HAL
open science

L'autophagie induite par les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 dégrade les peroxysomes : rôle dans la mort des lymphocytes T CD4 non infectés

Mathilde Galais

To cite this version:

Mathilde Galais. L'autophagie induite par les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 dégrade les peroxysomes : rôle dans la mort des lymphocytes T CD4 non infectés. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTT017 . tel-02464911

HAL Id: tel-02464911

https://theses.hal.science/tel-02464911

Submitted on 3 Feb 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé - CBS2

Unité de recherche : Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier IRIM UMR9004

L'autophagie induite par les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 dégrade les peroxysomes : rôle dans la mort des lymphocytes T CD4 non infectés

Présentée par Mathilde GALAIS
Le 25 Septembre 2019

Sous la direction de Dr Lucile ESPERT

Devant le jury composé de

Dr. Fabienne RAYNE, Maître de Conférences, MFP Bordeaux	Rapporteur
Dr. Jean-Christophe PAILLART, Directeur de Recherche, IBMC Strasbourg	Rapporteur
Pr. Audrey ESCLATINE, Professeur Université Paris Sud, IB2C Paris	Présidente de jury
Dr. Guillaume BOSSIS, Chargé de Recherche, IGMM Montpellier	Examinateur
Pr. Pierre CORBEAU, Professeur de l'UM, IGH Montpellier	Examinateur
Dr. Lucile ESPERT, Chargée de Recherche, IRIM Montpellier	Directeur de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

Aux termes de ce doctorat au sein de l'Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, je souhaite remercier les personnes avec qui j'ai partagé cette expérience et qui m'ont écoutée, encadrée et soutenue lors de sa réalisation. J'adresse une attention particulière…

Aux membres de mon jury de thèse, je les remercie pour avoir accepté de lire mon manuscrit et évaluer mon travail de recherche. Je remercie les examinateurs *Pr. Pierre Corbeau*, *Pr. Audrey Esclatine* et *Dr. Guillaume Bossis*. Je remercie mes rapporteurs *Dr. Fabienne Rayne* et *Dr. Jean-Christophe Paillart* pour leur investissement, leurs évaluations et l'intérêt accordé à mon projet de recherche.

A mon comité de thèse constitué de *Dr. Sébastien Besteiro*, *Dr. Nathalie Chazal* et *Dr. Sophie Pattingre*. Merci pour votre investissement, votre écoute et vos encouragements. Les conseils personnels prodigués lors de ces bilans me sont chers et je vous remercie tous d'avoir pris le temps de me faire progresser.

Aux membres de l'équipe Autophagie et Infections, anciens ou actuels, je vous remercie pour le quotidien partagé et l'apprentissage scientifique. J'adresse un chaleureux remerciement à *Martine* pour ses conseils bienveillants, qu'ils aient été scientifiques ou non, qui sont des apprentissages que je veillerai à poursuivre. Je tiens également à remercier tout particulièrement *Véro* qui en plus de son enthousiasme quotidien, m'a aussi beaucoup épaulée.

A *Lucile*, j'adresse ici des remerciements qui me sont chers et qui vont au-delà de ceux pour l'encadrement de ma thèse. J'ai apprécié les nombreux événements scientifiques auxquelles j'ai pu prendre part, l'apprentissage des valeurs du métier de chercheur, mais aussi l'apprentissage personnel que j'ai découvert. Je ne mesure pas la reconnaissance éprouvée à ton égard pour ces trois années. Je souhaite enfin simplement que les liens tissés perdurent.

Aux membres de l'Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, vous êtes nombreux, mais j'ai pour chacun d'entre vous une pensée particulière pour le cadre de travail partagé. Je remercie le directeur *Dr. Jean-Michel Mesnard* pour la bourse attribuée qui m'a permise de rejoindre l'établissement pour un stage par lequel j'ai commencé. Je remercie l'*équipe Support* qui a su me guider dans le quotidien et notamment *Pascale*. Je remercie *Antoine*, *Nathalie*, *Fabien, Nat, Seb, Éric M, Sylvain et Simon du MRI* qui ont été des personnes clés pour l'évolution de ma thèse. Je remercie également le comité d'organisation des journées IRIM 2017 avec qui j'ai partagé une belle expérience.

Aux doctorants de l'IRIM, ma promo et les suivantes, *Malvina, Juliette, Fernande,* tous dans le même bateau et rien qu'une bière fraîche du vendredi soir ne puisse pas surmonter.

Et puis, il y a les amis, ceux rencontrés à l'institut, au tennis, à Montpellier. Merci pour votre amitié, vos rires et votre soutien. *Matthias* je te remercie pour ta gentillesse inconditionnelle, et *Ana-Victoria* pour ta bienveillance. *Alice, Clément, Christophe, Juliette, Sarah, Juliette, Colin, Simon* vous êtes des rencontres d'amitié qui me sont chères et qui ont égayé mon quotidien, je vous en remercie. *Mélina, Margaux, Elsa, Agathe, Tony, Isa,* partager ma passion du tennis avec vous a été une réelle joie, j'espère vous retrouver encore sur les courts de terre battue. Ensuite, merci à *Célia* pour avoir été là pour moi, et pour les voyages ensemble, on continue sur le même cap peu importe la distance. Enfin, à *Justine* que je remercie de tout mon cœur pour les nombreux moments passés et la belle amitié construite. Tu m'as soutenue dans les temps forts et les moins bons, mais surtout on a ri et on s'est amusées donc pour ta joie de vivre, merci.

A tous, du fond du cœur, merci.

Enfin, je remercie ma famille si compréhensive tout au long du chemin parcouru. J'ai pu puiser grâce à vous le courage et la motivation nécessaire pour aller au bout de ce doctorat. Merci à mes *grands-parents* pour leurs visites sous le soleil de Montpellier pour échapper à la grisaille belge. *Simon,* merci pour toutes les choses que grâce à la fraternité l'on n'a pas besoin de se dire. *Maman, Papa* vous rendre fiers m'aura fait tenir jusqu'au bout. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir poussé à me surpasser à chaque difficulté et pour votre dévouement et votre soutien inconditionnel…

Merci

« How lucky I am to have something that makes saying goodbye so hard. »

Winnie the Pooh

Résumé

L'autophagie induite par les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 dégrade les peroxysomes : rôle dans la mort des lymphocytes T CD4 non infectés.

Le développement de la phase SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise) chez les patients infectés par le virus VIH-1 (Virus de l'Immunodéficience Humaine) se caractérise par une diminution progressive du nombre de cellules T CD4. Or la majorité des cellules constituant cette déplétion sont non-infectées et appelées "bystander". En 2006, notre équipe a montré que le contact entre les cellules infectées exprimant les glycoprotéines de l'enveloppe (Env) et les cellules non-infectées exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 déclenche au sein de ces dernières la voie d'autophagie, ce qui mène à une mort cellulaire par apoptose. L'autophagie est un processus impliqué dans la dégradation de matériel cytoplasmique après sa séquestration au sein de vacuoles dans lesquelles il sera dégradé puis recyclé. Ce processus peut être hautement sélectif par l'action de protéines réceptrices tels que p62 ou NBR1.

L'objectif de mon projet de thèse vise à comprendre comment l'autophagie induite par Env mène les cellules T CD4 bystander à leur mort par apoptose. Une précédente étude menée par notre équipe a démontré que les changements induits par Env au sein de ces cellules T CD4 non infectées comprenaient la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) menant à un état de stress oxydatif. Nous avons utilisé la technique HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence), pour montrer que le stress oxydatif induit par Env est impliqué dans la mort des cellules T CD4 bystander par apoptose. Nous avons également observé que l'autophagie doit être dégradative pour mener ces cellules T CD4 à leur mort par apoptose.

De plus, nous avons observé une dégradation des protéines peroxysomales par l'autophagie induite par Env dans le même modèle. Les peroxysomes sont des organelles essentielles de la cellule qui sont en partie responsables de la détoxification des ROS dans la cellule. Leur nombre est régulé par une dégradation sélective autophagique que l'on appelle la pexophagie.

Dès lors, nous étudions l'hypothèse de l'induction par Env d'une dégradation sélective des systèmes antioxydants de la cellule par autophagie dans les cellules T CD4 bystander. Les peroxysomes étant des organites responsables de la réponse au stress oxydatif, leur dégradation sélective pourrait empêcher la cellule de faire face au stress oxydatif qu'elle subit et la mener vers une mort cellulaire par apoptose. En conclusion, nous montrons que l'autophagie induite par Env dégrade un système antioxydant important qui est un facteur clé nécessaire à la survie des cellules T CD4 bystander pour réduire le stress oxydatif induit par Env.

Mots-clés : Pexophagie, VIH-1, Apoptose, ROS, Env

Laboratoire : Autophagie et Infections, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier
IRIM, UMR9004, 1919 Route de Mende 34293 Cedex 5 Montpellier

Abstract

Autophagy induced by HIV-1 envelope glycoproteins degrades peroxisomes: role in apoptosis of uninfected T CD4 lymphocytes.

The development of AIDS (Acquired ImmunoDeficiency Syndrome) in HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus)-infected patients is characterized by a progressive decrease in the number of CD4 T cells. The majority of dying cells are non-infected and called bystander CD4 T cells. In 2006, our team demonstrated that the contact between infected cells (expressing the envelope glycoproteins (Env)) and non-infected cells (expressing the CD4 and CXCR4 receptors) was responsible for enhancing the autophagic pathway which lead to their cellular death by apoptosis. The autophagic pathway is involved in the degradation of cytoplasmic material after its sequestration into vacuoles wherein it will be degraded and then recycled. This process can be highly selective through the involvement of receptor proteins such as p62 or NBR1.

We aim at understanding how Env-mediated autophagy can lead to apoptosis in bystander CD4 T cells. A precedent work of our team showed that the changes induced by Env in bystander CD4 T cells included the production of reactive oxygen species (ROS) leading to an oxidative stress state. We used an HTRF technic (Homogeneous Time Resolved Fluorescence) to show that the oxidative stress induced by Env is involved in the cellular death by apoptosis of bystander CD4 T cells. We also show that the autophagic process involved has to be a degradative process to lead these CD4 T cells to their death by apoptosis.

Moreover, we have observed that Env-mediated autophagy was degrading peroxisomal proteins. Peroxisomes are essential organelles in the cell responsible partly for the detoxification of ROS in the cell. Their number is regulated through a selective autophagic degradation known as pexophagy.

Therefore, we hypothesized that Env induced a selective degradation by autophagy of the cell antioxidant system in bystander CD4 T cells. Since peroxisomes are responsible for regulating the cellular response to an oxidative stress state, their selective degradation could prevent the cell from overcoming this event and eventually lead to its death by apoptosis. In conclusion, we are showing that Env-mediated autophagy degrades important antioxidant systems which are a key survival factor necessary to the bystander CD4 T cells to reduce the oxidative stress induced by Env.

Key words: Pexophagy, HIV-1, apoptosis, ROS, Env

Laboratory : Autophagie et Infections, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier IRIM, UMR9004, 1919 Route de Mende 34293 Cedex 5 Montpellier

Abréviations

°C (degré Celsius).....72
mL millilitre.....12
µm micromètre 33
nm nanomètre.....4
kb kilobases 4
kDa kiloDalton 4

K Lysine.....21
L Leucine.....30
Q Glutamine 21
R Arginine 21
E Glutamate.....21
F Phénylalanine 21
W Tryptophane 30

3-MA (3-methyladenine).....25
ADCC (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity).....7
ADCD (autophagy-dependent cell death) 36
ADN, (Acide Désoxyribonucléique) 3
AF (Auranofin) 68
AICD (Activation Induced T Cell Death)...15
AMBRA1 (Autophagy and Beclin1 Regulator 1) 24
AMD3100 (AnorMeD3100) 51
AMPc (Adénine MonoPhosphate cyclique) 37
AMPK (AMP Activated Protein Kinase) ...23
ANT (Adenine Nucleotide Translocase)...18
AP (antiprotéases).....56
APOBEC (Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic polypeptide-like).....6
ARE (Antioxydant Response Element) 40
ARN (Acide RiboNucléique).....3
ASP (AntiSense Protein) 8
ATG (Autophagy Related Genes).....19
ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated).....33
ATP (Adenosine TriPhosphate).....38
BAD (BCL-2 Agonist of cell Death).....38
BafA1 (Bafilomycin A1) 26
Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) 24
BID (BH3-Interacting domain Death agonist)..... 38
BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3) 32
Bnip3L (Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3, long form) 41
BST2 (Bone Marrow Stomal Cell Antigen 2) 7
CA (capside) 4
cART (combination AntiRetroviral Therapy) 2
CCR5 (C-C Chemokine Receptor 5) 5
CD4 (Cluster of Differenciation 4)..... 5
CDK9 (Cyclin Dependent Kinase 9) 10
CMA (Chaperone Mediated Autophagy) 21
CXCR4 (C-X-C Chemokine Receptor type 4) 5
DAB (3’3-Diaminobenzidine) 56
DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) 78
DAPK (Death-associated Protein Kinase) 24
DC (Dendritic Cell)..... 9
DC-SIGN (Dendritic Cell Specific Intracellular adhesion molecule 3 Grabbing non Integrin)..... 9
DFCP1 (Double FYVE Containing Protein1) 24
DHR123 (DiHydroRhodamine 123)..... 52
DIF-1 (Differenciation Inducing Factor-1)37
DMEM (Dulbecco’s modified Eagle medium)..... 71
DRAM1 (Damage-Regulated Autophagy Modulator 1)..... 38
EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic)..... 72
EFS (Etablissement Français du Sang) 72
ENV (glycoprotéines de l’enveloppe) 4
ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) 27
FOXO3a (Forkhead class O) 39
FUNDC1 (FUN14 Domain Containing 1) . 32
GABARAPs (GABA(A) receptor-associated protein) 26
GAG (group-specific antigen)..... 4
GAPDH (Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase)..... 76

GFP (Green Fluorescence Protein) 57
Grx (Glutaredoxine) 17
H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène) 17
HAND (HIV-Associated Neurocognitive Disorders) 46
HEK.293T (Human Embryonic Kidney) 50
HRP (Horseradish Peroxydase) 77
HSC70 (Heat Shock cognate 71 kDa protein) 21
HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence) 51
IL (Interleukine) 13
IN (Intégrase) 5
IRGM (immunity-associated GTPase family) 45
JNK1 (c-Jun N-terminale 1 Kinase) 24
Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) 40
LAMP2A (Lysosome-associated membrane protein 2A) 21
LANDO (LC3-Associated Endocytosis) 28
LIR (LC3-Interacting Region) 29
LT CD4 (Lymphocyte T CD4) 9
LTRs (Long Terminal Repeats) 4
MA (Matrice) 4
MAPs-LC3 (Microtubule-associated Protein Light Chain 3) 26
MFN (Mitofusin) 35
MHC (Major Histocompatibility Complex) 7
mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) 16
NAC (N-acetylcystein) 53
NC (Nucléocapside) 4
NDP52 (Nuclear Dot Protein 52) 27
Nef (Negative regulator Factor) 7
NIX (NIP3-like protein X) 38
NOX (NADPH oxydase) 17
NPC (Nuclear Pore Complex) 10
Nrf2 (Nuclear Factor erythroid 2-Related factor 2) 39
OH (radical hydroxyle) 17
OPTN (Optineurin) 31
PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) 51
PB1 (Phox and BEM1 domain) 31
PBMC (Peripheral Blood Mononucleated Cells) 44
PBS (Phosphate Buffered Saline) 72
PE (phosphatidylethanolamine) 25
PEG (PolyEthyleneGlycol) 60
PI (phosphatidylinositol) 24
PI3K-III (phosphoinositide 3-kinase de classe III) 24
PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) 24
PIC (Pre-Integration viral Compex) 6
PINK1 (PTEN-induced kinase 1) 40
PMP (Peroxisomal Membrane Protein) .. 35
Pr (précurseur polyprotéique) 4
PR (protéase) 5
Prx (peroxyrédoxine) 17
P-TEFb (Positive transcription elongation factor) 10
PTP (Permeability Transition Pore) 18
PTS (Peroxysome Targetting Signal) 34
PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) 38
PVDF (polyvinylidene) 76
RE (Reticulum Endoplasmique) 7
Rev (Regulator of expression of Viral proteins) 6
ROS (Reactive Oxygen Species) 17
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 71
RRE (Rev Responsive Element) 6
RT (Reverse Transcriptase) 5
RT-PCR (Reverse Transcription Plomerase Chain Reaction) 76
Rubicon (Run domain Beclin1 interacting and cystein rich domain containing protein) 24
SERINC3/5 (Serin incorporator) 7
SIDA (Syndrome de l'Immunodéficience Acquise) 1
simple oxygène (1/2 O_2) 17
SIV (Simian Immunodeficiency Virus) 1
SNARE (Soluble N-eethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein Receptor) 27
SNC (système nerveux central) 46
SOD (superoxyde dismutase) 17
SQSTM1 (sequestosome1) 29
Stbd1 (starch-binding-domain-containing protein 1) 32
SU (extracellulaires de surface gp120) 5
superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) 17
SVF (Sérum de veau fœtal) 71

TAR (Trans-Activating Response element) 5
Tat (Transactivator of transcription) 5
TAX1BP1 (Tax1 binding protein 1).....31
TEM (Transmission Electronic Microscopy) 48
TGFβ (Transforming Growth Factor-beta) 15
TGI (tractus gastro-intestinal) 14
Th17 (LT helpers de type 17).....9
TLR (toll-like receptors) 41
TM (enveloppe transmembranaires gp41) 5
TRIM (TRIpartite Motif) 32
TRX (Thiordoxin) 17
UBA (UBiquitin-Associated).....30
ULK (Unc-51 like protein) 23
UPS (Ubiquitin proteasome system) 20
UVRAG (UV irradiation resistance associated Gene protein) 27
VDAC1 (Voltage-dependant channel 1).. 41
Vif (Viral Infectivity factor)..... 6
VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine)..... 1
Vpr (Viral protein R) 6
Vpu (Viral protein U)..... 7
VSV-G (Vésicular Stomatitis Virus – Glycoproteins) 75
WIPI1/2 (WD-repeat protein interacting with phosphoinositides)..... 24
Zn^{2+} ion Zinc chargé doublement positivement 4
ZZ (domaine en doigt de Zinc) 31

Table des matières

REMERCIEMENTS III

RESUME V

ABSTRACT VI

ABREVIATIONS VII

TABLE DES ILLUSTRATIONS XV

1 INTRODUCTION 1

1.1 LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 (VIH-1) 1
1.1.A GÉNÉRALITÉS 1
1.1.A.1 Historique 1
1.1.A.2 Épidémiologie 2
1.1.A.3 Structure de la particule virale et organisation du génome viral 3
1.1.A.3.a Gènes de structure 4
1.1.A.3.b Gènes de régulation et gènes auxiliaires 5
1.1.A.4 Réplication virale 8
1.1.A.4.a Entrée virale 8
1.1.A.4.b Transcription Inverse 9
1.1.A.4.c Import Nucléaire et Intégration 10
1.1.A.4.d Transcription 10
1.1.A.4.e Assemblage et Maturation 11
1.1.B PHYSIOPATHOLOGIE 12
1.1.B.1 Transmission 13
1.1.B.2 Déplétion des lymphocytes T CD4 13
1.1.C VIH-1 ET STRESS OXYDATIF 17
1.2 AUTOPHAGIE 19
1.2.A GÉNÉRALITÉS 19
1.2.A.1 Types d'autophagie 21
1.2.A.1.a Microautophagie 21
1.2.A.1.b Autophagie dépendante des chaperonnes (CMA) 21
1.2.A.1.c Macroautophagie 21
1.2.A.2 Mécanismes moléculaires de l'autophagie 23
1.2.A.2.a Initiation 23
1.2.A.2.a.1 Complexe ULK 23
1.2.A.2.a.2 PI3K classe III/Beclin1 24
1.2.A.2.b Elongation 24
1.2.A.2.b.1 Complexe de conjugaison ATG12-ATG5/ATG16L1 25

1.2.A.2.b.2 Complexe de conjugaison ATG8-PE 25
1.2.A.2.c Maturation et recyclage 26
1.2.A.2.c.1 Complexe PI3K de classe III/Beclin1/UVRAG 26
1.2.A.3 Autophagie non canonique 27
1.2.B AUTOPHAGIE SÉLECTIVE 28
1.2.B.1 Généralités 28
1.2.B.2 Récepteurs autophagiques 29
1.2.B.3 Autophagie de précision 31
1.2.B.4 Pexophagie 32
1.2.C AUTOPHAGIE ET MORT CELLULAIRE 34
1.2.C.1 Autophagie en tant que mécanisme de survie cellulaire 34
1.2.C.2 Autophagie en tant que mécanisme de mort cellulaire 35
1.2.C.3 Liens autophagie et apoptose 37
1.2.D AUTOPHAGIE ET STRESS OXYDATIF 38
1.3 AUTOPHAGIE ET VIH-1 40
1.3.A.1 Lymphocytes T CD4 41
1.3.A.2. Lymphocytes T CD4 non infectés 41
1.3.A.1. Lymphocytes T CD4 Infectés 42
1.3.A.2 Autres types cellulaires cibles du VIH-1 44
1.3.B.1. Macrophages 44
1.3.B.2. Cellules Dendritiques 44
1.3.B.3. Cellules du système nerveux central 45

2 OBJECTIFS DE LA THÈSE 47

3 RÉSULTATS 50

3.1 MODÈLES CELLULAIRES ET ANALYSE DE L'AUTOPHAGIE 50
3.1.A MODÈLES CELLULAIRES 50
3.1.B TECHNIQUES D'ANALYSE DE L'AUTOPHAGIE 51
3.2 L'AUTOPHAGIE INDUITE PAR ENV CONDUIT À L'APOPTOSE DES CELLULES T CD4 NON INFECTÉES 51
3.3 L'AUTOPHAGIE INDUITE PAR ENV EST RESPONSABLE DE L'ACCUMULATION DE ROS DANS LES CELLULES T CD4 NON INFECTÉES. 52
3.4 LES ROS INDUITS PAR ENV SONT RESPONSABLES DE LA MORT PAR APOPTOSE DES CELLULES T CD4 NON INFECTÉES 53
3.5 ENV INDUIT LA DÉGRADATION SÉLECTIVE DES PROTÉINES PEROXYSOMALES PAR AUTOPHAGIE 53
3.5.A ENV INDUIT LA DÉGRADATION DE LA CATALASE ET DE PEX14 54
3.5.B L'AUTOPHAGIE INDUITE PAR ENV DÉGRADE PEX14 ET CATALASE 55
3.5.C IDENTIFICATION DES RÉCEPTEURS AUTOPHAGIQUES IMPLIQUÉS DANS LA DÉGRADATION DE PEX14 INDUITE PAR ENV 55
3.6 LES PEROXYSOMES MATURES SONT DÉGRADÉS PAR PEXOPHAGIE EN RÉPONSE À ENV 56
3.6.A QUANTIFICATION DE LA QUANTITÉ DES PEROXYSOMES PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX 57
3.6.B ENV INDUIT LA DIMINUTION DU NOMBRE DE PEROXYSOMES MATURES DANS LES CELLULES CIBLES 58

3.7 LES PEROXYSOMES COLOCALISENT AVEC LES LYSOSOMES **59**
3.8 TEST FONCTIONNEL : COMPLÉMENTATION DES CELLULES CIBLES AVEC LA CATALASE **60**

4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **63**

4.1 CONCLUSIONS **63**
4.2 PERSPECTIVES **65**

5 DISCUSSION **68**

6 MATÉRIEL ET MÉTHODES **72**

6.1 CULTURE CELLULAIRE **72**
6.1.A MODÈLE 1 72
6.1.A.1 Purification cellules T CD4 73
6.1.B MODÈLE 2 73
6.2 RÉACTIFS ET ANTICORPS **74**
6.2.A RÉACTIFS 74
6.2.B ANTICORPS 75
6.3 TRANSFECTIONS **75**
6.3.A ARN INTERFÉRENCE 75
6.3.B PLASMIDES ET TRANSFECTIONS 76
6.4 PRODUCTION VECTEURS RÉTROVIRAUX **76**
6.5 RT-PCR **77**
6.6 WESTERN BLOT **77**
6.7 HTRF (HOMOGENEOUS TIME RESOLVED FLUORESCENCE) **78**
6.8 DOSAGE DES ROS À L'AIDE DE LA SONDE DHR123 (DIHYDRORHODAMINE 123) **78**
6.9 IMMUNOFLUORESCENCE **79**
6.10 DAB (3,3'-DIAMINOBENZIDINE) **79**
6.11 ANALYSE IMAGERIE CONFOCALE **80**
6.11.A CELL PROFILER 80
6.11.B IMARIS 80
6.12 STATISTIQUES **81**

7 BIBLIOGRAPHIE **82**

8 ANNEXES **100**

8.1 LA LAP (LC3-ASSOCIATED PHAGOCYTOSIS) : PHAGOCYTOSE OU AUTOPHAGIE ? **100**
8.2 HIV-1 VPR INHIBITS AUTOPHAGY DURING THE EARLY STEPS OF INFECTION OF CD4 T CELLS **109**
8.3 PARTICIPATIONS À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES **133**
8.3.A L'UNIVERSITE DES JEUNES CHERCHEURS DE SIDACTION – 14 AU 20 OCTOBRE 2017 CARRY-LE-ROUET 133

8.3.B Journée des Docs et Postdocs Labex EpiGenMed 2017 – 27 Octobre 2017 à Montpellier 134
8.3.C 7ème Congrès du CFATG – du 27 au 29 novembre 2017 à Paris 135
8.3.D 16th Congress of the Students of CBS2 Doctoral School – May 31st, 2018 Montpellier 136
8.3.E 8eme Journees du CFATG – 17 au 18 Octobre 2018 La Grande Motte 137
8.3.F Cold Spring Harbor Laboratories – Retroviruses meeting May 20th – 25th 2019 New-York 138

Table des illustrations

Figure 1 : Découverte, phylogénie et prévalence des sous-types du VIH-1 1
Figure 2 : Statut épidémiologique du VIH-1 2
Figure 3 : Représentation de la structure de la particule virale et du génome du VIH-1. 4
Figure 4 : Cycle réplicatif du VIH-1. 7
Figure 5 : Entrée du VIH-1 9
Figure 6 : Evolution de la charge virale et du nombre de lymphocytes T CD4 au cours de l'infection par le VIH-1 chez des patients non traités. 12
Figure 7 : Sources cellulaires de production de ROS lors de l'infection par le VIH. 17
Figure 8 : Différentes formes d'autophagie. 20
Figure 9 : Mécanismes moléculaires de l'autophagie 21
Figure 10 : Régulation du complexe ULK 22
Figure 11 : Modèle de formation du phagophore à partir du RE 23
Figure 12 : Systèmes de conjugaison de l'autophagie. 24
Figure 13 : Différentes formes d'autophagie sélective et les récepteurs impliqués 28
Figure 14 : Familles de récepteurs autophagiques 29
Figure 15 : Pexophagie chez les mammifères 33
Figure 16 : Régulation transcriptionnelle des défenses antioxydantes par l'autophagie et le système du protéasome. 38
Figure 17 : Modèle des interactions entre le VIH-1 et l'autophagie dans les LT CD4. 41
Figure 18 : Relations entre le VIH et l'autophagie selon le type cellulaire ciblé ; lymphocytes T CD4, macrophage ou cellule dendritique. 43
Figure 19 : Env induit la production de ROS dans les cellules T CD4 cibles. 46
Figure 20 : Observation de l'autophagie induite par Env dans les cellules T CD4 cibles. 47
Figure 21 : Hypothèse de travail 47
Figure 22 : Modèles cellulaires étudiés 49
Figure 23 : Stratégies d'inhibition de l'autophagie. 50
Figure 24 : L'apoptose induite par Env dépend de l'autophagie 51
Figure 25 : L'IL1β n'est pas produite en réponse à Env dans notre modèle. 51
Figure 26 : Analyse du rôle de l'autophagie induite par Env dans la production de ROS. 52
Figure 27 : Le stress oxydatif induit par Env est impliqué dans la mort par apoptose des cellules T CD4 non infectées cibles. 52
Figure 28 : Protéines du peroxysome sont dégradées suite au contact avec Env 53
Figure 29 : Protéines du peroxysome sont dégradées par l'autophagie induite par Env. 54
Figure 30 : Protéines du peroxysome sont dégradées par l'autophagie induite par Env. 54
Figure 31 : Etude des récepteurs autophagiques impliqués dans la pexophagie induite par Env 55
Figure 32 : Marquage DAB des peroxysomes 56
Figure 33 : Quantification des peroxysomes par cytométrie en flux. 56
Figure 34 : Dégradation des peroxysomes "matures" induite par Env 57
Figure 35 : Les peroxysomes colocalisent avec les lysosomes. 58
Figure 36 : PEG-catalase n'est pas intégrées dans les cellules LT CD4 59

Figure 37 : Complémentation des cellules cibles en catalase et test du niveau d'apoptose suite à la complémentation en catalase 60
Figure 38 : Modèle de la dégradation autophagique sélective induite par Env des peroxysomes et facteurs antioxydants conduisant à un stress oxydatif et à la mort des cellules T CD4 non infectées..... 63
Figure 39 : Description du modèle cellulaire de coculture des cellules T CD4 cibles. 71
Figure 40 : Description du modèle cellulaire de coculture de cellules adhérentes cibles..... 72
Figure 41 : Principe du kit HTRF de quantification de l'apoptose par détection du clivage de PARP-1 77

Introduction

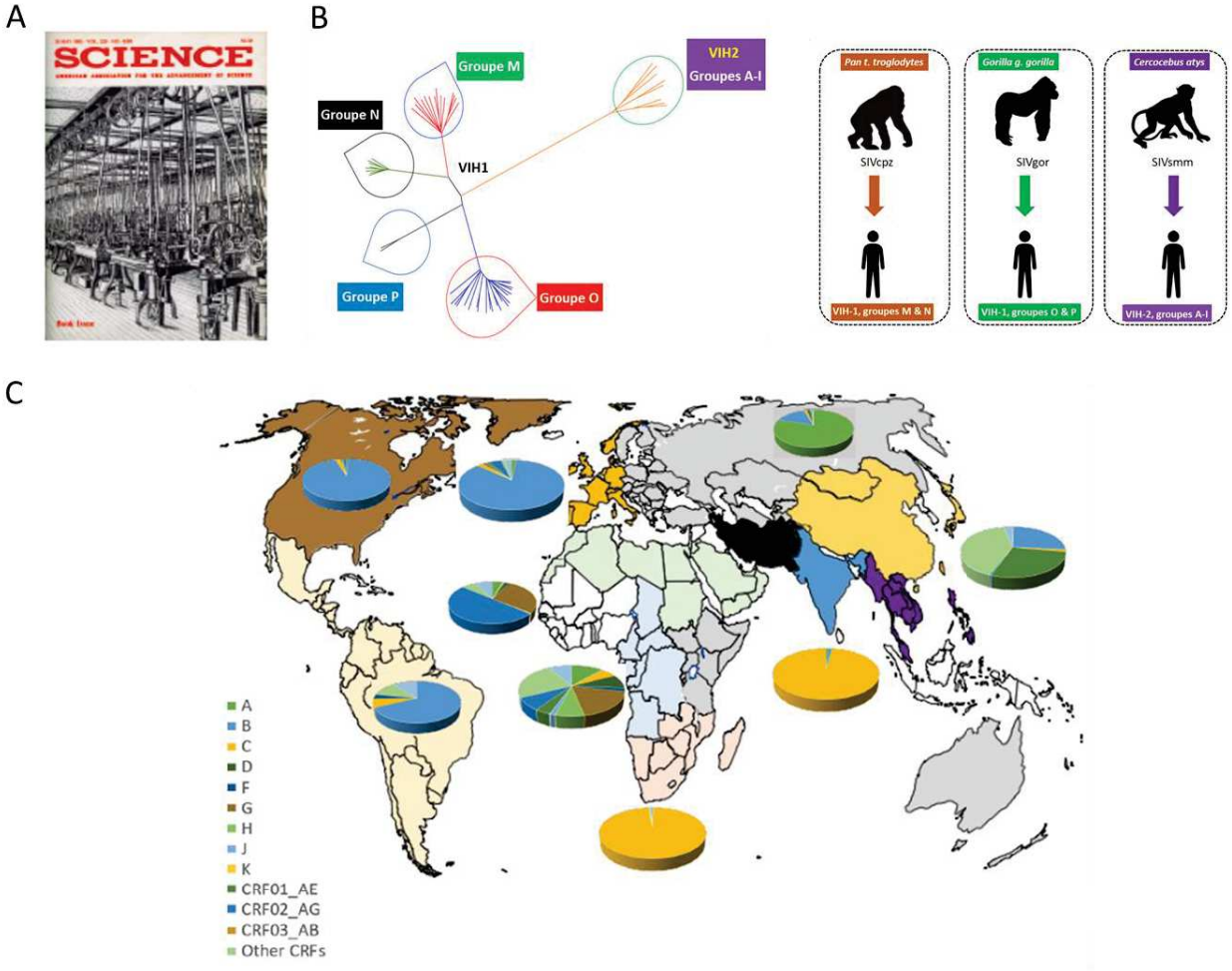


Figure 1 : Découverte, phylogénie et prévalence des sous-types du VIH-1

A. Couverture du numéro *Science* dans lequel est paru en 1983 l'article de l'identification d'un nouveau rétrovirus, le virus de l'immunodéficience humaine par F.Barré-Sinoussi et L.Montagnier. **B.** Phylogénie de la diversité génétique du VIH de type 1 et 2 et leurs groupes respectifs. Origine de l'émergence des groupes du VIH de type 1 et 2 par transmission d'animaux à l'homme. **C.** Prévalence de plusieurs soustypes du groupe M du VIH de type 1 à travers le globe.
Source : MOOC Pasteur HIV Science « Types, groups and subtypes and recombinants of HIV in the world » par Dr Ahidjo Ayouba

1 Introduction

1.1 Le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1)

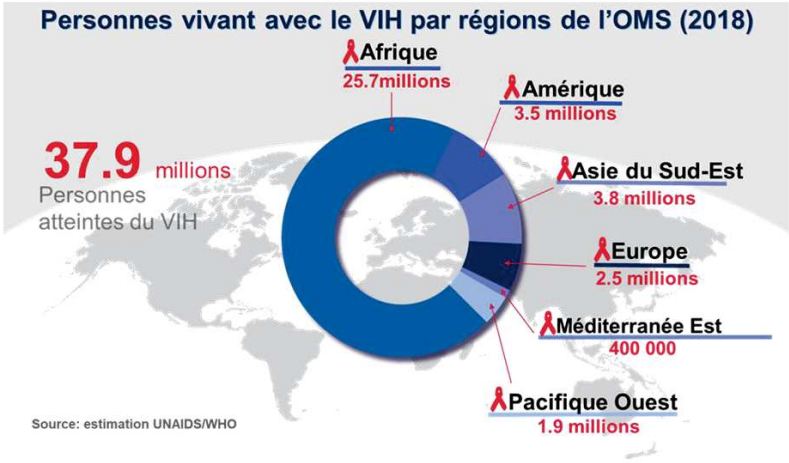
1.1.A Généralités

1.1.A.1 Historique

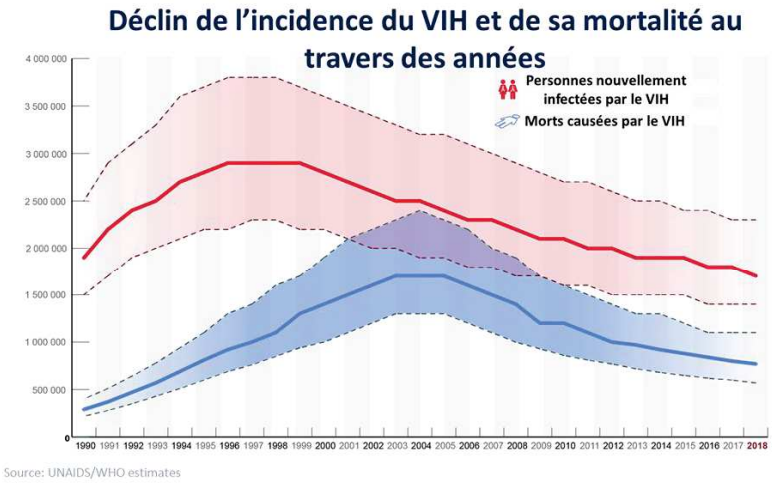
Au début des années 1980, la population mondiale se trouve confrontée à une nouvelle épidémie qui se caractérise par des lymphadénopathies observées chez certains patients (Levy *et al.* 1984). Les communautés scientifiques et médicales identifient rapidement les modes de transmission de cette maladie qui se propage par voie sexuelle, intraveineuse, par transfusion sanguine ou d'une mère à son enfant. En 1983, l'agent infectieux est identifié dans un laboratoire de l'Institut Pasteur de Paris à la suite d'une biopsie de nœuds lymphatiques d'un patient affecté par une déficience immunitaire (voir Figure 1A). Un nouveau rétrovirus humain, le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est identifié par Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier qui reçoivent, en 2008, le prix Nobel de physiologie et médecine pour leurs travaux (Barre-Sinoussi *et al.* 1983).

À ce jour, deux types de rétrovirus de l'immunodéficience humaine, le VIH-1 et le VIH-2, sont reconnus comme agents étiologiques du Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) (M. Peeters *et al*. 1989; Hirsch *et al.* 1989). Le VIH-2, que l'on retrouve principalement en Afrique de l'Ouest, est moins infectieux que le VIH-1, lequel est responsable de la pandémie mondiale. L'émergence de ces virus est due à l'adaptation inter-espèces d'un virus de primates (Simian Immunodeficiency Virus, SIV) à l'hôte humain (Sharp et Hahn 2011). Des études détaillées ont permis de déterminer que cet événement d'adaptation avait eu lieu à plusieurs reprises lors de chasses, par des morsures d'un singe infecté, par des écorchures lors du dépeçage de ces animaux, ou lors de la consommation de viande de brousse. Les groupes M (Main) et N (Non-M/Non-O) du VIH-1 trouvent leur origine dans une transmission par un chimpanzé (*Pan troglodytes troglodytes*) à l'humain, tandis que les groupes O (Outlier) et P ont été transmis par des gorilles (*Gorillas gorillas*) (voir Figure 1B) (Gao *et al.* 1999; Van Heuverswyn *et al*. 2006). Le VIH-2, constitué de 8 groupes, provient de transmissions à partir du singe sooty mangabey (*Cercocebus atys*) (Peeters *et al.*, 2014). Le groupe M du VIH-1, présentant la plus grande diversité génétique, est originaire de l'Est de la République Démocratique du Congo, et il est responsable de la pandémie (Van Heuverswyn *et al*. 2006). Cette large diversité génétique du groupe M du VIH-1 résulte de l'introduction de mutations par l'enzyme

A



B



C

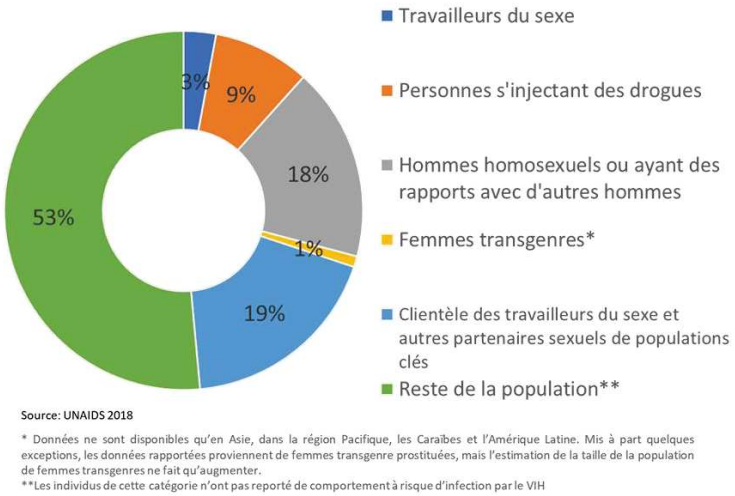


Figure 2 : Statut épidémiologique du VIH-1

A. Nombre de personnes vivant avec le VIH dans les différentes régions de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) **B.** Nombre de personnes nouvellement infectées par le VIH et nombre de décès causés par le VIH selon les années. **C.** Prévalence des populations clés du nombre de nouveaux cas d'infection relevés par l'OMS en 2018.

Source : UNAIDS WHO 2018 analysis

transcriptase inverse du virus, la recombinaison possible entre virus lors d'une super-infection et les migrations de populations humaines, donnant lieu à une classification des virus en plusieurs sous-types (A-D, F-H, J, K) (Vuilleumier et Bonhoeffer 2015; Perrin, Kaiser, et Yerly 2003). Les différents sous-types sont répartis de façon inéquitable à travers le monde (voir Figure 1C). Alors que le sous-type C représente près de la moitié des cas d'infection, c'est le sous-type B qui prédomine en Amérique du Nord et Europe de l'Ouest (Hemelaar *et al*. 2011).

1.1.A.2 Épidémiologie

Le VIH est l'agent étiologique du Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise. Depuis le début de la pandémie, il a causé plus de 35 millions de victimes en faisant dès lors une principale cause de mortalité dans le monde. En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé estimait à 37 millions le nombre de personnes infectées par le VIH-1 (voir Figure 2A). L'Afrique Sub-saharienne est la région la plus sévèrement touchée, représentant à elle seule près des deux tiers du nombre de cas d'infection avec des conséquences économiques et sociales majeures (« WHO | HIV/AIDS » s. d.). Pendant plusieurs années, la seule façon de se prémunir de cette maladie sexuellement transmissible a été l'utilisation de préservatifs associée à des changements comportementaux et l'éducation des populations. Au fil des années, de nombreux progrès ont été réalisés dans la lutte contre le VIH. La prévention par les dépistages et les thérapies antirétrovirales combinées (cART) ont permis de réduire notablement la morbidité et la mortalité associées à cette maladie (voir Figure 2B). Actuellement les patients diagnostiqués et rapidement mis sous traitement ont une charge virale indétectable et peuvent vivre aussi longtemps que des personnes non infectées. Cependant, malgré les progrès réalisés dans la prise en charge des patients séropositifs, l'épidémie de SIDA continue de faire des victimes. La croissance constante du nombre de personnes infectées par le VIH-1 est principalement due à deux facteurs. D'une part les individus infectés bénéficient d'une espérance de vie accrue grâce aux traitements tels que précédemment mentionné et, d'autre part, le nombre de nouveaux cas d'infection est toujours en progression dû au manque de couverture des méthodes de prévention et au retard de diagnostic. En France, l'un des enjeux principaux est de réduire le temps écoulé entre une nouvelle infection et son diagnostic qui est actuellement estimé à environ 3 ans. Enfin, les populations infectées à faibles revenus se soumettent difficilement aux tests et traitements encore trop couteux. De plus l'observance des traitements n'étant pas toujours respectée, des rebonds d'infection peuvent surgir.

N'importe quel individu peut être contaminé par le VIH-1, mais les observations démographiques de cas d'infection ont permis d'identifier des populations plus sensibles. Le programme international de lutte contre le VIH (UNAIDS) estime que près de la moitié des nouveaux cas d'infection ont lieu au sein de ces populations à risque qui se déclinent entre les hommes homosexuels, les consommateurs de drogues à injection, les travailleurs du sexe et leur clientèle et les transgenres (voir Figure 2C). Ainsi en Amérique du Nord et Europe de l'Ouest, bien que le nombre annuel de nouveaux cas d'infections soit décroissant, la prévalence du virus dans ces populations clés reste très élevée (UNAIDS data 2018).

Bien que les traitements permettent de contrôler la charge virale chez les patients infectés, ils ne permettent pas l'éradication du virus. Les patients sont donc contraints à se soumettre tout au long de leur vie à cette thérapie sous peine de voir resurgir le virus. De nombreuses comorbidités peuvent apparaitre chez ces patients, comme une inflammation chronique qui mène régulièrement à des complications. De plus, ces patients sous traitement ne sont pas à l'abris d'être en situation d'échec virologique. Cette situation se caractérise par une augmentation de la charge virale d'un patient malgré son traitement et est due à l'émergence de virus comportant plusieurs mutations les rendant résistants aux ART (Clutter *et al.* 2016; Stella-Ascariz *et al.* 2017). Dès que le virus possède plusieurs mutations de résistance, le traitement se complique par l'accès aux drogues et les résistances croisées qui engendrent des multirésistances à différentes drogues.

1.1.A.3 Structure de la particule virale et organisation du génome viral

Le VIH est un rétrovirus complexe du genre des *Lentivirus*. La famille des *Retroviridae,* dont il fait partie, comprend des virus enveloppés dont le génome diploïde consiste en deux molécules d'ARN simple brin à polarité positive appariées de façon non-covalente par leur extrémité 5'. Ces virus sont caractérisés par leur processus réplicatif unique qui implique l'action d'une enzyme qui assure la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN proviral. C'est cet ADN proviral qui sera ensuite intégré dans le génome de l'hôte et que l'on nomme alors provirus (Lodish *et al.* 2000). Le VIH-1 est un virus enveloppé sphérique d'environ 120 nm de diamètre. Les deux brins d'ARN y sont retrouvés associés à la nucléocapside (NC), intégrés dans une capside protéique (CA) (voir Figure 3A). Cette dernière est localisée au sein d'une matrice (MA), elle-même entourée d'une bicouche lipidique dérivée de la membrane

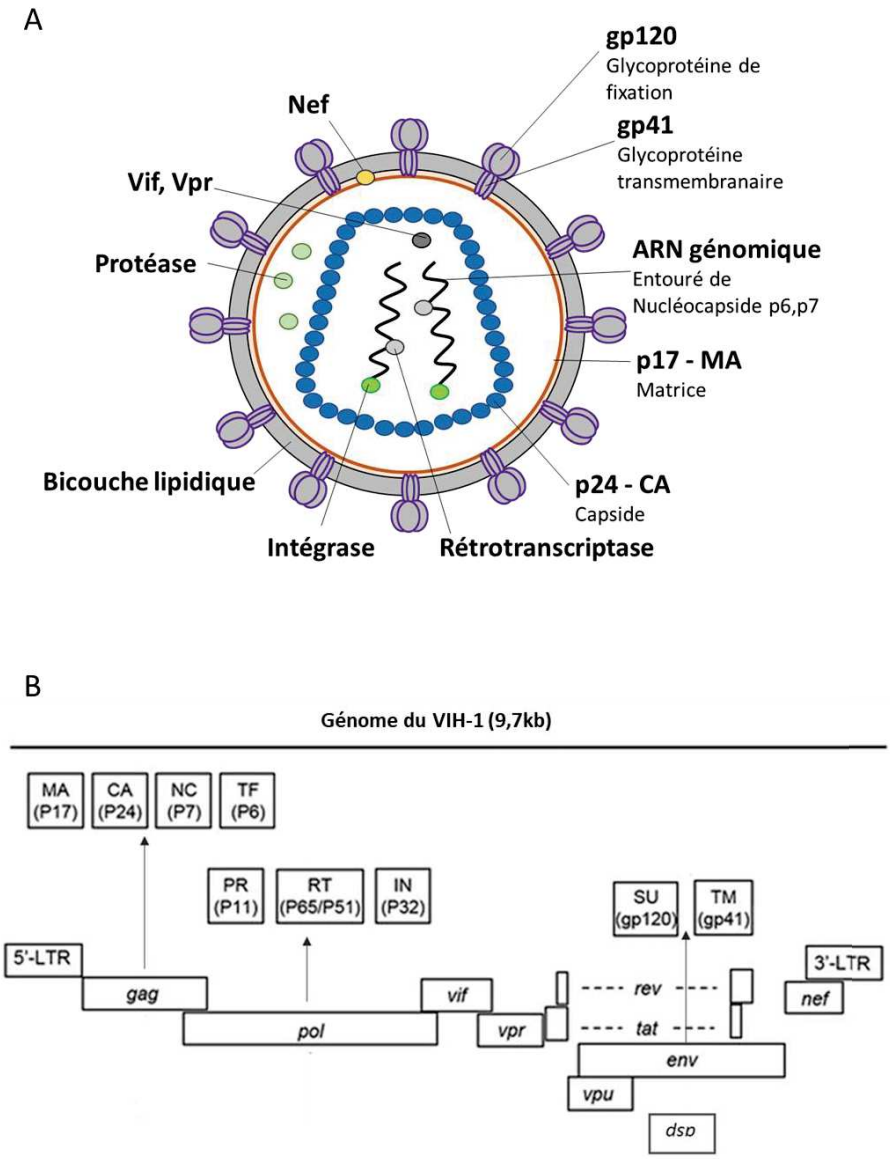


Figure 3 **:** Représentation de la structure de la particule virale et du génome du VIH-1.

A. Le diamètre de la particule virale mesure entre 80 et 120 nm. La protéine p24Gag (CA) est l'élément constituant la capside conique qui contient deux copies d'ARN simple brin de polarité positive appariées correspondant au génome du VIH-1. Le génome viral est associé aux protéines de nucléocapsides p7Gag (NC). La capside contient en outre trois enzymes virales : la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN) et la protéase (PR). Une matrice entoure la capside et est constituée de la protéine p17 (MA). Cette matrice assure l'incorporation de l'enveloppe virale par son interaction avec la queue cytoplasmique de la glycoprotéine gp41Env. La bicouche lipidique dérivée de la membrane cellulaire hôte est parsemée de complexes trimériques où les glycoprotéines gp120Env (SU) et gp41Env (TM) interagissent de façon non-covalente. **B**. Représentation schématique du génome ADN du VIH-1. Les LTR (Long Terminal Repeat) encadrent les ORFs du génome viral. Trois cadres de lecture du génome du VIH-1 (les ORFs) sont représentés par des rectangles et les protéines qu'ils transcrivent.

plasmique de l'hôte, au sein de laquelle sont insérés des complexes trimériques de glycoprotéines de l'enveloppe (Env).

Le génome du virus de l'immunodéficience humaine (9.7 kb) comprend les gènes structuraux classiques des rétrovirus (*gag, pol, env*) communs à tous les rétrovirus auxquels s'ajoutent les gènes codant pour des protéines régulatrices et auxiliaires du virus (voir Figure 3B). Après leur rétrotranscription, les provirus sont flanqués de part et d'autre de séquences identiques appelées LTRs (Long Terminal Repeats) qui jouent un rôle essentiel dans l'intégration et la régulation transcriptionnelle du génome viral.

1.1.A.3.a Gènes de structure

Le gène ***gag*** *(group-specific antigen)* code pour un précurseur polyprotéique $Pr55^{gag}$ dont le transcrit est traduit puis clivé en protéines virales de structure. La maturation de ce précurseur, permettant la production de différentes protéines de structure, est exécutée par la protéase virale. Les différentes protéines résultant de cette maturation sont :

- La protéine de matrice (MA) p17 : issue de la partie N-terminale du précurseur $Pr55^{gag}$, cette protéine compose la matrice qui entoure la capside et assure l'incorporation des protéines d'enveloppe au sein des particules virales.
- Les protéines p7 et p6 : composent la nucléocapside (NC). Grâce à sa composition riche en proline, ce polypeptide assure le repliement de l'ARN génomique au sein de la capside en présence de Zn^{2+}.
- La protéine p24 : protéine hydrophobe qui compose majoritairement la capside (CA) des particules virales. Cette protéine a un pouvoir immunogène très puissant étant donné la présence d'un grand nombre d'anticorps dirigés contre cette p24 retrouvés dans le sérum de patients infectés.

Le gène ***pol*** *(polymerase)* code pour les protéines virales enzymatiques indispensables à la réplication du virus. Parmi celles-ci, la transcriptase inverse, aussi appelée Reverse Transcriptase (RT) est une ADN polymérase ADN et ARN-dépendante. Le polypeptide Pol code également pour l'intégrase (IN) qui catalyse l'intégration de l'ADN viral au sein du génome de l'hôte, ainsi que pour la protéase (PR) nécessaire à la maturation des protéines du virus.

L'ARNm issu du gène ***env*** *(enveloppe)* est traduit en un précurseur de 160 kDa. Sa maturation permet l'obtention des protéines d'enveloppe transmembranaires gp41 (TM) et

extracellulaires de surface gp120 (SU). Ces glycoprotéines s'assemblent pour former un complexe trimérique stable (Env). Ces protéines TM et SU sont glycosylées au niveau de l'appareil de Golgi de l'hôte et permettent d'assurer la reconnaissance du récepteur CD4 et des corécepteurs CXCR4 ou CCR5 responsables de l'entrée virale.

1.1.A.3.b Gènes de régulation et gènes auxiliaires

En plus des trois gènes principaux, le génome du VIH-1 code pour des protéines régulatrices (Tat et Rev) et des protéines auxiliaires (Vif, Vpr, Vpu, Nef et ASP).

- La protéine **Tat** *(Transactivator of transcription)* est un régulateur essentiel de l'élongation de la transcription du génome viral car il augmente la processivité de la polymérase encourageant donc la production d'ARNm viraux. Lorsqu'elle est exprimée, cette protéine s'associe avec la boucle d'ARN viral TAR (Trans-Activating Response element) afin d'activer la phosphorylation complexe ARN polymérase II associé à certains sites du promoteur au niveau du LTR-5' du provirus afin de permettre au complexe d'assurer l'élongation de la transcription (Romani, Engelbrecht, et Glashoff 2010).

  Cette protéine est également efficacement sécrétée pour agir de manière paracrine au sein de cellules non infectées et y agir comme toxine virale (Gallo 1999; Rayne *et al*. 2010). En effet, cette protéine peut aisément pénétrer au sein de différents types cellulaires et réguler l'expression de certains gènes cellulaires permettant, entre autre, de diminuer la réponse immune de l'hôte (Gandhi *et al*. 2009).
- La protéine **Rev** *(Regulator of Expression of Viral proteins)* a pour rôle d'assurer le transport de l'ARN viral non épissé et mono-épissé du noyau de la cellule hôte vers le cytoplasme. Ce transport est assuré par la reconnaissance par Rev d'une région RRE (Rev Responsive Element) des ARNs viraux d'une part, et des éléments du système d'export nucléaire de l'autre (Hidalgo et Swanson 2017). Elle permet donc l'accumulation au niveau du cytoplasme des brins d'ARN de ~4kb qui permettent la traduction en protéines virales structurales Gag, Pol et Env et d'ARN génomique viral de ~9kb qui seront intégrés dans les nouvelles particules virales (Pollard et Malim 1998).
- La protéine **Vif** (Viral Infectivity Factor) est une protéine virale hautement exprimée dans le cytoplasme de cellules infectées. Vif est la protéine virale requise pour contrer

les facteurs de restriction cellulaires de la famille APOBEC3 (Y. Feng *et al.* 2014 ; Salter *et al*., 2014). Le facteur de restriction APOBEC3G possède une activité ADN déaminase des cytidines qu'il exerce sur l'ADN nouvellement synthétisé lors de la rétrotranscription du génome viral. L'action d'APOBEC3G entraîne l'insertion de codons stop prématurés ou une modification du ratio de nucléotides qui alerte la machinerie de dégradation de l'hôte afin d'éliminer l'ADN viral synthétisé La protéine Vif participe à la stratégie d'évasion du virus pour contrer cette défense innée de l'hôte car elle est capable de lier directement au facteur APOBEC3G et de recruter des enzymes E3 ligases pour favoriser sa dégradation par le protéasome (Marin *et al*. 2003; Sheehy, Gaddis, et Malim 2003; Conticello, Harris, et Neuberger 2003). Enfin, Vif contrôle également l'expression d'APOBEC3G par sa capacité à inhiber la traduction de l'ARNm d'APOBEC3G. Ces deux mécanismes induits par Vif de dégradation protéasomale et d'inhibition de traduction, contribuent donc à diminuer le niveau cellulaire d'APOBEC3G et à empêcher son incorporation dans les nouveaux virions (Guerrero *et al*. 2016).

- La protéine **Vpr** est une petite protéine virale régulatrice de 14 kDa présente au sein des particules virales principalement requise lors des premières étapes du cycle viral au sein des cellules nouvellement infectées. Vpr participe à l'import nucléaire du complexe de pré-intégration viral (PIC) (Heinzinger *et al*. 1994; Connor *et al*. 1995). De plus, Vpr influence la rétrotranscription du génome du VIH-1 par son interaction avec une enzyme cellulaire de la machinerie de réparation. Vpr participe à l'arrêt du cycle cellulaire, la régulation de l'apoptose et la transactivation du LTR du provirus ainsi que des gènes de l'hôte (Guenzel *et al*.,2014).

  Le gène *vpr* a un paralogue *vpx* que l'on ne retrouve que dans les lignées HIV-2 et SIVmac (SIV macaque), SIVsm (SIV sooty mangabée). Ces deux protéines partagent une structure similaire et sont toutes deux capables de lier la facteur cellulaire DCAF1 (DDB1-Cullin4-associated factor 1) qui est un adaptateur à l'ubiquitine ligase Cul4A et peuvent ainsi détourner la machinerie d'ubiquitination afin de dégrader par le protéasome des facteurs cellulaires (UNG2) ou de restriction (SAMHD1) (Schröfelbauer *et al.* 2005; Srivastava *et al.* 2008). C'est le cas pour la protéine Vpx qui en se liant à ce complexe ubiquitine ligase assure la dégradation de SAMHD1 (Sterile Alpha Motif domain and HD domain-containing protein 1). Sans cette dégradation, le facteur de

restriction SAMHD1 bloque la transcription inverse du virus en diminuant la disponibilité intracellulaire des dNTP (deoxynucleoside triphosphates) (Lahouassa *et al*. 2012). La protéine Vpx est également capable, par le même procédé d'induction de dégradation protéasomale, d'inactiver le complexe cellulaire HUSH (Human Silencing Hub) (Chougui et Margottin-Goguet 2019). L'activité du complexe cellulaire HUSH est de maintenir un état transcriptionnel réprimé par des modification épigénétiques de la chromatine (H3K9me3).

- La protéine **Vpu** est une petite protéine transmembranaire de 9 kDa qui peut modifier la distribution de protéines membranaires de la cellule hôte. L'une des principales fonctions de Vpu est d'induire la dégradation du récepteur CD4 nouvellement synthétisé au niveau du RE (Reticulum Endoplasmique) (Willey *et al*. 1992; Strebel *et al*. 1989). Cette action de Vpu sur le récepteur CD4 vise à diminuer les complexes CD4-Env qui pourraient être présentés à la surface de la cellule et être reconnus par des anticorps qui assurent la réponse ADCC (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) (Veillette *et al*. 2014; Pham *et al*. 2014). Une autre fonction de Vpu est d'améliorer la libération des nouveaux virions des cellules infectées. En effet, le facteur de restriction antiviral de l'hôte BST2 (Bone Marrow Stomal Cell Antigen 2, également appelé Tetherin ou CD317) est une protéine transmembranaire capable d'ancrer les particules virales nouvellement formées au niveau de la membrane plasmique de l'hôte empêchant ainsi leur libération. Vpu lève cette restriction en excluant BST2 des virions en cours d'assemblage au niveau de la membrane plasmique (Van Damme *et al.* 2008). (González 2015; Lin Li *et al.* 2005)
- La protéine **Nef** (Negative regulator Factor) est une protéine de 27 kDa qui a pour fonction de moduler l'expression de certaines protéines de surface des cellules immunitaires infectées. Nef cause une diminution de l'expression des protéines cellulaires de surface CD4, CD8, CD28 et du MHC-I et MHC-II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) (Lin Li *et al*. 2005). L'action sur le CD4 effectuée par Nef concerne les récepteurs présents à la surface cellulaire qui vont être endocytés et destinés à une dégradation lysosomale. Ainsi Nef permet d'éviter une super-infection et empêche les particules virales nouvellement formées d'interagir avec le récepteur CD4 d'une cellule déjà infectée (Pereira et DaSilva 2016). Une autre fonction essentielle de Nef est sa capacité à contrer les facteurs de restriction SERINC3/5. L'activité antivirale de

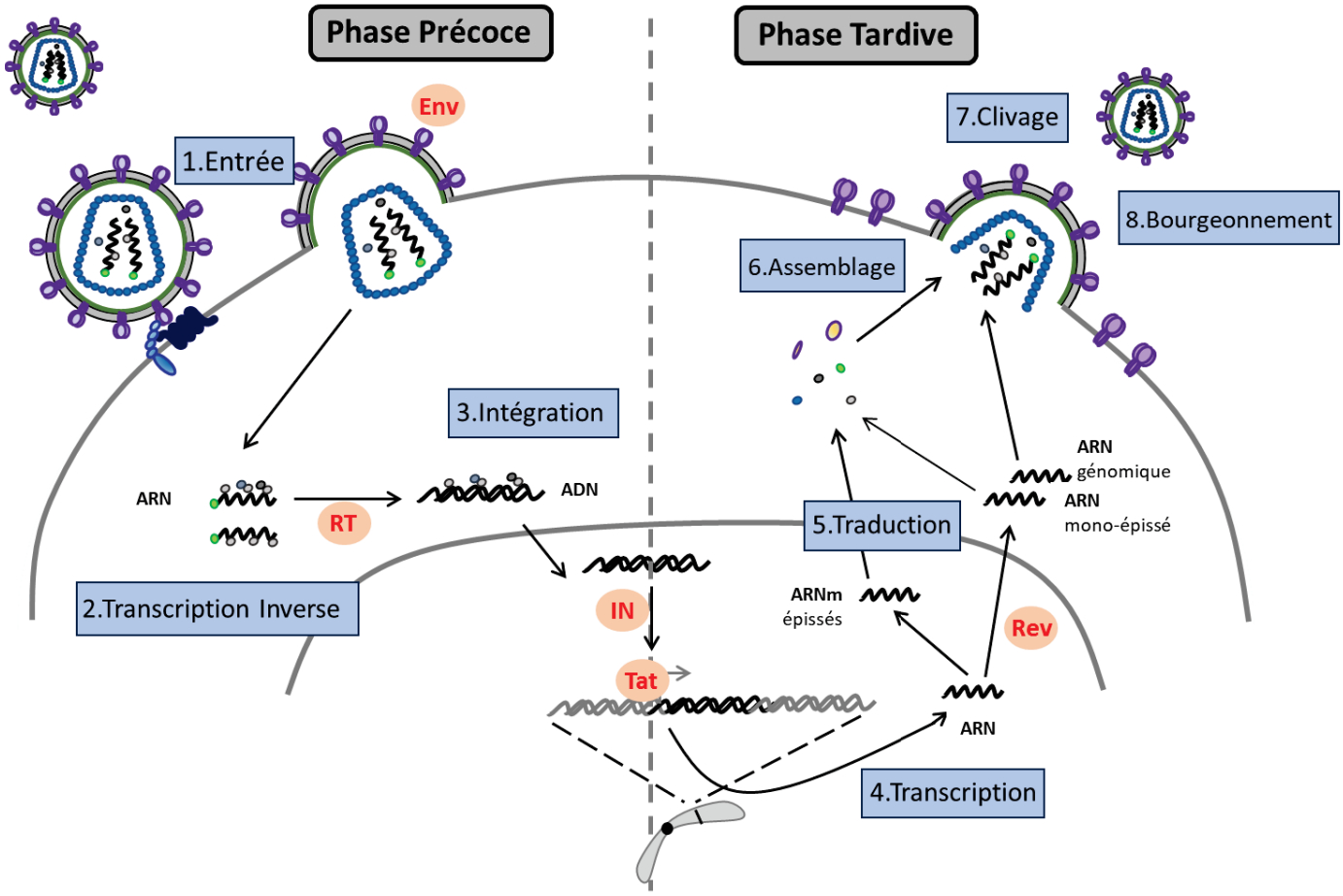


Figure 4 : Cycle réplicatif du VIH-1.

Etape 1 : Attachement, fusion et entrée du virus dans la cellule hôte. En rouge, les protéines virales Env forment un trimère de glycoprotéines d'enveloppe virale et sont responsables de cette étape. **Etape 2** : Décapsidation et transcription inverse du génome viral ARN en ADN. En rouge l'enzyme virale RT (Reverse Transcriptase) est responsable de cette étape. **Etape 3** : Import nucléaire et intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. En rouge, l'intégrase (IN) enzyme virale responsable de cette étape. **Etapes 4 et 5** : Transcription et traduction des protéines virales à l'aide de la machinerie cellulaire. En rouge, Tat est le transactivateur viral de la transcription des gènes viraux. Rev est responsable de l'export nucléaire des transcrits viraux non épissés qui serviront de génome aux nouvelles particules virales, et des transcrits mono-épissés qui codent pour les protéines de structure Gag, Pol et Env. **Etape 6 et 7** : Clivage des précurseurs et assemblage du nouveau virion. **Etape 8** : Bourgeonnement à la membrane et maturation puis libération de la nouvelle particule virale

SERINC3/5 est basée sur leur incorporation dans les particules virales. Or, Nef empêche ces facteurs de se retrouver au niveau des sites d'assemblage du VIH-1 à la membrane plasmique afin de prévenir leur incorporation dans les virus naissants (Usami, Wu, et Göttlinger 2015; Rosa *et al*. 2015).

- La protéine **ASP** (AntiSense Protein) : Il a également été démontré que le génome du VIH-1 pouvait être transcrit à partir du LTR-3' en antisens donnant lieu à l'expression d'une protéine ASP dans différent types cellulaires. L'expression de cette protéine a été décrite pour l'induction d'autophagie mais sa fonction reste encore à déterminer (Torresilla *et al*. 2013).

