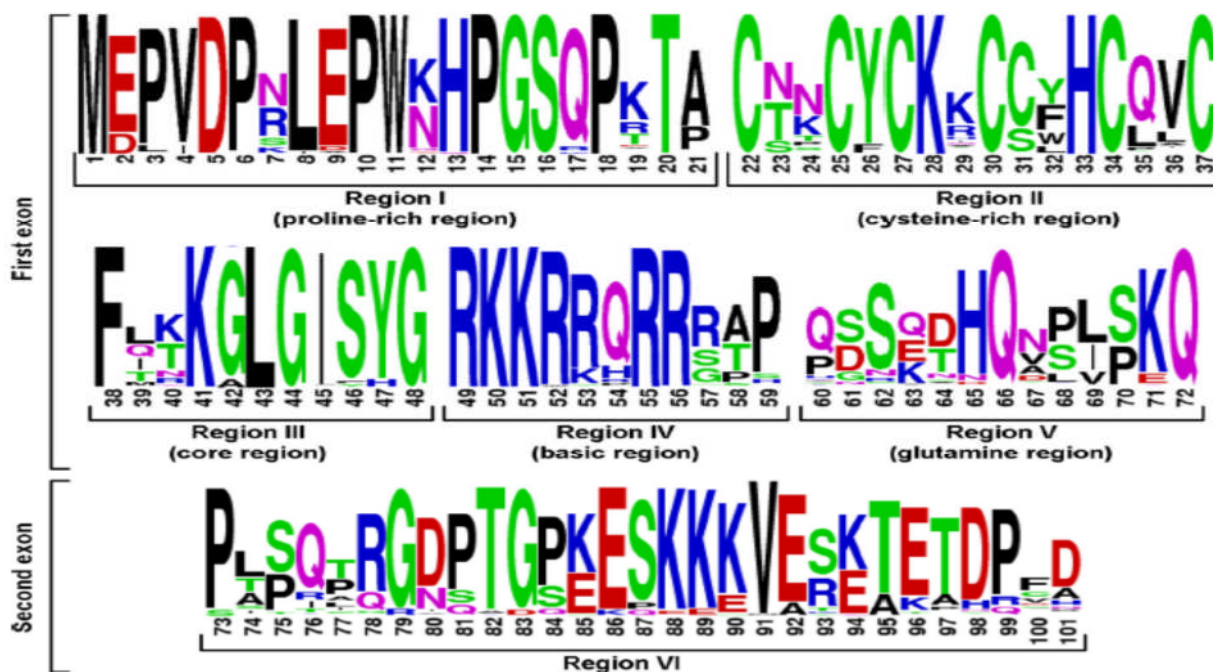


Figure 8 : Etude de la variation de la structure primaire de Tat du VIH-1, analyse effectuée sur 3378 séquences de Tat référencées dans la banque de données NCBI avec le programme (<http://weblogo.berkeley.edu>) (Musinova et al., 2016). Tat est une petite protéine, codée par deux exons. Elle est divisée en six régions différentes. Région I (résidus 1-21) est une région riche en proline et possède un Trp-11 très conservé. La région II (résidus 22-37) a sept cystéines, région très conservés. Région III (résidus, 38-48) a une Phe-38 conservée ainsi que la séquence 43-LGISYG-48 qui est aussi conservé. La région IV (résidus 49-59) est riche en acides aminés basiques comme la lysine et l'arginine et a une séquence très conservée 49-RKKRRQRRRAP-59. La région V (résidus 60-72) est une région riche en glutamine avec la plus forte variation de séquence. La région VI constitue le C-terminus de Tat, qui est codé par le second exon.

II.2. Structure tertiaire

D'après Clark *et al* 2012, les études de cristallographie indiquent que le manque d'une structure rigide de Tat lui permet la formation de nombreux complexes avec affinité élevée, et ceci avec divers partenaires (protéines ainsi que lipides ou sucres), chacun impliquant une conformation spécifique différente de Tat ; Néanmoins, Tat n'a pas montré la présence d'une organisation structurale secondaire majeure par des analyses de dichroïsme circulaire, et sa structure secondaire repose fortement sur l'effet de polarité avec solvant. Ces résultats indiquent que Tat est une protéine très flexible et intrinsèquement désordonnée. Elle se lie fortement à la séquence TAR, ainsi que la cycline T1 ainsi que le phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate (PtdIns (4,5) P2) (Debaisieux et al., 2012). La résolution de la structure tridimensionnelle de Tat par résonance magnétique nucléaire (RMN), (Peloponese et al., 2000) montre que le Trp-11 est situé en position centrale de la molécule, pris en sandwich

entre le noyau et les domaines riches en Glutamine où la stabilité de sa conformation se fait via des interactions électrostatiques entre le domaine amino-terminal acide (en particulier Asp / Glu 2) et le domaine basique (Debaisieux et al., 2012).

La première étude structurale par RMN a été réalisée sur le variant Tat Z2 (figure 9) composé de 86 acides aminés en présence d'un agent réducteur, le dithiothreitol (DTT). L'état d'oxydation des cystéines de la région II de Tat est un indicateur important de la fonctionnalité de la protéine virale.

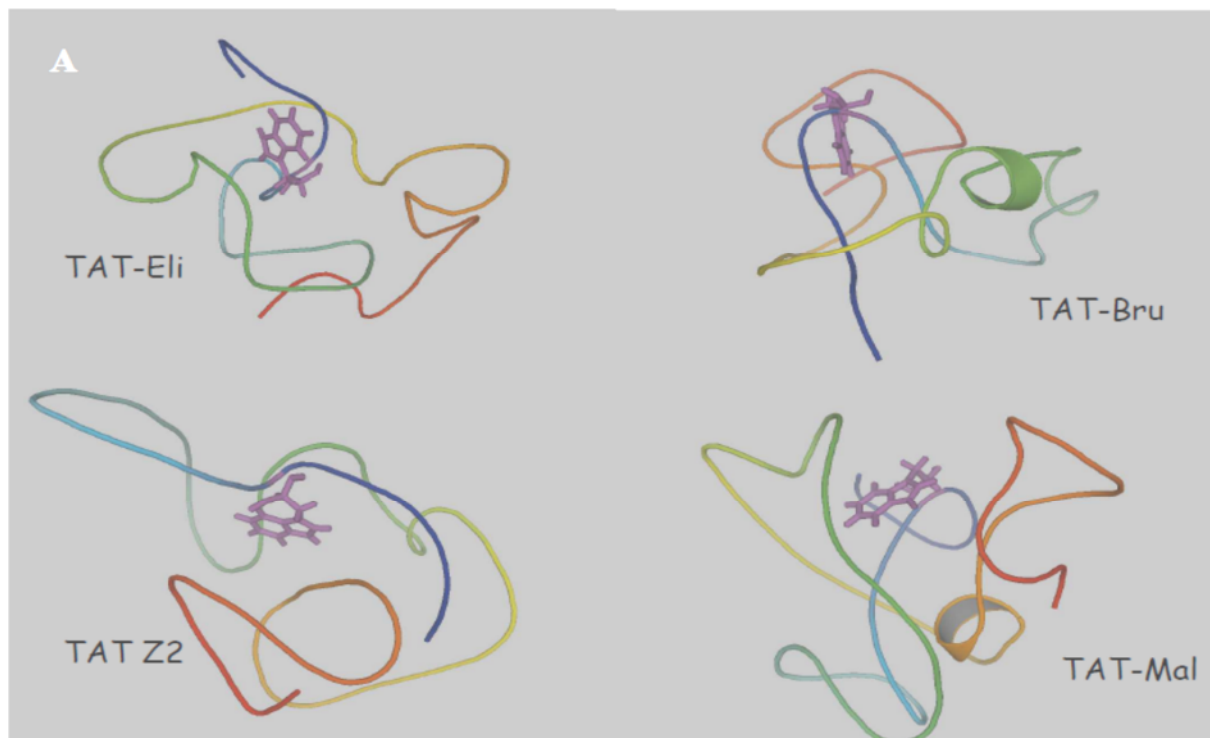


Figure 9 : Structures RMN de Tat du VIH-1 disponible à ce jour. Structures tridimensionnelle des 4 variants de Tat du VIH-1 construites à l'aide du logiciel Pymol(www.pymol.org). Tat Z2 (1TIV), Tat Bru (1JFW), Tat Mal (1K5K), Tat Eli (1FKU) représenté en Ribbon, le Tryptophane 11 mis en magenta représenté en sticks.

II.3. Structure quaternaire

Une étude majeure très récente a mis en évidence des changements structuraux de la protéine Tat lorsque cette dernière est liée au complexe P-TEFb (voir Figure 10). (Complexe constitué de la cycline T1 et de la kinase CDK9)(Tahirov et al., 2010) ; En effet, cette étude montre que la protéine Tat acquiert une conformation étendue lorsqu'elle est surtout associée à la cycline T1. Il est également montré que lorsque Tat est lié au P-TEFb et à deux ions zinc, son domaine d'activation acquiert une structure bien ordonnée, formant un pont médié par un atome Zn avec la Cys261 de la Cycline T1.

La fixation de Tat à P-TEFb couvre 3499 Å² de la surface du facteur, dont 88% sont sur la Cycline T1 et 12% sont sur Cdk9. De toute évidence, Tat se lie étroitement au P-TEFb car 37% de sa surface réplée (acides aminés 1-49) est complémentaire à la kinase. La surface formée entre ces deux protéines constitue le double de la valeur moyenne des surfaces d'interaction stables entre 2 protéines (Tahirov et al., 2010). Cette interaction entraîne des changements structuraux importants du complexe P-TEFb qui lui permet d'avoir une meilleure efficacité au cours du processus transcriptionnel (Tahirov et al., 2010).

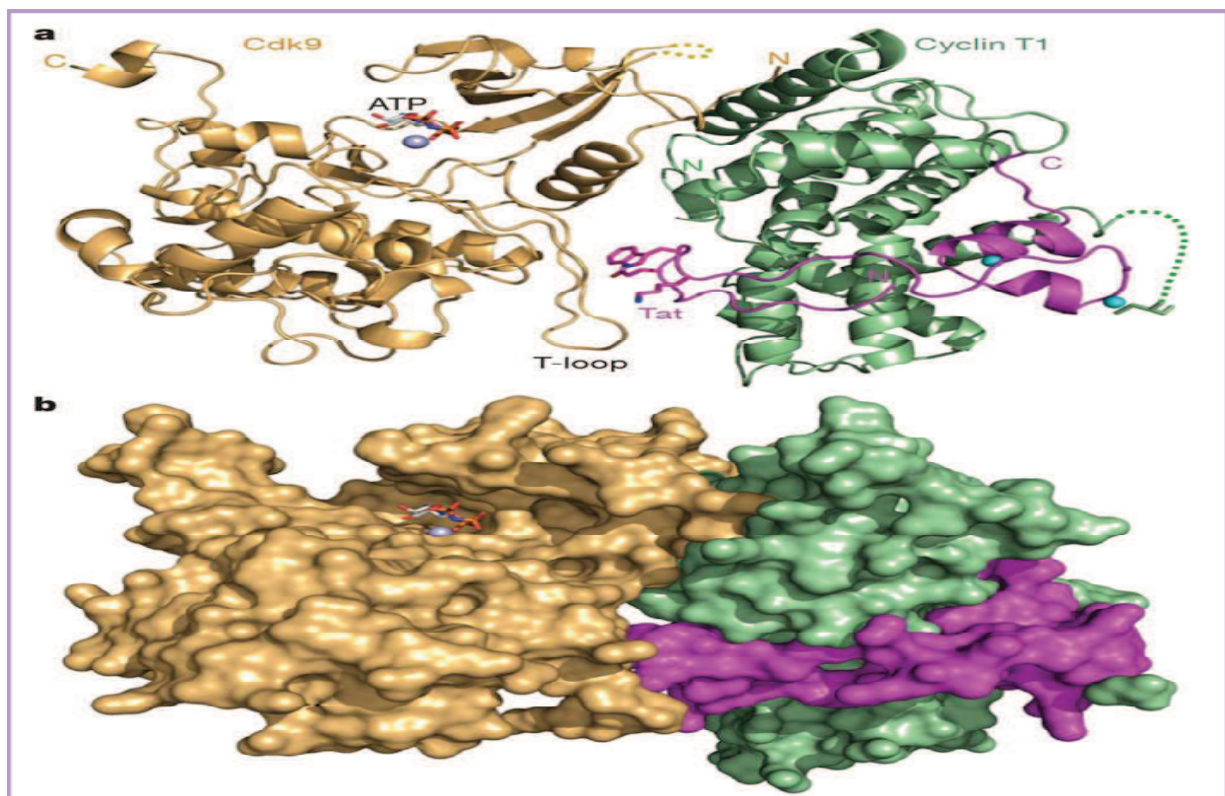


Figure 10 : Structure du complexe Tat/P-TEFb/ATP résolue par cristallographie aux rayons X (Tahirov et al., 2010). (a) Représentation Ribbon et (b) représentation surface de la structure du complexe Tat/P-TEFb/ATP. Cdk9 est en orange clair, la cycline T1 en vert pâle et Tat en magenta. Les chaînes latérales des résidus de Tat interagissant avec Cdk9, la Cystéine 261 (Cys 261) de la Cycline T1 et l'analogue de l'ATP sont représentés en forme Sticks. Les atomes de zinc et de magnésium sont respectivement représentés en sphères azur et bleu clair. Les lignes en pointillés représentent les chaînes manquantes entre la lysine 88 (Lys 88) et la glycine 97 (Gly 97) de Cdk9, et entre la Leucine 252 (Leu 252) et la cystéine 261 (Cys 261) de la Cycline T1.

III. Différents rôles de Tat au cours de l'infection VIH-1

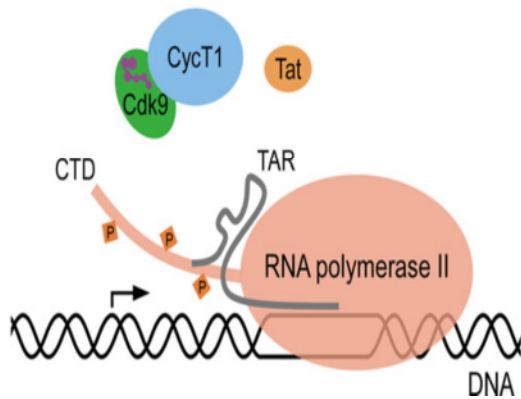
III.1. Rôle dans la transactivation de la transcription

C'est l'une des premières protéines à être exprimée après l'apparition de l'infection (Bagashev and Sawaya, 2013). La transactivation de la transcription est la fonction la plus connue de Tat et la plus décrite. Cette protéine fonctionne comme un adaptateur moléculaire qui recrute les éléments de la machinerie transcriptionnelle sur l'ARN viral en cours de synthèse. Elle a donc une fonction cruciale dans la multiplication des virus dans les cellules T infectées (Rayne et al., 2010).

Le complexe de pré-initiation de la transcription (composé de différentes protéines cellulaires dont l'ARN polymérase II (ARNpol II) et les facteurs de transcription TFII (-A, -B, -D, -E, -F)) est assemblé au niveau de la boîte TATA. La synthèse du transcrit débute suite à la phosphorylation de la Sérine 5 du domaine carboxy terminal (CTD) de l'ARN polymérase II. Cependant, après la synthèse de 20 à 30 nucléotides la transcription est bloquée suite au recrutement de deux facteurs négatifs de l'élongation de la transcription NELF et DCIF. Les ARN produits sont alors des transcrits courts, inachevés et non polyadénylés (Tahirov et al., 2010).