1.1.A.4 Réplication virale

Le cycle réplicatif du VIH-1 se décline en deux grandes phases (voir Figure 4) :

- La phase précoce, composée de l'entrée, la rétrotranscription du génome ARN en ADN et l'intégration du génome viral dans le génome de l'hôte. Une fois intégré, le provirus peut rester dormant dans certains types cellulaires et nécessite une activation pour exprimer ses gènes et produire des particules virales.
- La phase tardive, composée de la transcription du génome viral, la production de l'ARN génomique et des protéines virales et l'assemblage des particules virales néosynthétisées.

La durée moyenne d'un cycle réplicatif complet du VIH-1 dans les cellules hôte est estimée à 48 h (Holmes, Zhang, et Bieniasz 2015). La cinétique des étapes de la phase précoce du cycle réplicatif est raisonnablement bien appréciée et dure entre 1 et 3 h pour l'entrée, 6 à 48 h pour la transcription inverse et l'intégration enchaine ensuite durant 5 h. Les étapes de la phase tardive dépendent de la production des ARNm viraux (~11-14 h), la capacité des protéines virale à contrer les facteurs de restriction de la cellule hôte et l'assemblage des protéines en particules virales (~6 h).

1.1.A.4.a Entrée virale

L'infection par le VIH-1 commence par l'attachement du virus à sa cellule cible au moyen du complexe de protéines de l'enveloppe (Env). Env se lie au récepteur CD4 de la cellule cible grâce à la sous-unité virale gp120 (voir Figure 5). La liaison du CD4 à la gp120 cause un réarrangement structural qui lui permet alors d'interagir avec le corécepteur (CCR5 ou CXCR4

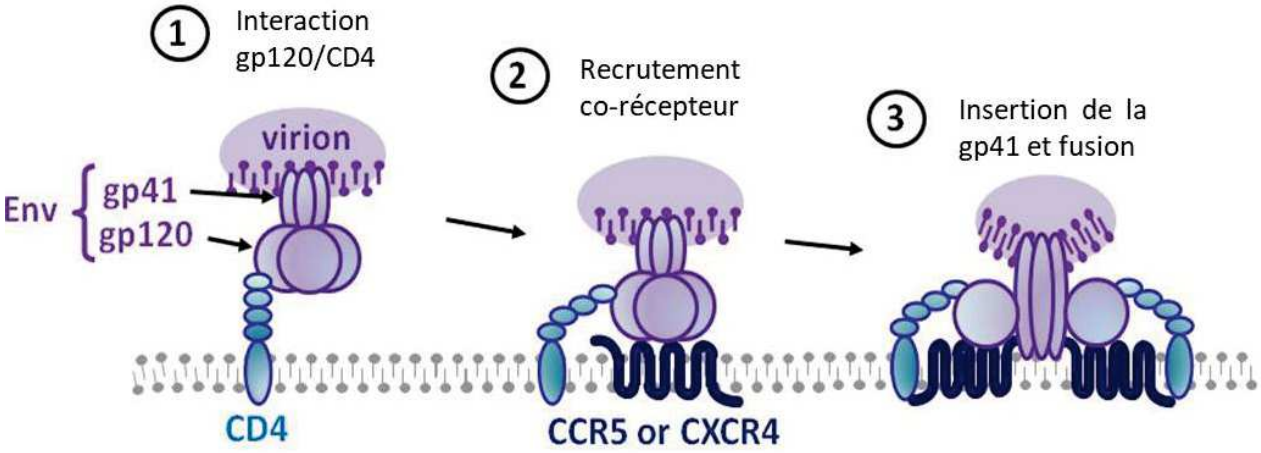


Figure 5 : Entrée du VIH-1

La gp120 interagit avec le récepteur CD4. Cette interaction déclenche un changement conformationnel de la gp120 qui peut ensuite reconnaitre et lier le corécepteur CCR5 ou CXCR4. Cette interaction induit ensuite un réarrangement structural de la gp41 et l'insertion de son peptide N-terminal de fusion dans la membrane de la cellule cible. Ceci a pour conséquence la fusion des membranes virales et cellulaires.

majoritairement). La liaison de gp120 au corécepteur induit un nouveau changement de conformation conduisant à l'exposition du domaine hydrophobe du peptide de fusion de la sous-unité virale gp41. Cette dernière s'insère dans la membrane cellulaire cible et entraîne le rapprochement et la fusion des membranes virales et cellulaires, permettant à la capside virale d'être libérée dans le cytoplasme de la cellule cible (Blumenthal, Durell, et Viard 2012; Wilen, Tilton, et Doms 2012).

On distingue les virus à tropisme R5, qui infectent les cellules cibles via le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5 et sont caractéristiques de la primo-infection. Les virus à tropisme X4, nécessitant le récepteur CD4 et le corécepteur CXCR4, émergent au cours de l'évolution de la maladie et sont associés à une forte diminution des cellules T CD4 impliquant ainsi une progression rapide vers la phase SIDA (Penn *et al*. 1999).

Les cellules cibles du virus sont définies par l'expression du récepteur CD4 et un des corécepteurs CXCR4 ou CCR5, majoritairement. Plusieurs types cellulaires sont dès lors concernés par cette infection. *In vivo*, les cibles majeures de l'infection sont les LT CD4 (Lymphocyte T CD4). Cependant, tous les sous-types de LT CD4 ne sont pas égaux face à ce risque d'infection. Les LT CD4 activés ou les LT helpers de type 17 (Th17) sont hautement sensibles à cette infection (Burgener, McGowan, et Klatt 2015). Il a récemment été proposé que l'activité métabolique basale de la cellule cible était déterminante pour sa permissivité à l'infection (Valle-Casuso *et al*. 2019).

Les cellules de la lignée myéloïde, tels que les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques (DCs) et certaines cellules du système nerveux, comme les cellules de la microglie ou les neurones, sont également des cibles de l'infection par le VIH-1. Certaines de ces cellules possèdent une longue durée de vie et sont donc considérées comme des réservoirs pour le VIH-1 (Mzingwane et Tiemessen 2017). Les DCs sont les premières cellules rencontrées par le virus. Elles ont la capacité de le fixer à l'aide de molécules de surface telles que DC-SIGN et de le transmettre aux LT CD4 lorsqu'elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (Ahmed *et al*. 2015; Vidya Vijayan *et al*. 2017).

1.1.A.4.b Transcription Inverse

Suite à la fusion des membranes virales et cellulaires, la capside virale entre dans le cytoplasme de la cellule. Au sein de la matrice formée par le polymère de capsides virales,

l'enzyme Reverse Transcriptase (RT) dirige la synthèse d'ADN double brin à partir d'un modèle d'ARN génomique viral simple brin ou de modèle ADN en tirant profit des nucléotides cellulaires. Cette enzyme ADN polymérase ARN/ADN dépendante assure la dégradation du brin d'ARN génomique viral de façon simultanée grâce à une activité RNAseH (Hu et Hughes 2012). De plus, la RT ne possédant pas d'activité de correction des erreurs (*proof-reading*), elle génère de nombreuses mutations qui sont insérées dans le génome viral lors de cette étape. Ceci explique en partie la diversité génétique observée chez les virus. Il a également été montré que cela pouvait permettre au virus d'échapper à la réponse immune mise en place par l'hôte et de développer des résistances contre les drogues utilisées dans les thérapies (Abram *et al*. 2014).

1.1.A.4.c Import Nucléaire et Intégration

Après l'étape de rétrotranscription, l'ADN double brin viral est associé à d'autres protéines virales (IN, MA, Vpr) et cellulaires formant le complexe pré-intégration (PIC). Le PIC est transporté vers le noyau cellulaire via le réseau de microtubules. Pour atteindre son objectif, il passe au travers des pores nucléaires (NPC) (Hu et Hughes 2012; Rankovic *et al*. 2017; Arhel 2010). En effet, ces NPC forment un canal aqueux permettant la diffusion passive de protéines inférieures à 50 kDa et le transport actif des protéines de plus grande taille. La composition du PIC du VIH-1 lui permet de traverser l'un de ces pores nucléaires pour atteindre le noyau cellulaire (Piller et Jans 2003). L'ADN viral, une fois dans le noyau, sera intégré au génome de l'hôte par l'action de l'enzyme virale Intégrase (IN). Les sites préférentiels d'intégration du provirus sont des régions transcriptionnellement actives (Craigie et Bushman 2012).

1.1.A.4.d Transcription

Les phases tardives du cycle réplicatif débutent après l'intégration du provirus. La transcription des gènes rétroviraux est réalisée par l'ARN polymérase II cellulaire, assurant la production des ARN messagers viraux et du génome viral. L'initiation de la transcription du génome du VIH-1 est contrôlée par le 5'-LTR composé d'une région promotrice, d'éléments d'activation de la transcription et d'éléments de régulation négative ou modulateurs. Lorsque la transcription débute, elle marque un arrêt au niveau du 59ème nucléotide ARN pour former la région TAR qui est reconnu par le transactivateur viral Tat afin d'activer l'élongation de la transcription du génome viral. La protéine virale Tat agit avec les complexes cellulaires P-TEFb,

Cycline 1 et CDK9 pour favoriser l'élongation de la transcription en phosphorylant le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II. Les ARN viraux résultants de cette transcription sont épissés de façon double ou simple produisant les protéines virales Tat, Rev et Nef ou Vpr, Vpu, Vif et Env respectivement. Les ARNm viraux qui ne sont pas épissés vont soit être traduits en protéines virales Gag et Pol ou être empaquetés dans les virions en tant que génome infectieux (Mahiet et Swanson 2016).

Dans certains cas, alors que le provirus est intégré au génome de la cellule hôte, la transcription du 5'-LTR peut être inactivée. Cet état de transcription inactive du génome viral intégré constitue alors un état de latence du virus. Plusieurs facteurs peuvent influencer cette entrée en latence virale tels que l'état chromatinien du site d'intégration, la localisation sub-nucléaire du provirus, l'absence de facteurs de transcription cellulaires inductibles (NF-κB, NFAT), la présence de facteurs répresseurs de transcription (CTIP-2, DSIF, NELF, TRIM), l'état chromatinien du promoteur du 5'LTR, la présence de marques épigénétiques répressives au niveau du promoteur 5'LTR, la séquestration du facteur cellulaire d'élongation de transcription P-TEFb ou enfin une concentration sub-optimale du transactivateur viral Tat (Van Lint, Bouchat, et Marcello 2013). Les cellules infectées par un virus en état de latence constituent un réservoir qui est difficilement identifiable et n'est pas sensible aux thérapies actuellement proposées.

1.1.A.4.e Assemblage et Maturation

La protéine virale Rev, située au sein du noyau de la cellule hôte, facilite l'export des transcrits simplement ou non épissés comportant une séquence d'élément de réponse à Rev (RRE). La traduction des transcrits non épissés produit une poly-protéine Gag de 55 kDa qui constitue un précurseur composé de 4 domaines : le coté N-terminal constitue la matrice (MA), suivi de la capside (CA), la nucléocapside (NC) et le domaine p6 en C-terminal. Le domaine MA assure l'acheminement du précurseur Pr55gag du cytoplasme vers la membrane plasmique, qui est le lieu d'assemblage des particules virales. Le domaine central CA permet sa multimérisation par des interactions entre protéines pour la création d'une particule sphérique immature. Le domaine NC basique capture deux copies d'ARN virale génomique lors de cet assemblage. Le virion bourgeonne et obtient alors sa double membrane lipidique. Les protéines Env qui sont transmembranaires et glycosylées sont acheminées à la membrane par la machinerie cellulaire. Comme ce sont des protéines membranaires, elles font l'objet d'une insertion dans

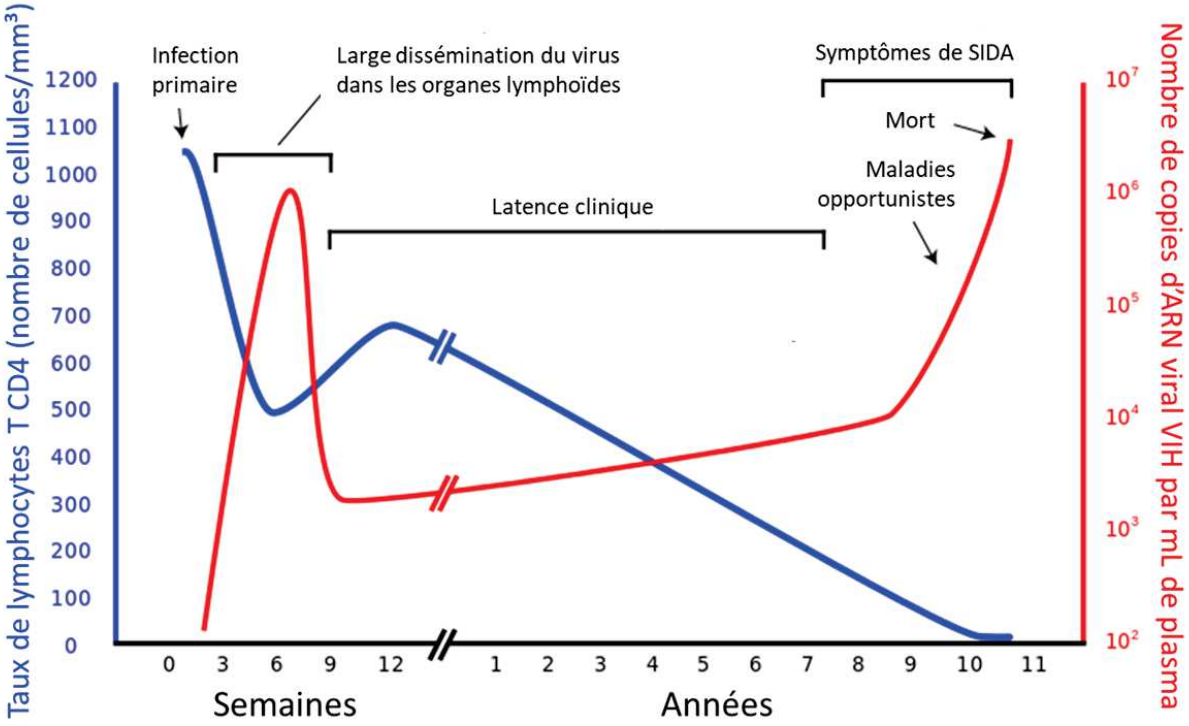


Figure 6 : Evolution de la charge virale et du nombre de lymphocytes T CD4 au cours de l'infection par le VIH-1 chez des patients non traités.

Evolution caractéristique du nombre de lymphocytes T CD4+ (ligne bleu) et de la charge virale (ligne rouge) au cours des trois stades de l'infection par le VIH-1 : primo-infection, latence clinique et phase SIDA.
Source : Naïf et al. 2013

la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et traversent le système cellulaire de sécrétion où elles sont glycosylées et assemblées en un complexe trimérique puis délivrées à la membrane plasmique par transport vésiculaire. La particule virale est libérée de la cellule hôte par l'intervention de la machinerie cellulaire de régulation des vésicules endosomales ESCRT. C'est cette machinerie qui facilite la fission des membranes et libère la nouvelle particule virale (Gomez et Hope 2005; Sundquist et Kräusslich 2012; Bell et Lever 2013). La dernière étape de maturation des virions est réalisée par un clivage auto-catalytique qui libère la protéase virale (PR) sous sa forme active. Cette protéase reconnait alors les sites spécifiques de Gag et procède à leur clivage dans un ordre précis pour permettre la stabilisation et la condensation des structures de la particule virale.

1.1.B Physiopathologie

L'infection par le VIH-1 a pour principale conséquence l'affaiblissement du système immunitaire par la destruction des LT CD4. En l'absence de traitement, l'évolution clinique de l'infection se manifeste par trois stades (voir Figure 6) :

- L'infection débute sans symptômes spécifiques, assimilables à ceux d'une grippe : on parle de **primo-infection** ou phase aigüe. Elle se caractérise par une chute rapide du nombre de LT CD4 et dure de 3 à 6 semaines. Le virus, quant à lui, se multiple de façon exponentielle au sein de l'organisme et colonise les organes lymphoïdes. On peut alors mesurer un pic d'ARN viral plasmatique de 10^6 à 10^7 copies/mL de plasma. Ce sont, dès ces premières semaines, que les réservoirs viraux sont établis et que la réponse immunitaire de l'hôte se met en place. Ainsi, les lymphocytes T CD8 cytotoxiques permettent de faire décroitre la charge virale. On parle de séroconversion et la virémie résulte de l'équilibre entre une réplication virale à bas bruit, mais continue, et une prise en charge par le système immunitaire.
- La deuxième phase est la phase dite de **latence clinique**. On observe une charge virale généralement basse voire indétectable et aucun symptôme n'est observable. Cependant, la diminution des LT CD4 se poursuit. La durée de cette phase est variable selon les individus. Ainsi, on distingue les patients affectés par une progression rapide de la maladie (moins de 3 ans), standard (8 à 15 ans), voire lente (plus de 10 ans).

- La **phase SIDA** débute lorsque le taux de LT CD4 atteint le seuil critique de 200 cellules/mm³ sang. Le système immunitaire de l'hôte ne peut alors plus contrôler l'infection et laisse place à une intensification de la réplication virale. De plus, des agents pathogènes dits « opportunistes » profitent de l'affaiblissement du système immunitaire et les patients succombent alors à ces infections secondaires (Naif 2013).

L'évolution clinique de la maladie a favorablement évolué depuis l'apparition des thérapies antirétrovirales. En effet, munis d'un traitement approprié, les patients ont aujourd'hui une espérance de vie identique à celle d'un patient non infecté et la maladie est maintenant considérée comme une maladie chronique.

1.1.B.1 Transmission

Le VIH-1 peut se transmettre par le contact étroit et non protégé avec certains liquides biologiques d'une personne infectée à savoir le sang, le lait maternel ou le sperme et les sécrétions vaginales. Le risque de transmission à un tiers existe dès le stade précoce de l'infection et persiste toute la vie du porteur du virus. La transmission peut avoir lieu entre la mère et l'enfant au cours d'une grossesse, pendant l'accouchement ou lors de l'allaitement. Le risque de transmission en cas de transfusion sanguine est extrêmement faible en France grâce à la sélection des donneurs et à la recherche des anticorps et du virus dans les dons de sang. Les protocoles en vigueur rendent le risque de transmission par des professionnels de santé extrêmement faible. Un risque important de contact avec du sang contaminé persiste lors du partage de matériel d'injection pour les utilisateurs de drogues.

Le risque de transmission devient cependant très faible si la charge virale est bien contrôlée. Ainsi, de nos jours, les patients traités présentant une observance correcte de leur traitement, ne transmettent plus le virus.

1.1.B.2 Déplétion des lymphocytes T CD4

De nombreux travaux ont montré que la mort cellulaire par apoptose est la voie majeure de disparition des LT CD4 au cours de l'infection par le VIH-1 (Alimonti 2003). Cependant, ce mécanisme n'est pas unique et d'autres types de mort cellulaire ont aussi été décrits dans la mort des cellules T CD4 au cours de l'infection, tels que la nécroptose (Pan *et al*. 2014) et la pyroptose (Doitsh *et al.* 2014). La pyroptose, caractérisée par l'activation de la caspase 1 et la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β et IL-18), serait déclenchée par des

intermédiaires ADN, issus d'une rétrotranscription avortée du génome viral, reconnus par des senseurs de l'immunité innée dans les LT CD4 (Doitsh *et al.* 2014).

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée qui implique une série d'événements tels que des changements morphologiques, des changements de composition membranaire, d'attachement, une condensation de la chromatine et une fragmentation d'ADN qui conduisent à une fragmentation nucléaire. Le processus dépend de voies de signalisation faisant intervenir des enzymes appelées « caspases » qui vont cliver des substrats cellulaires conduisant à la mort de la cellule. L'importante déplétion de LT CD4 observée au cours de l'infection par le VIH-1 est due à la fois à l'activation chronique du système immunitaire et aux effets cytopathiques du virus (Lackner, Lederman, et Rodriguez 2012; Varbanov, Espert, et Biard-Piechaczyk 2006).

- **Rôle de l'activation chronique du système immunitaire dans l'apoptose des LT CD4**

Au sein du système immunitaire, les LT CD4 sont des acteurs essentiels de l'immunité adaptative cellulaire et humorale contre les infections. Ce sont eux qui participent, par leur activation en cellules T helper, à la stimulation et différenciation des lymphocytes T CD8 (réponse cytotoxique) ou des lymphocytes B, macrophages ou autres effecteurs de l'immunité. Le nombre de ces LT CD4 est régulé par un équilibre entre leur état d'activation (cellules à courte durée de vie) et leur état naïf ou différencié en cellule mémoire (à longue durée de vie) (Crotty 2015; Castellino et Germain 2006). Lors d'une primo-infection par le VIH-1, ces mécanismes sont largement perturbés et conduisent, dans un premier temps, à une déplétion massive des LT CD4, suivie, dans un deuxième temps, par une phase chronique d'activation immunitaire qui provoque un épuisement du système immunitaire, contribuant ainsi à la diminution du nombre de ces cellules. Pour faire face à cette perte, l'organisme qui vise à maintenir le nombre de LT CD4 constant, répond rapidement en remplaçant les cellules par activation du système immunitaire. Le virus induit donc, par cette activation du système immunitaire, la production de ses cellules cibles favorisant ainsi sa réplication.

Au niveau du tractus gastro-intestinal (TGI) les LT CD4 helper 17 (Th17) représentent une population importante pour l'homéostasie intestinale et pour le maintien de la barrière épithéliale du TGI (Van Wijk et Cheroutre 2010). Ces cellules disparaissent largement au cours des premières semaines de l'infection par le VIH-1, soit directement par l'effet cytolytique des

protéines virales, soit indirectement par élimination par le système immunitaire de cellules infectées (Février, Dorgham, et Rebollo 2011). On observe, au niveau du TGI, une augmentation de la perméabilité du tractus gastro-intestinal qui permet la translocation de facteurs microbiens immunostimulateurs (Brenchley *et al.* 2006). La perturbation des fonctions du TGI, la déplétion des Th17, la translocation de facteurs microbiens accompagnés de l'inflammation chronique ajoutés aux conséquences délétères du cycle réplicatif viral, contribuent à la disparition des cellules T CD4 et aux dysfonctionnements d'autres types cellulaires (Hofer et Speck 2009).

Un des mécanismes pouvant aussi rendre compte de la diminution du nombre de LT CD4 est la haute fréquence de remplacement de ces cellules au cours de l'infection par le VIH-1 (Sodora et Silvestri 2008). L'activation chronique du système immunitaire provoquée par l'infection provoque une augmentation du niveau de production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires circulantes (IFN type I, IL-6, TGFβ, IL-8, IL-1α, IL-1β, MIP-1α, MIP-1β et RANTES) (Appay et Sauce 2008). Ces molécules conduisent à une augmentation exacerbée des mécanismes physiologiques de contrôle de la réponse immunitaire qui se résout par la mort des LT CD4 activés par un processus appelé AICD (Activation Induced T Cell Death). Dans le contexte de l'infection par le VIH-1, l'activation chronique du système immunitaire conduit à une augmentation de ce processus d'AICD qui participe, par conséquent, à la disparition des LT CD4 (Février, Dorgham, et Rebollo 2011).

- **Déterminants viraux impliqués dans l'apoptose des LT CD4**

La réplication du VIH-1 est massive dans les LT CD4 activés. De ce fait, la membrane plasmique de ces cellules peut être altérée lors du bourgeonnement viral. De plus, l'accumulation de l'ADN viral non intégré et des dimères d'ARN viraux peut aussi provoquer l'apoptose des LT CD4 infectés.

Certaines protéines virales exercent un effet pro-apoptotique. En particulier, Env est un déterminant majeur dans la mort des cellules T CD4 au cours de l'infection par le VIH-1.

- **Tat** a été montré comme pouvant activer la caspase 8. De plus, Tat peut aussi induire l'apoptose en dérégulant la production de cytokines comme le TGF, le TNF-α et l'IL2 (Li-Weber, Frank, et Krammeri 1994).
- **Vpr** est connue pour exercer un double rôle sur l'apoptose en fonction de sa concentration cellulaire : à faible concentration, elle a un rôle anti-apoptotique (Zhu *et al.*, 2003), alors qu'à forte concentration, elle est responsable de l'inactivation du facteur de transcription NF-κB (Ayyavoo *et al.* 1997) ainsi que de l'activation des caspases 3 et 9 (Muthumani *et al.* 2002). Vpr aurait donc un rôle protecteur de la cellule infectée dans les phases précoces de l'infection et augmenterait l'apoptose dans les phases tardives.
- **Nef** induit l'expression de Fas et FasL, molécules responsables de l'initiation de la réponse apoptotique extrinsèque, à la surface des cellules T CD4 infectées (X.-N. Xu *et al.* 1999; Zauli *et al.* 1999).
- **Vpu** augmente, comme Nef, la sensibilité de la cellule à l'apoptose induite par Fas/FasL car elle a la capacité de former des canaux dans les membranes induisant ainsi une modification de la perméabilité membranaire (Casella, Rapaport, et Finkel 1999; Schubert *et al.* 1996; Ewart *et al.* 1996).
- **PR** : La protéase virale peut activer la caspase 8 en clivant directement la pro-caspase-8 dans le cytoplasme des cellules infectées, activant ainsi directement le mécanisme d'apoptose (Nie *et al.* 2002).
- **Env** : Les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 ont été impliquées de nombreuses manières dans la mort cellulaire par apoptose au cours de l'infection par le VIH-1. Par exemple, la gp120 soluble circulante chez les patients infectés est capable d'induire notamment l'apoptose des cellules du système nerveux central (Y. Xu *et al.* 2004). L'activité fusogénique de la gp41, permettant la formation de syncytia, cellules géantes multinuclées, est également impliquée dans l'apoptose des LT CD4 puisque cette fusion déclenche une cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation de p53 via la MAPK p38 et mTOR (mammalian Target Of Rapamycin). On observe alors l'activation de Bax et la perméabilisation de la membrane mitochondriale, ce qui conduit à l'apoptose (Perfettini, Roumier, et Kroemer 2005).

  De façon particulièrement intéressante, il apparaît que le nombre de cellules T CD4 apoptotiques chez les patients excède largement le nombre de cellules infectées (effet

Tableau 1 : Liste des enzymes antioxydantes retrouvées dans une cellule

Antioxydant	ROS	Fonction
Catalase	H_2O_2	Catalase catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O). Cette enzyme est principalement localisée au niveau des peroxysomes et mitochondries (Pisoschi et Pop 2015).
SOD	$O_2^{-\cdot}$	Superoxyde dismutase (SOD) : l'activité enzymatique de cette protéine est de convertir le superoxyde ($O_2^{-\cdot}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il existe trois types de superoxyde dismutases chez les mammifères; SOD1 (contenant ions de cuivre et zinc) est présent dans le cytosol, SOD2 (contenant du manganese) est présent dans la matrice des mitochondries et SOD3 est extracellulaire (Ghezzi *et al.* 2000)
Gpx	Glutathion (GSH)	Glutathione peroxydase (Gpx) : sélenoprotéines réduisant les peroxydes. Cette famille de protéines présente plusieurs localisations cellulaires et différents substrats. Par exemple Gpx1 est présent dans le cytoplasme pour cataboliser le H_2O_2, Gpx4 quant à lui est présent dans le cytoplasme et les mitochondries car il hydrolyse les lipides hydroperoxydés.
Trx	Thiol	Thiorédoxines : ces protéines peuvent réduire les protéines possédent des liens disulfite. Trx1 est cytosolique Trx2 mitochondrial et Trx3 est un isofome spécifiquement retrouvé au sein des cellules spermatidiques (Matsuzawa *et al.* 2011).
Prx	peroxydes	Peroxyrédoxines : sont des thiol peroxydases ubiquitiares. Les mammifères possèdent 6 Prx qui sont localisées dans le cytoplasme (Prx1, Prx2, Prx6), dans le RE (Prx4), les mitochondries (Prx3), ou les peroxysomes et mitochondries (Prx5) (Hall *et al.* 2009).

dit « bystander ») (Finkel *et al*. 1995). Plusieurs travaux, dont ceux de notre équipe, ont montré que Env exerce un rôle majeur dans l'induction de la mort par apoptose des LT CD4 non infectées (Espert *et al.* 2006; Denizot *et al.* 2008; Perfettini *et al*. 2005).

1.1.C VIH-1 et Stress oxydatif

Le stress oxydatif, caractérisé par la production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species), est impliqué dans la pathogénèse de l'infection par le VIH-1 et la progression de la maladie (Baier-Bitterlich, Wachter, et Fuchs 1996; Baruchel et Wainberg 1992; Ivanov *et al.* 2016). Chez les patients infectés par le VIH-1, il a très rapidement été identifié un état de stress oxydatif au niveau de leur plasma, lymphocytes, monocytes et épithélium pulmonaire (Couret et Chang 2016; Ivanov *et al.* 2016). Le stress oxydatif induit par le VIH-1 joue un rôle important dans le développement de plusieurs pathologies associées à la présence du virus. On y retrouve de la neurotoxicité, la démence, un déséquilibre immunitaire par épuisement du nombre de LT CD4, et des maladies pulmonaires et cardiovasculaires. Le profil immunologique de patients infectés par le VIH-1 est affecté par l'état de stress oxydatif et peut être modulé par traitement antioxydant. En effet, une augmentation de l'apoptose des LT CD4 induite par stress oxydatif a aussi été observée chez les patients asymptomatiques (Dobmeyer *et al.* 1997).

Les ROS sont une famille de molécules appelés radicaux libres hautement réactifs (tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), oxygène singulet ($^1O_2$), le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$), l'oxyde nitrique ($NO^{\cdot}$) le dioxyde de nitrogène ($NO_2^{\cdot}$) et le peroxynitrite ($ONOO^-$)). Une des sources majeures de production de ROS est la mitochondrie mais ils peuvent également être produits au niveau des membranes (membrane plasmique et réticulum endoplasmique) par l'action des enzymes NADPH oxydase (NOXs). Ces ROS sont impliqués dans différents mécanismes cellulaires physiologiques ou pathologiques tels que les voies de signalisation, la régulation hormonale, l'induction d'apoptose, la prolifération des cellules T, l'inflammation, les mutations d'ADN mitochondrial ou le vieillissement (Pisoschi et Pop 2015; Belikov, Schraven, et Simeoni 2015; Kesarwani *et al.* 2013). Les ROS sont des molécules très réactives et leur quantité doit être finement régulée pour éviter leurs effets délétères sur les macromolécules comme l'ADN, les lipides ou les protéines. Pour ce faire, la cellule possède de nombreux systèmes antioxydants tels que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutaredoxine (Grx), la peroxyrédoxine (PRX), la thiorédoxine (TRX) (voir Tableau 1) ou des

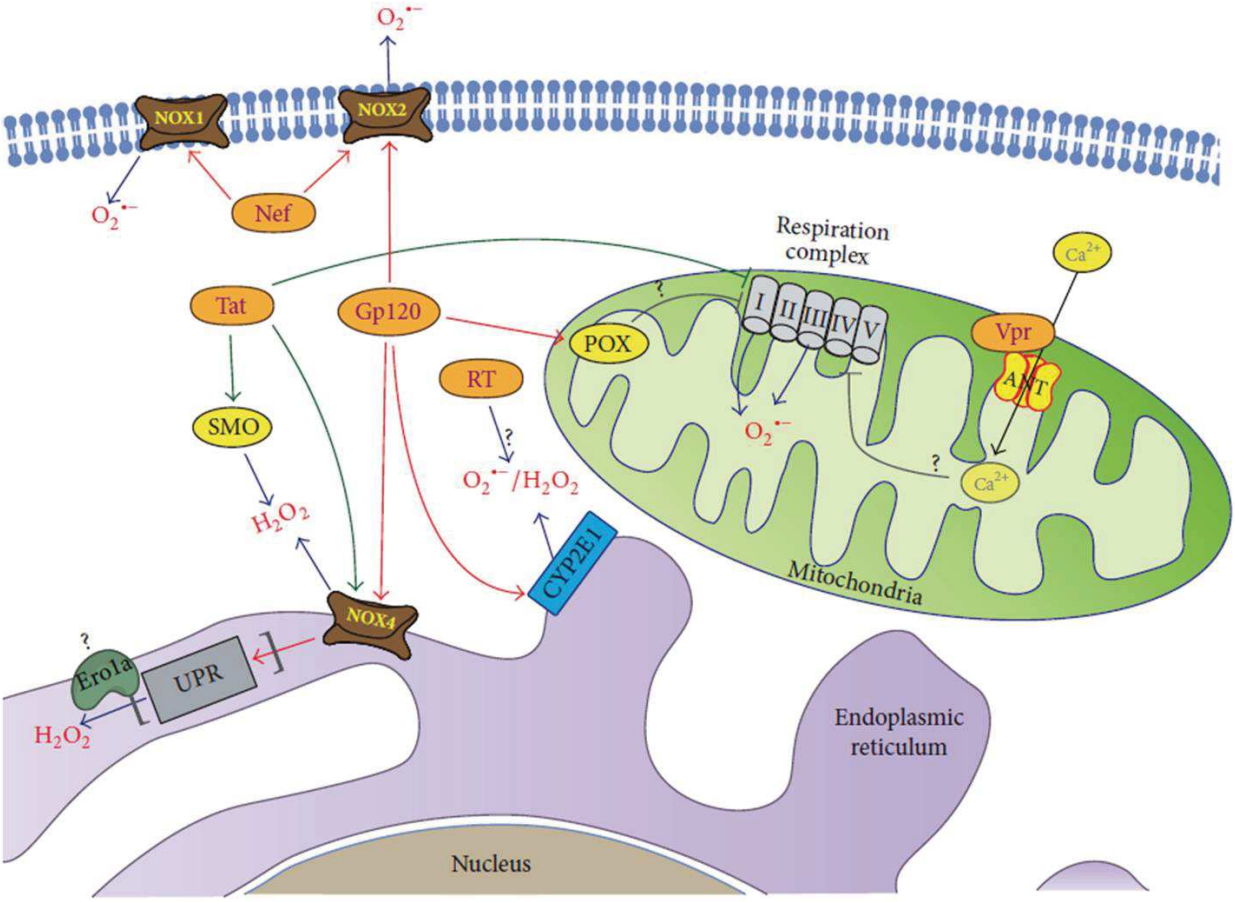


Figure 7 : Sources cellulaires de production de ROS lors de l'infection par le VIH.

Plusieurs protéines du VIH-1 augmentent la production de ROS par différents mécanismes. Ces protéines virales incluent notamment gp120, Tat, Nef et Vpr. La gp120 de l'enveloppe virale augmente la production de ROS par activation du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), de la proline oxidase (POX), de NOX2 et de NOX4. La protéine Tat induit la spermine oxydase (SMO), une enzyme impliquée dans le catabolisme des polyamines, et peut également impacter la fonction mitochondriale. Tat active également les NADPH oxydase et en particulier NOX4 qui peut ensuite mener d'autres enzymes générant des peroxydes à s'activer qui sont elles-mêmes impliquées dans la réponse aux protéines mal repliées telle que Ero1α (ER oxidoreductin 1α). La protéine Vpr interagit avec le translocateur de nucléotides adénide (ANT, un composant du pore de transition de perméabilité de la mitochondrie) qui est impliqué dans l'influx de Ca^{2+} dans la mitochondrie. La protéine Nef peut directement interagir avec les NOX.
Source : Ivanov et al., 2016

composés non enzymatiques qui sont des molécules de faibles poids moléculaire (acide urique, coenzymeQ, acide lipoïque) (Poljsak, Šuput, et Milisav 2013). Il existe donc, au sein des cellules, un équilibre entre la production de ROS et l'action des systèmes antioxydants (voir Tableau 1). Lorsque la quantité de ROS devient trop importante, la cellule se trouve dans un état de stress oxydatif qui la conduit à la mort par apoptose (Pisoschi et Pop 2015).

Après l'entrée dans la cellule, le VIH-1 perturbe la machinerie cellulaire pour en tirer profit et procéder à sa réplication. Ceci a pour conséquence de créer des dysfonctionnements menant à un déséquilibre du système rédox de la cellule et donc à un état de stress oxydatif. Cet état de stress oxydatif a un effet bénéfique sur le cycle réplicatif de différentes infections virales (Reshi, Su, et Hong 2014). Certaines protéines virales du VIH-1 ont la capacité de moduler le niveau de ROS au sein de la cellule en favorisant leur production ou en causant un dysfonctionnement des mitochondries (Perl *et al.* 2002) (voir Figure 7). Voici, ici, quelques exemples du rôle des protéines virales dans la modulation du niveau de ROS au cours de l'infection par le VIH-1 :

- la protéine d'enveloppe gp120 induit la production de ROS dans des astrocytes induisant ainsi leur mort par apoptose (Shah *et al*. 2013; Ivanov *et al.* 2016).
- Tat augmente la production d'H_2O_2 avec pour conséquence d'induire le récepteur FasL qui déclenche alors la mort par apoptose des cellules (Gülow *et al.* 2005). Tat permet aussi l'augmentation de la protéine NOX2 qui, en générant des ROS, mène à une activation de la voies NF-κB. Tat a également été montré comme pouvant diminuer l'expression de la protéine mitochondriale SOD (Couret et Chang 2016). Enfin, un important stress oxydatif est induit par Tat au niveau du RE au travers de la protéine NOX4 (Jadhav, Krause, et Singh 2014; R.-F. Wu *et al*. 2010; Price *et al.* 2006).
- Vpr augmente la production de ROS en influençant la production d'IL-6 et générant ainsi une réactivation des virus latents dans des cellules primaires (Hoshino *et al.* 2010). Vpr cause également des dysfonctionnements des mitochondries par sa liaison avec la protéine ANT (Adenine Nucleotide Translocase) qui forme un canal interne dans le pore de transition de perméabilité (PTP : Permeability Transition Pore) de cette organelle (Brenner 2003).
- Nef présente une activité pro-oxydante dans des polynucléaires neutrophiles ou des cellules de la microglie. Lorsque Nef interagit avec les protéines Vav qui sont des

facteurs d'échange de nucléotides pour Rac1 qui est recruté au sein des complexes NOX1-NOX3 (Olivetta *et al.* 2005; Vilhardt *et al.* 2002).

- De façon importante, notre équipe a montré que Env, exprimée à la surface de cellules infectées, induit un stress oxydatif, caractérisé par une augmentation de la quantité de ROS dans les cellules T CD4 non infectées (Molina *et al.* 2007). De plus, nos résultats (non publiés), ainsi que ceux d'une autre équipe montrent que Env, en particulier la fonction fusogénique de la gp41, augmente le niveau de ROS dans les cellules T CD4 non infectées et que cet évènement est impliqué dans leur mort par apoptose (Garg et Blumenthal 2006).

1.2 Autophagie

Le terme « autophagie » provenant du grec signifiant « se manger soi-même » désigne un processus conservé évolutivement au sein de tous les eucaryotes. En 1963, Christian de Duve (Prix Nobel de Physiologie et de Médecine 1974) utilise le terme d'autophagie pour décrire l'apport de matériel cytoplasmique au niveau des lysosomes qu'il étudie et observe par microscopie électronique (Deter, Baudhuin, et Duve 1967). Pendant les années qui suivirent, l'autophagie n'a été étudiée qu'au travers de techniques biochimiques et de microscope électronique d'ultrastructure qui ont modérément enrichi les connaissances de ce domaine. La découverte majeure des gènes régulant ce processus de l'autophagie (appelés ATG : Autophagy Related Genes) par Yoshinori Ohsumi grâce à un crible génétique chez la levure a fourni les bases moléculaires nécessaires à l'étude de l'autophagie chez les mammifères (Tsukada et Ohsumi 1993). Pour ces travaux, Dr. Ohsumi a été récompensé du prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 2016 (Mizushima 2018).

1.2.A Généralités

L'autophagie est un processus catabolique hautement conservé chez les eucaryotes qui délivre du matériel cytoplasmique par des organelles aux lysosomes pour être dégradés et recyclés (Eskelinen 2019). L'autophagie a pour rôle de maintenir les niveaux énergétiques intracellulaires et de protéger la cellule contre différents stress. Les cellules non mitotiques telles que les neurones ou cellules musculaires dépendent particulièrement de l'autophagie pour éliminer des organelles défectives ou des agrégats de protéines puisqu'elles ne peuvent pas renouveler leur cytoplasme par division cellulaire (Damme *et al*. 2015). Les cellules

eucaryotes disposent de deux systèmes de dégradation assurant le maintien de leur homéostasie : le système UPS (Ubiquitin proteasome system) et l'autophagie. L'UPS est responsable de la dégradation des protéines à courte durée de vie et des protéines solubles mal repliées, tandis que l'autophagie assure l'élimination de protéines à durée de vie plus longue ou d'agrégats insolubles ou même d'organelles défaillantes (telles que des mitochondries ou peroxysomes) et de parasites intracellulaires (bactéries par exemple) (Lilienbaum 2013). Bien que ces mécanismes diffèrent dans leurs substrats à dégrader, leur fonction de recyclage est commune et permet à la cellule de réutiliser ces éléments cytoplasmiques pour la synthèse de nouvelles molécules ou comme source d'énergie lors de carence. Ainsi, la communication et la coopération entre ces deux systèmes assure le maintien de l'homéostasie cellulaire (Kocaturk et Gozuacik 2018).

L'autophagie est aussi impliquée dans de nombreuses fonctions essentielles de la cellule ou de l'organisme comme le développement, la différenciation, la réponse au stress. Elle régule plusieurs fonctions immunes essentielles dont l'élimination de pathogènes intracellulaires, la sécrétion de cytokines, l'inflammation, la présentation d'antigènes et le développement des lymphocytes (Eskelinen 2019). L'autophagie influence aussi à la longévité d'un organisme en participant au maintien de ses cellules souches et en retardant son vieillissement. Par son importance dans toutes ces grandes fonctions cellulaires, le moindre dysfonctionnement de l'autophagie engendre d'importantes conséquences causant des maladies neurodégénératives (maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington ou la sclérose latérale amyotrophique), musculaires, des cancers, des dérégulations du système immunitaire, ou des troubles métaboliques (Eskelinen 2019).

La lutte contre les agents pathogènes est assurée par une forme d'autophagie sélective appelée « xénophagie » (voir chapitre « Autophagie Sélective ») et constitue une première défense cellulaire participant à l'immunité intrinsèque. Cependant, au cours de leur évolution, de nombreux pathogènes ont acquis la capacité d'échapper à la dégradation lysosomale du processus autophagique ou de détourner la machinerie cellulaire à leur avantage afin de survivre et de se multiplier au sein des cellules.

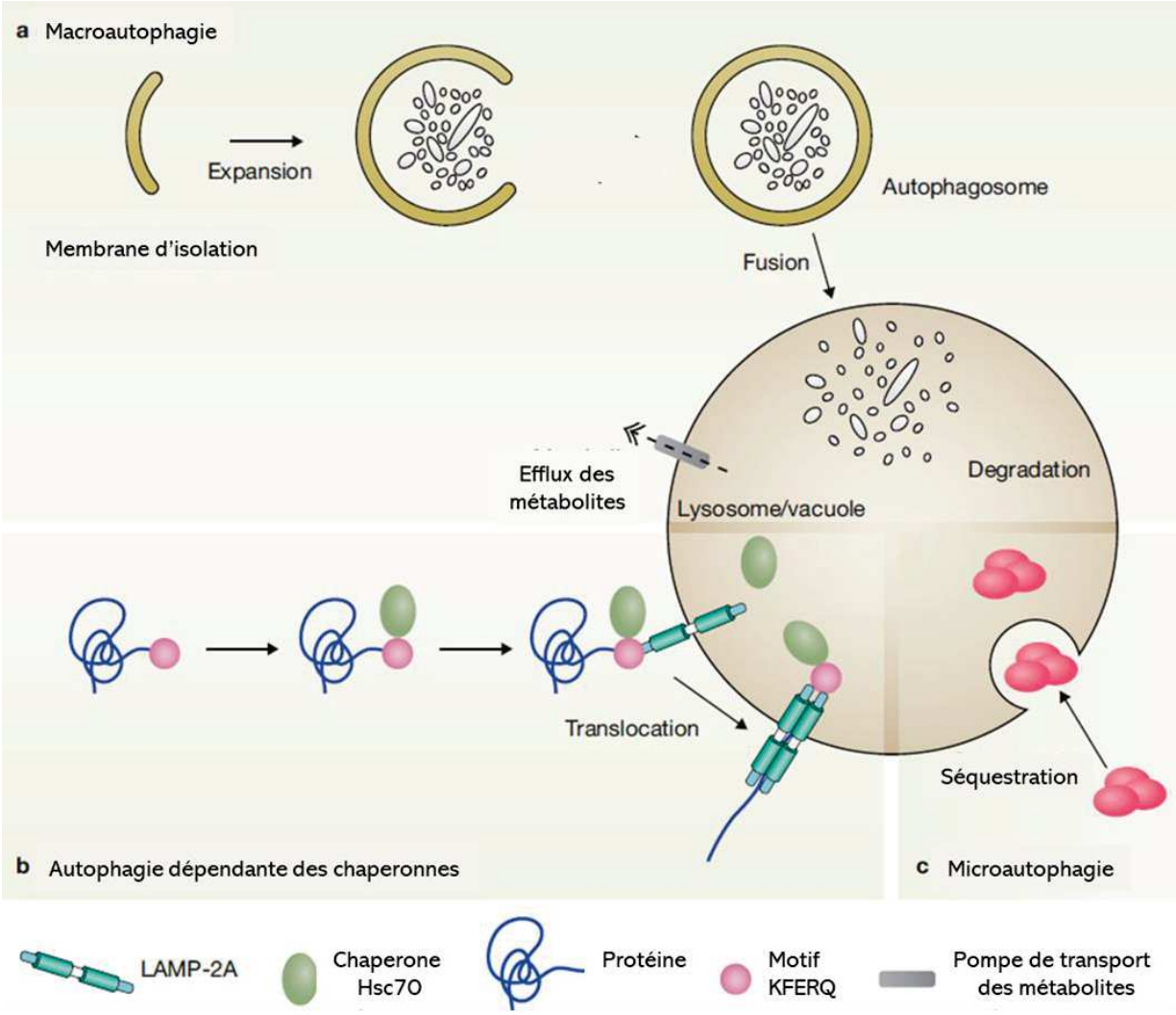


Figure 8 : Différentes formes d'autophagie.

A. La macroautophagie est caractérisée par la séquestration de structures dans des vésicules doubles-membranaires appelés autophagosomes destinées être détruits. Les autophagosomes vont ensuite fusionner avec des lysosomes déversant leur contenu qui sera dégradé par les hydrolases. Les métabolites seront ensuite transportés dans le cytoplasme pour être utilisés pour la synthèse de nouvelles macromolécules ou comme source d'énergie. **B.** L'autophagie dépendante des chaperonnes reconnait les protéines contenant la séquence KFERQ grâce à la chaperonne Hsc70 qui s'associe ensuite avec la protéine membranaire du lysosome LAMP2A déclenchant son oligomérisation. Cette association déclenche la translocation des protéines à l'intérieur du lysosome. **C**. La microautophagie implique l'invagination de la membrane du lysosome séquestrant le matériel à proximité.
Source : Boya, Reggiori et Codogno 2013

1.2.A.1 Types d'autophagie

Il existe plusieurs voies de signalisation permettant de cibler le matériel cytoplasmique à la dégradation lysosomale (voir Figure 8). On distingue ainsi la microautophagie, l'autophagie dépendante des chaperonnes (ou CMA pour Chaperone Mediated Autophagy) et la macroautophagie (Boya, Reggiori, et Codogno 2013).

1.2.A.1.a Microautophagie

La microautophagie est une forme d'autophagie au cours de laquelle le matériel cytoplasmique à dégrader entre directement dans un endosome tardif ou un lysosome par invagination de sa membrane (Mijaljica, Prescott, et Devenish 2011). Le matériel intra-endosomal ou intra-lysosomal est ensuite dégradé par les hydrolases lysosomales (Tekirdag et Cuervo 2018). Ce mécanisme a été particulièrement étudié chez la levure et a été impliqué dans la dégradation sélective de certains substrats dont les peroxysomes, mitochondries et gouttelettes lipidiques (Farré et Subramani 2004; Tekirdag et Cuervo 2018).

1.2.A.1.b Autophagie dépendante des chaperonnes (CMA)

L'autophagie dépendante des chaperonnes, ou CMA, se caractérise par l'adressage direct de protéines cytosoliques au lysosome *via* l'intervention d'une protéine chaperonne, HSC70, et son interaction avec la protéine lysosomale LAMP2A (Lysosome-associated membrane protein 2A) (Susmita Kaushik et Cuervo 2012). La CMA dégrade uniquement les protéines solubles présentant le motif peptidique de type « KFERQ » (K : Lysine, F : Phénylalanine, E : Glutamate, R : Arginine et Q : Glutamine) qui est reconnu par HSC70. Cette dernière va permettre la translocation des substrats du cytosol au lumen du lysosome (Bandyopadhyay *et al.* 2008). Les substrats, reconnus par la chaperonne, lient les récepteurs lysosomaux LAMP2A, stimulant ainsi leur oligomérisation et la formation du complexe de translocation (Lorenzo Galluzzi *et al.* 2017).

1.2.A.1.c Macroautophagie

La macroautophagie est la forme d'autophagie la plus documentée à ce jour. En effet, alors que la microautophagie et la CMA ne sont pas associés à des changements morphologiques au sein de la cellule, la macroautophagie est caractérisée par la formation de vésicules double membranaires, appelées autophagosomes capables d'englober de larges portions du

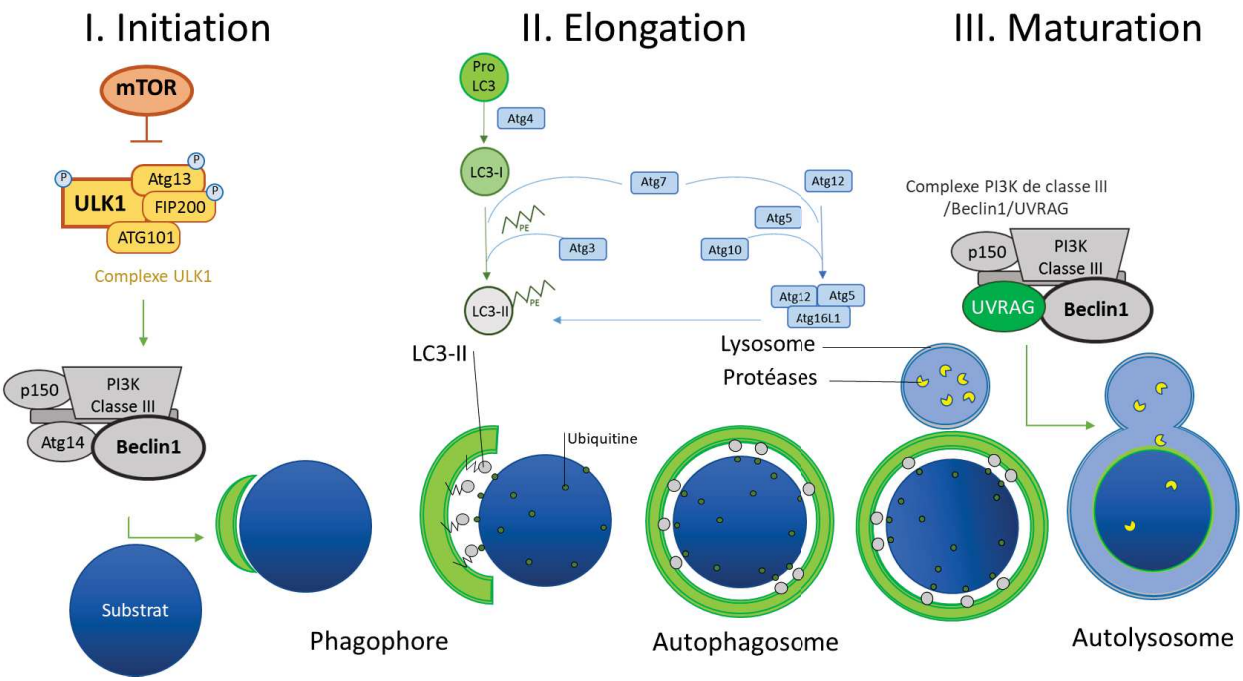


Figure 9 : Mécanismes moléculaires de l'autophagie

I. L'**initiation** de l'autophagie conduit à la formation du phagophore. Cette étape implique les complexes de signalisation mTOR, ULK1 et Beclin1/PI3K/ATG14L. **II**. L'**élongation** de la membrane du phagophore est réalisée par la coordination de deux systèmes de conjugaison de type « Ubiquitine-like » ATG12-ATG5/ATG16L1 et LC3-PE. Cette étape aboutit à la formation de l'autophagosome séquestrant du matériel cytoplasmique tels que les organelles, des protéines ou des pathogènes. **III.** La **maturation** des autophagosomes est l'étape au cours de laquelle ils fusionnent avec les lysosomes de façon dépendante au complexe Beclin1/PI3K/UVRAG. Au sein de l'autolysosome, le matériel séquestré sera dégradé puis recyclé dans le cytoplasme.

Le complexe ULK composé de ULK1/2, ATG13, FIP200 et ATG101 est responsable de l'initiation de l'autophagie et est régulé par la kinase mTOR. Le complexe PI3Kinase de Classe III associé à Beclin1, p150 et ATG14L est responsable de la formation du phagophore. Ce complexe peut être inhibé par l'association de Bcl-2 à Beclin1 ce qui mène alors à une inhibition de l'autophagie. Les complexes de conjugaison de type « Ubiquitine-like » ATG12-ATG5/ATG16L1 et LC3-PE sont responsables de l'élongation et la fermeture de l'autophagosome. ATG12 est conjugué à ATG5 par l'action de l'enzyme E1 ATG7 et E2 ATG10. Le conjugué qui en résulte forme un complexe avec ATG16L1. De même, LC3 qui est d'abord ciblé par ATG4 est conjugué à un lipide, le phosphatidyléthanolamine (PE), par l'action d'ATG7 et de l'enzyme E2 ATG3. Le complexe ATG12-ATG5/ATG16L1 agit comme E3 ligase en facilitant la conjugaison de LC3 au PE. Enfin, le complexe contenant UVRAG est impliqué dans la fusion des autophagosomes avec le lysosome et est inhibé par Rubicon.

Source : Inspiré de Lamb et al. 2013

cytoplasme y compris des organelles. La macroautophagie faisant l'objet de cette étude, le terme « autophagie » sera utilisé tout au long de ce manuscrit.

L'autophagie se décline en 3 grandes étapes :

- L'initiation est l'étape au cours de laquelle une double membrane appelée phagophore (ou membrane d'isolation) se forme dans le cytoplasme sous l'action du complexe Vps34/Beclin1.
- L'élongation est l'étape au cours de laquelle le phagophore s'allonge et se ferme en englobant le matériel à dégrader. Il en résulte une vacuole double membranaire appelée « autophagosome ». Cette étape dépend de l'action de 2 systèmes de conjugaison de type ubiquitination.
- La maturation est l'étape au cours de laquelle l'autophagosome va fusionner avec les lysosomes, créant une structure appelée « autolysosome » dans laquelle le matériel séquestré sera dégradé. Les produits de cette dégradation seront transportés pour rejoindre le cytoplasme grâce aux pompes lysosomales membranaires (Tanida 2011; Bento *et al.* 2016). Il est intéressant de noter qu'une connexion entre l'autophagie et la voie endosomale est possible au cours de cette étape. En effet, les endosomes peuvent fusionner avec les autophagosomes pour donner des structures appelées « amphisomes » avant de fusionner avec les lysosomes (Gordon et Seglen 1988; Klionsky, Eskelinen, et Deretic 2014).

Les mécanismes moléculaires qui contrôlent ces différentes étapes sont décrits dans le chapitre « Mécanismes moléculaires de l'autophagie ».

L'origine membranaire de l'autophagosome est étudiée depuis la découverte de ce processus cellulaire dans les années 1950. Le consensus actuel est que le phagophore est constitué de sources membranaires diverses telles que le RE, les sites de sorties du RE, les mitochondries, le compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi, le Golgi, les endosomes de recyclage et la membrane plasmique (Søreng, Neufeld, et Simonsen 2018).

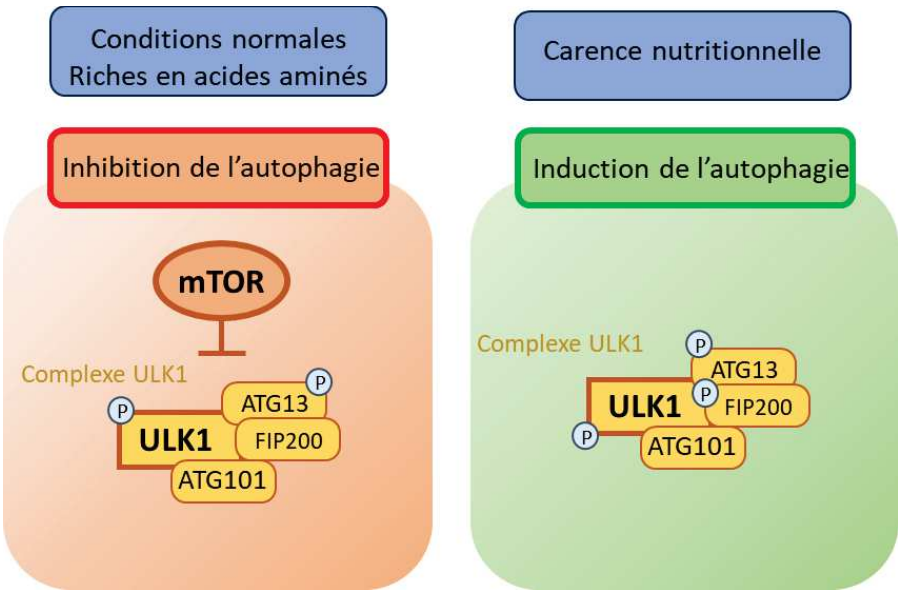


Figure 10 : Régulation du complexe ULK

Le complexe ULK est activé ou inhibé par la kinase mTOR. En présence de nutriments, mTOR est actif et procède à la phosphorylation de ULK1/2 et ATG13 ce qui a pour conséquence une inhibition de l'autophagie. En cas de carence en nutriments, mTOR est inactivé et se dissocie du complexe ULK. ULK1/2 devient alors active et procède à plusieurs phosphorylations pour que le complexe parvienne à sa forme active et participe à l'activation de l'autophagie.

1.2.A.2 Mécanismes moléculaires de l'autophagie

1.2.A.2.a Initiation

L'initiation de l'autophagie correspond à l'activation de plusieurs complexes protéiques qui assurent la formation du phagophore qui peut trouver son origine dans plusieurs sources membranaires telles que précédemment mentionnées. Le complexe ULK (constitué de ULK1/2, ATG13, FIP200 et ATG101) puis d'un second complexe phosphoinositide 3-kinase de classe III (PI3K-III) (constitué de PI3K-III/Vps34, Beclin1, ATG14 et p150) sont tout d'abord activés afin d'assurer la production de PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) nécessaire à cette étape (voir Figure 9*)* (Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013).

1.2.A.2.a.1 Complexe ULK

Cinq orthologues du facteur ATG1 de levure sont retrouvés chez les mammifères, mais, parmi ceux-ci, seuls ULK1 et ULK2 ont été caractérisés pour leur rôle dans l'autophagie (Farré et Subramani 2016). Ces protéines sont des kinases à sérine/thréonine dont les fonctions sont redondantes. Elles sont associées, en un complexe stable, avec les facteurs ATG13, FIP200 et ATG101. Dans des conditions riches en nutriments, le complexe ULK s'associe, par liaison directe, avec le complexe mTOR actif (Zachari et Ganley 2017; Chan et Tooze 2009). La kinase mTOR inhibe l'autophagie en phosphorylant le facteur ATG13 et le facteur ULK1 au niveau de sa région régulatrice interne, sur la sérine 757 (Ser^{757}).

En condition de carence nutritionnelle, mTOR est inactivée et ne se lie plus au complexe ULK. L'activité kinase de ULK1 devient alors catalytiquement active et assure son autophosphorylation ainsi que la phosphorylation de ses partenaires ATG13 et FIP200, conduisant à la forme active du complexe et à sa translocation au site de formation du phagophore naissant (voir Figure 10) (McAlpine *et al.* 2013; Hosokawa *et al*. 2009). Le complexe ULK recrute et active le complexe PI3 Kinase de classe III/Beclin1 en phosphorylant Beclin1 et ATG14L (chapitre « PI3K classe III »).

L'autophagie peut également être activée par la voie de l'AMP Kinase (AMP-activated protein kinase) en cas de carence énergétique. Lorsque le niveau d'ATP cellulaire est bas et que les niveaux d'AMP augmentent, l'AMPK est activée et phosphoryle un grand nombre de facteurs cellulaires dont mTOR. Celui-ci est, par conséquent, inactivé et ULK1 sera alors activé pour

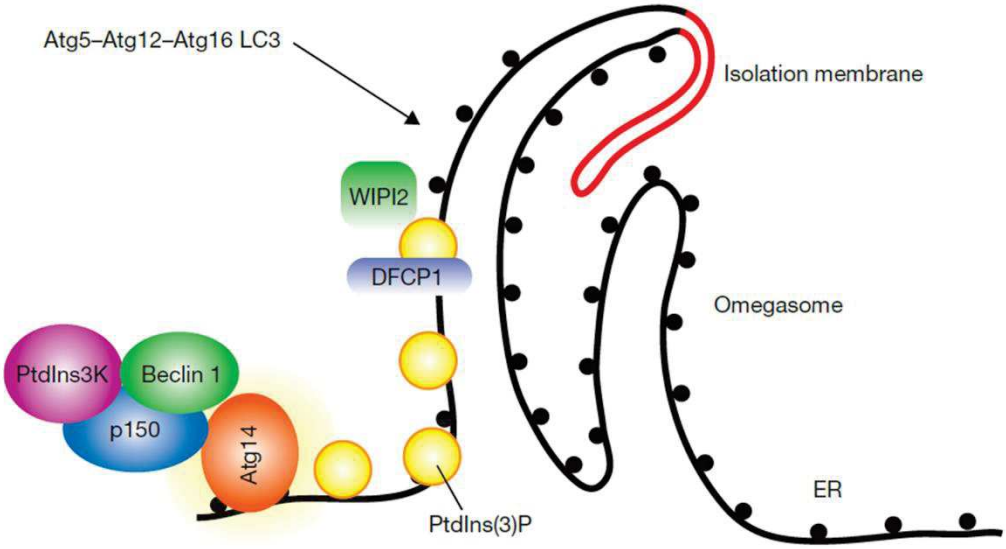


Figure 11 : Modèle de formation du phagophore à partir du RE

Le phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns(3)P) est essentiellement produit par le complexe Beclin1/Vsp34/PI3K de classe III et est essentiel à la formation du phagophore. Le PI3P produit permet le recrutement des protéines DFCP1, WIPI1 ou WIPI2 grâce à leur domaine FYVE.
Source: S.Tooze and T. Yoshimori Nat Cell Biol 2010

initier l'autophagie qui permettra de restaurer les besoins de la cellule (J. Kim *et al.* 2011). Le complexe ULK peut également être directement activé par l'AMPK indépendamment de mTOR (Egan *et al*. 2011).

1.2.A.2.a.2 PI3K classe III/Beclin1

Le second complexe essentiel à la formation du phagophore est composé de la phosphoinositide 3-kinase de classe III (PI3K-III) (ou Vacuolar sorting protein Vps34), Beclin1, ATG14L et p150 (ou Vps15). Le complexe ULK1 activé va recruter et activer le complexe PI3K III/Beclin1, stimulant ainsi l'activité de la PI3K-III. Cette dernière va assurer la phosphorylation du phosphatidylinositol (PI) en PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate). Le PI3P sert de signal lipidique pour le recrutement et l'activation d'autres effecteurs de l'autophagie possédant un domaine de fixation au PI3P (domaine FYVE) tels que DFCP1, ou les protéines WIPI1/2 (voir Figure 11) (Axe *et al.* 2008; Polson *et al.* 2010; Tooze et Yoshimori 2010). Le PI3P est essentiel à l'élongation du phagophore (Hill, Wrobel, et Rubinsztein 2019).

Un niveau de régulation supplémentaire est assuré par l'interaction entre Beclin1 et les protéines de la famille Bcl2 (Bcl2 et BclXL). En effet, la protéine Beclin1 interagit avec le domaine BH3 de ces protéines inhibant ainsi l'autophagie (Pattingre *et al.* 2005). En revanche, différentes voies de signalisation peuvent activer l'autophagie en permettant la phosphorylation de Bcl2 ou de Beclin1 par des enzymes à activité kinase telle que JNK1 (c-Jun N-terminale 1) et DAPK (Death-associated Protein Kinase) respectivement. Ces phosphorylations ont pour effet de dissocier le complexe Beclin1/Bcl2 et d'activer ainsi le processus (Pattingre *et al.* 2008; Zalckvar *et al.* 2009). Beclin1, qui n'a pas d'activité catalytique par elle-même, peut alors ensuite servir de plateforme pour le recrutement de facteurs activateur (AMBRA1, ATG14, UVRAG) ou répresseur (Rubicon) de l'autophagie dépendante du complexe PI3K-III (Menon et Dhamija 2018).

Les drogues 3-MA (3-methyladenine) ou Spautin1 sont utilisées au laboratoire pour cibler ce complexe et inhiber l'initiation d'autophagie (J. Liu *et al.* 2011).

1.2.A.2.b Elongation

Au cours de cette étape, le phagophore s'allonge et s'incurve, capturant ainsi une partie du cytoplasme puis se ferme et forme une vésicule double membranaire appelée

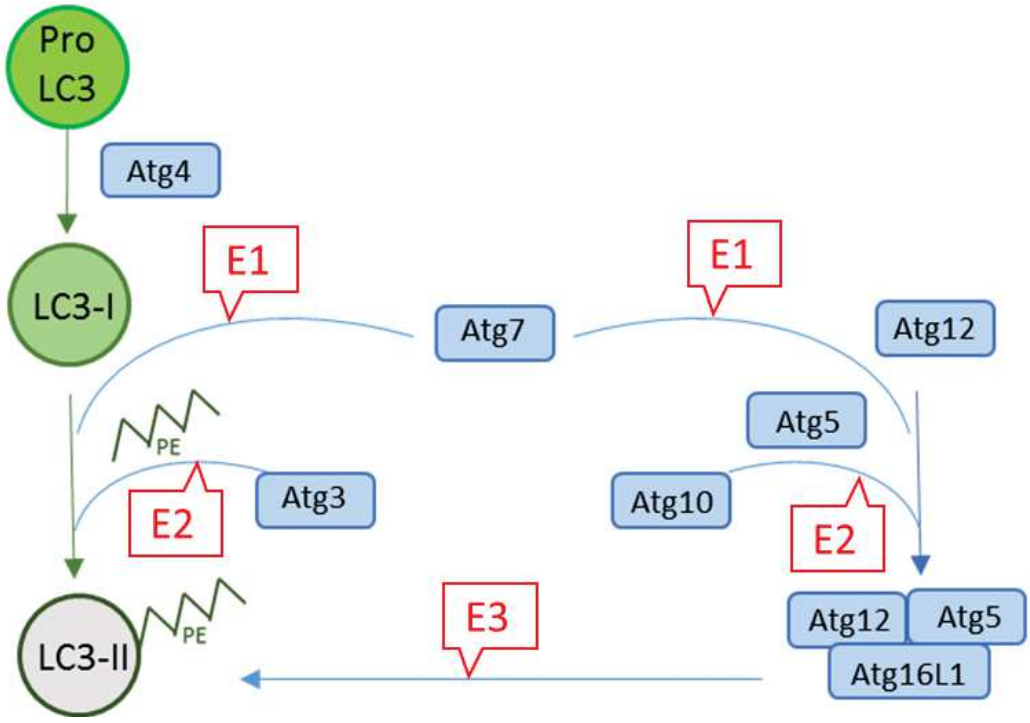


Figure 12 : Systèmes de conjugaison de l'autophagie.

Les complexes de conjugaison de type « Ubiquitine-like » ATG12-ATG5/ATG16L1 et LC3-PE sont responsables de l'élongation et la fermeture de l'autophagosome. ATG12 est conjugué à ATG5 par l'action de l'enzyme E1 ATG7 et E2 ATG10. Le conjugué qui en résulte forme un complexe avec ATG16L1. De même, LC3 qui est d'abord clivé par ATG4 est conjugué à un lipide, le phosphatidyléthanolamine (PE), par l'action d'ATG7 et de l'enzyme E2 ATG3. Le complexe ATG12-ATG5/ATG16L1 agit comme E3 ligase en facilitant la conjugaison de LC3 au PE.

autophagosome (voir Figure 9). Des apports lipidiques permettent la formation de l'autophagosome grâce à la protéine ATG9 et à deux systèmes de conjugaison de type ubiquitination. Typiquement, les systèmes de conjugaison de l'ubiquitine se composent de molécules « ubiquitine-like » qui sont conjuguées à un substrat par une enzyme d'activation (E1) puis une enzyme de conjugaison (E2) et enfin une ligase (E3).

1.2.A.2.b.1 Complexe de conjugaison ATG12-ATG5/ATG16L1

Dans le premier système de conjugaison de l'autophagie, la protéine ATG7 agit comme enzyme d'activation (E1) en exécutant le transfert de la protéine ATG12 sur la protéine ATG10. ATG10 agit ensuite en tant qu'enzyme de conjugaison (E2) pour lier de manière covalente le facteur ATG12 à la protéine ATG5 (voir Figure 12). Le conjugué ATG5-ATG12 se lie alors au facteur ATG16L1 pour former le premier complexe ATG5-ATG12/ATG16L1. Celui-ci agit comme une E3 ligase pour catalyser la réaction de conjugaison d'ATG8 avec PE (phosphatidylethanolamine) présenté au paragraphe prochain (Bento *et al.* 2016).

1.2.A.2.b.2 Complexe de conjugaison ATG8-PE

Le second système de conjugaison est unique car il permet la conjugaison d'une protéine (ATG8 chez la levure) à un lipide (phosphatidylethanolamine : PE). Les protéines de la famille ATG8 sont rapidement clivées après leur synthèse par une protéase à cystéine, ATG4. ATG8 clivée, cytosolique, nommée ATG8-I, expose en position C-terminale un résidu glycine qui est lié de manière covalente au PE. Les acteurs de cette conjugaison sont les facteurs ATG7 (E1), ATG3 (E2) et le complexe ATG12-ATG5/ATG16L1 (E3). Le conjugué ATG8-PE est alors appelé ATG8-II et se localise spécifiquement au niveau des membranes interne et externe des autophagosomes. Le ATG8-II ancré sur la membrane externe de l'autophagosome fermé est alors clivé par ATG4 pour recyclage. Le ATG8-II interne quant à lui reste lié à la membrane de l'autophagosome jusqu'à sa dégradation dans l'autolysosome et est couramment utilisé comme marqueur du flux autophagique (Søreng, Neufeld, et Simonsen 2018).

Les mammifères possèdent plusieurs orthologues d'ATG8 qui peuvent être regroupés en deux familles; les MAPs-LC3 (pour Microtubule-associated Protein Light Chain 3) : LC3A, LC3B, LC3B2 et LC3C, et les GABARAPs (GABA(A) receptor-associated protein) : GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2/GATE-16 (He *et al.* 2003, 3; Xin *et al.* 2001).

Très récemment, une étude a montré que les protéines de la famille ATG8 pourraient réguler l'activation du complexe ULK1/2. Dans ce travail, les auteurs montrent que les GABARAP auraient la capacité d'activer le complexe ULK1/2 et la formation du phagophore, alors que les membres de la famille MAP-LC3 auraient un effet inhibiteur sur ce complexe (Grunwald *et al.* 2019).

La lipidation du LC3-I cytosolique en LC3-II, ancré dans la membrane des autophagosomes, est couramment utilisé pour suivre le flux autophagique. Par exemple, en Western Blot la protéine LC3-II présente une mobilité électrophorétique plus importante que la protéine LC3-I. Par conséquent, LC3-I migre à un poids moléculaire apparent de 18 kDa tandis que LC3-II migre à un poids moléculaire apparent de 16 kDa. De plus, par microscopie, on peut observer LC3-II ponctuée correspondant aux autophagosomes, alors que LC3-I a un profil diffus dans le cytoplasme (Klionsky *et al.* 2016).

1.2.A.2.c Maturation et recyclage

Après sa fermeture, l'autophagosome doit fusionner avec un lysosome pour y délivrer son contenu à dégrader. Cette fusion donne lieu à un autolysosome au sein duquel le matériel séquestré est dégradé par les hydrolases du lysosome qui fonctionnent à pH acide (voir Figure 9). Les transporteurs présents à la surface membranaire des lysosomes pourront ensuite procéder au relargage des métabolites qui seront réutilisés par la cellule (Yang *et al*. 2006).

Pour éviter des fusions non spécifiques et assurer la dégradation des bons cargos, ce processus est hautement régulé pour que seuls les autophagosomes complètement formés puissent fusionner. Les microtubules sont impliqués dans le mouvement des autophagosomes et leur fusion avec soit des lysosomes, soit des endosomes. En effet, chez les mammifères et comme mentionné précédemment, les autophagosomes peuvent fusionner avec des endosomes donnant lieu à des structures appelées « amphisomes » qui seront à leur tour capables de fusionner avec des lysosomes (Gordon et Seglen 1988).

1.2.A.2.c.1 Complexe PI3K de classe III/Beclin1/UVRAG

Seuls les autophagosomes matures doivent pouvoir fusionner pour dégrader leur matériel séquestré. Pour réguler ce processus, la protéine UVRAG (UV irradiation resistance associated Gene protein) associée au complexe PI3K-III/Beclin1 est connue pour réguler l'étape de

maturation de l'autophagie. UVRAG peut aussi stimuler l'activité GTPase de RAB7 conduisant à la fusion des autophagosomes avec des endosomes et/ou lysosomes (Liang *et al.* 2008). On retrouve également de nombreux autres partenaires protéiques qui sont impliqués dans ces événements de fusion avec notamment les protéines ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) et SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein Receptor) (Lorenzo Galluzzi *et al.* 2017). De façon intéressante, il a été montré que certaines protéines connues pour leur rôle dans l'autophagie sélective favorisent l'étape de maturation. Par exemple, le récepteur de l'autophagie NDP52 favorise la maturation en interagissant avec différents membres de la famille ATG8 et avec la protéine Myosin VI (Viret, Rozières, et Faure 2018; Verlhac *et al.* 2015).

LC3-II étant dégradé dans l'autolysosome, il est utilisé pour mesurer le flux autophagique, notamment dans des conditions de blocage de ce flux par des drogues telles que la Bafilomycine A1, la Chloroquine ou un cocktail d'antiprotéases lysosomales (E64d + Pepstatine A) (Klionsky *et al.* 2016).

1.2.A.3 Autophagie non canonique

Il existe également d'autres formes d'autophagie qui ont été décrites pour leur indépendance à des facteurs clés de la macroautophagie. L'autophagie canonique telle que précédemment décrite fait intervenir des facteurs essentiels qui sont critiques à son déroulement tels que ATG5, ATG7, ULK1, Beclin1, ATG3, et la production de PI3P (Codogno, Mehrpour, et Proikas-Cezanne 2012; Ktistakis et Tooze 2016). Les formes d'autophagie dites non canoniques peuvent se dérouler de façon indépendante à l'un de ces facteurs. Par exemple, des réponses autophagiques dépendantes de ATG5, indépendantes de Beclin1 ont été décrites (huang et liu 2016; Niso-Santano *et al.* 2015). Tout comme la réponse autophagique indépendante de ULK1 et dépendante de ATG5 et Beclin1, également appelée phagocytose associée à LC3 (LAP pour LC3-Associated Phagocytosis) (Martinez *et al.* 2016).

La LAP se caractérise par le recrutement de certains facteurs de la machinerie autophagique, notamment LC3, au niveau de phagosomes à simple membrane qui contiennent des pathogènes extracellulaires ou des corps cellulaires qui sont destinés à être dégradés par des lysosomes (Martinez *et al.* 2015; 2016). Plusieurs facteurs autophagiques sont nécessaires à la LAP tels que ATG3, ATG5, ATG7, ATG10, ATG12, ATG16L1, Beclin1, VPS34 et UVRAG.

Cependant, la LAP ne dépend pas de l'activation du complexe ULK1/2 et fait, par ailleurs, intervenir les facteurs Rubicon et NOX2 (NAPDH oxydase 2) (Heckmann et Green 2019). La LAP joue un rôle dans le contrôle des infections par des pathogènes bactériens et fongiques, l'élimination des cellules apoptotiques (processus appelé efferocytose) et l'entose qui est une forme d'ingestion de cellules vivantes dans une vésicule simple membranaire (Martinez 2018; Florey *et al.* 2011). Cependant, puisque les substrats de la LAP sont des entités extracellulaires, la LAP est considérée comme une forme non canonique d'autophagie. Pour plus de détails sur le mécanisme de LAP, se référer à la revue en annexe de ce manuscrit.

Enfin, très récemment, un mécanisme similaire à la LAP mais impliquant l'endocytose, appelé LANDO (LC3-Associated Endocytosis), a été mis en évidence. Dans cette étude, les auteurs montrent que ce processus est un régulateur important de la dégradation des agrégats dans les cellules microgliales de souris dans un modèle de maladie d'Alzheimer (Heckmann *et al*. 2019).

1.2.B Autophagie Sélective

1.2.B.1 Généralités

Pendant de longues années, il était admis que l'autophagie dégradait les composés cytoplasmiques de manière non spécifique en fonction des besoins de la cellule. Il semble d'ailleurs que ce soit le cas dans les cas de carences nutritionnelles même si cette notion est débattue. Cependant, on sait maintenant que l'autophagie peut agir de manière hautement sélective pour dégrader des substrats spécifiques. La CMA, précédemment décrite, est une forme d'autophagie sélective (par la nécessité du motif « KFERQ »). La macroautophagie, ici appelée autophagie, quant à elle, peut également opérer de manière sélective grâce à l'action de protéines adaptatrices appelées « récepteurs autophagiques ». En effet, ces récepteurs interviennent dans la sélectivité des cargos à dégrader. Ils possèdent, d'une part, un domaine d'interaction avec une ou plusieurs protéines de la famille ATG8, appelé domaine LIR (LC3-Interacting Region) qui assure le ciblage à l'autophagosome et, d'autre part, un domaine capable de se lier à un cargo à dégrader (Birgisdottir, Lamark, et Johansen 2013; Khaminets, Behl, et Dikic 2016). Cette autophagie sélective vise à garantir un contrôle de la qualité des éléments du cytoplasme. Elle dégrade donc les éléments défectueux trouvés dans la cellule comme des organelles endommagées, des agrégats protéiques ou même des agents

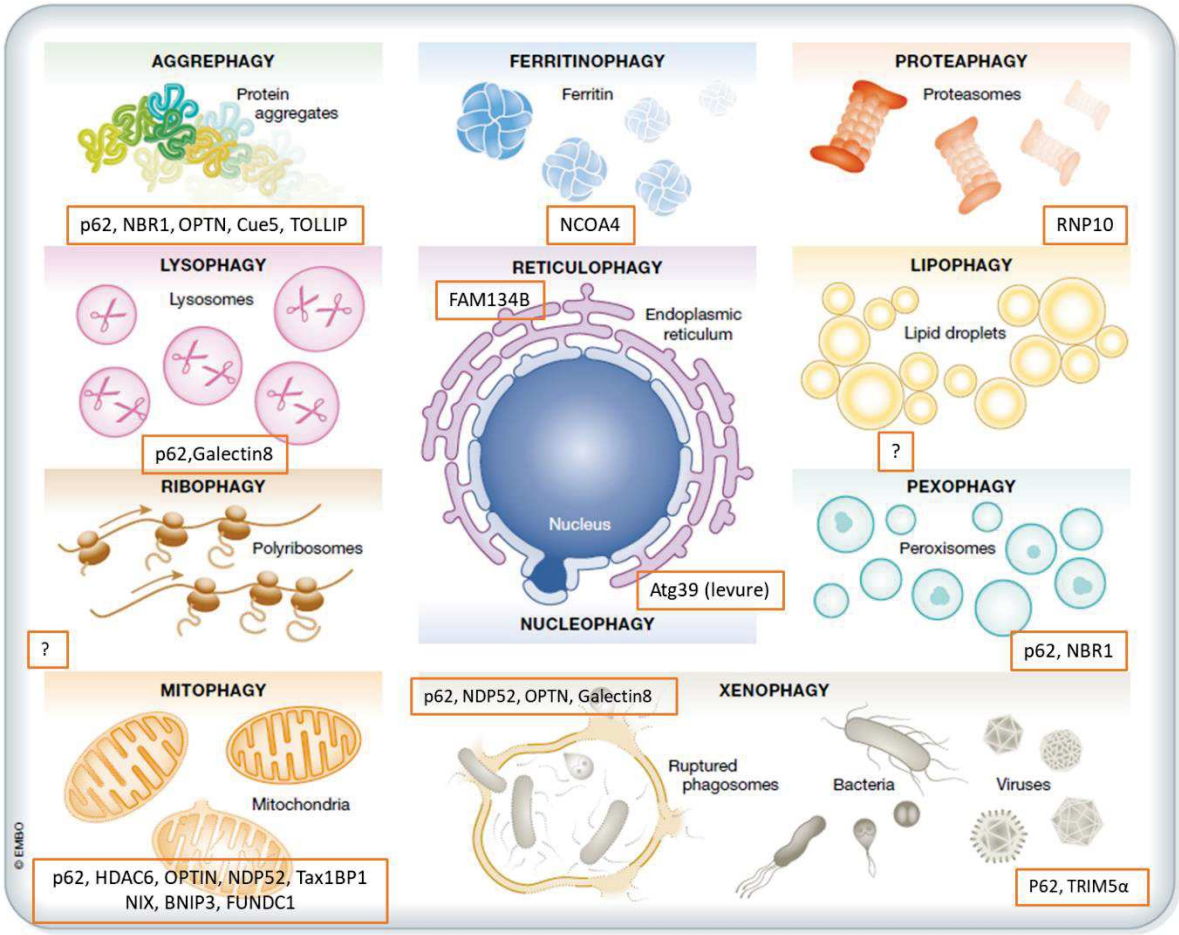


Figure 13 : Différentes formes d'autophagie sélective et les récepteurs impliqués

L'autophagie sélective cible les organelles dysfonctionnelles ou superflues selon les nécessités métaboliques. C'est également une source de matières premières pour les processus métaboliques et les voies de signalisation. Cette illustration présente différents substrats ciblés par autophagie sélective et les récepteurs autophagiques impliqués. L'aggréphagie est la dégradation des agrégats protéiques, la ferritinophagie permet la dégradation des complexes de ferritine, la protéaphagie dégrade les protéasomes défectueux, la lysophagie dégrade les lysosomes, la réticulophagie dégrade certaines portions du RE, la lipophagie dégrade les gouttelettes lipidiques, la ribophagie dégrade des ribosomes, la nucléophagie dégrade des portions du noyau, la pexophagie dégrade les peroxysomes, la mitophagie dégrade les mitochondries. La xénophagie est la dégradation des pathogènes de bactéries ou virus.
Source : Galluzzi et al. 2017, Lahiri et al., 2019 et Khaminets et al. 2016

pathogènes intracellulaires car ils représentent des facteurs nocifs pour l'intégrité de la cellule.

On distingue différents types d'autophagie sélective selon les cargos ciblés et dégradés. Ainsi, par exemple, la dégradation sélective des mitochondries est nommée « mitophagie », celle des agrégats protéiques est nommée « aggréphagie », celle des lysosomes est la « lysophagie », celle des complexes du protéasome la « protéophagie », celle des ribosomes la « ribophagie », celle des gouttelettes lipidiques est la « lipophagie », la dégradation des corps étrangers bactériens ou viraux est nommée « xénophagie » et la dégradation sélective des peroxysomes est appelée « pexophagie » (voir Figure 13) (Lorenzo Galluzzi *et al.* 2017).

1.2.B.2 Récepteurs autophagiques

Le premier récepteur autophagique à avoir été identifié est la protéine p62/SQSTM1 (sequestosome1, ici appelée simplement p62) qui est décrit pour sa capacité à lier les protéines ubiquitinées et son rôle potentiel dans la régulation de la prolifération et différenciation cellulaire (Lee *et al.* 1998). Par la suite, cette protéine sera reconnue comme récepteur autophagique par sa capacité à dégrader des agrégats de protéines ubiquitinés (Bjørkøy *et al.* 2005). Depuis, p62 a également été impliqué dans la dégradation d'autres substrats d'autophagie sélective (comme les mitochondries, les peroxysomes, les bactéries ou les protéines virales) (Johansen et Lamark 2011).

Un récepteur autophagique se définit par sa capacité à se lier aux protéines de la famille ATG8 au travers d'un motif LIR qui est relativement court puisqu'il ne se compose que de 4 acides aminés (WxxL) où s'enchaine un résidu aromatique Tryptophane (W) suivi de deux résidus aléatoires (x) et se termine par un résidu hydrophobe Leucine (L)) (Birgisdottir, Lamark, et Johansen 2013). Ce motif est variable pour autant que les propriétés des résidus aromatiques (W/F/Y) ou hydrophobes (L/I/V) soient conservées pour garder la capacité d'interaction avec LC3 et ses homologues. Une autre caractéristique des récepteurs autophagiques est qu'ils sont destinés à être dégradés avec leurs cargos (Stolz, Ernst, et Dikic 2014). Enfin, de manière générale, les récepteurs autophagiques reconnaissent et se lient à des cargos modifiés par ubiquitination *via* leur domaine UBA (UBiquitin-Associated) comme c'est le cas pour p62, NBR1, OPTN et NDP52. Des activités des récepteurs autophagiques indépendantes de la présence d'ubiquitine ont cependant été documentées (Sagnier *et al.* 2015; Orvedahl *et al.*

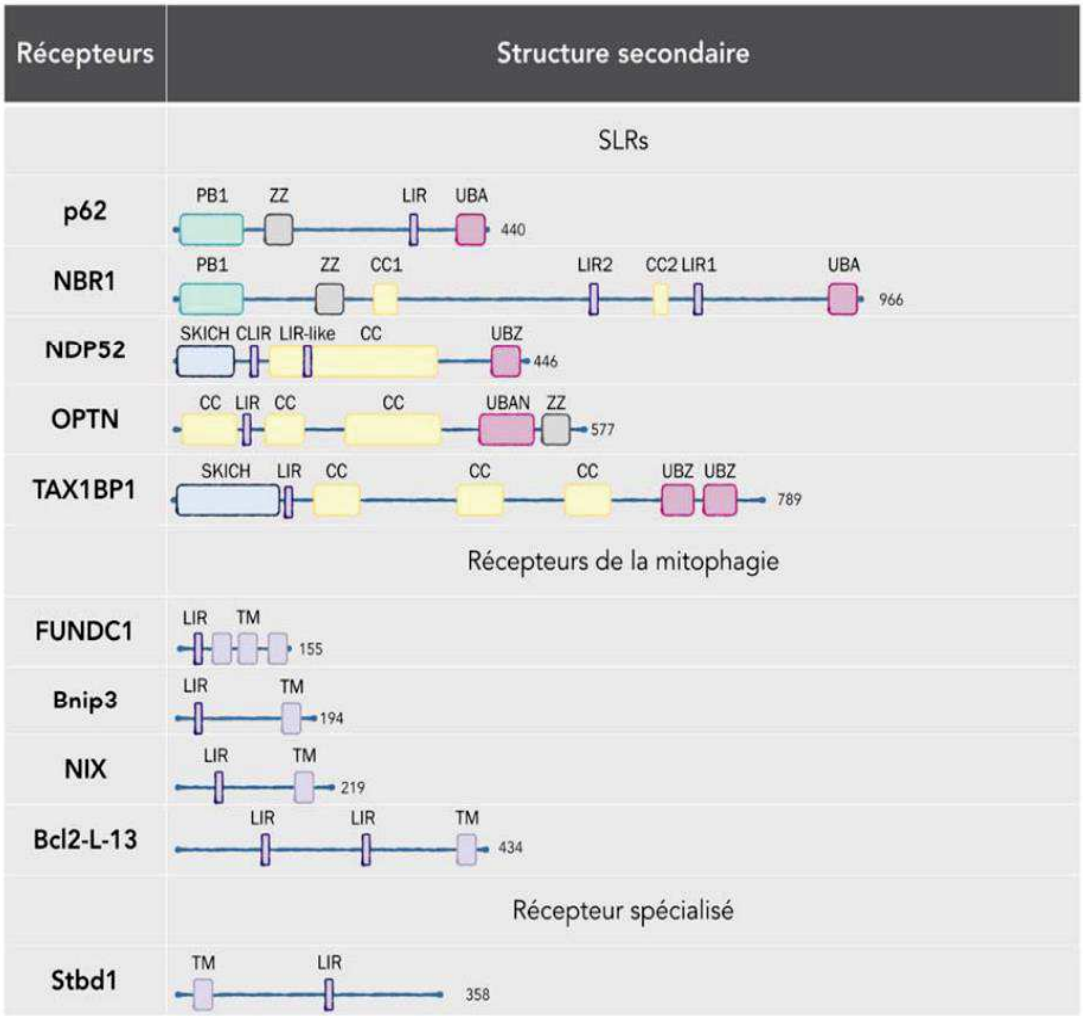


Figure 14 *:* Familles de récepteurs autophagiques

On distingue à ce jour trois différents types de récepteur autophagiques. Les récepteurs autophagiques de la famille Sequestrosome 1-like Receptors SLRs (p62, NBR1, NDP52, Optineurin OPTN et TAX1BP1) possèdent tous un domaine de di-/multi-mérisation, un domaine LIR (LC3-Interacting Region) et un domaine de liaison à l'ubiquitine. Les récepteurs de la mitophagie interagissent directement avec les membranes de leur substrat cible et possèdent un domaine LIR. Le récepteur spécialisé STB1 reconnait spécifiquement son substrat qui est le glycogène.

Source : Daussy, Espert 2016 revue Virologie

2010). D'autres récepteurs de l'autophagie sont connus pour lier leur cargo de manière indépendante de la présence d'ubiquitine comme NIX, BNIP3, FUNDC1, FAM134B (Stolz, Ernst, et Dikic 2014; Khaminets, Behl, et Dikic 2016).

Enfin, des travaux ont permis de montrer que les récepteurs autophagiques peuvent également avoir des actions indépendantes de l'adressage des cargos aux autophagosomes. Ainsi, la protéine NDP52 est capable de réguler positivement les étapes tardives de l'autophagie en régulant la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Verlhac *et al.* 2015).

On distingue, à ce jour, trois types différents de récepteur autophagiques (voir Figure 14) (Daussy et Espert 2016):

- SLR (Sequestosome 1-Like Receptors) :

Les récepteurs autophagiques de cette famille (p62, NBR1, NDP52, Optineurin OPTN et TAX1BP1) partagent des similarités structurales puisqu'ils possèdent tous un domaine de di-/multi-mérisation, un domaine LIR (bien qu'il soit atypique chez NDP52 et TAX1BP1) et un domaine de liaison à l'ubiquitine. Ces domaines sont nécessaires à l'exécution de leur rôle de récepteur autophagique (Birgisdottir, Lamark, et Johansen 2013).

- p62/SQSTM1

Le récepteur autophagique p62 ou sequestosome 1 (SQSTM1) est une protéine de 440 acides aminés constituée d'un domaine PB1 (Phox and BEM1 domain) en partie N-terminale, suivi successivement d'un domaine en doigt de Zinc (ZZ), un domaine LIR, et enfin en partie C-terminale d'un domaine UBA (Ubiquitine-Associated domain). L'oligomérisation de cette protéine p62 s'opère grâce à son domaine PB1 qui lui permet de s'associer soit avec elle-même, soit avec d'autres protéines kinases comme la PKC, MEKK3, MEK5 ou encore NBR1 (Lamark, Svenning, et Johansen 2017). Le domaine UBA de p62 lui assure la liaison à la fois aux chaines de mono- et de poly-ubiquitines (Vadlamudi *et al.* 1996). En particulier, ces domaines agissent de concert pour assurer le rassemblement des substrats ubiquitinés en un agrégat qui sera destiné à une dégradation autophagique (Bjørkøy *et al.* 2005).

- NBR1

Le récepteur autophagique NBR1 est une protéine de 966 acides aminés également constituée d'un domaine PB1 qui lui permet d'être un partenaire d'interaction de p62 (Kirkin, Lamark, Johansen, *et al.* 2009). Elle partage aussi avec p62 son organisation en domaines puisqu'on y retrouve successivement les domaines PB1, ZZ, LIR et UBA. NBR1 dispose également d'autres domaines qui sont conservés évolutivement et qui ne sont pas retrouvés chez p62. Il s'agit des domaines coiled-coil, nécessaires à sa dimérisation, et d'un domaine composé de quatre tryptophanes (W) (FW : Four W). NBR1 est incapable de multimériser *via* son domaine PB1 comme le peut p62. En revanche, elle peut former des hétéro-oligomères, au moyen du domaine PB1, entre NBR1 et p62. On retrouve deux motifs LIR dans la séquence de NBR1 et le domaine UBA est capable de se lier avec les chaines d'ubiquitine K48 et K63 (Kirkin, Lamark, Sou, *et al.* 2009). NBR1 a également un rôle dans la dégradation sélective des peroxysomes par autophagie (pexophagie) (Deosaran *et al.* 2013).

- Récepteurs de la mitophagie :

D'autres récepteurs autophagiques (BNIP3L, BNIP3, Bcl2-L-13, FUNDC1) interagissent directement avec les membranes de leur substrat cible. Lors de la mitophagie, ces récepteurs disposent d'un domaine transmembranaire qu'ils peuvent ancrer dans la membrane de la mitochondrie et un LIR leur assurant le recrutement aux autophagosomes (Wei, Liu, et Chen 2015; Otsu, Murakawa, et Yamaguchi 2015, 2).

- Récepteurs spécialisés :

Stbd1 (starch-binding-domain-containing protein 1), est spécialisé car il reconnait spécifiquement le glycogène dans le cadre de la glycophagie (S. Jiang, Wells, et Roach 2011).

1.2.B.3 Autophagie de précision

La famille des protéines TRIM (TRIpartite Motif) est une large famille de protéines dont 82 gènes ont été identifiés dans le génome humain. Ces protéines ont une structure commune basée sur 3 domaines (domaines RING en N-terminal, suivi d'au moins domaine B box et enfin un domaine coiled coil). Certains des membres de cette famille de protéines disposent d'un domaine LIR qui leur permet de se lier aux protéines de la famille d'ATG8 (Kimura, Mandell,

et Deretic 2016). Les protéines TRIM sont impliquées dans des fonctions cellulaires très diverses telles que la survie ou mort cellulaire, l'état métabolique, la réparation membranaire, l'exocytose synaptique de vésicules, la sénescence, la différenciation des érythrocytes et enfin le contrôle des infections virales bactériennes et fongiques (Hatakeyama 2017).

La famille des protéines TRIM a récemment été identifiée comme médiateur d'un mécanisme d'autophagie sélective appelé « autophagie de précision ». Les TRIM ont un rôle double dans ce processus car ils sont à la fois des régulateurs de l'initiation de l'autophagie et ont également une fonction de récepteurs autophagiques. En effet, ils servent à la fois de plateforme d'assemblage pour la machinerie de l'autophagosome et de récepteur puisqu'ils adressent des substrats à la dégradation. Dans un premier temps, la protéine TRIM va reconnaitre sa cible grâce à une interaction directe protéine-protéine sans nécessiter la présence d'une étiquette spécifique. Ensuite, cette protéine TRIM qui sert alors de récepteur va servir de plateforme d'assemblage pour la formation du phagophore autour du substrat à dégrader (Kimura *et al.* 2016). Cette plateforme s'appelle le « TRIMosome » contenant les protéines autophagiques ULK1, Beclin1, ATG16L1 et TRIM (Mandell *et al.* 2014).

1.2.B.4 Pexophagie

Les peroxysomes sont des organelles à simple membrane contenant une matrice composée de nombreuses enzymes oxydases, produisant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et d'enzymes le catabolisant comme la catalase (Gabaldón 2010). Les peroxysomes sont présents dans tous les types cellulaires à l'exception des spermatozoïdes et des globules rouges. La taille des peroxysomes varie de 0,1 à 1 µm et leur forme est généralement sphérique. Le nombre de ces organelles varie selon le type cellulaire et son environnement (Smith et Aitchison 2013). La fonction des peroxysomes est d'assurer la β-oxydation de lipides à longues chaines d'acides gras qui est un métabolisme produisant du H_2O_2 (Islinger *et al*. 2018). Le métabolisme des lipides a lieu au niveau des peroxysomes et des mitochondries. Les peroxysomes assurent le métabolisme des très longues chaines d'acides gras et des chaines ramifiées en unités plus petites de 8 carbones qui sont destinées à la mitochondrie pour être métabolisées par oxydation et libérer de l'énergie via la chaine de transport d'électrons de cette mitochondrie. Les peroxysomes ont également été identifiés comme des sites importants de « cross-talk » entre différentes voies de signalisation telles que la voie mTOR ou la voie de signalisation ATM

(Ataxia Telangiectasia Mutated) qui participent à maintenir le niveau énergétique cellulaire par activation de l'AMP kinase (Watters *et al.* 1999).

Par cette fonction de métabolisme des lipides, les peroxysomes sont une source importante de production de ROS. Une fonction importante de ces organelles est donc de détoxifier la cellule de ces radicaux à potentiel cytotoxique (Walker *et al.* 2018). Pour cela les peroxysomes disposent de plusieurs enzymes antioxydantes telles que la Catalase, la xanthine oxydase, l'acyl-CoA oxydase, le peroxiredoxines et la gluthatione peroxidase. La Catalase est une enzyme acheminée au peroxysome sous forme de monomère qui s'associe en un homotétramère pour devenir catalytiquement active et procéder à la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau.

Tout comme les mitochondries, les peroxysomes sont des organelles capables d'autoréplication par fission. Cependant à l'inverse des mitochondries, les peroxysomes ne contiennent pas d'ADN. Plus d'une centaine de gènes du génome humain ont été identifiés comme codant pour des protéines de ces organelles. La biogénèse des peroxysomes repose sur le transport cytosolique de protéines disposant d'un signal peptidique d'adressage au peroxysomes (PTS : Peroxysome Targeting Signal) (Ma, Agrawal, et Subramani 2011). L'homéostasie générale des peroxysomes doit pouvoir s'adapter aux nécessités métaboliques de la cellule et ceci est assuré par un équilibre entre leur prolifération, l'élimination des organelles endommagées ou surnuméraires par autophagie par un processus appelé « pexophagie ».

La pexophagie désigne ainsi la dégradation sélective des peroxysomes par autophagie (Zientara-Rytter et Subramani 2016). Les mécanismes moléculaires de ce processus ont été principalement étudiés chez la levure et beaucoup moins chez les mammifères. La pexophagie empêche une accumulation de peroxysomes fonctionnellement compromis et maintient l'équilibre rédox en dégradant les organelles surnuméraires ou endommagés. Ce mécanisme est important car son inhibition est associée au développement de maladies neurodégénératives et au vieillissement prématuré des cellules (Anding et Baehrecke 2017).

Chez les mammifères deux récepteurs autophagiques ont été identifiés pour leur implication dans la pexophagie ; il s'agit de p62 et NBR1 (voir Figure 15) (Yamashita *et al.* 2014; Deosaran *et al.* 2013).

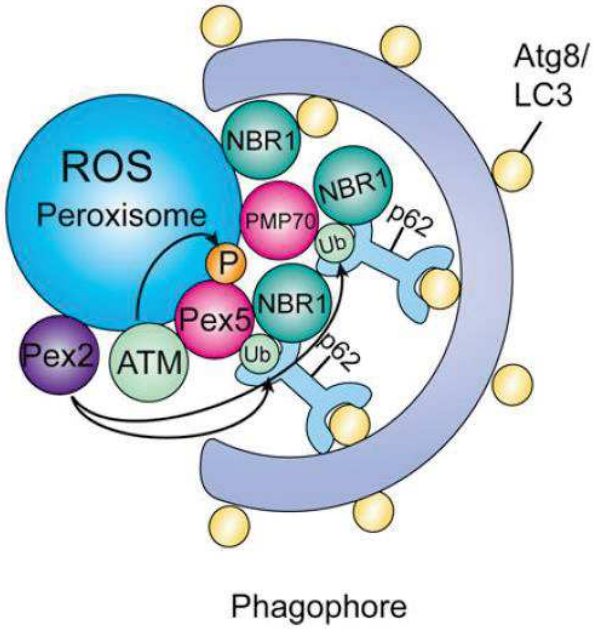


Figure 15 : Pexophagie chez les mammifères

Chez les mammifères, la pexophagie implique les récepteurs autophagiques NBR1 et p62. NBR1 se lie aux peroxysomes grâce à son domaine JUBA qui lui permet de se lier aux phospholipides et à l'ubiquitine. p62 coopère avec NBR1 pour se lier aux protéines ubiquitinées. La kinase ATM active la pexophagie en réponse aux ROS en phosphorylant Pex5 ce qui mène à l'ubiquitination de Pex5 qui peut alors être reconnu par p62 et envoyer les peroxysomes vers la dégradation par pexophagie. PMP70 a également été décrit pour son implication dans la pexophagie. PMP70 et Pex5 sont tous les deux ubiquitinés par Pex2.
Source : Anding et Baehrecke 2017

Les peroxysomes peuvent être ciblés à la pexophagie *via* plusieurs mécanismes :

- En cas de carence nutritionnelle, LC3B peut se lier directement à PEX14, qui est une protéine membranaire spécifique du peroxysome (L. Jiang *et al.* 2015).

- Après ubiquitination de PEX5, p62 et NBR1 transloquent au peroxysome en se liant à l'ubiquitine et recrutent la machinerie autophagique grâce à leur domaine LIR (Deosaran *et al.* 2013). Zhang et ses collaborateurs ont montré que les ROS activent une cascade de signalisation qui va aboutir à la pexophagie, via la protéine kinase ATM. En effet, ATM a la faculté de phosphoryler PEX5, se faisant, elle va induire son ubiquitination et donc sa reconnaissance par les récepteurs de l'autophagie sélective (Jiangwei Zhang *et al.* 2015). En parallèle, ATM va d'ailleurs activer ULK1 et inhiber mTOR pour induire l'autophagie (Walker *et al.* 2018). Néanmoins, PEX5 n'est sans doute pas la seule protéine peroxysomale ubiquitinée et d'autres cibles de la pexophagie doivent encore être recherchées.

- Enfin, des travaux de Peter Kijun Kim *et al.* ont montré que l'utilisation de protéines peroxysomales (PMP34 et Pex3) fusionnées à une mono-ubiquitine était suffisante pour induire de la pexophagie (P. K. Kim *et al.* 2008).

1.2.C Autophagie et mort cellulaire

1.2.C.1 Autophagie en tant que mécanisme de survie cellulaire

L'autophagie est essentielle au maintien de l'homéostasie : elle assure le contrôle qualité de la cellule en éliminant les organelles endommagées ou surnuméraires et permet de maintenir le pool d'acides aminés et la production d'énergie en cas de carences nutritionnelles. En cas de stress, la cellule induit donc l'autophagie pour favoriser sa survie (Rubinstein and Kimchi 2012; Gordy and He 2012).

L'un des mécanismes les mieux décrits, par lequel l'autophagie inhibe l'apoptose, est la mitophagie (Mariño *et al.* 2014). La mitochondrie est au cœur de la signalisation de l'apoptose : elle libère, entre autres, des protéines activatrices des caspases comme le cytochrome c. Les mitochondries endommagées sont particulièrement susceptibles d'activer l'apoptose, mais la mitophagie permet de limiter le phénomène. Ces mitochondries endommagées ont une diminution de leur potentiel membranaire ($\Delta\Psi m$), ce qui est synonyme, soit d'un problème

dans la chaîne respiratoire mitochondriale, soit de la perméabilisation de la membrane interne de la mitochondrie. Ce changement de potentiel induit l'accumulation de PINK1, et l'ubiquitination de certaines protéines présentes à la membrane de la mitochondrie (comme VDAC1, MFN1 et2) par la E3 ligase PARKIN. Les organelles endommagées vont ainsi être ciblées par des récepteurs autophagiques et ciblées aux autophagosomes (Youle and Narendra 2011).

L'autophagie peut aussi empêcher la mort de certaines cellules en dégradant sélectivement certaines protéines pro-apoptotiques afin de réduire leur abondance dans le cytosol, comme la caspase 8 (Hou *et al.* 2010). La dégradation de p62 permet aussi de protéger la cellule de la mort. En effet, p62, quand elle est surexprimée, entraîne la production de ROS qui peut mener à la mort cellulaire (Mathew *et al.* 2009).

1.2.C.2 Autophagie en tant que mécanisme de mort cellulaire

Aux débuts des études sur l'autophagie, les scientifiques avaient observé, en microscopie électronique, que des cellules mourantes pouvaient contenir un grand nombre d'autophagosomes et autolysosomes dans leur cytoplasme (Deter, Baudhuin, et Duve 1967). Ces observations peuvent néanmoins résulter d'une tentative de survie de la cellule. Il est donc nécessaire de différencier la mort « par » autophagie de la mort « avec » autophagie (L Galluzzi *et al.* 2012; Shen et Codogno 2011). Morphologiquement ces cellules diffèrent considérablement des cellules qui disparaissent par apoptose ou nécrose ce qui a mené à la description d'une « mort cellulaire dépendante de l'autophagie » (ADCD autophagy-dependent cell death) également appelée « mort cellulaire de type II » (Kroemer *et al.* 2009; Lorenzo Galluzzi *et al.* 2017). Enfin, plusieurs travaux suggèrent que lorsque l'autophagie est induite massivement, la cellule ne peut faire face à cette dégradation excessive et succombe. Cependant, le degré d'activation du flux autophagique qui est nécessaire pour discriminer une autophagie létale de celle qui sera non-létale pour la cellule nécessite encore d'être étudié (Kriel et Loos 2019).

Du fait des relations étroites entre l'autophagie et l'apoptose, des critères spécifiques ont été mis en place afin de pouvoir discriminer les deux processus de mort cellulaire. Ainsi, pour que l'autophagie soit considérée comme un mécanisme de mort cellulaire régulée, trois critères doivent être respectés (Shen et Codogno 2011): (I) La mort cellulaire doit s'exécuter sans

l'activation de la machinerie d'apoptose, ce qui signifie que les caspases ne doivent pas être activées. (II) Il y a une induction du flux autophagique dans les cellules mourantes. (III) L'inhibition d'autophagie par des moyens pharmacologiques doit pouvoir permettre à la cellule d'échapper à sa disparition.

La mort cellulaire par autophagie a été documentée dans plusieurs travaux. Seuls certains d'entre eux sont cités ici :

- Le blocage de l'apoptose par une drogue inhibitrice de caspases (z-VAD). En effet, le traitement des cellules avec cette drogue a pour conséquence directe une accumulation de ROS. Cette accumulation est causée par l'activation d'autophagie sélective de l'enzyme antioxydante Catalase. La disparition de cette protéine antioxydante au sein de la cellule conduit celle-ci à sa mort par ADCD (Yu *et al.* 2006).
- Une autre forme de mort cellulaire dépendante de l'autophagie a également été décrite pour sa dépendance aux niveaux pompes cellulaires Na^+, K^+-ATPase et appelée « autose » (Y. Liu *et al*. 2013). En plus des critères morphologiques de mort cellulaire autophagique classiquement observés (augmentation du nombre d'autophagosomes et manque des caractéristiques d'apoptose et nécrose), l'autose s'accompagne d'une dilatation du RE et de changements nucléaires caractéristiques (diminution de la membrane nucléaire).
- Enfin, la mort cellulaire par autophagie a été impliquée dans le développement des organismes *Dictyostelium discoideum* et *Drosophila melanogaster*. *Dictyostelium discoideum* est une amibe ne possédant pas de machinerie apoptotique (Lam *et al.* 2007, 2). Dans ce modèle, l'autophagie peut mener à un mécanisme de mort cellulaire lorsque les signaux d'activation de l'AMPc et de DIF-1 (Différenciation Inducing Factor-1) sont présents (Kosta *et al.* 2004; Luciani *et al.* 2009). Chez *Drosophila melanogaster*, lors du développement de cet organisme, la suppression de l'intestin moyen est davantage dépendante de la machinerie autophagique que de celle de l'apoptose (Denton *et al.* 2009). La fonction de mort cellulaire par autophagie a également été observée chez cet organisme dans le développement d'autres tissus tel que la disparition des glandes salivaires qui nécessitent l'activation de caspases comme cofacteur (Berry et Baehrecke 2007; Martin et Baehrecke 2004). Enfin, chez les mammifères, le développement de l'involution des glandes mammaires dépend de la

mort cellulaire par autophagie (Holst, Hurley, et Nelson 1987). Ces exemples reflètent donc le rôle de la mort cellulaire par autophagie dans le développement de divers organismes (Shen et Codogno 2011).

1.2.C.3 Liens autophagie et apoptose

L'autophagie et l'apoptose sont des processus étroitement liés. L'autophagie peut être rapidement induite lors de carences nutritionnelles ou stress cellulaires rapides pour rétablir l'homéostasie énergétique de la cellule. Lors de conditions de stress prolongé, la machinerie apoptotique est activée ce qui consomme l'énergie (ATP) libérée par induction d'autophagie initiale (Loos *et al.* 2013).

Le facteur de transcription p53 est connu pour son rôle dans la mort cellulaire programmée car il est activé en cas de dommage à l'ADN ou hypoxie. Il induit alors l'apoptose en favorisant la transcription de facteurs pro-apoptotiques. La facteur p53 peut également inhiber l'autophagie (Tasdemir *et a*l. 2008). En conditions basales, p53 est situé au niveau du cytosol où il exerce un effet inhibiteur sur FIP200 ce qui empêche le complexe d'initiation de l'autophagie de se former (Morselli *et al.* 2011). En cas de stress excessif en revanche, p53 est ciblé dans le noyau où il permet l'expression de facteur pro-autophagiques comme AMPK, DRAM1 (damage-regulated autophagy modulator 1), Sestrin 1 et Sestrin2 qui vont favoriser la survie cellulaire (Crighton *et al.* 2006; Budanov et Karin 2008).

En plus de p53, plusieurs facteurs sont connus pour stimuler à la fois l'autophagie et l'apoptose, tels que DAPK (death-associated protein kinase), JNK (JUN N-terminal Kinase), BAD (Bcl-2 Agonist of cell Death), BID (BH3-Interacting domain Death agonist), NIX (NIP3-like protein X), NOXA et PUMA (Kriel et Loos 2019). Bien que les protéines BH3-only soient généralement considérées comme des médiateurs de l'apoptose, elles sont également capables de prévenir l'interaction de Bcl-2 et Beclin1. En effet, l'interaction de ces protéines a un effet précédemment décrit inhibiteur de l'autophagie. Comme Beclin1 possède un domaine d'interaction BH3, il peut s'associer avec les protéines Bcl-2 et Bcl-XL qui sont anti-apoptotiques, ou activer les protéines BAX et BAD qui sont pro-apoptotiques. Beclin1 peut donc avoir un effet régulateur de l'apoptose (Galonek et Hardwick 2006). Les interactions de Beclin1 et Bcl2 peuvent notamment être ciblée par le facteur DAPK qui est un suppresseur de

tumeur capable de contrôler l'apoptose et l'autophagie à travers la phosphorylation de Beclin1 suite à différents signaux de stress dont celui du RE (Zalckvar *et al.* 2009).

Au cours de l'apoptose, les caspase activées peuvent cliver leurs substrats, parmi lesquels Beclin1. Cela a pour conséquence de perturber et d'empêcher les fonctions de Beclin1 dans la machinerie moléculaire de l'autophagie. Le fragment de Beclin1 ainsi généré transloque à la mitochondrie où il va favoriser la libération de facteurs pro-apoptotiques (Wirawan *et al*. 2010). Plusieurs autres ATGs (ATG5, ATG4, PI3K) sont aussi la cible des caspases (Betin et Lane 2009; Yousefi *et al.* 2006).

1.2.D Autophagie et Stress oxydatif

Tel que précédemment mentionné, les ROS sont des petites molécules essentielles aux voies de signalisation cellulaire. Il existe des liens étroits entre les ROS et l'autophagie (Scherz-Shouval et Elazar 2007). En effet, la production de ROS par les mitochondries ou via l'activation de la NADPH oxydase (NOX), peut induire l'autophagie et son rôle sera de diminuer le stress oxydatif.

Voici quelques exemples, non exhaustifs, de différents liens décrits entre les ROS et l'autophagie :

- **Facteurs de transcription :** Certains facteurs de transcription, tels que Nrf2 et FOXO3a, sont impliqués dans la régulation du stress oxydatif et de l'autophagie (Filomeni, De Zio, et Cecconi 2015; Poillet-Perez *et al*. 2015; Scherz-Shouval et Elazar 2011). Plusieurs voies de signalisation régulant cette interconnexion ont été mises en évidence. FOXO3a (Forkhead class O) et Nrf2 (Nuclear Factor erythroid 2-Related factor 2), facteurs de transcription régulés en réponse aux ROS (Klotz *et al.* 2015; Niture, Khatri, et Jaiswal 2014), induisent la transcription de plusieurs ATGs essentiels au processus autophagique (Lulu Li *et al*. 2015). Une des voies les mieux décrites dans ce contexte est la voie « KEAP1/Nrf2 ». Dans ce cas, le récepteur autophagique p62 peut adresser des substrats oxydés à la dégradation autophagique (Jain *et al.* 2010). L'expression de ce récepteur est notamment la cible du facteur de transcription Nrf2. En conditions normales, Nrf2 est séquestré dans le cytoplasme par le complexe Cul3-Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) et dégradé par le protéasome (voir Figure 16) (Bellezza

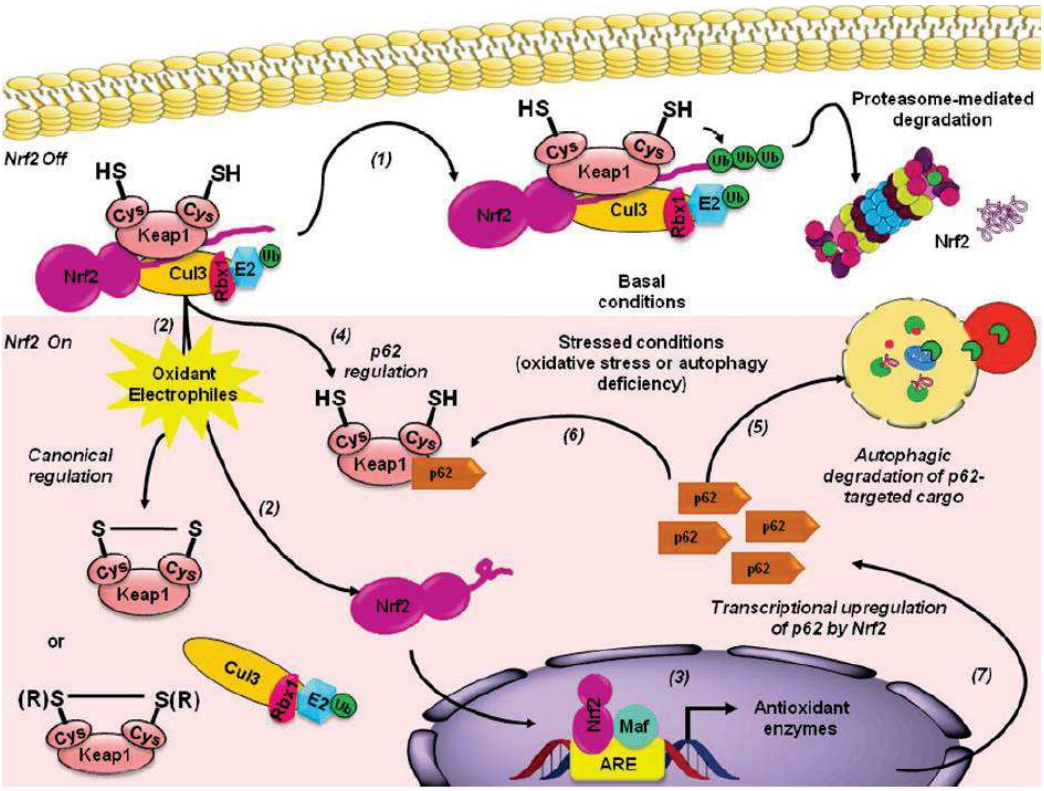


Figure 16 : Régulation transcriptionnelle des défenses antioxydantes par l'autophagie et le système du protéasome.

En condition basale (fond blanc), le facteur Nrf2 est inhibé et Keap1 sous sa forme réduite fonctionne comme E3 ubiquitine ligase procédant à l'ubiquitination du facteur Nrf2, le destinant à une dégradation par le protéasome. Par conséquent, les niveaux constitutifs de Nrf2 sont bas. Dans des conditions de stress (fond rose), Keap1 est oxydé, libérant Nrf2 qui peut ensuite être transloqué dans le noyau. Le facteur Nrf2 s'associe avec des facteurs de transcription pour permettre la transcription des gènes de protéines antioxydantes contenant dans leur promoteur une séquence ARE. En condition de stress oxydatif qui mène à une déficience d'autophagie, p62 s'accumule dans le cytoplasme et interagit avec Keap1 ce qui inhibe son interaction avec Nrf2 et permet à ce dernier de procéder à la transcription des gènes cibles.
Source : Navarro-Yepes et al. 2014

et al. 2018). Lors d'un stress oxydatif, Keap1 est oxydé causant l'inhibition de l'ubiquitination de Nrf2 et permettant sa translocation au niveau du noyau (voir Figure 16). Nrf2 se fixe sur les éléments de réponse antioxydante (ARE) et active la transcription des gènes antioxydants ainsi que l'expression de p62 (Jain *et al.* 2010; Komatsu *et al.* 2010). Le récepteur autophagique p62, peut également se lier au complexe Keap1 pour induire sa dégradation, libérant ainsi Nrf2, ce qui résulte en un effet rétro-positif sur l'activation de l'autophagie (Komatsu *et al.* 2010; Navarro-Yepes *et al*. 2014).

- **Voies de signalisation :** Les ROS activent de nombreuses voies de signalisation qui peuvent aboutir à l'induction d'autophagie. Par exemple, ces radicaux libres sont connus pour activer la MAPKinase JNK. Cette kinase est connue pour dissocier le complexe Beclin1/Bcl-2 en phosphorylant Beclin1. La dissociation de ce complexe va aboutir à l'induction d'autophagie (Deng *et al.* 2018; Z. Zhu *et al.* 2018). Les ROS peuvent également induire l'autophagie *via* l'inhibition de mTOR par l'AMPK (AMP-activated protein Kinase) (Song *et al*. 2018; S.-B. Wu *et al.* 2014).
- **Oxydation d'ATG4 :** Le H_2O_2 peut modifier les protéines contenant des groupements thiols tels que ceux contenants des cystéines, comme c'est le cas pour la protéine ATG4, protéase essentielle de l'autophagie (Scherz-Shouval *et al.* 2007). Ainsi, les ROS jouent un rôle majeur dans la régulation du processus autophagique.
- **Dégradation des protéines oxydées :** Lorsque les ROS s'accumulent davantage, la cellule fait face à un stress oxydatif qui peut engendrer l'oxydation irréversible de certaines protéines, lipides ou de l'ADN. Les protéines oxydées sont éliminées par le protéasome ou par autophagie (S. Kaushik et Cuervo 2006; Navarro-Yepes *et al.* 2014).
- **Mitophagie :** Les ROS produits par un dysfonctionnement des mitochondries sont essentiels pour l'induction de mitophagie (dégradation sélective des mitochondries) par deux voies majeures :

- Voie PINK1/Parkin : en cas de perte du potentiel membranaire de la mitochondrie, la facteur Parkin (E3 ligase) est recruté au niveau de la mitochondrie par la protéine PINK1 (PTEN-induced kinase 1) (D. Narendra *et al*. 2008; Matsuda *et al*. 2010). Parkin ubiquitine la VDAC1 mitochondriale (Voltage-dependent channel 1) qui sera alors reconnue par p62, conduisant la mitochondrie endommagée à la dégradation par autophagie (Geisler *et al.* 2010; D. P. Narendra *et al.* 2010).

- Voie NIX/Bnip3L : NIX/Bnip3L (Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3, long form) possède un domaine BH3 atypique et un domaine LIR assurant son interaction avec les protéines GABARAPL1 et LC3A (Ji Zhang et Ney 2009; Novak *et al*. 2010). NIX/Bnip3L assure une fonction de récepteur autophagique pour la dégradation sélective des mitochondries (Schweers *et al.* 2007).

➢ **Conséquences en physiopathologie :** Plusieurs pathologies ont été associées avec une accumulation de ROS et une autophagie défectueuse. Par exemple, l'accumulation de protéines oxydées mène à l'agrégation de ces protéines ce qui, en absence d'autophagie, permet le développement de maladie neurodégénérative (Yue *et al.* 2009). De plus, dans des cellules cancéreuses, l'accumulation de ROS suite à une hypoxie active l'autophagie entrainant la dégradation des mitochondries (car productrices de ROS), et favorisant la survie de la cellule tumorale (Rouschop et Wouters 2009).

1.3 Autophagie et VIH-1

L'autophagie est largement impliquée dans les processus de réponse immunitaire innée et adaptative. En effet, ce processus est reconnu comme un mécanisme majeur de la réponse immunitaire intrinsèque. Ainsi, les microbes intracellulaires peuvent être capturés par les récepteurs autophagiques pour être dégradés par la voie lysosomale (Deretic, Saitoh, et Akira 2013). On parle alors de xénophagie. L'autophagie combat les infections virales par plusieurs mécanismes : (I) la dégradation de composés viraux intra-cytoplasmiques (processus appelé virophagie) ; (II) l'activation du système immunitaire inné au travers des récepteurs endosomaux TLR (toll-like receptors) qui peuvent détecter la présence d'acides nucléiques viraux ; (III) l'activation de l'immunité adaptative au travers de la présentation d'antigènes viraux endogènes par le complexe MHC de classe I et II ; (IV) la régulation de l'activation du système immunitaire inné par le contrôle de la qualité des mitochondries et de la production de ROS ; (V) la promotion de la survie de la cellule (Dong et Levine 2013). L'autophagie joue également un rôle majeur dans l'immunité adaptative en régulant la survie et la fonction des cellules B et T (Deretic, Saitoh, et Akira 2013). Par exemple, la prolifération des cellules T après stimulation par un antigène requiert l'autophagie pour neutraliser les voies de mort cellulaire (Walsh et Bell 2010). De plus, l'autophagie permet la présentation d'antigènes intracellulaires

par le MHC de classe II et stimule la présentation d'antigènes extracellulaires par le MHC de classe I (Münz 2016).

De par son rôle dans la réponse immunitaire, les agents pathogènes ont développé des stratégies, au travers de leur évolution, afin de bloquer l'autophagie ou de l'utiliser à leur propre profit (Vergne *et al.* 2017).

L'autophagie a un rôle complexe dans l'infection par le VIH-1 car il dépend à la fois du type cellulaire ciblé par le virus et du statut infectieux de la cellule (cellules productivement infectées *vs* cellules voisines d'une cellule infectée) (Daussy et Espert 2016; Kyei *et al.* 2009; Blanchet *et al.* 2010; Denizot *et al.* 2008; Espert *et al.* 2006; Sagnier *et al.* 2015; Borel *et al.* 2015; Papin *et al.* 2014).

1.3.A.1 Lymphocytes T CD4

1.3.A.2. Lymphocytes T CD4 non infectés

Le VIH-1 infecte principalement les cellules du système immunitaire présentant le récepteur CD4 et les corécepteurs CXCR4 et/ou CCR5 à leur surface. Parmi ces cellules, les LT CD4 sont les cibles majeures de l'infection puisque le virus s'y réplique efficacement et induit leur forte déplétion par apoptose. Comme mentionné précédemment, la majeure partie des LT CD4 qui disparaissent au cours de l'infection ne sont pas infectés de manière productive mais sont les LT CD4 voisins des cellules infectées, mettant en évidence un effet appelé « bystander ».(Alimonti 2003; Finkel *et al*. 1995; Gougeon 2005; Varbanov, Espert, et Biard-Piechaczyk 2006).

Notre équipe, ainsi que d'autres, a montré que les glycoprotéines de l'enveloppe virale (Env) possèdent un rôle majeur dans la disparition des lymphocytes T CD4 non infectés. En effet, des LT CD4 infectés, qui expriment Env à leur surface, sont capables d'induire la mort par apoptose des LT CD4 non infectés après l'interaction de Env avec ses récepteurs (CD4 et CXCR4 ou CCR5). En recherchant les mécanismes, induits par Env, responsables de cette apoptose, mon équipe a montré que l'autophagie était nécessaire à son déclenchement (voir Figure 18). En effet, le blocage de l'autophagie par utilisation de drogues comme la 3-MA, qui bloque les phases d'initiation de l'autophagie, ou Bafilomycine A1 (BafA1), qui bloque les étapes de maturation du processus, suffit à abolir l'induction d'apoptose par Env dans les cellules

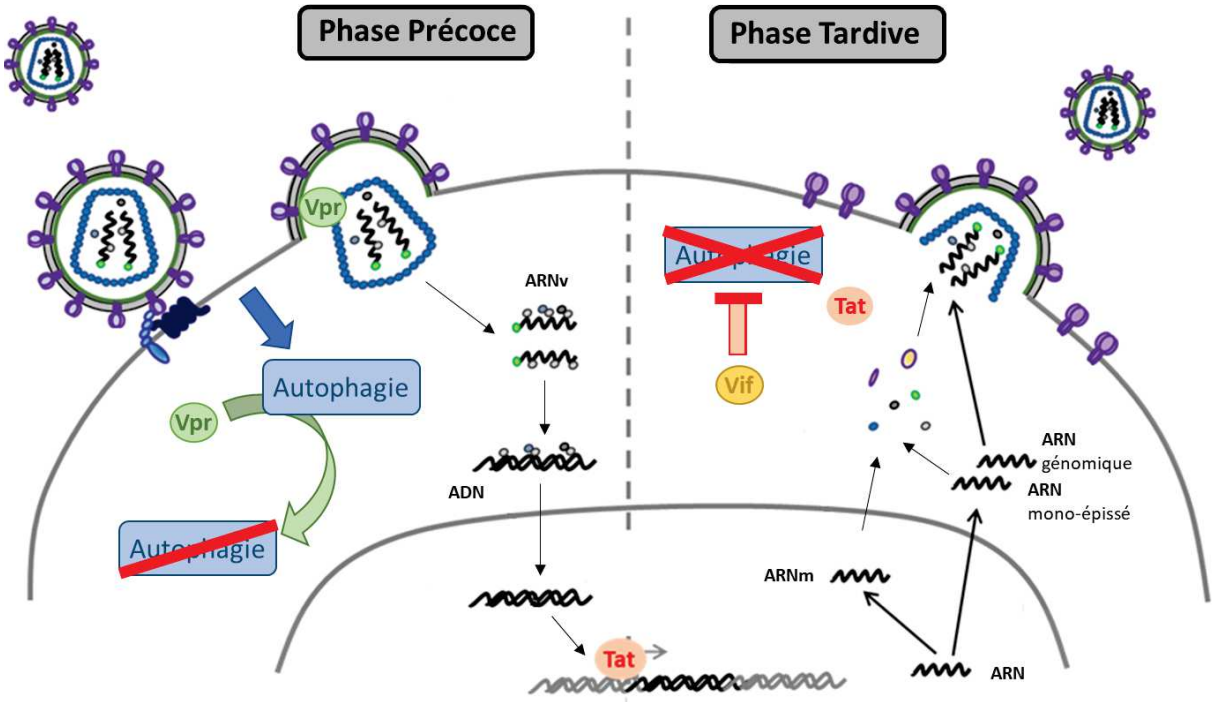


Figure 17 : Modèle des interactions entre le VIH-1 et l'autophagie dans les LT CD4.

L'autophagie est induite rapidement par Env à l'entrée du virus. Puis, cette autophagie est contrôlée par Vpr dans la phase précoce du cycle de réplication viral, pour être complètement inhibée par la protéine Vif néosynthétisée dans la phase tardive. Cette inhibition d'autophagie permettrait d'éviter la dégradation de Tat, protéine essentielle au cycle de réplication viral.

bystanders. Ce résultat a été confirmé par ARN interférence, en utilisant des siRNAs dirigés contre Beclin1, ATG7 ou ATG5 (Espert *et al.* 2006). Par la suite, le rôle des deux glycoprotéines de l'enveloppe virale, gp120 et gp41, et de la signalisation cellulaire induite par leurs interactions avec les récepteurs du VIH-1 (CD4 et CXCR4) a permis de montrer que c'est l'activité fusogénique de la gp41 qui est responsable de l'induction d'autophagie dans ce modèle. En effet, la simple mutation du second acide aminé du peptide de fusion de la gp41 (Mutation Val->Glu), suffit à abolir l'induction de l'autophagie et, par conséquent, de l'apoptose dans les LT CD4 non infectés (voir Figure17) (Denizot *et al.* 2008). Ce résultat indique que le processus observé est indépendant du tropisme de l'enveloppe virale (R5 ou X4). Une étude protéomique réalisée en parallèle a permis également de mettre en évidence un stress oxydatif induit par Env, caractérisé par une accumulation de ROS, au sein des cellules cibles T CD4 non infectées (Molina *et al.* 2007).

La recherche des relations entre le stress oxydatif et l'autophagie induits par Env dans les cellules T CD4 bystanders, et leur rôle dans l'apoptose de ces cellules, a constitué la base de mon projet de thèse.