La fonction principale de Tat est de favoriser la production d'une transcription complète par sa liaison à une structure « tige-boucle » nommée TAR pour « Tat Associated Region » présente à l'extrémité 5' de tous les transcrits naissants du VIH-1 (Kamori and Ueno, 2017), ce qui va permettre le recrutement de la cycline T1 et de la kinase dépendante de la cycline (Cdk9), composants du facteur d'élongation de la transcription pTEFb (Rayne et al., 2010). Ce facteur va par la suite phosphoryler les facteurs NELF et DCIF, conduisant à leurs libérations du complexe de transcription, ainsi que la phosphorylation de la Sérine 2 du domaine CTD de l'ARN polymérase II. Tous ces événements permettent à l'ARNpol II de réaliser une élongation productive et une synthèse des transcrits de VIH-1 de taille complète (voir Figure 11) (Bigalke et al., 2011).

A paused polymerase



B transcription elongation

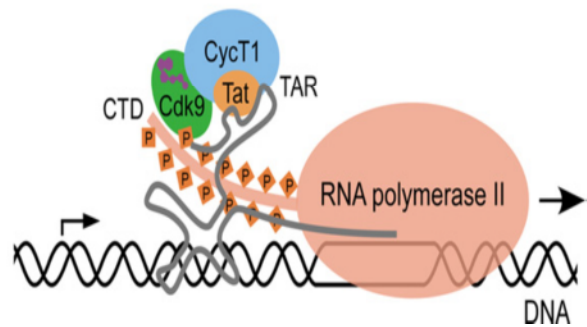


Figure 11 : Modèle du complexe d'activation de la transcription médiée par Tat-TAR (Bigalke et al., 2011) (A) en absence du Tat la Cyclin T1 et Cdk9 (P-TEFb) ne sont pas recrutés, par conséquent la transcription est bloquée. (B) en présence de Tat qui se lie à TAR « Tat Associated Region », Cdk9 de P-TEFb s'active et hyperphosphoryle Ser2 de CTD de l'ARN polymérase II, ce qui induit l'élongation de la transcription du transcrit viral.

III.2. Autres fonctions

-Tat peut être sécrétée par les cellules infectées, où elle peut agir comme une toxine virale qui affecte plusieurs types de cellules, déclenchant diverses réponses qui favorise l'infection par le virus. Elle peut également être directement cytopathique aux cellules T CD4+, neurones et astrocytes ou elle provoque à la fois le déclin des cellules T CD4+, caractéristique de l'apparition du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et les troubles neurologiques associés au VIH-1, qui sont parmi les sources de morbidité les plus sévères pour les patients atteints du SIDA soumis à la thérapie antirétrovirale HAART (Debaisieux et al., 2012).

- Tat stimule l'expression de l'enzyme immunosuppressive l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) dans les cellules dendritiques via l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires y compris, l'interleukine 10 (IL-10), TNF- α (Planes and Bahraoui, 2013). Cette enzyme appartient à la famille de l'oxygénase, elle est impliquée dans la dégradation du tryptophane, douée d'une forte activité immunosuppressive, liée à sa capacité à inhiber la prolifération des LT, via la déplétion du tryptophane et la production de composés cytotoxiques (la kynurenine, le 3-hydroxy-anthranilic acid, et le 3-hydroxy-kynurenine) par les LTh1 et Th17 qui sont les clés pour le contrôle de la réplication virale et la régulation de la réponse immunitaire, et permettant ainsi l'évolution de la maladie vers le stade SIDA (Smith et al., 2001).

- Tat libérée par les cellules T infectées par le VIH-1 permet l'adhésion, la migration directionnelle (chimiotactisme), la capacité à dégrader et traverser les membranes

basales(invasion) et la croissance des cellules endothéliales et du sarcome de Kaposi activées par les cytokines inflammatoires de type Th1(Albini, Barillari et al. 1995).

Le sarcome de Kaposi est une maladie angio-proliférative qui s'est faite connaître lors des premiers cas de SIDA et considérée comme une pathologie opportuniste, associée à l'infection par le virus de l'herpes humain 8 (HHV8). Chez les individus infectés par le VIH-1, le sarcome de Kaposi est plus fréquent et se présente sous une forme plus agressive qui est liée à la protéine Tat(Albini et al., 1995).

En se fixant aux HSPGs (heparan sulfate proteoglycan), Tat empêche la fixation du facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF) à ces derniers, le facteur se retrouve alors sous forme soluble ce qui favorise l'induction de l'angiogénèse, la perméabilité vasculaire et les œdèmes. Ces dernières caractéristiques sont impliquées dans la progression du sarcome de Kaposi (Toschi et al., 2006).

- Il a été montré que Tat est un ligand du LRP (lipoprotein receptor-related protein) (Liu et al., 2000). Son core domaine est directement impliqué dans l'interaction de Tat avec le LRP et cette interaction se fait sur plusieurs sites du récepteur. Elle entre donc en compétition avec les autres ligands du LRP, qui engendre une inhibition de leurs liaisons sur les neurones. Après sa liaison avec le LRP, Tat va être internalisée puis transloquée dans le noyau des neurones. Une fois arrivée dans le noyau, la protéine active l'expression de gènes neuronaux, ce qui contribue aux désordres neurologiques associés au VIH-1.

- La machinerie du silencing de la transcription génique de l'hôte joue un rôle dominant dans l'établissement de la latence du VIH-1.

La latence est un état réversible par lequel un virus pathogène devient dormant (latent) pendant le cycle de vie viral dans les cellules individuelles, la protéine Tat du VIH-1 peut affecter à la fois l'établissement et le renversement de cette latence, car elle joue un rôle important dans la régulation de la transcription virale. En effet, des études de mutagenèse dirigées *in-vitro* ont démontré qu'une activité insuffisante de transactivation de Tat peut entraîner une transcription altérée de gènes viraux et l'établissement d'une latence. Étant donné que Tat est une protéine très variable, il est concevable que des mutations naturelles de cette protéine puissent moduler de manière différentielle les fonctions de Tat, influençant ainsi sur l'établissement et / ou l'inversion de la latence virale *in vivo* (Kamori and Ueno, 2017).

-Tat induit la régulation négative de plusieurs gènes, comme le CMH-1 (Matsui et al., 1996). Les effets de Tat ne sont pas restreints uniquement aux cellules infectées puisque la protéine Tat extracellulaire, sécrétée à partir des cellules infectées, est capable d'entrer dans d'autres cellules et affecter l'expression de nombreux gènes cibles (Ju et al., 2009) provoquant ainsi par exemple l'apoptose et l'immunosuppression (Bennasser et al., 2006).

-Enfin dans les domaines d'application biotechnologique, la partie basique de Tat formée des résidus 47-57, appelés PTD, "domaine de transduction des protéines " grâce à leurs propriétés de traverser la membrane plasmique, les PTD de Tat sont actuellement développés et utilisés comme peptides transporteurs de molécules médicamenteuses, afin de les délivrer à l'intérieure des cellules cibles. Cette technologie est utilisée pour le traitement de nombreuses maladies (Zhang et al., 2012).

*Chapitre 3 : Le trafic
Ins and Outs de Tat
du VIH-1*

Chapitre3 : Le trafic Ins and Outs de Tat du VIH-1

I. mécanisme de la sécrétion de Tat du VIH-1 par les cellules infectées

I.1.Généralités sur la sécrétion des protéines

La plupart des protéines qui suivent la sécrétion classique ou qui sont dirigées vers la surface cellulaire ou dans l'espace extracellulaire contiennent un peptide signal de sécrétion. Les protéines nouvellement synthétisées entrent dans le réticulum endoplasmique grâce à la reconnaissance du peptide signal et leur transport est médié par des transporteurs vésiculaires, qui bourgeonnent à partir d'une membrane donneuse et fusionne avec la membrane cible (Lee et al., 2004). Ces protéines nouvellement synthétisées sortent du RE au niveau de domaines membranaires spécifiques appelés 'sites de sortie'.

A partir de ces sites se forment des vésicules recouvertes par COPII (Coat Protein II) et transitent entre le RE et l'appareil de Golgi (Lee et al., 2004), et c'est dans ce dernier que les protéines subissent des modifications post-traductionnelles et triées afin d'être expédiées vers leur destination finale.

Des vésicules intermédiaires recouvertes de COP I peuvent se former à partir de l'appareil de Golgi et faire un transport antérograde d'autres molécules vers le RE. Le transport au sein de la voie de sécrétion implique des événements de fusion entre des vésicules intermédiaires et des organelles, catalysés par les SNAREs [soluble N-ethyl maleimide-sensitive fusion protein (NSF) et la soluble NSF attachment protein (SNAP)]. Les protéines SNAREs sont divisées en deux groupes : les v-SNAREs (vesicular SNAREs, localisées sur la membrane du compartiment donneur) et les t-SNAREs (Target SNAREs, localisées sur la membrane du compartiment accepteur). La syntaxine 5 est un exemple de t-SNARE, essentielle au transport depuis et vers l'appareil de Golgi (Jahn and Scheller, 2006).

Une protéine v-SNARE donnée reconnaît spécifiquement une protéine t-SNARE cible via les motifs SNARE de chacune de ces protéines (Lee et al., 2004). Les membranes des compartiments donneurs et récepteurs se rapprochent, ce qui permet la fusion des deux compartiments. Les complexes SNAREs sont ensuite dissociés par l'ATPase NSF, via son Co-facteur SNAP. Cela induit le recyclage des v-SNAREs (Voir Figure 12).

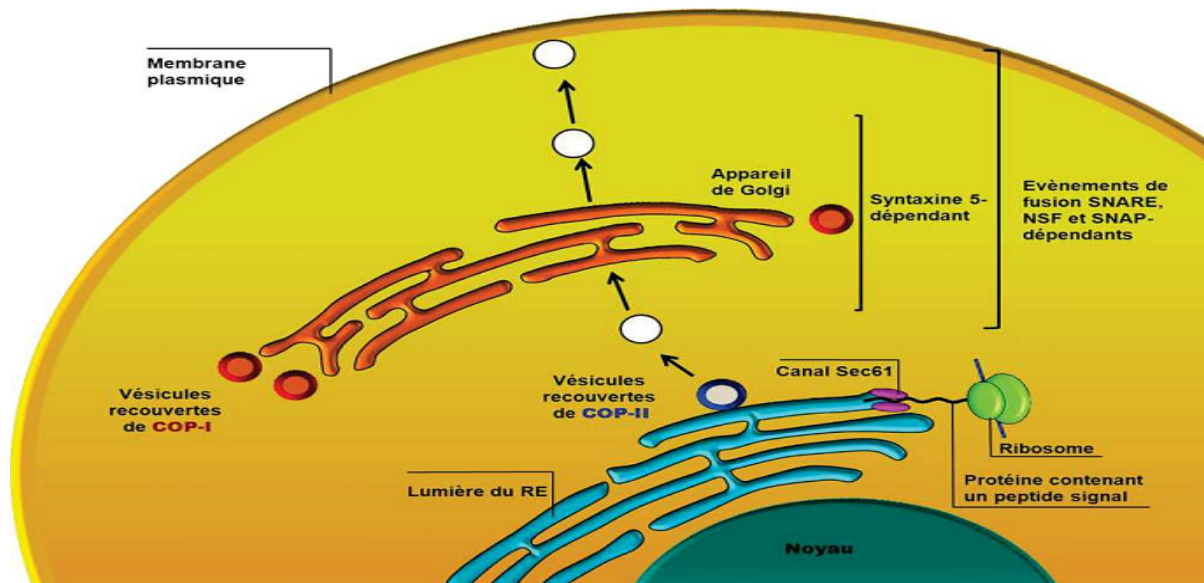


Figure 12: La voie de sécrétion classique des protéines (Nickel and Rabouille, 2009). Les protéines qui empruntent une sécrétion conventionnelle possèdent un peptide signal, ce type de sécrétion est dépendant du système RE /Golgi. Cette sécrétion se fait à l'aide du bourgeonnement de vésicules d'une membrane d'un compartiment donneur et cible la membrane du compartiment récepteur.

I.2. Généralités sur la sécrétion non conventionnelle

Beaucoup de protéines connues sont sécrétées de manière non-conventionnelle tel que des cytokines, des facteurs de croissance et d'autres molécules qui assurent des rôles importants dans la signalisation lors des processus physiologiques comme l'inflammation, l'angiogenèse, la différenciation cellulaire ou la prolifération. Dans la plupart des cas, la sécrétion non conventionnelle des protéines est un processus régulé par des déclencheurs externes. Les protéines utilisant cette voie non pas de peptide signal (Muesch et al., 1990). Cependant, certaines protéines possédant le peptide signal peuvent aussi emprunter cette voie.

I.2.1. Les phosphoinositides (PtdIns) impliqués dans la sécrétion non-conventionnelle des protéines

Les membranes cellulaires ne sont pas des structures figées mais plutôt dynamiques dont les propriétés physico-chimiques font partie des facteurs ayant permis l'apparition de la vie.

La membrane plasmique s'organise en deux feuillets de phospholipides, formant la bicouche lipidique dans laquelle s'insèrent d'autres macromolécules. Parmi ces molécules, les lipides membranaires, et plus particulièrement les phosphoinositides, qui jouent un rôle

majeur dans la régulation spatiotemporelle de différents processus cellulaires tels que la dynamique du cytosquelette, le trafic membranaire, la prolifération et la survie cellulaire.

Les phosphoinositides sont tous métabolisés directement ou séquentiellement à partir du phosphatidylinositol (PtdIns) (Roth, 2004).

Le noyau inositol des PtdIns est un polyol de cyclohexane dont les positions D3, D4 et D5 sont phosphorylables, générant potentiellement sept PtdIns différents : le phosphatidylinositol-3-phosphate PtdIns (3)P, le PtdIns (4)P, le PtdIns (5)P, le PtdIns (3,4)P₂, le PtdIns (3,5)P₂, le PtdIns (4,5)P₂ et le PtdIns (3,4,5)P₃ (illustrée par la figure 13) .

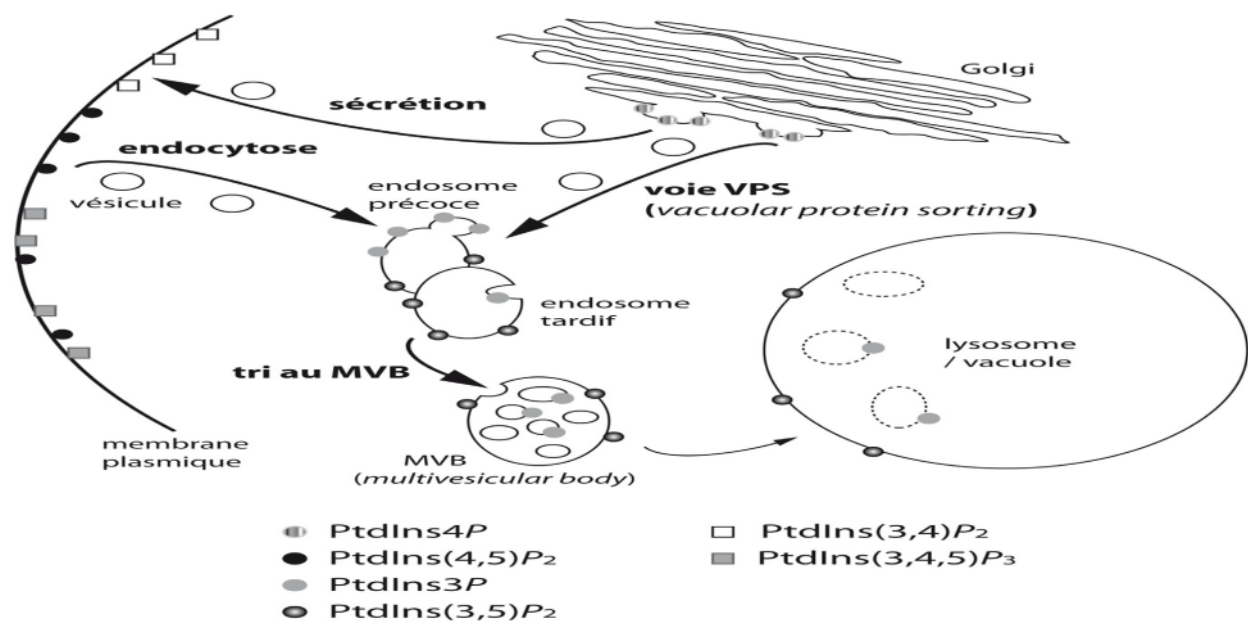


Figure 13: Localisation intracellulaire des différents phosphoinositides et les voies du trafic membranaire (Roth, 2004). Les différents phosphoinositides (PtdIns) sont spécifiquement enrichis dans des zones membranaires définies. Ils sont représentés par des symboles : en rond les PtdIns impliqués dans le trafic intracellulaire avec les étapes qu'ils régulent ; en carré les PtdIns impliqués dans la signalisation cellulaire.