1.3.A.1. Lymphocytes T CD4 Infectés

À la suite de la découverte de l'implication de l'autophagie dans les LT CD4 bystanders, mon équipe s'est intéressée au rôle de ce processus dans les cellules T CD4 productivement infectés par le VIH-1. Elle ainsi pu montrer que l'autophagie est induite par Env dans les LT CD4 lors de l'étape d'entrée du virus. Cependant, cette autophagie apparaît rapidement contrôlée dans les phases précoces du cycle de réplication et elle est complètement inhibée dans les phases tardives (Espert et Biard-Piechaczyk 2009; Espert *et al*. 2009; Zhou et Spector 2008; Sagnier *et al*. 2015). La recherche des facteurs viraux capables de contrôler l'autophagie dans ce modèle nous ont permis de mettre en évidence un rôle de Vpr dans les phases précoces du cycle de réplication viral. En effet, Vpr induit une diminution de la transcription des gènes ATGs, en permettant la dégradation du facteur de transcription FOXO3a par le protéasome (Manuscrit soumis, voir page 110). Dans les phases tardives du cycle de réplication du VIH-1, l'autophagie est complètement inhibée par l'action de la protéine virale Vif qui interagit avec LC3 (Borel *et al*. 2015). Le VIH-1, comme d'autres virus, a ainsi développé des stratégies pour éviter ce processus d'immunité intrinsèque. En effet, si l'autophagie n'était pas bloquée par Vpr, puis par Vif, elle serait capable de dégrader sélectivement le transactivateur viral Tat, protéine

essentielle à son cycle de réplication (voir Figure 17). La dégradation de Tat par autophagie fait intervenir le récepteur autophagique p62 mais ne requiert pas l'ubiquitination de Tat (Sagnier *et al.* 2015).

Un niveau de complexité supplémentaire a été mis en évidence par notre équipe, ainsi que par d'autres équipes. En effet, l'autophagie induite par Env à l'entrée du virus, bien qu'elle soit rapidement contrôlée, semble promouvoir la réplication virale. Ainsi, des travaux montrent que plusieurs protéines majeures de l'autophagie seraient nécessaires à l'infection par le VIH-1. En effet, l'utilisation de shRNA dirigés contre certains ATGs diminue la réplication du VIH-1 (Brass *et al.* 2008; Eekels *et al*. 2012).

Enfin, des mécanismes d'autophagie non canonique semblent également contribuer à l'infection par le VIH-1. En particulier, un mécanisme similaire au processus de LAP a été mis en évidence comme étant impliqué dans la levée de restriction, imposée par Bst2/Tetherin, par la protéine virale Vpu (Madjo *et al.* 2016).

Peu de travaux ont été effectués sur le rôle de l'autophagie au cours de l'infection par le VIH-1 au niveau clinique. Cependant, les résultats tendent à indiquer que l'autophagie serait plutôt favorable aux patients. En effet, une augmentation du niveau d'autophagie a été observée dans les cellules immunitaires du sang périphérique (PBMCs) issues de patients asymptomatiques depuis plus de 10 ans (Long Term Non progressors) ou chez des patients qui contrôlent leur virémie en dessous des limites de détection (Elite Controllers) (Nardacci *et al*. 2014). Par ailleurs, la réponse à un stimulus autophagique des cellules T CD4 d'individus infectés par le VIH-1 sous traitement antirétroviral efficace est statistiquement plus faible que celle des cellules T CD4 de sujets non infectés. Ce défaut dans les capacités d'induction de l'autophagie est encore plus prononcé dans les LT CD4 de patients « immunodiscordants », qui ont une charge virale indétectable sous traitement mais dont le nombre de LT CD4 reste très faible, suggérant que l'autophagie contrôle, au moins en partie, la réponse immunologique (Gómez-Mora *et al*. 2017).

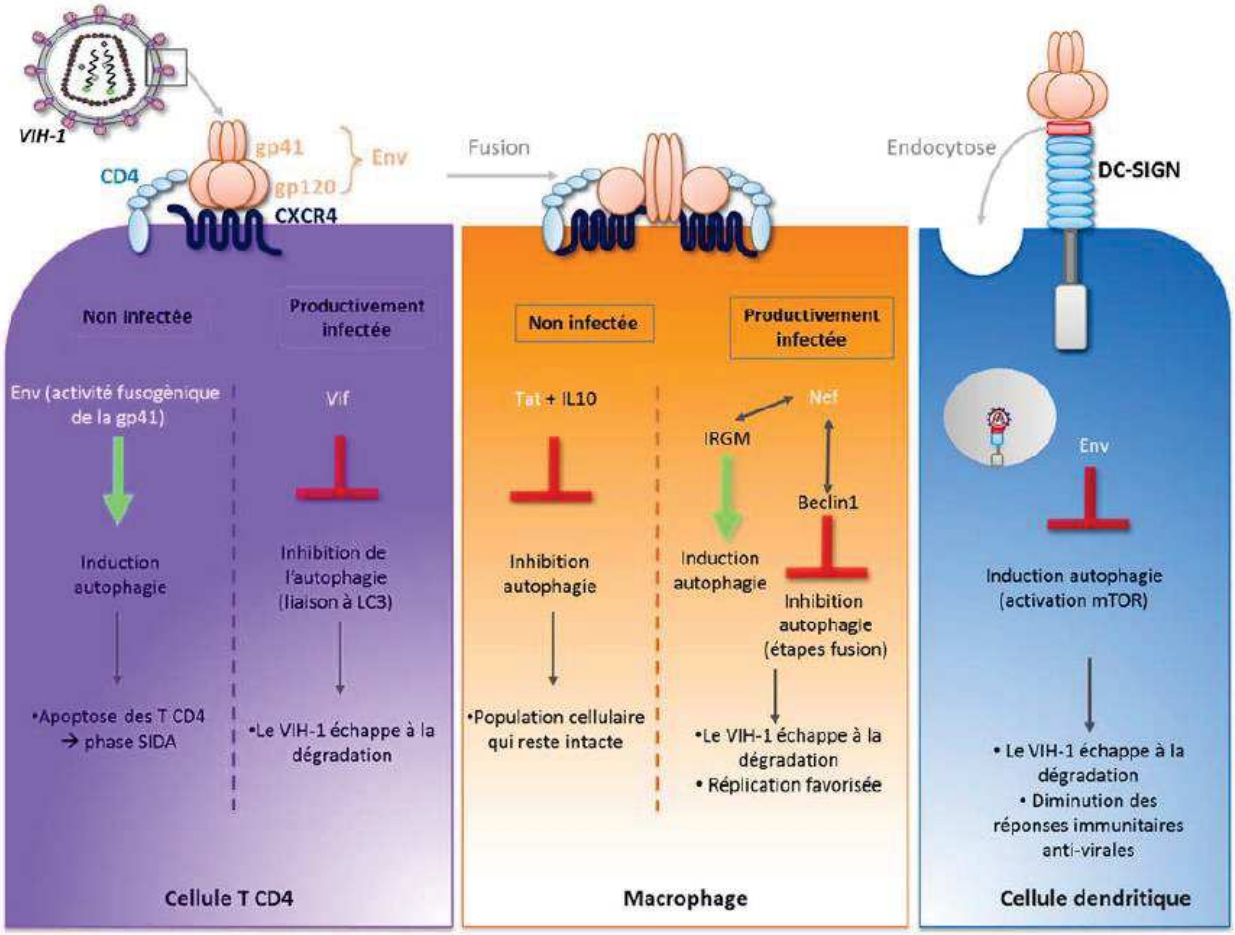


Figure 18 : Relations entre le VIH et l'autophagie selon le type cellulaire ciblé ; lymphocytes T CD4, macrophage ou cellule dendritique.

L'autophagie est induite par l'activité fusogénique de la gp41 de Env dans les cellules T CD4 non infectées, ce qui résulte en la mort de ces cellules par apoptose. La mort des cellules T CD4 bystander participe à la progression des patients vers la phase SIDA. Dans les cellules lymphocytaires T CD4 productivement infectées, l'autophagie est inhibée par la protéine virale Vif permettant au virus d'échapper à la dégradation cellulaire. Dans les cellules macrophages non infectées, la protéine virale Tat et la production de cytokine IL10 participent à l'inhibition d'autophagie visant à diminuer la présentation de MHC-II et préserver la population cellulaire. Au sein des cellules macrophagiques productivement infectées, la protéine virale Nef induit l'autophagie par interaction avec la protéine IRGM et inhibe ses étapes dégradatives par interaction avec la protéine Beclin1 afin de favoriser le cycle réplicatif viral en évitant sa dégradation. Dans les cellules dendritiques, l'autophagie est inhibée par Env qui active la voie de signalisation Akt/mTOR. Cette inhibition d'autophagie par le VIH-1 participe à diminuer la réponse immunitaire antivirale.

Source : Daussy et Espert 2016

1.3.A.2 Autres types cellulaires cibles du VIH-1

1.3.B.1. Macrophages

Les macrophages sont des cibles du VIH-1 qui se comportent différemment concernant la réponse autophagique à l'infection. En effet, à la différence des cellules T CD4 bystanders, le contact avec des cellules infectées, exprimant Env à leur surface, n'induit pas d'autophagie, ni d'apoptose, dans les macrophages bystanders, que ce soient des enveloppes virales à tropisme X4 ou R5 (Espert *et al.* 2009). Par ailleurs, il a été montré que la protéine virale Tat, connue pour être sécrétée par les cellules infectées, a la capacité d'inhiber l'autophagie dans les macrophages bystanders en agissant sur les voies de signalisation Scr-Akt et STAT3 et via l'induction d'une forte production d'IL-10 (voir Figure 18) (Van Grol *et al.* 2010).

Dans les macrophages productivement infectées par le VIH-1, on observe une manipulation fine de l'autophagie par le virus, en particulier par sa protéine virale Nef, pour favoriser sa réplication. En effet, l'étape d'initiation de l'autophagie est activée par l'interaction de Nef avec la protéine IRGM (immunity-associated GTPase family) (Grégoire *et al.* 2011). Ainsi, on observe de nombreuses vacuoles autophagiques dans les macrophages infectés par le VIH-1. Cette accumulation est due à la fois à l'activation des étapes d'initiation mais aussi au blocage des étapes de maturation de l'autophagie. Ce blocage est également effectué par Nef qui agit en interagissant avec Beclin1 au sein du complexe PI3K III/Beclin1/UVRAG. L'accumulation des autophagosomes favorise la réplication virale (Kyei *et al*. 2009). L'interaction entre Nef et Beclin1 est également responsable de la séquestration du facteur de transcription TFEB, entrainant une inhibition de la transcription de gènes ATGs, ajoutant un niveau de régulation transcriptionnel (Campbell *et al.* 2015). Cependant, il est important de noter que l'autophagie reste un mécanisme anti-VIH dans ces cellules puisqu'une induction d'autophagie par des drogues (Torin 1 ou Rapamycin) conduit à une baisse de production virale (Espert *et al.* 2009).

1.3.B.2. Cellules Dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont une population de cellules myéloïdes se situant à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Lors de l'infection par le VIH-1, ces cellules sont impliquées dans la transmission du virus aux LT CD4. Les DCs peuvent internaliser le VIH-1 grâce à différents récepteurs présents à leur surface, comme DC-SIGN. Dans ce cas, l'autophagie est rapidement inhibée par le virus, et plus précisément par Env, qui

active la voie de signalisation Akt/mTOR (Blanchet *et al.* 2010). En bloquant l'autophagie, le virus échappe à la dégradation et limite la réponse immunitaire (voir Figure 18).

1.3.B.3. Cellules du système nerveux central

La barrière hémato-encéphalique protège le système nerveux central (SNC) et représente donc un lieu où persister à l'abri de la réponse immunitaire pour le virus lorsqu'il parvient à la franchir. Le VIH-1 peut accéder au SNC rapidement après l'infection initiale grâce aux macrophages ou des cellules de la microglie. Une fois au niveau du SNC, le virus pourra se répliquer au sein de ces types cellulaires mais également au sein de certaines cellules neuronales. Ce processus engendre des déficits en cellules neuronales et est associé au développement de symptômes de l'infection par le VIH-1 appelé HAND (HIV-Associated Neurocognitive Disorders) (Carroll et Brew 2017; Eggers *et al.* 2017). L'apparition de HAND chez les patients infectés est associée à une espérance de vie diminuée. Dans les cellules neuronales, l'autophagie est particulièrement impliquée dans l'élimination des agrégats protéiques et organelles endommagées qui s'accumulent lors du vieillissement de la cellule. Dans ce contexte, une accumulation d'autophagosomes a été observée dans le cerveau des patients séropositifs post-mortem (Zhou, Masliah, et Spector 2011), mais le mécanisme par lequel l'autophagie est altérée n'a pas encore été totalement élucidé. L'autophagie est un mécanisme particulièrement impliqué dans le vieillissement, et son altération conduit à un vieillissement accéléré du cerveau chez les patients infectés ce qui représente un facteur de risque supplémentaire de développer une maladie neurodégénérative (Fields *et al.* 2013).

Objectifs de la thèse

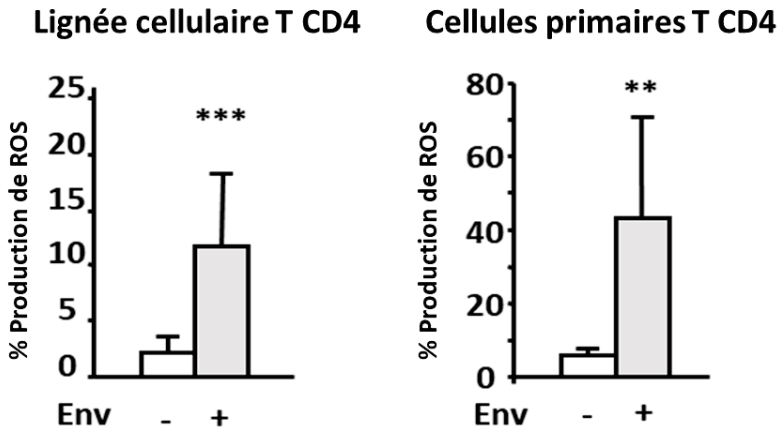


Figure 19 : Env induit la production de ROS dans les cellules T CD4 cibles.

Des cellules issues de lignées cellulaires T (CEM) ou des lymphocytes T CD4 primaires ont été cocultivés avec des cellules exprimant ou non Env durant 48 h. Les cellules cibles ont ensuite été récupérées pour dosage des ROS produits en utilisant la sonde DHR123 (sonde fluorescente en présence de ROS, détection en cytométrie de flux).

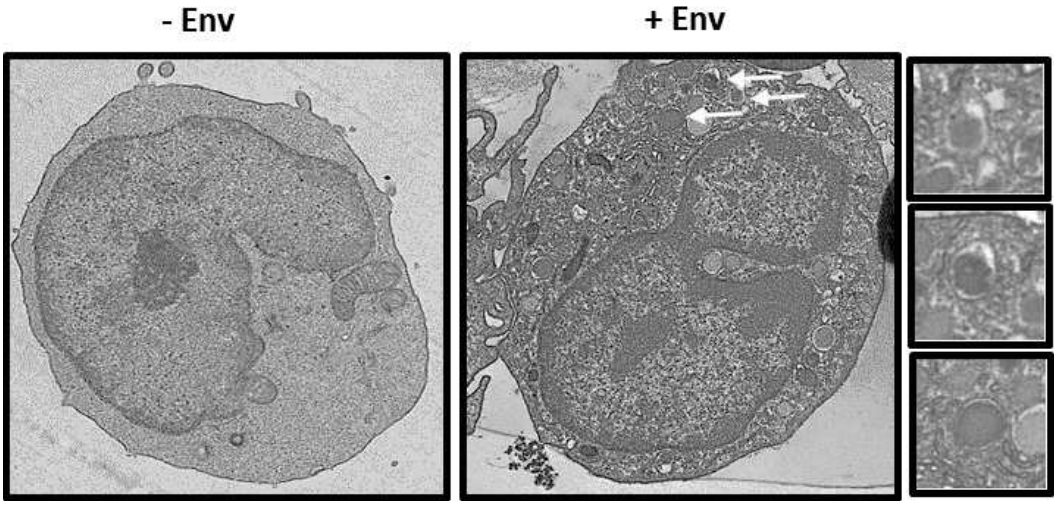


Figure 20 : Observation de l'autophagie induite par Env dans les cellules T CD4 cibles.

Des cellules T CD4 primaires ont été cocultivées avec des cellules exprimant ou non Env durant 48 h. Les cellules cibles ont été récupérées pour être analysées par TEM.

2 Objectifs de la thèse

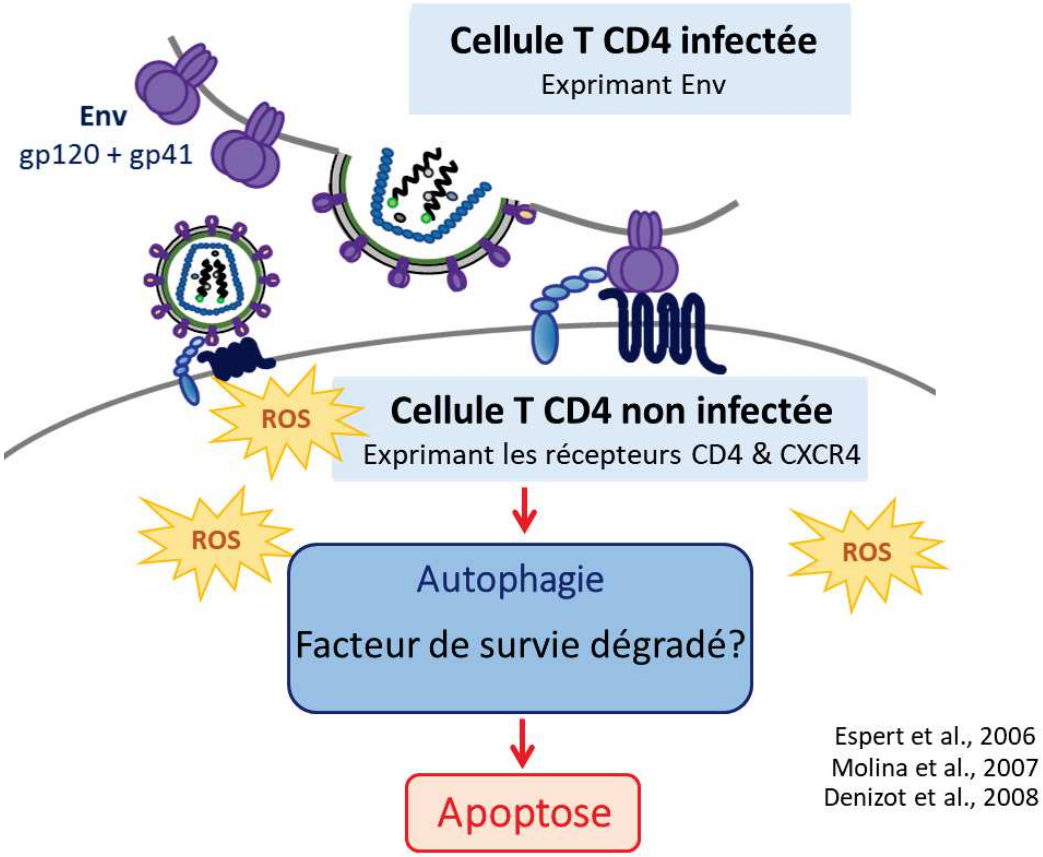
La physiopathologie de l'infection par le VIH-1 se caractérise par la diminution du nombre de LT CD4 au cours du temps, aboutissant à plus ou moins long terme au SIDA chez les patients non traités. Il a largement été caractérisé que la majorité des cellules T CD4 qui disparaissent au cours de ce processus ne sont pas les cellules qui sont productivement infectées mais les cellules voisines non infectées (effet « bystander »). De nombreux mécanismes sont connus pour être impliqués dans cet effet. Notamment, il a été montré par mon équipe, ainsi que par d'autres, que des cellules infectées, exprimant Env à leur surface, peuvent induire la mort par apoptose des cellules T CD4 non infectées après interaction de Env avec ses récepteurs CD4 et CXCR4 ou CCR5. Mon équipe a également montré que, dans ce contexte, Env induit massivement le processus d'autophagie dans les cellules non infectées et que ce processus est responsable du déclenchement de l'apoptose (Espert *et al.* 2006). L'objectif de mon projet de thèse était donc de déterminer comment l'autophagie pouvait conduire à l'apoptose induite par Env dans les LT CD4 non infectés bystanders.

Notre démarche s'est basée sur les résultats préliminaires suivants obtenus par mon équipe :

- L'autophagie induite par Env doit être complète, donc dégradative, pour conduire à l'apoptose. Ceci suggère qu'un facteur de survie est dégradé par autophagie dans ce contexte.
- Une étude protéomique réalisée par mon équipe a montré que Env induit un stress oxydatif dans les LT CD4 non infectés (voir Figure 19) (Molina *et al.* 2007).
- Des expériences de microscopie électronique (TEM) ont permis d'observer la présence de structures semblables à des peroxysomes au sein de vacuoles autophagiques dans des cellules T CD4 cibles après leur coculture avec des cellules exprimant Env (voir Figure 20).

Compte-tenu de ces différents résultats préliminaires, nous avons émis l'hypothèse que l'autophagie induite par Env pourrait dégrader les peroxysomes. En effet, les peroxysomes sont des organelles essentielles à la défense antioxydante des cellules. Ainsi, leur dégradation pourrait entrainer l'accumulation des ROS induite par Env et provoquerait la mort par apoptose des cellules cibles (voir Figure 21).

Le contact entre les cellules T CD4 infectées exprimant Env et les cellules T CD4 non infectées exprimant les récepteurs du VIH-1 induit dans ces dernières l'autophagie et un état de stress oxydatif menant ces cellules à leur mort par apoptose. Nous avons tenté d'identifier le facteur de survie dégradé par autophagie dont la disparition mène à la mort de la cellule T CD4 non infectée.



Résultats

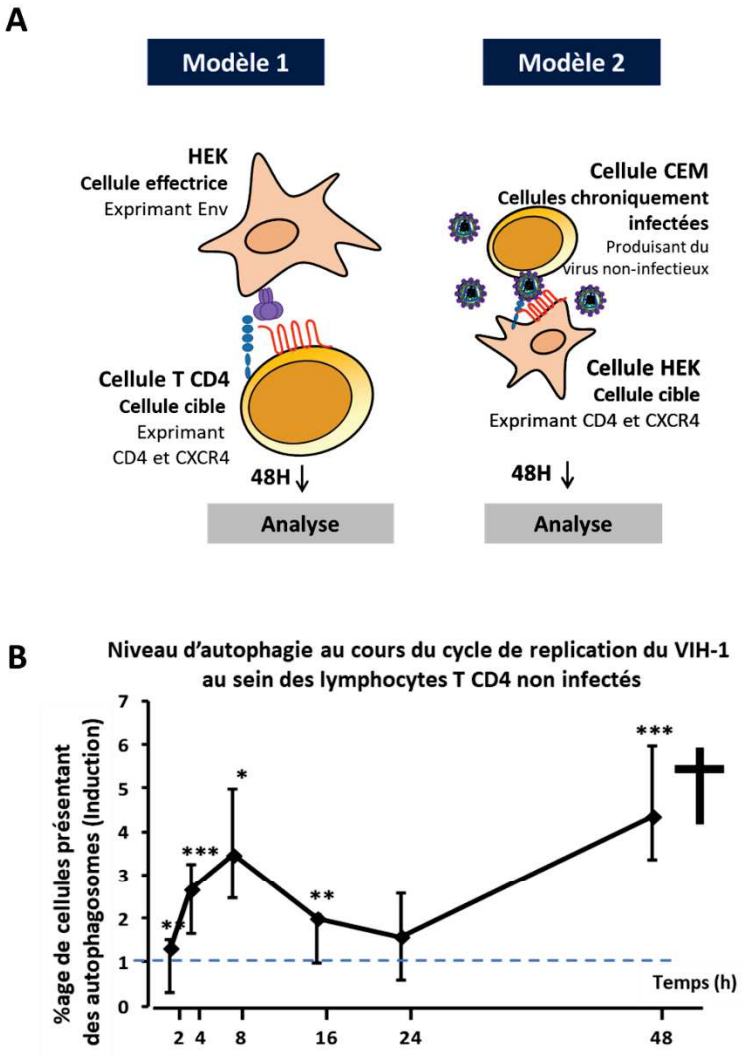


Figure 22 : Modèles cellulaires étudiés

A. Modèle 1 : Les cellules effectrices HEK.293 exprimant les glycoprotéines virales Env en surface sont mises en coculture durant 48 h avec des cellules cibles exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 **Modèle 2 :** Les cellules effectrices sont des cellules 8E5 exprimant Env qui sont chroniquement infectées par un virus défectueux comportant une mutation au niveau de la RT. Ces cellules sont mises en coculture durant 48 h avec les cellules cibles HEK.293 exprimant stablement les récepteurs CD4 et CXCR4 avant leur récolte pour analyse.

B. Niveau d'autophagie au cours du cycle réplicatif du VIH-1 dans LT CD4 non infecté

3 Résultats

3.1 Modèles cellulaires et analyse de l'autophagie

3.1.A Modèles cellulaires

Les résultats obtenus sont basés sur la coculture entre des cellules dites « effectrices » et des cellules dites « cibles ». Les cellules effectrices sont celles qui expriment Env en surface (issu de pNL4-3 à tropisme X4) et les cellules cibles expriment les récepteurs CD4 et CXCR4.

- Modèle 1 (voir Figure 22) : Des cellules adhérentes HEK.293 ont été stablement transfectées avec un plasmide permettant l'expression de Env en surface et sont les cellules effectrices de ce modèle. Des cellules HEK.293T n'exprimant pas Env sont utilisées comme contrôle. Les cellules cibles de ce modèle sont des cellules T CD4 en suspension exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4. Les cellules de lignée cellulaire CEM (A201.CD4/403) sont des lymphoblastes exprimant un récepteur CD4 tronqué en position 403. Ce récepteur CD4 conserve sa propriété de reconnaissance par la gp120 mais n'est en revanche plus capable de transmettre les signaux intracellulaires. Comme l'induction d'autophagie par Env dépend de la fusion membranaire médiée par la gp41, ce mutant n'a aucun impact sur nos résultats. Des cellules cibles T CD4 primaires purifiées à partir de sang issu de donneurs sains peuvent également être utilisées dans ce modèle (Convention avec l'EFS). Les cellules sont mises en coculture durant 48 h, temps nécessaire pour observer une bonne induction d'apoptose en réponse à Env. Les cellules cibles sont ensuite récoltées pour être analysées selon la technique désirée.
- Modèle 2 (voir Figure 22) : Les cellules effectrices utilisées dans ce modèle de coculture sont les 8E5 qui sont des cellules T chroniquement infectées, donc exprimant Env à leur surface, par un virus VIH-1 comportant une mutation au niveau de la RT ce qui rend ces virions incapables de compléter un cycle infectieux. Les cellules cibles sont des cellules adhérentes HEK.293 exprimant stablement les récepteurs CD4 et CXCR4. Bien que ce modèle soit moins physiologique, il nous permet de réaliser des expériences de transfection des cellules cibles plus aisément. De plus, notre équipe a montré que la séquence d'évènement « autophagie-apoptose » induite par Env se produit de la même façon dans ces cellules que dans les cellules T. Nous utilisons des

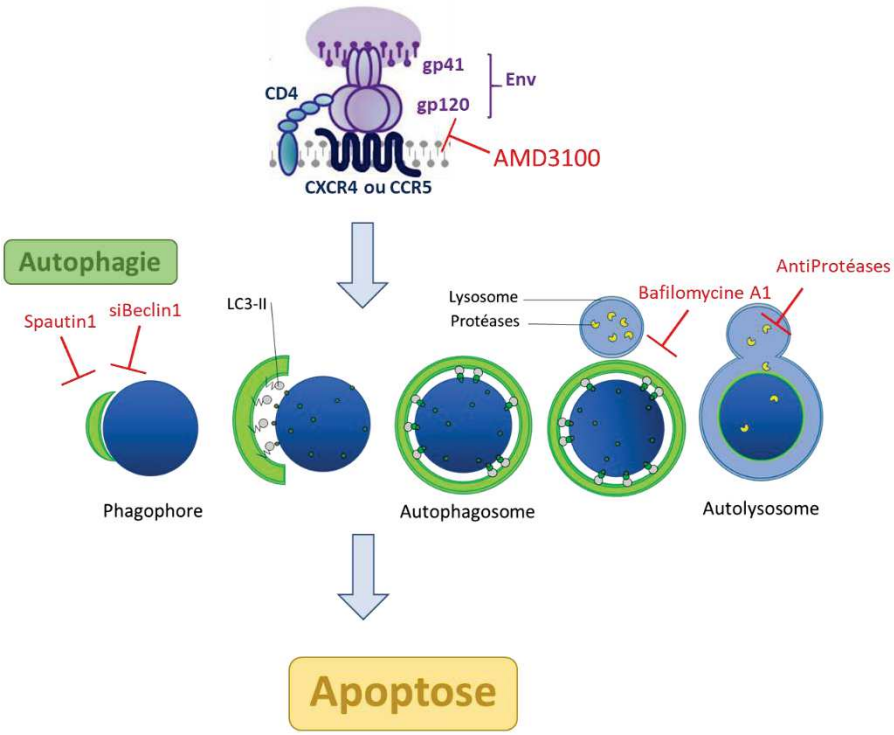


Figure 23 : Stratégies d'inhibition de l'autophagie.

L'AMD3100 est un antagoniste de CXCR4 qui empêche la reconnaissance par la gp120. La Spautin1 inhibe l'initiation de l'autophagie. L'interférence ARN du facteur Beclin1 diminue l'expression de ce facteur impliqué dans l'initiation de l'autophagie. La BafA1 est un inhibiteur de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Les antiprotéases (E64d et Pepstatine A) inhibent les protéases du lysosome.

cellules effectrices n'exprimant pas Env telles que des CEM en contrôle. Après 48 h de coculture, les cellules cibles sont récupérées pour être analysées.

3.1.B Techniques d'analyse de l'autophagie

Nous disposons de plusieurs stratégies d'inhibition des étapes essentielles de l'autophagie selon les modèles étudiés (voir Figure 23). Nous pouvons ainsi inhiber le contact entre Env et CXCR4 par l'utilisation d'AMD3100 qui est un antagoniste de CXCR4 et qui, par conséquent, empêche ainsi la reconnaissance de ce corécepteur par la gp120 (Donzella *et al.* 1998). Nous pouvons également inhiber l'autophagie à différents stades en utilisant des drogues comme la Spautin1 (bloque l'étape d'initiation), la Bafilomycine A1 (BafA1, inhibiteur de l'étape de maturation), les antiprotéases (AP : E64d + Pepstatine A, inhibiteur de la dégradation lysosomale). L'autophagie peut aussi être inhibée par la technique d'ARN interférence après transfection de siRNA dirigés contre l'expression d'ATG indispensables au processus d'autophagie. Dans cette étude, nous utilisons un siRNA dirigé contre l'expression de la protéine Beclin1 (Klionsky *et al.* 2016). Enfin, pour identifier si l'autophagie dégrade ses substrats de manière sélective, nous utilisons des siRNA dirigés contre l'expression de récepteurs de l'autophagie (sip62 ou siNBR1 en particulier).

3.2 L'autophagie induite par Env conduit à l'apoptose des cellules T CD4 non infectées

Mon équipe a précédemment montré que l'autophagie est nécessaire au déclenchement de l'apoptose induite par Env dans les cellules T CD4 non infectées bystanders (Espert *et al.* 2006). En effet, lorsque l'autophagie est inhibée par différentes stratégies (3-MA, siATG7, siBeclin1, Bafilomycine A1), l'apoptose induite par Env est inhibée. Au cours de ma thèse, j'ai participé à la reproduction de ces résultats en utilisant la technologie « HTRF » (Homogeneous Time Resolved Fluorescence, CisBio) basée sur une détection par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (voir HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence)pour détails du kit). Pour ce faire, nous avons utilisé un kit permettant le dosage des formes clivées de la PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) qui est une cible bien caractérisée des caspases 3 et 7 et qui permet ainsi de quantifier l'apoptose. Ainsi, les cellules T CD4 cibles ont été cocultivées durant 48 h avec des cellules exprimant ou non les glycoprotéines virales (Env) (Modèle 1) en présence ou non de drogues (AMD3100, BafA1, Spautin1). Les cellules cibles ont ensuite été

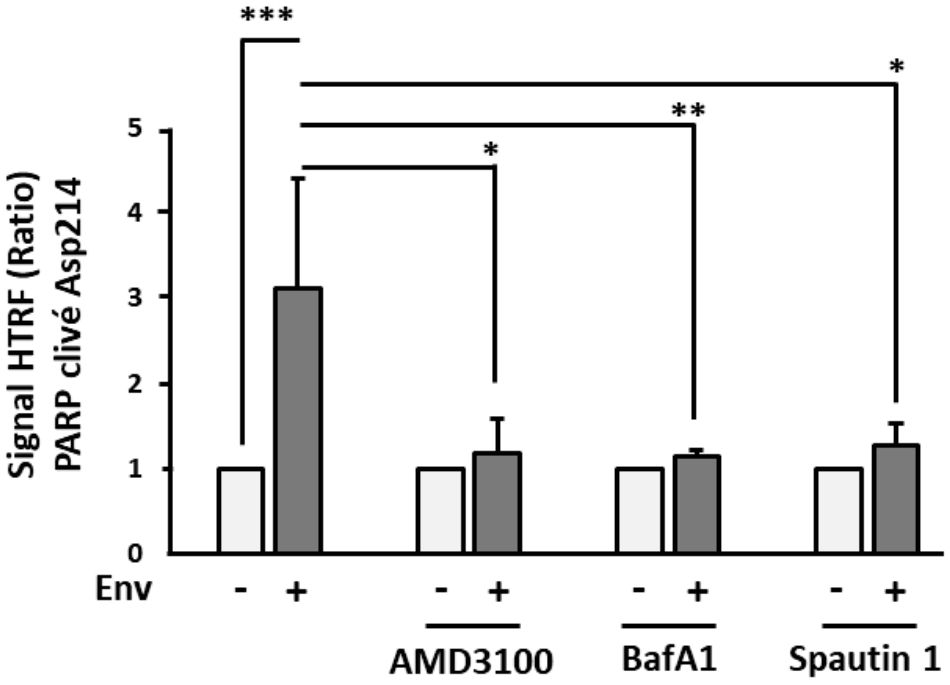


Figure 24 : L'apoptose induite par Env dépend de l'autophagie

Les cellules cibles T CD4 ont été cocultivées avec des cellules effectrices exprimant ou non Env. La coculture a duré 48 h en présence ou non d'inhibiteur du contact avec Env (AMD3100 1 µg/mL) ou d'inhibiteurs de l'autophagie (Spautin1 50 µM, Bafilomycine A1 100 nM). Les cellules cibles ont été récupérées et l'apoptose induite par Env a été analysée par dosage du clivage de la PARP (technologie HTRF, Cisbio).

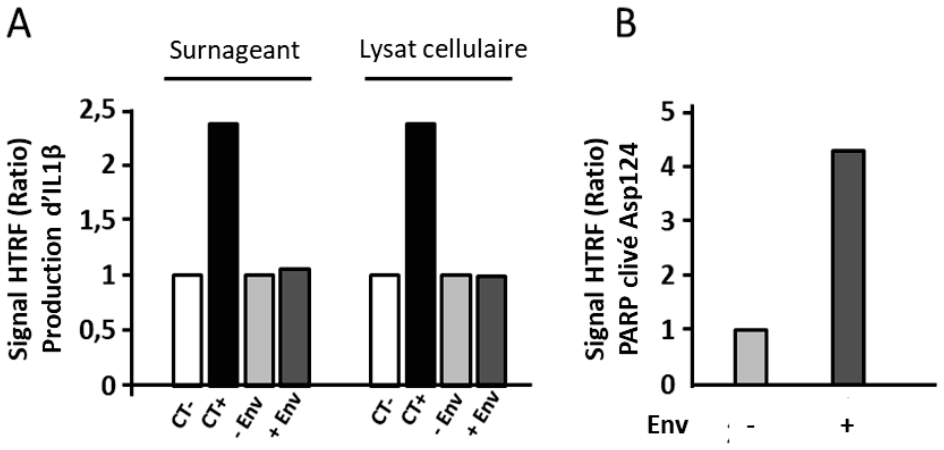


Figure 25 : L'IL1β n'est pas produite en réponse à Env dans notre modèle.

A. Des cellules T CD4 ont été cocultivées avec des cellules exprimant ou non Env. Après 48 h, la production l'IL1β a été dosée dans les surnageants de coculture et dans les lysats totaux des cellules cibles. (CT- : taux basal d'IL1β dans les cellules T CD4 cibles, CT+ : contrôle positif fourni dans le kit de dosage). **B.** Dosage de l'apoptose (PARP clivé) dans les mêmes lysats totaux que pour la condition en A.

récoltées et le taux d'apoptose analysé. Les résultats, présentés en Figure 24, montrent que l'apoptose est induite dans les cellules cibles suite au contact avec des cellules exprimant Env. Tel que précédemment observé, cette induction d'apoptose est bien dépendante de Env puisque l'utilisation d'AMD3100 inhibe la mort des cellules cibles. L'utilisation de deux inhibiteurs d'autophagie différents, Spautin1 et BafA1, indique que l'autophagie est bien nécessaire à l'apoptose induite par Env. De plus, les résultats obtenus après inhibition des étapes de maturation de l'autophagie (BafA1) montrent que le processus doit être complet et dégradatif pour conduire à l'apoptose.

Comme indiqué dans l'introduction de ce manuscrit (Chapitre Déplétion des lymphocytes T CD4), les travaux du groupe de W.Greene ont décrit le rôle d'un autre type de mort cellulaire appelé « pyroptose » dans la déplétion des cellules T CD4 non infectées exposés à des cellules infectées (Doitsh *et al.* 2014). Ce processus fait intervenir la caspase 1 dont l'activation permet la maturation de l'IL1β et sa sécrétion. Pour vérifier si ce processus est aussi impliqué dans notre modèle, des cellules T CD4 cibles ont été mises en coculture pendant 48 h avec des cellules exprimant, ou non, Env. La production d'IL1β a été évaluée par HTRF dans les surnageants de la coculture et dans les lysats totaux de cellules cibles. Les résultats, présentés en Figure 25, n'indiquent pas de production de cette cytokine dans notre modèle, alors que l'apoptose est bien induite dans les mêmes conditions. Ce résultat indique que Env n'est pas responsable de l'induction de pyroptose dans les cellules T CD4 non infectées. Ainsi, plusieurs types de mort cellulaire peuvent être induites dans les cellules T non infectées exposées à des cellules infectées.

3.3 L'autophagie induite par Env est responsable de l'accumulation de ROS dans les cellules T CD4 non infectées.

Une précédente étude de mon équipe a révélé l'induction d'un stress oxydatif par Env au sein des cellules T CD4 non infectées (Molina *et al.* 2007). J'ai donc analysé le rôle de l'autophagie dans cette production de ROS. J'ai cocultivé des cellules T CD4 cibles avec des cellules effectrices (exprimant Env) pendant 48 h en présence, ou non, d'une drogue inhibant l'étape d'initiation de l'autophagie (Spautin1) (modèle 1). La mesure des ROS présents au sein des cellules cibles a été réalisée par dosage de l'oxydation de la DHR123 (DiHydroRhodamine 123) par cytométrie en flux. Dans la condition non traitée (Mock), on observe une production de ROS induite par Env. En revanche, lorsque l'autophagie est inhibée par la Spautin1, la

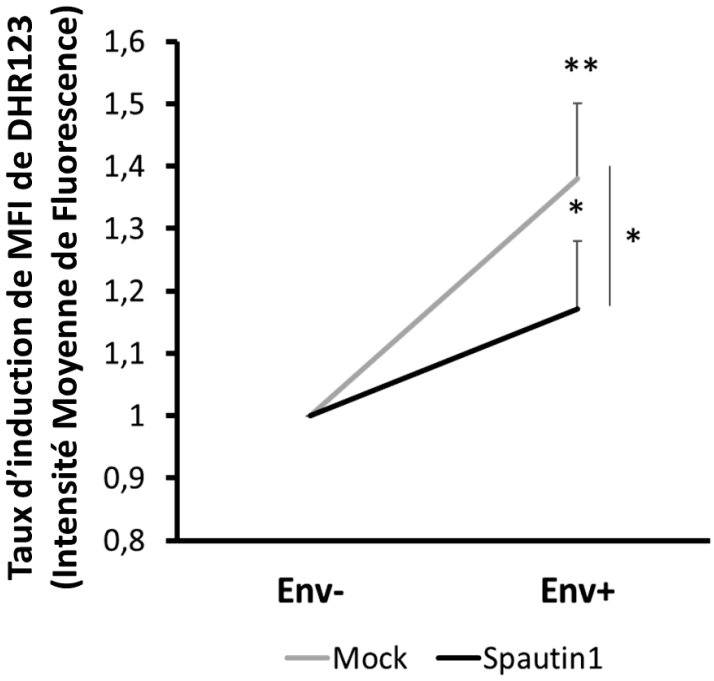


Figure 26 : Analyse du rôle de l'autophagie induite par Env dans la production de ROS.

Des cellules T CD4 ont été cocultivées durant 48 h avec des cellules exprimant ou non Env. La coculture a été traitée ou non avec un inhibiteur de l'autophagie (Spautin1, 50 µM). La production de ROS a ensuite été dosée par DHR123 dans les cellules T CD4 cibles par cytométrie en flux.

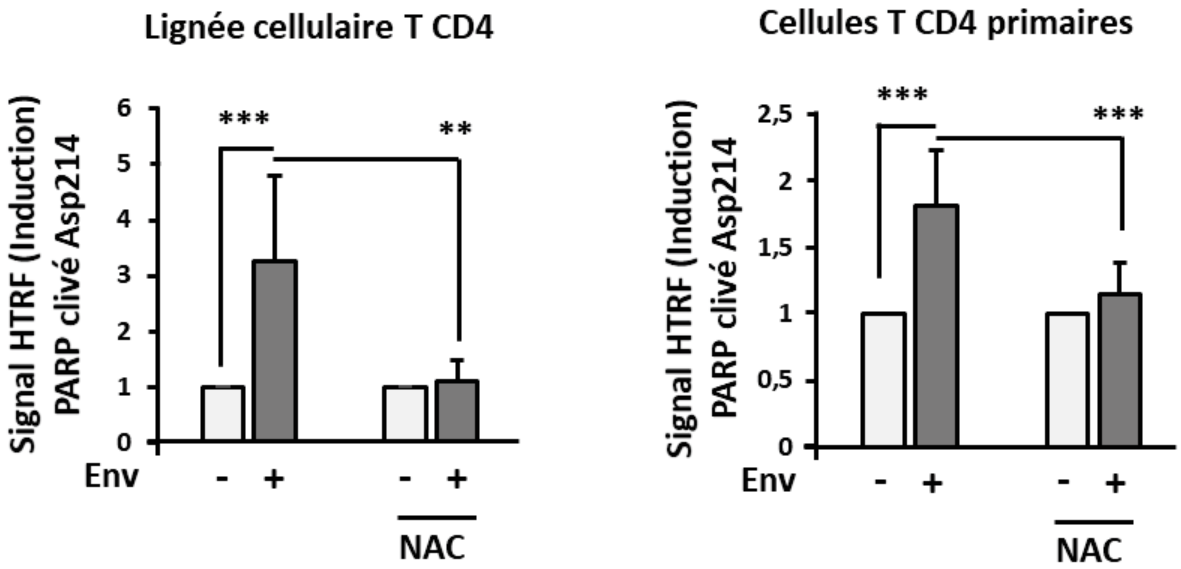


Figure 27 : Le stress oxydatif induit par Env est impliqué dans la mort par apoptose des cellules T CD4 non infectées cibles.

Des cellules issues de lignées cellulaires T CD4 (CEM) ou des lymphocytes T CD4 primaires ont été cocultivés avec des cellules exprimant ou non Env durant 48 h en présence ou en absence de NAC (10mM). Les cellules T CD4 cibles ont ensuite été récupérées pour doser le clivage de la PARP (apoptose) par la technologie HTRF.

production de ROS est diminuée dans ces cellules cibles (voir Figure 26). De façon inattendue, ces résultats montrent, dans ce contexte, que l'autophagie n'a pas un rôle antioxydant. Au contraire, ce processus participe à l'établissement du stress oxydatif induit par Env dans les cellules T CD4 non infectées.

3.4 Les ROS induits par Env sont responsables de la mort par apoptose des cellules T CD4 non infectées

A la vue des résultats précédents, nous nous sommes intéressés au rôle du stress oxydatif dans la mort par apoptose des cellules des LT CD4 non infectées exposées à Env. Pour cela, le niveau d'apoptose a été mesuré par HTRF (dosage du clivage de la PARP) dans le modèle 1 de coculture, en présence, ou non, de NAC (N-acétylcystéine), drogue antioxydante. Ces expériences ont été réalisées à la fois dans une lignée de cellules T CD4 ou dans des lymphocytes T CD4 primaires purifiés à partir de sang de donneurs sains. Les résultats montrent que l'utilisation du NAC inhibe totalement la mort par apoptose induite par Env dans les cellules T CD4 non infectées (voir Figure 27), indiquant un rôle majeur du stress oxydatif induit par Env dans cette mort.

Nous avons donc montré que l'autophagie induite par Env participe à l'induction d'un stress oxydatif dans les cellules T CD4 non infectées et que celui-ci est responsable de la mort par apoptose de ces cellules. Nos résultats montrent également que l'autophagie induite par Env doit être complète pour conduire à l'apoptose de ces cellules. L'ensemble de ces données indiquent fortement que l'autophagie induite par Env serait responsable de la dégradation d'un composé à activité antioxydante. En effet, les cellules T CD4 cibles, privées de leurs défenses antioxydantes suite à leur dégradation par autophagie, ne pourraient plus détoxifier les ROS produits, entrainant un stress oxydatif responsable de leur mort par apoptose.

La suite de notre étude a consisté à vérifier cette hypothèse en identifiant quel substrat cellulaire, ayant une action antioxydante, serait dégradé par l'autophagie induite par Env.

3.5 Env induit la dégradation sélective des protéines peroxysomales par autophagie

Tel que précédemment mentionné, l'autophagie a un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et participe au recyclage d'organelles endommagées ou surnuméraires. De façon intéressante, elle est connue pour son rôle dans la régulation du

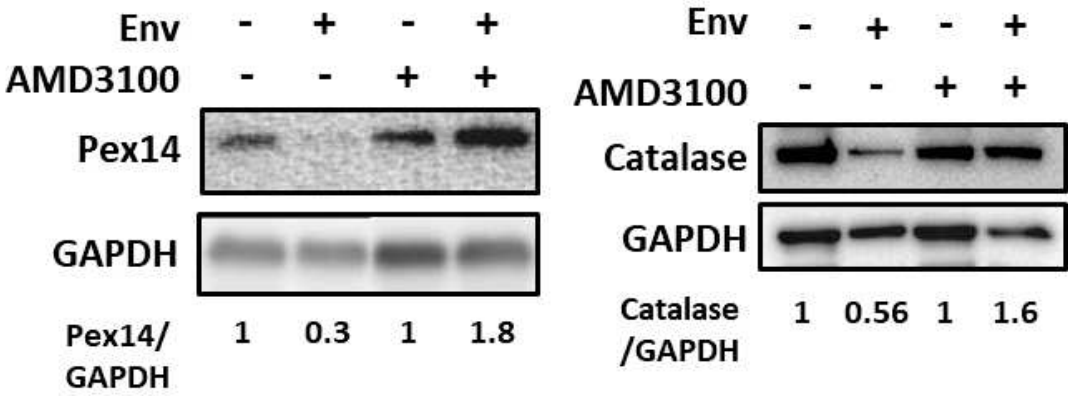


Figure 28 : Protéines du peroxysome sont dégradées suite au contact avec Env

Des cellules T CD4 ont été cocultivées avec des cellules exprimant ou non Env en présence ou non d'ADM3100 (1 µg/mL). Après 48 h, les cellules cibles sont récupérées et analysées en western blot pour l'expression de Pex14 ou catalase. Les quantifications du niveau d'expression des protéines sont présentées sous forme du rapport entre la protéine d'intérêt et la GAPDH. Pour chaque condition (non-traitée/traitée) on comparera les conditions exposées ou non à Env (Env- vs Env+). Ces expériences sont représentatives de plusieurs expériences.

nombre de peroxysomes. Pour rappel, les peroxysomes sont des organelles cellulaires majeures dans la lutte contre le stress oxydatif.

Comme mentionné précédemment, mon équipe a observé des structures similaires à des peroxysomes présentes à l'intérieur des autophagosomes dans les cellules T CD4 non infectées cibles après leur coculture avec des cellules exprimant Env (Figure 20). Du fait de leur rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant, nous avons recherché si ces organelles pourraient être les cibles de l'autophagie induite par Env dans les cellules T CD4 cibles. En effet, leur dégradation par autophagie pourrait réduire les capacités antioxydantes de la cellule et ainsi conduire à une accumulation de ROS.

Plusieurs approches expérimentales ont été mises au point pour tester cette hypothèse. Nous avons, en particulier, suivi l'expression de deux protéines peroxysomales, la catalase et Pex14, dans les cellules T CD4 non infectées en réponse à Env par des études biochimiques. Nous avons choisi de suivre ces protéines car :

- la catalase est une enzyme à activité antioxydante majeure des peroxysomes (impliquée dans le catabolisme du peroxyde d'hydrogène).
- Pex14 est une protéine impliquée dans la biogénèse des peroxysomes en participant à la machinerie d'import des protéines peroxysomales. Pex14 est dès lors une protéine qui est spécifiquement associée à ces organelles (Ma, Agrawal, et Subramani 2011).

3.5.A Env induit la dégradation de la catalase et de Pex14

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au niveau d'expression de ces protéines peroxysomales dans les cellules T CD4 cibles après coculture avec des cellules effectrices exprimant Env. Pour cela, les cellules cibles ont été mises en coculture durant 48 h avec des cellules effectrices en présence, ou non, d'AMD3100. Les résultats montrent une diminution du niveau des protéines Pex14 et catalase suite au contact avec Env dans la condition non traitée par l'AMD3100 (voir Figure 28). L'utilisation d'AMD3100, qui inhibe l'interaction entre Env et CXCR4, restaure le niveau d'expression des deux protéines testées.

Ces résultats indiquent que la dégradation de Pex14 et catalase observée est dépendante de Env puisqu'elle est inhibée par l'ajout d'AMD3100. De manière importante, cette drogue inhibe aussi l'autophagie induite par Env.

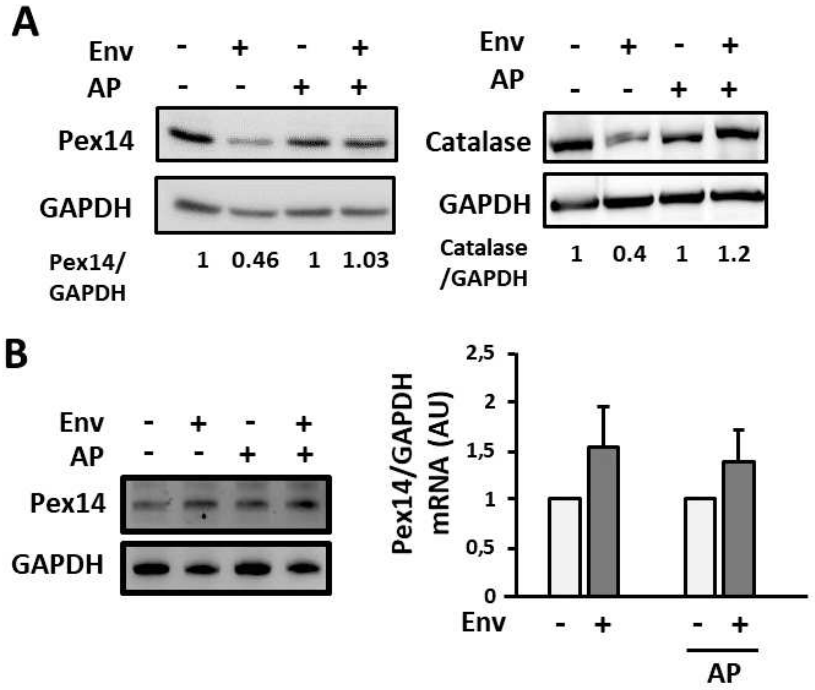


Figure 29 : Protéines du peroxysome sont dégradées par l'autophagie induite par Env.

A. Des cellules T CD4 ont été cocultivées avec des cellules exprimant ou non Env en présence ou non d'antiprotéases (AP, E64d, Pepstatine A, 10 µM respectivement). Après 48 h, l'expression de Pex14 ou de la catalase est analysée en WB. **B.** Dosage par PCR semi-quantitative des ARNm de Pex14 dans les mêmes lysats que les conditions en A.

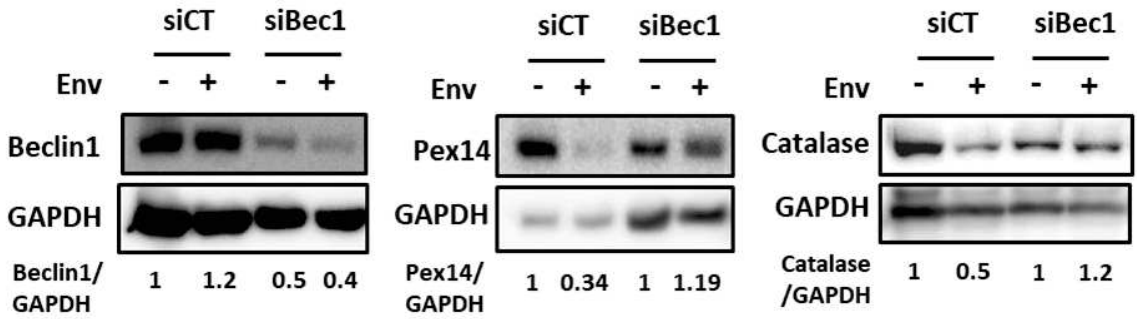


Figure 30 : Protéines du peroxysome sont dégradées par l'autophagie induite par Env.

Des cellules HEK293 exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 ont été transfectées avec des siRNAs CT ou dirigés contre Beclin1, puis cocultivées avec des cellules exprimant ou non Env. Après 48 h, l'expression de Beclin1, catalase ou Pex14 est analysée en WB. Les quantifications du niveau d'expression des protéines sont présentées sous forme du rapport entre la protéine d'intérêt et la GAPDH. Pour chaque condition (non-traitée/traitée) on comparera les conditions exposées ou non à Env (Env- vs Env+). Ces expériences sont représentatives de plusieurs expériences.

3.5.B L'autophagie induite par Env dégrade Pex14 et catalase

Afin d'analyser si la diminution du niveau des protéines Pex14 et catalase est due à l'autophagie induite par Env, le niveau d'expression de ces protéines a été évalué par Western Blot dans les cellules T CD4 cibles exposées durant 48 h à des cellules exprimant ou non Env, en présence d'inhibiteurs de la dégradation lysosomale (AP pour E64d + Pepstatine A) (voir Figure 29A). Les résultats montrent que les niveaux de Pex14 et catalase sont diminués en réponse à Env dans les cellules T CD4 cibles et que l'ajout d'inhibiteurs d'autophagie réverse cet effet. Ces résultats suggèrent que l'autophagie induite par Env est responsable de la dégradation des protéines testées.

Afin d'éliminer la possibilité d'une régulation transcriptionnelle du niveau de ces protéines, nous avons vérifié le niveau des ARNm de Pex14 dans les mêmes conditions. Comme montré sur la Figure 29B, nous avons constaté que le niveau des ARNm de Pex14 n'est pas modifié en réponse à Env, argumentant en faveur d'une dégradation de la protéine.

Le rôle de l'autophagie dans la dégradation des protéines du peroxysome a été confirmé par l'utilisation de siRNA ciblant l'expression de la protéine Beclin1, essentielle aux étapes d'initiation de l'autophagie. Pour ces expériences, le modèle 2 de coculture a été utilisé pour optimiser l'efficacité de transfection des siRNAs. Ainsi, les cellules cibles HEK.293 exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 ont d'abord été transfectées avec un siRNA contrôle (siCT) ou un siRNA ciblant l'ARNm de la Beclin1 (siBec1) avant d'être mises en coculture avec des cellules exprimant ou non Env durant 48 h. Les cellules cibles ont ensuite été récoltées pour analyser, par Western Blot, l'expression des protéines Beclin1, Pex14 et catalase. Les résultats obtenus confirment ceux obtenus avec l'utilisation des antiprotéases, à savoir que lorsque l'autophagie induite par Env est inhibée, la dégradation des protéines Pex14 et catalase n'est plus observée (voir Figure 30).

L'autophagie induite par Env est donc responsable de la dégradation de protéines du peroxysome.

3.5.C Identification des récepteurs autophagiques impliqués dans la dégradation de Pex14 induite par Env

Deux récepteurs de l'autophagie de la famille des SLRs (Sequestosome-Like Receptors), p62 et NBR1, ont précédemment été décrits pour leur rôle dans la pexophagie chez les

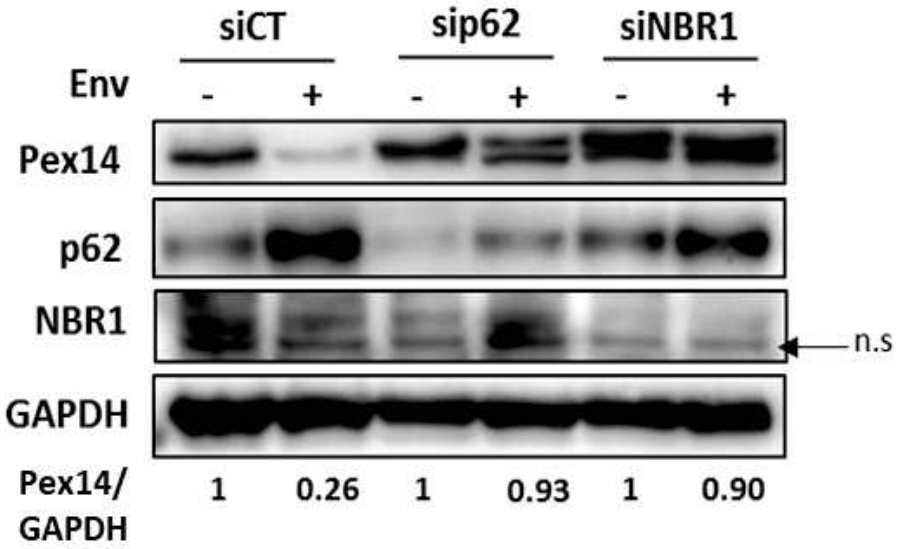


Figure 31 : Etude des récepteurs autophagiques impliqués dans la pexophagie induite par Env

Des cellules HEK293 exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 ont été transfectées avec des siRNAs CT ou dirigés contre p62 ou NBR1, puis cocultivées avec des cellules exprimant ou non Env. Après 48 h, l'expression de p62, NBR1 et Pex14 est analysée en WB. Les quantifications du niveau d'expression des protéines sont présentées sous forme du rapport entre la protéine d'intérêt et la GAPDH. Pour chaque condition (non-traitée/traitée) on comparera les conditions exposées ou non à Env (Env- vs Env+). Ces expériences sont représentatives de plusieurs expériences.

mammifères (P. K. Kim *et al.* 2008; Deosaran *et al.* 2013). Afin d'étudier le rôle de ces récepteurs dans la dégradation autophagique, induite par Env, des protéines Pex14 et catalase, nous avons choisi d'utiliser des siRNAs ciblant leur expression. Les cellules cibles HEK293 exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 (Modèle 2) ont été transfectées par un siCT, un sip62 ou un siNBR1 avant d'être mises en coculture durant 48 h avec des cellules exprimant ou non Env. Les cellules cibles ont ensuite été récoltées pour analyser par Western Blot le niveau d'expression de la protéine Pex14 (voir Figure 31). Comme attendu, dans les cellules transfectées avec un siCT, le niveau d'expression de Pex14 est diminué en réponse à Env. En revanche, dans les cellules transfectées avec un sip62 ou un siNBR1, le niveau d'expression de cette protéine reste inchangé. Ceci indique que les récepteurs autophagiques p62 et NBR1 sont impliqués dans la dégradation, induite par Env, des protéines peroxysomales testées.

Ces résultats nous ont alors conduits à étudier plus en avant cette dégradation. En particulier, nous avons recherché si l'autophagie induite par Env dans les cellules T CD4 non infectées pourrait dégrader les peroxysomes entiers.

3.6 Les peroxysomes matures sont dégradés par pexophagie en réponse à Env

Les résultats précédents, ainsi que l'observation par TEM de structures semblables à des peroxysomes au sein des autophagosomes induits par Env (voir Figure 20), suggèrent que Env induit un processus de pexophagie dans les cellules T CD4 non infectées. Nous avons donc voulu vérifier cette hypothèse en réalisant des expériences d'imagerie afin de confirmer la présence de ces organelles dans les autophagosomes. Pour ce faire, nous avons utilisé du DAB (3'3-Diaminobenzidine), composé qui, sous l'effet de la catalase, forme un précipité visible en microscopie à lumière blanche ou en microscope électronique (Cinci *et al.* 2014). Ce composé permet ainsi de visualiser les peroxysomes à l'intérieur de la cellule.

- **Utilisation du DAB en lumière blanche :**

Des cellules T CD4 cibles ont été cocultivées durant 48 h avec des cellules exprimant ou non Env, en présence ou non d'inhibiteurs d'autophagie (antiprotéases : AP). L'observation des cellules cibles marquées au DAB nous a permis de constater une population hétérogène de peroxysomes dans les différentes conditions testées. En effet, outre la différence du nombre de points noirs, représentant les précipités de DAB, dans les cellules cibles, une différence de taille de ces précipités est également visible. Ainsi, on observe que, dans les cellules cibles

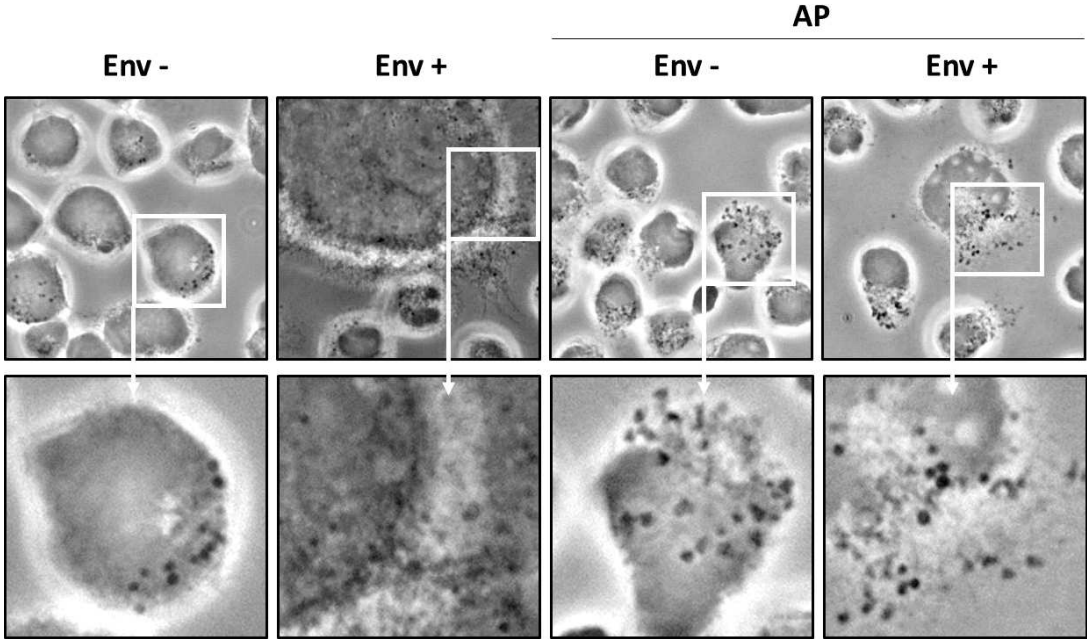


Figure 32 : Marquage DAB des peroxysomes

Des cellules T CD4 ont été cultivées durant 48 h avec des cellules exprimant ou non Env en présence ou non d'antiprotéases (E64d & Pepstatine A 10 µM respectivement). Les cellules cibles ont été fixées puis marquées au DAB avant d'être analysées par microscopie à lumière blanche. Les images sont présentées sans échelle car elles ont été acquises sur un microscope à objectif 63x non calibré. Les images de la seconde ligne montrent un agrandissement de la région d'intérêt indiquée d'un carré blanc sur les images de la première ligne.

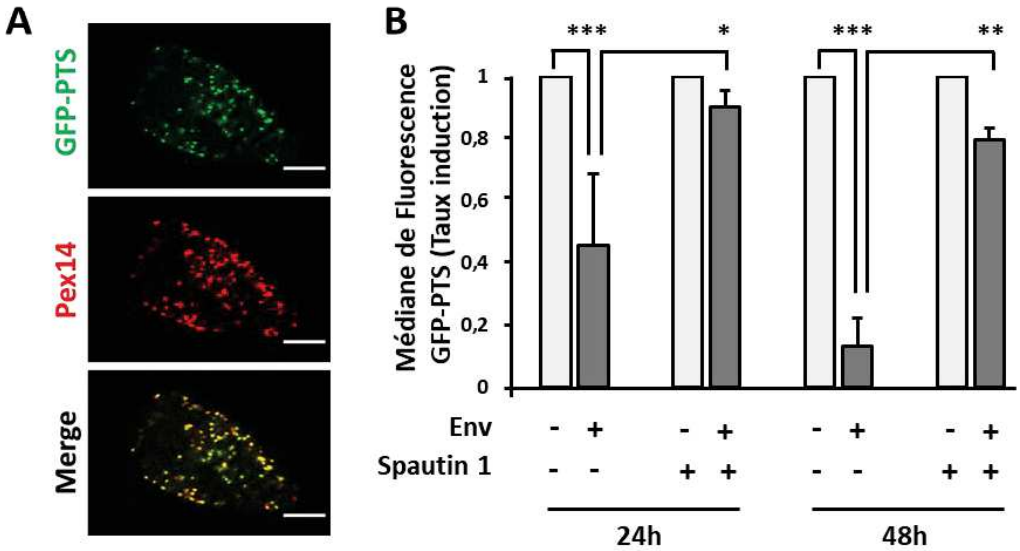


Figure 33 : Quantification des peroxysomes par cytométrie en flux.

A. Le plasmide GFP-PTS a été transfecté dans des cellules HEK293 exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 (Vert). Pex14 a été détecté dans les cellules cibles en Immunofluorescence grâce à un anticorps dirigé contre Pex14 (Rouge). La colocalisation du signal GFP-PTS et de Pex14 dans les cellules a été évaluée en microscopie confocale (Merge). L'échelle des images présentées est de 5 µm. **B**. Les cellules cibles HEK293 exprimant les récepteurs CD4 et co-récepteur CXCR4 transfectées GFP-PTS ont été mises en coculture durant 24 ou 48 h avec des cellules exprimant ou non Env en présence ou non d'un inhibiteur d'autophagie (Spautin1, 50 µM). Le niveau médian de GFP a été quantifié par cytométrie en flux (Analyse FlowJo). Les résultats sont exprimés en taux d'induction comparant les conditions Env- aux conditions Env+ selon les différents traitements.

exposées à Env, la taille des précipités semble plus petite que celle retrouvée dans les cellules non exposées à Env et l'ajout d'antiprotéases restaure la taille des précipités de DAB (voir Figure 32). Malheureusement, la qualité des images acquises dans cette expérience ne nous a pas permis de quantifier le nombre et la taille des précipités (représentant les peroxysomes) obtenus.

- **Utilisation du DAB en microscopie électronique :**

Nous avons, en parallèle, tenté de marquer les peroxysomes au DAB, dans des expériences de TEM, dans des cellules T CD4 après leur coculture avec des cellules exprimant Env. Pour cette expérience, il s'agissait de combiner ce marquage avec une analyse structurale de la cellule. Malheureusement, après plusieurs tentatives, les conditions de fixation des cellules pour la TEM n'ont pas permis de visualiser les précipités de DAB dans les cellules. Nous avons donc choisi d'utiliser d'autres stratégies pour quantifier le nombre et la taille des peroxysomes dans les cellules T CD4 cibles exposées à Env.

3.6.A Quantification de la quantité des peroxysomes par cytométrie en flux

Pour quantifier les peroxysomes dans notre modèle, nous avons utilisé un plasmide permettant l'expression de la protéine GFP couplée à un triplet de séquence d'adressage au peroxysome (PTS : Peroxisome Targeting Signal). En effet, au cours de la biogénèse des peroxysomes, les protéines peroxysomales sont adressées à ces organelles via cette séquence. Nous avons, dans un premier temps, vérifié la validité de ce plasmide en transfectant des cellules cibles HEK.293 (Modèle 2) avec le plasmide GFP-PTS. Les cellules cibles ont ensuite été récupérées et un immunomarquage de la protéine Pex14 a été effectué. On constate une quasi-parfaite colocalisation entre GFP-PTS et Pex14 (voir Figure 33A) confirmant que cet outil est fiable pour identifier les peroxysomes.

Nous avons alors utilisé cet outil pour quantifier les peroxysomes par cytométrie en flux. Pour cela, les cellules cibles HEK.293 exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 (Modèle 2) ont été transfectées avec le plasmide permettant l'expression de GFP-PTS. Puis, ces cellules transfectées ont été mises en coculture avec des cellules exprimant ou non Env durant 24 h ou 48 h avec un traitement, ou non, avec l'inhibiteur d'autophagie Spautin1. Le niveau médian de fluorescence de la GFP a été analysé dans les cellules cibles par cytométrie de flux. Les résultats montrent une diminution du niveau de fluorescence suite à l'exposition à Env (voir

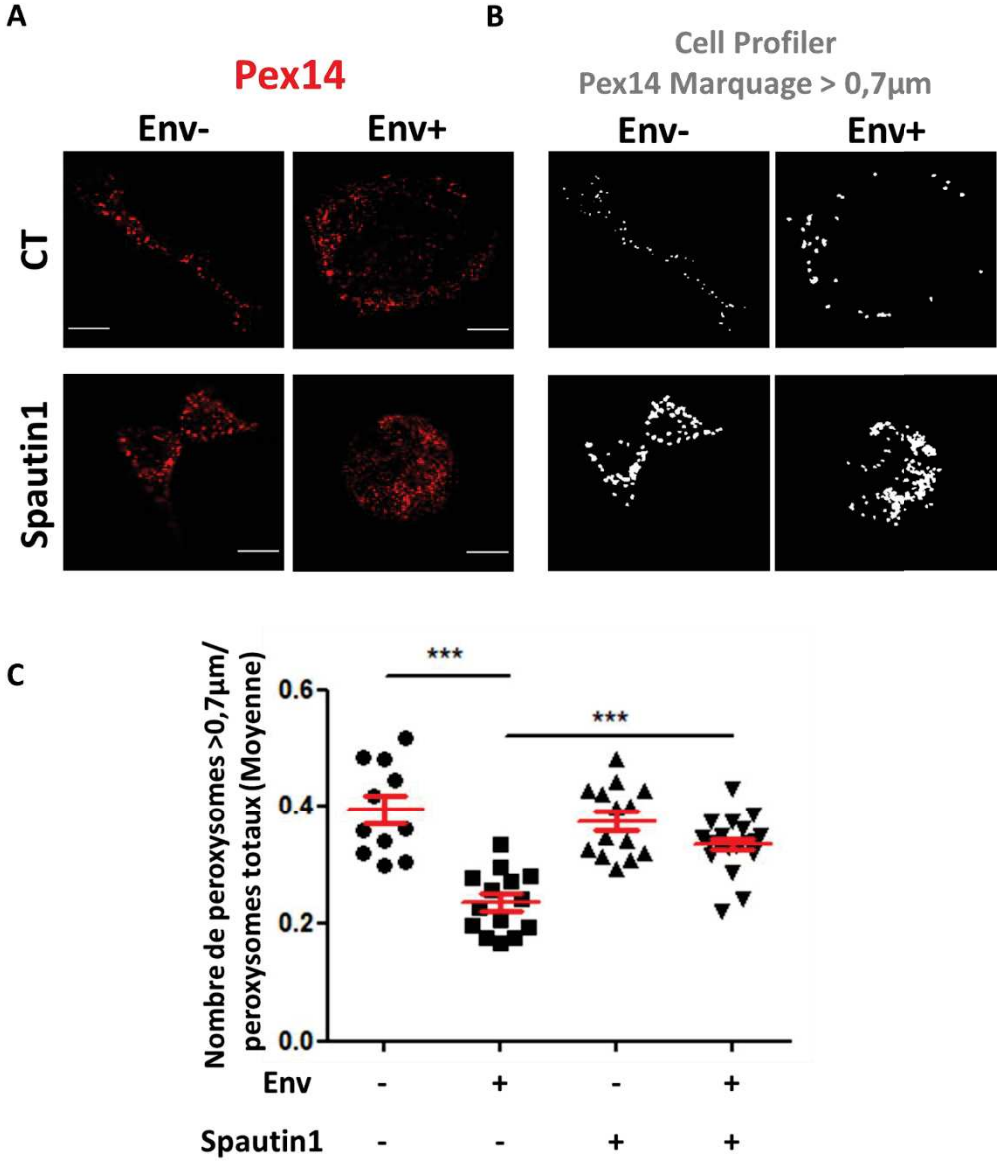


Figure 34 : Dégradation des peroxysomes “matures” induite par Env

Des cellules HEK.293 exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 ont été cocultivées avec des cellules exprimant ou non Env durant 48 h. Les cocultures ont été traitées ou non avec un inhibiteur de l’autophagie (Spautin1, 50 µM). **A.** Les cellules cibles ont été récoltées et fixées pour immunomarquage de la protéine Pex14. Les cellules ont ensuite été analysées par microscopie confocale. L’échelle est égale à 10 µm. **B.** Ces images ont ensuite été introduites dans le logiciel d’analyse d’images Cell Profiler pour mesurer l’aire de chaque peroxysome marqué et le classer selon le seuil de 0,7 µm de diamètre. Le logiciel nous indique alors quels sont les peroxysomes considérés au-dessus du seuil choisi. **C.** La classification réalisée par le logiciel Cell profiler nous as permis de calculer pour chaque cellule le rapport moyen du nombre de peroxysomes « matures » sur le nombre de peroxysomes totaux. Ces résultats sont présentés sous-forme de scatter plot à l’aide du logiciel GraphPad.

Figure 33B). L'utilisation de la Spautin1 réverse cet effet indiquant que l'autophagie induite par Env est impliquée dans la diminution de la fluorescence sans ajout de Spautin1. De plus, ces expériences montrent que la diminution du signal augmente avec le temps de coculture.

3.6.B Env induit la diminution du nombre de peroxysomes matures dans les cellules cibles

Suite à l'observation en DAB d'une population hétérogène en taille des peroxysomes en réponse à Env, nous avons voulu étudier ces variations et nous avons choisi la technique d'immunofluorescence. Les peroxysomes ont une taille variable entre 0,1 et 1 µm de diamètre. Bien qu'ils soient capables de fission, les peroxysomes dits « matures », lesquels exercent leur capacité antioxydante *via* la catalase, sont plus gros que ceux en cours de biogénèse. Pour analyser si Env avait un effet sur la taille des peroxysomes dans les cellules T CD4 cibles, nous avons mis en coculture, durant 48 h, des cellules HEK.293 exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 (Modèle2) avec des cellules exprimant ou non Env. Nous avons également traité, ou non, les cellules avec un inhibiteur de l'autophagie (Spautin1). Les cellules cibles ont ensuite été récoltées, fixées et les peroxysomes ont été marqués avec un anticorps spécifique de Pex14. Les cellules cibles ont ensuite été analysées par microscopie confocale (voir Figure 34). Afin de distinguer les gros peroxysomes, dits « matures », des petits peroxysomes (en cours de biogénèse), nous avons utilisé le logiciel « Cell Profiler ». Ainsi, chaque acquisition au microscope confocal a été réalisée sur le volume entier des cellules cibles. Nous avons fixé un « Z » de 1 µm (pas entre chaque tranche optique) pour chaque image afin d'éviter d'acquérir deux fois le même peroxysome. Le logiciel « Cell Profiler » a été utilisé pour sa capacité à distinguer les peroxysomes dans les cellules cibles et à mesurer leur aire (marquage Pex14). Nous avons fixé un seuil de 0,7 µm de diamètre pour identifier les peroxysomes « matures ». Sur la base de cette mesure effectuée par le logiciel « Cell Profiler », nous avons pu établir, pour chaque image analysée, un rapport du nombre de peroxysomes matures (diamètre >0,7 µm) sur le nombre de peroxysomes totaux. Ces rapports ont été collectés pour chaque image constituant le volume d'une cellule cible. Nous avons pu ainsi obtenir la moyenne des rapports de peroxysomes matures sur les peroxysomes totaux pour chaque cellule.

La comparaison du nombre moyen de peroxysomes matures sur les peroxysomes totaux d'une cellule nous indique que ce rapport est diminué suite au contact avec Env. Cependant, l'inhibition de l'autophagie par la Spautin1 restaure le rapport de peroxysomes matures sur le

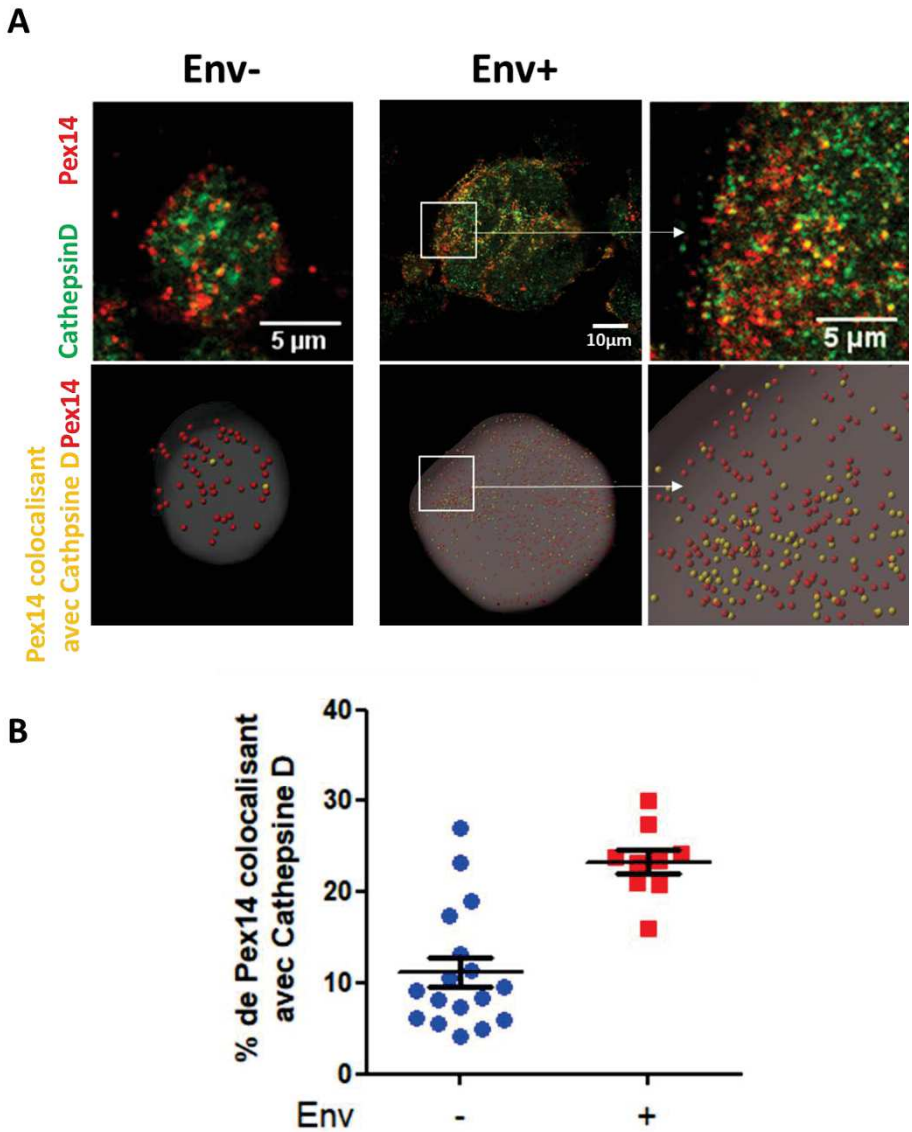


Figure 35 : Les peroxysomes colocalisent avec les lysosomes.

Des cellules T CD4 ont été cocultivées durant 48 h avec des cellules exprimant ou non Env en présence d'inhibiteurs des étapes dégradatives de l'autophagie (AP : E64d & Pepstatine A 10 µM respectivement). Les cellules cibles sont ensuite été récupérées et fixées ou immunomarquage des protéines Pex14 (Rouge) et Cathepsine D (Vert). **A.** Les cellules ont été analysées par microscopie confocale. Les images de microscopie présentées montrent à la fois le marquage Pex14 et Cathepsine D. L'échelle des images Env- est égale à 5 µm. L'échelle des images Env+ est égale à 10 µm. Nous présentons également pour cette condition une région d'intérêt (identifiée par un cadre blanc) à une échelle de 5 µm. Les immunomarquages ont été analysés par le logiciel Imaris qui a pu reconstituer chaque cellule dans son volume. Au sein de ce volume, le logiciel Imaris nous a permis de représenter chaque marquage Pex14 ou Cathepsine D par une sphère de 1 µm (vésicules Rouges pour Pex14 et Vertes pour Cathepsine D). Le logiciel a ensuite pu nous renseigner sur les vésicules Pex14 colocalisant avec Cathepsine D à un seuil de 0,3 µm (vésicules jaunes). Les échelles des images présentées sont semblables à celles de microscopie confocale respectivement. **B.** Les quantifications de sphères Pex14 totales et de Pex14 colocalisant avec Cathepsine D nous ont permis de calculer le rapport de sphères colocalisant sur le nombre total de celles-ci. Les résultats sont présentés en scatterplot du pourcentage de sphères Pex14 colocalisant avec Cathepsine D par cellule.

nombre de peroxysomes totaux dans les cellules exposées à Env. Ensemble, ces résultats suggèrent donc que l'autophagie induite par Env diminue le nombre de peroxysomes « matures » au sein des cellules cibles.

La quantification des peroxysomes « matures » dans le modèle 1 (où les cellules cibles sont des cellules T CD4 et non des HEK.293) est actuellement en cours.

3.7 Les peroxysomes colocalisent avec les lysosomes

Pour définitivement confirmer la dégradation des peroxysomes par l'autophagie, nous avons réalisé des études de colocalisation entre les peroxysomes et les lysosomes. Pour cela, des cellules T CD4 cibles ont été mises en coculture durant 48 h avec des cellules exprimant ou non Env. Les cocultures ont été traitées avec un inhibiteur de la dégradation lysosomale (AP : E64d et Pepstatine A) afin d'optimiser la visualisation des colocalisations. Les cellules cibles ont été récupérées et adhérées à des lamelles de poly-lysine avant d'être fixées pour ensuite procéder à l'immunomarquage. La protéine Pex14 a été révélée avec un fluorophore émettant dans le rouge (Alexa 555) et la Cathepsine D (protéase lysosomale) a été révélée grâce à un anticorps émettant dans le vert (Alexa 488) (voir Figure 35A). Les cellules ont ensuite été analysées par microscopie confocale. Plusieurs tranches optiques d'une même cellule ont été acquises afin de reconstituer tout le volume cellulaire. Les images ont ensuite été analysées grâce au logiciel d'analyse de microscopie confocale Imaris XT. Ce logiciel nous a permis d'observer, dans le volume de chaque cellule, le marquage des peroxysomes (Pex14) et des lysosomes (Cathepsine D) ainsi que leurs colocalisations potentielles. Le logiciel Imaris nous a ensuite permis de modéliser les marquages par des sphères de 1 µm, grâce auxquelles le taux de peroxysomes colocalisant avec des lysosomes (Jaune) a pu être calculé (seuil de colocalisation fixé à 0,3 µm). Pour chaque cellule cible, le nombre de peroxysomes colocalisant avec les lysosomes, rapporté au nombre de peroxysomes totaux a été évalué. Les résultats obtenus sont encourageants et montrent une nette augmentation du nombre de peroxysomes colocalisant avec les lysosomes dans les cellules T CD4 après leur coculture avec des cellules exprimant Env (voir Figure 35B). Ces résultats doivent être reproduits mais sont une preuve supplémentaire que Env induit bien la pexophagie dans les cellules T CD4 cibles.

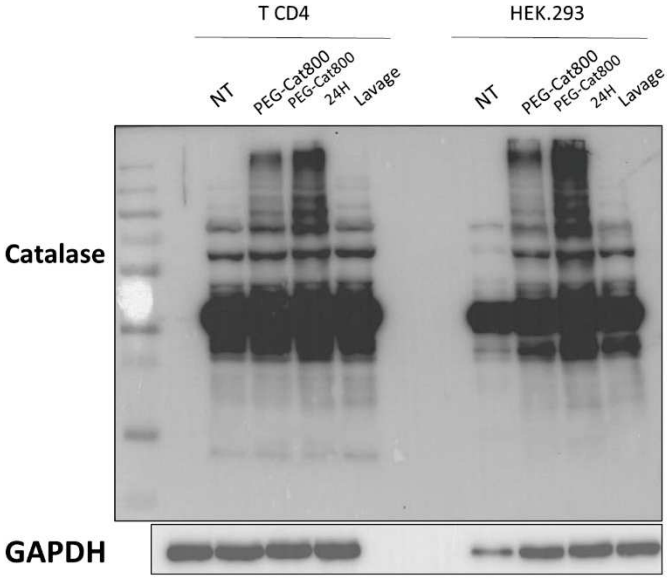


Figure 36 : PEG-catalase n'est pas intégrée dans les cellules LT CD4

Des cellules cibles T CD4 ou HEK.293 ont été incubées ou non avec de la PEG-catalase (800 unités/mL) durant 48 h. Après 24 h d'incubation, certaines cellules ont reçu une complémentation supplémentaire de PEG-Catalase (800 unités/mL), D'autres cellules ont été lavées aux PBS 24 h avant d'être récupérées. Les cellules cibles ont été analysées par Western Blot pour l'expression de la catalase. La quantité de protéines a été analysée par le niveau d'expression de la GAPDH.

3.8 Test fonctionnel : Complémentation des cellules cibles avec la catalase

L'ensemble des résultats obtenus indiquent que l'autophagie induite par Env dégrade sélectivement les peroxysomes matures dans les cellules T CD4 cibles. Ainsi, privées de ces organelles à activité antioxydante, les cellules cibles ne seraient plus en mesure de lutter contre l'accumulation des ROS induite par Env, les conduisant à la mort par apoptose. Afin de valider définitivement cette hypothèse, nous souhaitons complémenter les cellules cibles avec de la catalase et tester la capacité de Env à induire l'apoptose dans ces cellules complémentées. Pour ce faire, nous avons utilisé deux approches. La première vise à traiter les cellules cibles avec une catalase modifiée avec du PEG (PolyEthylèneGlycol) (PEG-catalase). Cette modification doit permettre à la catalase de pénétrer dans les cellules cibles avant leur coculture avec des cellules effectrices. La deuxième approche vise à obtenir des lignées stables de cellules T CD4 cibles surexprimant la catalase après transfection rétrovirale.

- **Utilisation de la PEG-catalase :**

La catalase couplée au poly-éthylène-glycol (PEG-catalase, Sigma Aldrich) a été utilisée par d'autres équipes pour sa capacité à traverser les membranes cellulaires (Ginet *et al.* 2014). Après plusieurs tentatives, nous avons pu mettre en évidence que ce composé ne pénétrait pas dans nos cellules T CD4 ou HEK.293 cibles (Figure 36). Nous avons donc abandonné cette stratégie de complémentation.

- **Utilisation des lignées surexprimant la catalase :**

Pour obtenir les lignées de cellules T CD4 cibles surexprimant la catalase, nous avons transfecté des cellules HEK.293 avec une combinaison de plasmides : un plasmide exprimant les protéines d'empaquetage d'un rétrovirus murin (pc57gp), un plasmide permettant l'expression de l'enveloppe du VSV (VSV-G) et un plasmide rétroviral permettant l'expression de la GFP seule (pMIG) ou de la catalase et de la GFP simultanément (pMIG-catalase). Après 48 h de transfection, les surnageants contenant les particules virales, générées à partir de ces trois plasmides, ont été récupérés et ont été utilisés pour transduire des cellules T CD4. Après 48 h, nous avons pu distinguer les cellules transduites grâce à l'expression de la GFP. Ces cellules transduites ont été clonées par dilution limite. Plusieurs clones ont été obtenus et nous avons vérifié l'expression de catalase et de la GFP dans trois d'entre eux (voir Figure 37A).

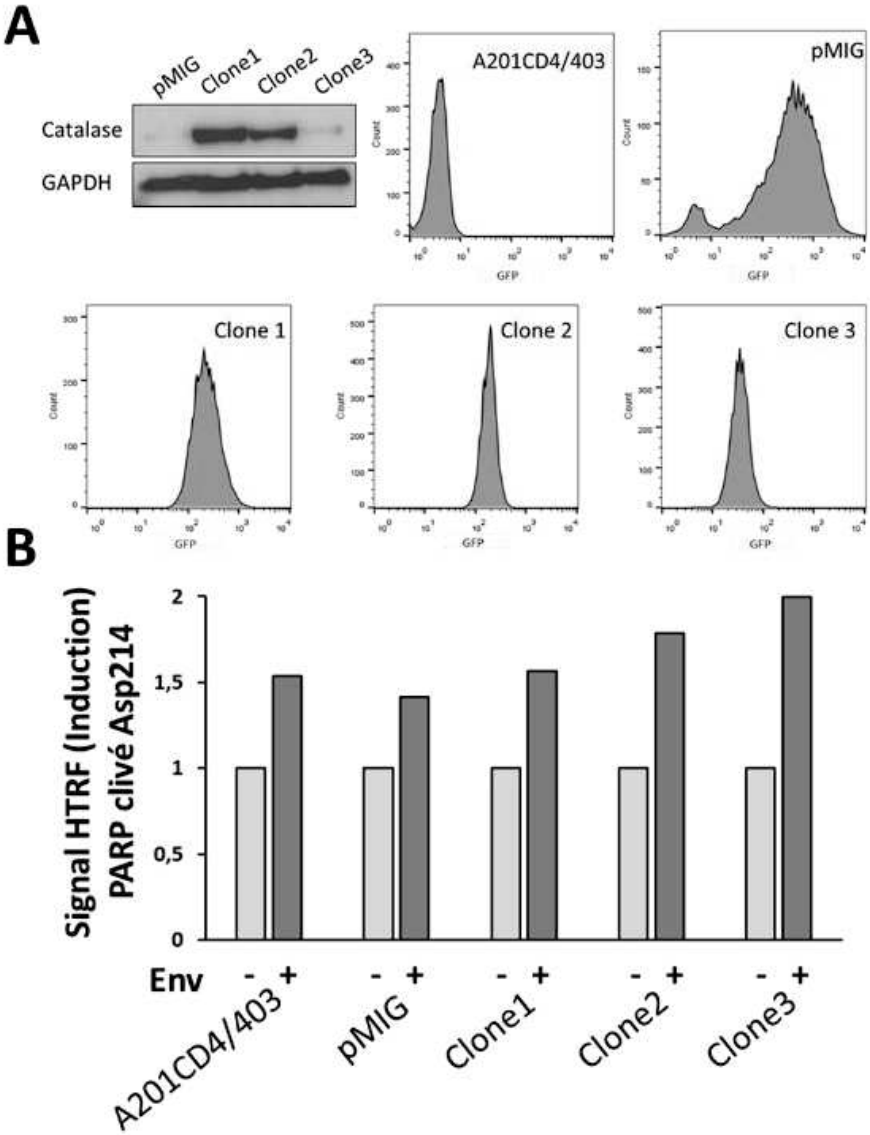


Figure 37 : Complémentation des cellules cibles en catalase et test du niveau d'apoptose suite à la complémentation en catalase

A. Les cellules clonales obtenues ont été testées par Western Blot pour leur expression en catalase ou en cytométrie de flux pour leur expression en GFP. **B.** Les cellules cibles complémentées en catalase (Clone 1, Clone 2, Clone3) ou non (A201CD4/403, pMIG) sont mises en coculture durant 48 h avec des cellules exprimant ou non Env. Les cellules cibles ont été récupérées et le niveau d'apoptose induit par Env est évalué par HTRF de PARP clivé (Asp124)

Les résultats montrent que l'expression de catalase est fortement augmentée dans les clones 1 et 2 et plus modérément dans le clone 3 en comparaison avec les cellules infectées par les particules virales contenant le gène d'expression de la GFP seul. L'expression de la GFP dans les clones est similaire à celle de la catalase.

Ces cellules T CD4 cibles complémentées ou non en catalase ont été mises en coculture avec des cellules effectrices exprimant, ou non, Env et l'apoptose des cellules cibles a été analysée par HTRF après 48 h. Les premiers résultats ne montrent pas de différence dans les niveaux d'apoptose induite par Env entre des cellules complémentées en catalase et des cellules contrôles (voir Figure 37B). Il apparaît donc que la surexpression de catalase n'ait pas suffit à inhiber l'apoptose induite par Env. Ces résultats doivent néanmoins être reproduits avant de conclure.

Conclusions et Perspectives

4 Conclusions et Perspectives

4.1 Conclusions

Au cours de l'infection par le VIH-1, la majeure partie des LT CD4 qui disparaissent ne sont pas infectés de manière productive mais sont les cellules T voisines des cellules infectées. De nombreux processus ont été mis en évidence pour expliquer cette déplétion des cellules « bystanders ». Parmi ces processus, mon équipe à précédemment montré un rôle du mécanisme d'autophagie induit par les glycoprotéines d'enveloppe virales. En effet, des cellules infectées, qui expriment Env en surface, induisent la mort par apoptose des cellules T CD4 bystanders en interagissant avec les récepteurs CD4 et CXCR4 ou CCR5. Plus précisément, c'est la fusion membranaire induite par la gp41 qui est le déclencheur de l'autophagie (Espert *et al.* 2006; Denizot *et al.* 2008). De manière intéressante, l'autophagie, connue majoritairement comme étant un mécanisme de survie, est nécessaire au déclenchement de l'apoptose dans ce contexte. Le but de mon projet de thèse était donc de rechercher comment l'autophagie induite par Env pouvait conduire à l'apoptose. En parallèle, les travaux de mon équipe ont également mis en évidence l'induction d'un stress oxydatif, caractérisé par un production excessive de ROS, dans les cellules bystanders en réponse à Env. Ce résultat a été confirmé dans d'autres études où, notamment une équipe, a montré que la fusion membranaire induite par la gp41 était à l'origine de l'induction de ce stress oxydatif et que celui-ci conduisait à l'apoptose des cellules bystanders (Garg et Blumenthal 2006). C'est donc, de manière tout à fait logique que nous nous sommes intéressés aux relations entre l'autophagie et le stress oxydatif dans notre modèle d'étude. Nous avons ainsi pu montrer que :

- **L'autophagie induite par Env est impliquée dans la production de ROS dans les cellules bystanders.** En effet, une inhibition de ce processus conduit à l'accumulation de ces radicaux libres. Comme le stress oxydant est connu pour induire l'apoptose, ces résultats étaient cohérents avec le fait que l'autophagie soit nécessaire à l'apoptose induite par Env.

Nous avons alors émis l'hypothèse que l'autophagie induite par Env dégraderait un (des) facteur(s) antioxydant(s), privant ainsi la cellule bystander de moyens pour lutter contre le stress oxydatif.

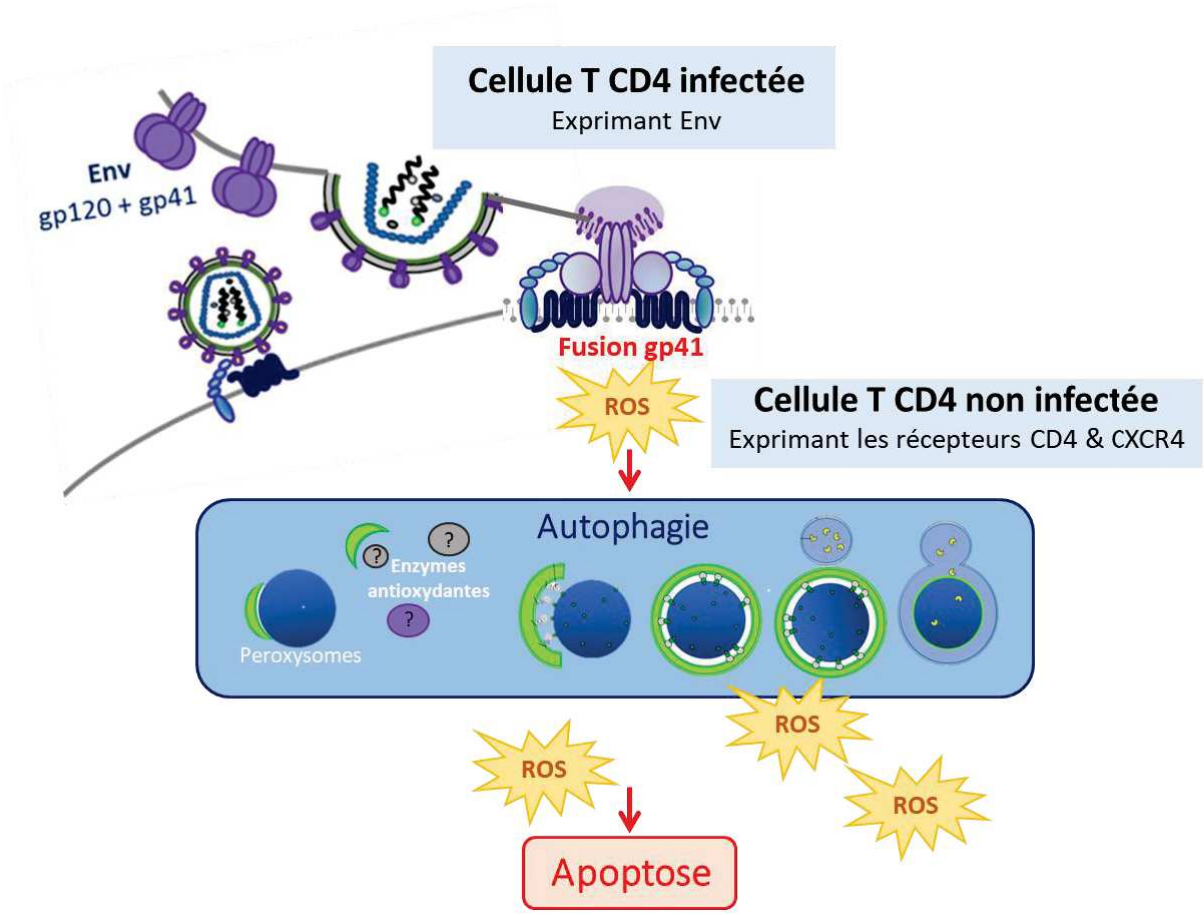


Figure 38 : Modèle de la dégradation autophagique sélective induite par Env des peroxysomes et facteurs antioxydants conduisant à un stress oxydatif et à la mort des cellules T CD4 non infectées

- **Les peroxysomes sont des cibles de l'autophagie induite par Env.** En effet, les peroxysomes sont des organelles majeures dans la lutte contre le stress oxydatif et représentent ainsi une cible privilégiée dans notre modèle d'étude.

Plus précisément, nous avons montré que l'autophagie induite par Env dégrade les protéines peroxysomales Pex14 et catalase. Cette autophagie semble sélective puisque les récepteurs autophagiques p62 et NBR1 se sont révélés être impliqués dans cette dégradation. Grâce à plusieurs techniques, nous avons pu montrer que ce sont les organelles entières, et pas seulement les protéines participant à la biogénèse des peroxysomes, qui sont dégradées par l'autophagie induite par Env (cytométrie en flux). Plus précisément, nous avons pu mettre en évidence la dégradation des peroxysomes de grande taille (>0.7 µm de diamètre), suggérant que l'autophagie cible les peroxysomes matures et donc fonctionnels (marquage au DAB, microscopie confocale et quantification avec le logiciel « Cell Profiler »).
L'ensemble de nos résultats nous permet de suggérer le modèle présenté en Figure 38, et sont actuellement en cours de rédaction pour publication dans un journal scientifique.

4.2 Perspectives

Plusieurs perspectives, détaillées ci-après, peuvent faire suite à cette première étude.

- ***Caractérisation de la dégradation par autophagie sélective :***

Nous avons montré l'implication de p62 et NBR1 dans la dégradation de Pex14 induite par Env, il serait intéressant de déterminer quels sont les domaines d'interaction entre les récepteurs de l'autophagie (NBR1, p62 ou autres récepteurs) et les protéines du peroxysome (implication des domaines UBA et PB1 en particulier).

Pour aller plus loin dans la mécanistique, il serait informatif de rechercher quels sont les signaux conduisant à la reconnaissance du peroxysome par les récepteurs autophagiques (en particulier le rôle de l'ubiquitination de Pex14 ou de Pex5) (Ma, Agrawal, et Subramani 2011; Jiangwei Zhang *et al.* 2015).

Enfin, dans le cadre d'une infection par le VIH-1, il serait important de rechercher si ce processus n'a lieu que dans les cellules bystanders ou s'il se produit aussi dans les cellules infectées. Si tel est la cas, les conséquences sur la cellule cible ou sur le cycle de réplication du virus devrait être recherchées.

- ***Confirmation de la prise en charge des peroxysomes dans les autophagosomes :***

Il serait intéressant de pouvoir observer la présence de peroxysomes dans des vacuoles autophagique en microscopie électronique. Nous avons tenté de réaliser cette expérience mais, malheureusement, malgré plusieurs essais, nous n'avons pas été en mesure de trouver les bonnes conditions pour marquer les peroxysomes à l'aide du DAB.

Une première expérience de colocalisation entre Pex14 et une protéine du lysosome (Cathepsine D) a donné des résultats encourageants car elle montre une augmentation du nombre des évènements de colocalisation entre les peroxysomes et les lysosomes en réponse à Env. Elle doit être reproduite afin d'obtenir des données statistiques. La colocalisation de Pex14 avec des protéines de la famille ATG8 est en cours de mise au point afin de déterminer si une (ou plusieurs) ATG8 est (sont) en jeu.

- ***Recherche si d'autres systèmes antioxydants des cellules cibles sont affectés par l'autophagie induite par Env :***

Notre tentative de complémentation des cellules cibles avec la catalase ne suffisant pas à inhiber la mort par apoptose induite par Env dans les cellules cibles, il semble nécessaire de

vérifier si cette complémentation suffit à inhiber le stress oxydant induit par Env ou si d'autres systèmes anti-oxydants sont dégradés par autophagie. Le niveau d'expression d'enzymes antioxydantes telles que la Superoxide Dismutase (SOD), Gluthation Peroxidase (Gpx4), Peroxiredoxine 2 et la Thiorédoxine pourra être évalué dans les cellules T CD4 cibles après coculture avec des cellules exprimant ou non Env.

- ***Recherche des voies de signalisation conduisant à l'induction de pexophagie par Env***

Il est connu que le stress oxydatif peut mener à l'activation de la protéine kinase ATM, qui induit la pexophagie (Jiangwei Zhang *et al.* 2015). Il serait intéressant d'étudier dans notre modèle si les ROS produits par la fusion de la gp41 participent à l'activation de cette voie de pexophagie.

- ***Recherche globale des cibles de l'autophagie induite par Env***

Pour aller plus loin dans la caractérisation du rôle de l'autophagie induite par Env dans les cellules T CD4 bystanders, il semble intéressant de rechercher l'ensemble des cibles spécifiques de l'autophagie Pour cela, un crible protéomique est en cours de mise au point pour nous permettre d'identifier l'ensemble des facteurs cellulaires sélectivement par ce processus dans différents contextes d'infection.

Discussion

5 Discussion

L'autophagie joue un rôle primordial au cours des infections, et dans l'infection par le VIH-1 en particulier, avec des conséquences physiopathologiques multiples. En effet, les relations entre le VIH-1 et l'autophagie sont nombreuses et complexes. Elles dépendent du type cellulaire ciblé par le virus et du statut infectieux de la cellule (cellules infectée vs cellules non infectées). Dans les LT CD4, nous avons montré que les protéines d'enveloppe du VIH-1 (Env) induisent l'autophagie lorsque ces cellules ne sont pas infectées productivement et que ce processus conduit à leur mort par apoptose. Par ailleurs, Env peut aussi induire l'autophagie dès la phase d'entrée du VIH-1 dans les LT CD4 mais ce processus est rapidement bloqué et inhibé dans ces cellules lorsqu'elles sont infectées de manière productive, suggérant que le VIH-1 a développé des stratégies pour le contrôler. Cependant, plusieurs travaux font état de l'effet anti-VIH de l'autophagie dans différents contextes cellulaires.

Nos travaux ont permis d'identifier la pexophagie comme un mécanisme de réponse à l'infection par le VIH-1 qui pourrait conduire à la destruction des LT CD4 mais le rôle de ce processus, et de l'autophagie dans la réponse au stress oxydatif pourrait s'étendre à plusieurs aspects de la pathogénèse liée à ce virus.

- ***Rôle dans les pathologies associées à l'infection par le VIH-1.***

Au-delà de ces travaux, la dégradation des systèmes antioxydants de la cellule nécessite une attention particulière dans le cadre de l'infection par le VIH-1. En effet, outre son rôle dans la déplétion du système immunitaire, le stress oxydant est clairement impliqué dans le développement de pathologies associés à l'infection par le VIH-1 telles que de la neurotoxicité, les démences, le déséquilibre immunitaire (Baier-Bitterlich, Wachter, et Fuchs 1996; Baruchel et Wainberg 1992; Legrand-Poels *et al.* 1990; Israël et Gougerot-Pocidalo 1997; Ivanov *et al.* 2016; Couret et Chang 2016). L'infection par le VIH-1 s'accompagne également d'un risque accru de développement de maladies cardiovasculaires telles que de l'hypertension artérielle, athérosclérose, myocardites ou pathologies pulmonaires et co-infections qui sont favorisées par le stress oxydatif induit par la présence du virus (Ballocca *et al*. 2017; Spieker *et al*. 2005; Fan *et al.* 2013). Au niveau du système immunitaire, les niveaux de ROS sont inversement corrélés au nombre de lymphocytes T CD4 (Malorni *et al*. 1998; Banki *et al*. 1998). Ceci peut être la conséquence d'une diminution du pool de glutathion réduit, de l'appauvrissement des

systèmes antioxydants de la cellule ou de l'accumulation de dommages à l'ADN causés par les ROS et la suppression des enzymes de réparation de l'ADN (P. Aukrust *et al.* 1995; Pål Aukrust *et al*. 2005).

- ***Rôle dans l'échappement du VIH-1 au système immunitaire***

De façon tout à fait intéressante, la dégradation sélective des peroxysomes peut se révéler être un avantage pour l'infection par le VIH-1 en participant à l'échappement du virus à l'immunité innée. En effet, les peroxysomes et les mitochondries sont des organelles qui possèdent, au sein de leur membrane, des protéines MAVS (Mitochondrial AntiViral Signaling proteins) (Dixit *et al*. 2010). Ces récepteurs font des peroxysomes une plateforme de signalisation pour l'immunité innée antivirale. La détection des pathogènes se fait de façon générale au moyen de récepteurs cellulaires (PRR Pattern Recognition Receptors) qui initient la production de cytokines pro-inflammatoires, IFN-I (Interféron de type I) ou la mort des cellules infectées. Les récepteurs à acide nucléiques étrangers de type RLRs (RIG-I Like Receptors) tels que RIG-I et MAD5 (Melanoma Différenciation Associated gene 5) reconnaissant les ARN cytosoliques et les récepteurs cGAS (cyclic GMP-AMP Synthase) reconnaissent les ADNs cytosoliques et activent la voie de signalisation STING (STImulator of INterferon Genes). Lorsque les RLRs RIG-I et MAD5 se lient à des petits ARN coiffés 5'-triphosphate ou à des longs ARNs génomiques respectivement, cela entraîne la dimérisation et l'activation des MAVS présents au sein des membranes des peroxysomes et des mitochondries. Cette dimérisation a pour conséquence l'activation d'une signalisation qui aboutit à l'activation des facteurs de transcription assurant la production d'ISG (IFN Stimulated Genes) (Dixit *et al*. 2010; Ding et Robek 2014). Ainsi, par l'induction de pexophagie, le VIH-1 pourrait échapper à l'immunité antivirale, dès l'entrée dans sa cellule cible, par la dégradation des senseurs de l'immunité présents à la surface des peroxysomes.

- ***Stress oxydant et traitements antirétroviraux***

Le traitement antirétroviral (ART) administré aux patients infectés par le VIH-1 est connu pour induire lui aussi un état de stress oxydatif (Wang *et al.* 2009; Nagiah, Phulukdaree, et Chuturgoon 2015; Manda *et al*. 2011; Weiß *et al.* 2016). Ces traitements permettent de réduire la virémie et d'améliorer les conditions immunologiques des patients infectés par le VIH-1 pour une période prolongée. Cependant, lorsque le traitement est arrêté, un rebond de

virémie est toujours possible dû à la présence de cellules T mémoire centrale ou de transition (T_{CM} ou T_{TM}) qui constituent une part importante du réservoir du VIH-1. Les traitements actuels ne parviennent pas à cibler directement des cellules contenant une copie transcriptionnellement inactive de l'ADN viral. Une nouvelle thérapie basée sur la réponse au stress oxydatif a été proposée pour cibler ce réservoir cellulaire du VIH-1. L'Auranofin (AF) est un composé à base d'or, à fonction pro-oxydante, qui inhibe la thiorédoxine réductase ce qui a pour conséquence d'affecter l'équilibre rédox de la cellule (Becker *et al*. 2000). L'AF s'est révélé efficace pour induire la mort par apoptose de cellules T mémoire sur base du statut oxydatif de ces lymphocytes (Badley *et al*. 2013). L'effet pro-apoptotique de l'AF s'est révélé efficace pour les cellules mémoires T_{CM} et T_{TM} qui ont des capacités de défenses antioxydantes restreintes (Chirullo *et al*. 2013). L'AF induit une mort cellulaire sensible au stress oxydatif par l'activation de la p38 MAPK (mitogen activated protein kinase) conduisant à la dépolarisation des mitochondries et une accumulation des peroxydes intracellulaires (Chirullo *et al*. 2013). L'association d'AF avec un inhibiteur de glutathionne biosynthèse tel que la buthionine sulfoximine (BSO) avec un traitement ART standard a permis de complètement supprimer la virémie SIV chez des macaques et de maintenir une survie sans déficience immunitaire pendant 2 ans après arrêt de la thérapie (Shytaj *et al*. 2013; 2015; Vint, Chain, et Foreman 1993). Ceci indique que les drogues induisant une mort par apoptose dépendant du stress oxydatif peuvent être envisagées pour réduire le réservoir viral du VIH-1. Il serait dès lors intéressant d'identifier si le traitement par AF induit dans les cellules mémoires l'autophagie et si ce traitement induit la mort de ces cellules par la même voie que dans notre modèle.

L'ensemble de ces données nous pousse à poursuivre à étudier les relations entre le stress oxydatif et l'autophagie au cours de l'infection par le VIH-1 afin d'obtenir une vue d'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués dans tous les aspects de la relation entre ce virus et son hôte.

Matériel et Méthodes

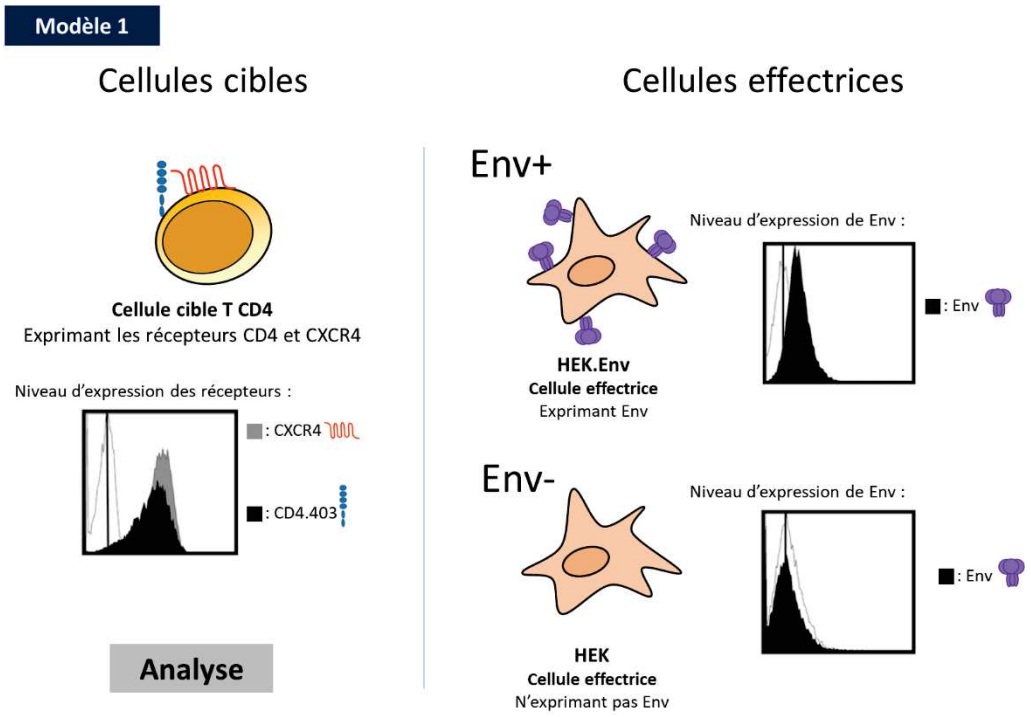


Figure 39 : Description du modèle cellulaire de coculture des cellules T CD4 cibles.

L'expression de la gp120 à la surface des cellules HEK et HEK.Env a été analysée par cytométrie de flux après incubation des cellules avec du PBS (histogramme blanc) ou avec du PBS contenant un anticorps polyclonal humain anti-gp120 (histogramme noir). Les anticorps liés ont été détectés avec un anticorps secondaire de chèvre Ig anti-humain marqué au FITC. L'expression des récepteurs de surface CD4 et CXCR4 des cellules cibles a été réalisée après incubation des cellules avec du PBS (histogramme blanc) ou avec un anticorps anti-CD4 (histogramme noir) ou anti-CXCR4 (histogramme gris) mAb à 10 µg/mL. Les anticorps liées ont été détectés à l'aide d'un anticorps de chèvre Ig anti-souris marqué au FITC. L'intensité de fluorescence est rapportée en mode logarithmique par un cytomètre de flux EPICS XL4.

6 Matériel et Méthodes

6.1 Culture cellulaire

6.1.A Modèle 1

Cellules cibles : cellules T CD4 en suspension exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 (voir Figure 39). On utilise soit :

- Des cellules de lignée CEM (A201.CD4/403). Ce sont des lymphoblastes exprimant un récepteur CD4 tronqué en position 403. Le récepteur CD4 conserve donc sa propriété de reconnaissance par le gp120 mais n'est en revanche plus capable de transmettre les signaux intracellulaires. Ces cellules sont cultivées à 37°C sous atmosphère saturée en humidité de CO_2 à 5% en milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) supplémenté avec 10% de sérum de fœtus bovin (SVF : Sérum de veau foetal) et des antibiotiques (1% de pénicilline-streptomycine) et une pression de sélection de G418 (1 mg/mL). Les cellules sont maintenues à une densité de 5.10^5 cellules/mL.
- Des cellules T CD4 primaires purifiées à partir de cellules mononucléées du sang périphérique par une sélection négative à l'aide du kit d'isolation de CD4 (Stem Cell Technology).

Cellules effectrices : cellules adhérentes HEK.293 stablement transfectées avec un plasmide permettant l'expression de Env (HEK.Env). Des cellules de la même lignée cellulaire n'exprimant pas Env sont utilisées comme contrôle (HEK.293T). Ces cellules sont cultivées à 37°C sous atmosphère saturée en humidité de CO_2 à 5% en milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) supplémenté avec 10% de sérum de fœtus bovin et des antibiotiques (1% de pénicilline-streptomycine). Une pression de sélection de méthotrexate (2 µM) est utilisée pour la culture des cellules HEK.Env.

Coculture : Les cellules effectrices adhérentes ($0.5.10^6$ HEK.293T et HEK.Env) sont lavées puis mises en plaque la veille de la coculture et les cellules T CD4 cibles, sont maintenues à une densité de 5.10^5 cellules/mL dans les conditions de culture précédemment décrites. Le jour de la coculture, les cellules T CD4 cibles exprimant les récepteurs CD4.403 et CXCR4 sont lavées puis reprises en milieu RPMI complet sans pression de sélection pour être enfin ajoutées en plaque aux cellules adhérentes (1.10^6/mL). La coculture des cellules est gardée à

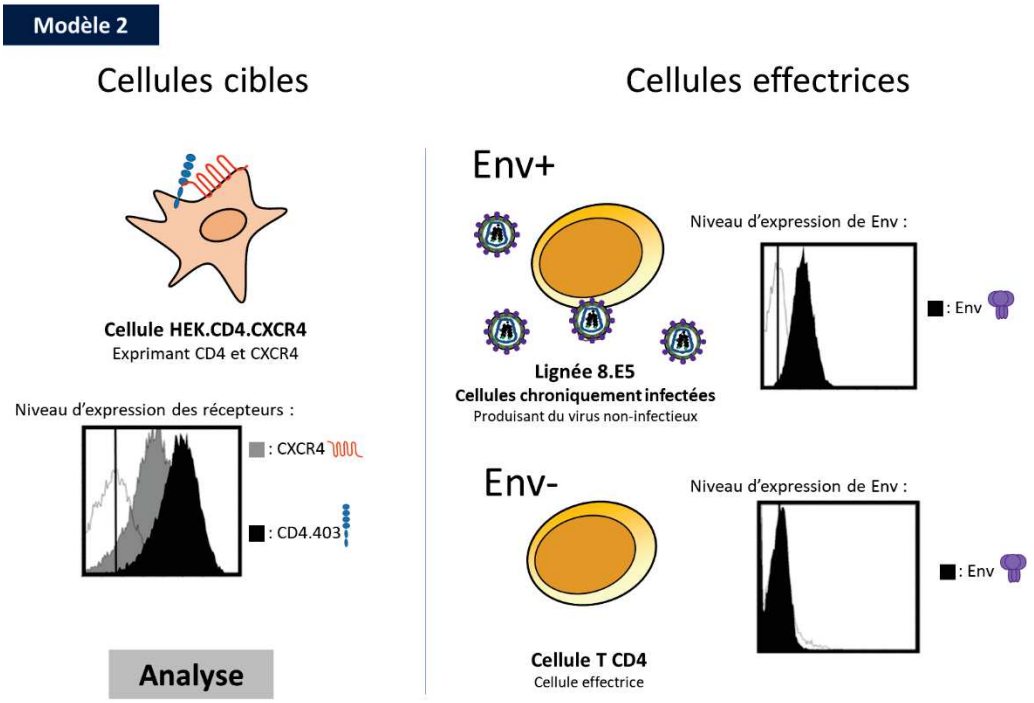


Figure 40 : Description du modèle cellulaire de coculture de cellules adhérentes cibles

L'expression de la gp120 à la surface des cellules 8E5 et T CD4 a été analysée par cytométrie de flux après incubation des cellules avec du PBS (histogramme blanc) ou avec du PBS contenant un anticorps polyclonal humain anti-gp120 (histogramme noir). Les anticorps liés ont été détectés avec un anticorps secondaire de chèvre Ig anti-humain marqué au FITC. L'expression des récepteurs de surface CD4 et CXCR4 des cellules cibles HEK.CD4.CXCR4 a été réalisée après incubation des cellules avec du PBS (histogramme blanc) ou avec un anticorps anti-CD4 (histogramme noir) ou anti-CXCR4 (histogramme gris) mAb à 10 µg/mL. Les anticorps liées ont été détectés à l'aide d'un anticorps de chèvre Ig anti-souris marqué au FITC. L'intensité de fluorescence est rapportée en mode logarithmique par un cytomètre de flux EPICS XL4.

37 °C sous atmosphère saturée en humidité de CO_2 à 5% pendant 48 h. Les cellules cibles ont ensuite été récupérées pour être analysées.

6.1.A.1 Purification cellules T CD4

Des cellules T CD4 primaires sont purifiées à partir de poches de sang obtenues auprès de l'Etablissement Français du Sang (EFS). De façon pratique, le sang est déposé délicatement sur du Ficoll™ afin d'isoler les PBMC. Après centrifugation, l'anneau de cellules est récupéré et les cellules sont lavées au PBS puis comptées pour connaître le total de cellules récupérées. Ces cellules font ensuite l'objet d'une sélection négative selon le protocole du kit « Easy Sep Negative Selection Human CD4 T cells » (Stem Cell Technology #19052). Pour cela, les cellules sont préparées à une concentration de $50x10^6$ cellules/mL dans une solution de PBS, SVF 2% et EDTA 1 mM. Le cocktail d'anticorps « EasySep®Human $CD4^+$T Cell Enrichment Cocktail » est ajouté aux cellules à raison de 50 µL/mL puis incubé à température ambiante pendant 10 minutes. Les billes magnétiques qui vont se coupler aux anticorps « EasySep®D Magnetic Particles » sont ensuite ajoutées aux cellules à raison de 100 µL/mL de cellules. Ce mélange est incubé à température ambiante pendant 5 minutes après avoir été mélangé à la pipette. Le volume est amené à 2,5 mL par addition du tampon PBS-SVF2%-EDTA1mM et mélangé. Les cellules sont ensuite placées dans un aimant « EasySep®Magnet » puis incubées pendant 5 minutes supplémentaires à température ambiante. L'aimant est ensuite inversé en un mouvement continu sans à-coups et les cellules T CD4 sont collectées. Les cellules sont ensuite lavées et cultivées en milieu RPMI complet sans antibiotique avant d'être utilisées en coculture dans notre modèle d'étude.

6.1.B Modèle 2

Cellules cibles : Cellules adhérentes HEK.293 stablement transfectées avec un plasmide permettant l'expression de CD4.403 et CXCR4 en surface (HEK.CD4.03/CXCR4) (voir Figure 40). Ces cellules sont cultivées à 37 °C sous atmosphère saturée en humidité de CO_2 à 5% en milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de fœtus bovin et des antibiotiques (1% de pénicilline-streptomycine). Une pression de sélection de G418 (1 mg/mL) et de Zéocine (250 µg/mL) est utilisée pour la culture des cellules HEK.CD4.403/CXCR4.

Cellules effectrices : Cellules exprimant ou non Env. La lignée cellulaire 8.E5 exprimant Env est dérivée de cellules T CEM contenant une seule copie du VIH-1 intégrée et incapable de

produire des virus infectieux dû à une mutation au niveau de la RT. Ces cellules sont cultivées à 37 °C sous atmosphère saturée en humidité de CO_2 à 5% en milieu RPMI supplémenté avec 10% de sérum de fœtus bovin et des antibiotiques (1% de pénicilline-streptomycine). Les cellules de la lignée cellulaire A201.CD4/403 n'exprimant pas Env sont utilisées comme contrôle.

Coculture : Les cellules cibles adhérentes ($0.5.10^6$ cellules HEK.CD4.403/CXCR4) sont lavées puis mises en plaque la veille de la coculture et les cellules 8.E5 et A201.CD4.403 sont maintenues à une densité de 5.10^5 cellules/mL dans les conditions de culture précédemment décrites. Le jour de la coculture, les cellules en suspension 8.E5 et A201.CD4.403 (1.10^6 cellules/ml) exprimant ou non Env sont lavées puis reprises en milieu RPMI complet sans pression de sélection pour être enfin ajoutées en plaque aux cellules adhérentes. La coculture des cellules est gardée à 37 °C sous atmosphère saturée en humidité de CO_2 à 5% pendant 48 h. Les cellules en suspension sont retirées de la coculture afin de récupérer les cellules cibles pour être analysées.

6.2 Réactifs et Anticorps

6.2.A Réactifs

Plusieurs drogues ont été utilisées dans les expériences.

- L'AMD3100 (1 µg/mL, Sigma-Aldrich A5602) est un antagoniste du récepteur CXCR4 qui empêche son interaction avec la gp120 (Donzella *et al*. 1998).
- Le NAC (N-acétyl-L cysteine) est un puissant antioxydant utilisé dans les cocultures à 10 mM durant 48 h (N-Acetyl-cysteine Sigma A7250).
- La PEG-catalase (800 Unités/mL, Sigma-Aldrich C4963) est une enzyme catalase sur laquelle a été rajouté un PEG censé permettre à la protéine de traverser la membrane plasmique et de pénétrer dans la cellule. Elle a été incubée durant 24 h ou 48 h avec des cellules T CD4 (A201.CD4.403).

L'autophagie a été inhibée par différentes drogues :

- Spautin1 (50 µM, Sigma SML0440) est inhibiteur de DUB (enzyme de de-ubiquitination). Cette drogue agit sur les phases précoces de l'autophagie en inhibant

l'activité de USP10 et USP13, protéines responsables de la dé-ubiquitination de Beclin1, modification connue pour affecter la stabilité de cette protéine.

- Les antiprotéases (E64d + Pepstatine A, 10 µg/mL chacun, Sigma-Aldrich E8640, P5318) sont des inhibiteurs spécifiques des protéases lysosomales (Cathepsine B et Cathepsine D, respectivement). Ces composés permettent d'inhiber l'étape dégradative de l'autophagie.
- La Bafilomycine A1 (100 nM, Sigma-Aldrich B1793) est un inhibiteur de la V-ATPase qui permet d'inhiber la fusion entre les autophagosomes avec les lysosomes (Yoshimori *et al*. 1991).

6.2.B Anticorps

Les anticorps suivant ont été utilisés : l'anticorps polyclonal lapin anti-Pex14 (ProteinTech : 10594-1AP), l'anticorps de lapin anti-catalase (Abcam ab1877-10), l'anticorps de souris anti-Beclin1 (ProteinTech : 11306-1-AP), l'anticorps de souris anti-p62 (Abcam AB56416), l'anticorps de lapin anti-NBR1 (Genetex GTX114539), l'anticorps de souris anti-Cathepsine D (Abcam ab6313), l'anticorps polyclonal de souris anti-GAPDH (Sigma G9295) couplé avec l'enzyme HRP de révélation.

Les anticorps secondaires reconnaissant les immunoglobulines de souris ou de lapin couplés HRP (Horseradish Peroxidase) (Sigma A9044, A0545) ont été utilisés en chimioluminescence dans les expériences de Western Blot. Ceux couplés aux fluorochromes Alexa 488 et Alexa 555 (Invitrogen A11017, A21069) ont été utilisés en immunofluorescence.

6.3 Transfections

6.3.A ARN interférence

Pour l'interférence ARN, un pool de plusieurs séquences de siRNA (Dharmacon) a été utilisé pour cibler les ARNm de Beclin1, p62 ou NBR1.

- siBeclin1 : 5'-UGGUUUACAUGUCGACUAA-3', 5'-UGGUUUACAUGUUGUGUGA-3', 5'-UGGUUUACAUGUUUUCUGA-3', 5'-UGGUUUACAUGUUUUCCUA-3')
- sip62/SQSTM1 : 5'-GAAAUGGGUCCACCAGGAA-3', 5'-GAUCUGCGAUGGCUGCAAU-3', 5'-GCAUUGAAGUUGAUAUCGA-3', 5'-GAAGUGGACCCGUCUACAG-3'

- siNBR1 : 5'-GAGAACAAGUGGUUAACGA-3', 5'-CCACAUGACAGUCCUUUAA-3', 5'-GAACGUAUACUUCCCAUUG-3', 5'-AGAAGCCACUUGCACAUUA-3'

Un total de 0,5x10^6 cellules cibles adhérentes (Modèle2) ont été transfectées avec 20 nM de siRNA (siRNA spécifiques ou siRNA non spécifiques contrôles), selon les instructions du fournisseur au moyen de la LipoRNAiMax (Invitrogen P/N56531). 24 h après la transfection, les cellules effectrices exprimant ou non Env ont été ajoutées pour une coculture de 48 h.

6.3.B Plasmides et Transfections

Les plasmides ont été amplifiés et purifiés sur colonne « endotoxin free » (Machery-Nagel). Les plasmides utilisés sont : GFP-SKL (Addgene#53450), MIG-empty (fourni par Dr G. Bossis), MIG-catalase (fourni par Dr G. Bossis), Plasmide d'enveloppe VSV-G (Vésicular Stomatitis Virus - Glycoproteins) (équipe), pc57gp – Plasmide de gènes GAG et POL du virus MLV (fourni Dr J-L. Battini).

Les transfections de cellules adhérentes ont été réalisées suivant les recommandations du fournisseur avec l'agent de transfection Turbofect (Thermo-Scientifics R0531).

6.4 Production vecteurs rétroviraux

Des cellules HEK.293T ont été transfectées de façon transitoire avec le plasmides pc57gp, le plasmide de l'enveloppe VSV-G et MIG-empty ou MIG-catalase pour produire des rétrovirus murins pseudotypés VSV-G (enveloppe à large tropisme). Ces virus ont été récupérés dans le surnageant après 48 h de transfection et ont été concentrés par ultracentrifugation sur coussin de sucrose avant d'être utilisés pour infecter des cellules T CD4 cibles (A201.CD4.403) pendant 48 h. L'infection des cellules T CD4 a pu être observée par la production de GFP une fois le rétrovirus intégré au génome de la cellule hôte. Les cellules infectées avec les rétrovirus produits par la transfection avec le pMIG-empty ont intégré à leur génome l'expression de GFP qui est mesurée par cytométrie de flux. Les cellules infectées avec les rétrovirus produits par la transfection MIG-catalase expriment la catalase et GFP qui est mesurée par cytométrie de flux également.