Les PtdIns jouent un rôle essentiel dans le recrutement et/ou l'activation de protéines effectrices (Roth, 2004). De plus, leur présence sur une membrane donnée et leurs niveaux varient grâce aux lipides kinases et phosphatases spécifiques présentes sur les différentes membranes, permettant ainsi la régulation spatiotemporelle de divers processus biologiques, tel que le bourgeonnement, la fusion ou la dynamique des membranes, et acquisition de la polarité cellulaire. Le phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PtdIns (4,5) P₂) représente environ 45% des PtdIns totaux et il est le PtdIns le plus largement dominant sur la membrane plasmique. Chez l'homme, la membrane plasmique est le site primaire de la synthèse du PtdIns (4,5) P₂. Plusieurs PtdIns-kinases sont à l'origine du PtdIns (4,5) P₂ ont été identifiées

: les PIP5K de type I α , β et γ sont localisées à la membrane plasmique et convertissent le PtdIns(4P) en PtdIns (4,5) P₂. Ce dernier est important pour plusieurs aspects du trafic membranaire englobant l'endocytose, la fusion et le recyclage des vésicules synaptiques, la régulation de l'exocytose, la phagocytose et la formation de vésicules au sein de l'appareil de Golgi (Roth, 2004).

Le phospholipide PtdIns (4,5) P₂, situé à la face interne de la membrane plasmique est aussi responsable du recrutement de la protéine Tat du VIH-1 sur le feuillet interne de la membrane plasmique dans le but de sa sécrétion (Rayne et al., 2010b).

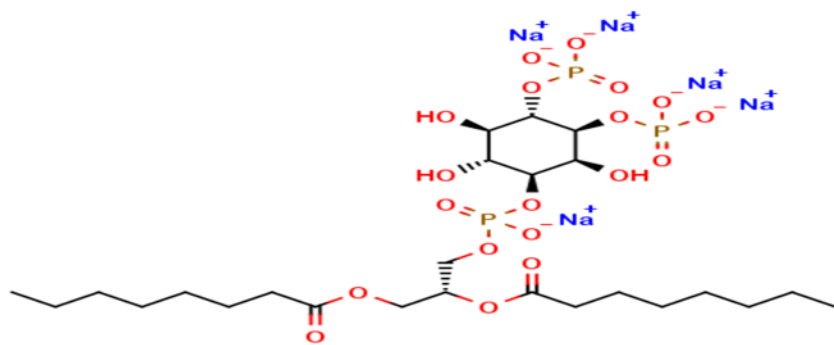


Figure 14: la structure biochimique du phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PtdIns (4,5)P₂) (Roth, 2004). Impliqué dans la sécrétion non conventionnelle de Tat.

II. Le mécanisme non conventionnel de l'externalisation de Tat

La protéine Tat est capable d'être sécrétée par les cellules infectées par le VIH-1 (LT CD4) dans l'environnement extracellulaire pour aller infecter à leur tour les cellules avoisinantes. La capacité de Tat à être sécrétée par les cellules infectées a été observée la première fois en 1990 (Ensoli et al., 1990). Le mécanisme de sécrétion de la protéine Tat est mal défini ; il est indépendant du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, puisque Tat ne contient pas de signal de sécrétion (Clark et al., 2017).

La protéine Tat est sécrétée en utilisant une voie non conventionnelle ou non classique dite aussi alternative. Cependant, le fait que la sécrétion soit non conventionnelle ne signifie pas que la sécrétion de la protéine ne soit pas hautement active. L'utilisation de variants glycosylables a permis de démontrer que Tat ne transite pas par le réticulum endoplasmique avant sa sécrétion.

L'export de la protéine Tat est dépendant de la température et insensible à la Brefeldine A, une drogue qui bloque la voie de sécrétion dépendante du RE/Golgi ;

indiquant que cette protéine ne transit pas par le RE et l'appareil de Golgi, elle est également insensible aux drogues perturbants le cytosquelette, indiquant que Tat ne nécessite pas de transport vésiculaire (Rayne et al., 2010a).

Ce mode de sécrétion montre des similarités avec celui du facteur de croissance FGF2 (fibroblasts growth factor) du fait des similitudes observées entre les deux protéines en terme de propriétés biochimiques et biophysiques (Zeitler et al., 2015). Cependant la spécificité et l'affinité envers le PtdIns (4,5) P2 restent plus importantes dans le cas de la protéine Tat car le Kd est estimé à environ 16 nm (Rayne et al., 2010b).

Tat s'accumule sur la membrane plasmique des cellules infectées grâce à son interaction spécifique avec le PtdIns (4,5)P2 (Rayne et al., 2010a). Cette interaction est permise grâce au domaine basique de Tat qui reconnaît et lie le PtdIns (4,5) P2. Cette interaction est stabilisée par l'insertion membranaire de la chaîne latérale de l'unique tryptophane (Trp-11) présent sur Tat. L'interaction Tat/PtdIns (4,5) P2 est indispensable pour la sécrétion de Tat, elle est d'une grande affinité ; trois charges positives de Tat qui sont les résidus 49-51 correspondants à l'arginine et deux lysines sont impliquées dans la liaison au PtdIns (4,5) P2 qui lui est engagé avec 3 à 5 charges négatives. Cette liaison n'est rendu possible que si le PtdIns (4,5) P2 se trouve au sein de la membrane plasmique (Rayne et al., 2010b).

En effet, à pH neutre la protéine Tat est inactive, et dans cette conformation inactive, la chaîne latérale du Trp11 est enfermée au sein de la protéine. Tat devient alors activée lors de sa liaison avec les membranes contenant le PtdIns (4,5) P2. Elle est ainsi recrutée au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique par le PtdIns (4,5)P2 avec lequel elle interagit via des interactions électrostatiques impliquant les charges positives portées par son domaine basique. Cette fixation induit l'exposition de l'unique tryptophane (Trp11) de Tat, ce dernier s'insère dans la bicouche lipidique, ce qui stabiliserait l'interaction Tat - PtdIns (4,5)P2 à la membrane et permettrait ainsi à Tat de traverser la membrane plasmique et d'être libérée dans le milieu extérieur (Rayne et al., 2010b) (Voir Figure 15).

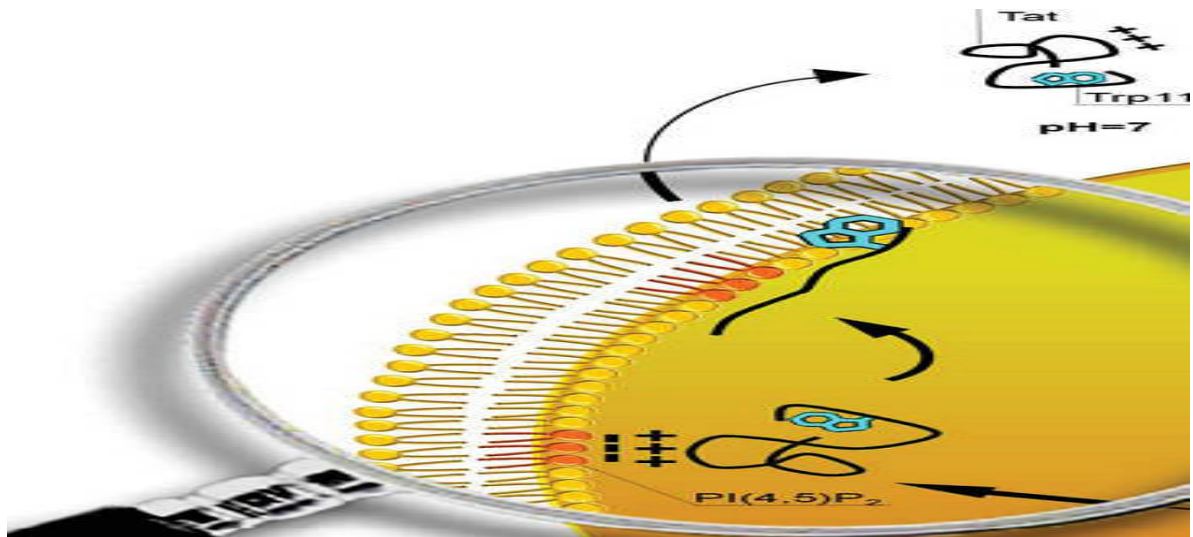


Figure 15: recrutement de la protéine Tat par la membrane plasmique lors de la sécrétion non conventionnelle (Debaisieux et al., 2012). La protéine Tat est activée lorsqu'elle se lie à la membrane contenant le PtdIns (4,5)P₂ et se stabilise grâce à des interactions électrostatiques.

Ce mécanisme de sécrétion inclut la formation d'oligomères insérés dans la membrane plasmique, ces oligomères de la protéine Tat ont la capacité de former des pores membranaires, cette formation de pores dépend en grande partie d'une interaction fonctionnelle entre la protéine Tat et le PtdIns (4,5) P₂ (Zeitler et al., 2015).

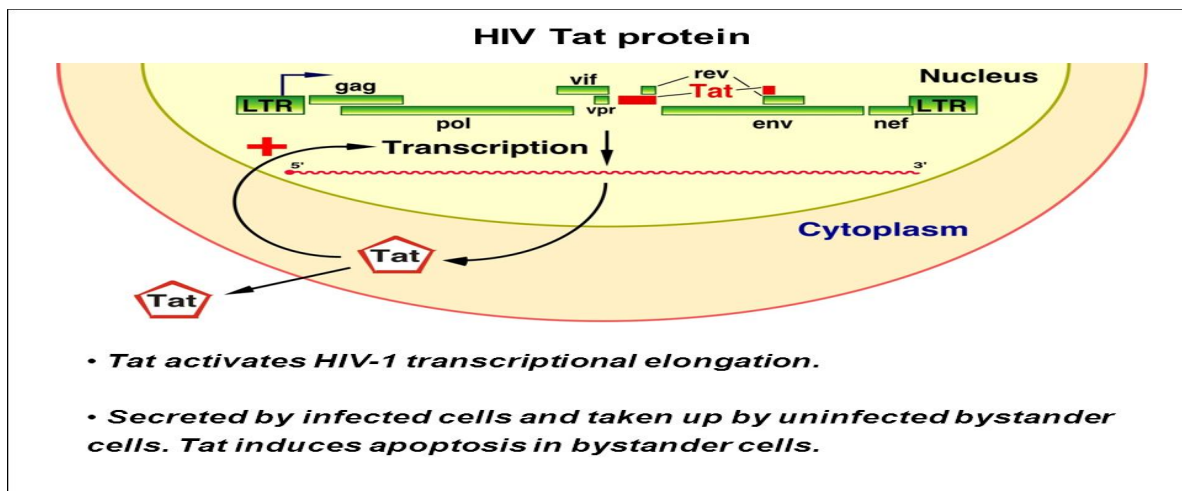


Figure 16: Sécrétion de Tat par la cellule infectée (Zeitler et al., 2015). La protéine Tat est sécrétée de manière non conventionnelle et possède la capacité d'infecter les cellules voisines par mécanisme d'endocytose.

III. Entrée de Tat dans les cellules avoisinantes par endocytose

III.1. Généralités sur l'endocytose

Toutes les cellules eucaryotes, sauf les hématies, capturent des molécules extracellulaires en les englobant dans des vacuoles ou des vésicules. Ces vacuoles/vésicules proviennent de la membrane plasmique par un mécanisme appelé endocytose. Les cellules utilisent l'endocytose pour se nourrir, se défendre et préserver leur homéostasie.

La plupart des processus d'endocytose consistent à capturer sélectivement des ligands qui se lient avec une affinité élevée à des récepteurs de la membrane plasmique avant d'être internaliser. Au cours de l'endocytose médiée par un récepteur, les complexes ligands-récepteurs se concentrent dans des régions membranaires qui s'invaginent en vésicules dans la cellule. D'autre part la cellule peut englober des liquides du milieu extracellulaire de façon non sélective par processus de pinocytose ou encore par macropinocytose.

En fonction du type cellulaire, plusieurs types de vésicules participent à l'activité globale d'endocytose:

- Les vésicules de clathrine, les vésicules de pinocytose non recouvertes et les cavéolines qui sont de petites tailles (50 à 150 nm de diamètre).
- Les phagosomes et les macropinosomes : sont volumineux (plusieurs centaines de nm de diamètre).

Dans cette partie nous nous limiterons à la description des différents facteurs impliqués dans l'endocytose par la voie de la clathrine qui permet l'entrée de Tat dans les cellules T-CD4+ (Vendeville et al., 2004).

III.1.1. Le mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine

L'endocytose dépendante de la clathrine est utilisée par toutes les cellules eucaryotes pour:

- Assimiler des nutriments essentiels comme le fer ou le cholestérol.
- Pour éliminer du milieu extracellulaire des produits potentiellement toxiques.

La formation de vésicules recouvertes de clathrine requiert l'action concertée de plusieurs dizaines de protéines. Ce processus est initié par la molécule du PtdIns (4,5) P2 qui permet le recrutement de protéines adaptatrices AP-2 sur des sites spécifiques de la membrane (Doherty and McMahon, 2009). Le PtdIns (4,5) P2 interagit à la fois avec la protéine adaptatrice et avec la dynamine qui est une mécano-enzyme qui se polymérise autour du cout des puits

recouverts et permet la scission des vésicules recouvertes (voir Figure 17) (Wieffer et al., 2009)

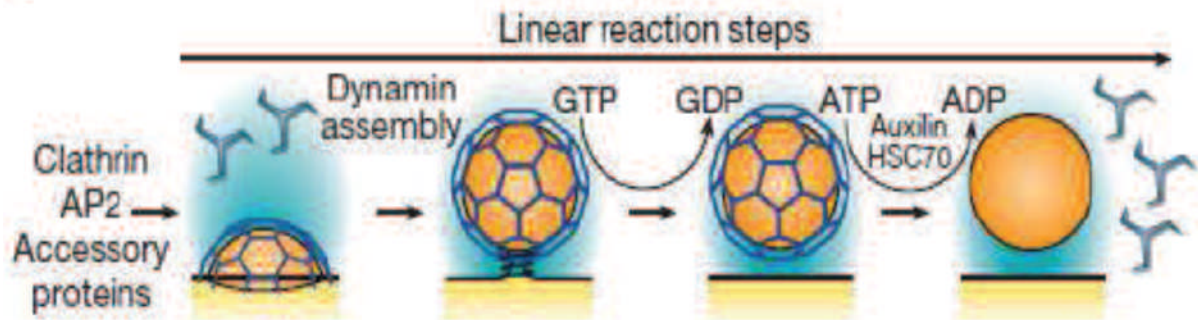


Figure 17: Schéma représentant les différentes étapes de la formation de vésicule recouverte de clathrine (Schmid and McMahon, 2007). L'adaptateur AP2 se lie à la membrane plasmique en reconnaissant le lipide PtdIns (4,5) P2 et des motifs endocytiques de certains récepteurs transmembranaires. Les triskèles de clathrine (bleu) se lient à la membrane par l'intermédiaire d'AP2. La polymérisation du manteau de la clathrine induit la déformation de la membrane plasmique et la formation d'un puit recouvert de clathrine. La mécano-enzyme dynamine se polymérise au cour de la vésicule naissante, et par hydrolyse de GTP, induit la scission de la vésicule. A ce stade, l'auxiline recrute Hsc70 qui induit la dépolymérisation du manteau de clathrine. La vésicule continue alors son chemin en route pour les endosomes précoces.