6.5 RT-PCR

Les cellules cibles ont été récupérées et l'ARN de ces cellules a été extrait selon le protocole du kit d'extraction ARN (Machery-Nagel « Nucleospin RNA Plus 740984.50 »). L'ARN extrait a ensuite été dosé par spectrophotométrie pour utiliser la quantité d'ARNm recommandée pour la réaction de RT PCR selon le kit Quiagen (OneStep RT-PCR kit 210212). Les séquences d'oligonucléotidiques sens et antisens utilisées pour la PCR ciblant Pex14 (5'-gggctgacagatgaagagattg-3' et 5'- cctggatcttctgctgctgctg -3' respectivement) ont été synthétisées par Sigma. Les produits de la réaction RT-PCR ont ensuite été déposés sur gel d'agarose pour quantifier la variation d'expression de l'ARNm de Pex14 dans les différentes conditions. Le niveau d'ARNm de la GAPDH (5'-cccatcaccatcttccag-3' et 5'-cctgcttcaccaccttct-3') a été utilisé comme contrôle de gène de ménage invariant.

6.6 Western Blot

Les cellules cibles de la coculture sont récupérées par centrifugation. Les culots cellulaires sont directement lysés dans un tampon Laemmli 2x et incubé 10 minutes à 95 °C afin dénaturer les protéines. Les protéines des lysats ont été séparées sur un gel Prosieve (Lonza N°50618) 12%. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidene) (Immobilon Milipore 42892-3). Après saturation par une solution de PBS-Caséine 0,5% (45 min) à température ambiante sous agitation, les blots ont été incubés sous agitation toute la nuit à 4 °C ou 2 h à température ambiante avec une solution de PBS-Caséine contenant l'anticorps primaire (dilution recommandée par le fournisseur). Après 3 lavages sous agitation au PBS-Tween 0,05%, les blots sont incubés durant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire adapté à la reconnaissance du type d'anticorps primaire couplé à l'enzyme peroxidase (HRP). Enfin, 3 lavages sous agitation au PBS-Tween 0,05% sont effectués avant de révéler les complexes d'anticorps par chimioluminescence grâce au kit ECL (Clarity Western ECL Substrate Biorad (170-5061) ou Luminata Forte Milipore WBLUF0500). La caméra ChemiDoc (Biorad) a été utilisée pour capter l'intensité de chimioluminescence. La GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge de référence. La quantification de la densitométrie des images a été analysée à l'aide du programme Image Lab (Biorad).

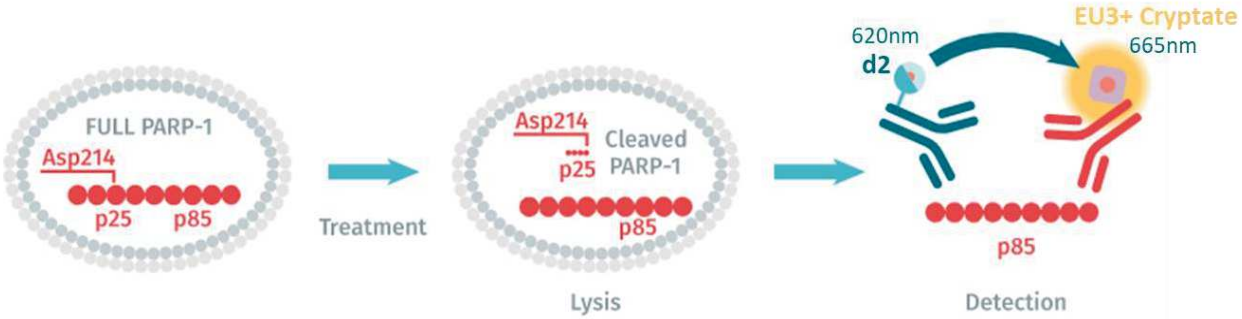


Figure 41 : Principe du kit HTRF de quantification de l'apoptose par détection du clivage de PARP-1

6.7 HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence)

- Détection de l'apoptose par dosage du clivage de la PARP (Asp124) (Cisbio 64PARPEG) : Après 48 h de coculture, les cellules cibles ont été récupérées pour être lysées dans 50 µL de tampon de lyse du kit. Les échantillons sont incubés 30 minutes sur vortex à température ambiante. Les lysats sont ensuite incubés avec deux anticorps monoclonaux capables de reconnaitre le fragment de PARP-1 clivé p85. Un anticorps est marqué avec le donneur EU3+ Cryptate et l'autre anticorps est marqué avec l'accepteur d2 (voir Figure 41). La proximité entre le donneur et l'accepteur mène à un signal de transfert d'énergie (TR-FRET) proportionnel au nombre de cellules en apoptose. Ces réactions ont été réalisées dans une plaque blanche à 384 puits et le signal émis par les anticorps a été mesuré par un appareil monochromatique de lecture de fluorescence (TECAN). Les données sont ensuite exprimées sous forme d'un ratio calculant l'intensité de fluorescence à 665 nm (émission avec transfert de fluorescence) rapportée à l'intensité de fluorescence à 620 nm (émission sans transfert), qui est ensuite multiplié par un facteur 10 000 afin de manipuler plus aisément les ratios.
- Détection de la pyroptose par dosage de la production d'IL1β (Cisbio 62HIL1BPET) : Le surnageant et le lysat des cellules cibles ont été quantifiés par HTRF pour la présence d'IL1β. Ils ont été incubés selon le protocole du kit avec les anticorps marqués avec les molécules donneur ou accepteur d'énergie. Ces réactions ont été réalisées dans une plaque blanche à 384 puits et le signal émis par les anticorps a été mesuré par un appareil monochromatique de lecture de fluorescence (TECAN). Les données sont ensuite exprimées sous forme d'un ratio calculant l'intensité de fluorescence à 665 nm (émission avec transfert de fluorescence) rapportée à l'intensité de fluorescence à 620 nm (émission sans transfert), qui est ensuite multiplié par un facteur 10 000 afin de manipuler plus aisément les ratios.

6.8 Dosage des ROS à l'aide de la sonde DHR123 (DiHydroRhodamine 123)

La DHR123 (ThermoFisher D632) est ajoutée à la coculture (Modèle1). Cette sonde est un fluorochrome lipophile sensible au peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui pénètre facilement dans la cellule. La DHR123 fluoresce quand elle est oxydée par les ROS. Elle est directement ajoutée dans le milieu de culture et incubée 1 h à 37 °C dans une atmosphère saturée en humidité de

CO_2 5%. Les cellules sont ensuite récupérées et re-suspendues dans un tampon HBSS avant de mesurer la fluorescence à 543 nm par cytométrie en flux (Beckman Coulter).

6.9 ImmunoFluorescence

Les cellules cibles ont été récupérées après 48 h de coculture avec les cellules effectrices. Les cellules cibles en suspension (Modèle 1) sont incubées dans un milieu RPMI non complémenté à 37 °C pendant 3 h sur des lamelles de verres couvertes de poly-lysine afin d'y adhérer. Les cellules cibles adhérentes (Modèle 2) sont cultivées sur lamelles de verre.

IF Pex14 (Modèle 2) : Après lavage au PBS, les cellules ont été fixées pendant 10 minutes avec une solution de Formaline-Triton 0,1% (Sigma HT5011-15mL). Après 3 nouveaux lavages avec une solution de blocage (PBS, SVF 1%, Saponine 0,5%), les lamelles ont été incubées dans la solution de blocage contenant un anticorps primaire (Pex14, dilution 1/1000) pour une incubation de 1h30 à température ambiante. Les lamelles ont ensuite été lavées 3 fois avec la solution de blocage avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire (Alexa 568, dilution 1/2000) pendant 1 h à l'abri de la lumière. Enfin, les lamelles ont été lavées au PBS puis à l'eau avant d'être incubées pendant 3 minutes avec une solution de DAPI permettant le marquage du noyau. Après un dernier lavage au PBS, les lamelles sont montées sur des lames de microscopie grâce au Prolong (Invitrogen P36930).

IF Pex14/Cathepsine D (Modèle 1) : Après lavage au PBS, les cellules ont été fixées pendant 10 minutes avec une solution de Formaline-Triton 0,5% fixées pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite saturées par une solution de blocage (PBS, SVF 1%, Saponine 0,5%) puis incubées avec deux anticorps primaires dirigés contre Cathepsine D (dilution 1/500) et Pex14 (dilution 1/1000). Après une étape de lavage, les cellules sont incubées avec des anticorps secondaires couplés à un fluorophore (Alexa488 et Alexa568, dilution 1/3000 et 1/2000 respectivement). Enfin les noyaux cellulaires sont marqués avec du DAPI et la lamelle est montée sur la lame avec du Prolong.

6.10 DAB (3,3'-diaminobenzidine)

Les cellules cibles (Modèle 1) sont récupérées après 48 h de coculture avec les cellules effectrices puis incubées dans un milieu RPMI non complémenté à 37 °C pendant 3 h sur des lamelles de verres couvertes de polylysine afin d'y adhérer. Après lavage au PBS, les cellules

sont fixées pendant 10 minutes avec une solution de Formalin-triton 0,2%. Les lamelles sont ensuite incubées durant 15 minutes avec une solution de DAB (3,3'-diaminobenzidine) préparée selon les instructions du fournisseur (Sigma-Aldrich, D4293). Après 3 lavages à l'eau, les lamelles sont montées sur des lames de microscopie grâce au Prolong (Invitrogen P36930). Les lamelles ont été analysées sur un microscope à lumière blanche (grossissement optique 63x avec immersion à l'huile). Les images ont été analysées à l'aide du logiciel « ImageJ ».

6.11 Analyse Imagerie Confocale

Les lames de microscopies ont été analysées à l'aide d'un microscope confocal Leica Sp5-SMD objectif 63x à immersion d'huile, et zoom numérique 2x (Plateforme MRI). Les images ont été acquises dans le volume de la cellule avec des tranches optiques (Z) de 1 µm (correspondant à la taille maximale connue d'un peroxysome).

6.11.A Cell Profiler

Le logiciel « ImageJ » a permis l'étude de cellules entières. Les images des différents plans d'une même cellule isolée ont ensuite été introduites dans le logiciel d'analyse d'images « Cell Profiler ». Ce logiciel a la capacité de mesurer l'aire de chaque marquage Pex14. « Cell Profiler » a ensuite classifié chaque objet mesuré dans les différents plans de la cellule isolée selon le seuil choisi de 0,7 µm diamètre. Nous avons choisi ce seuil de 0,7 µm afin de distinguer les peroxysomes « matures » des peroxysomes plus petits qui sont les peroxysomes immatures et divisés par fission. Le nombre de peroxysomes « matures » et nombre total de peroxysomes par cellule a été recueilli du logiciel « Cell Profiler » et le rapport de ces chiffres a été analysé dans Excel (Microsoft). Ces rapports sont ensuite comparés pour chaque type de condition (exposé ou non à Env).

6.11.B Imaris

Les images confocales acquises ont été utilisées dans le logiciel « Imaris » pour reconstituer chaque cellule de façon tridimensionnelle. Ce logiciel « Imaris » a ensuite été utilisé pour quantifier la colocalisation entre deux types d'organelles (les peroxysomes et les lysosomes). « Imaris » permet d'identifier chaque marquage et de le modéliser par des vésicules sphériques de 1 µm de diamètre. La colocalisation des sphères modélisées de peroxysomes (marquage Pex14) par rapport aux sphères de lysosomes (marquage Cathepsine D) peut être mesurée par « Imaris » à un seuil de 0,3 µm. Ce nombre de sphères de peroxysomes

colocalisant ou non avec les sphères de lysosomes est calculé dans le volume de la cellule par « Imaris ». Ces nombres sont ensuite reportés dans Excel pour calculer le rapport du nombre de peroxysomes colocalisés avec des lysosomes et le nombre total de peroxysomes pour chaque cellule. Ces rapports sont ensuite comparés pour chaque type de condition (exposé ou non à Env).

6.12 Statistiques

Les différences sont considérées significatives à *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001

La variance des résultats a été mesurée grâce au test t sur GraphPad Prism

Bibliographie

7 Bibliographie

« N-Acetyl-cysteine A7250 ». s. d. Sigma-Aldrich. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/a7250.

Abram, M. E., A. L. Ferris, K. Das, O. Quinones, W. Shao, S. Tuske, W. G. Alvord, E. Arnold, et S. H. Hughes. 2014. « Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase Affect the Errors Made in a Single Cycle of Viral Replication ». *Journal of Virology* 88 (13): 7589-7601. https://doi.org/10.1128/JVI.00302-14.

Ahmed, Zahra, Tatsuyoshi Kawamura, Shinji Shimada, et Vincent Piguet. 2015. « The Role of Human Dendritic Cells in HIV-1 Infection ». *Journal of Investigative Dermatology* 135 (5): 1225-33. https://doi.org/10.1038/jid.2014.490.

Alimonti, J. B. 2003. « Mechanisms of CD4+ T Lymphocyte Cell Death in Human Immunodeficiency Virus Infection and AIDS ». *Journal of General Virology* 84 (7): 1649-61. https://doi.org/10.1099/vir.0.19110-0.

Anding, Allyson L., et Eric H. Baehrecke. 2017. « Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles ». *Developmental Cell* 41 (1): 10-22. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.02.016.

Appay, V., et D. Sauce. 2008. « Immune Activation and Inflammation in HIV-1 Infection: Causes and Consequences ». *The Journal of Pathology* 214 (2): 231-41. https://doi.org/10.1002/path.2276.

Arhel, Nathalie. 2010. « Revisiting HIV-1 uncoating ». *Retrovirology* 7 (novembre): 96. https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-96.

Aukrust, P., A. M. Svardal, F. Muller, B. Lunden, R. K. Berge, P. M. Ueland, et S. S. Froland. 1995. « Increased Levels of Oxidized Glutathione in CD4+ Lymphocytes Associated with Disturbed Intracellular Redox Balance in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection ». *Blood* 86 (1): 258-67.

Aukrust, Pål, Luisa Luna, Thor Ueland, Rune F. Johansen, Fredrik Müller, Stig S. Frøland, Erling C. Seeberg, et Magnar Bjørås. 2005. « Impaired Base Excision Repair and Accumulation of Oxidative Base Lesions in CD4+ T Cells of HIV-Infected Patients ». *Blood* 105 (12): 4730-35. https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4272.

Axe, Elizabeth L., Simon A. Walker, Maria Manifava, Priya Chandra, H. Llewelyn Roderick, Anja Habermann, Gareth Griffiths, et Nicholas T. Ktistakis. 2008. « Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum ». *The Journal of Cell Biology* 182 (4): 685-701. https://doi.org/10.1083/jcb.200803137.

Ayyavoo, Velpandi, S. Mahalingam, Yosef Rafaeli, Sagar Kudchodkar, David Chang, T. Nagashunmugam, William V. Williams, et David B. Weiner. 1997. « HIV-1 Viral Protein R (Vpr) Regulates Viral Replication and Cellular Proliferation in T Cells and Monocytoid Cells in Vitro ». *Journal of Leukocyte Biology* 62 (1): 93-99. https://doi.org/10.1002/jlb.62.1.93.

Badley, A D, A Sainski, F Wightman, et S R Lewin. 2013. « Altering cell death pathways as an approach to cure HIV infection ». *Cell Death & Disease* 4 (7): e718. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.248.

Baier-Bitterlich, G., H. Wachter, et D. Fuchs. 1996. « Oxidative Stress and Apoptosis in HIV Infection ». *Science (New York, N.Y.)* 271 (5249): 582-83. https://doi.org/10.1126/science.271.5249.582.

Ballocca, Flavia, Fabrizio D'Ascenzo, Sebastiano Gili, Walter Grosso Marra, et Fiorenzo Gaita. 2017. « Cardiovascular disease in patients with HIV ». *Trends in Cardiovascular Medicine* 27 (8): 558-63. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2017.06.005.

Bandyopadhyay, Urmi, Susmita Kaushik, Lyuba Varticovski, et Ana Maria Cuervo. 2008. « The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (18): 5747-63. https://doi.org/10.1128/MCB.02070-07.

Banki, Katalin, Eliza Hutter, Nick J. Gonchoroff, et Andras Perl. 1998. « Molecular Ordering in HIV-Induced Apoptosis OXIDATIVE STRESS, ACTIVATION OF CASPASES, AND CELL SURVIVAL ARE REGULATED BY TRANSALDOLASE ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (19): 11944-53. https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11944.

Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, et al. 1983. « Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) ». *Science* 220 (4599): 868-71. https://doi.org/10.1126/science.6189183.

Barré-Sinoussi, Françoise, Anna Laura Ross, et Jean-François Delfraissy. 2013. « Past, Present and Future: 30 Years of HIV Research ». *Nature Reviews Microbiology* 11 (12): 877-83. https://doi.org/10.1038/nrmicro3132.

Baruchel, Sylvain, et Mark A. Wainberg. 1992. « The Role of Oxidative Stress in Disease Progression in Individuals Infected by the Human Immunodeficiency Virus ». *Journal of Leukocyte Biology* 52 (1): 111-14. https://doi.org/10.1002/jlb.52.1.111.

Becker, Katja, Stephan Gromer, R. Heiner Schirmer, et Sylke Müller. 2000. « Thioredoxin Reductase as a Pathophysiological Factor and Drug Target ». *European Journal of Biochemistry* 267 (20): 6118-25. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01703.x.

Belikov, Aleksey V., Burkhart Schraven, et Luca Simeoni. 2015. « T cells and reactive oxygen species ». *Journal of Biomedical Science* 22 (octobre). https://doi.org/10.1186/s12929-015-0194-3.

Bell, Neil M., et Andrew M. L. Lever. 2013. « HIV Gag Polyprotein: Processing and Early Viral Particle Assembly ». *Trends in Microbiology* 21 (3): 136-44. https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.006.

Bellezza, Ilaria, Ileana Giambanco, Alba Minelli, et Rosario Donato. 2018. « Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1865 (5): 721-33. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.

Bento, Carla F., Maurizio Renna, Ghita Ghislat, Claudia Puri, Avraham Ashkenazi, Mariella Vicinanza, Fiona M. Menzies, et David C. Rubinsztein. 2016. « Mammalian Autophagy: How Does It Work? » *Annual Review of Biochemistry* 85 (1): null. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014556.

Berry, Deborah L., et Eric H. Baehrecke. 2007. « Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila ». *Cell* 131 (6): 1137-48. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.048.

Betin, Virginie M. S., et Jon D. Lane. 2009. « Caspase Cleavage of Atg4D Stimulates GABARAP-L1 Processing and Triggers Mitochondrial Targeting and Apoptosis ». *Journal of Cell Science* 122 (14): 2554-66. https://doi.org/10.1242/jcs.046250.

Birgisdottir, Åsa Birna, Trond Lamark, et Terje Johansen. 2013. « The LIR Motif – Crucial for Selective Autophagy ». *J Cell Sci* 126 (15): 3237-47. https://doi.org/10.1242/jcs.126128.

Bjørkøy, Geir, Trond Lamark, Andreas Brech, Heidi Outzen, Maria Perander, Aud Øvervatn, Harald Stenmark, et Terje Johansen. 2005. « p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death ». *The Journal of Cell Biology* 171 (4): 603-14. https://doi.org/10.1083/jcb.200507002.

Blanchet, Fabien P., Arnaud Moris, Damjan S. Nikolic, Martin Lehmann, Sylvain Cardinaud, Romaine Stalder, Eduardo Garcia, et al. 2010. « Human Immunodeficiency Virus-1 Inhibition of Immunoamphisomes in Dendritic Cells Impairs Early Innate and Adaptive Immune Responses ». *Immunity* 32 (5): 654-69. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.011.

Blumenthal, Robert, Stewart Durell, et Mathias Viard. 2012. « HIV Entry and Envelope Glycoprotein-Mediated Fusion ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (49): 40841-49. https://doi.org/10.1074/jbc.R112.406272.

Borel, Sophie, Véronique Robert-hebmann, Jamal Alfaisal, Ashish Jain, Mathias Faure, Lucile Espert, Laurent Chaloin, Jean-christophe Paillart, Terje Johansen, et Martine Biard-piechaczyk. 2015. « Hiv-1 Viral Infectivity Factor Interacts with Microtubule-Associated Protein Light Chain 3 and Inhibits Autophagy ». *Aids* 29 (3): 275-86. https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000554.

Boya, Patricia, Fulvio Reggiori, et Patrice Codogno. 2013. « Emerging Regulation and Functions of Autophagy ». *Nature Cell Biology* 15 (7): 713-20. https://doi.org/10.1038/ncb2788.

Brass, Abraham L., Derek M. Dykxhoorn, Yair Benita, Nan Yan, Alan Engelman, Ramnik J. Xavier, Judy Lieberman, et Stephen J. Elledge. 2008. « Identification of Host Proteins Required for HIV Infection Through a Functional Genomic Screen ». *Science* 319 (5865): 921-26. https://doi.org/10.1126/science.1152725.

Brenchley, Jason M., David A. Price, Timothy W. Schacker, Tedi E. Asher, Guido Silvestri, Srinivas Rao, Zachary Kazzaz, et al. 2006. « Microbial Translocation Is a Cause of Systemic Immune Activation in Chronic HIV Infection ». *Nature Medicine* 12 (12): 1365. https://doi.org/10.1038/nm1511.

Brenner, Andrew P. Halestrap and Catherine. 2003. « The Adenine Nucleotide Translocase: A Central Component of the Mitochondrial Permeability Transition Pore and Key Player in Cell Death ». Current Medicinal Chemistry. 31 juillet 2003. http://www.eurekaselect.com/64034/article.

Budanov, Andrei V., et Michael Karin. 2008. « p53 Target Genes Sestrin1 and Sestrin2 Connect Genotoxic Stress and mTOR Signaling ». *Cell* 134 (3): 451-60. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.028.

Burgener, Adam, Ian McGowan, et Nichole R Klatt. 2015. « HIV and mucosal barrier interactions: consequences for transmission and pathogenesis ». *Current Opinion in Immunology*, Host pathogens * Allergy and hypersensitivity, 36 (octobre): 22-30. https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.06.004.

Campbell, Grant R., Pratima Rawat, Rachel S. Bruckman, et Stephen A. Spector. 2015. « Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Inhibits Autophagy through Transcription Factor EB Sequestration ». *PLoS Pathogens* 11 (6). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005018.

Carroll, Antonia, et Bruce Brew. 2017. « HIV-associated neurocognitive disorders: recent advances in pathogenesis, biomarkers, and treatment ». *F1000Research* 6 (mars). https://doi.org/10.12688/f1000research.10651.1.

Casella, Carolyn R., Eric L. Rapaport, et Terri H. Finkel. 1999. « Vpu Increases Susceptibility of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Cells to Fas Killing ». *Journal of Virology* 73 (1): 92-100.

Castellino, Flora, et Ronald N. Germain. 2006. « COOPERATION BETWEEN CD4+ AND CD8+ T CELLS: When, Where, and How ». *Annual Review of Immunology* 24 (1): 519-40. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115825.

Chan, Edmond Y., et Sharon A. Tooze. 2009. « Evolution of Atg1 Function and Regulation ». *Autophagy* 5 (6): 758-65.

Chirullo, B, R Sgarbanti, D Limongi, I L Shytaj, D Alvarez, B Das, A Boe, et al. 2013. « A candidate anti-HIV reservoir compound, auranofin, exerts a selective 'anti-memory' effect by exploiting the baseline oxidative status of lymphocytes ». *Cell Death & Disease* 4 (12): e944. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.473.

Chougui, Ghina, et Florence Margottin-Goguet. 2019. « HUSH, a Link Between Intrinsic Immunity and HIV Latency ». *Frontiers in Microbiology* 10 (février). https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00224.

Cinci, Lorenzo, Lorenzo Di Cesare Mannelli, Matteo Zanardelli, Laura Micheli, Daniele Guasti, et Carla Ghelardini. 2014. « Peroxisome determination in optical microscopy: A useful tool derived by a simplification of an old ultrastructural technique ». *Acta Histochemica* 116 (5): 863-70. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.02.006.

Clutter, Dana S, Michael R Jordan, Silvia Bertagnolio, et Robert W Shafer. 2016. « HIV-1 Drug Resistance and Resistance Testing ». *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 46 (décembre): 292-307. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.031.

Codogno, Patrice, Maryam Mehrpour, et Tassula Proikas-Cezanne. 2012. « Canonical and Non-Canonical Autophagy: Variations on a Common Theme of Self-Eating? » *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (1): 7-12. https://doi.org/10.1038/nrm3249.

Connor, Ruth I., Benjamin Kuan Chen, Sunny Choe, et Nathaniel R. Landau. 1995. « Vpr Is Required for Efficient Replication of Human Immunodeficiency Virus Type-1 in Mononuclear Phagocytes ». *Virology* 206 (2): 935-44. https://doi.org/10.1006/viro.1995.1016.

Conticello, Silvestro G, Reuben S Harris, et Michael S Neuberger. 2003. « The Vif Protein of HIV Triggers Degradation of the Human Antiretroviral DNA Deaminase APOBEC3G ». *Current Biology* 13 (22): 2009-13. https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.034.

Couret, Jennifer, et Theresa L. Chang. 2016. « Reactive Oxygen Species in HIV Infection ». *EC microbiology* 3 (6): 597-604.

Craigie, Robert, et Frederic D. Bushman. 2012. « HIV DNA Integration ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (7). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006890.

Crighton, Diane, Simon Wilkinson, Jim O'Prey, Nelofer Syed, Paul Smith, Paul R. Harrison, Milena Gasco, Ornella Garrone, Tim Crook, et Kevin M. Ryan. 2006. « DRAM, a P53-Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis ». *Cell* 126 (1): 121-34. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.034.

Crotty, Shane. 2015. « A brief history of T cell help to B cells ». *Nature reviews. Immunology* 15 (3): 185-89. https://doi.org/10.1038/nri3803.

Damme, Markus, Taina Suntio, Paul Saftig, et Eeva-Liisa Eskelinen. 2015. « Autophagy in Neuronal Cells: General Principles and Physiological and Pathological Functions ». *Acta Neuropathologica* 129 (3): 337-62. https://doi.org/10.1007/s00401-014-1361-4.

Daussy, Coralie F., et Lucile Espert. 2016. « L'autophagie sélective au cours des infections virales ». *Virologie* 20 (4): 196-206. https://doi.org/10.1684/vir.2016.0665.

Deng, Jingfan, Jiao Feng, Tong Liu, Xiya Lu, Wenwen Wang, Ning Liu, Yang Lv, Qing Liu, Chuanyong Guo, et Yingqun Zhou. 2018. « Beraprost sodium preconditioning prevents inflammation, apoptosis, and autophagy during hepatic ischemia-reperfusion injury in mice via the P38 and JNK pathways ». *Drug Design, Development and Therapy* 12 (novembre): 4067-82. https://doi.org/10.2147/DDDT.S182292.

Denizot, Mélanie, Mihayl Varbanov, Lucile Espert, Véronique Robert-Hebmann, Sophie Sagnier, Elisabet Garcia Elisabet Garcia, Marta Curriu, Robert Mamoun, Julià Blanco, et Martine Biard-Piechaczyk. 2008. « HIV-

1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells ». *Autophagy* 4 (8): 998-1008. https://doi.org/10.4161/auto.6880.

Denton, Donna, Bhupendra Shravage, Rachel Simin, Kathryn Mills, Deborah L Berry, Eric H Baehrecke, et Sharad Kumar. 2009. « Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in Drosophila ». *Current biology : CB* 19 (20): 1741-46. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.042.

Deosaran, Elizabeth, Kenneth B. Larsen, Rong Hua, Graeme Sargent, Yuqing Wang, Sarah Kim, Trond Lamark, et al. 2013. « NBR1 Acts as an Autophagy Receptor for Peroxisomes ». *J Cell Sci* 126 (4): 939-52. https://doi.org/10.1242/jcs.114819.

Deretic, Vojo, Tatsuya Saitoh, et Shizuo Akira. 2013. « Autophagy in infection, inflammation, and immunity ». *Nature reviews. Immunology* 13 (10): 722-37. https://doi.org/10.1038/nri3532.

Deter, Russell L., Pierre Baudhuin, et Christian de Duve. 1967. « Participation of Lysosomes in Cellular Autophagy Induced in Rat Liver by Glucagon ». *The Journal of Cell Biology* 35 (2): C11-16. https://doi.org/10.1083/jcb.35.2.C11.

Ding, Siyuan, et Michael D. Robek. 2014. « Peroxisomal MAVS Activates IRF1-Mediated IFN-λ Production ». *Nature Immunology* 15 (8): 700-701. https://doi.org/10.1038/ni.2924.

Dixit, Evelyn, Steeve Boulant, Yijing Zhang, Amy S. Y. Lee, Charlotte Odendall, Bennett Shum, Nir Hacohen, et al. 2010. « Peroxisomes Are Signaling Platforms for Antiviral Innate Immunity ». *Cell* 141 (4): 668-81. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.018.

Dobmeyer, Thomas S, Stephan Findhammer, Jürgen M Dobmeyer, Stefan A Klein, Bernhard Raffel, Dieter Hoelzer, Eilke B Helm, Dieter Kabelitz, et Rita Rossol. 1997. « Ex Vivo Induction of Apoptosis in Lymphocytes Is Mediated by Oxidative Stress: Role for Lymphocyte Loss in HIV Infection ». *Free Radical Biology and Medicine* 22 (5): 775-85. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00403-0.

Doitsh, Gilad, Nicole LK Galloway, Xin Geng, Zhiyuan Yang, Kathryn M. Monroe, Orlando Zepeda, Peter W. Hunt, et al. 2014. « Pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection ». *Nature* 505 (7484): 509-14. https://doi.org/10.1038/nature12940.

Dong, Xiaonan, et Beth Levine. 2013. « Autophagy and Viruses: Adversaries or Allies? » *Journal of innate immunity* 5 (5): 480-93. https://doi.org/10.1159/000346388.

Donzella, G. A., D. Schols, S. W. Lin, J. A. Esté, K. A. Nagashima, P. J. Maddon, G. P. Allaway, et al. 1998. « AMD3100, a Small Molecule Inhibitor of HIV-1 Entry via the CXCR4 Co-Receptor ». *Nature Medicine* 4 (1): 72-77.

Eekels, Julia JM, Sophie Sagnier, Dirk Geerts, Rienk E Jeeninga, Martine Biard-Piechaczyk, et Ben Berkhout. 2012. « Inhibition of HIV-1 replication with stable RNAi-mediated knockdown of autophagy factors ». *Virology Journal* 9 (mars): 69. https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-69.

Egan, Daniel F, Joungmok Kim, Reuben J Shaw, et Kun-Liang Guan. 2011. « The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR ». *Autophagy* 7 (6): 645-46. https://doi.org/10.4161/auto.7.6.15123.

Eggers, Christian, Gabriele Arendt, Katrin Hahn, Ingo W. Husstedt, Matthias Maschke, Eva Neuen-Jacob, Mark Obermann, Thorsten Rosenkranz, Eva Schielke, et Elmar Straube. 2017. « HIV-1-associated neurocognitive disorder: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment ». *Journal of Neurology* 264 (8): 1715-27. https://doi.org/10.1007/s00415-017-8503-2.

Eskelinen, Eeva-Liisa. 2019. « Autophagy: Supporting cellular and organismal homeostasis by self-eating ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 111 (juin): 1-10. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.03.010.

Espert, Lucile, et Martine Biard-Piechaczyk. 2009. « Autophagy in HIV-Induced T Cell Death ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 335: 307-21. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8_15.

Espert, Lucile, Mélanie Denizot, Marina Grimaldi, Véronique Robert-Hebmann, Bernard Gay, Mihayl Varbanov, Patrice Codogno, et Martine Biard-Piechaczyk. 2006. « Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4 ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (8): 2161-72. https://doi.org/10.1172/JCI26185.

Espert, Lucile, Mihayl Varbanov, Véronique Robert-Hebmann, Sophie Sagnier, Ian Robbins, Françoise Sanchez, Virginie Lafont, et Martine Biard-Piechaczyk. 2009. « Differential Role of Autophagy in CD4 T Cells and Macrophages during X4 and R5 HIV-1 Infection ». *PLoS ONE* 4 (6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005787.

Ewart, G D, T Sutherland, P W Gage, et G B Cox. 1996. « The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. » *Journal of Virology* 70 (10): 7108-15.

Fan, Xian, Bashar S. Staitieh, J. Spencer Jensen, Kara J. Mould, Jared A. Greenberg, Pratibha C. Joshi, Michael Koval, et David M. Guidot. 2013. « Activating the Nrf2-mediated antioxidant response element

restores barrier function in the alveolar epithelium of HIV-1 transgenic rats ». *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 305 (3): L267-77. https://doi.org/10.1152/ajplung.00288.2012.

Farré, Jean-Claude, et Suresh Subramani. 2004. « Peroxisome Turnover by Micropexophagy: An Autophagy-Related Process ». *Trends in Cell Biology* 14 (9): 515-23. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.07.014.

Farré, Subramani. 2016. « Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 17 (9): 537-52. https://doi.org/10.1038/nrm.2016.74.

Feng, Yuqing, Tayyba T. Baig, Robin P. Love, et Linda Chelico. 2014. « Suppression of APOBEC3-mediated restriction of HIV-1 by Vif ». *Frontiers in Microbiology* 5 (août). https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00450.

Février, Michèle, Karim Dorgham, et Angelita Rebollo. 2011. « CD4+ T Cell Depletion in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection: Role of Apoptosis ». *Viruses* 3 (5): 586-612. https://doi.org/10.3390/v3050586.

Fields, Jerel, Wilmar Dumaop, Anthony Adame, Ronald J. Ellis, Scott Letendre, Igor Grant, et Eliezer Masliah. 2013. « Alterations in the Levels of Vesicular Trafficking Proteins Involved in HIV Replication in the Brains and CSF of Patients with HIV-Associated Neurocognitive Disorders ». *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 8 (5): 1197-1209. https://doi.org/10.1007/s11481-013-9511-3.

Filomeni, G, D De Zio, et F Cecconi. 2015. « Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs ». *Cell Death and Differentiation* 22 (3): 377-88. https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150.

Finkel, T. H., G. Tudor-Williams, N. K. Banda, M. F. Cotton, T. Curiel, C. Monks, T. W. Baba, R. M. Ruprecht, et A. Kupfer. 1995. « Apoptosis Occurs Predominantly in Bystander Cells and Not in Productively Infected Cells of HIV- and SIV-Infected Lymph Nodes ». *Nature Medicine* 1 (2): 129-34.

Florey, Oliver, Sung Eun Kim, Cynthia P. Sandoval, Cole M. Haynes, et Michael Overholtzer. 2011. « Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes ». *Nature Cell Biology* 13 (11): 1335-43. https://doi.org/10.1038/ncb2363.

Gabaldón, Toni. 2010. « Peroxisome Diversity and Evolution ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365 (1541): 765-73. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0240.

Gallo, Robert C. 1999. « Tat as one key to HIV-induced immune pathogenesis and Pat toxoid as an important component of a vaccine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (15): 8324-26.

Galluzzi, L, I Vitale, J M Abrams, E S Alnemri, E H Baehrecke, M V Blagosklonny, T M Dawson, et al. 2012. « Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 ». *Cell Death and Differentiation* 19 (1): 107-20. https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96.

Galluzzi, Lorenzo, Eric H Baehrecke, Andrea Ballabio, Patricia Boya, José Manuel Bravo-San Pedro, Francesco Cecconi, Augustine M Choi, et al. 2017. « Molecular definitions of autophagy and related processes ». *The EMBO Journal* 36 (13): 1811-36. https://doi.org/10.15252/embj.201796697.

Galonek, Heidi L., et J. Marie Hardwick. 2006. « Upgrading the BCL-2 Network ». *Nature Cell Biology* 8 (12): 1317. https://doi.org/10.1038/ncb1206-1317.

Gandhi, Nimisha, Zainulabedin Saiyed, Samikkannu Thangavel, Jose Rodriguez, K.V.K. Rao, et Madhavan P.N. Nair. 2009. « Differential Effects of HIV Type 1 Clade B and Clade C Tat Protein on Expression of Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines by Primary Monocytes ». *AIDS Research and Human Retroviruses* 25 (7): 691-99. https://doi.org/10.1089/aid.2008.0299.

Gao, Feng, Elizabeth Bailes, David L. Robertson, Yalu Chen, Cynthia M. Rodenburg, Scott F. Michael, Larry B. Cummins, et al. 1999. « Origin of HIV-1 in the Chimpanzee *Pan Troglodytes Troglodytes* ». *Nature* 397 (6718): 436-41. https://doi.org/10.1038/17130.

Garg, Himanshu, et Robert Blumenthal. 2006. « HIV Gp41-Induced Apoptosis Is Mediated by Caspase-3-Dependent Mitochondrial Depolarization, Which Is Inhibited by HIV Protease Inhibitor Nelfinavir ». *Journal of Leukocyte Biology* 79 (2): 351-62. https://doi.org/10.1189/jlb.0805430.

Geisler, Sven, Kira M. Holmström, Diana Skujat, Fabienne C. Fiesel, Oliver C. Rothfuss, Philipp J. Kahle, et Wolfdieter Springer. 2010. « PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy Is Dependent on VDAC1 and P62/SQSTM1 ». *Nature Cell Biology* 12 (2): 119-31. https://doi.org/10.1038/ncb2012.

Ginet, Vanessa, Julien Puyal, Coralie Rummel, Dominique Aubry, Caroline Breton, Anne-Julie Cloux, Somi R Majjigapu, et al. 2014. « A critical role of autophagy in antileukemia/lymphoma effects of APO866, an inhibitor of NAD biosynthesis ». *Autophagy* 10 (4): 603-17. https://doi.org/10.4161/auto.27722.

Gomez, Candace, et Thomas J. Hope. 2005. « The Ins and Outs of HIV Replication ». *Cellular Microbiology* 7 (5): 621-26. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00516.x.

Gómez-Mora, Elisabet, Marta Massanella, Elisabet García, David Giles, Marta Bernadó, Victor Urrea, Jorge Carrillo, et al. 2017. « Elevated Humoral Response to Cytomegalovirus in HIV-Infected Individuals with Poor CD4+ T-Cell Immune Recovery ». *PLOS ONE* 12 (9): e0184433. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184433.

González, María Eugenia. 2015. « Vpu Protein: The Viroporin Encoded by HIV-1 ». *Viruses* 7 (8): 4352-68. https://doi.org/10.3390/v7082824.

Gordon, Paul B., et Per O. Seglen. 1988. « Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 151 (1): 40-47. https://doi.org/10.1016/0006-291X(88)90556-6.

Gougeon, M.-L. 2005. « To Kill or Be Killed: How HIV Exhausts the Immune System ». *Cell Death & Differentiation* 12 (S1): 845-54. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401616.

Grégoire, Isabel Pombo, Clémence Richetta, Laurène Meyniel-Schicklin, Sophie Borel, Fabrine Pradezynski, Olivier Diaz, Alexandre Deloire, et al. 2011. « IRGM Is a Common Target of RNA Viruses that Subvert the Autophagy Network ». *PLoS Pathogens* 7 (12). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002422.

Grunwald, Douglas S., Neil Michael Otto, Ji-Man Park, Daihyun Song, et Do-Hyung Kim. 2019. « GABARAPs and LC3s have opposite roles in regulating ULK1 for autophagy induction ». *Autophagy* 0 (0): 1-15. https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1632620.

Guenzel, Carolin A., Cécile Hérate, et Serge Benichou. 2014. « HIV-1 Vpr—a still “enigmatic multitasker” ». *Frontiers in Microbiology* 5 (mars). https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00127.

Guerrero, Santiago, Camille Libre, Julien Batisse, Gaëlle Mercenne, Delphine Richer, Géraldine Laumond, Thomas Decoville, Christiane Moog, Roland Marquet, et Jean-Christophe Paillart. 2016. « Translational Regulation of APOBEC3G MRNA by Vif Requires Its 5’UTR and Contributes to Restoring HIV-1 Infectivity ». *Scientific Reports* 6 (décembre): 39507. https://doi.org/10.1038/srep39507.

Gülow, Karsten, Marcin Kamiński, Katalin Darvas, Dorothee Süss, Min Li-Weber, et Peter H. Krammer. 2005. « HIV-1 Trans-Activator of Transcription Substitutes for Oxidative Signaling in Activation-Induced T Cell Death ». *The Journal of Immunology* 174 (9): 5249-60. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5249.

Hatakeyama, Shigetsugu. 2017. « TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis ». *Trends in Biochemical Sciences* 42 (4): 297-311. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.002.

He, Hua, Yongjun Dang, Fangyan Dai, Zekun Guo, Jiaxue Wu, Xinyu She, Yuan Pei, et al. 2003. « Post-Translational Modifications of Three Members of the Human MAP1LC3 Family and Detection of a Novel Type of Modification for MAP1LC3B ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (31): 29278-87. https://doi.org/10.1074/jbc.M303800200.

Heckmann, Bradlee L., et Douglas R. Green. 2019. « LC3-Associated Phagocytosis at a Glance ». *J Cell Sci* 132 (5): jcs222984. https://doi.org/10.1242/jcs.222984.

Heckmann, Bradlee L., Brett J. W. Teubner, Bart Tummers, Emilio Boada-Romero, Lacie Harris, Mao Yang, Clifford S. Guy, Stanislav S. Zakharenko, et Douglas R. Green. 2019. « LC3-Associated Endocytosis Facilitates β-Amyloid Clearance and Mitigates Neurodegeneration in Murine Alzheimer’s Disease ». *Cell* 0 (0). https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.056.

Heinzinger, N K, M I Bukinsky, S A Haggerty, A M Ragland, V Kewalramani, M A Lee, H E Gendelman, L Ratner, M Stevenson, et M Emerman. 1994. « The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (15): 7311-15.

Hemelaar, Joris, Eleanor Gouws, Peter D. Ghys, et Saladin Osmanov. 2011. « Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007 ». *AIDS (London, England)* 25 (5): 679-89. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328342ff93.

Hidalgo, Laura, et Chad M. Swanson. 2017. « Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) MRNA Translation ». *Biochemical Society Transactions* 45 (2): 353-64. https://doi.org/10.1042/BST20160357.

Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R. H. Purcell, et P. R. Johnson. 1989. « An African Primate Lentivirus (SIVsm) Closely Related to HIV-2 ». *Nature* 339 (6223): 389-92. https://doi.org/10.1038/339389a0.

Hofer, Ursula, et Roberto F. Speck. 2009. « Disturbance of the Gut-Associated Lymphoid Tissue Is Associated with Disease Progression in Chronic HIV Infection ». *Seminars in Immunopathology* 31 (2): 257-66. https://doi.org/10.1007/s00281-009-0158-3.

Holmes, Mowgli, Fengwen Zhang, et Paul D. Bieniasz. 2015. « Single-Cell and Single-Cycle Analysis of HIV-1 Replication ». *PLoS Pathogens* 11 (6). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004961.

Holst, B. D., W. L. Hurley, et D. R. Nelson. 1987. « Involution of the Bovine Mammary Gland: Histological and Ultrastructural Changes ». *Journal of Dairy Science* 70 (5): 935-44. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80097-8.

Hoshino, Shigeki, Mitsuru Konishi, Masako Mori, Mari Shimura, Chiaki Nishitani, Yoshio Kuroki, Yoshio Koyanagi, Shigeyuki Kano, Hiroyuki Itabe, et Yukihito Ishizaka. 2010. « HIV-1 Vpr Induces TLR4/MyD88-Mediated IL-6 Production and Reactivates Viral Production from Latency ». *Journal of Leukocyte Biology* 87 (6): 1133-43. https://doi.org/10.1189/jlb.0809547.

Hosokawa, Nao, Taichi Hara, Takeshi Kaizuka, Chieko Kishi, Akito Takamura, Yutaka Miura, Shun-ichiro Iemura, et al. 2009. « Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy ». *Molecular Biology of the Cell* 20 (7): 1981-91. https://doi.org/10.1091/mbc.E08-12-1248.

Hu, Wei-Shau, et Stephen H. Hughes. 2012. « HIV-1 Reverse Transcription ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (10). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882.

huang, Keqiang, et Dongxu liu. 2016. « Targeting Non-Canonical Autophagy Overcomes Erlotinib Resistance in Tongue Cancer ». *Tumor Biology* 37 (7): 9625-33. https://doi.org/10.1007/s13277-015-4689-z.

Islinger, Markus, Alfred Voelkl, H. Dariush Fahimi, et Michael Schrader. 2018. « The Peroxisome: An Update on Mysteries 2.0 ». *Histochemistry and Cell Biology* 150 (5): 443-71. https://doi.org/10.1007/s00418-018-1722-5.

Israël, N., et M. A. Gougerot-Pocidalo. 1997. « Oxidative Stress in Human Immunodeficiency Virus Infection ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 53 (11-12): 864-70.

Ivanov, Alexander V., Vladimir T. Valuev-Elliston, Olga N. Ivanova, Sergey N. Kochetkov, Elizaveta S. Starodubova, Birke Bartosch, et Maria G. Isaguliants. 2016. « Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016. https://doi.org/10.1155/2016/8910396.

Jadhav, Vaishnavi Sunil, Karl-Heinz Krause, et Sunit K. Singh. 2014. « HIV-1 Tat C Modulates NOX2 and NOX4 Expressions through MiR-17 in a Human Microglial Cell Line ». *Journal of Neurochemistry* 131 (6): 803-15. https://doi.org/10.1111/jnc.12933.

Jain, Ashish, Trond Lamark, Eva Sjøttem, Kenneth Bowitz Larsen, Jane Atesoh Awuh, Aud Øvervatn, Michael McMahon, John D. Hayes, et Terje Johansen. 2010. « P62/SQSTM1 Is a Target Gene for Transcription Factor NRF2 and Creates a Positive Feedback Loop by Inducing Antioxidant Response Element-Driven Gene Transcription ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (29): 22576-91. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118976.

Jiang, Li, Sayuri Hara-Kuge, Shun-ichi Yamashita, et Yukio Fujiki. 2015. « Peroxin Pex14p Is the Key Component for Coordinated Autophagic Degradation of Mammalian Peroxisomes by Direct Binding to LC3-II ». *Genes to Cells* 20 (1): 36-49. https://doi.org/10.1111/gtc.12198.

Jiang, Sixin, Clark D. Wells, et Peter J. Roach. 2011. « Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: Identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARAPL1 ». *Biochemical and biophysical research communications* 413 (3): 420-25. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.106.

Johansen, Terje, et Trond Lamark. 2011. « Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins ». *Autophagy* 7 (3): 279-96. https://doi.org/10.4161/auto.7.3.14487.

Kaushik, S., et A.M. Cuervo. 2006. « AUTOPHAGY AS A CELL-REPAIR MECHANISM: ACTIVATION OF CHAPERONE-MEDIATED AUTOPHAGY DURING OXIDATIVE STRESS ». *Molecular aspects of medicine* 27 (5-6): 444-54. https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.08.007.

Kaushik, Susmita, et Ana Maria Cuervo. 2012. « Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world ». *Trends in cell biology* 22 (8): 407-17. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.05.006.

Kesarwani, Pravin, Anuradha K. Murali, Amir A. Al-Khami, et Shikhar Mehrotra. 2013. « Redox Regulation of T-Cell Function: From Molecular Mechanisms to Significance in Human Health and Disease ». *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (12): 1497-1534. https://doi.org/10.1089/ars.2011.4073.

Khaminets, Aliaksandr, Christian Behl, et Ivan Dikic. 2016. « Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy ». *Trends in Cell Biology*, Special Issue: Quality Control, 26 (1): 6-16. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.010.

Kim, Joungmok, Mondira Kundu, Benoit Viollet, et Kun-Liang Guan. 2011. « AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 ». *Nature cell biology* 13 (2): 132-41. https://doi.org/10.1038/ncb2152.

Kim, Peter Kijun, Dale Warren Hailey, Robert Thomas Mullen, et Jennifer Lippincott-Schwartz. 2008. « Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (52): 20567-74. https://doi.org/10.1073/pnas.0810611105.

Kimura, Tomonori, Ashish Jain, Seong Won Choi, Michael A. Mandell, Terje Johansen, et Vojo Deretic. 2016. « TRIM-directed selective autophagy regulates immune activation ». *Autophagy* 13 (5): 989-90. https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1154254.

Kimura, Tomonori, Michael Mandell, et Vojo Deretic. 2016. « Precision autophagy directed by receptor regulators – emerging examples within the TRIM family ». *Journal of Cell Science* 129 (5): 881-91. https://doi.org/10.1242/jcs.163758.

Kirkin, Vladimir, Trond Lamark, Terje Johansen, et Ivan Dikic. 2009. « NBR1 Cooperates with P62 in Selective Autophagy of Ubiquitinated Targets ». *Autophagy* 5 (5): 732-33.

Kirkin, Vladimir, Trond Lamark, Yu-Shin Sou, Geir Bjørkøy, Jennifer L. Nunn, Jack-Ansgar Bruun, Elena Shvets, et al. 2009. « A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates ». *Molecular Cell* 33 (4): 505-16. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.020.

Klionsky, Daniel J, Kotb Abdelmohsen, Akihisa Abe, Md Joynal Abedin, Hagai Abeliovich, Abraham Acevedo Arozena, Hiroaki Adachi, et al. 2016. « Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) ». *Autophagy* 12 (1): 1-222. https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356.

Klionsky, Daniel J, Eeva-Liisa Eskelinen, et Vojo Deretic. 2014. « Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes… Wait, I'm confused ». *Autophagy* 10 (4): 549-51. https://doi.org/10.4161/auto.28448.

Klotz, Lars-Oliver, Cristina Sánchez-Ramos, Ignacio Prieto-Arroyo, Pavel Urbánek, Holger Steinbrenner, et Maria Monsalve. 2015. « Redox regulation of FoxO transcription factors ». *Redox Biology* 6 (décembre): 51-72. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.019.

Kocaturk, Nur Mehpare, et Devrim Gozuacik. 2018. « Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6 (octobre). https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00128.

Komatsu, Masaaki, Hirofumi Kurokawa, Satoshi Waguri, Keiko Taguchi, Akira Kobayashi, Yoshinobu Ichimura, Yu-Shin Sou, et al. 2010. « The Selective Autophagy Substrate P62 Activates the Stress Responsive Transcription Factor Nrf2 through Inactivation of Keap1 ». *Nature Cell Biology* 12 (3): 213-23. https://doi.org/10.1038/ncb2021.

Kosta, Artemis, Céline Roisin-Bouffay, Marie-Françoise Luciani, Grant P. Otto, Richard H. Kessin, et Pierre Golstein. 2004. « Autophagy Gene Disruption Reveals a Non-Vacuolar Cell Death Pathway in Dictyostelium ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (46): 48404-9. https://doi.org/10.1074/jbc.M408924200.

Kriel, Jurgen, et Ben Loos. 2019. « The Good, the Bad and the Autophagosome: Exploring Unanswered Questions of Autophagy-Dependent Cell Death ». *Cell Death & Differentiation* 26 (4): 640. https://doi.org/10.1038/s41418-018-0267-4.

Kroemer, G, L Galluzzi, P Vandenabeele, J Abrams, ES Alnemri, EH Baehrecke, MV Blagosklonny, et al. 2009. « Classification of cell death ». *Cell death and differentiation* 16 (1): 3-11. https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150.

Ktistakis, Nicholas T., et Sharon A. Tooze. 2016. « Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy ». *Trends in Cell Biology* 26 (8): 624-35. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.03.006.

Kyei, George B., Christina Dinkins, Alexander S. Davis, Esteban Roberts, Sudha B. Singh, Chunsheng Dong, Li Wu, et al. 2009. « Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages ». *The Journal of Cell Biology* 186 (2): 255-68. https://doi.org/10.1083/jcb.200903070.

Lackner, A. A., M. M. Lederman, et B. Rodriguez. 2012. « HIV Pathogenesis: The Host ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (9): a007005-a007005. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007005.

Lahouassa, Hichem, Waaqo Daddacha, Henning Hofmann, Diana Ayinde, Eric C. Logue, Loïc Dragin, Nicolin Bloch, et al. 2012. « SAMHD1 restricts HIV-1 by reducing the intracellular pool of deoxynucleotide triphosphates ». *Nature immunology* 13 (3): 223-28. https://doi.org/10.1038/ni.2236.

Lam, David, Jean-Pierre Levraud, Marie-Françoise Luciani, et Pierre Golstein. 2007. « Autophagic or necrotic cell death in the absence of caspase and bcl-2 family members ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 363 (3): 536-41. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.011.

Lamark, Trond, Steingrim Svenning, et Terje Johansen. 2017. « Regulation of Selective Autophagy: The P62/SQSTM1 Paradigm ». *Essays In Biochemistry* 61 (6): 609-24. https://doi.org/10.1042/EBC20170035.

Lamb, Christopher A., Tamotsu Yoshimori, et Sharon A. Tooze. 2013. « The Autophagosome: Origins Unknown, Biogenesis Complex ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (12): 759-74. https://doi.org/10.1038/nrm3696.

Lee, Young Han, Jesang Ko, Insil Joung, Jung-Hye Kim, et Jaekyoon Shin. 1998. « Immediate Early Response of the P62 Gene Encoding a Non-Proteasomal Multiubiquitin Chain Binding Protein ». *FEBS Letters* 438 (3): 297-300. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01323-4.

Legrand-Poels, Sylvie, Dolores Vaira, Joël Pincemail, Albert Van De Vorst, et Jacques Piette. 1990. « Activation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Oxidative Stress ». *AIDS Research and Human Retroviruses* 6 (12): 1389-97. https://doi.org/10.1089/aid.1990.6.1389.

Levy, J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro, et L. S. Oshiro. 1984. « Isolation of Lymphocytopathic Retroviruses from San Francisco Patients with AIDS ». *Science* 225 (4664): 840-42. https://doi.org/10.1126/science.6206563.

Li, Lin, Hai Shan Li, C. David Pauza, Michael Bukrinsky, et Richard Y. Zhao. 2005. « Roles of HIV-1 Auxiliary Proteins in Viral Pathogenesis and Host-Pathogen Interactions ». *Cell Research* 15 (11): 923. https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290370.

Li, Lulu, Jin Tan, Yuyang Miao, Ping Lei, et Qiang Zhang. 2015. « ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms ». *Cellular and Molecular Neurobiology* 35 (5): 615-21. https://doi.org/10.1007/s10571-015-0166-x.

Liang, Chengyu, Jong-soo Lee, Kyung-Soo Inn, Michaela U. Gack, Qinglin Li, Esteban A. Roberts, Isabelle Vergne, et al. 2008. « Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking ». *Nature cell biology* 10 (7): 776-87. https://doi.org/10.1038/ncb1740.

Lilienbaum, Alain. 2013. « Relationship between the proteasomal system and autophagy ». *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 4 (1): 1-26.

Liu, Junli, Hongguang Xia, Minsu Kim, Lihua Xu, Ying Li, Lihong Zhang, Yu Cai, et al. 2011. « Beclin1 Controls the Levels of p53 by Regulating the Deubiquitination Activity of USP10 and USP13 ». *Cell* 147 (1): 223-34. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.037.

Liu, Yang, Sanae Shoji-Kawata, Rhea M. Sumpter, Yongjie Wei, Vanessa Ginet, Liying Zhang, Bruce Posner, et al. 2013. « Autosis is a Na+,K+-ATPase–regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia–ischemia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (51): 20364-71. https://doi.org/10.1073/pnas.1319661110.

Li-Weber, Min, Rainer W Frank, et Peter H Krammeri. 1994. « Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Upregulates Interleukin-2 Secretion in Activated T Cells ». *J. VIROL.* 68: 9.

Lodish, Harvey, Arnold Berk, S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, et James Darnell. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4th éd. W. H. Freeman.

Loos, Ben, Anna-Mart Engelbrecht, Richard A. Lockshin, Daniel J Klionsky, et Zahra Zakeri. 2013. « The variability of autophagy and cell death susceptibility ». *Autophagy* 9 (9): 1270-85. https://doi.org/10.4161/auto.25560.

Luciani, M. F., Y. Kubohara, H. Kikuchi, Y. Oshima, et P. Golstein. 2009. « Autophagic or Necrotic Cell Death Triggered by Distinct Motifs of the Differentiation Factor DIF-1 ». *Cell Death and Differentiation* 16 (4): 564-70. https://doi.org/10.1038/cdd.2008.177.

Ma, Changle, Gaurav Agrawal, et Suresh Subramani. 2011. « Peroxisome Assembly: Matrix and Membrane Protein Biogenesis ». *The Journal of Cell Biology* 193 (1): 7-16. https://doi.org/10.1083/jcb.201010022.

Madjo, Ursula, Olivier Leymarie, Stéphane Frémont, Aurelia Kuster, Mélanie Nehlich, Sarah Gallois-Montbrun, Katy Janvier, et Clarisse Berlioz-Torrent. 2016. « LC3C Contributes to Vpu-Mediated Antagonism of BST2/Tetherin Restriction on HIV-1 Release through a Non-Canonical Autophagy Pathway ». *Cell Reports* 17 (9): 2221-33. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.045.

Mahiet, Charlotte, et Chad M. Swanson. 2016. « Control of HIV-1 Gene Expression by SR Proteins ». *Biochemical Society Transactions* 44 (5): 1417-25. https://doi.org/10.1042/BST20160113.

Malorni, Walter, Roberto Rivabene, Barbara M. Lucia, Rosetta Ferrara, Anna M. Mazzone, Roberto Cauda, et Roberto Paganelli. 1998. « The Role of Oxidative Imbalance in Progression to AIDS: Effect of the Thiol Supplier N-Acetylcysteine ». *AIDS Research and Human Retroviruses* 14 (17): 1589-96. https://doi.org/10.1089/aid.1998.14.1589.

Manda, Kalyan Reddy, Atrayee Banerjee, William A. Banks, et Nuran Ercal. 2011. « Highly Active Antiretroviral Therapy Drug Combination Induces Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Immortalized Human Blood-Brain Barrier Endothelial Cells ». *Free radical biology & medicine* 50 (7): 801-10. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.029.

Mandell, Michael A., Ashish Jain, John Arko-Mensah, Santosh Chauhan, Tomonori Kimura, Christina Dinkins, Guido Silvestri, et al. 2014. « TRIM Proteins Regulate Autophagy and Can Target Autophagic Substrates by Direct Recognition ». *Developmental Cell* 30 (4): 394-409. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.013.

Marin, Mariana, Kristine M. Rose, Susan L. Kozak, et David Kabat. 2003. « HIV-1 Vif Protein Binds the Editing Enzyme APOBEC3G and Induces Its Degradation ». *Nature Medicine* 9 (11): 1398-1403. https://doi.org/10.1038/nm946.

Martin, Damali N., et Eric H. Baehrecke. 2004. « Caspases Function in Autophagic Programmed Cell Death in Drosophila ». *Development* 131 (2): 275-84. https://doi.org/10.1242/dev.00933.

Martinez, Jennifer. 2018. « LAP it up, fuzz ball: a short history of LC3-associated phagocytosis ». *Current Opinion in Immunology*, Autoimmunity, 55 (décembre): 54-61. https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.09.011.

Martinez, Jennifer, Larissa D. Cunha, Sunmin Park, Mao Yang, Qun Lu, Robert Orchard, Quan-Zhen Li, et al. 2016. « Noncanonical autophagy inhibits the auto-inflammatory, lupus-like response to dying cells ». *Nature* 533 (7601): 115-19. https://doi.org/10.1038/nature17950.

Martinez, Jennifer, R. K. Subbarao Malireddi, Qun Lu, Larissa Dias Cunha, Stephane Pelletier, Sebastien Gingras, Robert Orchard, et al. 2015. « Molecular Characterization of LC3-Associated Phagocytosis Reveals Distinct Roles for Rubicon, NOX2 and Autophagy Proteins ». *Nature Cell Biology* 17 (7): 893-906. https://doi.org/10.1038/ncb3192.

Matsuda, Noriyuki, Shigeto Sato, Kahori Shiba, Kei Okatsu, Keiko Saisho, Clement A. Gautier, Yu-shin Sou, et al. 2010. « PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy ». *The Journal of Cell Biology* 189 (2): 211-21. https://doi.org/10.1083/jcb.200910140.

McAlpine, Fiona, Leon E. Williamson, Sharon A. Tooze, et Edmond Y.W. Chan. 2013. « Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2 ». *Autophagy* 9 (3): 361-73. https://doi.org/10.4161/auto.23066.

Menon, Manoj B., et Sonam Dhamija. 2018. « Beclin 1 Phosphorylation – at the Center of Autophagy Regulation ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6 (octobre). https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00137.

Mijaljica, Dalibor, Mark Prescott, et Rodney J. Devenish. 2011. « Microautophagy in Mammalian Cells: Revisiting a 40-Year-Old Conundrum ». *Autophagy* 7 (7): 673-82.

Mizushima, Noboru. 2018. « A Brief History of Autophagy from Cell Biology to Physiology and Disease ». *Nature Cell Biology* 20 (5): 521. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0092-5.

Molina, Laurence, Marina Grimaldi, Véronique Robert-Hebmann, Lucile Espert, Mihayl Varbanov, Christian Devaux, Claude Granier, et Martine Biard-Piechaczyk. 2007. « Proteomic Analysis of the Cellular Responses Induced in Uninfected Immune Cells by Cell-Expressed X4 HIV-1 Envelope ». *PROTEOMICS* 7 (17): 3116-30. https://doi.org/10.1002/pmic.200700306.

Morselli, Eugenia, Shensi Shen, Christoph Ruckenstuhl, Maria Anna Bauer, Guillermo Mariño, Lorenzo Galluzzi, Alfredo Criollo, et al. 2011. « p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200 ». *Cell Cycle* 10 (16): 2763-69. https://doi.org/10.4161/cc.10.16.16868.

Münz, Christian. 2016. « Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation ». *Trends in Immunology* 37 (11): 755-63. https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.017.

Muthumani, Karuppiah, Daniel S. Hwang, Brijal M. Desai, Donghui Zhang, Nathanael Dayes, Douglas R. Green, et David B. Weiner. 2002. « HIV-1 Vpr Induces Apoptosis through Caspase 9 in T Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (40): 37820-31. https://doi.org/10.1074/jbc.M205313200.

Mzingwane, Mayibongwe L., et Caroline T. Tiemessen. 2017. « Mechanisms of HIV Persistence in HIV Reservoirs ». *Reviews in Medical Virology* 27 (2): e1924. https://doi.org/10.1002/rmv.1924.

Nagiah, Savania, Alisa Phulukdaree, et Anil Chuturgoon. 2015. « Mitochondrial and Oxidative Stress Response in HepG2 Cells Following Acute and Prolonged Exposure to Antiretroviral Drugs ». *Journal of Cellular Biochemistry* 116 (9): 1939-46. https://doi.org/10.1002/jcb.25149.

Naif, Hassan M. 2013. « Pathogenesis of HIV Infection ». *Infectious Disease Reports* 5 (Suppl 1). https://doi.org/10.4081/idr.2013.s1.e6.

Nardacci, Roberta, Alessandra Amendola, Fabiola Ciccosanti, Marco Corazzari, Valentina Esposito, Chrysoula Vlassi, Chiara Taibi, et al. 2014. « Autophagy plays an important role in the containment of HIV-1 in nonprogressor-infected patients ». *Autophagy* 10 (7): 1167-78. https://doi.org/10.4161/auto.28678.

Narendra, Derek P, Lesley A Kane, David N Hauser, Ian M Fearnley, et Richard J Youle. 2010. « p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both ». *Autophagy* 6 (8): 1090-1106. https://doi.org/10.4161/auto.6.8.13426.

Narendra, Derek, Atsushi Tanaka, Der-Fen Suen, et Richard J. Youle. 2008. « Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy ». *The Journal of Cell Biology* 183 (5): 795-803. https://doi.org/10.1083/jcb.200809125.

Navarro-Yepes, Juliana, Michaela Burns, Annadurai Anandhan, Oleh Khalimonchuk, Luz Maria del Razo, Betzabet Quintanilla-Vega, Aglaia Pappa, Mihalis I. Panayiotidis, et Rodrigo Franco. 2014. « Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival ». *Antioxidants & Redox Signaling* 21 (1): 66-85. https://doi.org/10.1089/ars.2014.5837.

Nie, Z., B. N. Phenix, J. J. Lum, A. Alam, D. H. Lynch, B. Beckett, P. H. Krammer, R. P. Sekaly, et A. D. Badley. 2002. « HIV-1 Protease Processes Procaspase 8 to Cause Mitochondrial Release of Cytochrome c , Caspase Cleavage and Nuclear Fragmentation ». *Cell Death & Differentiation* 9 (11): 1172. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401094.

Niso-Santano, Mireia, Shoaib Ahmad Malik, Federico Pietrocola, José Manuel Bravo-San Pedro, Guillermo Mariño, Valentina Cianfanelli, Amena Ben-Younès, et al. 2015. « Unsaturated fatty acids induce non-canonical autophagy ». *The EMBO Journal* 34 (8): 1025-41. https://doi.org/10.15252/embj.201489363.

Niture, Suryakant K., Raju Khatri, et Anil K. Jaiswal. 2014. « Regulation of Nrf2—an update ». *Free Radical Biology and Medicine*, Antioxidants, 66 (janvier): 36-44. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008.

Novak, Ivana, Vladimir Kirkin, David G McEwan, Ji Zhang, Philipp Wild, Alexis Rozenknop, Vladimir Rogov, et al. 2010. « Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance ». *EMBO Reports* 11 (1): 45-51. https://doi.org/10.1038/embor.2009.256.

Olivetta, Eleonora, Donatella Pietraforte, Ilaria Schiavoni, Maurizio Minetti, Maurizio Federico, et Massimo Sanchez. 2005. « HIV-1 Nef regulates the release of superoxide anions from human macrophages ». *Biochemical Journal* 390 (Pt 2): 591-602. https://doi.org/10.1042/BJ20042139.

Orvedahl, Anthony, Sarah MacPherson, Rhea Sumpter, Zsolt Tallóczy, Zhongju Zou, et Beth Levine. 2010. « Autophagy Protects against Sindbis Virus Infection of the Central Nervous System ». *Cell host & microbe* 7 (2): 115-27. https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.01.007.

Otsu, Kinya, Tomokazu Murakawa, et Osamu Yamaguchi. 2015. « BCL2L13 is a mammalian homolog of the yeast mitophagy receptor Atg32 ». *Autophagy* 11 (10): 1932-33. https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1084459.

Papin, Laure, Coralie F. Daussy, Jamal Alfaisal, Lucile Espert, Fabien P. Blanchet, Julià Blanco, et Martine Biard-Piechaczyk. 2014. « Autophagy and HIV Infection ». In *Encyclopedia of AIDS*, édité par Thomas J. Hope, Mario Stevenson, et Douglas Richman, 1-7. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9610-6_395-1.

Pattingre, Sophie, Lucile Espert, Martine Biard-Piechaczyk, et Patrice Codogno. 2008. « Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes ». *Biochimie*, Cellular proteolysis, 90 (2): 313-23. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.08.014.

Pattingre, Sophie, Amina Tassa, Xueping Qu, Rita Garuti, Xiao Huan Liang, Noboru Mizushima, Milton Packer, Michael D. Schneider, et Beth Levine. 2005. « Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy ». *Cell* 122 (6): 927-39. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002.

Peeters, M., C. Honoré, T. Huet, L. Bedjabaga, S. Ossari, P. Bussi, R. W. Cooper, et E. Delaporte. 1989. « Isolation and Partial Characterization of an HIV-Related Virus Occurring Naturally in Chimpanzees in Gabon ». *AIDS (London, England)* 3 (10): 625-30.

Peeters, Martine, Mirela D'Arc, et Eric Delaporte. 2014. « The origin and diversity of human retroviruses ». *AIDS reviews* 16 (1): 23-34.

Penn, M. L., J.-C. Grivel, B. Schramm, M. A. Goldsmith, et L. Margolis. 1999. « CXCR4 Utilization Is Sufficient to Trigger CD4+ T Cell Depletion in HIV-1-Infected Human Lymphoid Tissue ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (2): 663-68. https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.663.

Pereira, Estela A., et Luis L. P. daSilva. 2016. « HIV-1 Nef: Taking Control of Protein Trafficking ». *Traffic* 17 (9): 976-96. https://doi.org/10.1111/tra.12412.

Perfettini, Jean-Luc, Thomas Roumier, et Guido Kroemer. 2005. « Mitochondrial Fusion and Fission in the Control of Apoptosis ». *Trends in Cell Biology* 15 (4): 179-83. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.02.005.

Perfettini, J.-L., M. Castedo, T. Roumier, K. Andreau, R. Nardacci, M. Piacentini, et G. Kroemer. 2005. « Mechanisms of Apoptosis Induction by the HIV-1 Envelope ». *Cell Death & Differentiation* 12 (1): 916. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401584.

Perl, Andras, Peter Gergely, Ferenc Puskas, et Katalin Banki. 2002. « Metabolic Switches of T-Cell Activation and Apoptosis ». *Antioxidants & Redox Signaling* 4 (3): 427-43. https://doi.org/10.1089/15230860260196227.

Perrin, Luc, Laurent Kaiser, et Sabine Yerly. 2003. « Travel and the Spread of HIV-1 Genetic Variants ». *The Lancet Infectious Diseases* 3 (1): 22-27. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00484-5.

Pham, Tram NQ, Sabelo Lukhele, Fadi Hajjar, Jean-Pierre Routy, et Éric A Cohen. 2014. « HIV Nef and Vpu protect HIV-infected CD4+ T cells from antibody-mediated cell lysis through down-modulation of CD4 and BST2 ». *Retrovirology* 11 (février): 15. https://doi.org/10.1186/1742-4690-11-15.

Piller, S. C., et L. Caly and D. A. Jans. 2003. « Nuclear Import of the Pre-Integration Complex (PIC): The Achilles Heel of HIV ? » Current Drug Targets. 30 juin 2003. http://www.eurekaselect.com/63786/article.

Pisoschi, Aurelia Magdalena, et Aneta Pop. 2015. « The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 97 (juin): 55-74. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

Poillet-Perez, Laura, Gilles Despouy, Régis Delage-Mourroux, et Michaël Boyer-Guittaut. 2015. « Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy ». *Redox Biology* 4 (avril): 184-92. https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.003.

Pollard, Victoria W., et Michael H. Malim. 1998. « The Hiv-1 Rev Protein ». *Annual Review of Microbiology* 52 (1): 491-532. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.491.

Polson, Hannah E. J., Jane de Lartigue, Daniel J. Rigden, Marco Reedijk, Sylvie Urbé, Michael J. Clague, et Sharon A. Tooze. 2010. « Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation ». *Autophagy* 6 (4): 506-22. https://doi.org/10.4161/auto.6.4.11863.

Price, Tulin Otamis, Fikriye Uras, William A. Banks, et Nuran Ercal. 2006. « A novel antioxidant N-acetylcysteine amide prevents gp120- and Tat-induced oxidative stress in brain endothelial cells ». *Experimental Neurology* 201 (1): 193-202. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.03.030.

Rankovic, Sanela, Janani Varadarajan, Ruben Ramalho, Christopher Aiken, et Itay Rousso. 2017. « Reverse Transcription Mechanically Initiates HIV-1 Capsid Disassembly ». *Journal of Virology* 91 (12). https://doi.org/10.1128/JVI.00289-17.

Rayne, Fabienne, Solène Debaisieux, Anne Bonhoure, et Bruno Beaumelle. 2010. « HIV-1 Tat Is Unconventionally Secreted through the Plasma Membrane ». *Cell Biology International* 34 (4): 409-13. https://doi.org/10.1042/CBI20090376.

Romani, Bizhan, Susan Engelbrecht, et Richard H. Glashoff. 2010. « Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1 ». *Journal of General Virology* 91 (1): 1-12. https://doi.org/10.1099/vir.0.016303-0.

Rosa, Annachiara, Ajit Chande, Serena Ziglio, Veronica De Sanctis, Roberto Bertorelli, Shih Lin Goh, Sean M. McCauley, et al. 2015. « HIV-1 Nef Promotes Infection by Excluding SERINC5 from Virion Incorporation ». *Nature* 526 (7572): 212-17. https://doi.org/10.1038/nature15399.

Rouschop, Kasper M. A., et Bradly G. Wouters. 2009. « Regulation of Autophagy through Multiple Independent Hypoxic Signaling Pathways ». *Current Molecular Medicine* 9 (4): 417-24.

Sagnier, Sophie, Coralie F. Daussy, Sophie Borel, Véronique Robert-Hebmann, Mathias Faure, Fabien P. Blanchet, Bruno Beaumelle, Martine Biard-Piechaczyk, et Lucile Espert. 2015. « Autophagy Restricts HIV-1 Infection by Selectively Degrading Tat in CD4+ T Lymphocytes ». *Journal of Virology* 89 (1): 615-25. https://doi.org/10.1128/JVI.02174-14.

Salter, Jason D., Guillermo A. Morales, et Harold C. Smith. 2014. « Structural insights for HIV-1 therapeutic strategies targeting Vif ». *Trends in biochemical sciences* 39 (9): 373-80. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.07.001.

Scherz-Shouval, Ruth, et Zvulun Elazar. 2007. « ROS, mitochondria and the regulation of autophagy ». *Trends in Cell Biology* 17 (9): 422-27. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.009.

Scherz-Shouval et Elazar 2011. « Regulation of Autophagy by ROS: Physiology and Pathology ». *Trends in Biochemical Sciences* 36 (1): 30-38. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.07.007.

Scherz-Shouval, Ruth, Elena Shvets, Ephraim Fass, Hagai Shorer, Lidor Gil, et Zvulun Elazar. 2007. « Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4 ». *The EMBO Journal* 26 (7): 1749-60. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601623.

Schröfelbauer, Bärbel, Qin Yu, Samantha G. Zeitlin, et Nathaniel R. Landau. 2005. « Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Induces the Degradation of the UNG and SMUG Uracil-DNA Glycosylases ». *Journal of Virology* 79 (17): 10978-87. https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.10978-10987.2005.

Schubert, U., A. V. Ferrer-Montiel, M. Oblatt-Montal, P. Henklein, K. Strebel, et M. Montal. 1996. « Identification of an Ion Channel Activity of the Vpu Transmembrane Domain and Its Involvement in the Regulation of Virus Release from HIV-1-Infected Cells ». *FEBS Letters* 398 (1): 12-18. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(96)01146-5.

Schweers, Rachel L., Ji Zhang, Mindy S. Randall, Melanie R. Loyd, Weimin Li, Frank C. Dorsey, Mondira Kundu, et al. 2007. « NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (49): 19500-505. https://doi.org/10.1073/pnas.0708818104.

Shah, A, S Kumar, S D Simon, D P Singh, et A Kumar. 2013. « HIV gp120- and methamphetamine-mediated oxidative stress induces astrocyte apoptosis via cytochrome P450 2E1 ». *Cell Death & Disease* 4 (10): e850. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.374.

Sharp, Paul M., et Beatrice H. Hahn. 2011. « Origins of HIV and the AIDS Pandemic ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine:* 1 (1). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841.

Sheehy, Ann M., Nathan C. Gaddis, et Michael H. Malim. 2003. « The Antiretroviral Enzyme APOBEC3G Is Degraded by the Proteasome in Response to HIV-1 Vif ». *Nature Medicine* 9 (11): 1404-7. https://doi.org/10.1038/nm945.

Shen, Han-Ming, et Patrice Codogno. 2011. « Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? » *Autophagy* 7 (5): 457-65. https://doi.org/10.4161/auto.7.5.14226.

Shytaj, Iart Luca, Barbara Chirullo, Wendeline Wagner, Maria G. Ferrari, Rossella Sgarbanti, Alessandro Della Corte, Celia LaBranche, et al. 2013. « Investigational Treatment Suspension and Enhanced Cell-Mediated Immunity at Rebound Followed by Drug-Free Remission of Simian AIDS ». *Retrovirology* 10 (1): 71. https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-71.

Shytaj, Iart Luca, Gabrielle Nickel, Eric Arts, Nicholas Farrell, Mauro Biffoni, Ranajit Pal, Hye Kyung Chung, et al. 2015. « Two-Year Follow-Up of Macaques Developing Intermittent Control of the Human Immunodeficiency Virus Homolog Simian Immunodeficiency Virus SIVmac251 in the Chronic Phase of Infection ». *Journal of Virology* 89 (15): 7521-35. https://doi.org/10.1128/JVI.00396-15.

Smith, Jennifer J., et John D. Aitchison. 2013. « Peroxisomes Take Shape ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (12): 803-17. https://doi.org/10.1038/nrm3700.

Sodora, Donald, et Guido Silvestri. 2008. « Immune Activation and AIDS Pathogenesis ». *Aids* 22 (4): 439-46. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282f2dbe7.

Song, Jun, Yeping Huang, Wenjian Zheng, Jing Yan, Min Cheng, Ruxing Zhao, Li Chen, Cheng Hu, et Weiping Jia. 2018. « Resveratrol Reduces Intracellular Reactive Oxygen Species Levels by Inducing Autophagy through the AMPK-MTOR Pathway ». *Frontiers of Medicine* 12 (6): 697-706. https://doi.org/10.1007/s11684-018-0655-7.

Søreng, Kristiane, Thomas P. Neufeld, et Anne Simonsen. 2018. « Chapter One - Membrane Trafficking in Autophagy ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Lorenzo Galluzzi, 336:1-92. Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.001.

Spieker, Lukas E., Bilgehan Karadag, Christian Binggeli, et Roberto Corti. 2005. « Rapid Progression of Atherosclerotic Coronary Artery Disease in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection ». *Heart and Vessels* 20 (4): 171-74. https://doi.org/10.1007/s00380-004-0790-8.

Srivastava, Smita, Selene K. Swanson, Nicolas Manel, Laurence Florens, Michael P. Washburn, et Jacek Skowronski. 2008. « Lentiviral Vpx Accessory Factor Targets VprBP/DCAF1 Substrate Adaptor for Cullin 4 E3 Ubiquitin Ligase to Enable Macrophage Infection ». *PLoS Pathogens* 4 (5). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000059.

Stella-Ascariz, Natalia, José Ramón Arribas, Roger Paredes, et Jonathan Z Li. 2017. « The Role of HIV-1 Drug-Resistant Minority Variants in Treatment Failure ». *The Journal of Infectious Diseases* 216 (Suppl 9): S847-50. https://doi.org/10.1093/infdis/jix430.

Stolz, Alexandra, Andreas Ernst, et Ivan Dikic. 2014. « Cargo Recognition and Trafficking in Selective Autophagy ». *Nature Cell Biology* 16 (6): 495-501. https://doi.org/10.1038/ncb2979.

Strebel, K., T. Klimkait, F. Maldarelli, et M. A. Martin. 1989. « Molecular and Biochemical Analyses of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu Protein ». *Journal of Virology* 63 (9): 3784-91.

Sundquist, Wesley I., et Hans-Georg Kräusslich. 2012. « HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (7): a006924. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924.
Tanida, Isei. 2011. « Autophagy Basics ». *Microbiology and Immunology* 55 (1): 1-11. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00271.x.
Tasdemir, Ezgi, M. Chiara Maiuri, Lorenzo Galluzzi, Ilio Vitale, Mojgan Djavaheri-Mergny, Marcello D'Amelio, Alfredo Criollo, et al. 2008. « Regulation of autophagy by cytoplasmic p53 ». *Nature cell biology* 10 (6): 676-87. https://doi.org/10.1038/ncb1730.
Tekirdag, Kumsal, et Ana Maria Cuervo. 2018. « Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Jointed by a chaperone ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (15): 5414-24. https://doi.org/10.1074/jbc.R117.818237.
Tooze, Sharon A., et Tamotsu Yoshimori. 2010. « The Origin of the Autophagosomal Membrane ». *Nature Cell Biology* 12 (9): 831-35. https://doi.org/10.1038/ncb0910-831.
Torresilla, Cynthia, Émilie Larocque, Sébastien Landry, Marilène Halin, Yan Coulombe, Jean-Yves Masson, Jean-Michel Mesnard, et Benoit Barbeau. 2013. « Detection of the HIV-1 Minus-Strand-Encoded Antisense Protein and Its Association with Autophagy ». *Journal of Virology* 87 (9): 5089-5105. https://doi.org/10.1128/JVI.00225-13.
Tsukada, Miki, et Yoshinori Ohsumi. 1993. « Isolation and Characterization of Autophagy-Defective Mutants of Saccharomyces Cerevisiae ». *FEBS Letters* 333 (1-2): 169-74. https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-E.
UNAIDS data 2018, WHO. s. d. « UNAIDS DATA 2018 », 376.
Usami, Yoshiko, Yuanfei Wu, et Heinrich G. Göttlinger. 2015. « SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef ». *Nature* 526 (7572): 218-23. https://doi.org/10.1038/nature15400.
Vadlamudi, R. K., I. Joung, J. L. Strominger, et J. Shin. 1996. « P62, a Phosphotyrosine-Independent Ligand of the SH2 Domain of P56lck, Belongs to a New Class of Ubiquitin-Binding Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (34): 20235-37.
Valle-Casuso, José Carlos, Mathieu Angin, Stevenn Volant, Caroline Passaes, Valérie Monceaux, Anastassia Mikhailova, Katia Bourdic, et al. 2019. « Cellular Metabolism Is a Major Determinant of HIV-1 Reservoir Seeding in CD4+ T Cells and Offers an Opportunity to Tackle Infection ». *Cell Metabolism* 29 (3): 611-626.e5. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.015.
Van Damme, Nanette, Daniel Goff, Chris Katsura, Rebecca L. Jorgenson, Richard Mitchell, Marc Johnson, Edward B. Stephens, et John Guatelli. 2008. « The interferon-induced protein BST-2/CD317 restricts release of virions from infected cells and is down-regulated from the cell surface by HIV-1 Vpu ». *Cell host & microbe* 3 (4): 245-52. https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.001.
Van Heuverswyn, Fran, Yingying Li, Cecile Neel, Elizabeth Bailes, Brandon F. Keele, Weimin Liu, Severin Loul, et al. 2006. « Human Immunodeficiency Viruses: SIV Infection in Wild Gorillas ». *Nature* 444 (7116): 164. https://doi.org/10.1038/444164a.
Van Lint, Carine, Sophie Bouchat, et Alessandro Marcello. 2013. « HIV-1 transcription and latency: an update ». *Retrovirology* 10 (juin): 67. https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-67.
Varbanov, Mihayl, Lucile Espert, et Martine Biard-Piechaczyk. 2006. « Mechanisms of CD4 T-Cell Depletion Triggered by HIV-1 Viral Proteins ». *AIDS Reviews* 8 (4): 221-36.
Veillette, Maxime, Anik Désormeaux, Halima Medjahed, Nour-Elhouda Gharsallah, Mathieu Coutu, Joshua Baalwa, Yongjun Guan, et al. 2014. « Interaction with Cellular CD4 Exposes HIV-1 Envelope Epitopes Targeted by Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity ». *Journal of Virology* 88 (5): 2633-44. https://doi.org/10.1128/JVI.03230-13.
Vergne, Isabelle, Frank Lafont, Lucile Espert, Audrey Esclatine, et Martine Biard-Piechaczyk. 2017. « Autophagie, protéines ATG et maladies infectieuses ». *médecine/sciences* 33 (3): 312-18. https://doi.org/10.1051/medsci/20173303019.
Verlhac, Pauline, Isabel P. Grégoire, Olga Azocar, Denitsa S. Petkova, Joël Baguet, Christophe Viret, et Mathias Faure. 2015. « Autophagy Receptor NDP52 Regulates Pathogen-Containing Autophagosome Maturation ». *Cell Host & Microbe* 17 (4): 515-25. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.02.008.
Vidya Vijayan, K. K., Krithika Priyadarshini Karthigeyan, Srikanth P. Tripathi, et Luke Elizabeth Hanna. 2017. « Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections ». *Frontiers in Immunology* 8 (mai). https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00580.
Vilhardt, Frederik, Olivier Plastre, Makoto Sawada, Kazuo Suzuki, Maciej Wiznerowicz, Etsuko Kiyokawa, Didier Trono, et Karl-Heinz Krause. 2002. « The HIV-1 Nef Protein and Phagocyte NADPH Oxidase Activation ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (44): 42136-43. https://doi.org/10.1074/jbc.M200862200.

Vint, I. A. M., B. M. Chain, et J. C. Foreman. 1993. « The Interaction of Auranofin and Buthionine Sulfoximine Blocks Activation of Human Peripheral T Lymphocytes ». *Cellular Immunology* 152 (1): 152-61. https://doi.org/10.1006/cimm.1993.1275.

Viret, Christophe, Aurore Rozières, et Mathias Faure. 2018. « Novel Insights into NDP52 Autophagy Receptor Functioning ». *Trends in Cell Biology* 28 (4): 255-57. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.01.003.

Vuilleumier, Séverine, et Sebastian Bonhoeffer. 2015. « Contribution of Recombination to the Evolutionary History of HIV ». *Current Opinion in Hiv and Aids* 10 (2): 84-89. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000137.

Walker, Cheryl L., Laura C. D. Pomatto, Durga Nand Tripathi, et Kelvin J. A. Davies. 2018. « Redox Regulation of Homeostasis and Proteostasis in Peroxisomes ». *Physiological Reviews* 98 (1): 89-115. https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2016.

Walsh, Craig M., et Bryan D. Bell. 2010. « T cell intrinsic roles of autophagy in promoting adaptive immunity ». *Current opinion in immunology* 22 (3): 321-25. https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.03.005.

Wang, Xinwen, Hong Chai, Peter H. Lin, Qizhi Yao, et Changyi Chen. 2009. « Roles and Mechanisms of Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitor Ritonavir and Other Anti-Human Immunodeficiency Virus Drugs in Endothelial Dysfunction of Porcine Pulmonary Arteries and Human Pulmonary Artery Endothelial Cells ». *The American Journal of Pathology* 174 (3): 771-81. https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080157.

Watters, Dianne, Padmini Kedar, Kevin Spring, Jonas Bjorkman, Phil Chen, Magtouf Gatei, Geoff Birrell, et al. 1999. « Localization of a Portion of Extranuclear ATM to Peroxisomes ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (48): 34277-82. https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.34277.

Wei, Huifang, Lei Liu, et Quan Chen. 2015. « Selective removal of mitochondria via mitophagy: distinct pathways for different mitochondrial stresses ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Mitophagy, 1853 (10, Part B): 2784-90. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.013.

Weiß, Marlene, Bernd Kost, Ingrid Renner-Müller, Eckhard Wolf, Ioannis Mylonas, et Ansgar Brüning. 2016. « Efavirenz Causes Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, and Autophagy in Endothelial Cells ». *Cardiovascular Toxicology* 16 (1): 90-99. https://doi.org/10.1007/s12012-015-9314-2.

« WHO | HIV/AIDS ». s. d. WHO. Consulté le 16 février 2019. http://www.who.int/gho/hiv/en/.

Wijk, Femke van, et Hilde Cheroutre. 2010. « Mucosal T cells in gut homeostasis and inflammation ». *Expert review of clinical immunology* 6 (4): 559-66. https://doi.org/10.1586/eci.10.34.

Wilen, Craig B., John C. Tilton, et Robert W. Doms. 2012. « HIV: Cell Binding and Entry ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (8). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006866.

Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, et K. Strebel. 1992. « Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu Protein Induces Rapid Degradation of CD4 ». *Journal of Virology* 66 (12): 7193-7200.

Wirawan, E, L Vande Walle, K Kersse, S Cornelis, S Claerhout, I Vanoverberghe, R Roelandt, et al. 2010. « Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria ». *Cell Death & Disease* 1 (1): e18. https://doi.org/10.1038/cddis.2009.16.

Wu, Ru-Feng, Zhenyi Ma, Zhe Liu, et Lance S. Terada. 2010. « Nox4-Derived H2O2 Mediates Endoplasmic Reticulum Signaling through Local Ras Activation ». *Molecular and Cellular Biology* 30 (14): 3553-68. https://doi.org/10.1128/MCB.01445-09.

Wu, Shi-Bei, Yu-Ting Wu, Tsung-Pu Wu, et Yau-Huei Wei. 2014. « Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Frontiers of Mitochondrial Research, 1840 (4): 1331-44. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.034.

Xin, Yurong, Long Yu, Zheng Chen, Lihua Zheng, Qiang Fu, Jianmin Jiang, Pingzhao Zhang, Romu Gong, et Shouyuan Zhao. 2001. « Cloning, Expression Patterns, and Chromosome Localization of Three Human and Two Mouse Homologues of GABAA Receptor-Associated Protein ». *Genomics* 74 (3): 408-13. https://doi.org/10.1006/geno.2001.6555.

Xu, Xiao-Ning, Bernd Laffert, Gavin R. Screaton, Michael Kraft, Dietlinde Wolf, Waldemar Kolanus, Juthathip Mongkolsapay, Andrew J. McMichael, et Andreas S. Baur. 1999. « Induction of Fas Ligand Expression by HIV Involves the Interaction of Nef with the T Cell Receptor ζ Chain ». *The Journal of Experimental Medicine* 189 (9): 1489-96.

Xu, Yan, Joseph Kulkosky, Edward Acheampong, Giuseppe Nunnari, Julie Sullivan, et Roger J. Pomerantz. 2004. « HIV-1-Mediated Apoptosis of Neuronal Cells: Proximal Molecular Mechanisms of HIV-1-Induced Encephalopathy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (18): 7070-75. https://doi.org/10.1073/pnas.0304859101.

Yamashita, Shun-ichi, Kakeru Abe, Yuki Tatemichi, et Yukio Fujiki. 2014. « The membrane peroxin PEX3 induces peroxisome-ubiquitination-linked pexophagy ». *Autophagy* 10 (9): 1549-64. https://doi.org/10.4161/auto.29329.

Yang, Zhifen, Ju Huang, Jiefei Geng, Usha Nair, et Daniel J. Klionsky. 2006. « Atg22 Recycles Amino Acids to Link the Degradative and Recycling Functions of Autophagy ». *Molecular Biology of the Cell* 17 (12): 5094-5104. https://doi.org/10.1091/mbc.E06-06-0479.

Yoshimori, T., A. Yamamoto, Y. Moriyama, M. Futai, et Y. Tashiro. 1991. « Bafilomycin A1, a Specific Inhibitor of Vacuolar-Type H(+)-ATPase, Inhibits Acidification and Protein Degradation in Lysosomes of Cultured Cells. » *Journal of Biological Chemistry* 266 (26): 17707-12.

Yousefi, Shida, Remo Perozzo, Inès Schmid, Andrew Ziemiecki, Thomas Schaffner, Leonardo Scapozza, Thomas Brunner, et Hans-Uwe Simon. 2006. « Calpain-Mediated Cleavage of Atg5 Switches Autophagy to Apoptosis ». *Nature Cell Biology* 8 (10): 1124. https://doi.org/10.1038/ncb1482.

Yu, Li, Fengyi Wan, Sudeshna Dutta, Sarah Welsh, ZhiHua Liu, Eric Freundt, Eric H. Baehrecke, et Michael Lenardo. 2006. « Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (13): 4952-57. https://doi.org/10.1073/pnas.0511288103.

Yue, Zhenyu, Lauren Friedman, Masaaki Komatsu, et Keiji Tanaka. 2009. « The Cellular Pathways of Neuronal Autophagy and Their Implication in Neurodegenerative Diseases ». *Biochimica et biophysica acta* 1793 (9): 1496-1507. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.01.016.

Zachari, Maria, et Ian G. Ganley. 2017. « The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation ». *Essays in Biochemistry* 61 (6): 585-96. https://doi.org/10.1042/EBC20170021.

Zalckvar, Einat, Hanna Berissi, Miriam Eisenstein, et Adi Kimchi. 2009. « Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL ». *Autophagy* 5 (5): 720-22. https://doi.org/10.4161/auto.5.5.8625.

Zauli, Giorgio, Davide Gibellini, Paola Secchiero, Hélène Dutartre, Daniel Olive, Silvano Capitani, et Yves Collette. 1999. « Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Protein Sensitizes CD4+ T Lymphoid Cells to Apoptosis via Functional Upregulation of the CD95/CD95 Ligand Pathway ». *Blood* 93 (3): 1000-1010.

Zhang, Ji, et Paul A. Ney. 2009. « ROLE OF BNIP3 AND NIX IN CELL DEATH, AUTOPHAGY, AND MITOPHAGY ». *Cell death and differentiation* 16 (7): 939-46. https://doi.org/10.1038/cdd.2009.16.

Zhang, Jiangwei, Durga Nand Tripathi, Ji Jing, Angela Alexander, Jinhee Kim, Reid T. Powell, Ruhee Dere, et al. 2015. « ATM Functions at the Peroxisome to Induce Pexophagy in Response to ROS ». *Nature cell biology* 17 (10): 1259-69. https://doi.org/10.1038/ncb3230.

Zhou, Dejiang, Eliezer Masliah, et Stephen A. Spector. 2011. « Autophagy Is Increased in Postmortem Brains of Persons With HIV-1-Associated Encephalitis ». *The Journal of Infectious Diseases* 203 (11): 1647-57. https://doi.org/10.1093/infdis/jir163.

Zhou, Dejiang, et Stephen A. Spector. 2008. « Human immunodeficiency virus type-1 infection inhibits autophagy ». *AIDS (London, England)* 22 (6): 695-99. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282f4a836.

Zhu, Y, M Roshal, F Li, J Blackett, et V Planelles. s. d. « Upregulation of Survivin by HIV-1 Vpr », 9.

Zhu, Zhongxin, Yewei Huang, Lingchun Lv, Youli Tao, Minglong Shao, Congcong Zhao, Mei Xue, et al. 2018. « Acute Ethanol Exposure-Induced Autophagy-Mediated Cardiac Injury via Activation of the ROS-JNK-Bcl-2 Pathway ». *Journal of Cellular Physiology* 233 (2): 924-35. https://doi.org/10.1002/jcp.25934.

Zientara-Rytter, Katarzyna, et Suresh Subramani. 2016. « Autophagic Degradation of Peroxisomes in Mammals ». *Biochemical Society Transactions* 44 (2): 431-40. https://doi.org/10.1042/BST20150268.

Annexes

8 Annexes

8.1 La LAP (LC3-associated phagocytosis) : phagocytose ou autophagie ?

Annexe I

Revue dans Médecine et Sciences :

La LAP (LC3-associated phagocytosis) : phagocytose ou autophagie ?

Mathilde Galais*, Baptiste Pradel* (co-premiers auteurs),

Isabelle Vergne, Véronique Robert-Hebmann,

Lucile Espert et Martine Biard-Piechaczyk

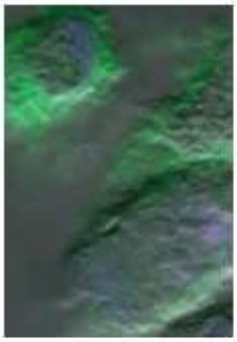
médecine/sciences 2019 ; 35 : 635-42

La phagocytose associée à LC3 (LAP)

Phagocytose ou autophagie ?

Mathilde Galais*[1], Baptiste Pradel*[1], Isabelle Vergne[2], Véronique Robert-Hebmann[1], Lucile Espert[1], Martine Biard-Piechaczyk[1]

› Phagocytose et macroautophagie, appelée ici autophagie, sont deux mécanismes essentiels de dégradation lysosomale de divers cargos englobés dans des structures membranaires. Ils sont tous deux impliqués dans la régulation du système immunitaire et la survie cellulaire. Cependant, la phagocytose permet l'ingestion de matériel extracellulaire alors que l'autophagie dégrade des composants intra-cytoplasmiques, avec des mécanismes d'activation et de maturation différents. La LAP (*LC3-associated phagocytosis*) est une forme particulière de phagocytose qui utilise certains éléments de l'autophagie. Elle permet l'élimination de pathogènes, de complexes immuns, de cellules avoisinantes, mortes ou vivantes, constituant un danger pour l'organisme, et de débris cellulaires, tels que les segments externes des photorécepteurs (POS, *photoreceptor outer segment*), ou la pièce centrale du pont intercellulaire produit en fin de mitose. Les cellules ont ainsi « optimisé » leurs moyens d'éliminer les composés potentiellement dangereux en partageant certains éléments essentiels des deux voies de dégradation lysosomale. ‹



[1]Institut de recherche en infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, CNRS, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier, France.
[2]Institut de pharmacologie et de biologie structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, UPS, 205, route de Narbonne, 31400 Toulouse, France.
martine.biard@irim.cnrs.fr
lucile.espert@irim.cnrs.fr
*Co-premiers auteurs

Différences entre la LAP, la phagocytose et l'autophagie

La LAP (*LC3-associated phagocytosis*), ou phagocytose associée à LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), est un mécanisme de phagocytose dans lequel certaines protéines contrôlant l'autophagie (*autophagy-related proteins* ou ATG) sont recrutées pour augmenter les capacités de dégradation [1]. La première étape de ce mécanisme est la formation par la cellule d'une vacuole, différente selon le processus, qui englobe le cargo à dégrader : le LAPosome pour la LAP ; le phagosome pour la phagocytose ; et l'autophagosome pour l'autophagie.

Vignette (Photo © Inserm – Charlotte Boix).

Contrairement à l'autophagie, qui est un mécanisme constitutif de toute cellule eucaryote, la LAP est activée dans des cellules douées de phagocytose : les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques, ainsi que les fibroblastes et les cellules épithéliales. Comme dans le cas de la phagocytose, la LAP est initiée par la reconnaissance de l'élément à dégrader par des récepteurs membranaires spécifiques, en particulier, les récepteurs de la région Fc des immunoglobulines (RFc), les *toll-like receptors* (TLR), le récepteur des phosphatidylsérines (PS) et le récepteur des β-glucanes (dectine-1). Leur activation conduit au remodelage du cytosquelette cortical d'actine qui permet l'internalisation du cargo. Celui-ci se retrouve alors dans un phagosome, vacuole à simple membrane. Dans le cas de la LAP, du phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) est rapidement produit à la membrane du LAPosome par le complexe PI3-kinase de classe III (PI3KCIII) constitué de la PI3-kinase, de sa sous-unité régulatrice 4 (PIK3R4), de la bécline 1, d'UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene protein*) et de Rubicon. Le PI3P ainsi synthétisé va ensuite recruter le complexe NOX2 (complexe NADPH oxydase 2), qui produit des composés réactifs de l'oxygène (ROS) au sein du phagosome. À ce stade, Rubicon joue un rôle essentiel : il favorise l'association du complexe PI3KCIII et stabilise le complexe contenant NOX2, ce qui permet une production efficace des ROS. Celle-ci est à l'origine du recrutement de deux systèmes de conjugaison impliqués dans l'autophagie : ATG12-ATG5 et un complexe constitué de la protéine LC3 couplée à une phosphatidyléthanolamine (PE) [1, 3-5]. Décoré de LC3, le phagosome est alors appelé LAPosome mais LC3 n'est associée à la PE qu'après la

formation de la vacuole. Cette caractéristique est importante à noter car, dans le cas de l'autophagie, LC3 est conjuguée à la PE pendant la formation de l'autophagosome, avant sa fermeture [1].

Contrairement à la phagocytose et à la LAP, l'autophagie est un mécanisme constitutif qui prend son origine dans le cytoplasme et non à la membrane de la cellule. Il peut également être induit dans différentes situations de stress cellulaires qui se traduisent par l'inactivation du complexe mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) et, en conséquence, par l'activation de ULK (*Unc-51-like kinase*) qui s'associe à ATG13, ATG101 et FIP200 (*FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa*). mTORC1 et ULK ne sont retrouvés que dans l'autophagie. Un troisième complexe, contenant PI3KCIII, la bécline 1 et ATG14L est alors activé. C'est la présence d'ATG14L qui signe l'activation du processus d'autophagie alors que celle de Rubicon est associée à la LAP. À noter que UVRAG et Rubicon participent également à l'autophagie, mais ils ont des rôles différents puisque UVRAG est impliqué dans la maturation de l'autophagosome et Rubicon dans l'inhibition de l'autophagie. Les deux systèmes de conjugaison, identiques à ceux décrits dans la LAP, vont conduire à l'élongation et à la fermeture d'une vacuole à double membrane, appelée autophagosome [1, 6].

Ces trois types de vésicules intra-cytoplasmiques, phagosome à simple membrane dépourvu de LC3, LAPosome à simple membrane recouvert de LC3, et autophagosome à double membrane recouvert de LC3, vont fusionner avec les lysosomes, avec pour conséquence la dégradation du matériel internalisé dans la vacuole (*Figure 1*).

La présence de LC3 sur le LAPosome semble influencer le devenir des cargos extracellulaires qu'il contient. Dans plusieurs types cellulaires, en particulier dans les macrophages primaires de souris, les LAPosomes fusionnent en effet plus rapidement avec les lysosomes que les phagosomes dépourvus de LC3. En revanche, dans des macrophages humains, la fusion des LAPosomes avec les lysosomes est retardée et les vésicules apparaissent stabilisées [7]. Dans certains cas d'infection, les vésicules à double membrane intégrant LC3 peuvent fusionner avec un phagosome et, dans des cellules épithéliales, l'enveloppement d'un phagosome par des autophagosomes a été observé.

La LAP au cours des infections et les mécanismes d'échappement

L'un des premiers rôles de la LAP est le contrôle des infections en permettant aux cellules douées de phagocytose d'internaliser les agents pathogènes (bactéries, champignons, parasites, virus) et de les éliminer (*Tableau I*). Mais, comme pour l'autophagie et la phagocytose, ces microorganismes ont su s'adapter ou contrer ce mécanisme pour survivre [11] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de I. Vergne et al., m/s n° 11, novembre 2017, page 312

Les bactéries

La LAP joue un rôle important dans l'immunité antibactérienne. Plusieurs travaux ont montré son implication dans le contrôle d'infections par différentes bactéries : *Salmonella* Typhimurium, dans les cellules épithéliales, les macrophages ou l'embryon de poisson zèbre ; *Listeria monocytogenes* et *Mycobacterium tuberculosis*, dans les macrophages et un modèle murin ; et *Legionella* [12-18]. De nouveaux acteurs protéiques et lipidiques ont ainsi été mis en évidence pour le déclenchement de la LAP au cours de ces infections. Les systèmes de sécrétion de type III de *Salmonella* (T3SS) et de type IV de *Legionella* (T4SS) participent en effet à l'activation de la LAP. Dans le cas de *Listeria*, c'est un récepteur cellulaire, Mac-1, présent à la surface des macrophages, qui participe à cette induction. Deux lipides, outre le PI3P, semblent également contribuer à l'activation de NOX2 et donc de la LAP dans ces infections : un céramide qui est synthétisé par la sphingomyélinase acide (ASMase), lors de l'infection à *L. monocytogenes*, et le diacylglycérol (DAG) produit par l'action combinée de la phospholipase D et de la phosphatidate-phosphatase, lors de l'infection à *Salmonella* et *Legionella*.

Les bactéries pathogènes ont néanmoins développé des stratégies afin de bloquer la LAP. Dans les macrophages et dans un modèle murin d'infection, il a ainsi été montré que *M. tuberculosis* sécrétait CpsA, un facteur de virulence qui inhibe le recrutement de NOX2 sur le phagosome, empêchant ainsi son élimination par la LAP [17]. RavZ, une protéase produite par *Legionella pneumophila* inhibe la LAP mais aussi l'autophagie en induisant la déconjugaison irréversible du complexe LC3-PE [18, 19]. Une autre stratégie, partagée par *L. monocytogenes*, *Shigella flexneri* et *Burkholderia pseudomallei*, consiste en un échappement de la bactérie du phagosome vers le cytosol de la cellule [20-22]. *Yersinia pseudotuberculosis* déclenche la LAP dans les cellules épithéliales, mais elle est capable d'inhiber l'acidification du LAPosome par un mécanisme qui reste inconnu [23].

Les champignons et les parasites

La LAP joue un rôle essentiel au cours des infections fongiques. Elle a été décrite notamment dans le cas d'infections par les champignons *Aspergillus* [24], *Candida albicans* [25], *Saccharomyces cerevisiae* [5] ou *Rhizopus* spp [26]. Ainsi, suite à leur phagocytose, les conidies d'*Aspergillus fumigatus*, spores assurant la multiplication du champignon, gonflent, exposant alors en surface des β-glucanes, sucres habituellement masqués par sa paroi, qui sont reconnus et activent la cellule [24] par la voie Dectine-1-Syk-NOX2. LC3 est alors recruté rapidement à la membrane du phagosome afin de l'adresser vers les lysosomes et d'éliminer le pathogène. Un rôle de la LAP sur l'inflammation engendrée par *A. fumigatus* a également été décrit. Il repose sur DAPK1 (*death-associated protein kinase 1*), un médiateur de la réponse à l'interféron γ (IFN-γ), et impliquerait l'adressage de l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin*

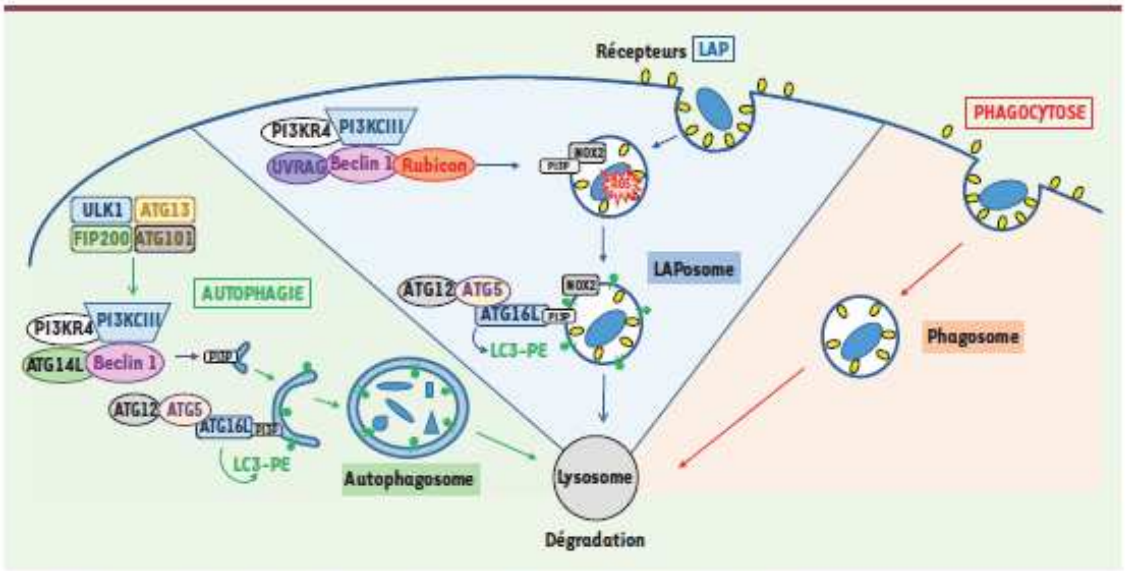


Figure 1. *LAP, phagocytose et autophagie. Trois mécanismes conduisant à la dégradation lysosomale.*

domain containing 3) vers le protéasome pour sa destruction [24]. *Aspergillus* pourrait néanmoins inhiber la LAP. Il interférerait avec NOX2, par action de la mélanine qui est présente sur sa paroi, empêchant ainsi le recrutement de LC3.

En ce qui concerne les parasites protozoaires, des mécanismes similaires à la LAP, appelés *LAP-like*, ont été décrits. Chez les Apicomplexes, comme *Toxoplasma gondii* [27] et *Plasmodium vivax* [28], l'entrée du parasite dans les cellules nucléées aboutit à la formation d'une vacuole appelée vacuole parasitophore. Recouverte rapidement de LC3 après l'entrée du parasite, elle conduit à son élimination. Cependant, ces deux parasites peuvent bloquer ce recrutement de LC3, favorisant ainsi leur survie [29].

D'autres parasites utilisent la LAP pour moduler la réponse immunitaire de l'hôte. Dans le cas de *Leishmania major*, le phlébotome, l'insecte vecteur, injecte à l'hôte des parasites viables et des parasites apoptotiques. Ces derniers, importants pour le pouvoir infectieux du parasite, sont phagocytés dans des vacuoles recouvertes de LC3. Ce processus de leurre permet en fait de diminuer l'activation des lymphocytes T de l'hôte infecté, ce qui favoriserait la survie des parasites viables [30] qui, eux, sont capables d'inhiber la LAP. En effet, la glycoprotéine GP63 du parasite bloque le recrutement de NOX2 à la membrane du phagosome en diminuant la quantité de VAMP8 (*vesicle-associated membrane protein 8*), une protéine du complexe SNARE (*soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*), importante pour la fusion entre les LAPosomes et les lysosomes [31].

Les virus

Le rôle de la LAP au cours des infections virales reste mal connu. La LAP, ou tout au moins certains de ces composants, semblent cependant avoir été détournés par certains virus au profit de leur propre réplication. C'est le cas du VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine de type 1) dont la protéine Vpu (*viral protein U*) est impliquée dans la régulation de plusieurs mécanismes, dont la LAP, afin de favoriser sa réplication. Vpu bloque en effet l'action du facteur de restriction BST2 (*bone marrow stromal cell antigen 2*), une glycoprotéine qui empêche le bourgeonnement du virus en retenant les particules virales à la surface de la cellule infectée. Dans les macrophages, Vpu recruterait LC3, accélérant ainsi la phagocytose et la dégradation de BST2 présent au site de bourgeonnement en engageant un processus de LAP [32]. Au cours des infections par HBV (virus de l'hépatite B), EV71 (entérovirus 71), IAV (virus influenza A) et VSV (virus de la stomatite vésiculeuse), on observe une induction de Rubicon. Son expression favorise la réplication de ces virus en inhibant la réponse immunitaire. Rubicon empêche en effet l'induction d'IFN de type I et de type III, *via* son interaction avec NEMO (*NF-κB essential modulator*), un facteur clé de la voie de la réponse *via* les IFN [33].

Rôle de la LAP dans l'immunité et l'inflammation

La LAP est donc essentielle à la destruction et à l'élimination de nombreux pathogènes. L'avantage de la LAP par rapport à la phagocytose est la présence de LC3 sur le LAPosome qui permet d'augmenter les capacités de dégradation de ces pathogènes. Elle est aussi particulièrement importante pour atténuer les phénomènes d'autoimmunité et d'inflammation.

m/s n° 8-9, vol. 32, août-septembre 2013

	Pathogène	Hôte	Caractéristiques	Activation	Adaptation	Réf
Bactéries	*Salmonella enterica* Typhimurium	Cellule épithéliale	NOX2, DAG	SPI-1 T3SS		[12]
		Macrophage embryon (poisson zèbre)	ATG5, Rubicon, NOX2 pas de rôle d'ATG13			[13]
	Listeria monocytogenes	Macrophage (souris)	Récepteur Mac-1, Rubicon, ATG7, NOX2, ASMase, pas de rôle d'ULK1, ULK2, FIP200			[14]
		Macrophage	Bécline 1 pas de rôle d'ULK1, FIP200 LAPosome		Échappement de la vacuole	[15]
	Mycobacterium tuberculosis	Macrophage	ATG5, Bécline 1 pas de rôle d'ATG13, ULK1			[16]
		Macrophage (souris)	ATG5, ATG7, ATG16L1, Bécline 1, Rubicon, NOX2 pas de rôle d'ATG14, ULK1		Le facteur de virulence CpsA bloque NOX2	[17]
	Legionella	Macrophage	Rubicon, NOX2, DAG pas de rôle d'ULK1 LAPosome	T4SS	La protéase RavZ libère LC3 de la phosphatidyléthanolamine	[18] [19]
	Shigella flexneri	Cellule épithéliale	LAPosome		Échappement de la vacuole via IcsB et VirA	[21]
	Burkholderia pseudomallei	Macrophage	LAPosome		Échappement de la vacuole via BopA	[22]
	Yersinia pseudotuberculosis	Cellule épithéliale	LAPosome		Inhibition de l'acidification de la vacuole	[23]
Mycètes	*Aspergillus fumigatus*	Macrophage	Dectine-2, Syk, ATG5, NOX2	β-glucanes	Blocage de la LAP dépendant de la mélanine	[24]
	Rhizopus spp.	Macrophage	LC3 Pas de LAPosome Pas de rôle de Rab-5		Blocage de la LAP dépendant de la mélanine	[26]
	Saccharomyces cerevisiae	Macrophage Cellule dendritique	Dectin-2, Syk, ATG7	β-glucanes		[5]
	Candida albicans	Macrophage	Rubicon			[25]

Parasites	*Toxoplasma gondii*	Cellule épithéliale	LAP-like : entrée active du parasite et non phagocytose ATG7, ATG16L		[27]
	Plasmodium vivax	Hépatocytes traités à l'IFN	LAP-like : entrée active du parasite et non phagocytose ATG5, Bécline 1, PI3K pas de rôle d'ULK1		[28]
	Leishmania major	Macrophage	LAPosome	GP63 bloque le recrutement de NOX2 en diminuant VAMP8	[30] [31]
Virus	VIH-1	Macrophage	LC3C, Bécline 1, ATG5 Pas de rôle de FIP200, ULK1 et ATG14	Protéine virale Vpu : liaison à LC3C : dégradation du facteur de restriction BST2	[32]
	HBV, EV71, IAV et VSV	Cellules mononucléées du sang périphérique	Rubicon	Interaction de Rubicon avec NEMO : inhibition de l'induction d'IFN	[33]

Tableau I. *La LAP au cours des infections bactériennes, fongiques, parasitaires et virales.* ASMase : *acid sphingomyelinase* ; cGAS : *cyclic GMP-AMP synthase* ; DAG : diacylglycérol ; Mac-1 : *β2 integrin macrophage-1 antigen* ; SPI-1 T3SS : *Salmonella pathogenicity island 1 type III secretion system* ; T4SS : *type IV secretion system* ; mTOR : *mechanistic target of rapamycin* ; GP63 : glycoprotéine 63 de surface de *Leishmania major* ; VAMP8 : *vesicle-associated membrane protein* ; VIH-1 : virus de l'immunodéficience humaine de type 1 ; HBV : virus de l'hépatite B ; EV71 : entérovirus 71 ; BST2 : *bone marrow stromal cell antigen 2* ; IAV : virus influenza de type A ; VSV : virus de la stomatite vésiculeuse ; IFN : interféron ; NEMO : *NF-κB essential modulator* ; LAPosome : vésicule à simple membrane décorée de LC3.

La LAP et la présentation antigénique

L'activation des lymphocytes T, cellules qui coordonnent et exécutent en partie les réponses immunitaires adaptatives, nécessite la présentation de peptides antigéniques par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La LAP joue un rôle important en facilitant la présentation par le CMH de classe II d'antigènes exogènes qui ont été phagocytés. Dans les phagocytes humains, le LAPosome est un compartiment cellulaire qui a une longue durée de vie (il peut persister pendant plus de 4 h après sa formation). Cette stabilité permet ainsi un stockage prolongé des antigènes et une dégradation lente, favorisant sans doute leur présentation [34].

La dégradation des complexes immuns

La reconnaissance des complexes immuns circulants, puis leur dégradation, est essentielle afin d'éviter les possibles réactions auto-immunes. L'activation de la LAP, dans ce cas, conduit à la production d'IFN de type I. La reconnaissance par les RFcγ des complexes autoimmuns formés entre ADN et IgG déclenche la migration du récepteur TLR9 et de sa protéine chaperonne, UNC93B (*Unc-93 homolog B1*), du réticulum endoplasmique vers le phagosome et un enrichissement de ce dernier en LC3 [35].

L'efferocytose : une élimination des cellules apoptotiques

L'élimination des cellules apoptotiques, un processus appelé efferocytose, est importante pour maintenir l'homéostasie tissulaire (environ 1 million de cellules meurent par seconde dans un organisme humain). C'est aussi un mécanisme qui limite le développement de pathologies auto-immunes : tout défaut d'efferocytose induit en effet une augmentation par les cellules dendritiques de la présentation d'antigènes du soi portés par des corps apoptotiques, avec l'activation possible de lymphocytes B et de lymphocytes T auto-immuns. Chez des souris déficientes pour la LAP (absence de NOX2 ou de Rubicon), un syndrome de type lupus érythémateux disséminé se développe. C'est une maladie chronique inflammatoire et auto-immune caractérisée par la production d'autoanticorps, en particulier antinucléaires, qui détruisent les tissus sains [6, 36, 37] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de S. Muller, m/s n° 11, novembre 2017, page 319

L'efferocytose se déroule en quatre étapes. La première est le recrutement des phagocytes par des signaux d'alerte de type « *find me* » qui sont libérés par des cellules mourantes. Ces signaux sont captés par des récepteurs présents sur les phagocytes qui migrent jusqu'au site de la cellule mourante afin de

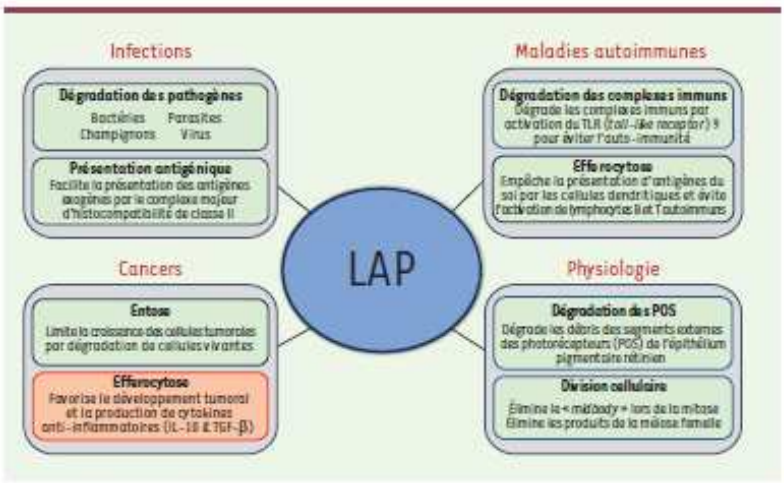


Figure 2. *Rôles de la LAP dans la physiopathologie.*

préparer la phagocytose. La seconde étape est la reconnaissance par la cellule phagocytaire de signaux de type « *eat me* » qui sont présent sur les cellules en apoptose. Le signal le mieux identifié et caractérisé est le signal constitué par la phosphatidylsérine. Ce lipide, présent dans la membrane plasmique interne des cellules saines, est activement transloqué vers la membrane externe lors de l'apoptose par un mécanisme qui dépend des caspases. L'engagement des récepteurs de la phosphatidylsérine exprimés par les phagocytes entraîne l'internalisation du corps cellulaire apoptotique puis sa dégradation après fusion avec les lysosomes [4, 36]. Même si l'efferocytose est définie comme un mécanisme « silencieux » au niveau immunologique, elle déclenche néanmoins la production de cytokines anti-inflammatoires (interleukine-10, TGF-β [*transforming growth factor β*]) et inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. Des défauts de LAP ont été révélés dans les cellules myéloïdes présentes au sein de tumeurs. Ils altèrent les capacités de destruction des cellules tumorales mourantes mais freinent le développement tumoral en déclenchant des réponses *via* les IFN. Dans un contexte tumoral, l'efferocytose pourrait ainsi avoir une action pro-cancéreuse, en contrecarrant les réponses pro-inflammatoires [38].

L'entose : un cannibalisme cellulaire

D'autres mécanismes de suppression ont été décrits afin de maintenir l'homéostasie tissulaire, notamment l'entose, un processus dans lequel une cellule vivante englobe dans une vacuole une autre cellule vivante, la tue et la digère [46] (➜).

(➜) Voir la Nouvelle de A.A. Mailloux et al., m/s n° 3, mars 2008, page 246

Les cellules ainsi englobées sont vivantes puisqu'elles restent capables de se diviser, et ne présentent pas les marqueurs caractéristiques de l'apoptose. Si certaines peuvent s'échapper et être libérées dans le milieu extérieur, la majorité de ces cellules sont pourtant destinées à disparaître [39]. L'entose est initiée par la formation de jonctions adhérentes entre les cellules, impliquant les protéines de la famille des cadhérines. Les vacuoles contenant les cellules internalisées sont recouvertes de LC3, ce qui permet leur fusion avec les lysosomes [40, 41]. Ces événements d'entose ont été documentés dans différents cancers, en particulier dans les tumeurs solides et dans les effusions pleurales de certains patients présentant des métastases. L'entose pourrait agir comme un suppresseur de tumeur en limitant la croissance des cellules tumorales.

Rôle de la LAP au-delà de l'immunité

Rôle de la LAP dans le cycle visuel

Les segments externes des photorécepteurs de la rétine subissent régulièrement des dommages dus au phénomène de photo-oxydation (une oxydation induite par la lumière). Pour maintenir la fonction visuelle, l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) élimine par la LAP les débris de segments externes ainsi produits, et les photorécepteurs se régénèrent [42] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de B. Villarejo-Zori et al., m/s n° 11, novembre 2017, page 297

Comme les cellules apoptotiques, les segments externes des photorécepteurs altérés exposent à leur surface la phosphatidylsérine. Celle-ci se lie à la protéine adaptatrice MFG-E8 (*milk fat globule-EGF factor 8 protein* ou lactadhérine), puis est reconnue par les récepteurs phagocytaires CD36 et l'intégrine $\alpha v\beta 5$ (récepteur de la vitronectine), exprimés à la membrane des cellules de l'EPR, entraînant l'activation de la LAP [6, 43].

Rôle de la LAP dans la division cellulaire

Au cours de la division cellulaire, un pont intercellulaire se forme entre les deux cellules filles lors de la cytocinèse[1]. Lors de l'abscission[2], ce pont est coupé symétriquement de part et d'autre de sa pièce centrale, appelée aussi *midbody*. Cette partie est ensuite dégradée par la LAP. Les Rab GTPases, en particulier Rab-5, Rab-7 et UNC-108, participent à ce processus et sont

[1] La cytocinèse est l'étape finale de la division cellulaire dans laquelle la cellule mère est physiquement divisée en deux cellules filles indépendantes.

[2] L'abscission consiste en la coupure du pont intercellulaire reliant les deux cellules filles à la suite de la contraction de l'anneau acto-myosique.

impliquées dans la maturation des LAPosomes [6, 44]. L'action de la LAP n'est donc pas restreinte aux phagocytes professionnels ou aux cellules épithéliales. Elle peut aussi être activée dans des cellules embryonnaires indifférenciées. Chez *Caenorhabditis elegans*, la LAP intervient ainsi dans l'élimination des produits de la méiose femelle [45].

Conclusion

La LAP est, comme la phagocytose, un mécanisme de l'immunité permettant la dégradation des cargos extérieurs dangereux pour la cellule. Elle partage également de nombreux points avec l'autophagie, et ces trois processus agissent de concert pour permettre la survie des cellules, des tissus et des organismes entiers dans un environnement stressant. Mais quelle est la raison de la co-existence de ces trois mécanismes ? Une hypothèse est que la cellule a ainsi acquis la capacité de s'adapter à différentes situations de danger, lui permettant de « choisir » la meilleure option à chaque événement. La redondance partielle de ces trois mécanismes lui permet également de continuer à se défendre et d'éliminer les composants potentiellement dangereux lorsque l'un des processus fait défaut. La présence de LC3 sur le LAPosome semble être un atout qui favorise sa fusion avec les lysosomes, et donc la maturation du phagosome, améliorant ainsi la production de peptides qui seront présentés dans le contexte du CMH-II aux lymphocytes, afin d'initier une réponse immunitaire adaptative.

Il reste de nombreuses zones d'ombre concernant tant le mécanisme de la LAP que son rôle précis dans l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Il reste en particulier à définir la nature des signaux qui déclenchent le recrutement de LC3 à la membrane de certains phagosomes ainsi que le mécanisme par lequel celle-ci favorise leur maturation et le processus de dégradation. La participation des différentes ATG, en particulier LC3, aux mécanismes d'autophagie ou de LAP, les fonctions potentiellement différentes que ces processus présentent selon le type cellulaire, et leur impact sur la réponse inflammatoire, sont autant de questions qui nécessitent d'être posées.

La LAP apparaît être un processus majeur participant au maintien d'un état immunitaire « silencieux », non inflammatoire. Un défaut de LAP est en effet à l'origine de pathologies, dont des maladies auto-immunes et auto-inflammatoires *(Figure 2)*, pour lesquelles il n'existe que peu de traitements efficaces. Le progrès des connaissances dans ce domaine ouvrira vraisemblablement de nouvelles perspectives thérapeutiques pour ces maladies. ◊

SUMMARY

LAP (LC3-associated phagocytosis): phagocytosis or autophagy?

Phagocytosis and macroautophagy, named here autophagy, are two essential mechanisms of lysosomal degradation of diverse cargos into membrane structures. Both mechanisms are involved in immune regulation and cell survival. However, phagocytosis triggers degradation of extracellular material whereas autophagy engulfs only cytoplasmic elements. Furthermore, activation and maturation of these two processes are different. LAP (LC3-associated phagocytosis) is a form of phagocytosis that uses components of the autophagy pathway. It can eliminate (i) pathogens, (ii) immune complexes, (iii) threatening neighbouring cells, dead or alive, and (iv) cell debris, such as POS (photoreceptor outer segment) and the midbody released at the end of mitosis. Cells have thus optimized their means of elimination of dangerous components by sharing some fundamental elements coming from the two main lysosomal degradation pathways. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

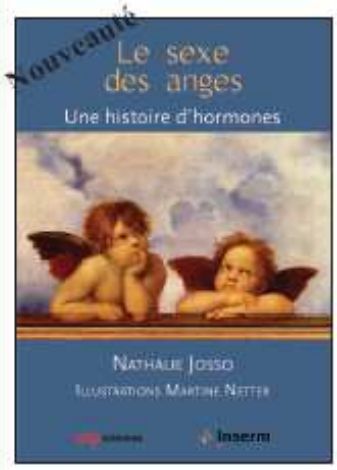
1. Heckmann BL, Boada-Romero E, Cunha LD, *et al.* LC3-associated phagocytosis and inflammation. *J Mol Biol* 2017 ; 429 : 3561-76.
2. Heckmann BL, Green DR. LC3-associated phagocytosis at a glance. *J Cell Sci* 2019 ; 132.
3. Martinez J, Malireddi RK, Lu Q, *et al.* Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat Cell Biol* 2015 ; 17 : 893-906.
4. Martinez J, Almendinger J, Oberst A, *et al.* Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 17396-401.
5. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, *et al.* Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 2007 ; 450 : 1253-7.
6. Fazeli G, Wehman AM. Safely removing cell debris with LC3-associated phagocytosis. *Biol cell* 2017 ; 109 : 355-63.
7. Romao S, Munz C. LC3-associated phagocytosis. *Autophagy* 2014 ; 10 : 526-8.
8. Lerena MC, Colombo MI. Mycobacterium marinum induces a marked LC3 recruitment to its containing phagosome that depends on a functional ESX-1 secretion system. *Cell Microbiol* 2011 ; 13 : 814-35.
9. Nicola AM, Albuquerque P, Martinez LR, *et al.* Macrophage autophagy in immunity to *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Infect Immun* 2012 ; 80 : 3365-76.
10. Brooks CR, Yeung MY, Brooks YS, *et al.* KIM-1-/TIM-1-mediated phagocytosis links ATG5-/ULK1-dependent clearance of apoptotic cells to antigen presentation. *EMBO J* 2015 ; 34 : 2441-64.
11. Vergne I, Lafont F, Espert L, *et al.* Autophagie, protéines ATG et maladies infectieuses. *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 : 312-8.
12. Huang J, Brumell JH. Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nat Rev Microbiol* 2014 ; 12 : 101-14.
13. Masud S, Prajsnar TK, Torraca V, *et al.* Macrophages target *Salmonella* by Lc3-associated phagocytosis in a systemic infection model. *Autophagy* 2019 ; 1-17.
14. Yang CS, Lee JS, Rodgers M, *et al.* Autophagy protein Rubicon mediates phagocytic NADPH oxidase activation in response to microbial infection or TLR stimulation. *Cell Host Microbe* 2012 ; 11 : 264-76.
15. Gluschko A, Herb M, Wiegmann K, *et al.* The beta2 integrin Mac-1 induces protective LC3-associated phagocytosis of *Listeria monocytogenes*. *Cell Host Microbe* 2018 ; 23 : 324-37 e5.
16. Abnave P, Mottola G, Gimenez G, *et al.* Screening in planarians identifies MORN2 as a key component in LC3-associated phagocytosis and resistance to bacterial infection. *Cell Host Microbe* 2014 ; 16 : 338-50.
17. Koster S, Upadhyay S, Chandra P, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* is protected from NADPH oxidase and LC3-associated phagocytosis by the LCP protein CpsA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017 ; 114 : E8711-E20.
18. Hubber A, Kubori T, Coban C, *et al.* Bacterial secretion system skews the fate of Legionella-containing vacuoles towards LC3-associated phagocytosis. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 44795.