➤ La Clathrine

La clathrine est constituée d'un hexamère de trois chaînes légères de 30 KDa et de trois chaînes lourdes de 192 KDa qui s'associent entre elles au niveau de leurs extrémités C-terminales, dessinant un triskélium de clathrine. Les triskélium s'assemblent en formant une structure de cage. Elle est produite dans le cytosol et est incapable de se lier directement à une membrane lipidique, ce sont les protéines adaptatrices qui assurent son recrutement sur la membrane ainsi que d'autres protéines auxiliaires, en se fixant préalablement au PtdIns (4,5) P2 (Burtey et al., 2007).

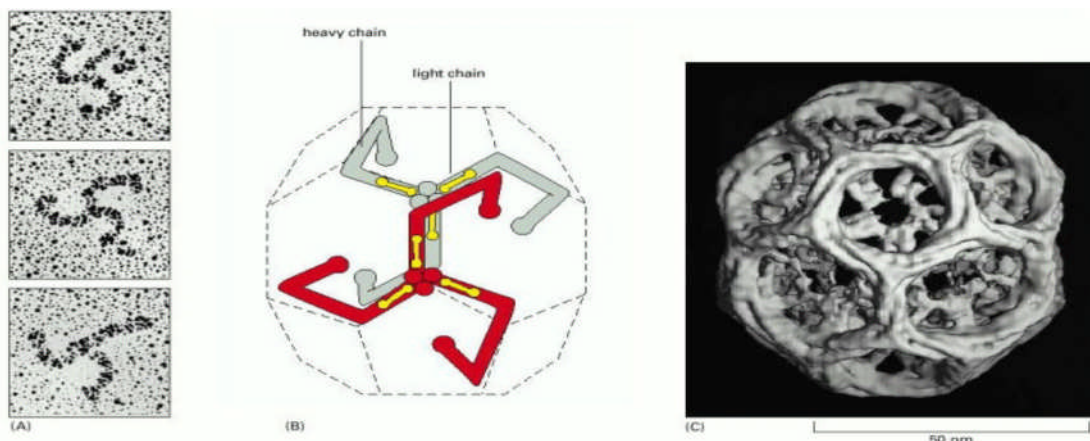


Figure 18: Les différentes représentations de Catherine (A) : Structure en triskelion de la clathrine en microscopie électronique.(B) Deux triskélions, chaînes lourdes en gris ou rouge, chaînes légères en jaune (C) : Structure d'une vésicule tapissée de clathrine « cage de clathrine » modélisée(Wieffer et al., 2009).

➤ **Le complexe AP2**

C'est un hétérotétramère qui fixe la clathrine, elle est capable de lier un grand nombre de protéines auxiliaires durant l'endocytose. Son interaction avec le PtdIns (4,5) P2 est essentielle pour le processus d'endocytose (Wieffer et al., 2009).

➤ **Eps15**

C'est un substrat de récepteurs à activité kinase et un constituant des fosses recouvertes de clathrine à membrane plasmatique, il permet l'établissement d'un module de nucléation et permettrait ainsi de définir le lieu de formation des vésicules, il serait également essentiel au recrutement de AP-2 (Henne et al., 2010).

➤ **La dynamine**

Une GTPase de 100 KDa, s'auto-assemble après son association au GTP en un anneau hélicoïdal autour du collet du puit. Cet anneau va permettre la constriction du collet du puit et la libération de la vésicule dans le cytoplasme. La fonctionnalité de la dynamine dépend de sa liaison au phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate.

➤ **SNAREs**

Le complexes SNAREs (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors) protéine transmembranaire composée de la v-SNARE localisée sur la vésicule et de la t-SNARE située sur la membrane cible (target). La t- et la v-SNARE s'associent étroitement, permettant l'accrochage de la vésicule sur la membrane cible afin de permettre la fusion subséquente des deux membranes (Bonifacino and Glick, 2004).

➤ **Rôle des petites protéines GTPase dans le trafic vésiculaire**

Les protéines Rab-GTPases et Arfs et leurs effecteurs sont des GTPases monomériques qui contribuent à la sélectivité du transport vésiculaire. Il existe plus de 60 protéines Rab différentes, elles sont impliquées dans la biogenèse des vésicules mais aussi dans la mobilité des vésicules et l'arrimage de celles-ci sur la membrane receveuse (Pfeffer, 1994). Chaque protéine Rab se localise d'une manière assez spécifique sur un organe où elle recrute ses effecteurs. Par exemple, Rab5 se concentre sur les endosomes de tri, Rab11 se

situant au niveau des endosomes de recyclage alors que Rab-7 est localisé sur les endosomes tardifs (Cai et al., 2007). Les Rab peuvent ainsi exercer un contrôle strict du trafic vésiculaire en régulant d'une manière spatiotemporelle le recrutement des différents éléments impliqués dans ce processus.

III.1.2. La voie endocytaire de dégradation

Les endosomes constituent les principaux compartiments de tri de la voie d'endocytose. Ils se caractérisent par une structure pléomorphe, composée d'un ensemble de vésicules, vacuoles (s'engagent dans la maturation), tubules (recyclage sur la membrane plasmique) et corps multi- vésiculaires.

Les molécules extracellulaires et les récepteurs de surface sont acheminés vers les endosomes précoces (de tri). Certains récepteurs sont recyclés et retournés vers la membrane plasmique, d'autres sont dirigés vers l'appareil de Golgi. Cependant les molécules destinées à être dégradées sont envoyées vers les endosomes tardifs pour au final être dégradées dans les lysosomes.

Une acidification progressive est produite au cours de cette progression, elle est assurée par l'ATPase vacuolaire (Falguieres et al., 2008) (Figure19).

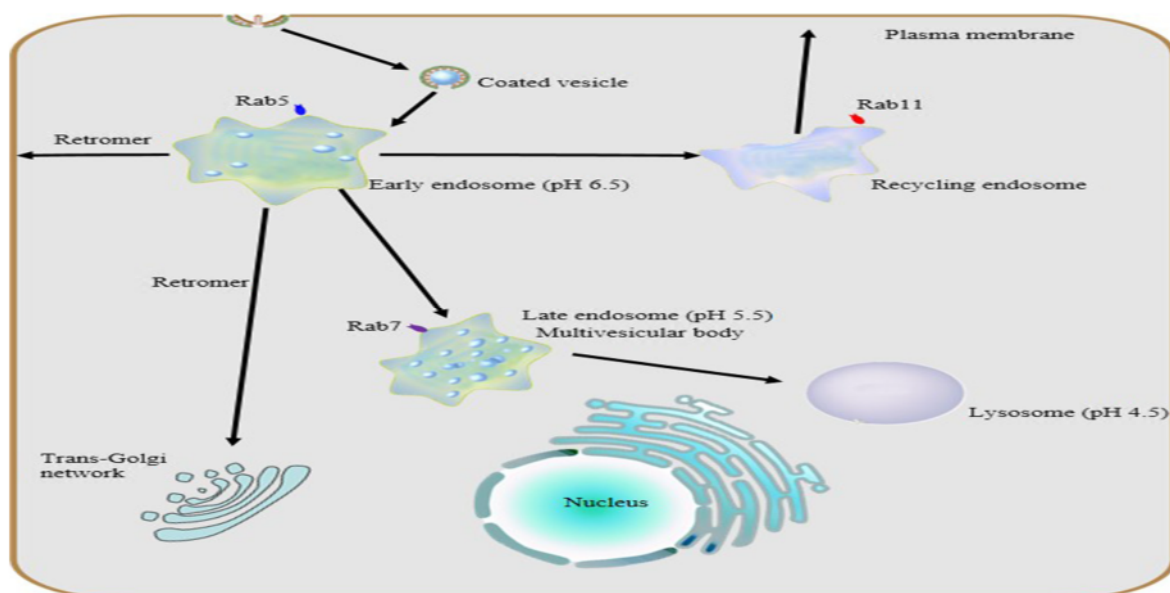


Figure 19: la voie d'endocytose (Hu and Hughes, 2012) À la suite de l'internalisation, les protéines cargo sont transportées vers des endosomes précoces via des vésicules endocytaires, sous le contrôle de Rab-5. Les premiers endosomes servent de stations de tri primaires dans lesquelles les protéines peuvent être triées dans des endosomes de recyclage pour retourner vers la surface de la cellule, dans une voie rétrogradée, médiée par retromer

pour être renvoyée au réseau trans-Golgi (TGN) ou dans une voie de dégradation Pour un ciblage éventuel sur le lysosome. À mesure que le nombre de vésicules intraluminales augmentent, les premiers endosomes atteignent les endosomes tardifs, puis ces derniers fusionnent avec les lysosomes. Compte tenu de leurs différentes capacités d'acidification, un gradient de pH stable est établi dans différents compartiments pendant le processus de maturation: les premiers endosomes maintiennent le pH à environ 6,5, les endosomes tardifs à environ 5,5 et les lysosomes à environ 4,5. Une autre forme de régulation du trafic vésiculaire dans la voie de dégradation est représentée par l'action de la v-ATPase (vacuolar H⁺ ATPase), qui permet la translocation des protons du cytosol vers les endosomes. Cela conduit à une acidification progressive des endosomes allant d'un pH 6.5 dans les endosomes précoces vers un pH 5.0 dans les lysosomes (Recchi and Chavier, 2006).

IV. Internalisation de Tat

La protéine transactivatrice Tat joue un rôle crucial dans la multiplication du VIH-1. Elle possède la propriété d'être sécrétée par les cellules infectées et présente des concentrations mesurées dans le sérum des patients infectés situées dans la gamme des nanomolaires (Rayne et al., 2010a). Par la suite, elle peut pénétrer par endocytose dans les cellules voisines non-infectées, dans lesquelles elle agit comme une toxine virale qui peut affecter plusieurs types de cellules, et provoquant divers dysfonctionnements. Cette entrée se fait par l'utilisation de plusieurs récepteurs différents (Debaisieux et al., 2012). Il faut noter aussi que ce transport intercellulaire de Tat est étroitement lié à la pathogenèse du VIH-1.

Le mécanisme d'entrée de Tat dans les cellules est un mécanisme actif nécessitant un apport en ATP. En effet, plusieurs études montrent que l'internalisation de la protéine est fortement réduite à 4°C. Elle peut affecter les monocytes, les cellules endothéliales et les neurones, mais l'une des ces principales cibles reste les LT CD4⁺ (Vendeville et al., 2004). Bien que l'internalisation de cette protéine via les cavéoline ca été décrite dans les lignées cellulaires HeLa, ce mécanisme n'est pas possible dans les lymphocytes T qui n'expriment pas du tout de cavéoline. La pénétration se fait principalement par voie d'endocytose via les vésicules de clathrine et de façon dépendante de l'Eps-15 (Vendeville et al., 2004).

Tat possède un certain nombre de sites de liaison à des récepteurs de surface des cellules, parmi lesquels on trouve :

- **La dipeptidylaminopeptidase IV (CD26)** : une glycoprotéine transmembranaire dotée d'une activité exopeptidase qui est impliquée dans l'activation des LT. Cette interaction est médiée par le domaine N-terminal de Tat (aa 1-9) et conduit à l'inhibition de la prolifération des LT, probablement via l'inhibition de la production de l'IL-2 (Chang et al., 1997).

- **La Protéine liée aux récepteurs des lipoprotéines (LRP) :** Tat détourne ce récepteur présent à la surface des neurones afin de pénétrer dans les cellules nerveuses.
- **CXCR4 et d'héparane sulfate des protéoglycanes de (HSPG) :** qui est un constituant de la matrice extracellulaire dont l'interaction avec Tat se fait via des interactions de charges impliquant le domaine basique.

Ce large panel de récepteurs reflète la flexibilité moléculaire de Tat. Bien que leur niveau d'expression peut varier selon les types de cellules (Debaisieux et al., 2012). Ces interactions vont permettre à Tat de cibler la voie endosomale afin de pénétrer dans ces cellules, ou encore d'activer des voies de signalisations qui conduisent au déclenchement de réponses cellulaires souvent bénéfiques pour le virus et néfastes pour les cellules du système immunitaire et du système nerveux central.

Ces récepteurs identifiés (à titre d'exemple le LRP) pourraient assurer l'endocytose dépendante à la clathrine de Tat. Comme décrit ci-dessus (Debaisieux, Rayne et al. 2012), Tat est acheminée vers les endosomes précoces Rab-5 positif (petite GTPase localisée sur les endosomes précoces qui régule la fusion des vésicules endocytaires) (Vendeville et al., 2004). Les endosomes précoces évoluent par la suite pour former des endosomes tardifs exprimant Rab-7. D'après Debaisieux et al (2012), Tat tire profit du pH acide pour s'échapper des endosomes tardifs vers le cytoplasme et éviter ainsi une dégradation par les enzymes lysosomiales, et la translocation dans le cytoplasme est assistée par l'intervention de la chaperonne Hsp-90 qui permet à Tat de retrouver sa conformation structurale native.

IV.1. La translocation pH dépendante de Tat des endosomes tardifs vers le cytosol

La structure de Tat est stabilisée à pH neutre par des interactions électrostatiques entre les résidus acides Asp/Glu2 et basiques Arg 55-57, le faible pH au niveau des endosomes tardifs (pH 5,3-5,5) permet la rupture de ces liaisons et provoque l'exposition du Trp-11 qui déclenchera la translocation de Tat vers le cytosol. Et elle est facilitée par l'action de la chaperonne cytosolique Hsp-90.

Lors de l'exposition de cette protéine au pH acide, les résidus acides Asp/Glu2 de cette protéine se protonisent, une protonation qui déstabilise les interactions électrostatiques avec le domaine basique, ce qui permet le dépliement de la protéine résultant en exposant le Trp-11 et son insertion dans la membrane endosomale. Ce qui déclenche sa translocation dans le

cytosol par l'intermédiaire de la chaperonne Hsp90 qui permet à cette protéine de retrouver sa conformation native (voir figure 20) (Debaisieux et al. 2012).

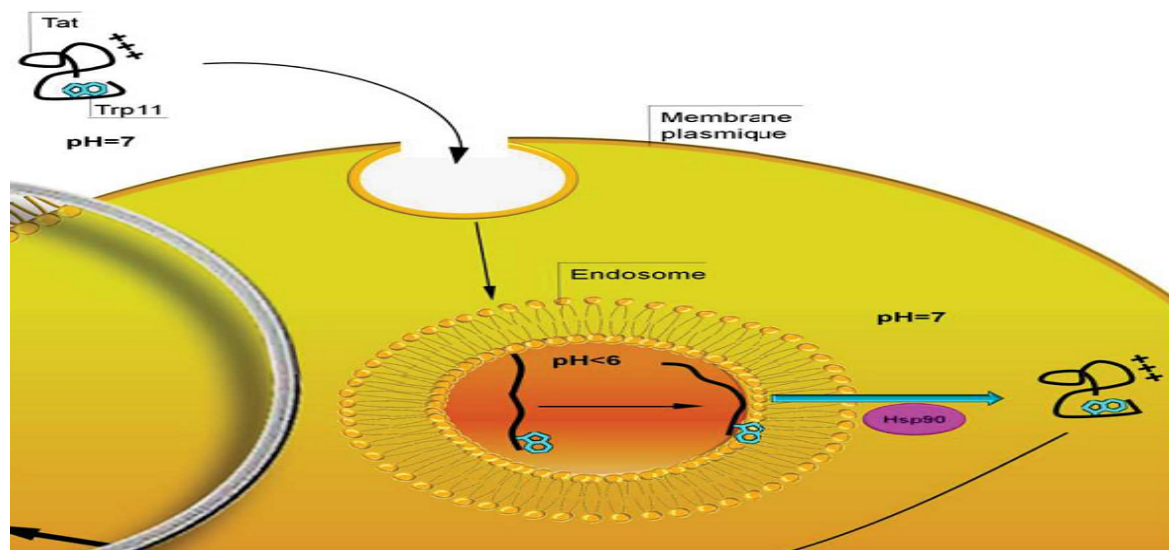


Figure 20: la translocation du Tat vers le cytosol (Debaisieux et al., 2012). Tat est endocytée, et le faible pH endosomale déclenche sa translocation à travers la membrane endosomale vers le cytosol où le Tryptophane joue un rôle essentiel durant ce processus.

Une fois dans le cytosol, Tat interagit avec Plusieurs partenaires cytosoliques et ces interactions affectent les activités de la cellule. A titre d'exemple elle interagit avec des protéines Phosphatase-1 (PP1), se lie à la tubuline, cette interaction permet le ciblage nucléaire de la phosphatase et sa livraison à des substrats nucléaires spécifiques critiques pour la transcription du VIH-1 (Debaisieux et al., 2012).

*Chapitre 4: implication
de Tat dans
l'apparition de
l'immunodéficience*

Chapitre 4: implication de Tat dans l'apparition de l'immunodéficience associée à l'infection VIH-1

I. Induction de l'apoptose des Lymphocytes-T CD4 non-infectées par Tat du VIH-1

L'infection par le VIH-1 conduit progressivement à la diminution de la fonctionnalité et la mort d'un grand nombre de cellules LT CD4 qui aboutit à l'apparition de la phase SIDA. Il a été démontré que le nombre de cellules LT CD4 non infectées qui meurent par apoptose est beaucoup plus important que le nombre de LT CD4 infectées. Cette destruction des cellules LT non infectées est directement liée au passage vers le stade SIDA (Espert et al., 2007).

I.1. Généralités sur l'apoptose (la mort cellulaire programmée)

L'apoptose a été décrite pour la première fois par Kerr et al en 1972 comme étant une mort cellulaire génétiquement programmée en réponse à un signal extra ou intracellulaire. Elle forme un équilibre avec la prolifération cellulaire et contribue ainsi à l'homéostasie tissulaire, c'est-à-dire ; la division cellulaire reste en parfait équilibre avec la mort cellulaire (Espert et al., 2007).

- **L'apoptose possède deux voies de signalisation**

1 .La voie intrinsèque

L'apoptose par voie intrinsèque fait intervenir de nombreuses protéines tel que les caspases (cysteinyl aspartate-specific protéinase) qui sont des protéases à cystéines responsables de l'apoptose, les protéines de la famille du gène Bcl- 2 (B-cell lymphoma 2) qui sont des anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques: Bax, Bad, Bak, et Bid, ces deux dernières ont comme rôle de réguler l'apoptose (Espert et al., 2007).

La mitochondrie joue un rôle primordial dans l'apoptose puisqu'elle renferme des protéines appelées Simp (soluble intermembrane proteins) tel que le cytochrome C, qui une fois transloquer dans le cytosol s'associe à la protéine Apaf-1, s'il n'est pas bloqué par les facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2), il active la caspase-9 (caspase initiatrice) qui à son tour déclenche une cascade d'activation de caspases effectrices induisant la mort de la cellule voir Figure 21 (Gross et al., 1999).

2. La voie extrinsèque

L'apoptose par voie extrinsèque fait intervenir des récepteurs spécialisés qualifiés de récepteurs à la mort cellulaire qui engage la cascade de signalisation des caspases (Ashkenazi and Dixit, 1999). Ces récepteurs membranaires appartiennent à la superfamille du TNF R (Tumor Necrosis Factor Receptor) : TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), Fas, DR (Death Receptor) 3,4 et 5. Ils possèdent dans leur partie intra- cytoplasmique C-terminale, une région conservée appelée domaine de mort DD (Death Domain), comme DED (Death effector Domain) et CARD (Caspase Recruiting Domains).

Les récepteurs de mort une fois liés à leurs ligands forment des trimères nécessaires au recrutement de protéines cytosoliques FADD (fas associated death domain). L'ensemble forme ce qu'on appelle un complexe DISC (Complexe DISC: death Inducing signaling complex)), qui aboutit à l'activation des caspases 8 et 10 et en conséquence le déclenchement de l'apoptose comme illustrer sur la Figure 21.

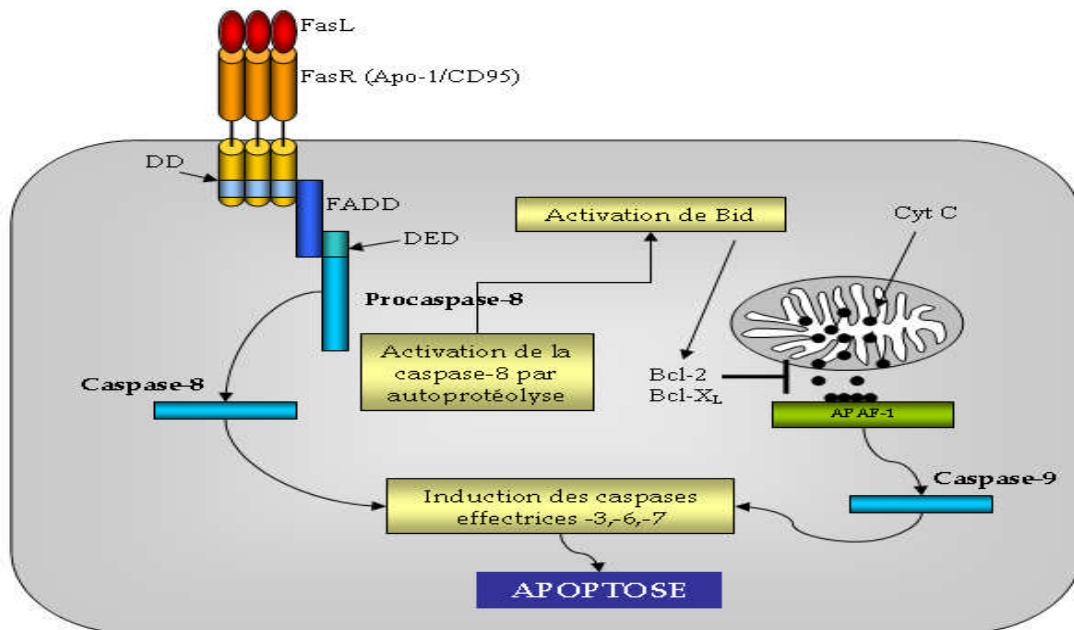


Figure 21: Les deux voies de signalisation de l'apoptose (Yuan and Yankner, 2000). La voie de signalisation extrinsèque implique les récepteurs de mort comme Fas et la voie intrinsèque est déclenchée par l'implication de la mitochondrie, les deux voies aboutissent à l'activation des caspases.

I.2. Implication de Tat dans l'induction de l'apoptose des cellules LT CD4

Le VIH-1 est responsable de la chute du nombre des cellules LT CD4 dans l'organisme des patients et l'apparition de la phase SIDA qui se traduit par la manifestation des maladies opportunistes pouvant mener au décès de la personne atteinte. La protéine Tat est incriminée dans le déclenchement du processus de la mort cellulaire programmée des LT CD4+ infectées et non infectées. Le dernier cas implique l'entrée de Tat dans la cellule cible par endocytose, par le biais de l'acidification qui règne au sein des endosomes tardifs, ce qui permet l'ouverture de la protéine et provoquant ainsi sa translocation dans le cytoplasme menant à l'apoptose de ces cellules.

Au niveau des LT CD4+, la protéine Tat est capable de déclencher les deux voies de signalisation apoptotiques ; la voie intrinsèque et extrinsèque par le ciblage des gènes pro-apoptotiques et des gènes régulant le cycle cellulaire. Cela se fait par stimulation du facteur de transcription FOXO3a (Forkhead box transcription factor O class 3a) qui contrôle l'expression de plusieurs gènes pro-apoptotique (Dabrowska et al., 2008). Le mécanisme par lequel Tat induit l'apoptose se fait par association de cette protéine aux deux promoteurs des gènes *PTEN* et *PP2A*, considéré comme l'événement initiateur de la mort cellulaire programmée (Kim et al., 2010).

La protéine Tat provoque l'augmentation des phosphatases PTEN et PP2A qui engendrent la réduction du taux de la kinase AKT (protéine kinase B) phosphorylé (pAKT) qui appartient à la famille des protéines kinases impliquées dans la voie de signalisation et l'élévation du taux de FOXO3a non phosphorylé qui cible les gènes pro-apoptotique (Dabrowska et al., 2008). Le facteur FOXO3a favorise l'augmentation de la transcription de Egr-1 (Early growth response protein) qui peut stimuler à son tour la transcription de *PTEN* (Phosphatase and TENSin homolog), renforçant ainsi la voie qui mène à l'activation transcriptionnelle du facteur FOXO3a (Dabrowska et al., 2008).

La voie extrinsèque est activée par la liaison de ligands tel que Fas L, TNF alpha et TRAIL ligand à leurs récepteurs de mort respectifs Fas (CD95), TNFR-1 (Tumor necrosis factor receptor-1), DR4 (Death Receptor-4) et DR5 (Death Receptor-4) situés sur la membrane plasmique. Cette liaison conduit à l'activation des caspases 8 et 10 proximales qui sont les initiateurs de l'activation des effecteurs caspases 3 et 7. Quand les gènes pro-apoptotiques : (*Puma*, *NOXA* et *P53*) sont ciblés par la protéine Tat via FOXO3a, dans ce cas la, c'est la voie intrinsèque de l'apoptose qui est déclencher et les protéines pro-apoptotiques

(Bax, Bad, Bak et Bid) vont faire en sorte de provoquer la résorption de la membrane mitochondriale et libération du Cytochrome C, responsable de la formation de l'apoptosome et le déclenchement de la cascade des caspases (Dabrowska et al., 2008; Kim et al., 2010).

Une autre voie qu'utilise la protéine Tat pour déclencher l'apoptose des LTCD4+ non infectées c'est de perturber la dynamique du réseau micro-tubulaire. En effet Tat s'associe au dimère de tubuline α/β et au microtubule et renforce ainsi la polymérisation micro-tubulaire ainsi qu'à la protéine d'association au microtubule LIS1 qui est connu aussi pouvoir faciliter l'assemblage des microtubules, rôle similaire des protéines MAPs (microtubule-associated proteins) qui régulent la polymérisation (Giacca, 2005). Cette perturbation du réseau micro-tubulaire responsable du transport macromoléculaire et vésiculaire déclenche la voie intrinsèque de l'apoptose via la mitochondrie, cette voie est induite par l'implication de protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 et plus particulièrement la protéine Bim qui engendre la libération du facteur pro-apoptotique cytochrome C (figure 22). A ces événements s'ajoute la formation d'intermédiaires réactifs oxygénés (ROS) ainsi que l'activation du facteur inducteur apoptotique (AIF) (Giacca, 2005).

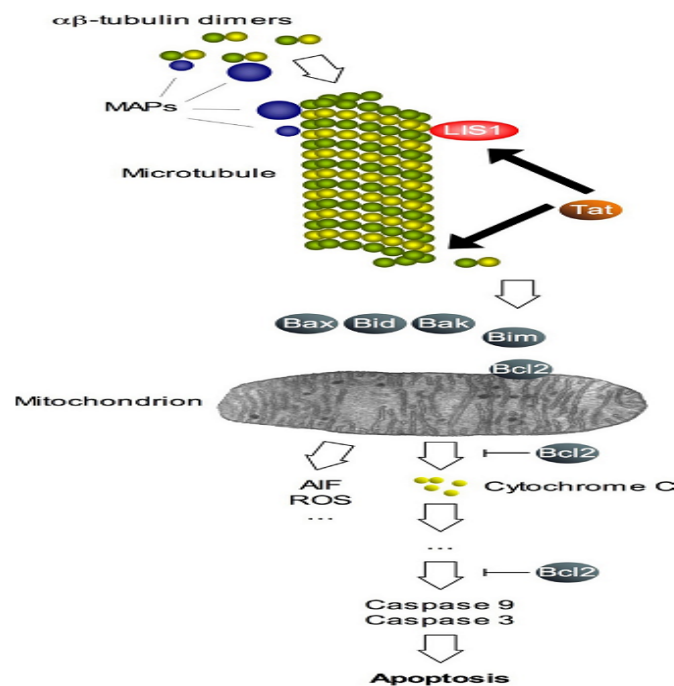


Figure 22: Déclenchement de l'apoptose par Tat par perturbation du réseau micro tubulaire (Giacca, 2005). La protéine Tat se lie au dimère de tubuline ainsi qu'à la protéine LIS1 et provoque une perturbation du réseau microtubulaire aboutissant au déclenchement de la voie intrinsèque de l'apoptose par la protéine pro-apoptotique Bim.

II. Inhibition de la phagocytose par Tat du VIH-1

II.1. Généralités sur la phagocytose

Notre environnement est peuplé de micro-organismes comme les virus et les bactéries qui peuvent entrer dans l'organisme et engendrer diverses pathologies. Lorsqu'un microbe parvient à traverser les premières barrières de défense naturelles comme la peau ou les muqueuses, il établit un site d'infection qui perpétue sa transmission. Une réponse immune de l'hôte est requise pour contrer la diffusion du pathogène. Dans la plupart des cas, ces pathogènes sont éliminés par les cellules du système de l'immunité innée, dites effectrices, spécialisées dans l'ingestion et la destruction des micro-organismes (Janeway and Medzhitov, 2002).

II.1.1. Les phagocytes

Les phagocytes ou cellules phagocytaires sont les éboueurs de l'organisme, capables d'endocyter les bactéries et les cellules mortes ; on parle de phagocytose. Parmi eux on compte les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles.

a) Le monocyte

Le monocyte est une cellule sanguine immature de la famille des leucocytes, qui provient de la moelle osseuse. Cette cellule se différencie une fois arrivé dans les tissus de résidence, il sera ainsi à l'origine des macrophages et des cellules dendritiques.

b) Le macrophage

Le macrophage est la cellule phagocytaire professionnelle qui provient de la différenciation des monocytes. Un des rôles principaux des macrophages est le nettoyage de l'organisme des corps apoptotiques, des poussières et d'agents pathogènes. Il joue également le rôle de cellule présentatrice d'antigène. Ces cellules doivent donc d'être ubiquitaires au sein de l'organisme (tissus conjonctifs, foie, tissus nerveux, poumons, os, rate...etc.). Les macrophages résidents portent chacun une appellation caractéristique suivant le tissu dans lequel il se trouve : les cellules de Kupffer dans le foie, les cellules microgliales dans les tissus nerveux, les macrophages alvéolaires dans les poumons...etc. Les macrophages expriment les récepteurs membranaires tels que CD4, les molécules de co-stimulation B7 et des récepteurs aux chimiokines CCR5, pratiquement expriment tous les récepteurs membranaires PRR (*Pattern Recognition Receptors*) qui reconnaissent les PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), et les molécules du CMH de classe 1 et 2. Il représente une cible cellulaire importante dans le cas d'une infection au VIH-1.

c) La cellule dendritique (DC)

La cellule dendritique est une cellule immunitaire dotée à l'état mature d'expansions cytoplasmiques appelées "dendrites", et présente dans l'ensemble des tissus de l'organisme, plus spécifiquement au niveau de l'épiderme et au niveau du thymus. Elle a deux origines, soit myéloïde en dérivant du monocyte, ou bien lymphoïde. La cellule dendritique joue différents rôles dans la réponse immunitaire. Elle joue le rôle de cellule phagocytaire et de cellule présentatrice d'antigène (CPA), lui permettant d'activer les lymphocytes (T et B). Cette coopération se fait au niveau des organes lymphoïdes secondaires ou bien en périphérie. Elle a donc un rôle principal dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative. En effet une fois l'antigène phagocyté et présenté, la cellule dendritique quitte son lieu de résidence et migre vers les organes lymphoïdes secondaires pour assurer une première activation des lymphocytes T naïfs.

d) Les polynucléaires neutrophiles

C'est les globules blancs les plus nombreux dans le sang. Ils ont un rôle principal dans la phagocytose et sont attirés vers le lieu de l'infection par les chimiokines libérées par les macrophages et les autres cellules présentes. Ils passent ainsi par diapédèse des vaisseaux sanguins où ils résident en temps normal, vers les tissus conjonctifs cibles. Contrairement aux autres cellules phagocytaires, les polynucléaires neutrophiles meurent suite au processus de phagocytose (durée de vie courte).

II.1.2. Récepteurs de surface, mécanisme de reconnaissance des ligands

La membrane plasmique d'un macrophage contient un grand nombre de protéines, glycoprotéines et glycolipides essentiels à leurs fonctions. Ces fonctions comprennent la différenciation, la croissance, la survie, l'adhésion, la migration, et bien d'autres fonctions effectrices et de régulation dont la phagocytose. On distingue une variété de ces récepteurs membranaires impliqués dans la capacité des macrophages à reconnaître et internaliser des particules portant des structures moléculaires de reconnaissance appropriées (Aderem and Underhill, 1999).

1. Les récepteurs au fragment Fc gamma (Fc γ R) : Lors d'une infection, Les bactéries se trouvent sous forme recouvertes à leurs surfaces par des anticorps de type IgG synthétisés par les plasmocytes de l'hôte. Ces anticorps exposent librement la partie constante, fragments Fc des molécules d'anticorps qui peuvent alors être reconnus et se lier aux récepteurs Fc γ R

présents sur le phagocyte. La liaison des Fc γ R nécessite donc une interaction préalable d'un anticorps de type IgG avec un antigène bactérien.

2. Récepteur au complément : Les phagocytes possèdent un récepteur reconnaissant le composant du complément: C3b. La liaison de bactéries recouvertes du fragment C3b du complément à ce récepteur conduit, là aussi, à une phagocytose des bactéries en question ainsi qu'à la flambée respiratoire (Alim et al., 2015).

3. Récepteurs « scavengers » : Les récepteurs « scavenger » se lient à des polyanions divers et variés présents sur les surfaces bactériennes permettant une augmentation de la phagocytose des bactéries (Alim et al., 2015).

4. Les récepteurs de la famille Toll-like (TLR :Toll-Like Receptors) : Les phagocytes possèdent une variété de Toll-like receptors (membres de la famille de Pattern Recognition Receptors ou PRRs) qui reconnaissent des motifs moléculaires très partagés par de nombreux agents infectieux appelés PAMPs (pathogen associated molecular patterns). La liaison des agents pathogènes aux Toll-like receptors conduit à l'activation des phagocytes qui vont alors produire des cytokines inflammatoires (IL-1, TNF-alpha et IL-6) (Aderem and Underhill, 1999).

II.1.3.Le mécanisme de phagocytose

Le processus de phagocytose est caractérisé par trois étapes principales ;

- La phase de reconnaissance et d'adhésion du microbe qui s'effectue grâce à des récepteurs de micro-organismes étrangers ou de cellules sénescents présents à la surface du macrophage, ou par l'intermédiaire des récepteurs aux opsonines.
- La phase d'internalisation ou ingestion qui aboutit à la formation du phagosome.
- La phase de dégradation par divers enzymes protéolytiques qui s'accumulent dans le phagosome suite à sa fusion avec les lysosomes dont ils possèdent également un pH interne très bas (acidique), qui favorise l'hydrolyse des particules (illustrée par la figure 23)

C'est la reconnaissance de la particule qui permet de déclencher la cascade de signaux qui aboutissent à la polymérisation de l'actine, la production de divers espèces réactifs de l'oxygène comme l'anion superoxyde (O₂⁻), l'eau oxygénée H₂O₂, production de dérivés nitrés et synthèse de cytokines et chimiokines anti-inflammatoires.

Tous ces récepteurs de la phagocytose activent la polymérisation de l'actine qui sert de moteur à l'extension de la membrane (Swanson, 2008). En quelques secondes, après la

reconnaissance par les récepteurs, il y a formation de filaments d'actine qui se dépolymérisent très rapidement pour donner naissance au phagosome qui entreprend un processus de maturation (Diakonova et al., 2002).

Dans le cas de la phagocytose induite par les récepteurs Fc γ R, la réorganisation du cytosquelette d'actine est contrôlée par deux protéines G de la famille de Rho (*Rho family*), soit Rac-1 et Cdc42 ainsi qu'Arf-6 (ADP-ribosylation factor), éléments responsables de la formation des pseudopodes. L'inhibition de l'une des deux protéines bloque la polymérisation de l'actine et l'internalisation de la particule opsonisée par le macrophage (Caron and Hall, 1998).

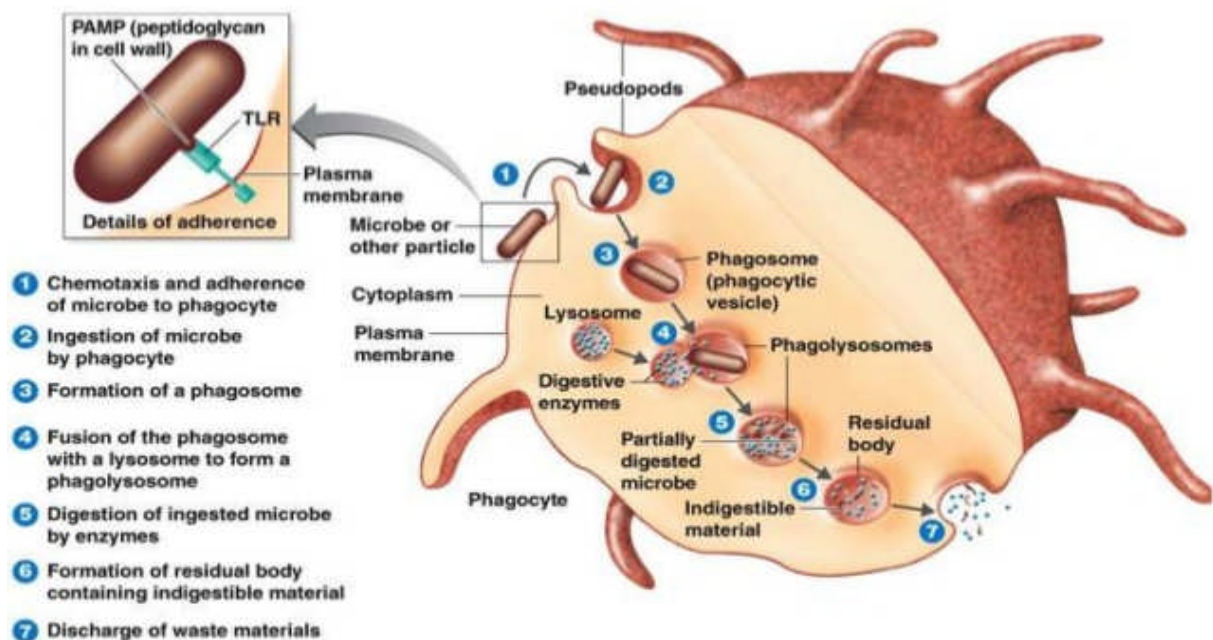


Figure 23: Le processus de phagocytose (Diakonova et al., 2002) : En premier lieu, l'agent infectieux doit être reconnu par les récepteurs situés à la surface des phagocytes tel les PRRs (Pattern Recognition Receptor) qui reconnaissent les PAMPS (Pathogen Associated Molecular Patterns). Une fois que le microbe est reconnu comme étranger, une « cascade » de signaux se déclenche à l'intérieur de la cellule et permet la formation de prolongations, nommées pseudopodes, suite à la déformation de la membrane de celle-ci pour pouvoir entourer la particule et de l'absorber. Cette particule sera enfermée à l'intérieur de la cellule dans un compartiment appelé phagosome ; Par la suite, ces compartiments vont fusionner avec les lysosomes, dans lesquels se trouvent des protéines, les enzymes protéolytiques, chargées de détruire ou de décomposer ces particules.

II.2.Tat inhibe la phagocytose en empêchant le recrutement de Cdc42 sur la coupelle phagocytaire

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) est responsable du SIDA et rend l'organisme vulnérable à de nombreux pathogènes opportunistes. Une étude récente avait montrée que l'action de la protéine virale Tat permet au VIH-1 d'inhiber la capacité d'élimination des phagocytes non infectés tels que les macrophages. Fortement sécrétée par les cellules infectées, Tat entre dans les cellules non infectées et empêche le recrutement d'une petite protéine (Cdc42) impliquée dans le processus de phagocytose (Debaisieux et al., 2015).

Les maladies opportunistes sont les causes majeures de la morbidité et de la mortalité lors du SIDA. Elles sont dues à des pathogènes opportunistes incluant des infections causées par des bactéries comme *Mycobacterium avium* ou des parasites comme *Toxoplasma gondii*. Ces pathogènes sont normalement éliminés par des cellules spécialisées que sont les monocytes, neutrophiles ou macrophages qui vont phagocyter ces pathogènes et les dégrader, mais l'activité phagocytaire de ces phagocytes est très diminuée chez les patients porteurs du VIH-1. La cause de ce défaut était inconnue, mais on savait cependant qu'il n'était pas dû directement à l'infection virale car les phagocytes ne sont pas ou peu infectés par le VIH-1. Des travaux récents ont démontré la forte mobilité de la protéine Tat du VIH-1 ainsi que sa capacité à être sécrétée par les cellules infectées. Cette Tat extracellulaire peut ensuite entrer dans des cellules non infectées, passer dans le cytosol et aller se fixer avec une forte affinité sur un phospholipide particulier, le phosphatidylinositol (4,5)bisphosphate (PtdIns (4,5) P2) qui est localisé sur le feuillet interne de la membrane plasmique, le (PtdIns (4,5) P2) est un élément crucial du processus de phagocytose par son implication direct dans le recrutement sur la coupelle phagocytaire de facteurs impliqués dans ce phénomène. Ces travaux originaux ont aussi montré que Tat bloque le recrutement d'une petite protéine GTPase "Cdc42" sur la coupelle phagocytaire via le PtdIns (4,5) P2, situé au niveau de la zone de contact entre le phagocyte et la cible à capturer (Debaisieux et al., 2015).

II.2.1. Le rôle de Cdc42 et du PtdIns (4,5) P2 dans la phagocytose

Le Phosphoinositide (PtdIns (4,5) P2) semble jouer plusieurs rôles au niveau de la coupelle phagocytaire, dont il permet de :

- moduler la polymérisation de l'actine en affectant des protéines régulatrices d'actine

- réguler le plasma du cytosquelette et l'adhérer à la membrane et permet aussi le recrutement de Rac1 et Cdc42 lors de la phagocytose médiée par le récepteur FcγR.

Le Cdc42 est une petite GTPase de la famille Rho, qui régule les voies de signalisation qui contrôlent diverses fonctions cellulaires, y compris la morphologie cellulaire, la migration cellulaire, l'endocytose et la progression du cycle cellulaire. Les Rho GTPases sont essentielles à l'assemblage et au réarrangement du cytosquelette et la dynamique de l'actine qui sont à la base de l'adhésion et de la migration cellulaires. Elle joue aussi un rôle clé dans la phagocytose car elle permet la polymérisation des filaments d'actines qui soutiennent la formation d'extensions de membranes appelées pseudopodes qui englobent la particule cible pour former le phagosome. Elle est ainsi requise pour la phagocytose via les récepteurs reconnaissant la plupart des pathogènes recouverts par des anticorps (Debaisieux et al., 2015).

II.2.2.mécanisme d'inhibition de la phagocytose par Tat VIH-1

La Protéine Tat VIH-1 est efficacement sécrétée par les cellules infectées. Cette protéine par la suite peut entrer dans des cellules non infectées et atteindre leur Cytosol.

Tat est aussi présente dans les sérums de patients infectés par le VIH-1 à des concentrations de nanomolaire. Une étude avait démontrée que Tat inhibe la phagocytose de bactéries opsonisés *Mycobacterium avium* ou des parasites *Toxoplasma gondii* opsonisés par des macrophages primaires humains. L'ajout d'anticorps anti-Tat ou un virus possédant un mutant de Tat incapable d'être sécrétée (Ad8-Tat-W11Y) rétablit la fonction de phagocytose des micro-organismes par les macrophages primaires. Ce qui démontre que Tat du VIH-1 affecte considérablement la fonction phagocytaire chez les macrophages (Debaisieux et al., 2015).

Il a été observé que cette inhibition résulte d'un défaut de la phagocytose, médiée par le mannose et le récepteur au fragment Fcγ, respectivement et non pas celle médiée par le récepteur au complément CR3. Cette inhibition repose sur l'interaction de forte affinité entre Tat et le PtdIns (4,5) P2. Cette interaction désorganise la machinerie phagocytaire, probablement en empêchant par compétition le recrutement de l'un de ses éléments clés : qu'est le Cdc42, ou elle empêche son recrutement sur la coupelle phagocytaire, ce qui bloque ainsi l'activation de la phagocytose par formation des pseudopodes, comme observé au microscope électronique montré sur la Figure 24.

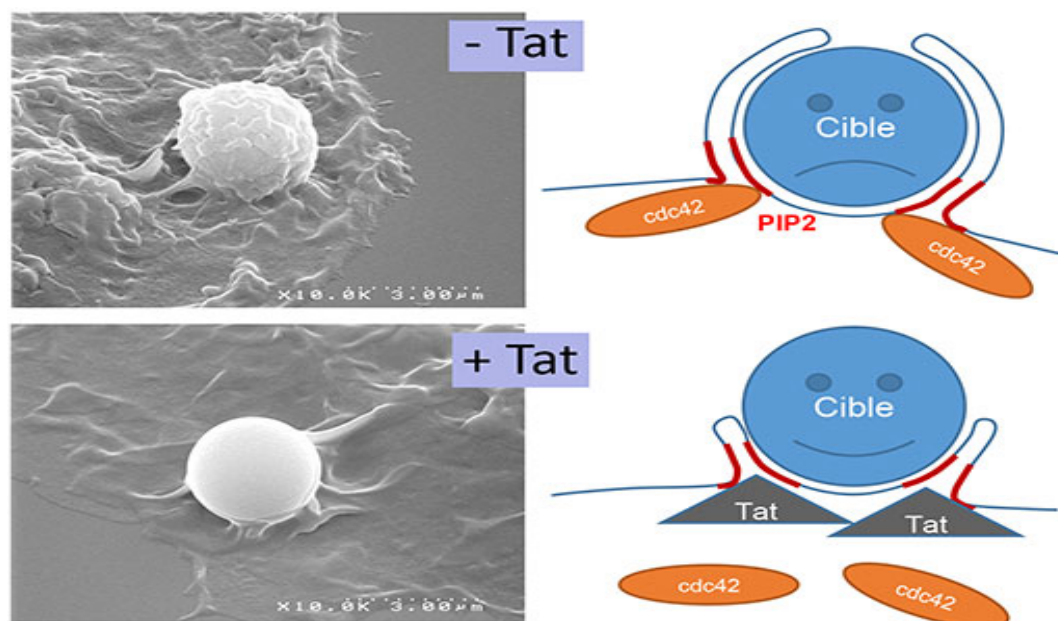


Figure 24: Effets de Tat sur le recrutement de Cdc42 au niveau de la coupe phagocytaire (Beaumelle, Toth et al. 2017). Des macrophages primaires humains ont été prétraités ou non par Tat avant d'ajouter pour 3 minutes des billes de latex (diamètre $3\mu\text{m}$) recouvertes d'anticorps et visualisation par microscopie électronique à balayage. En absence de Tat, le PtdIns (4,5) P2 permet le recrutement de Cdc42 au niveau de la coupe phagocytaire et la polymérisation d'actine nécessaire à l'élongation des pseudopodes. La phagocytose est efficace, les macrophages captent totalement les billes (haut). En présence de Tat, le Cdc42 n'est plus recruté sur la coupelle car Tat mobilise le PtdIns (4,5) P2 à ce niveau. Les pseudopodes sont alors plus courts et la phagocytose des cibles est inhibée car bloquée à un stade précoce, celui de l'élongation des pseudopodes (bas).

Il faut noter aussi que Tat doit être sécrétée par les cellules infectées, puis s'internalise dans les cellules non-infectées par endocytose, pour ensuite exercer leur effet dans le cytosol. Il a été constaté que le virus met en place un système pour promouvoir cette sécrétion efficace. Ce résultat est conforme à la conclusion, que Nef qui n'est pas sécrété par des cellules infectées, est le principal responsable de l'inhibition de la phagocytose dans les cellules infectées. Le virus, par conséquent, utilise deux protéines différentes pour inhiber efficacement la phagocytose dans les macrophages infectés et non infectés. La protéine Tat inhibe également la phagocytose médiée par $\text{Fc}\gamma\text{R}$ dans les neutrophiles et les monocytes.

Cette étude a fourni une base moléculaire pour élucider les dysfonctionnements dans la phagocytose observés dans les Phagocytes non infectés suite à l'infection par le VIH-1. Ces travaux clarifient la cause de la faible activité phagocytaire des phagocytes observée lors de l'infection par le VIH-1 et expliquent comment l'infection par celui-ci peut faciliter le développement d'infections causées par des pathogènes opportunistes (Beaumelle et al., 2017).

*Discussion et
perspectives*

Discussion et perspectives

L'intérêt que porte la communauté scientifique à l'étude des fonctions de la protéine Tat lors de l'infection VIH-1 ne cesse de grandir. De nombreuses interrogations restent encore mal-élucidées, en relation avec les implications fonctionnelles de cette protéine virale pendant l'infection virale. La grande flexibilité de la structure de Tat constitue un obstacle majeur pour mieux comprendre les aspects moléculaires de cette protéine virale. Dans la pathologie du VIH-1, Tat exerce de nombreuses fonctions et possède la capacité d'interagir avec de nombreux partenaires. Dans ce travail, nous nous sommes intéressée dans une première partie à la description de la forte mobilité de la protéine Tat et clarifier les mécanismes moléculaire qui lui permettent de sortir des cellules infectées à travers un mécanisme de sécrétion non-conventionnelle faisant impliqués des résidus situés au niveau du domaine basique de Tat (résidus 49-51), qui interagissent de manière fortement spécifique avec un partenaire membranaire qu'est le phosphoinositide (PtdIns (4,5) P2). Il a été déjà décrit comme responsable de la sécrétion non-conventionnelle du FGF-2. L'affinité de Tat à son partenaire est estimée dans l'ordre de la nano-molaire ($K_d=16$ nM). Cette forte affinité pourrait avoir de conséquences néfastes sur les différents processus cellulaire initiés par le PtdIns (4,5) P2, comme l'endocytose, la phagocytose et l'exocytose. Ce qui participerait activement à la dérégulation des fonctions du système immunitaire rencontrée au cours du SIDA. Dans une seconde partie nous avons décrit les mécanismes moléculaires avec lesquels la protéine Tat du VIH-1 arrive à entrer dans les cellules cibles (LT CD4, macrophages, neutrophiles...etc.) pour y aller induire de dysfonctionnement divers au niveau de ces cellules. Tat se transloque vers le cytosol de ces cellules en empruntant la voie d'endocytose par la voie clathrine impliquant un nombre de récepteurs membranaire. Une fois arriver au niveau des endosomes tardifs, Tat tire profit du pH acide endosomal pour (pH 5.5) pour se déplier à fin d'exposer le résidu Trp-11 qui lui permet une insertion efficace à travers la membrane des endosomes et assurer son passage vers le cytosol. Le dernier chapitre de notre étude été consacré à l'étude des effets de Tat et sa participation active à l'induction de l'état d'immunodéficience observé chez les individus infectés par le VIH-1. En premier lieu Tat montre une forte habilité d'induire l'apoptose des cellules non-infectés à travers sa capacité d'interagir avec beaucoup de partenaire liés à la signalisation apoptotique. Outre, Tat possède une capacité d'inhiber la phagocytose des phagocytes en faisant intervenir sa forte interaction avec le PtdIns (4,5) P2, cette interaction empêche le recrutement du Cdc42 sur la coupe phagocytaire responsable de l'activation du processus de phagocytose ainsi que la formation

des pseudopodes. Ces anomalies ouvrent la voie à l'apparition de nombreuses infections opportunistes.

Récemment La voie de recherche des scientifiques pour lutter contre le SIDA se sont orienté vers l'étude de la protéine Tat et essayer de la cibler en vu de développement de molécules vaccinale. Comme elle est secrétée de manière très précoce après infection par le virus et que cette Tat extracellulaire est incriminée dans l'effondrement de l'immunité cellulaire en déclenchant l'apoptose des LT CD4+ et du maintien des cellules réservoirs produisant le virus (Loret et al., 2016). La protéine Tat est présente chez tout les types et sous types de VIH-1 des différents continents, son rôle au niveau extracellulaire est d'empêcher l'élimination des cellules réservoirs du virus par les cellules cytotoxiques du système immunitaire (Campbell and Loret, 2009).

La raison pour la quelle chez la majorité des patients, le système immunitaire ne développe pas de réponse anti-Tat est la présence d'analogies de séquence entre Tat et des protéines humaines en particulier la protamine, empêche le système immunitaire de se défendre contre le virus. Des chercheurs à l'université d'Aix- Marseille se sont intéresser à un isotype de Tat nommée Tat-Oyi découverte dans une étude menée en 1989 et exprimée par la souche virale VIH-1 Oyi présente chez des patientes Gabonaises résistantes au virus.

Cette souche de VIH-1 spécifique appelée VIH1-Oyi avait montrée que la seule différence avec le VIH-1 classique est la présence d'une mutation sur le gène Tat Cystéine 22 mutée en Serine, cela semble être la raison de la perte d'activité de trans-activation lors de la réplication du virus. Un vaccin thérapeutique efficace à base de Tat Oyi contre le SIDA doit maintenir une virémie indétectable sans thérapie anti-retrovirale. La particularité de Tat-Oyi est de transformer la partie hautement conservée des variants de Tat en un épitope tridimensionnel, stimulant la production d'anticorps monoclonaux comme le mAb7G12 qui reconnaissent et neutralisent tous les variants existants de Tat. Le mAb7G12 a été caractérisé précédemment comme étant un anticorps qui reconnait les différentes variantes de la protéine Tat montrant qu'une séquence bien conservée existe chez tous les variants de cette protéine et qui joue un rôle dans leurs activité.

Egalement un peptide appelé MIMOOX à été également conçu à partir de Tat-Oyi identifié comme le site de liaison possible pour cet anticorps monoclonal mAb7G12, ce peptide a été synthétisé chimiquement et stabilisé par un pont disulfure (Mediouni et al., 2013). Des essais de reconnaissance compétitives avec le mAb7G12 entre Tat-Oyi et

MIMOOX ont montré que ce dernier mime la séquence conservée des variantes de la protéine Tat.

Ces nano-vaccins contiennent un épitope tridimensionnel déclenchant la production d'anticorps neutralisants, ils permettent de provoquer une réponse immunitaire avec une faible diversité d'anticorps polyclonaux, cela devrait réduire significativement le risque de réponse auto-immune du vaccin classique. Cependant le peptide MIMOOX ne pourra pas remplacer Tat-Oyi dans un future vaccin contre Tat parce qu'il a une affinité deux fois inférieure par rapport à Tat-Oyi pour l'Ac mAb7G12.

Les laboratoires biosantech ont décidé alors de prendre la licence de développement et de commercialisation de brevet du vaccin à partir de la Tat-Oyi, Leur hypothèse est fondée sur le fait que la vaccination des patients séropositifs par un principe actif du variant Tat-Oyi aiderai le système immunitaire a reconnaître les variant de la protéine Tat présents dans le sang. La neutralisation de Tat extracellulaire permettra la restauration de l'immunité cellulaire et l'élimination des cellules LT CD4 infectées. Cette stratégie de recherche et développement de molécules vaccinales à base des protéines du virus VIH-1 notamment Tat et Env portent l'espoir des chercheurs d'arriver un jour à concevoir un vaccin efficace pour contrer ce virus dévastateur.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

Abdul-Aziz, M., A. G. Tsolaki, L. Kouser, M. V. Carroll, M. N. Al-Ahdal, R. B. Sim and U. Kishore (2016). "Complement factor H interferes with Mycobacterium bovis BCG entry into macrophages and modulates the pro-inflammatory cytokine response." Immunobiology **221**(9): 944-952.

Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.

Albini, A., G. Barillari, R. Benelli, R. C. Gallo and B. Ensoli (1995). "Angiogenic properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4838-4842.

Alim, A., E. B. N, A. E. Abass, E. M. Elhassan, A. A. Mohammed and I. Adam (2015). "Complement activation, placental malaria infection, and birth weight in areas characterized by unstable malaria transmission in central Sudan." Diagn Pathol **10**: 49.

Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1999). "Apoptosis control by death and decoy receptors." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 255-260.

Bagashev, A. and B. E. Sawaya (2013). "Roles and functions of HIV-1 Tat protein in the CNS: an overview." Virology **10**: 358.

Bannwarth, S. and A. Gatignol (2005). "HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host." Curr HIV Res **3**(1): 61-71.

Bardy, M., B. Gay, S. Pebernard, N. Chazal, M. Courcoul, R. Vigne, E. Decroly and P. Boulanger (2001). "Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vif with Gag and Gag-Pol precursors: co-encapsidation and interference with viral protease-mediated Gag processing." J Gen Virol **82**(Pt 11): 2719-2733.

Barre-Sinoussi, F., A. L. Ross and J. F. Delfraissy (2013). "Past, present and future: 30 years of HIV research." Nat Rev Microbiol **11**(12): 877-883.

Beaumelle, B., P. Toth, O. A. Malak, C. Chopard, G. Loussouarn and N. Vitale (2017). "Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate-mediated pathophysiological effect of HIV-1 Tat protein." Biochimie.

Bennasser, Y., M. L. Yeung and K. T. Jeang (2006). "HIV-1 TAR RNA subverts RNA interference in transfected cells through sequestration of TAR RNA-binding protein, TRBP." J Biol Chem **281**(38): 27674-27678.

Bigalke, J. M., N. Czudnochowski, F. Vollmuth, K. Vogel-Bachmayr, K. Anand and M. Geyer (2011). "Formation of Tat-TAR containing ribonucleoprotein complexes for biochemical and structural analyses." Methods **53**(1): 78-84.

Bonifacino, J. S. and B. S. Glick (2004). "The mechanisms of vesicle budding and fusion." Cell **116**(2): 153-166.

Bukrinskaya, A., B. Brichacek, A. Mann and M. Stevenson (1998). "Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton." J Exp Med **188**(11): 2113-2125.

Buonaguro, L., M. L. Tornesello and F. M. Buonaguro (2007). "Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications." J Virol **81**(19): 10209-10219.

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**(1): 61-76.

Bushman, F., M. Lewinski, A. Ciuffi, S. Barr, J. Leipzig, S. Hannenhalli and C. Hoffmann (2005). "Genome-wide analysis of retroviral DNA integration." Nat Rev Microbiol **3**(11): 848-858.

Cai, H., K. Reinisch and S. Ferro-Novick (2007). "Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle." Dev Cell **12**(5): 671-682.

Campbell, G. R. and E. P. Loret (2009). "What does the structure-function relationship of the HIV-1 Tat protein teach us about developing an AIDS vaccine?" Retrovirology **6**: 50.

Cannon, P. M., S. Matthews, N. Clark, E. D. Byles, O. Iourin, D. J. Hockley, S. M. Kingsman and A. J. Kingsman (1997). "Structure-function studies of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein, p17." J Virol **71**(5): 3474-3483.

Caron, E. and A. Hall (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." Science **282**(5394): 1717-1721.

Chang, H. C., F. Samaniego, B. C. Nair, L. Buonaguro and B. Ensoli (1997). "HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region." AIDS **11**(12): 1421-1431.

Chu, H., J. J. Wang, M. Qi, J. J. Yoon, X. Chen, X. Wen, J. Hammonds, L. Ding and P. Spearman (2012). "Tetherin/BST-2 is essential for the formation of the intracellular virus-containing compartment in HIV-infected macrophages." Cell Host Microbe **12**(3): 360-372.

Ciuffi, A., M. Llano, E. Poeschla, C. Hoffmann, J. Leipzig, P. Shinn, J. R. Ecker and F. Bushman (2005). "A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration." Nat Med **11**(12): 1287-1289.

Clapham, P. R. and A. McKnight (2002). "Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses." J Gen Virol **83**(Pt 8): 1809-1829.

Clark, E., B. Nava and M. Caputi (2017). "Tat is a multifunctional viral protein that modulates cellular gene expression and functions." Oncotarget **8**(16): 27569-27581.

Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux and et al. (1986). "Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS." Science **233**(4761): 343-346.

Costa, L. J., Y. H. Zheng, J. Sabotic, J. Mak, O. T. Fackler and B. M. Peterlin (2004). "Nef binds p6* in GagPol during replication of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **78**(10): 5311-5323.

Dabrowska, A., N. Kim and A. Aldovini (2008). "Tat-induced FOXO3a is a key mediator of apoptosis in HIV-1-infected human CD4+ T lymphocytes." J Immunol **181**(12): 8460-8477.

Debaisieux, S., S. Lachambre, A. Gross, C. Mettling, S. Besteiro, H. Yezid, D. Henaff, C. Chopard, J. M. Mesnard and B. Beaumelle (2015). "HIV-1 Tat inhibits phagocytosis by preventing the recruitment of Cdc42 to the phagocytic cup." Nat Commun **6**: 6211.

Debaisieux, S., F. Rayne, H. Yezid and B. Beaumelle (2012). "The ins and outs of HIV-1 Tat." Traffic **13**(3): 355-363.

Deeks, S. G., J. Overbaugh, A. Phillips and S. Buchbinder (2015). "HIV infection." Nat Rev Dis Primers **1**: 15035.

Diakonova, M., G. Bokoch and J. A. Swanson (2002). "Dynamics of cytoskeletal proteins during Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages." Mol Biol Cell **13**(2): 402-411.

Doherty, G. J. and H. T. McMahon (2009). "Mechanisms of endocytosis." Annu Rev Biochem **78**: 857-902.

Ensoli, B., G. Barillari, S. Z. Salahuddin, R. C. Gallo and F. Wong-Staal (1990). "Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients." Nature **345**(6270): 84-86.

Espert, L., M. Denizot, M. Grimaldi, V. Robert-Hebmann, B. Gay, M. Varbanov, P. Codogno and M. Biard-Piechaczyk (2007). "Autophagy and CD4+ T lymphocyte destruction by HIV-1." Autophagy **3**(1): 32-34.

Falguieres, T., P. P. Luyet, C. Bissig, C. C. Scott, M. C. Velluz and J. Gruenberg (2008). "In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101." Mol Biol Cell **19**(11): 4942-4955.

Fauci, A. S. and R. C. Desrosiers (1997). Pathogenesis of HIV and SIV. Retroviruses. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Cold Spring Harbor (NY).

Fisher, A. G., M. B. Feinberg, S. F. Josephs, M. E. Harper, L. M. Marselle, G. Reyes, M. A. Gonda, A. Aldovini, C. Debouk, R. C. Gallo and et al. (1986). "The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication." Nature **320**(6060): 367-371.

- Ganser-Pornillos, B. K., A. Cheng and M. Yeager (2007). "Structure of full-length HIV-1 CA: a model for the mature capsid lattice." Cell **131**(1): 70-79.
- Geretti, A. M. (2006). "HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management." Curr Opin Infect Dis **19**(1): 1-7.
- Giacca, M. (2005). "HIV-1 Tat, apoptosis and the mitochondria: a tubulin link?" Retrovirology **2**: 7.
- Girard, M. P., S. Osmanov, O. M. Assossou and M. P. Kieny (2011). "Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: a review." Vaccine **29**(37): 6191-6218.
- Gross, A., J. M. McDonnell and S. J. Korsmeyer (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." Genes Dev **13**(15): 1899-1911.
- Henne, W. M., E. Boucrot, M. Meinecke, E. Evergren, Y. Vallis, R. Mittal and H. T. McMahon (2010). "FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis." Science **328**(5983): 1281-1284.
- Hetzer, C., W. Dormeyer, M. Schnolzer and M. Ott (2005). "Decoding Tat: the biology of HIV Tat posttranslational modifications." Microbes Infect **7**(13): 1364-1369.
- Hu, W. S. and S. H. Hughes (2012). "HIV-1 reverse transcription." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(10).
- Iordanskiy, S. N. and M. I. Bukrinsky (2009). "Analysis of viral and cellular proteins in HIV-1 reverse transcription complexes by co-immunoprecipitation." Methods Mol Biol **485**: 121-134.
- Jahn, R. and R. H. Scheller (2006). "SNAREs--engines for membrane fusion." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 631-643.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jouvenet, N., S. M. Simon and P. D. Bieniasz (2011). "Visualizing HIV-1 assembly." J Mol Biol **410**(4): 501-511.
- Ju, S. M., H. Y. Song, J. A. Lee, S. J. Lee, S. Y. Choi and J. Park (2009). "Extracellular HIV-1 Tat up-regulates expression of matrix metalloproteinase-9 via a MAPK-NF-kappaB dependent pathway in human astrocytes." Exp Mol Med **41**(2): 86-93.
- Kamori, D. and T. Ueno (2017). "HIV-1 Tat and Viral Latency: What We Can Learn from Naturally Occurring Sequence Variations." Front Microbiol **8**: 80.

Kim, N., S. Kukkonen, S. Gupta and A. Aldovini (2010). "Association of Tat with promoters of PTEN and PP2A subunits is key to transcriptional activation of apoptotic pathways in HIV-infected CD4+ T cells." *PLoS Pathog* **6**(9): e1001103.

Korber, B., M. Muldoon, J. Theiler, F. Gao, R. Gupta, A. Lapedes, B. H. Hahn, S. Wolinsky and T. Bhattacharya (2000). "Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains." *Science* **288**(5472): 1789-1796.

Leavitt, A. D., R. B. Rose and H. E. Varmus (1992). "Both substrate and target oligonucleotide sequences affect in vitro integration mediated by human immunodeficiency virus type 1 integrase protein produced in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Virol* **66**(4): 2359-2368.

Lee, M. C., E. A. Miller, J. Goldberg, L. Orci and R. Schekman (2004). "Bi-directional protein transport between the ER and Golgi." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 87-123.

Lemey, P., O. G. Pybus, B. Wang, N. K. Saksena, M. Salemi and A. M. Vandamme (2003). "Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6588-6592.

Levin, J. G., J. Guo, I. Rouzina and K. Musier-Forsyth (2005). "Nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: critical role in reverse transcription and molecular mechanism." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **80**: 217-286.

Levy, D. N., G. M. Aldrovandi, O. Kutsch and G. M. Shaw (2004). "Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(12): 4204-4209.

Liu, Y., M. Jones, C. M. Hingtgen, G. Bu, N. Larabee, R. E. Tanzi, R. D. Moir, A. Nath and J. J. He (2000). "Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands." *Nat Med* **6**(12): 1380-1387.

Loeb, D. D., R. Swanstrom, L. Everitt, M. Manchester, S. E. Stamper and C. A. Hutchison, 3rd (1989). "Complete mutagenesis of the HIV-1 protease." *Nature* **340**(6232): 397-400.

Loret, E. P., A. Darque, E. Jouve, E. A. Loret, C. Nicolino-Brunet, S. Morange, E. Castanier, J. Casanova, C. Caloustian, C. Bornet, J. Coussirou, J. Boussetta, V. Couallier, O. Blin, B. Dussol and I. Ravaux (2016). "Intradermal injection of a Tat Oyi-based therapeutic HIV vaccine reduces of 1.5 log copies/mL the HIV RNA rebound median and no HIV DNA rebound following cART interruption in a phase I/II randomized controlled clinical trial." *Retrovirology* **13**: 21.

Massiah, M. A., M. R. Starich, C. Paschall, M. F. Summers, A. M. Christensen and W. I. Sundquist (1994). "Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein." *J Mol Biol* **244**(2): 198-223.

- Matsui, M., R. J. Warburton, P. C. Cogswell, A. S. Baldwin, Jr. and J. A. Frelinger (1996). "Effects of HIV-1 Tat on expression of HLA class I molecules." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **11**(3): 233-240.
- Mediouni, S., A. Darque, I. Ravoux, G. Baillat, C. Devaux and E. P. Loret (2013). "Identification of a highly conserved surface on Tat variants." J Biol Chem **288**(26): 19072-19080.
- Miyauchi, K., Y. Kim, O. Latinovic, V. Morozov and G. B. Melikyan (2009). "HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes." Cell **137**(3): 433-444.
- Muesch, A., E. Hartmann, K. Rohde, A. Rubartelli, R. Sitia and T. A. Rapoport (1990). "A novel pathway for secretory proteins?" Trends Biochem Sci **15**(3): 86-88.
- Murphy, K. M., M. J. Sweet and D. A. Hume (1994). "The HIV-1 regulatory protein Nef has a specific function in viral expression in a murine macrophage cell line." J Leukoc Biol **56**(3): 294-303.
- Musinova, Y. R., E. V. Sheval, C. Dib, D. Germini and Y. S. Vassetzky (2016). "Functional roles of HIV-1 Tat protein in the nucleus." Cell Mol Life Sci **73**(3): 589-601.
- Naif, H. M. (2013). "Pathogenesis of HIV Infection." Infect Dis Rep **5**(Suppl 1): e6.
- Nickel, W. and C. Rabouille (2009). "Mechanisms of regulated unconventional protein secretion." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(2): 148-155.
- Peloponese, J. M., Jr., C. Gregoire, S. Opi, D. Esquieu, J. Sturgis, E. Lebrun, E. Meurs, Y. Collette, D. Olive, A. M. Aubertin, M. Witvrow, C. Pannecouque, E. De Clercq, C. Bailly, J. Lebreton and E. P. Loret (2000). "1H-13C nuclear magnetic resonance assignment and structural characterization of HIV-1 Tat protein." C R Acad Sci III **323**(10): 883-894.
- Perez, L. G., M. A. O'Donnell and E. B. Stephens (1992). "The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor binding glycoprotein." J Virol **66**(7): 4134-4143.
- Pfeffer, S. R. (1994). "Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking." Curr Opin Cell Biol **6**(4): 522-526.
- Planes, R. and E. Bahraoui (2013). "HIV-1 Tat protein induces the production of IDO in human monocyte derived-dendritic cells through a direct mechanism: effect on T cells proliferation." PLoS One **8**(9): e74551.
- Pollard, V. W. and M. H. Malim (1998). "The HIV-1 Rev protein." Annu Rev Microbiol **52**: 491-532.
- Popov, S., M. Rexach, G. Zybarth, N. Reiling, M. A. Lee, L. Ratner, C. M. Lane, M. S. Moore, G. Blobel and M. Bukrinsky (1998). "Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex." EMBO J **17**(4): 909-917.

Quaranta, M. G., B. Mattioli, L. Giordani and M. Viora (2006). "The immunoregulatory effects of HIV-1 Nef on dendritic cells and the pathogenesis of AIDS." FASEB J **20**(13): 2198-2208.

Rayne, F., S. Debaisieux, A. Bonhoure and B. Beaumelle (2010). "HIV-1 Tat is unconventionally secreted through the plasma membrane." Cell Biol Int **34**(4): 409-413.

Rayne, F., S. Debaisieux, H. Yezid, Y. L. Lin, C. Mettling, K. Konate, N. Chazal, S. T. Arold, M. Pugniere, F. Sanchez, A. Bonhoure, L. Briant, E. Loret, C. Roy and B. Beaumelle (2010). "Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate enables efficient secretion of HIV-1 Tat by infected T-cells." EMBO J **29**(8): 1348-1362.

Recchi, C. and P. Chavrier (2006). "V-ATPase: a potential pH sensor." Nat Cell Biol **8**(2): 107-109.

Romani, B., S. Engelbrecht and R. H. Glashoff (2010). "Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1." J Gen Virol **91**(Pt 1): 1-12.

Rosenberg, E. S., J. M. Billingsley, A. M. Caliendo, S. L. Boswell, P. E. Sax, S. A. Kalams and B. D. Walker (1997). "Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia." Science **278**(5342): 1447-1450.

Roth, M. G. (2004). "Phosphoinositides in constitutive membrane traffic." Physiol Rev **84**(3): 699-730.

Schmid, E. M. and H. T. McMahon (2007). "Integrating molecular and network biology to decode endocytosis." Nature **448**(7156): 883-888.

Schubert, U., S. Bour, A. V. Ferrer-Montiel, M. Montal, F. Maldarell and K. Strebel (1996). "The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains." J Virol **70**(2): 809-819.

Smith, D. G., G. J. Guillemain, L. Pemberton, S. Kerr, A. Nath, G. A. Smythe and B. J. Brew (2001). "Quinolinic acid is produced by macrophages stimulated by platelet activating factor, Nef and Tat." J Neurovirol **7**(1): 56-60.

Stoltzfus, C. M. and J. M. Madsen (2006). "Role of viral splicing elements and cellular RNA binding proteins in regulation of HIV-1 alternative RNA splicing." Curr HIV Res **4**(1): 43-55.

Swanson, J. A. (2008). "Shaping cups into phagosomes and macropinosomes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 639-649.

Tahirov, T. H., N. D. Babayeva, K. Varzavand, J. J. Cooper, S. C. Sedore and D. H. Price (2010). "Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb." Nature **465**(7299): 747-751.

Toschi, E., I. Bacigalupo, R. Strippoli, C. Chiozzini, A. Cereseto, M. Falchi, F. Nappi, C. Sgadari, G. Barillari, F. Mainiero and B. Ensoli (2006). "HIV-1 Tat regulates endothelial cell cycle progression via activation of the Ras/ERK MAPK signaling pathway." Mol Biol Cell **17**(4): 1985-1994.

Van Epps, P. and R. C. Kalayjian (2017). "Human Immunodeficiency Virus and Aging in the Era of Effective Antiretroviral Therapy." Infect Dis Clin North Am.

Van Maele, B. and Z. Debyser (2005). "HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins." AIDS Rev **7**(1): 26-43.

Vendeville, A., F. Rayne, A. Bonhoure, N. Bettache, P. Montcourrier and B. Beaumelle (2004). "HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses." Mol Biol Cell **15**(5): 2347-2360.

Wieffer, M., T. Maritzen and V. Haucke (2009). "SnapShot: endocytic trafficking." Cell **137**(2): 382 e381-383.

Yuan, J. and B. A. Yankner (2000). "Apoptosis in the nervous system." Nature **407**(6805): 802-809.

Zeitler, M., J. P. Steringer, H. M. Muller, M. P. Mayer and W. Nickel (2015). "HIV-Tat Protein Forms Phosphoinositide-dependent Membrane Pores Implicated in Unconventional Protein Secretion." J Biol Chem **290**(36): 21976-21984.

Zhang, X., X. Zhang and F. Wang (2012). "Intracellular transduction and potential of Tat PTD and its analogs: from basic drug delivery mechanism to application." Expert Opin Drug Deliv **9**(4): 457-472.

Zhou, Q. and P. A. Sharp (1995). "Novel mechanism and factor for regulation by HIV-1 Tat." EMBO J **14**(2): 321-328.

Résumé

Le VIH-1 est un rétrovirus d'origine simienne responsable de l'apparition du syndrome d'immunodéficience chez l'homme. La pathogénicité de ce virus est causée en grande partie par un nombre de protéines virales codées par les différents gènes du VIH-1. C'est le cas de la protéine régulatrice Tat, indispensable à la réplication virale ainsi qu'à l'apparition et la progression de l'infection au VIH-1. La protéine Tat est sécrétée de manière non conventionnelle par les cellules infectées, donc indépendante de la voie de sécrétion classique passant par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Elle s'associe au PtdIns (4,5) P2 contenu sur le feuillet interne de la membrane plasmique de manière très spécifique avec une très forte affinité. Tat est ainsi recrutée au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique, qui est ensuite sécrétée dans le milieu extracellulaire. Cette protéine, une fois au milieu extracellulaire possède la capacité d'entrer dans les LT CD4 non infectées, par voie d'endocytose via la clathrine et fait intervenir différents récepteurs cellulaires. A l'intérieur des cellules non infectées, cette protéine peut déclencher l'apoptose soit par la voie intrinsèque médiée par la mitochondrie ou bien la voie extrinsèque, en activant les récepteurs de la mort cellulaire. Elle peut également déclencher la mort cellulaire en perturbant le réseau micro-tubulaire. La destruction massive par apoptose des LT CD4 non infectées, engendrée par la protéine Tat est en partie responsable de l'évolution vers le stade SIDA. La protéine Tat est aussi incriminée dans l'inhibition de la phagocytose chez les macrophages, en interagissant avec ce même PtdIns (4,5) P2, cette protéine interfère avec le recrutement du facteur Cdc-42 sur la coupelle phagocytaire et prévient ainsi son activation et affecte aussi l'élongation des pseudopodes. Ce qui empêche la phagocytose des agents pathogènes responsables de l'apparition des maladies opportunistes au cours du SIDA.

Mots clés: Tat VIH-1, trafic, immunodéficience, phagocytose, apoptose.

Abstract

HIV-1 is a retrovirus responsible of a human immunodeficiency. The pathogenesis of this virus is largely caused by several proteins encoded by different genes located on the HIV-1 genome. This is the case of the Tat protein, which is essential for viral replication and the progression of HIV-1 infection. Tat protein is unconventionally secreted by the infected cells and Therefore independent of the endoplasmic reticulum / Golgi apparatus pathway. Tat protein is able to specifically bind PtdIns 4,5 P2 located at the plasma membrane, Tat becomes active and then recruited to the inner leaflet of plasma membrane to promote its membrane translocation. This protein, once outside of the cell has the ability to enter bystander uninfected LT CD4+ by endocytosis clathrin dependant and involving various cellular receptors. Within the uninfected cells, this protein can trigger apoptosis signaling either by the intrinsic pathway, mediated by mitochondria or the extrinsic pathway, mediated by death receptors. Tat can also trigger cell death by disrupting micro-tubular network. The massive destruction of bystander LT CD4 by apoptosis, induced by Tat protein is in part responsible for the evolution towards AIDS stage. Tat protein is also incriminated in the inhibition of phagocytosis in macrophages. by interacting with PtdIns 4,5 P2, Tat protein interferes with the recruitment of Cdc-42 on phagocyte cup and prevent its activation and also affects the pseudopoda's elongation which prevents the phagocytosis of pathogens responsible for the appearance of opportunistic diseases.

Keys words: Tat HIV-1, immunodeficiency, phagocytosis, apoptosis.