RÉFÉRENCES

19. Choy A, Dancourt J, Mugo B, *et al.* The Legionella effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science* 2012 ; 338 : 1072-6.
20. Mitchell G, Cheng MI, Chen C, *et al.* *Listeria monocytogenes* triggers noncanonical autophagy upon phagocytosis, but avoids subsequent growth-restricting xenophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018 ; 115 : E210-E7.
21. Campbell-Valois FX, Sachse M, Sansonetti PJ, Parsot C. Escape of actively secreting *Shigella flexneri* from ATG8/LC3-positive vacuoles formed during cell-to-cell spread is facilitated by IcsB and VirA. *mBio* 2015 ; 6 : e02567-14.
22. Gong L, Cullinane M, Treerat P, *et al.* The Burkholderia pseudomallei type III secretion system and BopA are required for evasion of LC3-associated phagocytosis. *PLoS One* 2011 ; 6 : e17852.
23. Ligeon LA, Moreau K, Barois N, *et al.* Role of VAMP3 and VAMP7 in the commitment of Yersinia pseudotuberculosis to LC3-associated pathways involving single- or double-membrane vacuoles. *Autophagy* 2014 ; 10 : 1588-602.
24. Akoumianaki T, Chamilos G. DAPK1 keeps the peace in antifungal inflammation. *Cell Host Microbe* 2016 ; 20 : 695-7.
25. Duan Z, Chen Q, Du L, *et al.* Phagocytosis of *Candida albicans* inhibits autophagic flux in macrophages. *Oxid Med Cell Longev* 2018 ; 2018 : 4938649.
26. Andrianaki AM, Kyrmizi I, Thanopoulou K, *et al.* Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against Rhizopus species. *Nat Commun* 2018 ; 9 : 3333.
27. Selleck EM, Orchard RC, Lassen KG, *et al.* A noncanonical autophagy pathway restricts *Toxoplasma gondii* growth in a strain-specific manner in IFN-gamma-activated human cells. *mBio* 2015 ; 6 : e01157-15.
28. Boonhok R, Rachaphaew N, Duangmanee A, *et al.* LAP-like process as an immune mechanism downstream of IFN-gamma in control of the human malaria Plasmodium vivax liver stage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016 ; 113 : E3519-28.
29. Coppens I. How Toxoplasma and malaria parasites defy first, then exploit host autophagic and endocytic pathways for growth. *Curr Opin Microbiol* 2017 ; 40 : 32-9.
30. Crauwels P, Bohn R, Thomas M, *et al.* Apoptotic-like Leishmania exploit the host's autophagy machinery to reduce T-cell-mediated parasite elimination. *Autophagy* 2015 ; 11 : 285-97.
31. Matta C, Casgrain PA, Seguin O, *et al.* *Leishmania major* promastigotes evade LC3-associated phagocytosis through the action of GP63. *PLoS Pathog* 2016 ; 12 : e1005690.
32. Madjo U, Leymarie O, Fremont S, *et al.* LC3C contributes to Vpu-mediated antagonism of BST2/Tetherin restriction on HIV-1 release through a non-canonical autophagy pathway. *Cell Rep* 2016 ; 17 : 2221-33.
33. Wan Y, Cao W, Han T, *et al.* Inducible Rubicon facilitates viral replication by antagonizing interferon production. *Cell Mol Immunol* 2017 ; 14 : 607-20.
34. Munz C. Non-canonical functions of macroautophagy proteins during endocytosis by myeloid antigen presenting cells. *Front Immunol* 2018 ; 9 : 2765.
35. Henault J, Martinez J, Riggs JM, *et al.* Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity* 2012 ; 37 : 986-97.
36. Green DR, Oguin TH, Martinez J. The clearance of dying cells: table for two. *Cell Death Differ* 2016 ; 23 : 915-26.
37. Muller S. Autophagie, auto-immunité et maladies auto-immunes. *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 : 319-27.
38. Cunha LD, Yang M, Carter R, *et al.* LC3-associated phagocytosis in myeloid cells promotes tumor immune tolerance. *Cell* 2018 ; 175 : 429-41 e16.
39. Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, *et al.* A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* 2007 ; 131 : 966-79.
40. Florey O, Kim SE, Sandoval CP, *et al.* Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat Cell Biol* 2011 ; 13 : 1335-43.
41. Florey O, Overholtzer M. Autophagy proteins in macroendocytic engulfment. *Trends Cell Biol* 2012 ; 22 : 374-80.
42. Villarejo-Zori B, Boya P. Autophagie et vision. *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 : 297-304.
43. Kim JY, Zhao H, Martinez J, *et al.* Noncanonical autophagy promotes the visual cycle. *Cell* 2013 ; 154 : 365-76.
44. Fazeli G, Trinkwalder M, Irmisch L, Wehman AM. *C. elegans* midbodies are released, phagocytosed and undergo LC3-dependent degradation independent of macroautophagy. *J Cell Sci* 2016 ; 129 : 3721-31.
45. Fazeli G, Stetter M, Lisack JN, Wehman AM. *C. elegans* blastomeres clear the corpse of the second polar body by LC3-associated phagocytosis. *Cell Rep* 2018 ; 23 : 2070-82.
46. Mailleux AA, Overholtzer M, Brugge JS. L'entose, mort cellulaire par cannibalisme entre cellules tumorales. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 246-8.

TIRÉS À PART
M. Biard-Piechaczyk

Bon de commande à retourner à EDP Sciences, 17 avenue du Hoggar, 91944 Les Ulis Cedex
Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org



NOM : ..... Prénom : .....
Adresse : .....
Code postal : ..... Ville : .....
Pays : .....
Fonction : .....
Je souhaite recevoir l'ouvrage
Le sexe des anges : 20 € + 3 € de port = 23 € TTC
en ..... exemplaire, soit un total de ..... €
❒ Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences
❒ Par carte bancaire : ❒ Visa ❒ Eurocard/Mastercard
Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | Signature :
Date d'expiration : | | | | | |
N° de contrôle au dos de la carte : | | | |

8.2 HIV-1 Vpr inhibits autophagy during the early steps of infection of CD4 T cells

Annexe II

Cet article est actuellement soumis pour publication

HIV-1 Vpr inhibits autophagy during the early steps of infection of CD4 T cells

Jamal Alfaisal*, Alice Machado * (co-premiers auteurs),

Mathilde Galais, Véronique Robert-Hebmann, Laetitia Arnauné-Pelloquin

Lucile Espert et Martine Biard-Piechaczyk

HIV-1 Vpr inhibits autophagy during the early steps of infection of CD4 T cells

Jamal Alfaisal[1§], Alice Machado[1§], Mathilde Galais[1], Véronique Robert-Hebmann[1], Laetitia Arnauné-Pelloquin[2], Lucile Espert[1*], Martine Biard-Piechaczyk[1*]

[1] IRIM, University of Montpellier, CNRS, 34293 Montpellier, France

[2] Centre de Recherches sur la Cognition animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

[§] These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors:

Martine Biard-Piechaczyk, martine.biard@irim.cnrs.fr

IRIM, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

Tel : 33 4 34 35 94 55

Fax : 33 4 34 35 94 11

Lucile Espert, lucile.espert@irim.cnrs.fr

IRIM, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

Tel : 33 4 34 35 94 55

Fax : 33 4 34 35 94 11

ABSTRACT

Autophagy is triggered during HIV-1 entry into CD4 T cells and then very rapidly controlled, before provirus integration into the host genome, by a still unknown mechanism. As HIV-1 viral protein R (Vpr) is the only auxiliary protein found within the virion in substantial amount, we studied its capabilities to control the early steps of autophagy. We demonstrated here that ectopic Vpr, as well as Vpr coming from the virus, block autophagy. Interestingly, Vpr decreases the expression level of two essential autophagy proteins (ATG), LC3B and Beclin-1, and an important autophagy-related protein, BNIP3. We determined that Vpr decreases the transcription of these ATGs and promotes the degradation of the FOXO3a transcription factor through the ubiquitin proteasome system. In summary, we provide insights of how HIV-1 controls the autophagy process very early after its entry into CD4 T cells and discovered a new function of Vpr.

Key words: autophagy; HIV-1; Vpr; Foxo3a; LC3

1. Introduction

Autophagy is a lysosomal degradation mechanism involving autophagy related proteins (ATGs). Sequential ATG complexes, including the ULK1 complex, the Beclin-1/class III PI3K complex and the ATG5/ATG12 and ATG8/LC3 conjugation systems, orchestrate and mediate the formation of double membrane vesicles (autophagosomes) that encompass cytoplasmic material (Wesselborg and Stork, 2015). The autophagosomes then fuse with lysosomes for cargo degradation. BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3), a member of the BH3-only subfamily of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of autophagy in different cell types (Bellot et al., 2009; Hamacher-Brady et al., 2007; Kanzawa et al., 2005). BNIP3 can thus be defined as an ATG by regulating autophagy induction (Fullgrabe et al., 2016). BNIP3 triggers also mitophagy (Ney, 2015) and apoptosis (Landes et al., 2010), and its precise functions are not yet clearly defined (Burton and Gibson, 2009).

Autophagy is regulated by several transcription factors, including the forkhead transcription factor FOXO3a (Warr et al., 2013), a potent transcriptional activator responsible for ATG genes induction such as MAPLC3B (microtubule-associated protein light chain 3B, hereafter referred to as LC3), BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3) and Beclin-1 (Mammucari et al., 2007; Sanchez et al., 2012).

Besides its role in maintaining homeostasis, autophagy plays a crucial role in the immune responses against pathogens. Autophagy is induced into CD4 T cells by HIV-1 envelope (Env), via the fusogenic function of gp41 (Denizot et al., 2008). In bystander CD4 T cells, which are not productively infected, autophagy is uncontrolled and leads to their death by apoptosis (Espert et al., 2006). This mechanism is thus responsible, at least in part, for HIV-1 pathogenesis. Autophagy is differentially controlled in HIV-1-infected cells (Espert et al., 2009). In macrophages, autophagy is required for HIV-1 replication, and IRGM (immunity-

associated GTPase family M) plays an important role through its binding to Nef (Gregoire et al., 2011). However, the autophagy flux can degrade HIV-1 and Nef acts as an anti-autophagic maturation factor through interaction with beclin-1 (Kyei et al., 2009) and through transcription factor EB sequestration (Campbell et al., 2015). In CD4 T cells, autophagy is an anti-HIV-1 process by selectively degrading the viral transactivator Tat, an essential protein for viral transcription (Sagnier et al., 2015). We and others have previously reported that autophagy is blocked in CD4 T cells that were productively infected by HIV-1 (Espert et al., 2009; Zhou and Spector, 2008), thus allowing HIV-1 replication to occur. We already know that neo-synthesized Vif blocks autophagy in CD4 T cells infected by HIV-1 for at least 4 days (Borel et al., 2015). However, the Env-induced autophagy level is very rapidly controlled in infected CD4 T cells, before its complete inhibition in the late steps of infection (Sagnier et al., 2015). This result suggests that another viral component, present in the incoming viral particles, acts very early after HIV-1 entry, before integration.

Among the HIV-1 auxiliary proteins, viral protein R (Vpr) is the only one packaged into virions in large quantity (Cohen et al., 1990). It is a multifunctional viral protein essential for viral replication in macrophages (Heinzinger et al., 1994), but it also facilitates viral replication in CD4 T cells (Hohne et al., 2016; Rucker et al., 2004; Zhou et al., 2012). Vpr is known to play multiple roles at different stages of the HIV-1 viral life cycle such as arresting the cell cycle at the G2/M phase, increasing the activity of the HIV-1 long terminal repeat and regulating apoptosis (Guenzel et al., 2014) by hijacking E3 ubiquitin ligases. Indeed, Vpr binds to DCAF1 (DDB1 (DNA damage-binding protein 1) and CUL4-associated factor 1), also known as viral protein R binding protein (VprBD), which is part of two E3 ubiquitin ligases, DCAF1-DDB1-CUL4-ROC1 and DCAF1-DDB1-DYRK2-EDD. Thus, Vpr targets cellular proteins to proteasomal degradation, such as the uracil DNA glycosylase 2 (UNG2) and single-strand selective

monofunctional uracil DNA glycosylase 1 (SMUG1) (Schrofelbauer et al., 2005) or the endoribonuclease Dicer (Casey Klockow et al., 2013).

We demonstrate here that ectopic Vpr inhibits the basal and induced autophagy flux. In the context of HIV-1 infection of CD4 T cells, Vpr coming from the viruses decreases autophagy triggered during viral entry. Interestingly, Vpr decreases the expression of three ATGs, LC3, Beclin-1 and BNIP3, at their transcriptional level, and induces the degradation of the transcription factor FOXO3a.

2. Materials and methods

Cell lines, viruses and infections. The Jurkat CD4 T cell line and the adherent HEK.293T cell line were cultured in RPMI and DMEM, respectively, supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% fetal calf serum. HIV-1 infection of Jurkat cells was performed with normalized amounts of supernatant of HEK.293T cells that have been transfected with X4 viruses (NL4-3 or NL4-3ΔVpr strains) for two days. Follow-up of Jurkat cell infection was done by analysing the percentage of infected cells after 24h of infection by flow cytometry using the HIV KC57 FITC kit according to the manufacturer's instructions (Beckman Coulter). Briefly, cells were fixed and permeabilized, and the anti-p24 antibody was added to the cells. After staining for 30min, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), and fluorescence intensity was measured on a Coulter Epics XL Flow Cytometer (Beckman Coulter).

Reagents, plasmids and antibodies. Torin 1 (To) was purchased from Tocris, chloroquine (CQ) and MG132 from Sigma-Aldrich. The pNL4-3 molecular clone and pNL4-3 deleted of Vpr were

obtained from the NIH AIDS Reagent Program. Plasmids that express HA-Vpr and DsRed-Vpr were a gift from S. Benichou (Institut Cochin, Paris), and plasmid expressing Flag-FOXO3a was purchased from Addgene. Anti-LC3, anti-GAPDH, anti-Flag, anti-BNIP3 and anti-HA antibodies were obtained from Sigma-Aldrich; anti-Beclin-1 antibody was purchased from Santa-Cruz Biotechnologies. The monoclonal anti-p24 antibody was from the NIH AIDS Reagent program.

Western blotting. Cells were washed twice in PBS and the cell pellet was resuspended in Laemmli buffer. Cell lysates were electrophoresed in 12% ProsieveTM 50 gel (Lonza) and blotted to PVDF membranes. After a blocking step for 1 hour at room temperature in PBS containing 0.5% casein, blots were incubated with the primary antibody in the blocking buffer. After 3 washes with PBS and 0.05% Tween, the blots were incubated with peroxidase-coupled antiserum diluted in the blocking buffer. After further washes, the immune complexes were revealed by ECL (Biorad) and autoradiographed. Quantification of protein expression was performed by densitometry analysis using the ImageJ software and statistical analysis was performed using ANOVA.

Analysis of autophagy. The autophagy flux was analyzed by western blot by following the expression level of LC3-II and by immunofluorescence after labeling of endogenous LC3-II using in both cases the rabbit anti-LC3 antibody L7543 (1 µg/ml, Sigma Aldrich). To analyze the flux, Torin 1 (To, 2 µM, Sigma Aldrich) was added for 3h, in presence or absence of the autophagic flux blocker chloroquine (CQ, 50µM, Sigma Aldrich). Basal autophagy was also analyzed in parallel.

Immunofluorescence studies. Cells were fixed in 1% paraformaldehyde for 10min and then in 100% methanol for 5min at room temperature. After three washes in PBS, the first antibody was incubated for 1h at room temperature. After further washes, the fluorochrome-conjugated secondary antibody (Life Technologies) is then incubated for 30min, the nuclei were labeled with Dapi, and the cells were examined by epifluorescence using a Leica microscope. To analyze autophagy in HIV-1-infected CD4 T cells, cells were incubated with the rabbit anti-LC3 antibody L7543 (1µg/ml, Sigma Aldrich) and the mouse monoclonal anti-p24 antibody for 1h. After further washes, the cells were incubated with Alexa-488 and -568-conjugated secondary antibodies (Life Technologies) for 30min. The number of LC3 dots (green) per infected CD4 T cell (red) was counted. More than 100 CD4 T cells were analyzed for each culture condition by 2 independent investigators. Statistical analysis was performed using ANOVA.

Transfection. Jurkat cells were nucleofected using the Amaxa technology and HEK.293T cell transfection was performed using the Turbofect transfection reagent (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions.

Reverse transcription PCR (RT-PCR). RNA was purified from 106 cells using the Nucleospin RNA plus (Macherey-Nagel), and RT-PCR was performed using the QIAGEN OneStep RT-PCR kit according to the manufacturer's instructions. The oligonucleotides used for LC3, Beclin-1, BNIP3 and GAPDH mRNA are: LC3 FOR: GATGTCCGACTTATTCGAGAGC; LC3 BACK: TTGAGCTGTAAGCGCCTTCTA; Beclin-1 FOR: ACTGTGTTGCTGCTCCATGC; Beclin-1 BACK: CCCAAGCAAGACCCCACTTA; BNIP3 FOR: GAACTCCCTGAGGCGGGAAGAA; BNIP3 BACK:

AGTGTTTGCCGCTGTCAGTAC. GAPDH FOR: CCCATCACCATCTTCCAG; GAPDH BACK: CCTGCTTCACCACCTTCT. A control RT-PCR was done without RNA.

Cellular fractionation. Cells were lysed in hypotonic buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.65, 1.5mM MgCl2, 1mM DTT, 20mM N-ethylmaleimide, and protease inhibitors) and centrifuged at 500 × g for 15min. The supernatant constituted the cytoplasmic fraction and the pellet resuspended in Laemmli buffer constituted the nuclear fraction.

3. Results

Vpr inhibits the autophagy process. Basal autophagy and chemically-induced autophagy (Torin 1, To) were first analyzed by immunofluorescence in Jurkat cells expressing, or not, HA-Vpr, by counting the number of LC3 dots per cell. The autophagy flux was also studied using chloroquine (CQ), which blocks the maturation step of the process. As expected, autophagy is induced by To when Vpr is not expressed (Fig. 1A, white bars). However, the number of LC3 puncta remains very low in cells expressing HA-Vpr (red cells) whatever the conditions used, i.e. cells treated by To, CQ, or To + CQ (Fig. 1A, black bars). This result was reproduced with the ectopically expressed DsRed-Vpr in Jurkat cells (Fig. 1b), indicating that the tag has no influence on the inhibitory effect of Vpr on autophagy. It is important to note that cell nucleofection with a plasmid expressing the tag alone does not affect the autophagy flux (data not shown).

To confirm these results, we analyzed the effect of Vpr on autophagy by western blot by following the level of lipidated LC3 (LC3-II) in Jurkat cells expressing, or not, HA-Vpr. As shown in figure 1C, LC3-II expression increases in presence of To + CQ without HA-Vpr, whereas the

level of LC3-II stays very low in the presence of HA-Vpr. Altogether, these results confirm that Vpr inhibits both basal and induced autophagy. Interestingly, we observed that Vpr also decreases the expression of LC3-I, the non-lipidated form of LC3 (Fig. 1C). In accordance, red cells (Vpr positive cells) have a low LC3-I labeling (diffuse green fluorescence) in the cell cytoplasm (Fig. 1A and Fig. 1B).

Vpr decreases the expression of several ATGs and acts at the transcriptional level. As we showed that Vpr decreases the LC3-I expression level, we then analyzed the expression of two others ATGs, i.e. Beclin-1 and BNIP3. As presented in Figure 2, Vpr triggers a significant decrease in the expression of the three ATGs analyzed. It is worth noting that LC3 and HA-Vpr cannot be revealed on the same blot due to their very similar molecular weight. This result suggests that Vpr may either trigger degradation of the three proteins, or, more probably, regulate the expression of these ATGs upstream by acting at their transcriptional level.

To analyze whether Vpr could modulate the transcription of the LC3, Beclin-1 and BNIP3 genes, we studied the expression of their mRNA by RT-PCR in Jurkat cells expressing, or not, HA-Vpr. As shown in Figure 3, the mRNA level of these three genes is strongly decreased in presence of HA-Vpr. Expression of HA-Vpr was controlled by Western blot (data not shown). These results demonstrate that the Vpr-mediated decrease in the expression of the ATGs tested is transcriptionally regulated.

Vpr, coming from the virion, inhibits HIV-1-induced autophagy. As Vpr is incorporated into the viral particles, we next analyzed the capability of Vpr coming from virions to block Env-induced autophagy at the early steps of infection, before the integration of the provirus into

the genome of the host cells (Mohammadi et al., 2013). To this aim, we infected Jurkat cells with HIV-1 (NL4-3 or NL4-3ΔVpr strains) and analyzed autophagy after 8h of infection, in presence or absence of CQ to follow the autophagy flux. The quantity of viruses was adjusted to have the same percentage of infected Jurkat cells (40%) by flow cytometry at 24h of infection. Autophagy was analyzed in HIV-1-infected Jurkat cells by counting the number of endogenous LC3 dots in cells expressing the viral capsid (p24 positive cells). As shown in Figure 4A, the number of autophagosomes is significantly higher in HIV-1ΔVpr-infected cells compared to wt HIV-1-infected cells, in presence or absence of CQ. These results demonstrate that Vpr, coming from the virion, negatively controls autophagy at the early step of infection, before de novo expression of the viral proteins.

The FOXO3a transcription factor is a target of Vpr. Several transcription factors are known to trigger autophagy by regulating the expression of autophagy-related genes (Lapierre et al., 2015). Among them, FOXO3a hold our attention because its activation increases the abundance of mRNA and protein levels of LC3 and BNIP3 in several cell types, including cardiomyocytes, mouse primary renal proximal tubular cells or skeletal muscle cells (Kume et al., 2010; Mammucari et al., 2007; Sengupta et al., 2009). FOXO3a is also known to induce the expression of the Beclin-1 in muscle cells (Mammucari et al., 2007; Webb and Brunet, 2014). As Vpr is known to target several cellular proteins to degradation by the ubiquitin-proteasome system (UPS), we analyzed whether Vpr could also trigger FOXO3a degradation. We thus analyzed the expression level of Flag-FOXO3a in presence or absence of HA-Vpr and MG132, a UPS inhibitor. As shown in Figure 5A, the expression level of FOXO3a is strongly decreased in presence of HA-Vpr without MG132, and this expression is almost completely restored in presence of the UPS inhibitor. This result indicates that Vpr triggers the UPS-mediated FOXO3a degradation.

FOXO3a is mainly regulated through its subcellular localization. Indeed, its transcriptionally active form is located in the nucleus, while its inactive form is sequestered in the cytoplasm. To analyze whether Vpr could influence the FOXO3a localization into cells, we analyzed its expression level after cell fractionation in presence or absence of HA-Vpr. The Figure 5B shows that Flag-FOXO3a and HA-Vpr are present in both fractions, but the latter is more expressed into the nucleus. In presence of HA-Vpr, expression of Flag-FOXO3a is dramatically decreased in the cytoplasm but is also strongly reduced in the nucleus, indicating that the overall pool of FOXO3a is subjected to Vpr-mediated degradation (Fig. 5B), and that Vpr does not trigger FOXO3a shuttling. Vpr-mediated FOXO3a degradation is UPS-dependent since addition of MG132 restores the expression level of FOXO3a in both fractions (Fig. 5C).

4. Discussion

During HIV-1 entry into CD4 T cells, autophagy is induced through the fusogenic function of gp41 (Denizot et al., 2008). Our previous results have shown that Env-mediated autophagy is an anti-viral mechanism by degrading specifically Tat (Sagnier et al., 2015). Thus, autophagy must be negatively regulated in infected CD4 T cells, the main target cells of HIV-1, for an efficient viral replication. After provirus integration, neosynthesized viral infectivity factor (Vif) blocks autophagy (Borel et al., 2015), but a first negative control of autophagy occurs earlier after HIV-1 entry, before synthesis of new viral proteins (Sagnier et al., 2015). Vpr was a good candidate for this action since it is the only auxiliary viral protein well incorporated into virions. Many functions of this viral protein are linked to its capability to bind to E3 ligases in order to degrade their substrates. In addition, several E3 ligases, and especially CUL-RING E3 ligases, can regulate the autophagy machinery and the upstream regulators of autophagy (Cui et al., 2016). We demonstrate here that the expression level of the proteins BNIP3, LC3 and Beclin-

1 dramatically decreases in presence of Vpr. We thus investigated their level of transcription in the presence of Vpr. Interestingly, these three ATG genes were negatively regulated by Vpr at the transcriptional level, indicating that Vpr acts upstream, on a transcriptional factor. Several positive transcriptional regulators of ATGs are known, including transcription factor EB (TFEB), FOXO3a and E2F1 (Fullgrabe et al., 2016). All these factors induce the expression of LC3 (Polager et al., 2008; Sanchez et al., 2012; Settembre et al., 2011) whereas BNIP3 is overexpressed by both E2F1 and FOXO3a (Mammucari et al., 2007; Shaw and Kirshenbaum, 2008; Yurkova et al., 2008) and Beclin-1 only by FOXO3a (Sanchez et al., 2012). As LC3, BNIP3 and Beclin-1 are downregulated in presence of Vpr, we focused our work on FOXO3a. In addition, we already know that Env triggers the production of ROS (Molina et al., 2007) and numerous data demonstrate that FOXO3a is activated in response to oxidative stress (Storz, 2011). However, we cannot exclude a role of the other transcriptional factors in Vpr-mediated inhibition of autophagy.

FOXO3a is regulated by various post-translational modifications including phosphorylation that dictates its subcellular localization. One study have indirectly linked Vpr to FOXO3a, through its interaction with 14-3-3 (Kino et al., 2005b). 14-3-3 are a highly conserved family of molecules that inhibit FOXO3a by inducing its accumulation in the cytoplasm (Brunet et al., 1999; Brunet et al., 2002; Dobson et al., 2011; Lehtinen et al., 2006; Tzivion et al., 2011). In a context of insulin resistance/lipodystrophy syndrome, Vpr binding to 14-3-3 inhibits insulin/PI3K/Akt-1 signaling pathway, triggering FOXO3a translocation to the nucleus (Kino et al., 2005a). We demonstrated here another function of Vpr, where Vpr triggers the degradation of FOXO3a by the proteasome both in the cytoplasm and the nucleus of cells. Further studies are needed to know the E3 ligase involved in this process. However, as FOXO3a is involved in many essential cellular processes, including the control of the cell cycle, the

protection from oxidative stress, apoptosis and longevity, these results are of major interest to understand the actions of Vpr at different steps of the HIV-1 life cycle.

In conclusion, these data demonstrate that during HIV-1 infection of CD4 T cells, incoming Vpr acts to inhibit the autophagy process activated during viral entry to “prepare” the cells for an efficient viral replication. These results also open the route to a better understanding of the roles of Vpr during HIV-1 infection through FOXO3a degradation.

Acknowledgments

We thank S. Benichou for providing plasmids expressing Vpr and M. Mougel for technical advises and very helpful scientific discussions. This work was supported by institutional funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Montpellier University and grants from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS) and Sidaction. J.A. was benefiting from the Dunia Beam Erasmus Mundus scholarship, funded with the support of the European Commission.

Conflicts of Interest

The authors have no financial interests to declare.

References

Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., Mazure, N.M., 2009. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. Mol Cell Biol 29, 2570-2581.

Borel, S., Robert-Hebmann, V., Alfaisal, J., Jain, A., Faure, M., Espert, L., Chaloin, L., Paillart, J.C., Johansen, T., Biard-Piechaczyk, M., 2015. HIV-1 viral infectivity factor interacts with microtubule-associated protein light chain 3 and inhibits autophagy. AIDS 29, 275-286.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E., 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. Cell 96, 857-868.

Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J.V., Dalal, S.N., DeCaprio, J.A., Greenberg, M.E., Yaffe, M.B., 2002. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. J Cell Biol 156, 817-828.

Burton, T.R., Gibson, S.B., 2009. The role of Bcl-2 family member BNIP3 in cell death and disease: NIPping at the heels of cell death. Cell Death Differ 16, 515-523.

Campbell, G.R., Rawat, P., Bruckman, R.S., Spector, S.A., 2015. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Inhibits Autophagy through Transcription Factor EB Sequestration. PLoS Pathog 11, e1005018.

Casey Klockow, L., Sharifi, H.J., Wen, X., Flagg, M., Furuya, A.K., Nekorchuk, M., de Noronha, C.M., 2013. The HIV-1 protein Vpr targets the endoribonuclease Dicer for proteasomal degradation to boost macrophage infection. Virology 444, 191-202.

Cohen, E.A., Dehni, G., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., 1990. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. J. Virol. 64, 3097-3099.

Cui, D., Xiong, X., Zhao, Y., 2016. Cullin-RING ligases in regulation of autophagy. Cell division 11, 8.

Denizot, M., Varbanov, M., Espert, L., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Garcia, E., Curriu, M., Mamoun, R., Blanco, J., Biard-Piechaczyk, M., 2008. HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. Autophagy 4, 998-1008.

Dobson, M., Ramakrishnan, G., Ma, S., Kaplun, L., Balan, V., Fridman, R., Tzivion, G., 2011. Bimodal regulation of FoxO3 by AKT and 14-3-3. Biochim Biophys Acta 1813, 1453-1464.

Espert, L., Denizot, M., Grimaldi, M., Robert-Hebmann, V., Gay, B., Varbanov, M., Codogno, P., Biard-Piechaczyk, M., 2006. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. J Clin Invest 116, 2161-2172.

Espert, L., Varbanov, M., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Robbins, I., Sanchez, F., Lafont, V., Biard-Piechaczyk, M., 2009. Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. PLoS ONE 4, e5787.

Fullgrabe, J., Ghislat, G., Cho, D.H., Rubinsztein, D.C., 2016. Transcriptional regulation of mammalian autophagy at a glance. J Cell Sci 129, 3059-3066.

Gregoire, I.P., Richetta, C., Meyniel-Schicklin, L., Borel, S., Pradezynski, F., Diaz, O., Deloire, A., Azocar, O., Baguet, J., Le Breton, M., Mangeot, P.E., Navratil, V., Joubert, P.E., Flacher, M., Vidalain, P.O., Andre, P., Lotteau, V., Biard-Piechaczyk, M., Rabourdin-Combe, C., Faure, M., 2011. IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. PLoS Pathog 7, e1002422.

Guenzel, C.A., Herate, C., Benichou, S., 2014. HIV-1 Vpr-a still "enigmatic multitasker". Front Microbiol 5, 127.

Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., Logue, S.E., Sayen, M.R., Jinno, M., Kirshenbaum, L.A., Gottlieb, R.A., Gustafsson, A.B., 2007. Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. Cell Death Differ 14, 146-157.

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

Hohne, K., Businger, R., van Nuffel, A., Bolduan, S., Koppensteiner, H., Baeyens, A., Vermeire, J., Malatinkova, E., Verhasselt, B., Schindler, M., 2016. Virion encapsidated HIV-1 Vpr induces NFAT to prime non-activated T cells for productive infection. Open biology 6.

Kanzawa, T., Zhang, L., Xiao, L., Germano, I.M., Kondo, Y., Kondo, S., 2005. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. Oncogene 24, 980-991.

Kino, T., De Martino, M.U., Charmandari, E., Ichijo, T., Outas, T., Chrousos, G.P., 2005a. HIV-1 accessory protein Vpr inhibits the effect of insulin on the Foxo subfamily of forkhead transcription factors by interfering with their binding to 14-3-3 proteins: potential clinical implications regarding the insulin resistance of HIV-1-infected patients. Diabetes 54, 23-31.

Kino, T., Gragerov, A., Valentin, A., Tsopanomihalou, M., Ilyina-Gragerova, G., Erwin-Cohen, R., Chrousos, G.P., Pavlakis, G.N., 2005b. Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to 14-3-3 proteins and facilitates complex formation with Cdc25C: implications for cell cycle arrest. J Virol 79, 2780-2787.

Kume, S., Uzu, T., Horiike, K., Chin-Kanasaki, M., Isshiki, K., Araki, S., Sugimoto, T., Haneda, M., Kashiwagi, A., Koya, D., 2010. Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. J Clin Invest 120, 1043-1055.

Kyei, G.B., Dinkins, C., Davis, A.S., Roberts, E., Singh, S.B., Dong, C., Wu, L., Kominami, E., Ueno, T., Yamamoto, A., Federico, M., Panganiban, A., Vergne, I., Deretic, V., 2009. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. J Cell Biol 186, 255-268.

Landes, T., Emorine, L.J., Courilleau, D., Rojo, M., Belenguer, P., Arnaune-Pelloquin, L., 2010. The BH3-only Bnip3 binds to the dynamin Opa1 to promote mitochondrial fragmentation and apoptosis by distinct mechanisms. EMBO Rep 11, 459-465.

Lapierre, L.R., Kumsta, C., Sandri, M., Ballabio, A., Hansen, M., 2015. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. Autophagy 11, 867-880.

Lehtinen, M.K., Yuan, Z., Boag, P.R., Yang, Y., Villen, J., Becker, E.B., DiBacco, S., de la Iglesia, N., Gygi, S., Blackwell, T.K., Bonni, A., 2006. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. Cell 125, 987-1001.

Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., Goldberg, A.L., Schiaffino, S., Sandri, M., 2007. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. Cell Metab 6, 458-471.

Mohammadi, P., Desfarges, S., Bartha, I., Joos, B., Zangger, N., Munoz, M., Gunthard, H.F., Beerenwinkel, N., Telenti, A., Ciuffi, A., 2013. 24 hours in the life of HIV-1 in a T cell line. PLoS Pathog 9, e1003161.

Molina, L., Grimaldi, M., Robert-Hebmann, V., Espert, L., Varbanov, M., Devaux, C., Granier, C., Biard-Piechaczyk, M., 2007. Proteomic analysis of the cellular responses induced in uninfected immune cells by cell-expressed X4 HIV-1 envelope. Proteomics 7, 3116-3130.

Ney, P.A., 2015. Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. Biochim Biophys Acta 1853, 2775-2783.

Polager, S., Ofir, M., Ginsberg, D., 2008. E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. Oncogene 27, 4860-4864.

Rucker, E., Grivel, J.C., Munch, J., Kirchhoff, F., Margolis, L., 2004. Vpr and Vpu are important for efficient human immunodeficiency virus type 1 replication and CD4+ T-cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo. J Virol 78, 12689-12693.

Sagnier, S., Daussy, C.F., Borel, S., Robert-Hebmann, V., Faure, M., Blanchet, F.P., Beaumelle, B., Biard-Piechaczyk, M., Espert, L., 2015. Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. J Virol 89, 615-625.

Sanchez, A.M., Csibi, A., Raibon, A., Cornille, K., Gay, S., Bernardi, H., Candau, R., 2012. AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. J Cell Biochem 113, 695-710.

Schrofelbauer, B., Yu, Q., Zeitlin, S.G., Landau, N.R., 2005. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases. J Virol 79, 10978-10987.

Sengupta, A., Molkentin, J.D., Yutzey, K.E., 2009. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. J Biol Chem 284, 28319-28331.

Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D.C., Ballabio, A., 2011. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. Science 332, 1429-1433.

Shaw, J., Kirshenbaum, L.A., 2008. Molecular regulation of autophagy and apoptosis during ischemic and non-ischemic cardiomyopathy. Autophagy 4, 427-434.

Storz, P., 2011. Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. Antioxid Redox Signal 14, 593-605.

Tzivion, G., Dobson, M., Ramakrishnan, G., 2011. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. Biochim Biophys Acta 1813, 1938-1945.

Warr, M.R., Binnewies, M., Flach, J., Reynaud, D., Garg, T., Malhotra, R., Debnath, J., Passegue, E., 2013. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. Nature 494, 323-327.

Webb, A.E., Brunet, A., 2014. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. Trends Biochem Sci 39, 159-169.

Wesselborg, S., Stork, B., 2015. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. Cell Mol Life Sci 72, 4721-4757.

Yurkova, N., Shaw, J., Blackie, K., Weidman, D., Jayas, R., Flynn, B., Kirshenbaum, L.A., 2008. The cell cycle factor E2F-1 activates Bnip3 and the intrinsic death pathway in ventricular myocytes. Circulation research 102, 472-479.

Zhou, D., Spector, S.A., 2008. Human immunodeficiency virus type-1 infection inhibits autophagy. AIDS 22, 695-699.

Zhou, T., Dang, Y., Baker, J.J., Zhou, J., Zheng, Y.H., 2012. Evidence for Vpr-dependent HIV-1 replication in human CD4+ CEM.NKR T-cells. Retrovirology 9, 93.

Figure Legends

Figure 1. Ectopic Vpr inhibits the autophagy flux. (A) Jurkat cells were transfected with a plasmid expressing HA-Vpr for 1 day. Torin 1 (To, 2µM), chloroquine (CQ, 50µM) or To + CQ was then added in the wells for 3h. Non-treated (NT) cells were analyzed in parallel. Cells were fixed, and LC3 and HA-Vpr were detected by immunofluorescence. The number of autophagosomes (LC3 dots) was counted by 2 investigators in more than 100 cells. Statistical significance was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA, **P<0.01; ***P<0.001). (B) Jurkat cells were transfected with a plasmid expressing DsRed-Vpr for 1 day. To (2µM), CQ (50µM) or To + CQ was then added in the wells for 3h. Cells were fixed, and LC3 and DsRed-Vpr were detected by immunofluorescence. The number of autophagosomes (LC3 dots) was counted by 2 investigators in more than 100 cells. Results are from at least three independent experiments. (C) Jurkat cells were transfected with a plasmid expressing HA-Vpr or HA alone for 1 day. To (2µM), CQ (50µM) or To plus CQ was then added in the wells for 3h. Cells were harvested, and lysates were immunoblotted with anti-LC3 Ab and anti-GAPDH Ab as a loading control. LC3 levels (LC3-II and LC3-I) with or without Vpr were quantified by densitometry and normalized with GAPDH expression levels. Results are from at least three independent experiments.

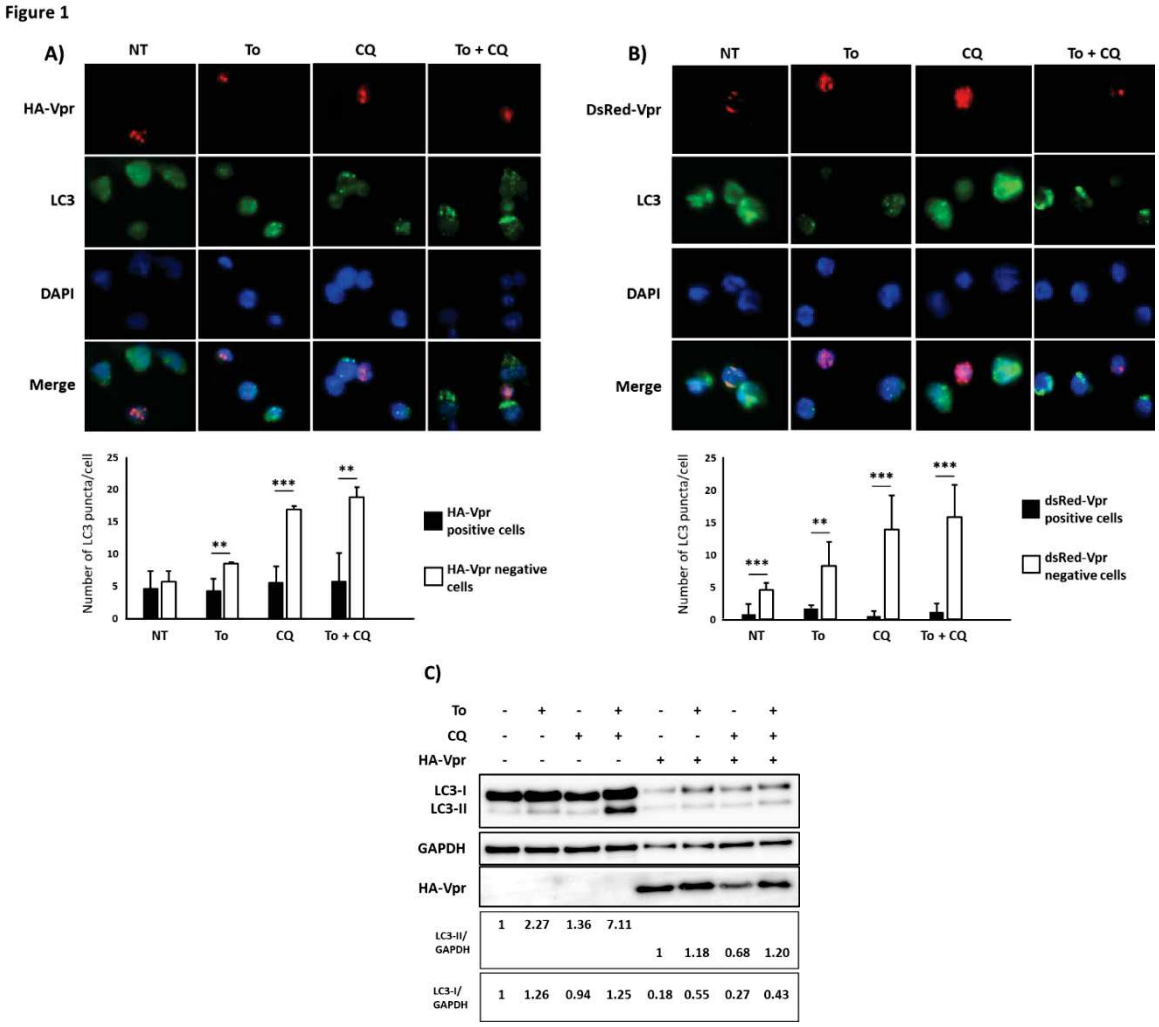


Figure 2. Vpr decreases the expression level of LC3, Beclin-1 and BNIP3. Jurkat cells were transfected with a plasmid expressing HA or HA-Vpr for 1 day. Cells were harvested, and lysates were immunoblotted with the Abs of interest and the anti-GAPDH Ab as a loading control. Results are from at least three independent experiments.

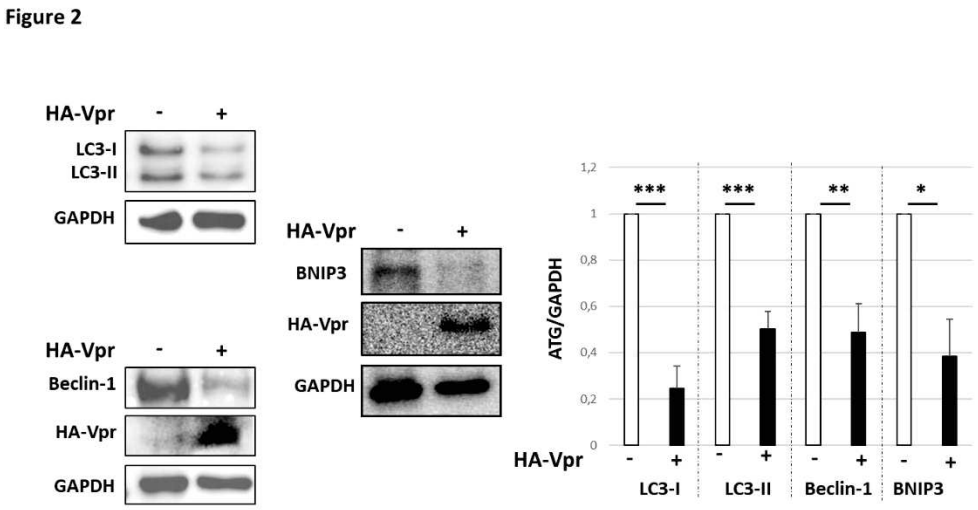


Figure 3. Vpr acts at the transcriptional level. Jurkat cells were transfected with a plasmid expressing HA or HA-Vpr for 1 day. Total RNA was purified and expression of LC3, BNIP3 and Beclin-1 mRNA, and GAPDH mRNA as a control, was analyzed by RT-PCR. A negative control was done without RNA. The figure is representative of three independent experiments.

Figure 3

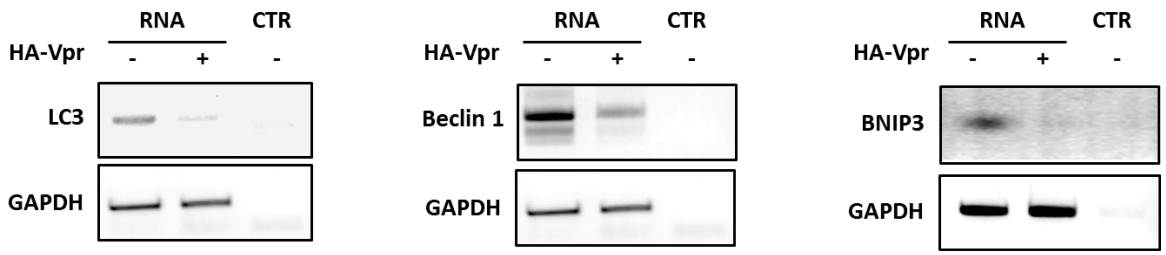


Figure 4. Vpr coming from the viruses inhibits autophagy. Jurkat cells were infected by wt HIV-1 or HIV-1ΔVpr for 8h. Cells were treated, or not, with CQ for 3h before fixation, and LC3 and p24 were detected by immunofluorescence. The number of autophagosomes (LC3 dots) was counted by 2 investigators in more than 100 infected cells (p24 positive cells). Results are from at least three independent experiments. Statistical significance was analyzed by ANOVA (*P<0.05).

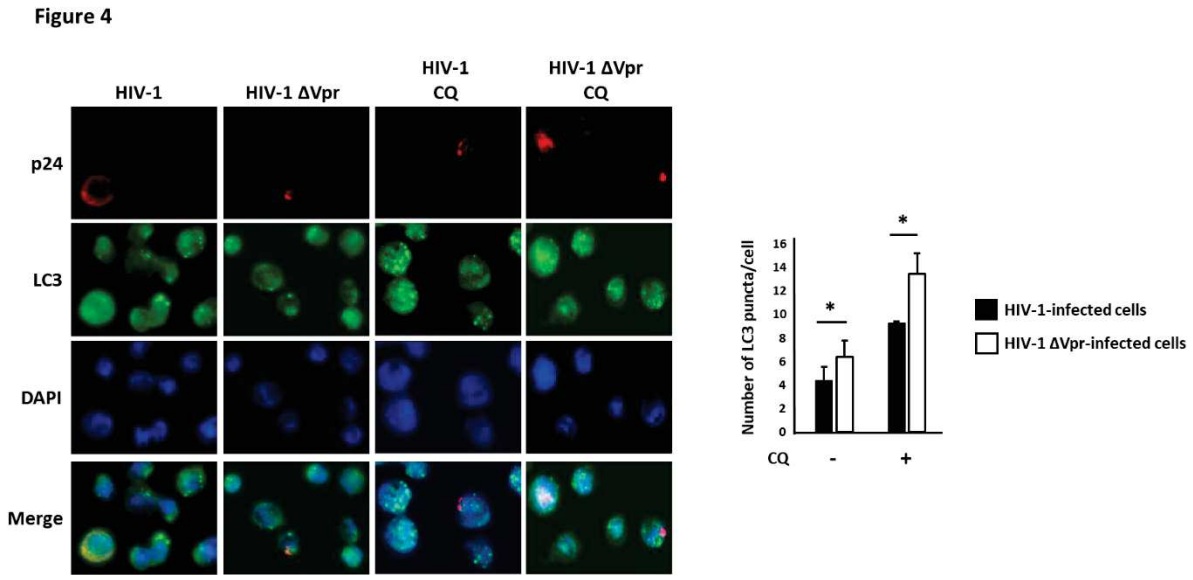
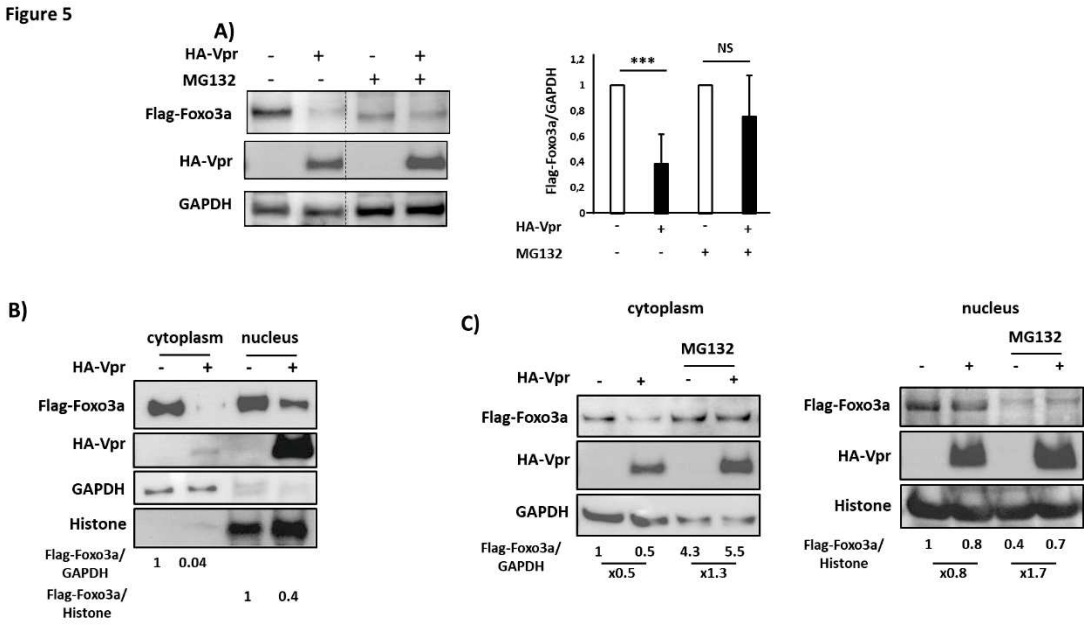


Figure 5. Vpr triggers UPS-dependent degradation of FOXO3a. (A) HEK293T cells were transfected with plasmids expressing HA or HA-Vpr and Flag-FOXO3a and treated or not with MG132 for 5h at 20µM. Expression of Flag-FOXO3a was analyzed by western blot. Statistical significance was analyzed by ANOVA (***P<0.001; NS: non-significant difference). (B) HEK293T cells were transfected for one day with plasmids expressing HA or HA-Vpr and Flag-FOXO3a, and expression of Flag-FOXO3a was analyzed in both the cytoplasm and the nucleus. (C) In the same experimental conditions, subcellular expression of Flag-FOXO3a was analyzed in presence or absence of MG132. A ratio between expression of Flag-Foxo3a in absence and presence of Vpr as well as the x-fold difference was indicated. Results are from at least three independent experiments.



8.3 Participations à des congrès scientifiques

8.3.A L'Université des Jeunes Chercheurs de Sidaction – 14 au 20 Octobre 2017 Carry-le-Rouet

Mathilde Galais

Fonction : Doctorante 2ème année

Domaine de recherche : Recherche fondamentale

Discipline : Virologie

Ville-Pays : Montpellier - France

Auteurs et affiliations

Mathilde Galais, Coralie F. Daussy, Véronique Robert-Hebbman, Martine Biard-Piechaczyk et Lucile Espert

Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), CNRS UMR9004, Université de Montpellier, 1919 Route de Mende, Montpellier, France

Résumé

Titre : Rôle de l'autophagie sélective lors de l'infection des cellules T CD4 par le VIH-1.

Le développement de la phase SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise) chez les patients infectés par le virus VIH-1 (Virus de l'Immunodéficience Humaine) se caractérise par une diminution progressive du nombre de cellules T CD4. Or la majorité des cellules constituant cette déplétion sont non-infectées et appelées "bystander". En 2006, notre équipe a montré que le contact entre les cellules infectées exprimant les glycoprotéines de l'enveloppe (Env) et les cellules non-infectées exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 déclenche au sein de ces dernières la voie d'autophagie, ce qui mène à une mort cellulaire par apoptose. L'autophagie est un processus impliqué dans la dégradation de matériel cytoplasmique après sa séquestration au sein de vacuoles dans lesquelles il sera dégradé puis recyclé. Ce processus peut être hautement sélectif par l'action de protéines réceptrices tels que p62 ou NBR1.

L'objectif de mon projet de thèse vise à comprendre comment l'autophagie induite par Env mène les cellules T CD4 bystander à leur mort par apoptose.

Une précédente étude menée par notre équipe a démontré que les changements induits par Env au sein de ces cellules T CD4 non infectées comprenaient la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) menant à un état de stress oxydatif. Durant la première année de mon doctorat, j'ai obtenu des résultats encourageants par la technique HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence), montrant que le stress oxydatif induit par Env est impliqué dans la mort des cellules T CD4 bystander par apoptose. De plus, nous avons observé une dégradation des protéines peroxysomales par l'autophagie induite par Env dans le même modèle.

Dès lors, nous étudions l'induction par Env d'une dégradation sélective des peroxysomes par autophagie, également appelée pexophagie dans les cellules T CD4 bystander. Les peroxysomes étant des organites responsables de la réponse au stress oxydatif, leur dégradation sélective pourrait empêcher la cellule de faire face au stress oxydatif qu'elle subit et la mener vers une mort cellulaire par apoptose.

Présentation d'un Flash Talk et d'un poster intitulé : Rôle de l'autophagie sélective lors de l'infection des cellules T CD4 par le VIH-1.

8.3.B Journée des Docs et Postdocs Labex EpiGenMed 2017 – 27 Octobre 2017 à Montpellier

Role of selective autophagy during HIV-1 infection of CD4 T cells.

Mathilde Galais[1], Coralie F. Daussy, Véronique Robert-Hebmann, Martine Biard-Piechaczyk and Lucile Espert

[1]Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), CNRS, Université de Montpellier UMR 9004, 1919 Route de Mende, Montpellier, France.

Role of selective autophagy during HIV-1 infection of CD4 T cells.

The development of AIDS (Acquired ImmunoDeficiency Syndrome) in HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus)-infected patients is characterized by a progressive decrease in the number of CD4 T cells. The majority of dying cells are non-infected and called bystander CD4 T cells. In 2006, our team demonstrated that the contact between infected cells (expressing the envelope glycoproteins (Env)) and non-infected cells (expressing the CD4 and CXCR4 receptors) was responsible for enhancing the autophagic pathway which lead to their cellular death by apoptosis. The autophagic pathway is involved in the degradation of cytoplasmic material after its sequestration into vacuoles wherein it will be degraded and then recycled. This process can be highly selective through the receptor proteins such as p62 or NBR1.

The aim of my research project is to understand how Env-mediated autophagy can lead to apoptosis in bystander CD4 T cells.

A precedent work of our team showed that the changes induced by Env in bystander CD4 T cells included the production of reactive oxygen species (ROS) leading to an oxidative stress state. During the first year of my PhD, I have obtained promising results showing, through an HTRF technic (Homogeneous Time Resolved Fluorescence), that this oxidative stress induced by Env is involved in the cellular death by apoptosis of bystander CD4 T cells. Moreover, we have observed a degradation of peroxisomal proteins due to Env-mediated autophagy in the same model.

Therefore, our hypothesis is that Env induces the selective degradation of peroxisomes by autophagy, also known as pexophagy, in bystander CD4 T cells. Since peroxisomes are responsible for regulating the cellular response to an oxidative stress state, their selective degradation could prevent the cell from overcoming this event and eventually leads to its death by apoptosis.

Présentation d'un poster intitulé: Role of selective autophagy during HIV-1 infection of CD4 T cells.

8.3.C 7ème Congrès du CFATG – du 27 au 29 novembre 2017 à Paris

Role of selective autophagy during HIV-1 infection of CD4 T cells.

Galais Mathilde[1], Daussy F. Coralie, Robert-Hebmann Véronique, Biard-Piechaczyk Martine et Espert Lucile

[1] Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), CNRS UMR 9004, Montpellier, France

The development of AIDS (Acquired ImmunoDeficiency Syndrome) in HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus)-infected patients is characterized by a progressive decrease in the number of CD4 T cells. However the number of infected cells is insufficient to explain on its own this depletion. The majority of dying cells are non-infected and called bystander CD4 T cells. In 2006, our team demonstrated that the contact between infected cells (expressing the envelope glycoproteins (Env)) and non-infected cells (expressing the CD4 and CXCR4 receptors) was responsible for enhancing the autophagic pathway which lead to their cellular death by apoptosis. The autophagic pathway is involved in the degradation of cytoplasmic material after its sequestration into vacuoles wherein it will be degraded and then recycled. This process can be highly selective through the receptor proteins such as p62 or NBR1.

The aim of my research project is to understand how Env-mediated autophagy can lead to apoptosis in bystander CD4 T cells.

A precedent work of our team showed that the changes induced by Env in bystander CD4 T cells included the production of reactive oxygen species (ROS) leading to an oxidative stress state. During the first year of my PhD, I have obtained promising results showing, through an HTRF technic (Homogeneous Time Resolved Fluorescence), that this oxidative stress induced by Env is involved in the cellular death by apoptosis of bystander CD4 T cells. Moreover, we have observed a degradation of peroxisomal proteins due to Env-mediated autophagy in the same model.

Therefore, our hypothesis is that Env induces the selective degradation of peroxisomes by autophagy, also known as pexophagy, in bystander CD4 T cells. Since peroxisomes are responsible for regulating the cellular response to an oxidative stress state, their selective degradation could prevent the cell from overcoming this event and eventually leads to its death by apoptosis.

Présentation d'un poster intitulé : Role of selective autophagy during HIV-1 infection of CD4 T cells.

Prix de la meilleure présentation avec poster

8.3.D 16th Congress of the Students of CBS2 Doctoral School – May 31st, 2018 Montpellier

Role of pexophagy in HIV-1 Env-induced apoptosis of uninfected CD4 T cells.

Mathilde Galais, Coralie F. Daussy, Véronique Robert-Hebmann, Martine Biard-Piechaczyk, and Lucile Espert

Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifique UMR9004 Université de Montpellier, France

The development of AIDS in HIV-1 infected patients is characterized by a progressive decrease in the number of CD4 T cells. The majority of dying cells are non-infected cells called bystander CD4 T cells. In 2007 our team demonstrated that the contact between infected cells (expressing the envelope glycoproteins (Env)) and non-infected cells (expressing the CD4 and CXCR4 receptors) was responsible for inducing an oxidative stress state in the later cells and enhancing the autophagic pathway which lead to their cellular death by apoptosis. The aim of my research project is to understand how Env-induced autophagy can lead to apoptosis of those uninfected CD4 T cells. The results obtained demonstrate that peroxisomal proteins (Pex14 & Catalase) are degraded upon Env-induced autophagy. This degradation is dependent on p62/SQSTM1 and NBR1 autophagic receptors. Peroxisomes are organelles important for the detoxification of Reactive Oxygen Species (ROS). Moreover, we have been able to show that Env-induced autophagy is responsible for the depletion of mature peroxisomes, a process known as pexophagy. Our current hypothesis is that the Env-induced pexophagy is responsible for an excessive accumulation of ROS leading the uninfected CD4 T cells to apoptosis.

Key words: Pexophagy, HIV, apoptosis, ROS

Présentation d'un Flash Talk et d'un poster intitulé: Role of pexophagy in HIV-1 Env-induced apoptosis of uninfected CD4 T cells.

8.3.E 8ème Journées du CFATG – 17 au 18 Octobre 2018 La Grande Motte

Role of pexophagy in HIV-1 Env-induced apoptosis of uninfected CD4 T cells.

Mathilde Galais, Coralie F. Daussy, Véronique Robert-Hebmann, Martine Biard-Piechaczyk, and Lucile Espert

Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifique UMR9004 Université de Montpellier, France

The development of AIDS in HIV-1 infected patients is characterized by a progressive decrease in the number of CD4 T cells. The majority of dying cells are non-infected cells called bystander CD4 T cells. In 2007 our team demonstrated that the contact between infected cells (expressing the envelope glycoproteins (Env)) and non-infected cells (expressing the CD4 and CXCR4 receptors) was responsible for inducing an oxidative stress state in the later cells and enhancing the autophagic pathway which lead to their cellular death by apoptosis. The aim of my research project is to understand how Env-induced autophagy can lead to apoptosis of those uninfected CD4 T cells. The results obtained demonstrate that peroxisomal proteins (Pex14 & Catalase) are degraded upon Env-induced autophagy. This degradation is dependent on p62/SQSTM1 and NBR1 autophagic receptors. Peroxisomes are organelles important for the detoxification of Reactive Oxygen Species (ROS). Moreover, we have been able to show that Env-induced autophagy is responsible for the depletion of mature peroxisomes, a process known as pexophagy. Our current hypothesis is that the Env-induced pexophagy is responsible for an excessive accumulation of ROS leading the uninfected CD4 T cells to apoptosis.

Key words: Pexophagy, HIV, apoptosis, ROS

Présentation orale intitulée : HIV-1 Env induced autophagy degrades cellular antioxidant systems

Prix Arlette Darfeuille-Michaud pour la communication orale « short talk »

8.3.F Cold Spring Harbor Laboratories – Retroviruses meeting May 20th – 25th 2019 New-York

HIV-1 Env-induced autophagy degrades cellular antioxidants systems.

Galais Mathilde, Daussy F. Coralie, S.Sagnier, F.P.Blanchet, V.Robert-Hebmann, S.Pattingre, M.Biard-Piechaczyk, Lucile Espert

The development of AIDS (Acquired ImmunoDeficiency Syndrome) in HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus)-infected patients is characterized by a progressive decrease in the number of CD4 T cells. The majority of dying cells are non-infected and called bystander CD4 T cells. In 2006, our team demonstrated that the contact between infected cells (expressing the envelope glycoproteins (Env)) and non-infected cells (expressing the CD4 and CXCR4 receptors) was responsible for enhancing the autophagic pathway which lead to their cellular death by apoptosis. The autophagic pathway is involved in the degradation of cytoplasmic material after its sequestration into vacuoles wherein it will be degraded and then recycled. This process can be highly selective through the involvement of receptor proteins such as p62 or NBR1.

We aim at understanding how Env-mediated autophagy can lead to apoptosis in bystander CD4 T cells. A precedent work of our team showed that the changes induced by Env in bystander CD4 T cells included the production of reactive oxygen species (ROS) leading to an oxidative stress state. We used an HTRF technic (Homogeneous Time Resolved Fluorescence) to show that the oxidative stress induced by Env is involved in the cellular death by apoptosis of bystander CD4 T cells. We also show that the autophagic process involved has to be a degradative process to lead these CD4 T cells to their death by apoptosis.

Moreover, we have observed that Env-mediated autophagy was degrading peroxisomal proteins. Peroxisomes are essential organelles in the cell responsible partly for the detoxification of ROS in the cell. Their number is regulated through a selective autophagic degradation known as pexophagy.

Therefore, we hypothesized that Env induced a selective degradation by autophagy of the cell antioxidant system in bystander CD4 T cells. Since peroxisomes are responsible for regulating the cellular response to an oxidative stress state, their selective degradation could prevent the cell from overcoming this event and eventually lead to its death by apoptosis. We also studied the involvement of other antioxidant proteins which revealed to also be affected by the Env-mediated autophagy. In conclusion, we are showing that Env-mediated autophagy degrades important antioxidant systems which are a key survival factor necessary to the bystander CD4 T cells to reduce the oxidative stress induced by Env.

Présentation d'un poster intitulé : HIV-1 Env-induced autophagy degrades cellular antioxidants systems.

Résumé

Le développement de la phase SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise) chez les patients infectés par le virus VIH-1 (Virus de l'Immunodéficience Humaine) se caractérise par une diminution progressive du nombre de cellules T CD4. Or la majorité des cellules constituant cette déplétion sont non-infectées et appelées "bystander". En 2006, notre équipe a montré que le contact entre les cellules infectées exprimant les glycoprotéines de l'enveloppe (Env) et les cellules non-infectées exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 déclenche au sein de ces dernières la voie d'autophagie, ce qui mène à une mort cellulaire par apoptose. L'autophagie est un processus impliqué dans la dégradation de matériel cytoplasmique après sa séquestration au sein de vacuoles dans lesquelles il sera dégradé puis recyclé. Ce processus peut être hautement sélectif par l'action de protéines réceptrices tels que p62 ou NBR1.

L'objectif de mon projet de thèse vise à comprendre comment l'autophagie induite par Env mène les cellules T CD4 bystander à leur mort par apoptose. Une précédente étude menée par notre équipe a démontré que les changements induits par Env au sein de ces cellules T CD4 non infectées comprenaient la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) menant à un état de stress oxydatif. Nous montré que le stress oxydatif induit par Env est impliqué dans la mort des cellules T CD4 bystander par apoptose. Nous avons également observé que l'autophagie doit être dégradative pour mener ces cellules T CD4 à leur mort par apoptose. De plus, nous avons observé une dégradation des protéines peroxysomales par l'autophagie induite par Env dans le même modèle. Les peroxysomes sont des organelles essentielles de la cellule qui sont en partie responsables de la détoxification des ROS dans la cellule. Leur nombre est régulé par une dégradation sélective autophagique que l'on appelle la pexophagie.

Dès lors, nous étudions l'hypothèse de l'induction par Env d'une dégradation sélective des systèmes antioxydants de la cellule par autophagie dans les cellules T CD4 bystander. Les peroxysomes étant des organites responsables de la réponse au stress oxydatif, leur dégradation sélective pourrait empêcher la cellule de faire face au stress oxydatif qu'elle subit et la mener vers une mort cellulaire par apoptose. En conclusion, nous montrons que l'autophagie induite par Env dégrade un système antioxydant important qui est un facteur clé nécessaire à la survie des cellules T CD4 bystander pour réduire le stress oxydatif induit par Env.

Mots-clés : Pexophagie, VIH-1, Apoptose, ROS, Env

Abstract

The development of AIDS (Acquired ImmunoDeficiency Syndrome) in HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus)-infected patients is characterized by a progressive decrease in the number of CD4 T cells. The majority of dying cells are non-infected and called bystander CD4 T cells. In 2006, our team demonstrated that the contact between infected cells (expressing the envelope glycoproteins (Env)) and non-infected cells (expressing the CD4 and CXCR4 receptors) was responsible for enhancing the autophagic pathway which lead to their cellular death by apoptosis. The autophagic pathway is involved in the degradation of cytoplasmic material after its sequestration into vacuoles wherein it will be degraded and then recycled. This process can be highly selective through the involvement of receptor proteins such as p62 or NBR1.

We aim at understanding how Env-mediated autophagy can lead to apoptosis in bystander CD4 T cells. A precedent work of our team showed that the changes induced by Env in bystander CD4 T cells included the production of reactive oxygen species (ROS) leading to an oxidative stress state. We showed that the oxidative stress induced by Env is involved in the cellular death by apoptosis of bystander CD4 T cells. We also show that the autophagic process involved has to be a degradative process to lead these CD4 T cells to their death by apoptosis. Moreover, we have observed that Env-mediated autophagy was degrading peroxisomal proteins. Peroxisomes are essential organelles in the cell responsible partly for the detoxification of ROS in the cell. Their number is regulated through a selective autophagic degradation known as pexophagy.

Therefore, we hypothesized that Env induced a selective degradation by autophagy of the cell antioxidant system in bystander CD4 T cells. Since peroxisomes are responsible for regulating the cellular response to an oxidative stress state, their selective degradation could prevent the cell from overcoming this event and eventually lead to its death by apoptosis. In conclusion, we are showing that Env-mediated autophagy degrades important antioxidant systems which are a key survival factor necessary to the bystander CD4 T cells to reduce the oxidative stress induced by Env.

Key words: Pexophagy, HIV-1, apoptosis, ROS, Env

Laboratory : Autophagie et Infections, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier IRIM, UMR9004, 1919 Route de Mende 34293 Cedex 5 Montpellier

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER