

Université de Montréal

La protéine Nef du VIH-1 altère la fonction de Lck dans les thymocytes de
souris transgéniques

par

Joël Guertin

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître Sciences (M.Sc.)
en Biologie Moléculaire

Avril, 2011

© Joël Guertin, 2011

Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

La protéine Nef du VIH-1 altère la fonction de Lck dans les thymocytes de
souris transgéniques

présenté par :
Joël Guertin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Nikolaus Heveker
président-rapporteur

Dr Paul Jolicoeur
directeur de recherche

Dr Nancy Dumais
membre du jury

Résumé

La protéine Nef du VIH-1 joue un rôle important dans la pathogenèse du VIH-1 en modulant les voies de signalisation de la cellule hôte. La signalisation par le TcR est essentielle à la sélection positive pour générer les cellules simples positives (SP) CD4⁺ et simples positives (SP) CD8⁺, processus largement dépendant de l'activité de la Src kinase Lck et de son habileté à lier la queue cytoplasmique des corécepteurs CD4 et CD8. Nous avons précédemment trouvé que l'expression de Nef dans le VIH ou VIS peut induire une sévère déplétion des thymocytes et une baisse d'expression du corécepteur CD4 à la membrane. Nous avons également montré que Nef bloque la génération des thymocytes doubles positifs (DP) CD4⁺ CD8⁺ en plus d'altérer la transition des cellules DP vers CD4⁺ SP. Par contre, ce phénotype est récupérable par plusieurs approches dont le croisement d'une souris transgéniques exprimant Nef avec une souris exprimant la forme constitutivement active de Lck Y505F. Les résultats indiquent que la maturation des cellules CD4⁺ est altérée par le dysfonctionnement de la signalisation CD4-Lck. Toutefois, les mécanismes moléculaires par lesquels Nef contribue au bloc de la génération des cellules CD4⁺ dans le thymus demeurent très imprécis.

Dans cette étude, en utilisant des approches biochimiques et de microscopie confocale, nous avons trouvé que les thymocytes transgéniques Nef⁺ expriment plus de Lck que les thymocytes Nef⁻. Malgré cette augmentation, une partie significative de Lck est incapable d'atteindre la membrane plasmique. Cette fraction était significativement accumulée dans un compartiment intracellulaire des thymocytes transgéniques exprimant Nef. Également, en utilisant la technique d'essai kinase *in vitro*, nous avons trouvé que l'activité kinase de Lck est significativement augmentée dans les thymocytes transgéniques mais demeure stable suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4. Également, comparativement aux thymocytes Nef⁻, la kinase Lck dans les thymocytes transgéniques était résistante à la dégradation suite à une stimulation. En examinant le statut de c-Cbl, le principal régulateur négatif de Lck, nous avons montré que c-Cbl colocalise faiblement avec Lck, malgré son hyperphosphorylation constitutive. Ceci pourrait expliquer l'échec de la dégradation de Lck. En plus, nous avons trouvé que suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4, la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 493 par Lck est diminuée, résultant d'une importante baisse de l'activité kinase de Zap-70 et d'un bloc des premiers événements de la voie de signalisation par le TcR. Ces données indiquent que la signalisation CD4-Lck est interrompue par la présence de Nef.

Mots-clés : VIH-1, Nef, thymocytes, Lck, Zap-70

Abstract

HIV-1 Nef protein plays an essential role in the HIV-1 pathogenesis by modulating the host signaling transduction pathways. TcR signalling is important for the thymic selection process to CD4 and CD8 single positive T cells and is greatly dependent on the activity of Src kinase Lck and its ability to bind to CD4 and CD8 cytoplasmic tail. We previously found that expression of HIV or SIV Nef can induce severe thymocytes depletion and downregulation of CD4 expression in Nef⁺ mice. We also recently showed that Nef blocks generation of double positive thymocytes and impairs DP to CD4⁺ SP T cells transition. The reversal of this phenotype was accomplished by several approaches, among them by crossing Nef⁺ mice with mice expressing constitutively active Lck Y505F. These results imply that the maturation of CD4⁺ T cells is disrupted due to impairment of Lck-mediated CD4 receptor signaling. However, the molecular mechanisms by which Nef contributes to the impairment in thymic CD4 generation remains largely unclear.

In this study, using confocal microscopy and biochemical approaches, we found that Nef⁺ thymocytes express more Lck than the Nef⁻ control. Despite of this increase, a significant portion of Lck molecules were unable to reach to the plasma membrane. It was significantly accumulated in the intracellular endosomal compartment of the Nef⁺ thymocytes. Moreover, using IVKA we found that the activity of Lck is significantly increased in Nef⁺ thymocytes but was not further increased upon stimulation by α -CD3 ϵ , α -CD4 or α -CD3 ϵ + α -CD4. Moreover, compared to Nef⁻ controls, Lck kinase in Nef⁺ thymocytes was resistant to degradation upon stimulation. Examining the status of c-Cbl, the main negative regulator of Lck, showed that c-Cbl localized with Lck poorly, despite his constitutive hyperphosphorylation. This explains the failure of Lck degradation. In addition, we found that upon stimulation, Zap-70 phosphorylation at tyrosine 493 by Lck is decreased, resulting by a decrease of Zap-70 kinase activity and TcR proximal event block. These data indicate that CD4-Lck signaling was interrupted by the presence of Nef.

Keywords: HIV-1, Nef, thymocytes, Lck, Zap-70

Table des matières

RÉSUMÉ ET MOTS-CLÉS.....	iii
ABSTRACT AND KEYWORDS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xii
DÉDICACE.....	xv
REMERCIEMENTS.....	xvi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : Rétrovirus	1
1.1 Caractéristiques et structure des rétrovirus.....	1
1.2 VIH-1 et pathogenèse du SIDA	2
1.2.1 Infection primaire au VIH-1	3
1.2.2 Phase de latence	4
1.2.3 Infection tardive et progression de la maladie	4
1.3 Tropisme du VIH-1	5
1.4 Cycle de réplication du VIH-1.....	6
1.5 Génôme du VIH-1.....	9
1.5.1 Gènes structuraux (<i>gag, pol, env</i>)	10
1.5.2 Gènes régulateurs (<i>rev</i> et <i>tat</i>).....	14
1.5.3 Gènes accessoires (<i>vif, vpu, vpr, nef</i>)	15
CHAPITRE 2 : La protéine Nef du VIH-1	19
2.1 Structure et caractéristiques de Nef	19
2.2 Fonctions biologiques de Nef.....	22
2.2.1 Baisse de la régulation du corécepteur CD4.....	22
2.2.2 Baisse de la régulation du CMH-1	24
2.2.3 Augmentation de l'infectivité des particules virales	25
2.2.4 Interférence dans la transduction du signal	26
2.2.4.1 Survie cellulaire et apoptose	27
2.2.4.2 Remodelage du cytosquelette d'actine	28

2.2.4.3 Activation cellulaire	29
2.2.4.3.1 Association avec PAK1/2	30
2.2.4.3.2 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)	31
CHAPITRE 3 : Famille des Src kinases	32
3.1 Membres de la famille des Src kinases	32
3.2 Structure	32
3.3 Régulation de l'activité catalytique.....	33
3.4 Liaison et modulation des Src kinases par Nef.....	33
3.4.1 Hck	33
3.4.2 Lyn, c-Src, Fgr, Yes et Blk	34
3.4.3 Fyn.....	35
3.4.4 Lck.....	36
CHAPITRE 4 : Lck et signalisation par le TcR	38
4.1 Structure et caractéristiques.....	38
4.2 Régulation de l'activité catalytique.....	39
4.3 Rôle de Lck dans le développement des cellules T	41
4.4 Description de la voie du TcR	43
4.4.1 Microdomaines membranaires et voie du TcR	45
4.5 Liaison et modulation de Lck par Nef.....	45
4.5.1 Impact de l'interaction entre Nef et Lck sur la transduction du signal	46
4.6 Souris transgéniques.....	48
4.6.1 Souris CD4C/HIV ^{MutG}	48
4.6.2 Implication de Nef dans la voie de signalisation CD4/Lck	49
4.6.2.1 Rationalisation et hypothèse	49
CHAPITRE 5 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	51
5.1 Matériel	51
5.2 Méthodes	53

CHAPITRE 6 : RÉSULTATS.....	60
CHAPITRE 7 : DISCUSSION.....	107
CHAPITRE 8 : CONCLUSION.....	118
BIBLIOGRAPHIE.....	119
ANNEXE 1.....	150

Liste des tableaux

Tableau I : Partenaires cellulaires connus pour interagir avec Nef.....	37
--	----

Liste des figures

Figure 1 :	Progression de l'infection primaire au VIH-1 vers le stade SIDA	5
Figure 2 :	Cycle de réplication du VIH-1.....	8
Figure 3 :	Structure du VIH-1.....	18
Figure 4 :	Structure de la protéine Nef du VIH-1	21
Figure 5 :	Structure de Lck.....	39
Figure 6:	Régulation de Lck	40
Figure 7 :	Signalisation par le TcR médiée par les Src kinases Lck et Fyn dans le développement des cellules T et de la fonction en périphérie.....	42
Figure 8 :	Signalisation par la voie du TcR.....	44
Figure 9 :	Structure du transgène CD4C/HIV ^{MutG}	48
Figure 10 :	Sauvetage de la génération des cellules CD4 ⁺ dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+	76
Figure 11A :	Altération de la dégradation de Lck dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	77
Figure 11B :	Altération de la dégradation de la forme active Lck Y394 dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	78
Figure 11C :	Altération de la cinétique d'activation de Lck dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	79
Figure 12 :	Altération du mécanisme d'activation de Lck dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	80
Figure 13 :	Accumulation de Lck dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	81
Figure 14 :	Hyperphosphorylation de c-Cbl dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	82
Figure 15A :	Nef prévient la colocalisation entre Lck et c-Cbl sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	83

Figure 15B : Nef prévient la colocalisation entre Lck et c-Cbl sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	84
Figure 16 : Malgré sa délocalisation, la phosphorylation en tyrosine est dépendante de Lck dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	85
Figure 17 : La phosphorylation de Zap-70 est altérée sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	86
Figure 18A : Phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 292 comparable sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	87
Figure 18B : Hyperphosphorylation de Zap-70 en tyrosine 319 sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	88
Figure 18C : Altération de la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 493 sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	89
Figure 19A : Prévention de l'activation de Zap-70 par Lck sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	90
Figure 19B : Nef prévient la phosphorylation des substrats en aval de Zap-70 sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	91
Figure 20A : Altération de la phosphorylation en tyrosine dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	92
Figure 20B : Analyse statistique de la phosphorylation en tyrosine dans les thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	93
Figure 21A : La phosphorylation en tyrosine révélée en immunofluorescence est altérée dans les microdomaines membranaires des thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	94
Figure 21B : La phosphorylation en tyrosine révélée par immunobuvardage est altérée dans les microdomaines membranaires des thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	95
Figure 22 : Enrichissement de Lck dans les microdomaines membranaires des thymocytes CD4C/HIV ^{Nef}	96
Figure 23A : Hyperphosphorylation de Lck en tyrosine 394 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+	97

Figure 23B : Hyperactivation de Lck dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+	98
Figure 24 : Nef induit et active la forme DPho-active Lck dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+	99
Figure 25 : Coopération entre Nef et la forme active de Lck pour la dégradation de c-Cbl dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+	100
Figure 26A : Hyperphosphorylation de Zap-70 en tyrosine 292 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+	101
Figure 26B : Hyperphosphorylation de Zap-70 en tyrosine 319 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+	102
Figure 26C : Sauvetage de la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 493 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+	103
Figure 27 : Sauvetage de la fonction de Lck à activer Zap-70 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+	104
Figure 28 : Sauvetage de la fonction de Lck à phosphoryler Zap-70 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+	105
Figure 29 : Hyperphosphorylation des protéines phosphotyrosines dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+	106

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADAP :	Adhesion and degranulation promoting adaptor protein
ADN:	Acide déoxyribonucléique
AP :	Activator protein
APOBEC :	Apolipoprotein B editing catalytic subunit 3G
ARF6 :	ADP-ribosylation factor 6
ARN:	Acide ribonucléique
ASK-1:	Apoptosis Signal Regulation kinase-1
Bip :	Binding immunoglobulin protein
BLV:	Bovine Leukemia Virus
BSA :	Bovine serum albumin
β-TrCP :	Beta-transducing repeat-containing protein
CA :	Protéine de la capside
Cbl :	Casitas B-lineage Lymphoma
CCR :	Chemokine (C-C motif) receptor
CD4C :	Promoteur humain du CD4
CDK9 :	Cyclin dependant kinase 9
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CO₂ :	Dioxyde de carbone
CPA :	Cellule présentatrice d'antigène
Csk :	c-Src tyrosine kinase
DAPI :	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DC-SIGN :	Lectine de type C spécifique aux cellules dendritiques
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DOCK2 :	Dedicator of cytokinesis
2DN :	Double négative
DP :	Double positive
EDTA :	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELMO :	Engulfment and cell motility gene
env :	Gène de la glycoprotéine de l'enveloppe
Env :	Protéine de l'enveloppe
ERK :	Extracellular signal-regulated kinase
FAK :	Focal adhesion kinase
FBS :	Fetal bovine serum
FITC :	Fluorescéine isothiocyanate
GADS :	Grb2-related adaptor protein
gag :	Groupe antigen surface; gène codant pour les protéines de structures
Gag:	Protéines de la matrice, la capside, la nucléocapside et p6
GEF :	Guanidine nucleotide exchange factor
GM1 :	Monosialotetrahexosylganglioside de type 1
gp :	Glycoprotéine

Hck :	Hematopoietic cellular kinase
HTLV:	Human T-lymphotropic virus
IL-2 :	Interleukine-2
IL2R :	Récepteur à l'interleukine-2
In :	Intégrase
IRCM :	Institut de Recherches Cliniques de Montréal
ITAMs :	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITK :	Inducible tyrosine kinase
IVKA :	<i>In vitro</i> kinase assay
JNK :	c-Jun N-terminal kinase
KAB :	Kinase activation buffer
kDa :	KiloDalton
KEB :	Kinase extraction buffer
LAT :	Linker of activation of T cell
LCK :	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LTR :	Long terminal repeat
MA :	Protéine de la matrice
MAPK :	Mitogen-activated protein kinase
MIP-1β :	Macrophage inflammatory protein-1 β
MLB :	Mild lysis buffer
NAK :	Nef-associated kinase
NAKC :	Nef-associated kinase complex
NC :	Protéine de la nucléocapside
<i>nef</i> :	Gène negative factor
Nef :	Protéine Negative factor
NFAT :	Nuclear factor of activated T cells
NF-κB :	Nuclear Factor-kappa B
nm :	Nanomètre
PAK :	p21 Associated kinase
PACS :	Phosphofurin acidic cluster sorting
PBS :	Phosphate buffer saline
PCR :	Polymerase chain reaction
PE :	Phycoérythrine
PI3K :	Phosphatidyl inositol-3kinase
PIC :	Pre integration complex
PKC :	Proteine kinase C
PMA :	Phorbol myristil acetate
<i>pol</i> :	Gène viral codant pour la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase
Pol :	Protéines de la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase
PP2 :	Inhibiteur spécifique des Src kinases
<i>pro</i> :	Gène codant pour la protéase
<i>rev</i> :	Gène codant pour la protéine impliquée dans l'export nucléaire des ARNm

Rev :	Protéine impliquée dans l'export nucléaire des ARNm
rpm :	Revolution per minute
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute medium
RRE :	Rev response element
SDF-1α :	Stromal derived factor-1 α
SH :	Src homology
SIDA :	Syndrôme de l'immunodéficience acquise
SKAP55 :	Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa
SLP-76 :	Src homology 2 (SH2) domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
SMAC :	Supramolecular activation cluster
SP :	Simple positive
SP1:	Spacer peptide 1
SP2 :	Spacer peptide 2
TAR :	Trans-activating response element
<i>tat</i> :	Gène codant pour la protéine transactivatrice
Tat :	Protéine transactivatrice
TBS :	Tris buffer saline
TcR :	T cell receptor
TEMED :	Tetramethylethylenediamine
TFR :	Transframe region
TNF-α :	Tumor necrosis factor α
UBCH7 :	Ubiquitin-conjugating enzyme 7
VIB :	Virus de l'immunodéficience bovine
VIF :	Virus de l'immunodéficience féline
<i>vif</i> :	Gène codant pour la protéine virion infectivity factor
Vif :	Protéine virion infectivity factor
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS :	Virus de l'immunodéficience simienne
<i>vpr</i> :	Gène codant la viral protein R
Vpr :	Viral protein R
<i>vpu</i> :	Gène codant pour la viral protein U
Vpu :	Viral protein U
WASP :	Wiskott-Aldrich syndrome protein
Zap-70 :	Zeta associated protein of 70 kDa

À Alain, Francine et Valérie

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier tout particulièrement et témoigner toute ma reconnaissance au Dr. Paul Jolicoeur, mon directeur de recherche, pour son accueil et la confiance qu'il m'a accordée dès mon arrivée dans le laboratoire. Également, je tiens à le remercier pour sa disponibilité, ses précieux conseils ainsi que son engouement face à la science qu'il m'a transmis tout au long de ma formation. En évoluant au sein de ce laboratoire, j'ai eu l'opportunité de développer mon esprit critique, ma rigueur scientifique ainsi que mon sens de l'organisation qui, somme toute, m'ont servi d'inspiration au cours de l'élaboration de mon projet de maîtrise.

J'aimerais également remercier Dr. Zaher Hanna pour m'avoir guidé tout au long de mon cheminement. Je voudrais témoigner de son enthousiasme, de son accessibilité et de son habileté à transmettre son savoir et son intérêt pour la science dont j'ai bénéficié durant ma formation.

En plus, je dois profondément souligner l'apport de mes collègues de travail dans mon processus d'apprentissage, entre autres pour leur aptitude à créer un climat favorable à l'exercice de ma fonction ainsi que pour leurs conseils techniques qu'ils m'ont transmis au cours des trois dernières années.

Je ne peux passer sous silence la contribution de mon ami Phillippe qui m'a également donné de précieux conseils et qui m'a soutenu durant mon cheminement.

Finalement, je tiens sincèrement à remercier ma famille, Alain, Francine et Valérie qui m'ont permis d'être la personne que je suis aujourd'hui. Je leur dois reconnaissance pour leur soutien moral, financier ainsi que leurs encouragements qui m'ont incité à me dépasser dans le but d'atteindre mes objectifs.

Introduction

CHAPITRE 1: RÉTROVIRUS

1.1 Structure et caractéristiques

Les rétrovirus consistent en une large famille de virus à acide ribonucléique (ARN) enveloppés, qui sont définis par une taxonomie commune selon leur structure, leur composition et leurs propriétés de réplication. La taille des virions varie allant d'un diamètre de 80 à 120 nanomètres (nm) dont l'enveloppe externe est munie de glycoprotéines de surface qui servent de sites d'attachement viral à la cellule. L'ARN viral est simple brin, linéaire, non-segmenté, d'une polarité positive dont la stratégie de réplication du virus repose sur la rétrotranscription de l'ARN simple brin en acide déoxyribonucléique (ADN) double brin capable de s'intégrer au génome de la cellule hôte infectée. Contrairement à plusieurs virus où l'ADN est directement transcrit en ARN et traduit en protéines, la rétrotranscription de l'ARN en ADN précédant le processus habituel de transcription et de traduction confère au rétrovirus un mode de fonctionnement différent (Coffin et *al*, 1997).

Tous les rétrovirus sont groupés à l'intérieur de la grande famille des *Retroviridae* (Murphy et *al*, 1995). Selon leur degré de similitude, cette famille se divise en sept genres : les virus de type C chez les mammifères, les virus de type C chez le poulet, les virus de type B, les virus de type D, les lentivirus, les virus du groupe «Human T-lymphotropic virus/Bovine Leukemia Virus» (HTLV/BLV) et les spumavirus (Coffin, 1992). Parmi les sept différents genres de rétrovirus, cinq ont un potentiel oncogène, communément appelé «oncovirus», les deux autres groupes étant les lentivirus et les spumavirus (Coffin, 1992a; Murphy et *al*, 1994).

Selon la complexité de leur génome, les genres sont également divisés en deux classes : les rétrovirus simples et complexes (Coffin, 1992a; Murphy et *al*, 1994). Bien qu'ils possèdent des particularités similaires, certaines différences majeures sont retrouvées au niveau de leur organisation génomique, de leur composition protéique et de leur architecture. Les rétrovirus simples possèdent une structure génomique provirale de base qui comprend trois gènes de base dont : *gag*, *pol* et *env*. Quant au gène *gag*, sa fonction consiste à diriger la synthèse des protéines internes du virion dont la matrice, la capsid et la nucléocapsid. Le gène *pol* détient quant à lui l'information nécessaire à l'expression de la transcriptase inverse et l'intégrase, et finalement le gène *env* code pour les composantes transmembranaires de l'enveloppe. De plus, tous les rétrovirus contiennent une petite séquence codante qui contient l'information pour la synthèse de la protéase du virion. Ces quatre gènes sont flanqués par de longues séquences répétées aux deux extrémités du génome qui sont désignées par le 5'LTR et le 3'LTR. Ces gènes codent pour différentes protéines structurales et enzymes nécessaires à l'infection et à la réplication du virus dans la cellule hôte. En plus de ces quatre gènes fondamentaux, plusieurs rétrovirus complexes codent pour différentes protéines régulatrices et accessoires qui dérivent de l'épissage de l'ARN et qui participent à différentes étapes du cycle viral et de la pathogenèse du SIDA (Coffin, 1992a; Murphy et *al*, 1994).

1.2 VIH-1 et pathogenèse du SIDA

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est un lentivirus qui fait partie de la famille des rétrovirus complexes responsables de la pathogenèse du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Environ 33,3 millions de personnes sont porteurs du VIH-1 à l'échelle mondiale, mais les pays les plus touchés et dont la prévalence est la plus élevée sont situés sur le continent africain, spécifiquement dans la région subsaharienne (<http://www.unaids.org>). Le mode de transmission du virus s'effectue de personnes en personnes, principalement par le sang via l'utilisation d'aiguilles contaminées

ou par l'entremise de relations sexuelles non-protégées. Également, le VIH-1 peut se transmettre d'une femme enceinte infectée à son bébé durant la grossesse ou encore après la naissance lors de l'allaitement. Le terme lentivirus provient du latin «lenti» qui veut dire lent, ce qui signifie que les maladies reliées au lentivirus sont généralement caractérisées par une lente dégénérescence marquée par trois principales étapes : la phase aiguë, la phase de latence et la progression de la maladie (Gonda et *al*, 1986). Les lentivirus touchent plusieurs espèces dont, par exemple, le virus de l'immunodéficience féline (VIF) chez le chat, le virus de l'immunodéficience bovine (VIB) chez le bovin et le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) chez diverses espèces de primates (Egberink et Horzinek, 1992; Gonda et *al*, 1986). Chez l'humain, le VIH-1 infecte principalement les cellules immunitaires causant une déplétion graduelle et une dysfonction de ses cellules, jusqu'au point où la personne infectée atteint le stade SIDA et succombe à diverses infections opportunistes.

1.2.1 Infection primaire au VIH-1

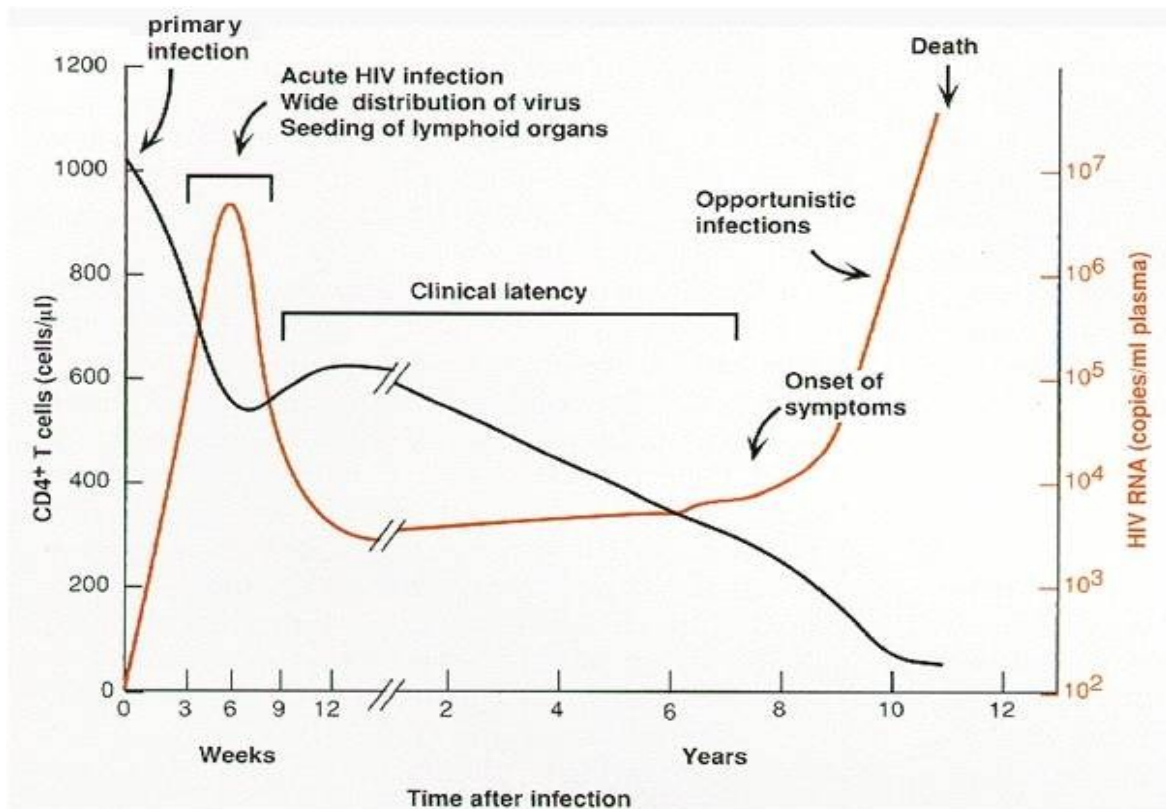
L'infection primaire au VIH-1 est surtout associée à l'apparition de symptômes aigus ressemblant à la mononucléose qui généralement, survient dans les 3 à 6 semaines suivant l'infection (Tindall et Cooper, 1991). Les symptômes sont également accompagnés d'une hausse de la réplication virale qui peut être détectée approximativement trois semaines suivant l'infection. À ce moment, le nombre de virions dans le plasma peut atteindre 10^6 à 10^7 /ml (Clark et *al*, 1991; Tindall et Cooper, 1991). Également, cette période se caractérise par une chute drastique du nombre de lymphocytes $CD4^+$ dans le sang dans les 2 à 8 semaines après l'infection. Dans certains cas, le niveau de lymphocytes $CD4^+$ dans le sang remonte presque à la normale et cette étape marque le début de la phase latente de la maladie (Gaines et *al*, 1990).

1.2.2 Phase de latence

Suivant la réponse immune au VIH-1, la période de latence peut aussi bien, selon l'individu, varier entre 1 à 16 ans, période durant laquelle l'individu ne présente pas ou peu de symptômes associés à la maladie (Ho et *al*, 1995; Lemp et *al*, 1990b; Moss et Bacchetti, 1989). Toutefois, la réplication virale s'effectue continuellement et le nombre de lymphocytes CD4⁺ diminue progressivement (Piatak et *al*, 1993).

1.2.3 Infection tardive et progression de la maladie

La progression de la maladie vers le stade SIDA est caractérisée par un faible nombre de lymphocytes CD4⁺ accompagnée d'une haute charge virale (Pantaleo et *al*, 1993a; Mellors et *al*, 1996, 1997). Lorsque le nombre de lymphocytes CD4⁺ est sous les 500/ μ l, les premiers symptômes de la maladie apparaissent et lorsque le nombre de lymphocytes CD4⁺ chute sous les 200/ μ l jusqu'au point où elles sont toutes perdues, le patient est susceptible de succomber à de nombreuses infections opportunistes (**Figure 1, p.5**) (Cheng-Mayer et *al*, 1988).



Tiré de Pantaléo et *al* 1993a

Figure 1 : Progression de l'infection primaire au VIH-1 vers le stade SIDA. Nombre de cellules CD4⁺/μl (noir) et du nombre de copies d'ARN viral/ml de plasma (rouge) durant la phase d'infection primaire, de latence et au stade SIDA lors de l'infection tardive.

1.3 Tropicisme

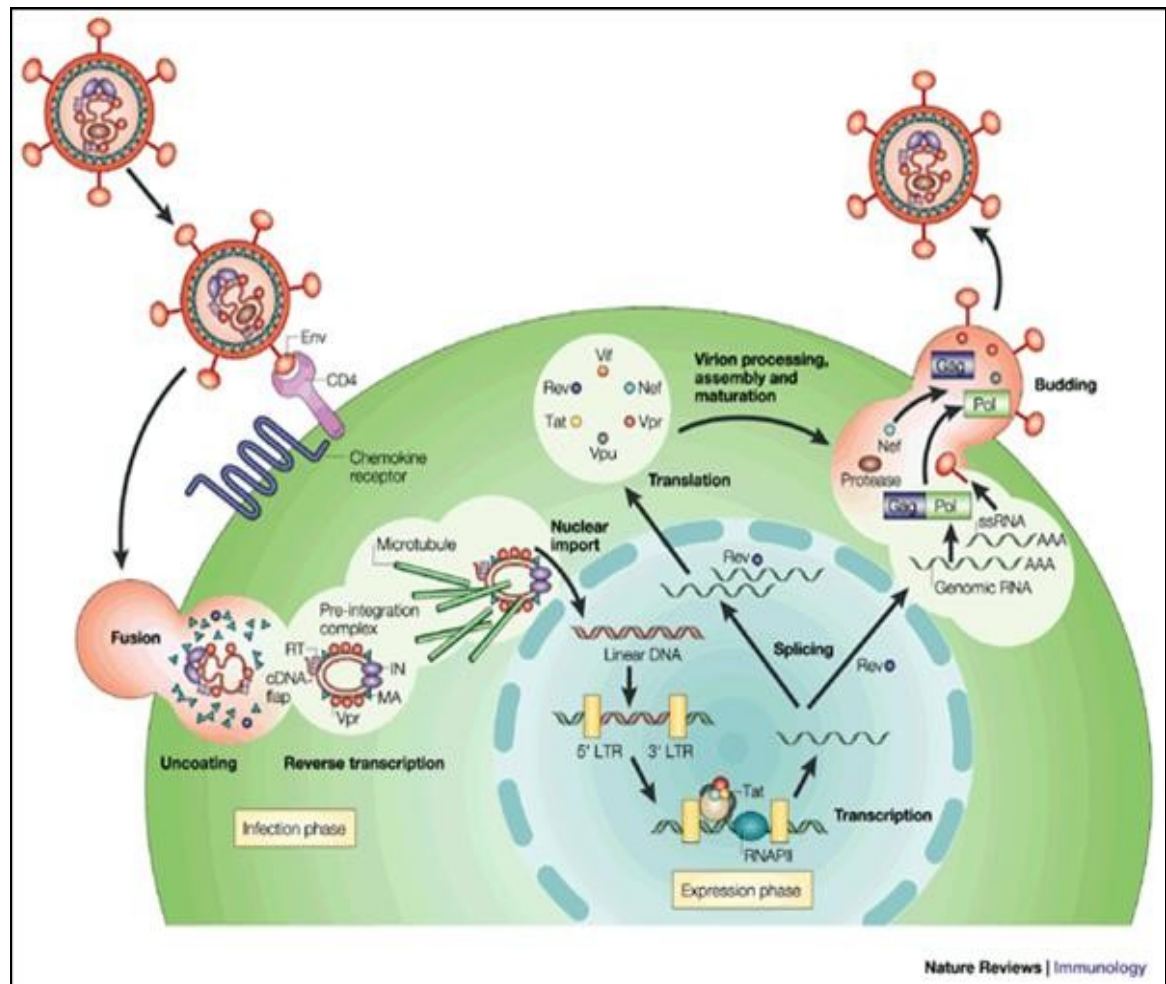
Le VIH-1 requiert l'expression du récepteur CD4 ainsi que la présence d'un des deux corécepteurs aux chémokines CCR5 ou CXCR4 à la surface de la cellule immune cible (Choe et *al*, 1996; Deng et *al*, 1996). Ces deux récepteurs sont essentiels à l'attachement de l'enveloppe virale et son entrée dans la cellule, bien que d'autres récepteurs et corécepteurs dont FPRL1, CCR3, CCR8, APJ, CMKLR1, RDC-1, CXCR6, CCR1, GPCR1, GPR15 et CCR6 ont été identifiés pour être impliqués lors du processus

d'entrée de certaines souches de VIH-1 et VIH-2 (Coetzer et *al*, 2011; Nedellec et *al*, 2009). Avec cette spécificité, les populations cellulaires susceptibles à l'infection sont les lymphocytes CD4⁺, les thymocytes, les monocytes/macrophages, les cellules microgliales et les cellules dendritiques (Funke et *al*, 1987; Bleul et *al*, 1997). En plus de la voie commune CD4/CCR5, l'infection des cellules dendritiques peut également s'effectuer par une autre route en utilisant la lectine de type C appelée DC-SIGN (Pope et Haase, 2003). Quant au tropisme du VIH-1, cela dépend du récepteur utilisé entre le CCR5 ou le CXCR4 par la particule virale pour son entrée dans la cellule et, par conséquent, réfère au type cellulaire infecté par le VIH-1.

1.4 Cycle de réplication

La première étape du cycle viral consiste en la liaison de la glycoprotéine gp120 au récepteur CD4 de la cellule hôte. Suite à cette liaison, la glycoprotéine de l'enveloppe subit un changement de conformation et permet l'attachement aux récepteurs CCR5 ou CXCR4 impliqués dans le processus de fusion (Chan et Kim, 1998; Wyatt et Sodroski, 1998). Suite à la fusion du virus avec la cellule cible, l'ARN viral et les enzymes dont la transcriptase inverse, l'intégrase, la ribonucléase et la protéase sont injectées dans le cytoplasme de la cellule (Chan et Kim, 1998). À cette étape, la transcriptase inverse transcrit l'ARN viral en ADN double brin qui est transporté dans le noyau de la cellule au sein d'un complexe multiprotéique, appelé complexe de préintégration (PIC). Cet ADN viral double brin est par la suite intégré à l'ADN génomique par l'action de l'intégrase et cette forme se nomme provirus (Smith et Daniel, 2006; Zeng et *al*, 2005). La transcription de l'ADN proviral en ARN nécessite toutefois l'action de certains facteurs de transcription cellulaires dont particulièrement NF- κ B, qui est régulé à la hausse sur l'activation de la cellule (Hiscott et Genin, 2001). Sous le contrôle des promoteurs viraux, la transcription de l'ADN proviral en ARN est finement régulée par la protéine Tat et s'effectue sous le contrôle de l'ARN polymérase II. L'ARN viral généré se retrouve sous sa pleine longueur ainsi que sous sa

forme épissée. Les ARN épissés sont exportés du noyau vers le cytoplasme où ils sont traduits en protéines régulatrices dont Tat, qui stimule la production de nouveaux virus et Rev qui contrôle l'export nucléaire de l'ARN viral de pleine longueur (Pollard et Malim, 1998). Les ARN viraux de pleine longueur seront également traduits dans le cytoplasme en polyprotéines et vont générer les protéines Gag et Env. Sous l'action de la protéase, les polyprotéines seront par la suite clivées en protéines fonctionnelles nécessaires à l'assemblage du virion à la membrane plasmique. À cette étape, l'ARN de pleine longueur est empaqueté dans la particule virale suite à son interaction avec la protéine Gag et les protéines de l'enveloppe sont également acheminées au site d'assemblage. Les polyprotéines Gag (p55) et Gag-Pol (p160) sont associées à l'ARN viral lors de la formation du virion. La maturation du virion s'effectue par bourgeonnement et finalement la protéase clive les polyprotéines en protéines et enzymes fonctionnelles pour produire un virion mature et infectieux (Smith et Daniel, 2006; Zeng et *al*, 2005). Un schéma du cycle de réplication virale est illustré à la page suivante (**Figure 2, p.8**).



Tiré de Peterlin et Trono, 2003

Figure 2 : Cycle de réplication du VIH-1. 1) Attachement du virus au corécepteur CD4 de la cellule hôte par la portion SU de la glycoprotéine de l'enveloppe. 2) Fusion et l'entrée du virus. 3) Transcription inverse de l'ARN viral pour générer un ADN double brin et transport du complexe de préintégration dans le noyau. 4) Intégration à l'ADN chromosomal de la cellule hôte. 5) L'ADN proviral est transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire et génération de l'ARN viral de pleine longueur et sous forme épissé. 6) L'ARN viral est par la suite traduit dans le cytoplasme. 7) Assemblage du virion à la membrane plasmique et finalement le relâchement du virion par bourgeonnement. 8) Étape subséquente de maturation pour devenir une particule infectieuse.

1.5 Génome du VIH-1

Le génome du VIH-1 est d'une taille d'environ 10 000 nucléotides qui se présente sous la forme de deux simples brins identiques d'ARN linéaires à polarité positive. Comme pour tous les rétrovirus, le VIH-1 encode les trois gènes de base *gag*, *pol* et *env* (Coffin, 1992a; Murphy et al, 1994). Le gène *gag* code pour les protéines structurales qui sont post-traductionnellement clivées à partir du précurseur Pr55^{Gag}. Les protéines issues de cette série de clivages sont : la capsid, la matrice, la nucléocapsid, p6 et p2 (Coffin, 1990; Luciw, 1996). Le gène *pol* code, quant à lui, pour les enzymes nécessaires à la réplication du virus dont la transcriptase inverse et l'intégrase, qui cette fois-ci sont post-traductionnellement clivées à partir du précurseur Pr160^{Gag-Pol}. La transcriptase inverse permet la transcription inverse de l'ARN en ADN et l'intégrase assure la fonction d'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte (Brown, 1997). Le gène *env*, troisième gène de base des rétrovirus, code pour l'enveloppe virale retrouvée sous la forme d'un précurseur gp160, qui est par la suite scindé en deux sous-unités, la gp120 et la gp41. Quant à sa fonction, l'enveloppe est impliquée dans le processus d'attachement viral à la cellule cible par la liaison au corécepteur CD4. En plus de ces trois gènes de base, le VIH-1 code pour d'autres gènes que l'on nomme gènes régulateurs et gènes accessoires. Les gènes régulateurs sont *tat* et *rev* qui codent respectivement pour une protéine transactivatrice et une protéine impliquée dans l'épissage de l'ARN. Finalement, quatre gènes accessoires dont *vpr*, *vpu*, *vif* et *nef* complètent le génome du VIH-1 et sont impliqués à différents stades du cycle viral. La fonction de ces gènes est principalement liée à l'augmentation du pouvoir infectieux des particules virales (Cullen, 1998; Luciw, 1996).

1.5.1 Gènes structuraux (*gag, pol, env*)

L'assemblage des lentivirus se fait principalement à la membrane plasmique des cellules infectées et ce processus, qui se déroule en plusieurs étapes, nécessite l'implication de la protéine virale Gag. L'expression seule de Gag est suffisante à l'assemblage et au relâchement des particules virales immatures en l'absence des autres protéines virales (Ono et Freed, 1999). Synthétisée par les ribosomes dans le cytoplasme à partir de l'ARN génomique non-épissé, la protéine Gag se présente sous la forme d'un précurseur de polyprotéines Pr55^{Gag}. Ce précurseur Pr55^{Gag} est transporté à la membrane plasmique et se compose de quatre domaines protéiques : la matrice, la capsid, la nucléocapsid ainsi que le domaine p6 et de deux peptides espaceurs, SP1 et SP2. Durant ou immédiatement après le relâchement de la particule virale, Pr55^{Gag} est scindé par la protéase virale pour générer les protéines p17 de la matrice, p24 de la capsid, p7 de la nucléocapsid et p6 (Ono et *al*, 1999; Spearman, 1997). Ce clivage induit un réarrangement morphologique que l'on nomme maturation et donne naissance à une particule avec un core condensé et conique, deux caractéristiques d'un virion infectieux (Akira et *al*, 1999). Spécifiquement, Gag médie la production des particules par l'interaction entre les protéines Gag, plus particulièrement entre les domaines CA et SP1. L'assemblage des particules se fait à la membrane plasmique et implique le domaine MA de la protéine Gag qui permet l'attachement à la membrane plasmique. Cette interaction de Gag à la membrane permet l'incorporation de l'ARN viral génomique, du complexe glycoprotéique de l'enveloppe et de la protéine précurseur Gag-Pol (Pr160^{Gag-Pol}).

La matrice est impliquée dans plusieurs étapes, aussi bien à des étapes précoces que tardives du cycle viral. Dans un premier temps, la myristoylation de Gag dans la partie N-terminale du domaine MA permet le recrutement de Gag à la membrane et est requise pour l'assemblage du virus (Gaysen et *al*, 1989; Göttlinger et *al*, 1989; Bryant et Ratner, 1990; Pal et *al*, 1990). Également, d'autres fonctions ont été rapportées dont l'incorporation de la

glycoprotéine de l'enveloppe, du précurseur Gag-Pol, le ciblage du PIC vers le noyau ainsi que son rôle dans l'assemblage des particules et du bourgeonnement à travers la formation de multimères de MA-MA (Spearman *et al*, 1997; Adamson *et al*, 2009).

De toutes les protéines qui dérivent du précurseur Gag, la capsid est celle ayant la plus grosse taille moléculaire, soit 231 acides aminés (Yoo *et al*, 1997). De forme conique, la capsid du VIH-1 contient deux domaines structuraux, dont un domaine d'assemblage en N-terminal et un domaine de dimérisation C-terminal. Cette structure formée par la capsid assure son implication dans l'enveloppement du complexe nucléocapsid/ARN génomique (Ganser-Pornillos *et al*, 2003; K. von Schwedler *et al*, 2003).

La nucléocapsid est une petite protéine basique de 55 acides aminés qui dérive d'une série de clivages de la protéine Gag. Certains travaux ont démontré que la nucléocapsid reconnaît spécifiquement une séquence d'encapsidation ϕ près de l'extrémité 5' du génome, permettant le compactage de l'ARN à l'intérieur du corps viral (Berkowitz *et al*, 1993; Dannull *et al*, 1994). Capable de se lier aux acides nucléiques simple brin, la nucléocapsid permet de protéger le génome viral des nucléases cellulaires. Une autre fonction consiste à promouvoir l'appariement des séquences d'ARN complémentaires (Prats *et al*, 1988). Précisément, la nucléocapsid stimule la transcription inverse en facilitant l'appariement de l'amorce ARNt au site de liaison et stimule la réaction d'échange des brins (deRocquigny *et al*, 1992).

Finalement, la dernière protéine issue du précurseur Gag, située en aval de la nucléocapsid, est la protéine p6, qui consiste en un polypeptide d'environ 60 acides aminés. Sa fonction s'effectue lors des étapes finales du bourgeonnement et du relâchement des particules virales ainsi que dans l'incorporation de la protéine Vpr dans le virion (Göttlinger *et al*, 1991).

Le gène *pol* code pour une polyprotéine qui, suite à divers clivages protéolytiques, générera les trois enzymes virales: la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase, toutes essentielles à la réplication virale.

La transcriptase inverse du VIH-1 est une enzyme multifonctionnelle qui permet la transcription inverse du génome du VIH-1. Structuellement, l'enzyme est sous la forme d'un hétérodimère de 66/51 kiloDalton (kDa) avec une activité ADN polymérase. La sous-unité de 66 kDa contient le site actif de l'enzyme pour la polymérisation de l'ADN et l'activité Rnase H tandis que la sous-unité de 51 kDa est issue du clivage protéolytique du domaine de la Rnase H dans la sous-unité de 66 kDa et est dépourvue de toute activité enzymatique (Kohlstaedt et al, 1992; Huang et al, 1998; Ding et al, 1998). La transcriptase inverse possède trois activités enzymatiques distinctes dans le processus de la polymérisation de l'ADN. Sa première activité enzymatique consiste en la polymérisation de l'ADNc à partir de l'ARN viral. La deuxième étape implique son activité Rnase H qui résulte en la dégradation du brin d'ARN du duplexe ARN-ADNc et finalement la synthèse du nouveau brin d'ADN à partir de l'ADNc (Huber et al, 1989; Fuentes et al, 1996).

L'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte est une étape fondamentale au cycle de vie du VIH-1. Cette étape résulte d'une infection permanente en plus de permettre l'établissement d'un réservoir proviral nécessaire à la production de virus. Le processus d'intégration médié par l'intégrase s'effectue selon deux étapes indépendantes. La première étape se déroule dans le cytoplasme et consiste en la liaison de l'intégrase sur l'extrémité 3' de l'ADN rétrotranscrit en enlevant deux nucléotides (GT) adjacents, exposant ainsi le groupe hydroxyl de l'extrémité 3'. La deuxième réaction se produit dans le noyau où l'intégrase joint les extrémités de l'ADN viral préalablement digéré au génome cellulaire (Bushman et al, 1991).

La protéase est initialement traduite à partir du précurseur Gag-Pol, séquence flanquée en N-terminal par la «transframe region» (TFR) et en C-terminal par la transcriptase inverse (Barre-Sinoussi et *al*, 1983; Louis et *al*, 2000; Oroszlan et Luftig, 1990). Faisant partie de la famille des protéases à acide aspartique, la protéase du VIH-1 se compose de 99 acides aminés dont l'activité requiert absolument son clivage en N-terminal ainsi que son homodimérisation. La protéase est responsable de son autoclivage à partir du précurseur Gag-Pol et du clivage des précurseurs Gag et Gag-Pol pour la génération des protéines structurales et fonctionnelles (Oroszlan et Luftig, 1990).

L'entrée du VIH-1 dans la cellule cible est un processus médié par la glycoprotéine de l'enveloppe virale. L'attachement viral à la cellule cible s'effectue à travers la liaison de la gp120 virale et du corécepteur de surface CD4 (Myszka et *al*, 2000). Dans les cellules infectées, l'enveloppe est synthétisée sous la forme d'un précurseur glycosylé gp160 qui est envoyé dans le réticulum endoplasmique pour y subir diverses modifications où des sucres et des ponts disulfures sont ajoutés à la glycoprotéine ainsi que la formation d'oligomères de gp160. De plus, les interactions transitoires avec les protéines chaperones du réticulum endoplasmique dont Bip, la calnexine et calréticuline, assurent le bon repliement de la gp160 (Earl et *al*, 1991; Knarr et *al*, 1999). Suite à l'oligomérisation, la gp160 est transportée à l'appareil de Golgi et est clivée par l'action des protéases cellulaires de la famille des furines pour ainsi générer les sous-unités gp120 et gp41 qui resteront associées de façon non-covalente, soit à travers des liaisons hydrophobiques (Corbitt et *al*, 1990). Plusieurs résidus de sucres seront également transformés en des sucres plus complexes dans le réseau de l'appareil de Golgi. Ces modifications au niveau des sucres sont extrêmement importantes dans le processus de reconnaissance des ligands de l'enveloppe dont DC-SIGN et autres lectines et sont également impliquées dans le repliement de l'enveloppe (Turville et *al*, 2002). Finalement, le complexe glycoprotéique de l'enveloppe est transporté à la surface cellulaire où les particules virales sont assemblées en vue de permettre le bourgeonnement de la membrane plasmique.

1.5.2 Gènes régulateurs (*rev* et *tat*)

La protéine Rev a initialement été identifiée pour sa fonction régulatrice au niveau de l'expression des protéines du virion. L'expression de Rev active l'expression des gènes structuraux et enzymatiques dont *gag*, *pol* et *env* de l'ADN proviral. Le mécanisme s'effectue par la liaison de Rev sur la région «Rev-responsive element» (RRE) qui consiste en une structure d'ARN présente sur l'ARN non-épissé des gènes *gag* et *gag-pol* ainsi que sur l'ARN du gène *env* épissé qu'une seule fois. Cette liaison de Rev permet, avec la contribution des composantes du «CRM-1-mediated nuclear export pathway», l'augmentation des niveaux d'ARN viraux dans le cytoplasme et, par conséquent, l'augmentation de leur niveau d'expression. Additionné à son rôle dans l'augmentation de l'expression des protéines virales, Rev augmente également l'efficacité de l'encapsidation de l'ARN génomique dans le virion (Grewe et Überla, 2010; Groom et al, 2009).

La protéine transactivatrice (Tat) consiste en une petite protéine régulatrice de 14 kDa impliquée dans la transactivation et l'augmentation de la transcription des gènes du VIH-1 à partir du promoteur des LTR viraux. La stimulation de l'élongation des transcrits se fait par la liaison de Tat sur une structure en épingle à cheveux, située en 5' des transcrits viraux naissants, nommée «Trans-activating Response Element» (TAR). Dans le complexe contenant le facteur d'élongation positif de transcription b (P-TEFb), la liaison de Tat sur TAR permet, avec la contribution de la cycline T1, le recrutement de la cycline cellulaire CDK9 sur les LTR. Ce mécanisme permet via l'activité kinase de CDK9, la phosphorylation en C-terminal de la grosse sous-unité de l'ARN polymérase II, permettant l'initiation de la transcription du génome viral (Wei et al, 1998; Karn, 1999; Price, 2000; Bannwarth et Gatignol, 2005).

1.5.3 Gènes accessoires (*vif*, *vpu*, *vpr*, *nef*)

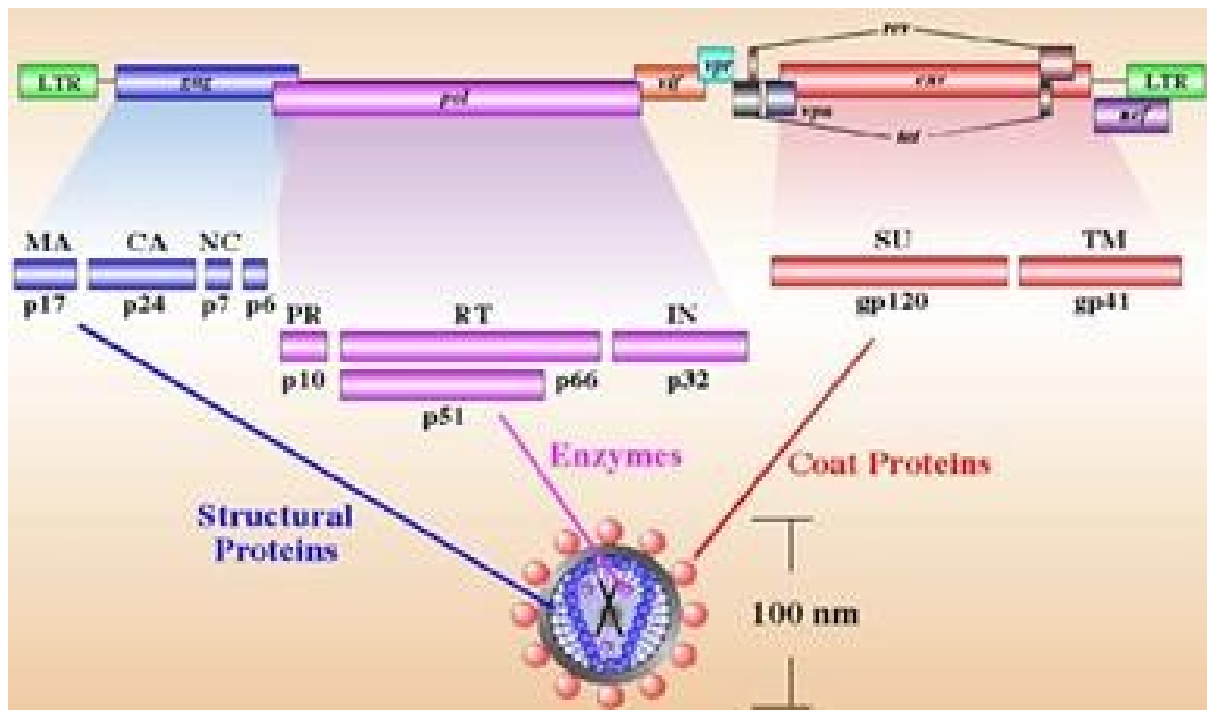
La protéine «virion infectivity factor» (Vif) est une protéine accessoire de 23 kDa impliquée dans la production de virus infectieux. Toutefois, son implication est dépendante du type cellulaire suggérant la présence d'un facteur cellulaire spécifique à l'accomplissement de sa fonction (Fisher et *al*, 1987; Strebel et *al*, 1987). Plus précisément, un résultat de recherche a démontré que Vif peut contrer les effets antiviraux des protéines «Apolipoprotein B editing catalytic subunit 3G» (APOBEC). Celles-ci font partie de la famille des cytidines désaminases et leur encapsidation dans les particules virales cause soit la désamination des résidus cytidine en uracil durant la transcription inverse ou l'inhibition de la réplication du virus à travers un mécanisme indépendant de la désamination. La fonction primaire de Vif consiste à prévenir l'encapsidation des protéines APOBEC dans les particules virales, mécanisme engendré par l'habileté de Vif à induire l'ubiquitination et la dégradation de certaines protéines APOBEC, dont APOBEC3G et APOBEC3F. La prévention de l'encapsidation des protéines APOBEC peut également se produire par un ou plusieurs mécanismes indépendants de l'ubiquitination (Goila-Gaur et Strebel, 2008).

Quant à la «viral protein R» (Vpr), cette protéine de 14 kDa se compose de 96 acides aminés dont la structure contient une région flexible en N-terminal, trois hélices α avec des propriétés amphipathiques et une région flexible en C-terminal (Felzien et *al*, 1998; Müller et *al*, 2000). L'arrangement tridimensionnel confère à Vpr une versatilité au niveau des interactions avec les protéines cellulaires et virales qui sont directement reliées à la pathogenèse du VIH-1. L'incorporation de Vpr dans le virion se fait à travers une interaction avec le domaine p6 de la protéine Gag (Bachand et *al*, 1999). Plusieurs fonctions ont été attribuées à Vpr dans l'augmentation de l'infectivité des virions : la modulation de la transcription du génome viral, la réduction du taux de mutation du VIH-1, l'induction de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2, la perturbation de la

mitose et l'implication dans le transport du complexe de préintégration (Sawaya et *al*, 2000; Chang et *al*, 2004; Vodicka et *al*, 1998; Rogel et *al*, 1995; Jowett et *al*, 1999).

La «viral protein U» (Vpu) consiste en une protéine transmembranaire de 77-86 acides aminés qui est associée à deux fonctions primaires durant le cycle viral (Maldarelli et *al*, 1993). Une de ces deux fonctions consiste à antagoniser les effets de la protéine Tetherine dans certains types cellulaires spécifiques. La Tetherine permet, en absence de Vpu, la liaison croisée des virions avec la membrane plasmique de la cellule hôte. Un récent ouvrage a également démontré que les particules virales matures contenant la Tetherine ont été trouvées dans les compartiments intracellulaires suite à leurs rétentions à la membrane plasmique, ce qui suggère une fonction de la Tetherine dans le processus de dégradation des particules virales. Donc, l'effet inhibiteur de Vpu sur la Tetherine permet l'augmentation du relâchement des virions à la membrane plasmique (Neil et *al*, 2006). L'autre effet de Vpu consiste en son implication dans la baisse d'expression du corécepteur CD4. Contrairement à la protéine «Negative factor» (Nef) qui retire le corécepteur CD4 de la surface membranaire à des stades précoces de l'infection, Vpu agit à des stades tardifs sur le corécepteur CD4 nouvellement synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique (Willey et *al*, 1992). La dégradation du corécepteur CD4 par Vpu nécessite sa liaison au CD4 ainsi que sa phosphorylation pour interagir avec les protéines «Beta-transducing repeat-containing protein» (β -TrCP-1 et β -TrCP-2), deux protéines adaptatrices F-box qui font partie d'un complexe E3 ubiquitine ligase impliquées dans la voie de signalisation ubiquitine/protéasome (Schubert et Srebel, 1994; Bour et Strebel, 1995; Margottin et *al*, 1998; Buttica et *al*, 2007). Également, la dégradation du corécepteur CD4 par Vpu empêche la séquestration du précurseur de l'enveloppe gp160 au niveau du réticulum endoplasmique. Ce mécanisme favorise la génération des glycoprotéines matures de l'enveloppe gp120 et gp41 et facilite leur transport vers le lieu d'assemblage à la membrane plasmique (Buonocore et *al*, 1993; Crise et *al*, 1990, Jabbar et Nayak, 1990; Stevenson et *al*, 1988).

La dernière protéine accessoire du VIH-1, Nef, tire son nom de son premier effet négatif rapporté antérieurement sur la suppression de l'expression des gènes à partir des LTR. Toutefois, plusieurs effets positifs ont, à ce jour, été trouvés pour jouer un rôle central dans la pathogenèse du VIH-1. L'importance de cette protéine, unique au VIS et VIH, a été démontrée autant chez le macaque que chez l'humain, où un ralentissement de la progression de la maladie a été observé dans des souches de VIS ou VIH défectueuses pour le gène Nef (Daniel *et al*, 1992; Swigut *et al*, 2004; Deacon *et al*, 1995; Dyer *et al*, 1997; Kirchoff *et al*, 1995). Les fonctions les mieux caractérisées de Nef sont associées à sa capacité d'induire la baisse de régulation du complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 (CMH-1) et du corécepteur de surface CD4 (Bandres *et al*, 1995; Garcia et Miller, 1991; Cohen *et al*, 1999; Collins *et al*, 1998; Schwartz *et al*, 1996). La multifonctionnalité de Nef lui confère également la possibilité d'interagir avec un large éventail de substrats menant à l'altération de la transduction du signal de la cellule hôte (Du *et al*, 1995; Simmons *et al*, 2001). Les détails concernant la structure ainsi que les mécanismes impliqués dans l'accomplissement de la fonction biologique de Nef seront expliqués ultérieurement en plus amples détails. Toutefois, avant d'entreprendre le prochain chapitre, un schéma du génome du VIH-1 est illustré à la page suivante (**Figure 3, p.18**).



Adapté de Stewart et al, 2000

Figure 3 : Structure du VIH-1. Le génome du VIH-1 consiste en trois gènes communs compris chez tous les membres de la famille des rétrovirus soit *gag*, *pol* et *env*. Également, le VIH-1 code pour deux gènes régulateurs, *rev* et *tat*, et quatre gènes accessoires qui sont *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef*.

CHAPITRE 2 : La protéine Nef du VIH-1

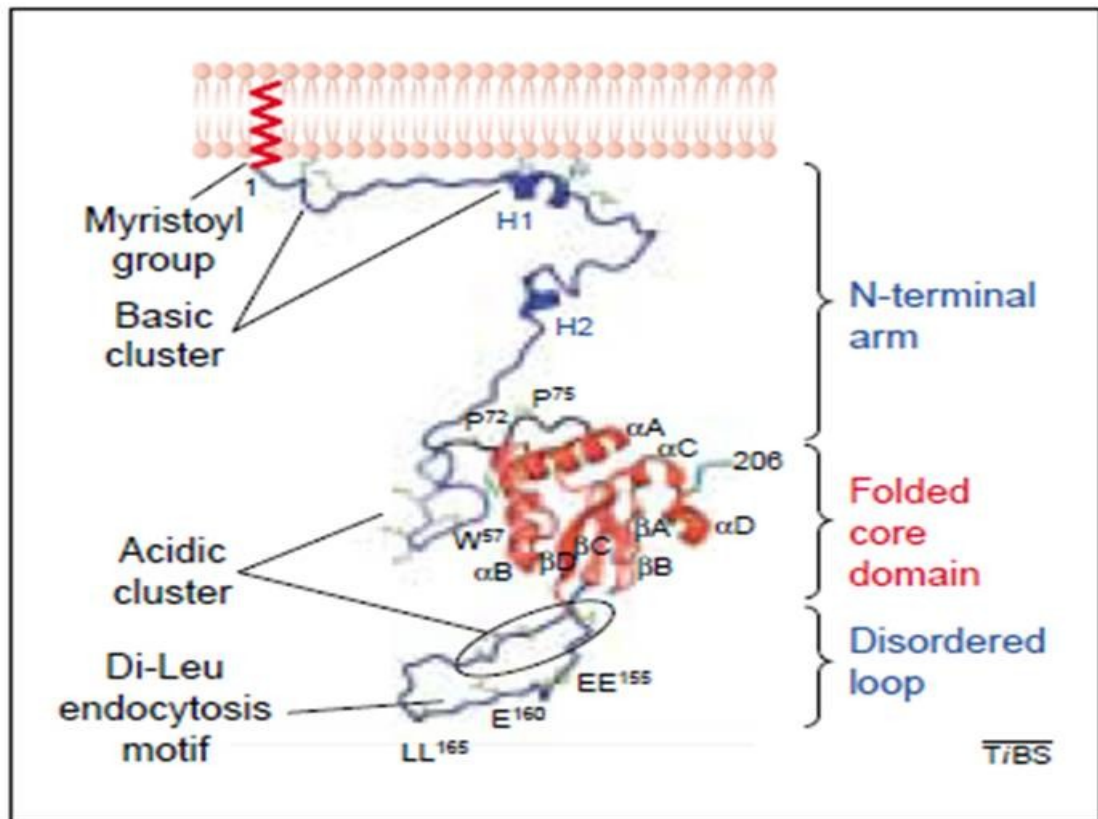
2.1 Structure et caractéristiques de Nef

La protéine accessoire Nef est exprimée par tous les lentivirus des primates dont le VIH-1, VIH-2 et VIS. Dépendamment de l'allèle, sa taille moléculaire varie entre 27 et 34 kDa (Piguet et Trono, 1999). Nef est exprimée à de hauts niveaux à des moments précoces et tout au long du cycle viral jouant ainsi un rôle déterminant dans la pathogénécité virale et le développement du SIDA (Kestler et *al*, 1991; Wei et *al*, 2003). Structurellement, Nef se compose de 206 acides aminés et la protéine se divise en trois domaines: le bras en N-terminal composé d'environ 70 acides aminés, suivi du noyau appelé le core de la protéine formé d'environ 130 acides aminés ainsi qu'une petite queue en C-terminale d'environ 5 acides aminés (**Figure 4, p21**) (Arold et Baur, 2001).

Le bras N-terminal consiste en une région flexible, mais génétiquement diverse (Arold et Baur, 2001). Les acides aminés 21 à 34 pourraient, entre autres, servir à la liaison entre les deux hélices α qui couvrent la région des acides aminés 15 à 20 et 35 à 41 (Geyer et *al*, 1999). Cette région renferme quelques séquences d'acides aminés consensus dont : M¹GxxxS⁶ (Geyer et *al*, 1999), C⁵⁵AW↓LEA⁶⁰ (Freund et *al*, 1994), W⁵⁷L⁵⁸ et un domaine E⁶²EEE⁶⁶. Bien que la structure entière de Nef soit difficile à résoudre par cristallographie au rayon X et résonance magnétique nucléaire, le domaine core a toutefois été résolu et consiste en la seule partie de Nef qui adopte une structure tertiaire stable (Arold et *al*, 1997; Hochrein, 2006). Le core forme un domaine α - β dans lequel un feuillet β central anti-parrallèle de 4 brins est flanqué en N-terminal par deux longues hélices α anti-parrallèles et en C-terminal par deux petites hélices α . Également, une séquence riche en proline (P⁶⁹xxPxxPxxP⁷⁸) forme une hélice polyproline de type II ayant une affinité pour les protéines contenant un domaine SH3. Adjacent à l'hélice polyproline se trouvent deux hélices α qui englobent les acides aminés 81 à 120 où l'on retrouve un domaine di-arginine RR¹⁰⁶. Sont également retrouvés quatre feuillets β anti-parrallèles à 4 brins qui s'étendent des acides aminés 121 à 186 contenant les domaines FPD¹²⁴, P¹⁴⁷xxP¹⁵⁰, di-acidique EE¹⁵⁵,

di-leucine E¹⁶⁰xxxLL¹⁶⁵ et un groupement acide D¹⁷⁵DPxxE¹⁸⁰. Ultiment, deux autres hélices α couvrent les acides aminés de la position 187 à 203 (Arold et Baur, 2001) et se terminent par la queue en C-terminale de Nef.

Pour être fonctionnelle, Nef doit subir certaines modifications post-traductionnelles. Parmi celles-ci, on retrouve la myristoylation qui s'effectue par l'action de la N-myristoyl transférase à partir de la séquence consensus M¹Gxxx(S/T)⁶ (Peng et Robert-Guroff, 2001). La méthionine initiale est retirée durant la traduction et un groupement myristate est inséré sur la glycine en position 2. Toutes les activités biologiques attribuées à Nef, à l'exception de l'activation de la protéine «Hematopoietic cellular kinase» (Hck) (Briggs et *al*, 2001), requièrent sa myristoylation, puisqu'elle permet son ancrage aux membranes cellulaires nécessaires à l'accomplissement de ses fonctions (Resh, 1999). Une autre modification post-traductionnelle de Nef consiste en son clivage par la protéase virale dans le virion. Ce clivage spécifique s'effectue dans la séquence consensus C⁵⁵AW↓LEA⁶⁰ qui sépare le domaine du core de la région d'attachement à la membrane en N-terminal. Pensée pour être d'une importance biologique, la fonction découlant de cette modification demeure imprécise (Pandori et *al*, 1996; Welker et *al*, 1996). Finalement, Nef peut également être phosphorylée par deux membres de la sous-famille des protéines kinases C (PKC), les PKC delta et thêta. Une étude a démontré que l'association de Nef et PKC est suffisante à l'activation de PKC pour induire la phosphorylation de Nef sur le résidu sérine en position 6. Par une étude de mutagenèse, l'altération de cette modification réduit légèrement la myristoylation de Nef, l'activation de «p21 Associated kinase 2» (PAK2) ainsi que sa localisation périnucléaire, ce qui suggère que la phosphorylation de Nef est impliquée dans l'augmentation de la réplication virale et l'infectivité des particules virales (Wolf et *al*, 2008). Bien que ces modifications soient attribuées à l'accomplissement de ses fonctions, Nef est dépourvue d'activité enzymatique et sert d'adaptateur à un grand nombre de protéines cellulaires. À travers ses multiples motifs, Nef recrute différentes composantes cellulaires pour manipuler le trafic intracellulaire des récepteurs de surface (Tolstrup et *al*, 2004).



Tiré de Arold et Baur, 2000

Figure 4 : Structure de la protéine Nef du VIH-1. Nef contient trois domaines dont un bras en N-terminal, un domaine core et une petite queue en C-terminal. Le groupement myristate et le groupement d'acides aminés basiques en N-terminal permettent son ancrage à la membrane. Plusieurs motifs sont retrouvés dans les trois domaines et permettent ses diverses associations avec les protéines cellulaires.

2.2 Fonctions biologiques de Nef

Nef est une protéine multifonctionnelle connue pour interagir avec plusieurs protéines impliquées dans la signalisation cellulaire ainsi que dans le transport des protéines de la cellule hôte (Geyer 2001). Son expression permet d'assurer quatre principales fonctions *in vitro* très bien documentées: la régulation à la baisse du corécepteur de surface CD4, la régulation à la baisse du CMH-1, l'augmentation de l'infectivité des particules virales et, finalement, l'interférence au niveau de la transduction du signal dans le processus d'activation cellulaire. Ces fonctions de Nef contribuent largement à l'état de persistance de l'infection au VIH-1 et à la progression du SIDA.

2.2.1 Baisse de la régulation du corécepteur CD4 de surface

La baisse de la régulation du corécepteur CD4 de surface à la synapse immunologique a été la première fonction attribuée à Nef qui, sans aucun doute, a été la plus étudiée jusqu'à présent (Garcia et Miller, 1991; Guy et *al*, 1987). Le corécepteur CD4 est une glycoprotéine de surface dont le poids moléculaire est de 55 kDa et représente le récepteur primaire pour l'entrée du VIH-1. Composante de la signalisation par le TcR, le CD4 permet l'interaction avec le CMH-II exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), dont les lymphocytes T auxiliaires, les cellules dendritiques et les macrophages/monocytes (Lama, 2003). Plusieurs mécanismes contribuent à la baisse de la régulation du CD4 à la surface lors de l'infection au VIH-1. La glycoprotéine de l'enveloppe virale et la protéine Vpu, via leur action dans des sites intracellulaires, ont la capacité de baisser les niveaux de corécepteur CD4 à la surface en empêchant ce dernier d'atteindre la membrane plasmique (Piguet et *al*, 1999). À l'inverse, Nef agit sur le corécepteur CD4 déjà présent à la surface de la cellule et accélère le processus d'endocytose impliqué dans sa dégradation par la voie endosomale/lysosomale (Aiken et *al*, 1994). Ce mécanisme est en accord avec le fait que Nef localise et augmente le nombre de

vésicules de clathrine contenant le corécepteur CD4 (Foti et *al*, 1997; Greenberg et *al*, 1997). D'ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la formation des vésicules de clathrine permet de bloquer la baisse de régulation du corécepteur CD4 par Nef. Au niveau moléculaire, le mécanisme par lequel Nef induit la baisse du CD4 requiert, dans un premier temps, la liaison de Nef avec le domaine di-leucine du domaine cytoplasmique du CD4 (Mangasarian et *al*, 1997). Plusieurs résidus de Nef sont impliqués dans cette interaction avec le CD4 : les acides aminés W⁵⁷L⁵⁸ dans sa boucle flexible proximale, les résidus G96, L97, R106, L110 situés dans le domaine core de Nef en plus du résidu aspartate en position 204 (Grzesiek et *al*, 1996; Iafrate et *al*, 1997). Suite à sa liaison au CD4, Nef agit en tant que connecteur avec la machinerie d'endocytose en recrutant, entre autres, le complexe de la clathrine contenant la protéine AP-2 qui lie le domaine di-leucine ¹⁶⁰ExxxLL¹⁶⁵ ainsi que les résidus acidiqes ¹⁷⁴(E/D)D¹⁷⁵ de Nef (Grzesiek et *al*, 1997). De même, Nef interagit avec la sous-unité régulatrice VIH de l'ATPase vacuolaire qui fait partie du complexe formant les vésicules de clathrine. Cette interaction permet de stabiliser la faible liaison directe entre Nef et AP-2 (Erdtmann et *al*, 2000). Finalement, l'interaction de Nef via son motif diacidique ¹⁵⁵EE¹⁵⁶ avec la protéine β-COP, qui consiste en une partie du coatamère de type I, permet de diriger le complexe Nef-CD4 vers les endosomes et les lysosomes pour sa dégradation (Benichou et *al*, 1994; Piguet et *al*, 1999). L'effet de pont médié par Nef entre le CD4 et la machinerie d'endocytose déplace la liaison entre le CD4 et la tyrosine kinase cellulaire «Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase» (Lck). Modifiant sa distribution, une certaine fraction a été rapportée pour accumuler dans les endosomes (Thoulouze et *al*, 2006). Par conséquent, la baisse du corécepteur CD4 par Nef prévient la superinfection puisque le CD4 est le récepteur primaire d'entrée du VIH-1 et, par le fait même, module la signalisation par la voie du récepteur de la cellule T (Geleziunas et *al*, 1994; Wildum et *al*, 2006).

2.2.2 Baisse de la régulation du CMH-1

Une autre fonction bien conservée de Nef procurant un avantage à la persistance virale revient à sa capacité de baisser la quantité du CMH-1 de surface (Pamer et Cresswell, 1998; Schwartz et al, 1996). La reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques requiert la présentation des peptides viraux à la surface des cellules infectées par le CMH-1 pour permettre leur élimination (Rock et Goldberg, 1999; Yewdell et Hill, 2002). L'échappement à la surveillance immunitaire des cellules infectées où la protéine Nef est exprimée a été démontré *in vitro* par une réduction de la lyse médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (Collins et al, 1998; Yang et al, 2002). Des études de mutagenèse ont démontré que la baisse de régulation du corécepteur CD4 et du CMH-1 s'effectue par des voies de signalisation d'endocytose bien distinctes (Riggs et al, 1999). L'expression de Nef n'affecte toutefois pas le transport du CMH-1 du réticulum endoplasmique vers le Golgi, mais permet l'internalisation rapide de la surface de la cellule vers les endosomes qui, par la suite, s'accumule dans le trans-Golgi pour être envoyé dans les vésicules de clathrine du post-Golgi (Piguet et al, 2000). L'initiation du mécanisme de la baisse de la régulation du CMH-1 se fait par l'entremise d'une interaction entre Nef et la protéine «Phosphofurin acidic cluster sorting» (PACS-2) au niveau du trans-Golgi. Cette interaction induit le déplacement de PACS-2 et permet à Nef de lier une protéine de la famille des Src kinases. Suite à ces événements, la Src kinase phosphoryle la kinase «Zeta associated protein of 70 kDa» (Zap-70), qui à son tour phosphoryle et active la protéine phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3K) suite à la liaison sur son domaine SH2 (Atkins, 2008). Cette cascade de réactions mène donc à l'activation de la PI3K et, par conséquent, contribue à l'augmentation des niveaux de PIP₃ permettant l'activation du facteur d'échange de nucléotide guanine ARNO ainsi que la GTPase «ADP-ribosylation factor 6» (ARF6). Bien que ce mécanisme n'implique pas d'interaction directe entre Nef et le CMH-1, il requiert toutefois la présence du complexe PACS-1/AP-1 pour lier la queue cytoplasmique du CMH-1 (Atkins, 2008). Le mécanisme utilisé par Nef dans la baisse de

régulation du CMH-1 a d'ailleurs été supporté par l'utilisation d'inhibiteurs de la PI3K qui ont la propriété de contrer cet effet (Blagoveshchenskaya et *al*, 2002).

De même, plusieurs travaux ont démontré que Nef peut moduler les niveaux de plusieurs autres récepteurs de surface dont le CD8, la chaîne invariante immature du CMH-II, l'IL2R, DC-SIGN, CD80, CD86 ainsi que le CMH-II mature (Chaudhry et *al*, 2005; Garcia et Miller, 1991; Greenway et *al*, 1994; Schwartz et *al*, 1996; Sol-Foulon et *al*, 2002; Stumptner-Cuvelette, 2001; Stove et *al*, 2005).

2.2.3 Augmentation de l'infectivité des particules virales

L'expression abondante de Nef à des stades précoces de l'infection au VIH-1 représente environ 75% de toute la charge d'ARN viral contenue dans la cellule hôte (Klotman et *al*, 1991). Autant chez le macaque que chez l'humain infectés respectivement au VIS et VIH, un gène *nef* fonctionnel est absolument requis pour maintenir de hautes charges virales et le développement du SIDA (Kestler et *al*, 1991; Aldrovandi et Zack, 1996; Duus et *al*, 2001). Son expression est nécessaire à la réplication dans les cellules T primaires, les macrophages et plusieurs lignées de cellules T (Miller et *al*, 1994; Spina et *al*, 1994). Des études ont démontré que les particules déficientes pour le gène *nef* étaient de 4 à 40 fois moins infectieuses que celles du VIH-1 de type sauvage, et ce, dans un seul cycle d'infection (Aiken et Trono, 1995; Chowes et *al*, 1994; Miller et *al*, 1994). Le processus par lequel Nef permet l'augmentation de l'infectivité des particules virales est d'une grande complexité et s'effectue par plusieurs mécanismes. La baisse d'expression du corécepteur CD4 par Nef représente un mécanisme empêchant la séquestration de la glycoprotéine de l'enveloppe par le corécepteur CD4. Puisque le corécepteur CD4 peut s'accumuler dans les particules virales, sa présence pourrait bloquer l'incorporation de la glycoprotéine de l'enveloppe dans les virions. L'habileté de Nef à baisser les niveaux de CD4 à la surface contre cet effet et augmente le relâchement des virions. (Lama et *al*, 1999; Lundquist et *al*,

2004). De plus, Nef permet d'augmenter le transport du cholestérol nécessaire à la biosynthèse des microdomaines membranaires impliqués dans le bourgeonnement des virions. Puisque Nef contient un site de myristoylation en N-terminal et une séquence consensus de reconnaissance du cholestérol en C-terminal, son ancrage à la membrane et son effet catalyseur au niveau du transport du cholestérol permet, par le fait même, une plus grande incorporation de Nef lui-même dans la particule virale où il est clivé par la protéase. (Welker et *al*, 1998; Zheng et *al*, 2003). Son inclusion dans le virion semble également faciliter l'incorporation de kinases cellulaires pouvant phosphoryler certaines composantes virales dont la matrice, processus largement associé à la production de particules virales infectieuses (Freed et *al*, 1990). Un autre mécanisme implique la liaison de Nef avec la dynamine 2, un régulateur clé du transport vésiculaire. Cette interaction permet, avec la collaboration de la clathrine, l'enclenchement des événements impliqués dans l'invagination de la membrane (Pizzato et *al*, 2007). Quoi qu'il en soit, les mécanismes employés par Nef pour augmenter l'infectivité des particules virales font surtout appel à sa capacité de moduler le bourgeonnement du virion et le transport vésiculaire dans la cellule cible.

2.2.4 Interférence dans la transduction du signal

En plus d'interagir avec les protéines impliquées dans ses modifications post-traductionnelles ainsi que celles menant à la baisse de régulation des corécepteurs de surface, Nef possède également la capacité de lier et moduler le comportement des protéines intervenant dans la transduction du signal. Ces différentes interactions peuvent interférer au niveau de la survie cellulaire et de l'apoptose, du réarrangement du cytosquelette d'actine ainsi que sur la signalisation par le TcR.

2.2.4.1 Survie cellulaire et apoptose

Le VIH-1 peut induire la mort cellulaire autant dans les cellules infectées que dans les cellules non-infectées (Badley et *al*, 2000). Le mécanisme associé à cet effet découle de la capacité de Nef à induire l'expression de Fas (CD95) et du ligand de Fas (CD95L) dans les cellules infectées (Xu et *al*, 1999; Zauli et *al*, 1999). L'expression du CD95L à la surface des cellules infectées contribue à l'évasion immune en permettant d'enclencher le processus d'apoptose spécifiquement dans les cellules T cytotoxiques (Xu et *al*, 1999). Au niveau moléculaire, ce mécanisme implique la protéine «Apoptosis Signal Regulation kinase-1» (ASK-1) jouant un rôle intermédiaire et crucial dans les voies de signalisation du récepteur Fas et du «Tumor necrosis factor α » (TNF- α) associées à l'induction de l'apoptose par la voie de «c-Jun N-terminal kinase» (JNK). Toutefois, Nef a été rapportée pour lier et inhiber l'activité d'ASK-1 augmentant la résistance des cellules infectées de l'apoptose (Chang et *al* 1998; Geleziunas et *al*, 2001). La protection des cellules infectées contre l'apoptose peut également s'effectuer par la formation du complexe Nef-PI3K-PAK. L'activation des deux kinases par Nef permet la phosphorylation de Bad, protéine pro-apoptotique et membre de la famille Bcl-2 permettant le déclenchement de l'apoptose au niveau de la mitochondrie. Généralement, ce mécanisme s'effectue à travers la sérine kinase AKT, qui inactive Bad suite à la phosphorylation sur un résidu sérine. En présence de Nef, la phosphorylation de Bad se produit indépendamment d'AKT et permet le relâchement de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L, du complexe Bad-Bcl-X_L pour augmenter la survie cellulaire (Wolf et *al*, 2001). Finalement, Nef peut accentuer l'effet anti-apoptotique des cellules infectées suite à l'interaction de son domaine N-terminal incluant les résidus 1 à 57 avec la protéine pro-apoptotique p53. Cette interaction entraîne la diminution de la demi-vie de p53 et par conséquent, sa liaison à l'ADN associée à son activité transcriptionnelle (Greenway et *al*, 2002).

2.2.4.2 Remodelage du cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine régule plusieurs fonctions des cellules immunitaires, dont la signalisation, la différenciation, la migration à travers les tissus ainsi que la présentation d'antigènes. Le réarrangement du cytosquelette d'actine et, par conséquent, la forme que la cellule immunitaire adopte varie considérablement selon la fonction spécifique. Plusieurs effets de Nef impliqués dans la réplication virale, l'évasion du système immunitaire et l'activation cellulaire ainsi que l'augmentation du relâchement des particules virales sont en partie associés à la déstabilisation du cytosquelette d'actine (Fackler et *al*, 1997; Niederman et *al*, 1993). Bien que certains phénotypes inverses aient été observés, plusieurs systèmes ont démontré, à l'exception des cellules dendritiques où Nef améliore la formation de la synapse immunologique entre les cellules dendritiques et les cellules CD4⁺ (Quaranta et *al*, 2003), que Nef induit la dépolymérisation de l'actine (Campbell et *al*, 2004; Fackler et *al*, 1999). Par ailleurs, une étude a démontré que Nef lie et active le facteur d'échange de nucléotides guanine Vav permettant l'activation de plusieurs effecteurs en aval dont JNK. Cette liaison a mené à l'observation de divers changements morphologiques des cellules immunitaires. Dans cette même étude, les auteurs ont démontré, suite à l'utilisation d'une forme dominante négative de Vav, que l'activité kinase de PAK2 est dépendante de l'association entre Nef et Vav et permet l'initiation d'une cascade de signalisation (Fackler et *al*, 1999). Également, une observation a été effectuée dans une lignée de cellules gliales où Nef peut activer Rac, ce qui a potentialisé l'existence d'un lien entre Nef et la voie de signalisation Vav/PAK/Rac (Vilhardt et *al*, 2002). D'ailleurs, une récente étude basée sur la mutation de Nef en position 195, soit la forme F195A, ainsi que la déplétion des niveaux endogènes de PAK2, ont démontré que l'association Nef-PAK2 induit un blocage sévère au niveau de la polymérisation de l'actine et, par conséquent, l'inhibition de la chimiotaxie dans les lymphocytes T suite au traitement par le «Stromal derived factor-1 α » (SDF-1 α) (Stolp, 2009). Le mécanisme résultant de cette inhibition de la chimiotaxie consiste en l'activation de PAK2 qui permet l'hyperphosphorylation et l'inactivation de la cofiline

impliquée dans le remodelage de l'actine en procurant les monomères d'actine nécessaires à la synthèse de nouveaux filaments (Bamburg et Bernstein, 2008; Stolp et *al*, 2009). L'inhibition de la chimiotaxie par Nef a également été démontrée dans les cellules T primaires et les cellules Jurkat stimulées par les chémokines SDF-1 et «Macrophage inflammatory protein-1 β » (MIP-1 β) par la voie de signalisation des corécepteurs CXCR4 et CCR5 respectivement. Dans cette étude, Nef a été démontrée pour inhiber la chimiotaxie par la formation d'un complexe impliquant les protéines DOCK2-ELMO1 pour activer Rac2. Ce complexe contribue également à l'activation de la cellule T (Janardhan et *al*, 2004).

2.2.4.3 Activation cellulaire

En plus de la baisse de régulation du corécepteur CD4 et du CMH-1 associée à l'augmentation de l'infectivité des particules virales (Alexander et *al*, 2004), Nef interagit, dépendamment de sa localisation, avec plusieurs kinases endogènes pour activer ou inhiber différentes voies de signalisation (Bauer et *al*, 1994). En plus d'augmenter la survie des cellules infectées, les interactions médiées par Nef optimisent l'environnement cellulaire pour la réplication virale et l'augmentation de l'infectivité des particules virales (Arora, 2002). L'activation de la cellule hôte est requise à la réplication virale et ce processus a d'ailleurs été démontré, dans les lymphocytes T, pour contribuer à la progression de la pathogenèse associée au VIH-1 (Hazenberg et *al*, 2003). Nef contribue à ce niveau en baissant le seuil d'activation de la cellule T favorisant l'intégration du virus et l'activité transcriptionnelle des gènes viraux à des stades précoces (Schrager et Marsh, 1999; Wu, Y. et J. W. Marsh, 2001).

2.2.4.3.1 Association et activation de PAK1/2 (p-21 associated kinase)

Le complexe NAK a été décrit pour la première fois comme étant deux phosphoprotéines de poids moléculaires apparents de 62 kDa et 72 kDa (Sawai et *al*, 1994). La protéine de 62 kDa a été identifiée comme PAK1 tandis que celle de 72 kDa était pensée pour être un substrat de PAK1 (Lu et *al*, 1996; Nunn et Marsh, 1996; Sawai et *al*, 1996). À travers les membres de la famille des PAK, Nef semble s'associer préférentiellement à PAK2 (Renkema et *al*, 1999; Renkema et *al*, 2001; Schindler et *al*, 2007; Vincent et *al*, 2005). Toutefois, Nef a également été démontrée pour s'associer et induire l'activation de PAK1 (Fackler et *al*, 2000). L'association de Nef menant à l'activation de PAK2 est une des premières fonctions décrites de Nef et est très bien conservée à travers les différents allèles de Nef du VIH-1 et du VIS (Renkema et *al*, 1999). D'ailleurs, cette fonction a été démontrée dans plusieurs lignées cellulaires où Nef est exprimée, soit dans les lymphocytes T et les macrophages infectés au VIH-1 (Brown et *al*, 1999; Sawai et *al*, 1994) ainsi que dans plusieurs populations de cellules immunitaires (thymocytes, macrophages et cellules dendritiques) de souris transgéniques n'exprimant que le gène *nef* (Vincent et *al*, 2006). Toutefois, l'association entre Nef et PAK2 s'effectue transitoirement par un mécanisme d'autorégulation. Une étude a démontré que l'activation de PAK2 est requise pour la formation du NAKC mais qu'en même temps, la hausse de son activité catalytique favorise sa dissociation du complexe (Pulkkinen et *al*, 2004). L'activation de PAK2 par Nef a été rapportée pour se produire exclusivement dans les microdomaines membranaires où environ seulement 5 à 10% de Nef localise (Fenard et *al*, 2005). D'ailleurs, certaines études ont démontré l'importance du ciblage de Nef à la membrane dans l'association et l'autophosphorylation du complexe «Nef-associated kinase» (NAK) (Krautkrämer et *al*, 2004; Manninen et *al*, 1998). La mutation de PAK2 dans son domaine de liaison des GTPases a également révélé leur implication au niveau de la stabilisation et de l'activation du complexe NAK (Pulkkinen et *al*, 2004). Au niveau biologique, l'activité catalytique de PAK2 est en partie associée à son implication dans le processus d'activation cellulaire. Le

rôle de PAK2 dans l'activation des cellules T a été démontré dans une étude où l'utilisation de la forme dominante négative de PAK2, dépourvue d'activité enzymatique, a bloqué la hausse de la régulation du marqueur d'activation CD69 en plus de diminuer l'activité du facteur de transcription NFAT suite à l'engagement du récepteur de la cellule T (TcR) dans les cellules Jurkat (Chu et *al*, 2004).

2.2.4.3.2 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)

Plusieurs interactions de Nef avec des protéines cellulaires sont connues pour moduler l'activité des protéines «Mitogen-activated protein kinase» (MAPK). D'ailleurs, une observation effectuée dans les cellules Jurkat stimulées au phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) a démontré que Nef entre en synergie par la voie de signalisation Ras/MAPK et permet l'augmentation d'environ 100 fois l'expression du gène du facteur de transcription NFAT par rapport au contrôle (Manninen et *al*, 2000). Par contre, peu d'interactions directes entre Nef et les membres des MAPK ont été répertoriées jusqu'à présent. Toutefois, une étude de liaison a démontré que Nef peut coprécipiter MAPK et que cette interaction est médiée par l'affinité entre le domaine SH3 de MAPK et la séquence riche en proline de Nef [(Pxx)4]. Cette interaction mène cependant à l'inhibition de l'activité MAPK *in vitro* (Greenway et *al*, 1995, 1996). Également, une séquence acide hautement conservée de Nef en C-terminal, Asp¹⁷⁴-Asp-X-X-X-Glu¹⁷⁹, très similaire au site de liaison de c-Raf1 sur Ras, a été démontrée pour lier c-Raf1 *in vitro*. L'interaction entre Nef et c-Raf1 a également été observée dans la lignée cellulaire CEM T exprimant constitutivement la forme native de Nef. Considérant l'implication des MAPK dans plusieurs voies de signalisation, la modulation de l'activité des MAPK par Nef peut induire de sévères perturbations au niveau de la signalisation dans les cellules infectées (Hodges et *al*, 1998).

CHAPITRE 3 : Famille des Src kinases

3.1 Membres de la famille des Src kinases

Les Src kinases font partie d'une famille comprenant neuf membres groupés par une homologie de séquence qui partagent des caractéristiques structurales communes : c-Src, Lck, Hck, Fyn, Blk, Lyn, Fgr, Yes et Yrk (Brown et Cooper, 1996; Thomas et Brugges, 1997). Leur expression varie selon le tissu, où c-Src, Fyn et c-Yes sont exprimés dans une variété de types cellulaires, tandis que le reste des Src kinases, à l'exception de Yrk, ont un profil d'expression restreint aux cellules hématopoïétiques (Thomas et Brugges, 1997). Le dernier membre, Yrk, comporte certaines variétés quant à sa distribution et sa fonction. Yrk est exprimé spécifiquement dans un large éventail de tissus de poulet durant le développement et l'éclosion (Martins-Green et *al*, 2000). Au niveau biologique, l'activation des Src kinases est régulée par divers récepteurs dont ceux aux facteurs de croissance, aux cytokines, aux molécules d'adhésion ainsi que les récepteurs aux antigènes. Leur fonction est critique pour générer un signal approprié en réponse aux stimuli externes (Brown et Cooper, 1996; Thomas et Brugges, 1997).

3.2 Structure

Tous les Src kinases partagent une structure conservée qui consiste en un alignement consécutif des domaines Src-homology 4 (SH4), Src-homology 3 (SH3), Src-homology 2 (SH2) et un domaine tyrosine kinase (Src-homology 1) (Koegl et *al*, 1994; Resh, 1999). Suivant le domaine SH4, une séquence d'environ 50 à 70 acides aminés, appelée domaine unique, diffère tout au long de la famille des Src kinases.

3.3 Régulation de l'activité catalytique

La régulation de l'activité catalytique des Src kinases s'effectue principalement par la phosphorylation impliquant deux résidus tyrosines. Dans le cas de c-Src, ces résidus font référence à la tyrosine 416, située dans la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase et à la tyrosine 527, située dans la petite queue en C-terminale. Cette dernière constitue un site d'autoinhibition de l'enzyme (Cooper et *al*, 1986). La phosphorylation de ce site par la kinase Csk (Nada et *al*, 1991) promouvoit l'assemblage des domaines SH2, SH3 et tyrosine kinase dans une conformation inactive maintenue par le repliement et l'interaction entre ces domaines (Sicheri et *al*, 1997; William et *al*, 1997). À l'opposé, la phosphorylation en tyrosine 416, qui s'effectue par un mécanisme de trans-autophosphorylation, permet la pleine activité catalytique (Smart et *al*, 1981).

3.4 Liaison et modulation des Src kinases par Nef

Le motif polyproline situé dans le domaine core très bien conservé à travers les différents allèles de Nef du VIH-1 et du VIS permet, avec plus ou moins d'affinités, de lier et moduler le niveau d'activation de plusieurs membres de la famille des Src kinases (Cheng et *al*, 1999; Renkema et Saksela, 2000).

3.4.1 Hck

Une liaison bien documentée de Nef avec les Src kinases est celle avec Hck. Principalement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, dont les monocytes, les granulocytes (Lichtenberg et *al*, 1992) ainsi que les lymphocytes B (Moarefi, 1997), la protéine Hck se retrouve en deux isoformes de quantités comparables qui proviennent de la traduction d'un seul ARNm (Lock et *al*, 1991). L'isoforme p59Hck se localise à la

membrane plasmique tandis que l'isoforme p61Hck se situe à la face cytoplasmique des lysosomes (Carréno et *al*, 2000). Dans les macrophages, plusieurs voies de signalisation sont dépendantes de l'activité de Hck : la signalisation par le récepteur Fc gamma dans la phagocytose (Kedzierska et *al*, 2001), la voie de la β -intégrine 1 impliquant Cbl et la PI3K dans l'adhésion et la migration (Meng et Lowell, 1998), et la voie de l'interleukine-2 (Bosco et *al*, 2000). La liaison de Nef avec Hck a été démontrée pour être celle ayant la plus grande affinité ($K_D = 1,5$ microM) parmi les interactions de type SH3 (Arold et *al*, 1998; Horenkamp et *al*, 2011; Lee et *al*, 1995; Moarefi, 1997; Stangler et *al*, 2007). Spécifiquement, la liaison cause le déplacement du domaine SH3 et permet une forte activation de Hck (Moarefi, 1997). L'activation de Hck par Nef a d'ailleurs été démontrée pour induire des tumeurs malignes dans des fibroblastes (Briggs et *al*, 1997). La fonction primaire associée à l'activation de Hck a été démontrée dans certaines études où 1) l'expression de la forme dominante négative de Hck inhibe l'entrée et l'infectivité du VIH-1 (Komuro et *al*, 2003; Tokunaga et *al*, 1998) et 2) l'expression de Nef dans les souris transgéniques déficientes pour le gène *hck*^{-/-} a largement atténué les symptômes associés à la maladie du SIDA (Hanna et *al*, 2001).

3.4.2 Lyn, c-Src, Fgr, Yes, Blk

Certains travaux ont également rapporté que le domaine SH3 de Lyn peut lier le motif polyproline de Nef avec une affinité comparable à celle du domaine SH3 de Hck *in vitro* (Saksela et *al*, 1995; Choi et Smithgall, 2004). À l'exception de Hck, Lyn est le seul membre de la famille des Src kinases contenant un résidu isoleucine en position 96 nécessaire à la liaison de la poche hydrophobique de Nef (Choi et Smithgall, 2004; Lee et *al*, 1995). L'effet de Nef sur l'activité catalytique de Lyn est très peu documenté, toutefois, une étude effectuée dans la levure a démontré le potentiel de Nef à activer Lyn. Basé sur le fait que l'expression ectopique de c-Src induit la suppression de la croissance cellulaire de façon kinase-dépendante, les auteurs ont transfecté Nef en présence de chacune des Src

kinases prises individuellement pour observer l'effet sur la croissance des levures. Ce système a également été validé par la cotransfection de c-Src avec Csk, diminuant ainsi l'activité catalytique de c-Src et, par conséquent, l'induction de la croissance de levures. Finalement, la suppression de la croissance des levures a été observée pour Lyn, Hck et c-Src, indiquant que Nef active fortement ces trois kinases. Toutefois, aucun effet notable n'a été détecté pour Fgr, Fyn, Yes et Lck (Trible et *al*, 2006).

3.4.3 Fyn

Fyn est exprimé en deux isoformes, Fyn T, principalement retrouvé dans les lymphocytes T et Fyn B, qui est hautement exprimé dans le cerveau (Cooke et Perlmutter, 1989; Picard et *al*, 2004). Principalement, Fyn se localise dans les structures intracellulaires, où il interagit avec la protéine «Focal adhesion kinase» (FAK) (Kanazawa et *al*, 1996; Qian et *al*, 1997). Fyn a également été démontrée pour lier, phosphoryler et activer la protéine «Wiskott-Aldrich syndrome protein» (WASP) dans les cellules T (Badour et *al*, 2004). À la membrane, Fyn peut, contrairement à Lck, se localiser directement sur la sous-unité du complexe CD3 du TcR (Timson Gauen et *al*, 1992). Dans la transduction du signal par le TcR, Fyn partage quelques fonctions avec Lck qui peuvent partiellement substituer Lck pendant le développement des thymocytes (Groves et *al*, 1996). La liaison entre Nef et Fyn s'effectue par l'interaction du domaine SH3 de Fyn et le motif polyproline de Nef, toutefois l'affinité de liaison est beaucoup plus faible que pour Hck et Lyn ($K_D > 20\mu\text{M}$). Par contre, le mutant de Fyn où l'arginine en position 96 est mutée pour l'isoleucine (Fyn R96I), comme retrouvée pour Hck, est suffisant pour augmenter de façon importante l'affinité de la liaison ($K_D = 380\text{ nM}$) (Lee et *al*, 1995). Toutefois, l'effet de Nef sur l'activité catalytique de Fyn est peu documenté à l'exception de l'étude effectuée chez la levure décrite précédemment, qui a démontré que Nef ne peut activer Fyn dans ces conditions (Trible et *al*, 2006).

3.4.4 Lck

Le dernier membre de la famille des Src kinases est Lck mais puisque sa régulation en présence de Nef fait l'objet de ce mémoire, le prochain chapitre portera sur Lck et la signalisation par la voie du TcR. Divers aspects seront abordés dans le chapitre dont sa structure, sa régulation, son rôle dans le développement des cellules T et dans la signalisation par la voie du TcR ainsi que les effets de Nef connus sur la modulation de Lck. Toutefois, avant d'entreprendre ce prochain chapitre, un tableau récapitulatif des partenaires d'interaction de Nef est présenté à la page suivante (**Tableau I, p.37**).

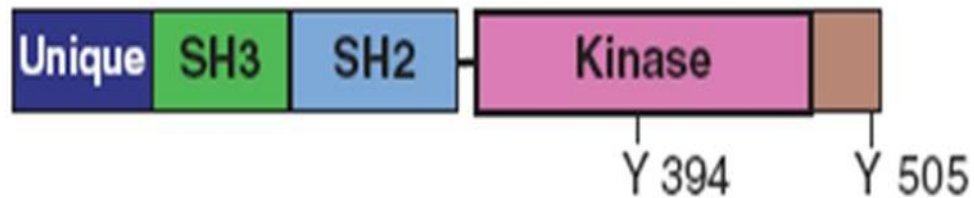
Tableau I : Partenaires cellulaires connus pour interagir avec Nef.

Noms des protéines	Références
Protéines de modification	
N-myristoyl-transférase	(Peng et Robert-Guroff, 2001)
Protéase virale	(Pandori et al, 1996; Welker et al, 1996)
Baisse de la régulation du CD4	
Corécepteur CD4	(Mangarisan, 1997)
Protéine adaptatrice 1/2/3	(Erdtmann et al, 2000)
ATPase vacuolaire	(Erdtmann et al, 2000)
β -COP	(Benichou et al, 1994; Piguet et al, 1999)
Baisse de la régulation du CMH-1	
PACS-1/2	(Atkins, 2008)
AP-1	(Atkins, 2008)
Infectivité virale	
Dynamine 2	(Pizzato et al, 2007)
Cytosquelette d'actine	
Vav	(Fackler et al, 1999)
DOCK2	(Janardhan et al, 2004)
ELMO1	(Janardhan et al, 2004)
Survie cellulaire et apoptose	
Ask1	(Chang et al 1998; Geleziunas et al, 2001)
p53	(Greenway et al, 2002)
PI3K	(Wolf et al, 2001)
Activation cellulaire	
Src kinases (Hck, Lyn, c-Src, Fyn et Lck)	(Arold et al, 1998; Collette et al, 1996)
PAK1/2	(Fackler et al, 2000; Vincent et al, 2005)
PKC θ	(Smith et al, 1996)
MAPK (Erk1)	(Greenway et al, 1995, 1996)
c-Raf1	(Hodges et al, 1998)

CHAPITRE 4: Lck et signalisation par le TcR

4.1 Structure et caractéristiques

Lck est une protéine de poids moléculaire de 56 kDa principalement exprimée dans les cellules T (Perlmutter et *al*, 1988). Dans son domaine Src-homology 4 (SH4) de la portion N-terminal, Lck contient des sites d'attachement covalents pour des groupements lipidiques saturés. Ces modifications post-traductionnelles servent d'ancrage à la membrane (Resh, 1999). Suite à l'enlèvement de la méthionine en début de chaîne, un groupement myristate est ajouté sur le résidu glycine en position 2 (Johnson et *al*, 1994). Ajouté à cela, Lck subit l'ajout de deux groupements palmitates sur les résidus cystéines en position 3 et 5 toutefois, ces modifications sont réversibles (Paige et *al*, 1993). En plus de permettre son attachement à la membrane, la portion N-terminale de Lck contient un domaine unique essentiel à sa localisation sur la queue cytoplasmique des corécepteurs CD4 et CD8 α (Rudd et *al*, 1998; Veillette et *al*, 1988). La séquence motif CXXC dans le domaine unique de Lck permet l'interaction avec la séquence motif CXCP des corécepteurs CD4 et CD8 α (Shaw et *al*, 1990; Turner et *al*, 1990). Le domaine SH3 est composé de cinq feuillets β antiparrallèles et de deux boucles importantes, appelées boucles RT et n-Src (Musacchio et *al*, 1992; Yu et *al*, 1992) qui contiennent le site de reconnaissance pour le motif polyproline (Feng et *al*, 1994; Lim et *al*, 1994). Adjacent au domaine SH3, le domaine SH2 consiste en un feuillet β central et une simple hélice compactée (Eck et *al*, 1993; Waksman et *al*, 1993) dont l'architecture sert de site de reconnaissance pour les protéines phosphorylées en tyrosine (Overduin et *al*, 1992). Le domaine tyrosine kinase de Lck se caractérise par une structure bi-lobée dont le lobe en N-terminal est constitué de cinq feuillets β et d'une hélice α et celui en C-terminal est principalement constitué d'une hélice α et contient la boucle régulatrice d'activation qui permet l'activité tyrosine kinase associée à Lck (Taylor et *al*, 1992; Hubbard et Till, 2000). Finalement, la région C-terminale de Lck consiste en une petite queue qui contient le site de phosphorylation autoinhibiteur (**Figure 5, p.39**) (Cooper et *al*, 1986).



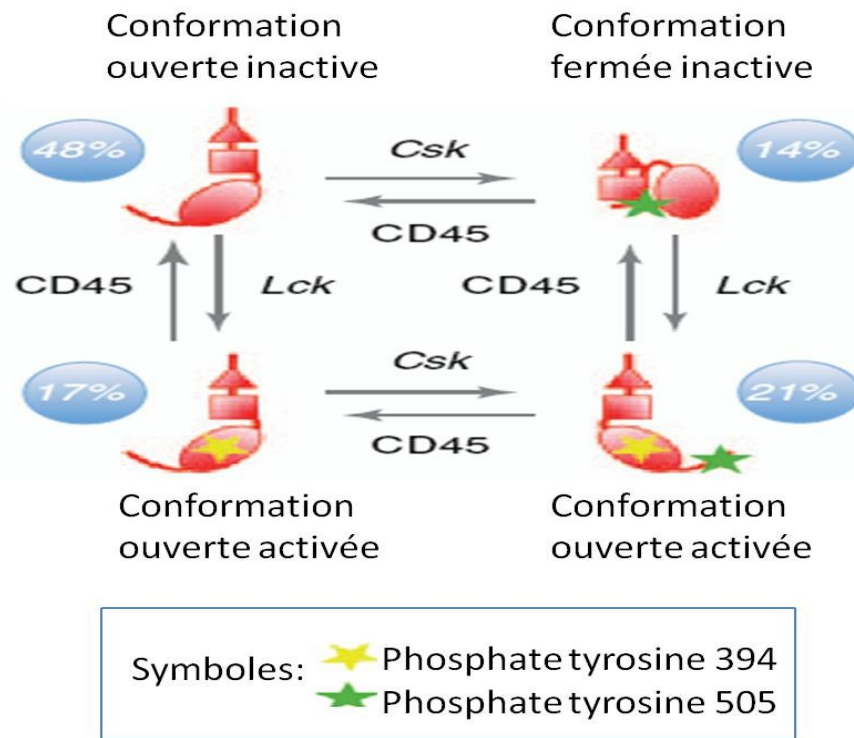
Adapté de Zamoyska et *al*, 2003

Figure 5 : Structure de Lck. Succession des domaines unique, SH3, SH2, tyrosine kinase et la petite queue en C-terminal. Le site d'activation en tyrosine 394 et d'autoinhibition en tyrosine 505 sont situés dans le domaine kinase et la queue en C-terminal respectivement.

4.2 Régulation de l'activité catalytique

L'activité catalytique de Lck est finement régulée par l'équilibre entre la phosphorylation et la déphosphorylation du site inhibiteur en C-terminal et la phosphorylation dans la boucle d'activation du domaine catalytique (Boggon et Eck, 2004). Lorsque phosphorylée en tyrosine 505 par Csk, Lck adopte une conformation fermée, où la tyrosine lie le domaine SH2 de Lck rendant la kinase inactive (Sicheri et Kuriyan, 1997; Xu et *al*, 1999). À l'inverse, la phosphatase CD45 régule l'activité de Lck par son action opposée, en déphosphorylant la tyrosine 505 (Hermiston et *al*, 2003). Lorsque Lck n'est phosphorylée sur aucun de ces deux sites, la protéine adopte une conformation ouverte mais demeure inactive, cette forme est appelée «primed Lck». La phosphorylation dans la boucle d'activation en tyrosine 394 de la forme «primed Lck» s'effectue par une réaction de trans-autophosphorylation de l'enzyme permettant l'augmentation de l'activité catalytique. Les interactions entre les domaines SH2, SH3 et la phosphorylation en tyrosine 394 permettent de positionner précisément l'ATP et stabiliser la conformation pour l'activité de l'enzyme (Boggons et Eck, 2004; Hermiston et *al*, 2003). Récemment, une autre forme moléculaire

de Lck a été observée, la forme phosphorylée simultanément en tyrosine 394 et 505. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que cette forme adopte une conformation ouverte dont l'activité catalytique est comparable à celle phosphorylée en tyrosine 394 (**Figure 6, p.40**) (Nika et al, 2010).

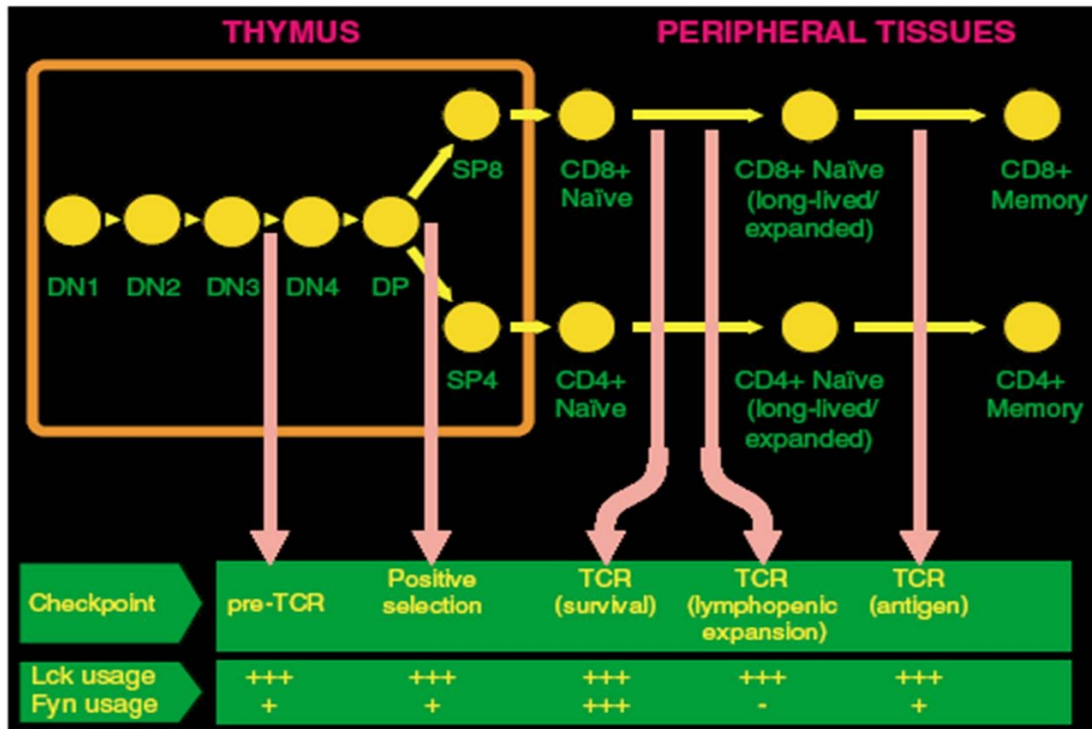


Adapté de Davis et van Den Merwe, 2010

Figure 6: Régulation de Lck. L'interconversion des différentes formes actives et inactives de Lck s'effectue par l'entremise de la kinase Csk, Lck lui-même et la phosphatase CD45. Les domaines SH3, SH2 et tyrosine kinase sont représentés par des triangles, des carrés et des ovales respectivement. Les étoiles jaunes et vertes représentent la phosphorylation en tyrosine 394 et 505 respectivement. Finalement, les cercles bleus indiquent le pourcentage de chaque forme mesurée dans une récente étude dans les lymphocytes CD4⁺ humains à l'état non-stimulé (Nika et al, 2010).

4.3 Rôle de Lck dans le développement des cellules T

L'importance de Lck dans le développement des thymocytes a été démontrée suite à l'analyse des souris déficientes pour le gène *lck*^{-/-}. Lors du développement des cellules T, deux défauts majeurs caractérisent les souris *lck*^{-/-}. Premièrement, un blocage sévère de la différenciation des thymocytes lors de la transition du stade DN3 (CD4⁻ CD8⁻ CD44⁻ CD25⁺) vers DN4 (CD4⁻ CD8⁻ CD44⁺ CD25⁻), à un point où environ 10% du nombre de thymocytes DP (CD4⁺ CD8⁺) est atteint comparativement au type sauvage (Molina et al, 1992). Également, la faible quantité de cellules qui deviennent DP montrent un phénotype anormal et ne peuvent exprimer correctement les molécules CD5 ainsi que le TcR (Anderson et al, 1993). Deuxièmement, l'autre blocage survient lors de la transition des thymocytes immatures DP vers les cellules CD4⁺ SP, où très peu sont générés dans les souris *lck*^{-/-}. Au contraire, malgré l'homologie de structure entre Lck et Fyn, les souris déficientes pour le gène *fyn*^{-/-} ne montrent aucun problème majeur au niveau du développement des cellules T; le nombre de cellules présentes et leur proportion sont normales. Toutefois, les souris déficientes pour les deux gènes *lck*^{-/-} et *fyn*^{-/-}, le développement des cellules T est complètement bloqué au stade DN3, indiquant que Fyn n'a pas de rôle unique mais peut compenser quelques fonctions de Lck au cours du développement des thymocytes (**Figure 7, p.42**) (Groves et al, 1996; van Oers et al, 1996).

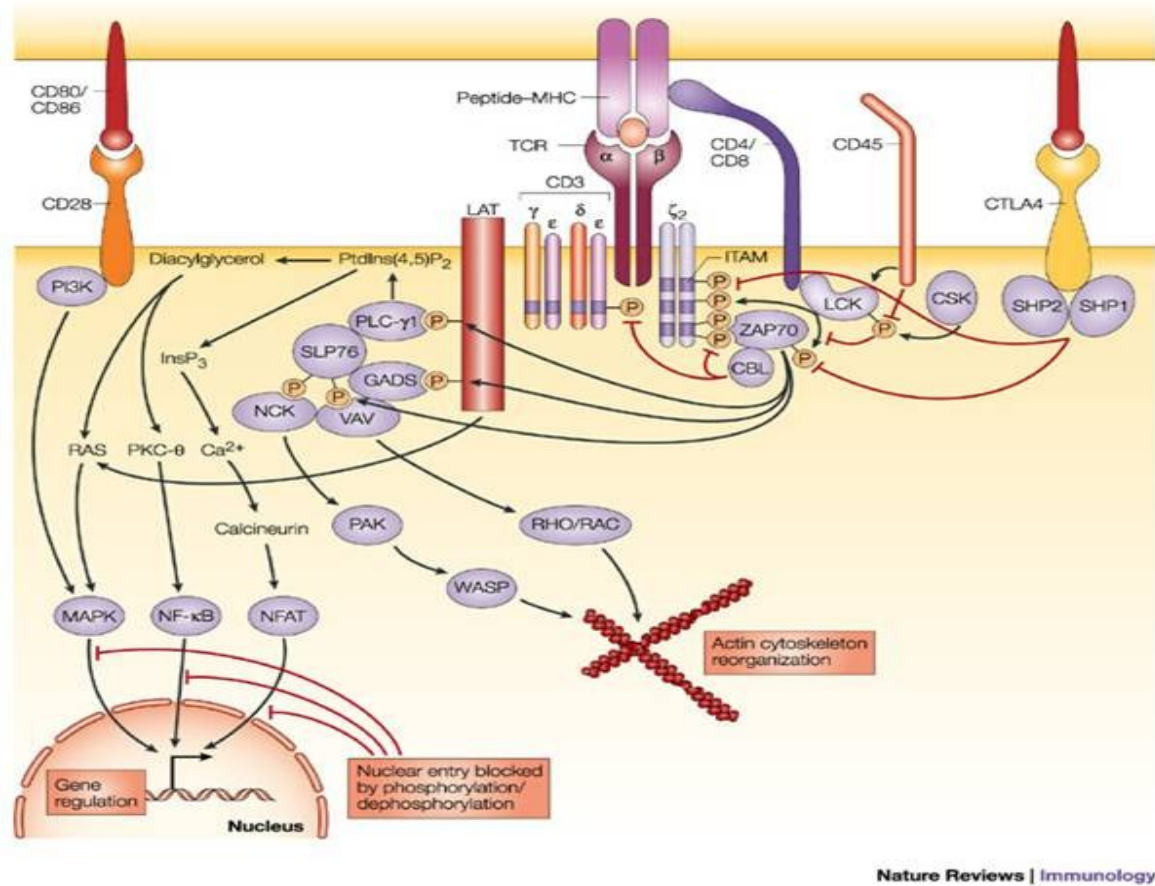


Tiré de Palacios et Weiss, 2004

Figure 7 : Signalisation par le TcR médiée par les Src kinases Lck et Fyn dans le développement des cellules T et de la fonction en périphérie. Niveau de contribution de Lck et Fyn au cours des différentes étapes du développement des lymphocytes T et de leur fonction en périphérie. Au niveau du thymus, Lck apporte une plus grande contribution que Fyn et ce, spécialement à la signalisation pré-TcR ainsi que durant le processus de sélection positive lors de la transition des thymocytes DP vers CD4⁺ SP ou CD8⁺ SP.

4.4 Description de la voie du TcR

La ligation du complexe CMH/peptide sur le TcR permet son recrutement dans les microdomaines membranaires, où est déclenchée une succession de phosphorylations en tyrosine dans les «Immunoreceptor tyrosine-based activation motif» (ITAMs) du complexe de la chaîne CD3/zêta (Latour et Veillette, 2001). La phosphorylation des ITAMs, mécanisme médié par l'action des Src kinases Lck et Fyn, permet le recrutement de Zap-70 sur la chaîne zêta du TcR, qui à son tour est phosphorylé et activé par Lck. L'activation de Zap-70 déclenche la phosphorylation sur plusieurs résidus tyrosines présents dans la protéine transmembranaire et adaptatrice «Linker of activation of T cell» (LAT) impliquée dans le recrutement de plusieurs protéines. Parmi celles-ci, on retrouve le complexe SLP-76/GADS, la phospholipase C- γ 1, la protéine «Adhesion and degranulation promoting adaptor protein» (ADAP), «Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa» (SKAP55), la protéine adaptatrice Nck, la kinase «Inducible tyrosine kinase» (ITK) et le facteur d'échange de nucléotide guanine Vav (Smith-Garvin et *al*, 2009). La formation du complexe multiprotéique, appelé SMAC, enclenche à ce moment plusieurs voies de signalisation impliquées dans divers processus dont la régulation du cytosquelette d'actine par la voie Vav/PAK/Rac, l'activation des MAPK, l'augmentation du calcium intracellulaire et la voie de la protéine kinase C. Ces voies de signalisation mènent à l'activation de plusieurs facteurs de transcription incluant NF- κ B, NFAT et AP-1 (Fos/Jun), qui sont directement impliqués dans la régulation de l'expression des gènes (Smith-Garvin et *al*, 2009). Finalement, l'atténuation de la signalisation suite à l'engagement du TcR requiert la phosphorylation et l'augmentation de l'activité ubiquitine ligase de «c-Casitas B-lineage Lymphoma» (c-Cbl) (Thien et *al*, 2003). Par un mécanisme de rétroaction négative, c-Cbl régule l'ubiquitination de Lck et de certaines composantes de la voie du TcR permettant le ciblage de ces protéines vers la voie du protéasome (**Figure 8, p.44**) (Rao et *al*, 2002).



Tiré de Baniyash, 2004

Figure 8 : Signalisation par la voie du TcR. La présentation du CMH/peptide au TcR déclenche la phosphorylation du complexe CD3 par les Src kinases Lck et Fyn. La phosphorylation de la chaîne zêta du TcR par Lck permet le recrutement de Zap-70 à la membrane. L'activation de Zap-70 mène à la phosphorylation de la protéine transmembranaire adaptatrice LAT, ce qui permet le recrutement de plusieurs effecteurs et la formation du SMAC. Plusieurs voies de signalisation découlent de ce complexe, menant à l'activation de plusieurs facteurs de transcription dont NF-κB, NFAT et AP1 (Fos/Jun).

4.4.1 Rôle des microdomaines membranaires dans la voie du TcR

Les microdomaines membranaires sont des structures hautement organisées de la membrane plasmique estimées à environ 25-50 nm (Friedrichson et Kurzchelia, 1998; Varma et Mayor, 1998). Ces régions se distinguent du reste de la membrane plasmique par leur enrichissement en cholestérol et en sphingolipides, et ces lipides sont essentiels au maintien de l'intégrité des microdomaines membranaires (Simons et Toomre, 2000). Dans les lymphocytes T, quelques protéines impliquées dans la signalisation par la TcR, dont Lck et LAT, sont constitutivement localisées dans les microdomaines membranaires et facilitent les associations intermoléculaires et la propagation du signal (Dykstra et *al*, 2003). L'importance des microdomaines membranaires a été démontrée suite à la déplétion du cholestérol des membranes par des drogues et agents séquestrants dont le méthyl- β -cyclodextrine, menant à l'inhibition de la voie de signalisation et de l'activation du lymphocyte T (Kabouridis et *al*, 2000; Xavier et *al*, 1998).

4.5 Liaison et modulation de Lck par Nef

Le domaine polyproline P⁷²xxP⁷⁵ de Nef a été démontré pour lier Lck dans son domaine SH3 (Cheng et *al*, 1999; Collette et *al*, 1996; Greenway et *al*, 1996; 1999) et étonnamment, Nef peut également lier le domaine SH2 de Lck (Cheng et *al*, 1999; Collette et *al*, 1996; Dutartre et *al*, 1998). Un mécanisme additionnel implique les 22 premiers acides aminés situés dans le bras N-terminal de Nef qui exercent une fonction de support dans la liaison entre Nef et Lck (Baur et *al*, 1997). Bien que cette interaction implique différents motifs de Nef, l'affinité de liaison entre Nef et Lck est comparée à celles pour les Src kinases Fyn et c-Src, mais demeure plus faible que la liaison entre Nef et Hck (Arold et *al*, 1998).

4.5.1 Effet de l'interaction entre Nef et Lck sur la transduction du signal

Dans les lymphocytes T, l'expression de Lck est intimement associée à la régulation des voies de signalisation par le TcR et par le récepteur à l'interleukine-2 (IL2R), deux voies de signalisation impliquées dans le processus d'activation cellulaire (Rudd et *al* 1988; Veillette et *al* 1988; Frank et *al* 1990; Horak et *al* 1991; Bolen et *al* 1992; Minami et *al* 1993). D'une part, la baisse de la régulation du récepteur à l'IL2R et du corécepteur CD4 par Nef a été démontrée pour contribuer à l'inhibition de l'état d'activation des cellules T (Greenway et *al*, 1994). D'autre part, certaines études ont démontré que Nef inhibe directement l'activité de Lck (Collette et *al*, 1996; Greenway et *al*, 1996; 1999) et que cette inhibition pourrait expliquer la baisse des niveaux d'ARNm de l'IL-2 et de la production de protéines dans les cellules (Greenway et *al*, 1995; Collette et *al*, 1996). À l'opposé, Nef a été démontrée pour augmenter la production d'IL-2 et potentialiser l'activation cellulaire dans les lymphocytes CD4⁺ primaires. La présence de Nef dans les microdomaines membranaires permet l'assemblage de complexes protéiques menant à la superinduction des facteurs de transcription NFAT et NF-κB (Wang et *al*, 2000). Parallèlement, une étude a démontré que Nef induit la fusion des microdomaines membranaires qui coïncide avec l'augmentation de l'association entre Lck et la chaîne zêta du complexe CD3 en absence de stimulus (Djordjevic et *al*, 2004). Responsable de la phosphorylation de la chaîne zêta du complexe CD3, Lck favorise le recrutement, la phosphorylation et l'activation de Zap-70 impliquée dans la hausse de l'expression des gènes dont l'IL-2 (Weiss, 1993; Weiss et Littman, 1994). Une étude effectuée dans les cellules Jurkat a démontré que Nef active Lck permettant ainsi le recrutement de la PKCθ dans les microdomaines membranaires, mécanisme associé à l'augmentation de l'activité de la MAPK «Extracellular signal-regulated kinase» (Erk) et la hausse de la transcription du VIH-1 (Whitte et *al*, 2008). Une autre fonction de Nef en revient à sa capacité d'induire, par l'entremise de Lck, l'hyperphosphorylation constitutive de la protéine proto-oncogène c-Cbl dans les lymphocytes CD4⁺. Très peu est connu concernant la fonction biologique associée à

l'hyperphosphorylation de c-Cbl en présence de Nef (Yang et Henderson, 2005). Toutefois, un récent ouvrage a démontré que Nef inhibe l'activité ubiquitine ligase de c-Cbl en séquestrant l'enzyme E2 de conjugaison de l'ubiquitine UBCH7 dans le cytoplasme (Simmons et *al*, 2005). Ce mécanisme menant à l'échec de la dégradation de Vav requiert absolument l'activité de Lck. En plus, celui-ci favorise la formation d'un complexe entre c-Cbl, β -Pix et la GTPase CDC42 associé à l'activation de la signalisation et l'augmentation de la réplication du VIH-1 dans les cellules CD4⁺ (Simmons et *al*, 2005). Tous ces mécanismes d'action de Nef par l'entremise de Lck contribuent, de près ou de loin, à la modification de la signalisation par le TcR et à l'état d'activation cellulaire.

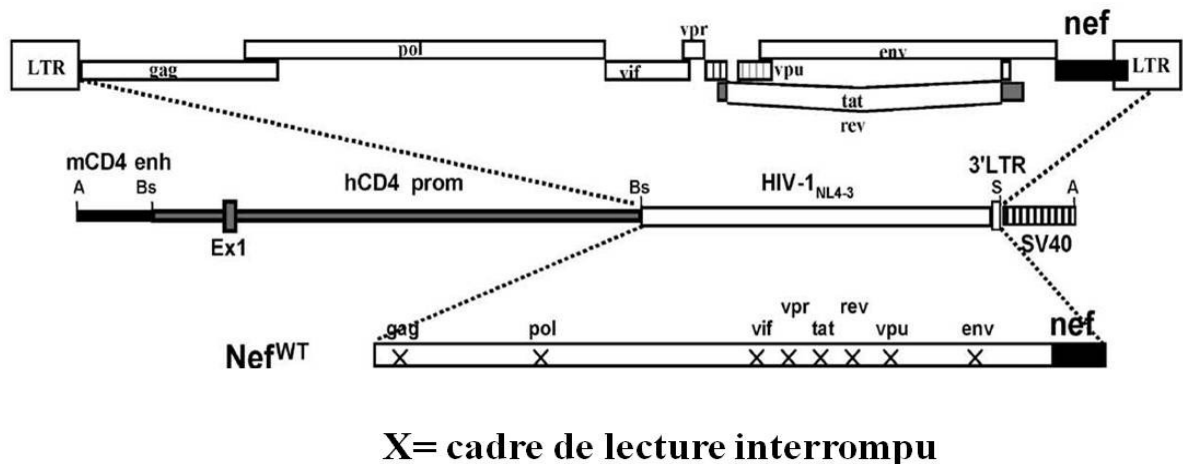
Mis à part l'effet de Nef sur l'activité de Lck, plusieurs études ont démontré que Nef inhibe la formation de la synapse immunologique altérant ainsi les premiers événements de la signalisation par le TcR (Ahrel et *al*, 2009). Un mécanisme bien conservé entre les allèles de Nef revient à sa capacité de provoquer l'accumulation intracellulaire de Lck rapportée pour s'effectuer au niveau des endosomes (Haller et *al*, 2007; Rudolph et *al*, 2009; Thoulouze et *al*, 2006). Cet effet médié par Nef altère la signalisation par le TcR et cause un dysfonctionnement au niveau du remodelage du cytosquelette d'actine. L'inhibition de la polymérisation de l'actine ainsi que le recrutement de Lck à la synapse immunologique ont été démontrés pour requérir les mêmes motifs de Nef qui sont étroitement corrélés à son association avec PAK2 (Haller et *al*, 2007).

Bien que Nef interagisse avec plusieurs partenaires associés à la signalisation par le TcR, son rôle dans l'interférence des premiers événements à proximité du TcR demeure un peu controversé. Dépendamment du système utilisé, plusieurs effets de Nef rapportés sur la modulation de Lck sont contradictoires et demeurent à éclaircir. Dans cet ouvrage, nous avons utilisé un modèle de souris transgéniques où Nef est exprimée, ce qui nous permet d'étudier son impact sur la modulation de la Src kinase Lck dans les thymocytes transgéniques primaires.

4.6 Modèle de souris transgéniques

4.6.1 Souris CD4C/HIV^{MutG}

Le modèle murin utilisé n'exprime que la protéine Nef du VIH-1 sous le contrôle du promoteur CD4C humain fusé à la séquence «*enhancer*» CD4 murin. Par conséquent, l'expression de Nef se limite aux thymocytes immatures CD4⁺ CD8⁺, aux lymphocytes T CD4⁺, ainsi que dans les populations de cellules myéloïdes, dont les macrophages et les cellules dendritiques (Hanna et *al*, 1998). Ce modèle a été généré dans notre laboratoire, celui du Dr. Paul Jolicoeur, à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) (Figure 9, p.48).



Tiré de Hanna et *al*, 2006

Figure 9 : Structure du transgène CD4C/HIV^{MutG}. La séquence «*enhancer*» CD4 murin (mCD4 enh), le promoteur CD4C humain (hCD4C prom), chacun des gènes du VIH-1^{NL4-3} et la séquence de polyadénylation du «simian virus 40» (SV40) ont été liés ensemble. Ex1 et Ex2 sont les deux premiers exons non-traduits du gène CD4 humain; 3'LTR est une partie de la séquence 3'LTR du génome du VIH-1. Le symbole X signifie que le cadre de lecture du gène indiqué est interrompu.

4.6.2 Implication de Nef dans la voie de signalisation CD4/Lck

4.6.2.1 RATIONALISATION

L'état de la cellule et le type cellulaire où la Src kinase Lck est étudiée peuvent significativement affecter les résultats. Un récent ouvrage a rapporté que Lck est trouvée dans quatre différentes formes moléculaires qui ont des activités enzymatiques distinctes dans les lymphocytes T et dont chacune est présente à un différent ratio selon le type cellulaire (Nika et *al*, 2010). D'un autre côté, il est connu que Nef interagit et se lie avec certaines protéines de la famille des Src kinases dont Hck et Lyn pour lesquelles Nef a apparemment une plus grande affinité (Saksela et *al*, 1995). En ce qui concerne Lck, aucune démonstration formelle d'une liaison stable et directe n'a été démontrée, du moins dans des conditions où Nef et Lck sont exprimés à des niveaux physiologiques. Par contre, plusieurs travaux ont rapporté que Nef module l'activité kinase de Lck (Collette et *al*, 1996; Greenway et *al*, 1996; 1999), ce qui suggère que cette modulation pourrait s'effectuer par l'entremise d'une liaison transitoire ou indirecte, donc sans la nécessité d'une liaison entre Nef et Lck. Nous avons utilisé un modèle murin du SIDA généré par notre groupe (**Figure 9, p.46**) (Hanna et *al*, 1998), le CD4C/HIV^{Nef}, pour étudier l'implication de Lck sur les anomalies retrouvées au niveau des lymphocytes T en présence de Nef. Ces souris transgéniques expriment Nef sous le contrôle d'un promoteur CD4 humain permettant ainsi l'expression dans les cellules immunitaires qui sont les cibles du VIH-1 chez l'humain : les lymphocytes CD4⁺ immatures et matures, les macrophages et les cellules dendritiques. Fait intéressant, ces souris développent une sévère maladie semblable au SIDA qui s'apparente de très près à celle retrouvée chez l'humain étant infecté au VIH-1 (Hanna et *al*, 1998; 2009). En particulier, les souris montrent une déplétion des cellules CD4⁺ périphériques, processus associé à leur activation et apoptose. Également, on observe une déplétion des cellules DP CD4⁺ CD8⁺ et SP CD4⁺ CD8⁻. Nous avons trouvé que cette déplétion des cellules SP CD4⁺ CD8⁻ résulte d'une baisse de sélection positive et d'un dysfonctionnement

au niveau de l'engagement du lymphocyte à générer un lymphocyte CD4⁺ (Hanna et *al*, 1998; 2009). Le processus de sélection positive ainsi que le destin de la cellule à générer une cellule CD4⁺ ou CD8⁺ dépend largement de l'intensité et de la durée du signal par la voie du TcR, processus médié en grande partie par l'activité kinase de Lck et son habileté à lier la queue cytoplasmique du corécepteur CD4 (Singer et *al*, 2008). Sachant que la baisse d'expression du corécepteur CD4 à la surface par Nef peut influencer le destin de Lck, la question est maintenant de comprendre comment Nef peut moduler, au niveau moléculaire, la Src kinase Lck.

HYPOTHÈSE

Nef altère la fonction de Lck en diminuant son accumulation à proximité du TcR.

OBJECTIFS

L'objectif primaire de ce mémoire sera d'évaluer l'impact de Nef sur la régulation de Lck. Spécifiquement, nous chercherons à déterminer si Nef affecte le niveau d'expression, l'activité kinase ainsi que la localisation de Lck dans les thymocytes en absence et suite à diverses conditions de stimulation. Également, nous aborderons de près la fonctionnalité d'une étape cruciale à la signalisation par le TcR médiée par Lck, soit la phosphorylation de son substrat en aval, la kinase Zap-70. Un autre objectif aura pour but de mesurer l'impact de Nef sur la phosphorylation en tyrosine à la synapse immunologique, premiers évènements de la signalisation par le TcR qui sont impliqués dans le processus d'activation cellulaire. Finalement, nous étudierons au niveau moléculaire, l'effet de l'expression de la forme constitutivement active de Lck Y505F sur la transduction du signal par la voie du TcR dans les thymocytes Lck Y505F/Nef⁺.

CHAPITRE 5 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

5.1 MATÉRIELS

Souris

Les souris transgéniques CD4C/HIV^{MutG} sont désignées dans ce mémoire comme les souris CD4C/HIV^{Nef} (Hanna et *al*, 1998). Ces souris transgéniques CD4C/HIV^{Nef} ont été croisées sur un background C3H non-Tg (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN). Les souris transgéniques Lck Y505F (lignée A16924), exprimant la forme constitutivement active de Lck Y505F, ont été obtenues du Dr. P.José Alberola-Ila (Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, OK). Le génotypage des souris transgéniques s'est effectué par la réaction en chaîne par polymérase (PCR) suite à l'utilisation d'oligonucléotides spécifiques aux différents transgènes. Les souris sont maintenues à l'animalerie dans des conditions stériles, exemptes de pathogènes suivant le guide établi par le «Canadian Council on Animal Care» et a été approuvé par le comité de la protection des animaux de l'IRCM.

Anticorps et réactifs

Les anticorps monoclonaux α -CD4 PE (Cederlane's) et α -CD8 FITC (Cederlane's) ont été utilisés pour la **cytométrie en flux**.

Pour l'**immunofluorescence en microscopie confocale**, les anticorps suivants ont été utilisés : l'anticorps monoclonal α -Lck clone 3A5 (Santa Cruz biotechnology), un sérum polyclonal de lapin α -Lck (cadeau de Dominique Davidson Ph.D), α -c-Cbl clone 7G10 (Upstate Biotechnology), l'anticorps monoclonal α -p-Y clone 4G10 fabriqué au laboratoire. La sous-unité B de la toxine du choléra conjuguée à la biotine (Molecular Probes) a servi au marquage du GM1 qui représente la fraction associée aux microdomaines membranaires.

La fraction GM1 a été révélée avec la streptavidine couplée au Alexa 488. Les anticorps secondaires utilisés pour la révélation des différents marquages sont les suivants : IgG α -souris (H+L) couplé au Alexa 555, Ig α -lapin couplé au Alexa 488 et IgG α -lapin (H+L) couplé au Alexa 633. Finalement, le réactif 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, Ca) a été utilisé pour marquer les noyaux des thymocytes.

Les anticorps monoclonaux α -CD3 ϵ couplés à la biotine (clone 145-2C11), α -CD4 couplé à la biotine (clone GK1.5 de BD Biosciences) et la streptavidine (Zymed San Francisco, CA, États-Unis) ont été utilisés pour la **stimulation *in vitro* des thymocytes**.

L'inhibiteur de la famille des Src kinases PP2 est provenu de chez Calbiochem (San Diego, CA, États-Unis).

Pour l'immunobuvardage, les anticorps suivants ont été utilisés : α -Lck clone 3A5 (Santa Cruz biotechnology), α -p-Src Y416 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), α -p-Zap-70 Y292 (Invitrogen), α -p-Zap-70 Y319 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), α -p-Zap-70 Y493 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), α -Zap-70 clone 99F2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), α -p-Y clone 4G10, α -LAT (Upstate Biotechnology), α -Cbl clone 7G10 (Upstate Biotechnology), α -p-Lck Y505 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), α -Nef clone NF2-B2 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program). Les anticorps α -Actine (Sigma-Aldrich) et α -GAPDH clone 6C5 (Abcam, Cambridge, MA) ont été utilisés pour les contrôles internes de chargement des protéines. Les anticorps secondaires IgG α -mouse (H+L) couplé au Alexa 680 et IgG α -rabbit (H+L) couplé au Alexa 680 ont servi à la révélation effectuée à l'aide du Scanner de fluorescence infrarouge Odyssey LI-COR.

Pour l'essai kinase *in vitro* (**IVKA**) de Lck, les anticorps α -Lck 3A5 (Santa Cruz biotechnology) et le sérum polyclonal de lapin α -Lck (cadeau de Dominique Davidson Ph.D) ont été utilisés pour l'immunoprécipitation et l'immunobuvardage respectivement.

Quant à l'essai kinase *in vitro* (**IVKA**) de **Zap-70**, l'immunoprécipitation s'est effectuée avec un sérum polyclonal α -lapin (cadeau de Dominique Davidson Ph.D) et l'immunobuvardage avec un α -Zap-70 clone 99F2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Le gamma-ATP radioactif ^{32}P est provenu de chez Perkin-Elmer.

Finalement, les anticorps α -Lck clone 3A5 (Santa Cruz biotechnology), le sérum de lapin α -Zap-70 (cadeau de Dominique Davidson Ph.D), α -Cbl clone 7G10 (Upstate Biotechnology), α -p-Lck Y505 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) ont été utilisés pour les différentes **immunoprécipitations**.

5.2 MÉTHODES

Analyse en cytométrie en flux

Les thymocytes ont été placés dans une plaque de 96 puits à une quantité de $0,5 \times 10^6$ /puits. La suspension de thymocytes a ensuite été centrifugée pendant 3 minutes à 1000 rpm utilisant le «Thermo FA-MICRO Fixed Angle Rotor» (94,9 g) et lavée une fois dans 200 μl de tampon de FACS (PBS + 2% FCS + 0,01% NaN_3). Les thymocytes ont été incubés dans 200 μl de tampon de blocage (PBS + 20% FCS + 0,02% NaN_3) pendant 30 minutes à 4 $^{\circ}\text{C}$. Après centrifugation, les anticorps α -CD4 PE et α -CD8 FITC ont été ajoutés dans un volume de 100 μl à une concentration de 1/50 et l'incubation avec les thymocytes s'est effectuée pendant 30 minutes à 4 $^{\circ}\text{C}$. Les cellules ont été lavées une fois dans le tampon de FACS, resuspendues dans 200 μl de tampon de FACS/puits et finalement placées dans des microtubes pour FACS (Bio-Rad, numéro de catalogue 223-9391) contenant préalablement 200 μl de tampon de FACS, pour un volume final de 400 μl . L'acquisition en cytométrie en flux a ensuite été effectuée pour les marquages des corécepteurs CD4 et CD8. L'acquisition des données s'est effectuée avec le cytomètre en flux «FACSCalibur»

(BD Biosciences, San Jose, CA) et leur analyse avec le logiciel «CellQuest» (Becton Dickinson).

Traitement des thymocytes avec l'inhibiteur PP2

Les thymocytes fraîchement recueillis ont été placés dans un petri Falcon 50 mm à une concentration de 5×10^6 cellules/ml dans un milieu RPMI contenant 5% de sérum foetal de bovin. Les thymocytes ont été préchauffés à 37°C pendant 10 minutes et ensuite traités ou non avec 10 μ M de PP2 dilué dans le DMSO à une concentration finale de 0,1% (v/v). Les thymocytes ont ensuite été placés dans un incubateur où l'atmosphère est humidifiée avec une concentration de 5% en dioxyde de carbone (CO₂) à 37°C pendant 1 heure 30 minutes. Suite à la période d'incubation, les thymocytes ont été recueillis pour en analyser leur profil de phosphorylation en tyrosine par immunobuvardage de type western.

Stimulation des thymocytes *in vitro*

Les thymocytes ont été placés dans un eppendorf à une concentration de 50×10^6 cellules/ml dans un milieu RPMI contenant 5% de sérum fœtal bovin. Les cellules ont ensuite été incubées sur glace avec les anticorps anti-CD3 ϵ biotine (clone 145-2C11) et anti-CD4 biotine (clone GK1.5) à une concentration de 10 μ g/ml pendant 10 minutes. Suite à la période d'incubation, les thymocytes ont été centrifugés à 2500 rpm utilisant le «Thermo FA-MICRO Fixed Angle Rotor» (592,9 g) pendant 5 minutes à 4°C pour ensuite être lavés dans une solution de PBS 1X à 4°C. Pour la stimulation, une solution de RPMI contenant 5% de sérum foetal bovin à une concentration de 20 μ g/ml en streptavidine a été préchauffée à 37°C pendant 10 minutes. Finalement, la stimulation s'est effectuée à une concentration de 50×10^6 cellules/ml dans la solution de streptavidine pendant 5 minutes à 37°C. Suite à la période d'incubation, les thymocytes ont été placés sur glace durant 5

minutes pour arrêter la stimulation et ensuite centrifugés à 2500 rpm utilisant le «Thermo FA-MICRO Fixed Angle Rotor» (592,9 g) pendant 5 minutes à 4⁰C. Les thymocytes ont ensuite été lysés et leur contenu analysé par immunobuvardage de type western.

Lyse cellulaire et dosage des protéines

Suite aux différents traitements, les thymocytes ont été lavés une fois dans une solution de PBS 1X à 4⁰C. Ensuite, les cellules ont été lysées 15 minutes sur glace dans un tampon MLB (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 1% triton, 2mM EDTA) contenant 4 mM d'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄), de 10 mM de fluorure de sodium (NaF), 1 mM de phénylméthylsulfonil (PMSF) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les lysats cellulaires ont été clarifiés de débris suite à une centrifugation de 12 000 rpm utilisant le «Thermo FA-MICRO Fixed Angle Rotor» (13 624 g) pendant 10 minutes. Ensuite, 2 µl de chaque échantillon ont été prélevés pour ensuite doser leur contenu en protéines par la méthode de micro-BCA de Pierce (Rockford, IL, États-Unis).

Immunoprécipitation

Suite à la lyse cellulaire, les lysats de protéines ont été incubés avec l'anticorps indiqué à la concentration mentionnée pendant 2 heures sous rotation à 4⁰C. Suite à la période d'incubation, les lysats de protéines et l'anticorps ont été incubés avec 50 µl de protéine A Sépharose (1 :1) préalablement lavée deux fois dans le «mild lysis buffer» (MLB) pendant 30 minutes à 4⁰C sous rotation. Suite à la période d'incubation, le complexe contenant les billes de protéine A Sépharose, l'anticorps et la protéine cible, a été centrifugé à 1000 rpm utilisant le «Thermo FA-MICRO Fixed Angle Rotor» (94,9 g) pendant 10 secondes et lavé 3X dans le tampon MLB à 4⁰C.

Essai kinase *in vitro* (IVKA)

Suite à l'immunoprécipitation, le complexe, contenant les billes de protéine A Sépharose, l'anticorps et la protéine cible, a été centrifugé à 1000 rpm utilisant le «Thermo FA-MICRO Fixed Angle Rotor» (94,9 g) pendant 10 secondes et lavé 1X dans le tampon «kinase extraction buffer» (KEB) (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 0,5% triton, 2mM EDTA) à 4⁰C. Ensuite, le complexe a été lavé 2X avec le «kinase activation buffer» (KAB) (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM NaCl, 0,5% triton, 10 mM MgCl₂) à 4⁰C et centrifugé à 1000 rpm utilisant le «Thermo FA-MICRO Fixed Angle Rotor» (94,9 g) pendant 10 secondes. Le surnageant a été retiré et 25 µl de KAB ont été ajoutés au complexe avant de démarrer l'essai kinase *in vitro*. Par la suite, 24 µl/réaction d'un mélange contenant 6 µl de gamma ³²P pour 100 µl de KAB ont été ajoutés aux 25 µl du complexe préalablement sur glace. La réaction s'est effectuée pendant 6 minutes 30 secondes à température pièce et s'est arrêtée en mettant le mélange sur glace pendant 1 minute. L'immunoprécipitat a été centrifugé à 1000 rpm utilisant le «Thermo FA-MICRO Fixed Angle Rotor» (94,9 g) pendant 10 secondes et lavé 1 fois avec le KEB 1X.

Immunofluorescence en microscopie confocale

Les thymocytes fraîchement recueillis ont été placés dans un eppendorf à une concentration de 1x10⁶ cellules/ml dans une solution de PBS 2% FBSI. Les thymocytes ont ensuite été stimulés ou non (voir protocole stimulation) et par la suite lavés deux fois dans le PBS 1X. Les thymocytes ont ensuite été fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes à la température pièce. Après l'étape de la fixation, les thymocytes ont été centrifugés à 2500 rpm utilisant le «Thermo FA-MICRO Fixed Angle Rotor» (592,9 g) pendant 5 minutes et ont été lavés 2 fois dans le PBS 1X. Les cellules ont été placées dans une solution de PBS 0,5% BSA et le compte cellulaire a été fait de façon à avoir 50 000 cellules par condition. Les thymocytes ont été mis sur une lame par la technique du

cytopot qui s'est effectuée à 300 rpm utilisant le «Shandon Cytospin 2» pendant 5 minutes. Les cellules ont été perméabilisées dans une solution de PBS 0,1% Triton-X-100 pendant 6 minutes. Deux lavages successifs ont été effectués dans le PBS 1X et les sites non-spécifiques ont été bloqués dans une solution de PBS 5% BSA pendant 1 heure 30 minutes. Les thymocytes ont ensuite été incubés avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de PBS 2,5% BSA pendant 1 heure 30 minutes. L'excès d'anticorps a été enlevé suite à 3 lavages successifs de 5 minutes dans le PBS. Ensuite, les thymocytes ont été incubés avec l'anticorps secondaire dilué dans une solution de PBS 2,5% BSA pendant 1 heure. Finalement, les cellules ont été lavées 3 fois dans une solution de PBS pendant 5 minutes et 30 µl de DAPI ont été ajoutés sur les thymocytes pour visualiser les noyaux lors de l'acquisition des résultats au microscope confocale.

Purification des microdomaines membranaires

Solubilisation des membranes cellulaires par le détergent à 37⁰C : 150x10⁶ de thymocytes ont été recueillis et lavés deux fois dans une solution de PBS froid (4⁰C) et ont ensuite été resuspendus dans 1 ml de tampon de lyse (50 mM HEPES, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2mM d'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄) 10 mM de fluorure de sodium (NaF), 1 mM de phénylméthylsulfonil (PMSF) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases) sans détergent. La suspension de thymocytes a été préincubée pendant 5 minutes à 37⁰C et 100 µl d'une solution mère de Brij 98 10% dans 20 mM HEPES, pH 7.4, ont ensuite été ajoutés pour apporter la concentration de Brij 98 finale à 1%. Après 5 minutes de solubilisation à 37⁰C, le lysat cellulaire a été mixé avec un volume égal de 80% sucrose et transféré dans un tube à ultracentrifugation Sorvall. Par la suite, 2 ml de 30% sucrose et 1 ml de 5% sucrose dans le tampon de lyse 1X sans détergent ont été rajoutés par-dessus pour un volume total de 5 ml. Toutes les solutions de sucrose ont été préparées dans le tampon de lyse 1X sans détergent en présence de 2 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF et le cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 18-20

heures à 40 000 rpm dans une ultracentrifugeuse utilisant le rotor SW 55Ti (194 432 g) à 4°C. Suite à l'ultracentrifugation, neuf fractions de 0,5 ml ont été récoltées du haut vers le bas du gradient.

Electrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage de type western

Suite au dosage des protéines par micro-BCA de Pierce, 50 µg de protéines ont été mélangés avec le tampon d'électrophorèse (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycérol, 2% SDS, 5% β-mercaptoéthanol et 0,00625% bleu de bromophénol) puis chauffées à 100°C pendant 5 minutes. Après la préparation des échantillons, ces derniers ont été déposés sur gel de polyacrylamide selon la méthode de Laemmli (1970). Les gels de séparation contenaient 9% (p/v) d'acrylamide, 0,400 M de tampon Tris-HCl à pH 8.8, 0,1% (v/v) de SDS, 0,1% de persulfate d'ammonium et 0,8 µl/ml de N,N,N',N-tétraméthylènediamine (TEMED). Les gels d'entassement contenaient 3,9% (p/v) d'acrylamide, 0,060 M de Tris-HCl pH 6.8, 0,1% (v/v) de SDS, 16% sucrose, 0,1% APS et 0,8 µl/ml de TEMED. La migration des protéines s'est effectuée à 100 volts pendant environ 30 minutes jusqu'à ce que les protéines aient entré dans le gel de séparation et par la suite s'est poursuivie à 130 volts pendant environ 1 heure 30 minutes jusqu'à ce que le bleu de bromophénol (front de migration) soit sorti du gel. Suite à l'électrophorèse SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène (PVDF) d'une porosité de 0,45 µm préalablement trempée dans le méthanol. Les transferts ont été effectués à 25 volts pendant 16 heures dans un tampon de transfert (10 mM Tris, 96 mM glycine, et 15% méthanol). Le lendemain, les membranes ont été incubées pendant 1 heure 30 minutes dans une solution TBS contenant 5% en albumine de sérum bovin (BSA).

Immunodétection des protéines

Suite au blocage des sites de liaisons non-spécifiques par le BSA, les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires dilués dans un tampon TBS contenant 0,1% Tween-20 et 2,5% BSA pendant 2 heures à la température pièce. Les membranes ont ensuite subi trois lavages successifs de 8 minutes dans un tampon TBS contenant 0,1% Tween et ont été incubées pendant 1 heure avec les anticorps secondaires couplés au fluorochrome Alexa 680 dilués dans un tampon TBS contenant 0,1% Tween-20 et 2,5% BSA. Finalement, les membranes ont subi deux lavages successifs de 8 minutes avec un tampon TBS contenant 0,1% Tween-20 et un lavage avec un tampon TBS sans Tween-20 pendant 8 minutes.

Analyses statistiques

Le révélement des protéines immunodéfectées a été réalisé à l'aide du scanner de fluorescence infrarouge Odyssey LI-COR. L'analyse quantitative s'est effectuée avec le logiciel Odyssey et les ratios ont été normalisés avec la β -actine, utilisée comme contrôle interne de chargement. Les analyses statistiques se sont effectuées à l'aide du logiciel «GraphPad Prism», où le «paired two-tailed Student t test » a été effectué pour comparer la représentabilité d'un groupe avec le groupe témoin. Les résultats dont l'analyse statistique a été effectuée sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes (n=3) et les données sont présentées comme étant la moyenne \pm l'écart-type. Les différences significatives sont indiquées sur les figures et ont une valeur de *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

CHAPITRE 6 : RÉSULTATS

Nef bloque la transition des thymocytes DP vers les thymocytes CD4⁺ SP, phénotype sauvé par la faible expression de la forme constitutivement active de Lck Y505F

L'expression de Nef dans le thymus a considérablement provoqué une baisse d'expression du corécepteur CD4 de surface dans les thymocytes DP et CD4⁺ SP. Nef a également causée une forte déplétion du nombre de thymocytes DP (donnée non-montrée), mais le pourcentage de génération de ces cellules est similaire à celui des thymocytes Nef- (**Figure 10, p.76**). Par contre, nous avons observé un blocage sévère au niveau de la génération des cellules CD4⁺ SP, où seulement 3% ont été générées dans le thymus comparativement à 7% dans les thymocytes contrôles Nef- (**Figure 10, p.76**). Bien que l'expression de la forme constitutivement active de Lck Y505F a permis la transition des thymocytes DP vers CD4⁺ SP, la présence de Nef en simultanée avec la forme active de Lck n'a eu aucun effet négatif à ce niveau, où un ratio de 44% de cellules CD4⁺ SP a été observé dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+ comparativement à 42% dans les thymocytes Lck Y505F. Ce sauvetage a également été réalisé malgré la persistance de Nef à induire la baisse de la régulation du corécepteur CD4 (**Figure 10, p.76**). Nous avons également noté que Nef favorise la transition des thymocytes DP vers CD8⁺ SP et que cet effet est amplifié dans les thymocytes LckY505F/Nef+, où cette population s'élève à 10% comparativement à 2% dans les thymocytes LckY505F (**Figure 10, p.76**). Ces données suggèrent que la signalisation CD4/Lck est altérée dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}.

Altération de la cinétique d'activation de Lck dans les thymocytes transgéniques CD4C/HIV^{Nef}

Puisque la faible expression de la forme constitutivement active de Lck a permis le sauvetage de la transition des thymocytes DP vers CD4⁺ SP et ce, même en présence de Nef, nous avons donc émis l'hypothèse que le seuil d'activité généré par l'entremise de Lck n'est pas atteint dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Pour faire suite, nous nous sommes donc attardés à l'étude de sa régulation et de sa cinétique en présence de Nef. Dans un premier temps, nous avons observé que les thymocytes Nef⁺ expriment environ 1,3 fois de Lck ($p < 0,05$) que les thymocytes Nef⁻ (**Figure 11B, p.78**). Ajouté cette hausse d'expression, les niveaux de Lck sont demeurés inchangés suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 de 10 minutes, comparativement aux thymocytes Nef⁻, où une baisse d'environ 50 % de la quantité initiale de Lck a été observée dans ces conditions (**Figure 11B, p.78**). Cette cinétique s'est également effectuée sur les niveaux de la forme active de Lck phosphorylée en tyrosine 394 (détecté avec un α -p-Src Y416), où nous avons observé une augmentation d'approximativement deux fois à l'état constitutif (**Figure 11A, p.77**). Étrangement, la stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 n'a permis aucune modification du profil de phosphorylation de Lck en tyrosine 394. Les niveaux de la forme active de Lck sont demeurés stables tout au long de la stimulation comparativement aux thymocytes Nef⁻, où nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de Lck en tyrosine 394 après une minute, qui par la suite s'est consommée graduellement au cours de la cinétique de 10 minutes (**Figure 11A, p.77**). Pour résumer, le ratio p-Lck Y394/Lck détecté dans les thymocytes Nef⁺ est augmenté d'approximativement 1,5 fois à l'état non-stimulé, pour finalement être inférieur d'environ 40% par rapport au contrôle suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 de 10 minutes (**Figure 11C, p.79**). Les résultats suggèrent que le mécanisme d'activation de Lck est altéré suite à l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes Nef⁺.

Nef active Lck dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}

L'activation de Lck est principalement associée à sa capacité de lier la queue cytoplasmique du corécepteur CD4, gérant ainsi sa distribution à la synapse immunologique et donc son accumulation à proximité du TcR (Artyomov et *al*, 2010). Bien que la liaison d'un anticorps monoclonal α -CD4 sur le corécepteur n'ait eu d'effet notable sur la phosphorylation de Lck en tyrosine 394 (**Figure 11A, p.77**), l'activité catalytique de Lck demeure difficilement prévisible. Nef pourrait, par l'entremise d'un mécanisme direct ou indirect, moduler son activité catalytique sans nécessairement modifier son profil de phosphorylation. Certaines études ont d'ailleurs démontré le potentiel de Nef à moduler le comportement des Src kinases dont Lck (Briese et *al*, 2005; Collette et *al*, 1997; Haller et *al*, 2010; Suzu et *al*, 2005). Pour cette raison, nous avons décidé de pousser davantage l'étude de la régulation de Lck dans les thymocytes primaires en évaluant son activité catalytique par un essai kinase *in vitro*. Cette technique permet de déterminer l'efficacité d'autophosphorylation de l'enzyme associée à son activité. Nous avons trouvé que Nef a considérablement haussé l'activité catalytique de Lck dans les thymocytes à l'état non-stimulé. Toutefois, la stimulation par un α -CD3 ϵ , un α -CD4 ou un α -CD3 ϵ + α -CD4 simultanément n'a permis aucune augmentation subséquente de l'activité catalytique, contrairement aux thymocytes Nef-, où Lck s'est pleinement activée sur l'engagement du corécepteur CD4 (**Figure 12, p.80**). Quant à l'efficacité de Lck à phosphoryler ses substrats, un candidat de taille moléculaire d'environ 85 kDa a constitutivement été co-immunoprécipité avec Lck dans les thymocytes Nef+ dont nous n'avons pas révélé l'identité jusqu'à présent. Par contre, malgré l'inefficacité du corécepteur CD4 à contribuer à l'activation de Lck, nous avons trouvé suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4, une augmentation de la phosphorylation d'un substrat d'un poids moléculaire d'environ 21 kDa, pensé pour être la chaîne zêta du TcR. Cependant, la phosphorylation des substrats de poids moléculaires apparents de 70 kDa et 120 kDa, probablement Zap-70 et c-Cbl respectivement (Ashe et *al*, 1999), a considérablement été diminuée par rapport au contrôle

dans ces conditions (**Figure 12, p.80**). Les résultats ont indiqué un dysfonctionnement de la cinétique d'activation de Lck et de la phosphorylation de ses substrats.

Accumulation de Lck dans les thymocytes Nef+

Malgré la hausse de l'activité catalytique dans les thymocytes Nef+ à l'état non-stimulé, la faible réponse émise suite une stimulation par un α -CD4 laisse croire que Lck est peu disponible pour lier le corécepteur CD4 et que, par conséquent, sa localisation pourrait être altérée. Nous avons donc décidé d'étudier par immunofluorescence en microscopie confocale : la localisation de Lck. Suite à l'analyse individuelle des thymocytes Nef+ (n=20) et Nef- (n=20) sur trois expériences indépendantes (n=3), nous avons observé une importante accumulation de Lck dans les thymocytes Nef+, visualisée par la formation d'agrégats dans environ 65% des cellules analysées. Cette accumulation a d'ailleurs été observée à un endroit spécifique, plus précisément dans une section située à proximité du pôle de la cellule (**Figure 13A, p.81**). Nous avons également remarqué que la taille de l'agrégat dans cette section était inversement proportionnelle à la quantité de Lck retrouvée dans la tranche située à l'équateur de la cellule (**Figure 13B, p.81**). Cette distribution a vraiment été frappante puisque dans les thymocytes Nef-, la localisation de Lck s'est disposée de façon beaucoup plus uniforme à travers les différentes sections de la cellule. (**Figures 13A-B, p.81**).

Nef modifie le profil de phosphorylation en tyrosine de c-Cbl

La délocalisation et l'altération de l'activation de Lck pourraient, sans contredit, influencer la phosphorylation de c-Cbl, principal régulateur négatif qui dépend de l'activité catalytique de Lck (Lupher et *al*, 1999). Afin d'en évaluer son potentiel, nous avons, suite à une immunoprécipitation de c-Cbl, quantifié les niveaux de sa phosphorylation en tyrosine. Les résultats ont indiqué que Nef induit de façon constitutive l'hyperphosphorylation de c-

Cbl par approximativement deux fois dans les thymocytes à l'état non-stimulé (**Figure 14, p.82**). Suite à une stimulation α -CD3 ϵ + α -CD4, le niveau de phosphorylation s'est considérablement accentué, mais n'a toutefois atteint qu'environ 70% de celle mesurée dans les thymocytes Nef⁻ dans ces conditions (**Figure 14, p.82**). Le profil de phosphorylation de c-Cbl suggère que Nef pourrait, par l'intermédiaire de Lck, induire l'hyperphosphorylation constitutive de c-Cbl sans toutefois contribuer aux événements de phosphorylation suite à l'engagement du TcR/CD4. Quoi qu'il en soit, les niveaux de phosphorylation de c-Cbl en tyrosine retrouvés dans les thymocytes Nef⁺ ne peuvent expliquer l'échec de la dégradation de Lck.

Nef réduit la colocalisation entre Lck et c-Cbl

Bien qu'une étude plus spécifique du profil de phosphorylation de c-Cbl soit requise, nous avons cherché à établir un lien entre l'accumulation de Lck (**Figure 11B, p.78**) et la colocalisation entre ces deux protéines. Par immunofluorescence en microscopie confocale, nous avons marqué à l'aide d'anticorps spécifiques les deux candidats, Lck et c-Cbl, pour ensuite en analyser leur distribution dans la cellule. À cause de la distribution non-uniforme de Lck dans les thymocytes Nef⁺, deux tranches représentatives des niveaux de Lck dans la cellule ont été analysées, soit la tranche correspondant à l'équateur de la cellule ainsi que celle située à proximité du pôle.

L'analyse de la tranche située à l'équateur de la cellule nous a permis d'observer une colocalisation entre Lck et c-Cbl dans les thymocytes Nef⁺ comparable à celle dans les thymocytes Nef⁻. La différence marquée s'est observée suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4, où nous n'avons pas observé de hausse notable de la colocalisation entre c-Cbl et Lck comparativement aux thymocytes Nef⁻ (**Figure 15A, p.83**). Quant à l'analyse de la tranche située à proximité du pôle de la cellule, où une importante fraction de Lck est localisée, nous n'avons pas observé une forte colocalisation entre Lck et c-Cbl et cela

autant dans les thymocytes à l'état non-stimulé que suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 (**Figure 15B, p.84**). Toutefois, cette observation s'est répercutée dans les thymocytes Nef- puisqu'une plus faible fraction de Lck se localisait dans cette région (**Figure 15B, p.82**). Les résultats suggèrent donc que l'accumulation de Lck pourrait être en partie reliée à sa faible colocalisation avec c-Cbl suite à l'engagement du TcR/CD4.

La signalisation par le TcR est toujours dépendante de Lck dans les thymocytes Nef+

Afin de déterminer le niveau de contribution de Lck dans la signalisation par la voie du TcR, nous avons évalué l'effet de son inhibition sur la phosphorylation des substrats en tyrosine. Pour ce faire, nous avons utilisé le PP2, un inhibiteur spécifique de l'activité kinase de Lck. Tel qu'attendu, l'utilisation standard de 10 μ M de PP2 a permis, autant dans les thymocytes Nef- que Nef+, l'inhibition de la phosphorylation de Lck dans les thymocytes à l'état non-stimulé ainsi que suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 (**Figure 16, p.85**). Également, l'inhibition de son activité catalytique a provoqué, dans les deux cas, l'abolition presque complète de la phosphorylation en tyrosine de tous les substrats en aval (**Figure 16, p.85**). Ces résultats confirment que, malgré sa délocalisation, Lck est toujours requis pour initier la signalisation par la voie du TcR.

Malgré sa délocalisation, Lck conserve une certaine habileté à phosphoryler Zap-70

Dû à sa délocalisation, nous pensions que Lck pouvait phosphoryler ses substrats de façon aberrante. Bien que la phosphorylation en tyrosine d'un large éventail de substrats soit toujours dépendante de l'activité kinase de Lck, nous avons mesuré son efficacité à phosphoryler son premier substrat en aval : la tyrosine kinase Zap-70. Suite à

l'immunoprécipitation de Zap-70, nous avons trouvé dans les thymocytes non-stimulés, un profil de phosphorylation augmenté d'approximativement deux fois comparativement aux thymocytes Nef-. Cet écart s'est également maintenu suite à la stimulation par un α -CD3 ϵ (**Figure 17, p.86**). Tel qu'attendu, nous n'avons pas détecté d'augmentation subséquente de la phosphorylation suite à une stimulation par un α -CD4 (**Figure 17, p.86**), en accord avec la baisse d'expression du corécepteur CD4 et son implication dans le processus d'activation de Lck. Toutefois, la stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 a permis une amplification de la phosphorylation qui a atteint un rendement d'environ 70% la phosphorylation détectée dans les thymocytes Nef- dans ces mêmes conditions (**Figure 17, p.86**). Les résultats suggèrent que Lck a conservé son habileté à phosphoryler Zap-70 et qu'une fraction de Lck liée au corécepteur CD4 contribue à l'augmentation subséquente de la phosphorylation dans des conditions de stimulation.

Nef prévient l'activation de Zap-70 par Lck

Généralement, l'augmentation de la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine suite à l'engagement TcR/CD4 est étroitement liée à l'augmentation de son activité catalytique, mécanisme Lck-dépendant (Gelkop et *al*, 2005; Pelosi et *al*, 1999). Toutefois, malgré l'activation constitutive de Lck rapportée dans les thymocytes Nef⁺, aucune augmentation de l'activité catalytique de Zap-70 n'a été détectée et cette dernière est similaire à celle mesurée dans les thymocytes Nef- (**Figure 19A, p.90**). Étrangement, et ce malgré l'augmentation de la phosphorylation suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ , l'activité catalytique de Zap-70 est demeurée stable et le rendement a été d'environ 10% inférieur à celui obtenu dans les thymocytes Nef- dans ces mêmes conditions (**Figure 19A, p.90**). Contre toute attente, cette baisse de rendement s'est davantage amplifiée suite à l'engagement du TcR/CD4, où l'activité kinase de Zap-70 n'a atteint que 28% celle mesurée dans les thymocytes Nef- (**Figure 19A, p.90**). Les résultats indiquent que l'augmentation de la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine n'est pas proportionnelle à son

activité, ce qui suggère que Nef altère la phosphorylation de un ou plusieurs sites critiques impliqués dans la régulation de son activité kinase.

Nef modifie la spécificité de Lck envers la phosphorylation de Zap-70

Plusieurs sites de phosphorylation de Zap-70 ont été identifiés comme étant critiques dans la régulation de son activité catalytique, les mieux caractérisés étant les tyrosines 292, 319 et 493 (Kong et *al*, 1996). Puisque Nef prévient l'activation de Zap-70 suite à l'engagement du TcR/CD4 et ce, malgré l'augmentation de la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine, nous avons émis l'hypothèse que Nef puisse modifier la spécificité de la phosphorylation Zap-70 sur un ou plusieurs sites. Suite à cette hypothèse, nous avons donc quantifié les niveaux de phosphorylation des trois différents sites énumérés précédemment : les tyrosines 292, 319 et 493.

Dans un premier temps, nous avons étudié le profil de phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 292 puisque ce site de phosphorylation est connu pour son implication dans l'atténuation de l'activité kinase de Zap-70, spécifiquement en servant de site de recrutement pour c-Cbl (Magnan et *al*, 2001). Consistant avec l'augmentation de l'activité kinase de Lck dans les thymocytes Nef⁺, les résultats issus de de l'immunobuvardage ont révélé une hausse significative ($p < 0,01$) de la phosphorylation d'approximativement 2 fois dans les thymocytes Nef⁺, qui d'ailleurs s'est maintenue suite à la stimulation par un α -CD3 ϵ (**Figure 18A, p.87**). Bien que la stimulation par un α -CD4 n'ait influencé la phosphorylation sur ce site, la stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 a considérablement contribué à l'augmentation subséquente de la phosphorylation. Les niveaux détectés ont été comparables à ceux obtenus dans les thymocytes Nef⁻, la faible différence n'étant pas significative ($p > 0,05$) (**Figure 18A, p.87**). Les résultats n'ont pas indiqué que la prévention de l'activation de Zap-70 par Nef était la conséquence d'une hyperphosphorylation sur le site d'inhibition en tyrosine 292.

Dans un second temps, nous avons analysé le site de phosphorylation en tyrosine 319. Ce site de phosphorylation est localisé dans le domaine régulateur de Zap-70 qui devient rapidement phosphorylé suite à l'engagement du TcR/CD4, et permet la levée d'un mécanisme d'autoinhibition favorisant l'activité catalytique (Di Bartolo *et al*, 1999). Dans le même sens que la phosphorylation en tyrosine 292, nous avons observé une augmentation de la phosphorylation constitutive en tyrosine 319 d'approximativement deux fois. La réponse a également été accompagnée d'une augmentation soutenue suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ (**Figure 18B, p.88**). Étonnamment, le niveau de phosphorylation suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 a significativement surpassé ($p < 0,05$) le niveau de phosphorylation mesuré dans les thymocytes Nef- (**Figure 18B, p.88**). Néanmoins, les résultats suggèrent que Nef favorise la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 319 par Lck, ce qui normalement, devrait contribuer à l'augmentation subséquente de son activité catalytique.

Finalement, nous avons analysé le niveau de phosphorylation en tyrosine 493, située dans la loupe d'activation du domaine catalytique de Zap-70. La phosphorylation sur ce site par Lck permet la stabilisation de la conformation ouverte de la loupe d'activation pour que l'enzyme soit complètement active (Chan *et al*, 1995). Comme pour la phosphorylation sur les tyrosines 292 et 319, nous avons détecté une augmentation de la phosphorylation constitutive d'approximativement deux fois. Par contre, aucune augmentation significative n'a été détectée ($p > 0,05$) suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ (**Figure 18C, 89**). Ce résultat démontre bien une altération de la phosphorylation en tyrosine 493 puisqu'une augmentation d'environ deux fois a été observée dans les thymocytes Nef- dans ces conditions (**Figure 18C, p.89**). Sous des conditions plus physiologiques, la stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4, n'a pas été en mesure de corriger cette altération, ne procurant qu'un faible rendement de 40% la phosphorylation mesurée dans les thymocytes Nef-, la différence étant très significative ($p < 0,001$) (**Figure 18C, p.89**).

Les résultats ont confirmé que Nef affecte la spécificité de Lck envers la phosphorylation de Zap-70, dans un premier temps, en augmentant la phosphorylation sur la tyrosine 319 et deuxièmement en diminuant considérablement la phosphorylation en tyrosine 493. Ce mécanisme pourrait être en partie responsable de la prévention de l'activation de Zap-70 par Lck dans les thymocytes Nef⁺.

Blocage de la signalisation en aval de Zap-70 dans les thymocytes Nef⁺

Puisque l'activation de Zap-70 par Lck est cruciale à la phosphorylation des substrats en aval, la prévention de l'activation de Zap-70 dans les thymocytes Nef⁺ devrait inhiber ou, du moins, considérablement diminuer la phosphorylation en tyrosine subséquente. Pour démontrer cette hypothèse, nous avons isolé par co-immunoprécipitation le complexe contenant Zap-70 pour en analyser la teneur en protéines phosphorylées en tyrosine. Puisque l'activation complète de Zap-70 requiert l'engagement du TcR et du corécepteur CD4, nous avons donc évalué son efficacité à phosphoryler ses substrats dans ces conditions. En accord avec notre hypothèse, nous avons démontré un blocage de la phosphorylation de plusieurs substrats de Zap-70 dans le complexe isolé des thymocytes Nef⁺. Bien que le même éventail de substrats de tailles moléculaires comprises entre 75 et 120 kDa ait co-immunoprécipité avec Zap-70, le niveau de phosphorylation s'est avéré beaucoup plus faible comparativement à celui détecté dans les thymocytes Nef⁻ (**Figure 19B, p.91**). Également, la co-immunoprécipitation de Zap-70 n'a permis de détecter qu'un faible niveau de phosphorylation pour p56, préalablement identifié comme étant Lck, suggérant que Lck n'a pas co-immunoprécipité avec Zap-70. Nous pensons que Nef pourrait diminuer la stabilité du complexe, puisque comme démontré précédemment, Lck semble toujours en mesure d'interagir et de phosphoryler Zap-70 (**Figures 18A-B-C, p.87-88-89**).

Puisque la co-immunoprécipitation ne permet d'évaluer directement le potentiel de Zap-70 à phosphoryler ses substrats, en outre pour des raisons de stabilité du complexe dans nos conditions de lyse, nous avons analysé la phosphorylation des substrats à partir de lysats totaux de thymocytes. Nous avons donc mesuré la phosphorylation de quatre candidats potentiels en aval de Zap-70 : p37, p76, p95 et p120. Également, nous avons analysé le candidat à p70 (**Figures 20A-B, p.92-93**) dont le profil de phosphorylation a correspondu à celui obtenu pour la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine démontré précédemment (**Figures 17, p.86**). Pour les quatre autres candidats, les analyses d'immunobuvardage ont indiqué une hausse de la phosphorylation constitutive pour chacun d'entre eux. Par contre, suite à la stimulation par un α -CD3 ϵ , nous avons démontré une hausse considérable de la phosphorylation que pour p37 et p120, aucune augmentation notable n'a été observée pour les candidats p76 et p95 (**Figures 20A-B, p.92-93**). Tel qu'attendu, la stimulation par un α -CD4 n'a eu aucun effet notable pour tous les candidats. Finalement, suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4, seuls les mêmes candidats qui ont répondu à la stimulation par un α -CD3 ϵ , soit p37 et p120, ont montré une hausse subséquente de la phosphorylation. Les profils de phosphorylation de p76 et p95 sont demeurés relativement stables. Ces résultats suggèrent que Nef induit l'activation constitutive tout en prévenant l'hyperactivation de certains substrats suite à l'engagement du TcR/CD4.

Altération de la phosphorylation en tyrosine dans les microdomaines membranaires des thymocytes CD4C/HIV^{Nef}

Considérant que la phosphorylation associée aux microdomaines membranaires est largement dépendante de l'activité tyrosine kinase de Lck et de Zap-70, nous avons étudié le contenu en protéines phosphotyrosines à cet endroit. Pour ce faire, deux approches ont été utilisées : l'immunofluorescence en microscopie confocale et l'approche biochimique par purification sur gradient de sucrose. Consistant avec la forte activité kinase de Lck

détectée dans les thymocytes Nef⁺, nous avons démontré à l'aide de ces deux techniques, un contenu plus élevé de protéines phosphorylées en tyrosine dans les microdomaines membranaires (**Figures 21A-B, p.94-95**) et ce, spécifiquement pour les candidats p37 et p56, probablement LAT et Lck respectivement (**Figure 21B, p.95**). Allant dans le même sens que les données présentées dans les lysats totaux (**Figures 20A-B, p.92-93**), nous n'avons pas observé, à l'exception de p37 (**Figure 21B, p.95**), de hausse significative de la colocalisation des protéines phosphotyrosines dans les microdomaines membranaires suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 (**Figures 21A-B, p.94-95**). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que Nef prévient l'hyperactivation de Zap-70 suite à l'engagement du TcR/CD4. Finalement, nous avons démontré un enrichissement de Lck en plus d'une petite fraction de Nef se localisant dans les microdomaines membranaires (**Figure 22, p.96**), ce qui pourrait en partie expliquer l'activation constitutive de la signalisation par le TcR où Nef agirait en tant que catalyseur (**Figure 20A p.92**). Finalement, le candidat à p37 a été identifié comme étant LAT mais sa localisation dans les microdomaines membranaires n'a pas semblé être modifiée par la présence de Nef (**Figure 22, p.94**).

Nef induit l'hyperactivation de Lck dans les thymocytes Lck Y505F/Nef⁺

Nous avons démontré précédemment que Nef pouvait activer Lck sans toutefois permettre l'hyperactivation suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 (**Figure 12, p.80**). Nous pensons que ce niveau intermédiaire d'activité de Lck et, par conséquent, de la signalisation par le TcR est insuffisant et résulte du blocage de la transition des cellules DP vers CD4⁺ SP dans les thymocytes Nef⁺ (**Figure 10, p.76**). Nous nous attendions donc à sauver ce phénotype en augmentant l'activité catalytique de Lck. Nous avons donc utilisé un modèle de souris doubles transgéniques exprimant à la fois Nef et la forme constitutivement active de Lck Y505F pour en étudier les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans le sauvetage de la transition des cellules DP vers CD4⁺ SP.

Les analyses effectuées dans les thymocytes simples transgéniques n'exprimant que la forme constitutivement active de Lck Y505F ont démontré un profil de phosphorylation de Lck en tyrosine 394 comparable à celui obtenu dans les thymocytes Nef⁺ (**Figure 23A, p.97**). Toutefois, l'activité catalytique mesurée a légèrement été inférieure, suggérant un effet de Nef dans le processus d'activation de Lck indépendant du niveau de phosphorylation en tyrosine 394 (**Figure 23B, p.98**). Étonnamment, nous avons observé dans les thymocytes doubles transgéniques Lck Y505F/Nef⁺, une augmentation d'environ 30% la phosphorylation de Lck en tyrosine 394 accompagnée d'une impressionnante augmentation de l'activité catalytique par approximativement 2,5 fois par rapport aux thymocytes Nef⁺ (**Figures 23A-B, p.97-98**). Toutefois, l'expression seule de la forme active de Lck Y505F a eu un effet beaucoup moins prononcé, où une augmentation de la phosphorylation de Lck en tyrosine 394 d'environ 40% n'a permis qu'une hausse de l'activité kinase d'approximativement 1,6 fois par rapport au contrôle Nef⁻ (**Figures 23A-B, p.97-98**). Ces résultats ont confirmé que Nef agit positivement sur l'activité de Lck indépendamment de sa phosphorylation en tyrosine 394.

Nef favorise la forme moléculaire DPho-active Lck

Une étude a récemment démontré que l'activité kinase de Lck provenait majoritairement de deux formes moléculaires distinctes, soit la forme phosphorylée en tyrosine 394 et déphosphorylée en tyrosine 505 et la forme phosphorylée sur les deux sites simultanément, désigné comme étant la forme DPho-active Lck (Nika et *al*, 2010). Suite à cette découverte, nous voulions déterminer si Nef pouvait avoir une influence sur la génération des différentes formes moléculaires de Lck ainsi que sur leur activité kinase. Pour le déterminer, nous avons immunoprécipité la forme DPho-active Lck à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre le site de phosphorylation de Lck en tyrosine 505 dans des conditions non-dénaturantes. Cette stratégie nous a permis d'immunoprécipiter que

cette forme, puisque la forme moléculaire inactive phosphorylée qu'en tyrosine 505 est inaccessible à l'anticorps à cause du repliement du site phosphorylé sur son domaine SH2.

Les résultats ont indiqué, dans un premier temps, que Nef favorise la génération de la forme DPho-active Lck et qu'en plus, cette forme est active. Étrangement, la génération de cette forme moléculaire endogène a remarquablement été augmentée dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+, suggérant qu'en plus de l'effet positif de Nef, l'expression de la forme constitutivement active de Lck Y505F peut contribuer à la génération de cette forme (**Figure 24, p.99**). Toutefois, l'effet du transgène Lck Y505F seul n'a pas eu d'effet notable sur la génération de DPho-active Lck (**Figure 24, p.99**), suggérant que ce mécanisme est dans un premier temps Nef dépendant qui, par conséquent, peut être amplifié dans des conditions associées à l'hyperactivation de Lck.

La hausse de l'activité kinase de Lck dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+ corrèle avec la réduction des niveaux de c-Cbl

Nous avons démontré précédemment une hausse inattendue de l'activité kinase de Lck dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+ (**Figure 23B, p.98**). Considérant que c-Cbl est le principal régulateur de l'activité catalytique de Lck, nous nous attendions à ce que les niveaux de c-Cbl soient diminués dans ces conditions. Bien que nous ayons démontré que Nef induit l'hyperphosphorylation de c-Cbl (**Figure 14, p.82**), les niveaux de c-Cbl n'ont cependant pas été modifiés dans les thymocytes Nef+ (**Figure 25, p100**). Également, nous avons observé une légère diminution de la quantité de c-Cbl par l'expression de la forme active de Lck Y505F toutefois, la différence n'a pas été significative ($p > 0,05$) (**Figure 25, p.100**). De façon inattendue, les thymocytes doubles transgéniques Lck Y505F/Nef+ ont montré une chute drastique de la quantité de c-Cbl d'environ 50% comparativement aux thymocytes Nef+ (**Figure 25, p.100**), consistant avec la considérable hausse de l'activité

kinase de Lck. Ces résultats suggèrent une coopération entre Nef et la forme constitutivement active de Lck Y505F dans le processus de dégradation de c-Cbl.

La phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 493 est rétablie dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+

Nous avons démontré précédemment que malgré l'activité constitutive de Lck, Nef semblait affecter la spécificité de la phosphorylation de Zap-70 (**Figures 18A-B-C, p.87-88-89**), et ce particulièrement en tyrosine 493. Nous voulions donc vérifier si l'importante hausse de l'activité kinase de Lck mesurée dans les thymocytes LckY505F/Nef+ pouvait corriger les anomalies retrouvées dans les thymocytes Nef+ et rétablir l'activité kinase de Zap-70.

Suite aux analyses d'immunobuvardage, nous avons trouvé dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+, des augmentations de la phosphorylation d'approximativement 9 fois, 3 fois et 15 fois pour les tyrosines 292, 319 et 493 respectivement, comparativement aux thymocytes Nef+ (**Figures 26A-B-C, p.101-102-103**). Le sauvetage de la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 493 suggère que Lck a retrouvé sa capacité à activer Zap-70. Tel qu'attendu, l'activité kinase de Zap-70 a considérablement augmenté dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+ comparativement aux thymocytes Nef+ (**Figure 27, p.104**). Bien que le profil de phosphorylation de Zap-70 en tyrosine ne pouvait être associé à son activité catalytique dans les thymocytes Nef+ (**Figure 17, p.86; Figure 19A, p.90**), une étroite corrélation a été observée dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+ (**Figure 27, p.104; Figure 28, p.105**). Étrangement, nous avons observé pour une activité kinase de Lck similaire entre les thymocytes Nef+ et les thymocytes Lck Y505F, un rendement de 20% la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine dans les thymocytes Nef+ (**Figure 28, p.105**). Spécifiquement, l'analyse sur les trois différents sites spécifiques nous a permis de confirmer que seule la phosphorylation en tyrosine 319 était comparable, les niveaux de

phosphorylation en tyrosine 292 et 493 ont montré des rendements d'environ 30% et 23% respectivement comparativement à ceux obtenus dans les thymocytes Lck Y505F (**Figures 26A-B-C, p.101-102-103**).

Sauvetage de la signalisation en aval de Zap-70 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+

Suite au sauvetage de la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 493 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+, nous prévoyions une hausse de la phosphorylation en tyrosine des composantes de la voie du TcR. Tel qu'attendu, l'activité de Lck couplée à l'augmentation de l'activité catalytique de Zap-70 ont permis l'hyperactivation de tous les candidats et ce davantage pour p37, préalablement identifié comme LAT, et correspondant au premier substrat direct de Zap-70 (**Figure 29, p.106**). Toutefois, malgré l'activité catalytique de Lck similaire et une faible contribution de Zap-70 dans les thymocytes Nef+, le profil de phosphorylation en tyrosine dans les thymocytes Nef+ a été comparable à celui observé dans les thymocytes Lck Y505F (**Figure 29, p.106**). Ces résultats suggèrent que Nef contrôle la signalisation par le TcR et ce, principalement par l'entremise de Lck.

Figures associées aux résultats

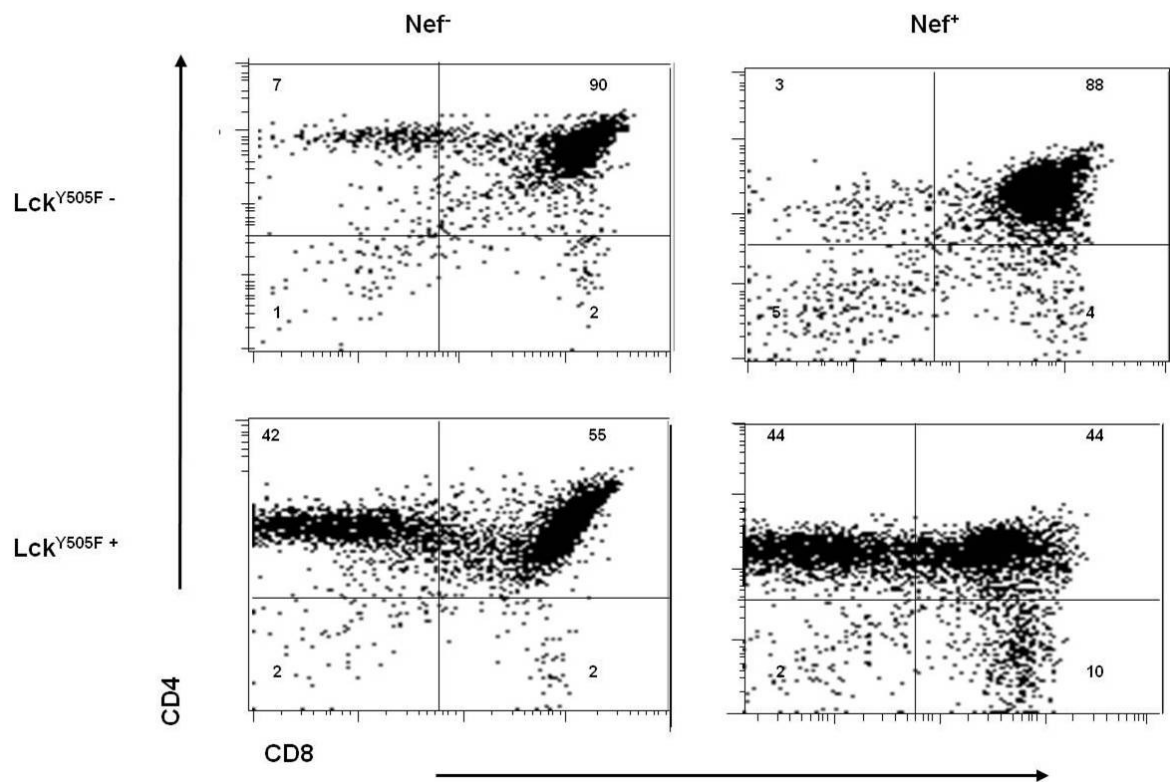


Figure 10 : Sauvetage de la génération des cellules CD4⁺ dans les thymocytes Lck Y505F/Nef⁺. Profil CD4/CD8 des thymocytes totaux CD4C/HIV^{Nef} et Lck Y505F/Nef⁺ avec leur contrôle respectif Nef⁻ sur des souris âgées de 4 à 6 semaines. La baisse de l'expression du corécepteur CD4 ainsi que la proportion de cellules CD4⁺ générées ont été comparées aux contrôles Nef⁻ respectifs. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3) qui ont donné des résultats similaires.

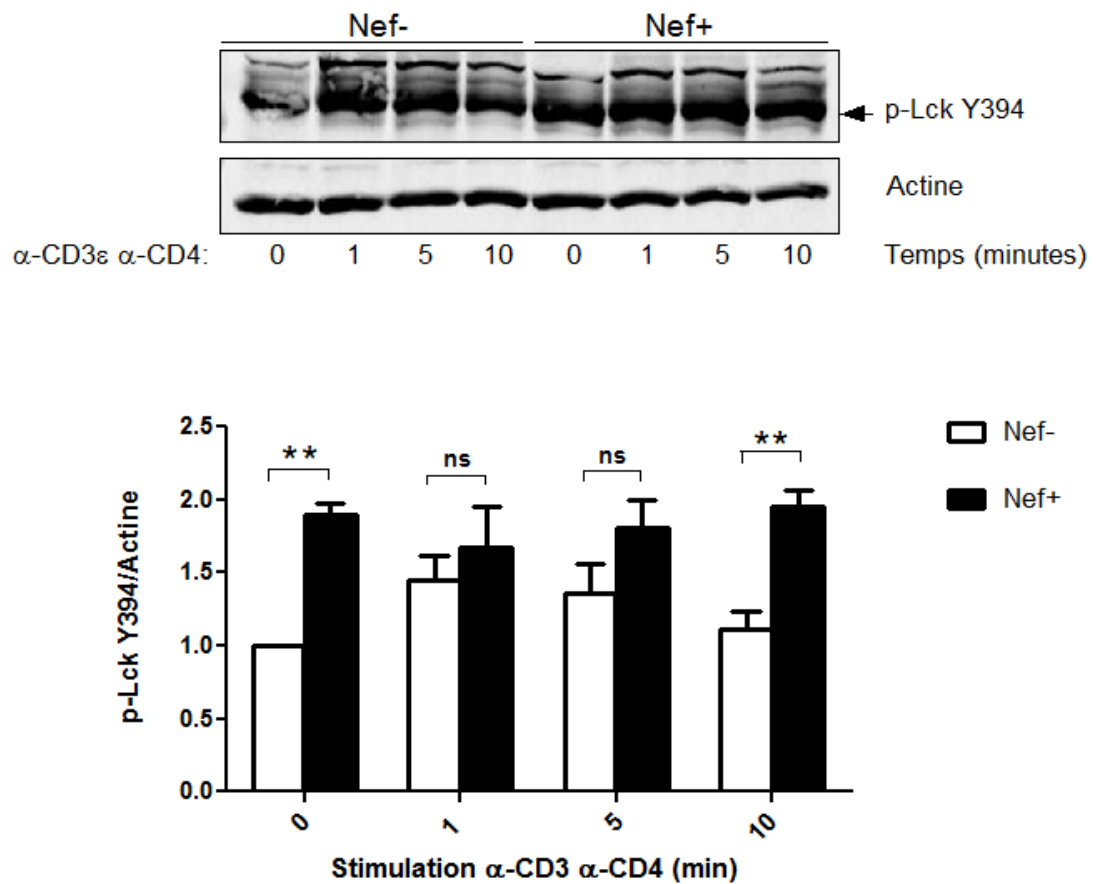


Figure 11A : Altération de la dégradation de la forme active Lck Y394 dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 suite à une cinétique de 0 à 10 minutes à 37⁰C. Les niveaux de la forme active de Lck Y394 dans le lysat cellulaire ont été déterminés avec un anticorps p-Src Y416 et le contrôle du chargement interne avec l'anticorps α -Actine. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

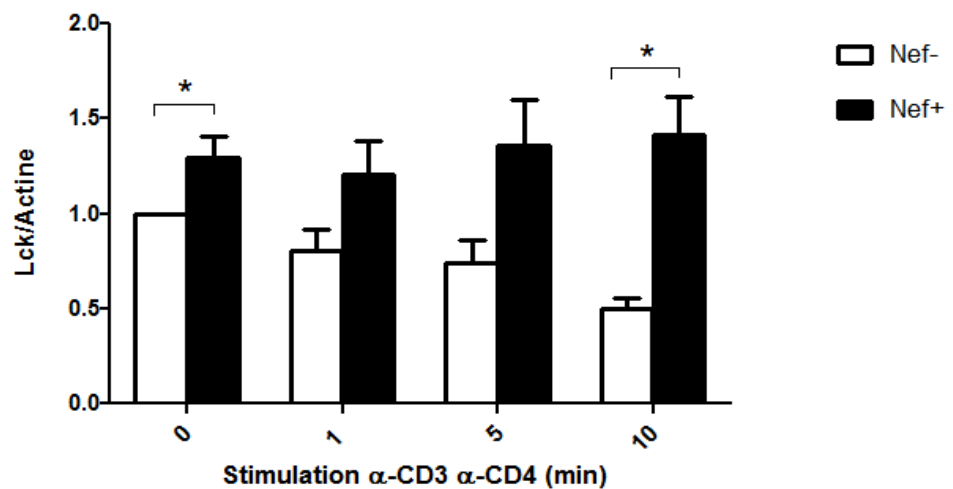
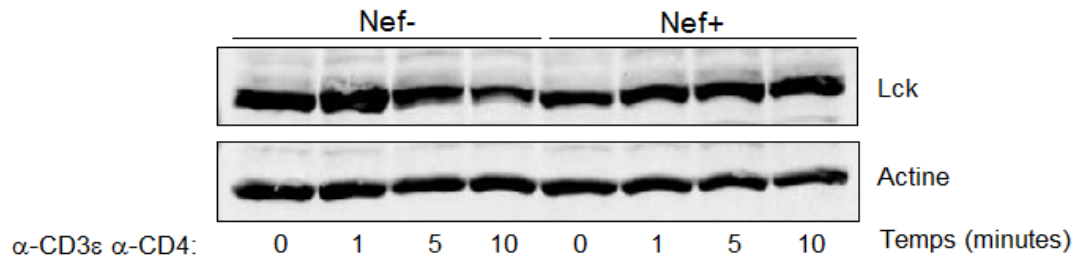


Figure 11B : Altération de la dégradation de Lck dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à une stimulation par un α-CD3ε + α-CD4 suite à une cinétique de 0 à 10 minutes à 37⁰C. Les niveaux de Lck dans le lysat cellulaire ont été déterminés avec un anticorps α-Lck (3A5) et le contrôle du chargement interne a été déterminé avec l'anticorps α-Actine. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

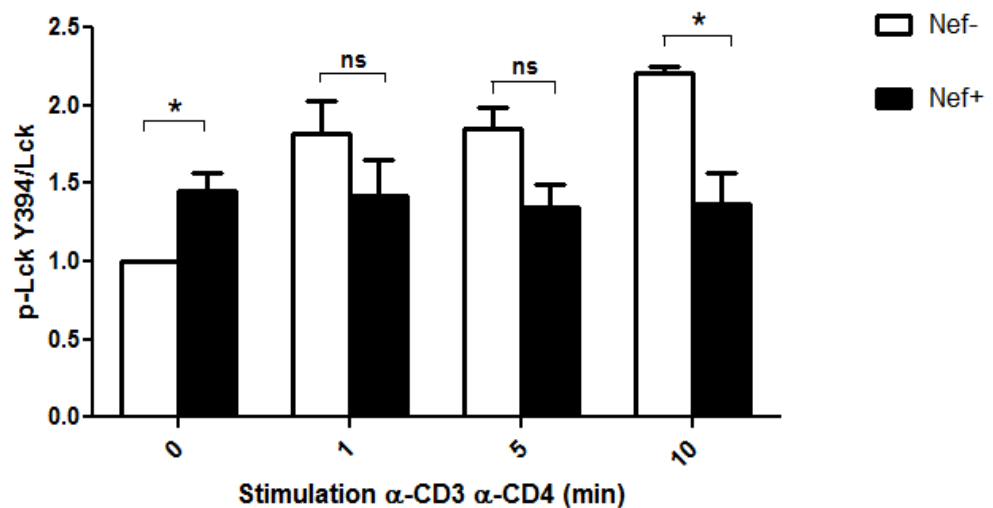
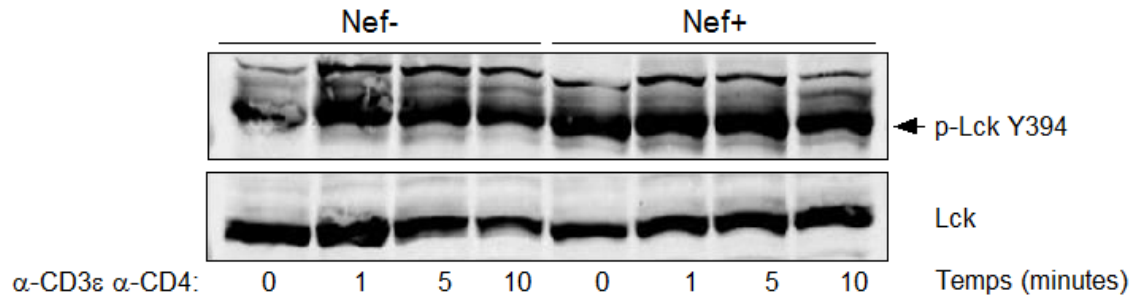


Figure 11C : Altération de la cinétique d'activation de Lck dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 suite une cinétique de 0 à 10 minutes à 37°C. Les niveaux de la forme active de Lck Y394 et de Lck total dans le lysat cellulaire ont été déterminés avec les anticorps p-Src Y416 et α -Lck (3A5) respectivement. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

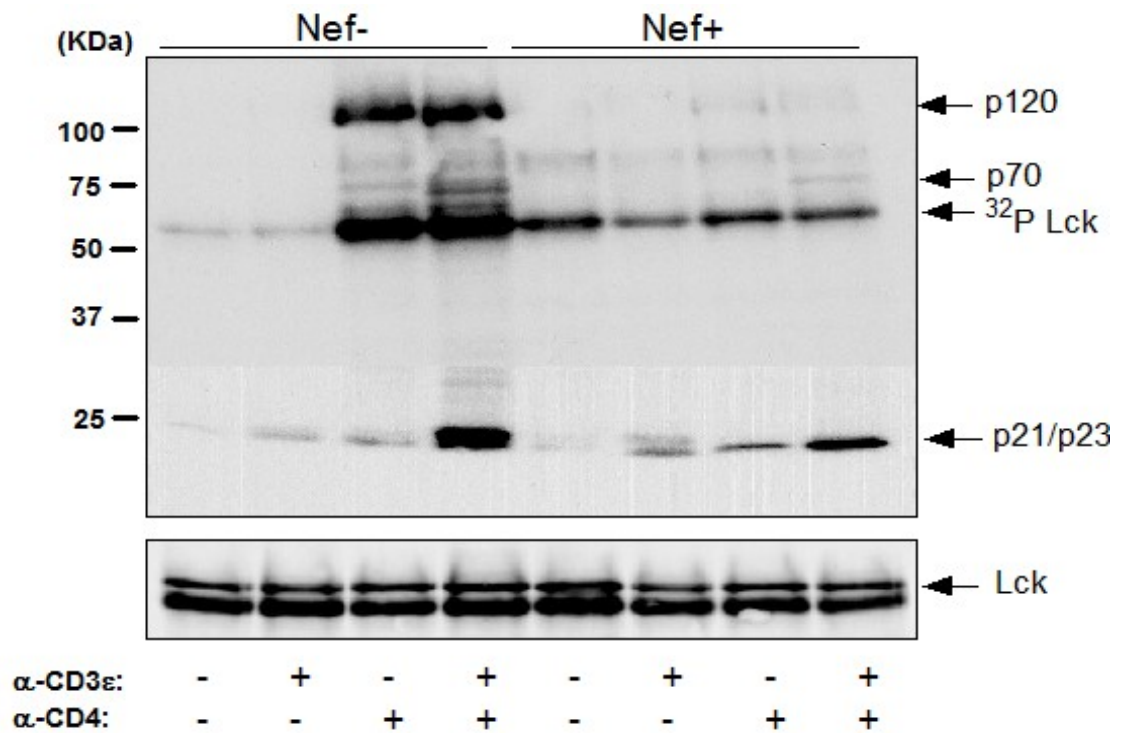


Figure 12 : Altération du mécanisme d'activation de Lck dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à différentes stimulations : α-CD3ε, α-CD4 et α-CD3ε + α-CD4 pendant 5 minutes à 37⁰C avant la préparation du lysat cellulaire. Une immunoprécipitation avec un α-Lck (3A5) a été effectuée et un essai kinase *in vitro* (IVKA) de l'immunoprécipitat a été réalisé à température pièce utilisant le gamma ATP radioactif marqué au ³²P. Les analyses ont été effectuées dans trois expériences indépendantes (n=3) qui ont donné des résultats similaires.

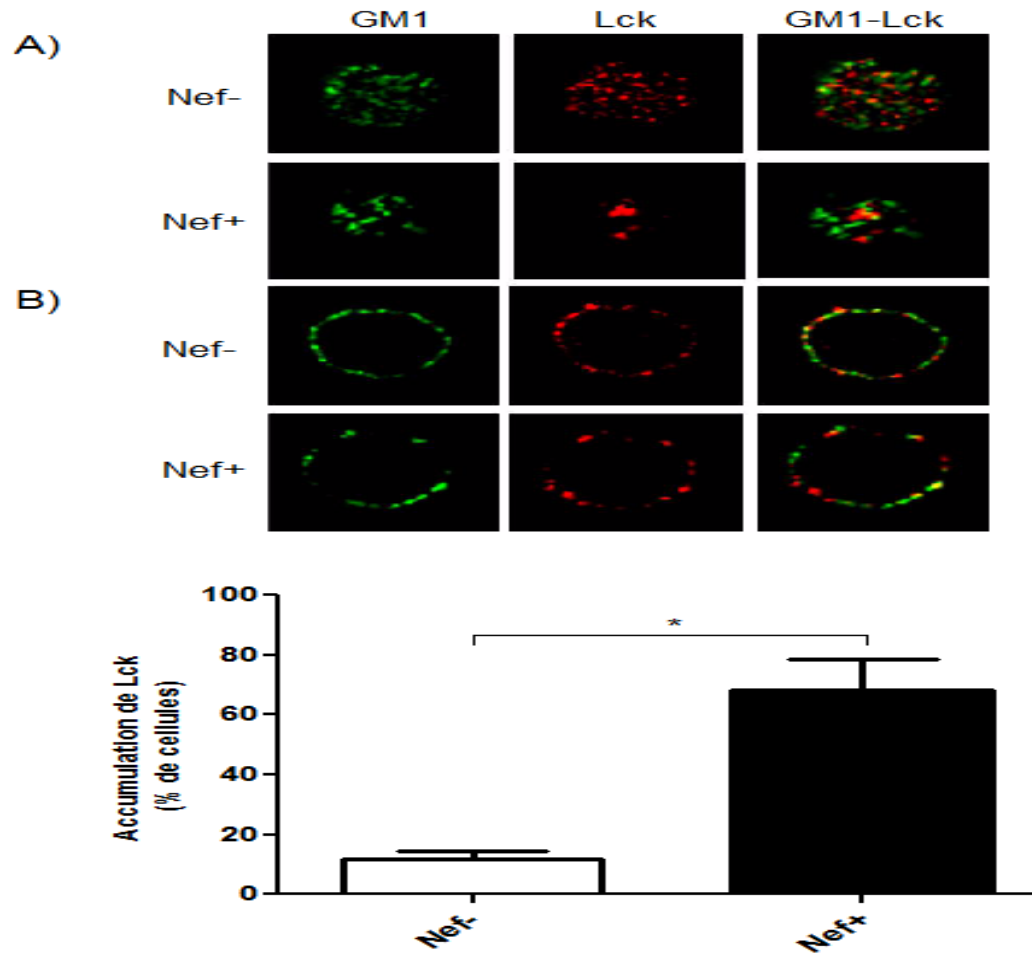


Figure 13 : Accumulation de Lck dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef⁻ et Nef⁺ ont été analysés par immunofluorescence en microscopie confocale, où la «Cholera Toxin Subunit B» a été utilisée pour marquer la fraction microdomaine membranaire (vert) et l'anticorps α -Lck (3A5) pour le marquage de Lck (rouge). Ces marquages ont été effectués dans une tranche située A) à proximité du pôle de la cellule et B) à l'équateur de la cellule. La délocalisation de Lck s'est quantifiée suite à l'observation de 20 cellules Nef⁻ et Nef⁺ (n=20) dans trois expériences indépendantes (n=3), où les résultats ont été exprimés selon le pourcentage de cellules qui ont montré une accumulation de Lck dans les thymocytes Nef⁺ supérieure à celle normalement retrouvée dans les thymocytes Nef⁻. Le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

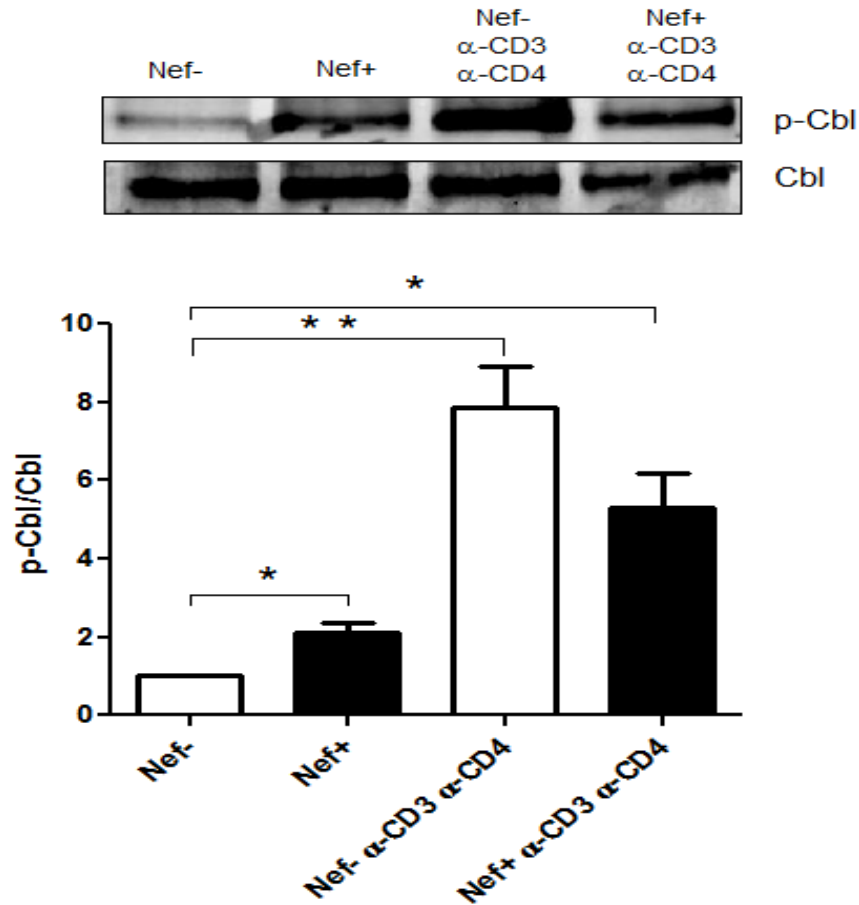


Figure 14 : Hyperphosphorylation de c-Cbl dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à une stimulation α -CD3e + α -CD4 de 5 minutes à 37⁰C avant la préparation du lysat cellulaire. Une immunoprécipitation avec l'anticorps α -c-Cbl (7G10) a été effectuée et la phosphorylation en tyrosine a été détectée suite à l'immunobuvardage avec l'anticorps α -p-Y (4G10). L'intensité de la phosphorylation a été reportée sur la quantité totale de c-Cbl dans l'immunoprécipitat déterminé suite à l'immunobuvardage avec l'anticorps α -c-Cbl (7G10). Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- à l'état non-stimulé s'est fait attribuer une valeur de 1. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

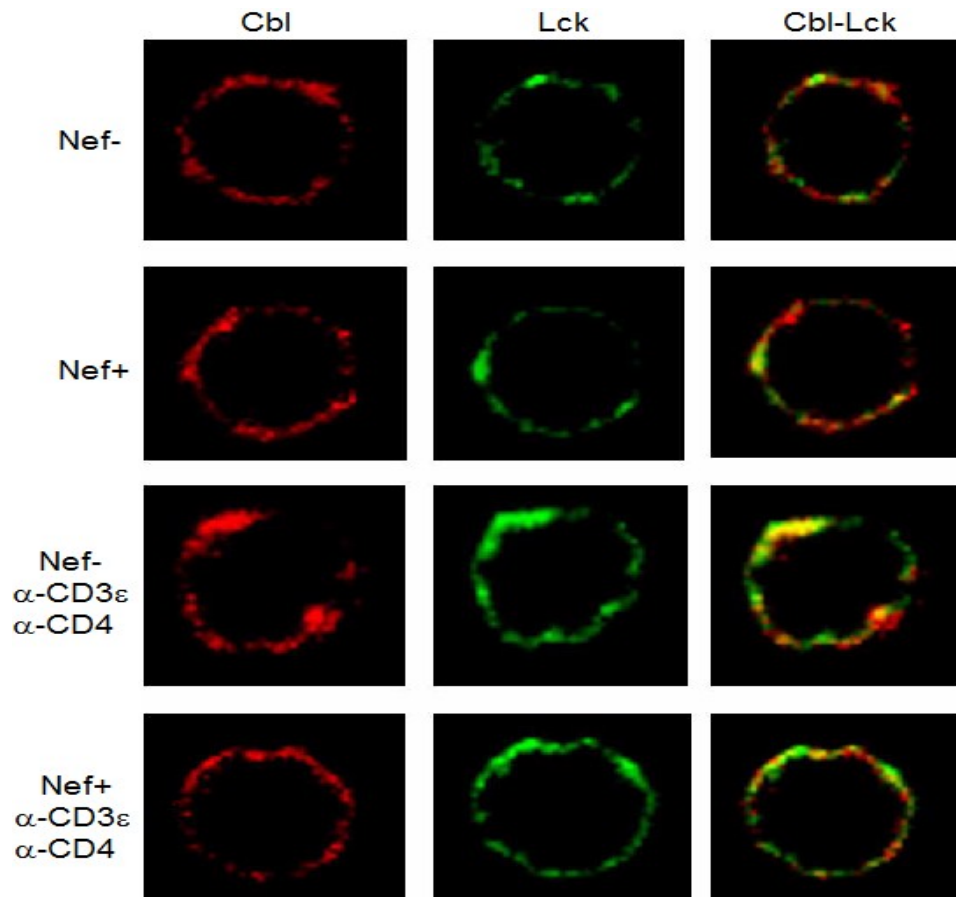


Figure 15A : Nef prévient la colocalisation entre Lck et c-Cbl sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 pendant 5 minutes à 37°C. L'immunofluorescence en microscopie confocale a ensuite été procédée où les marquages de c-Cbl (rouge) et Lck (vert) ont été effectués avec les anticorps α -c-Cbl (7G10) et un sérum polyclonal de lapin contenant l'anticorps α -Lck respectivement. L'analyse de 20 cellules (n=20) de la section située à l'équateur de la cellule a été représentative dans trois expériences indépendantes (n=3) qui ont donné des résultats similaires.

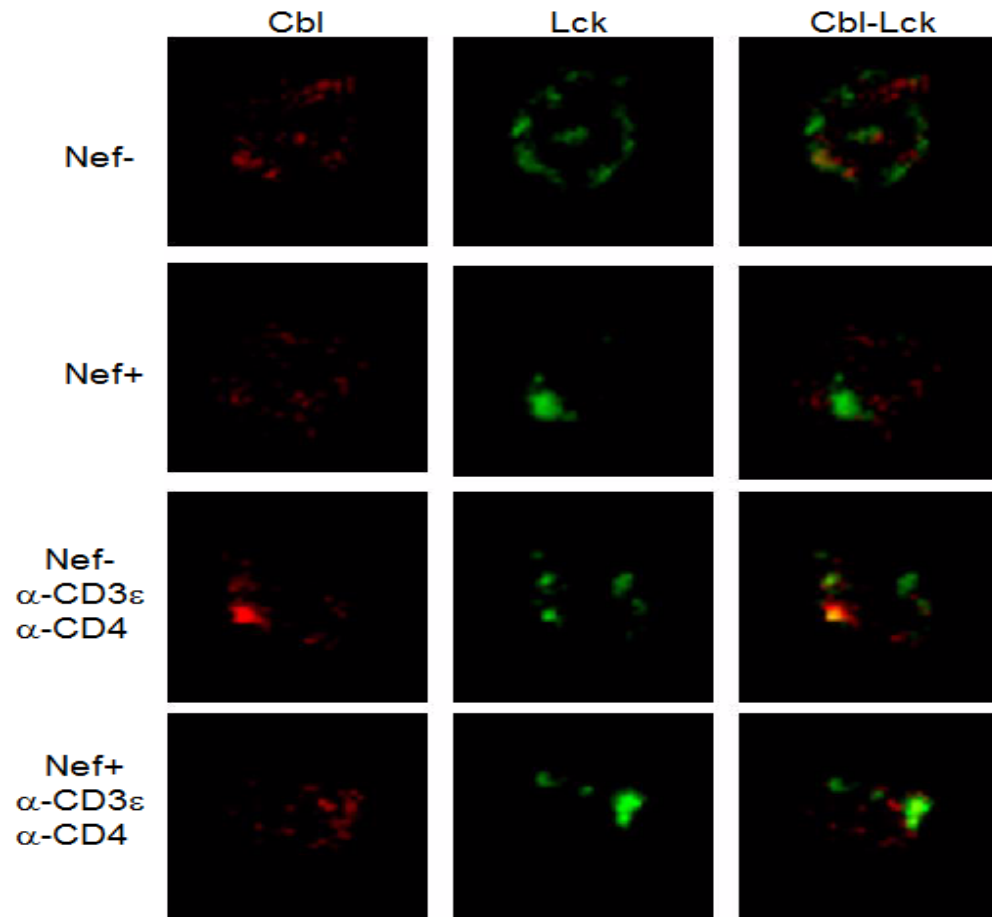


Figure 15B: Nef prévient la colocalisation entre Lck et c-Cbl sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à une stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 pendant 5 minutes à 37⁰C. L'immunofluorescence en microscopie confocale a ensuite été procédée où les marquages de c-Cbl (rouge) et Lck (vert) ont été effectués avec les anticorps α -c-Cbl (7G10) et un sérum polyclonal de lapin contenant l'anticorps α -Lck respectivement. L'analyse de 20 cellules (n=20) dans la section située à proximité du pôle de la cellule a été représentative dans trois expériences indépendantes (n=3) qui ont donné des résultats similaires.

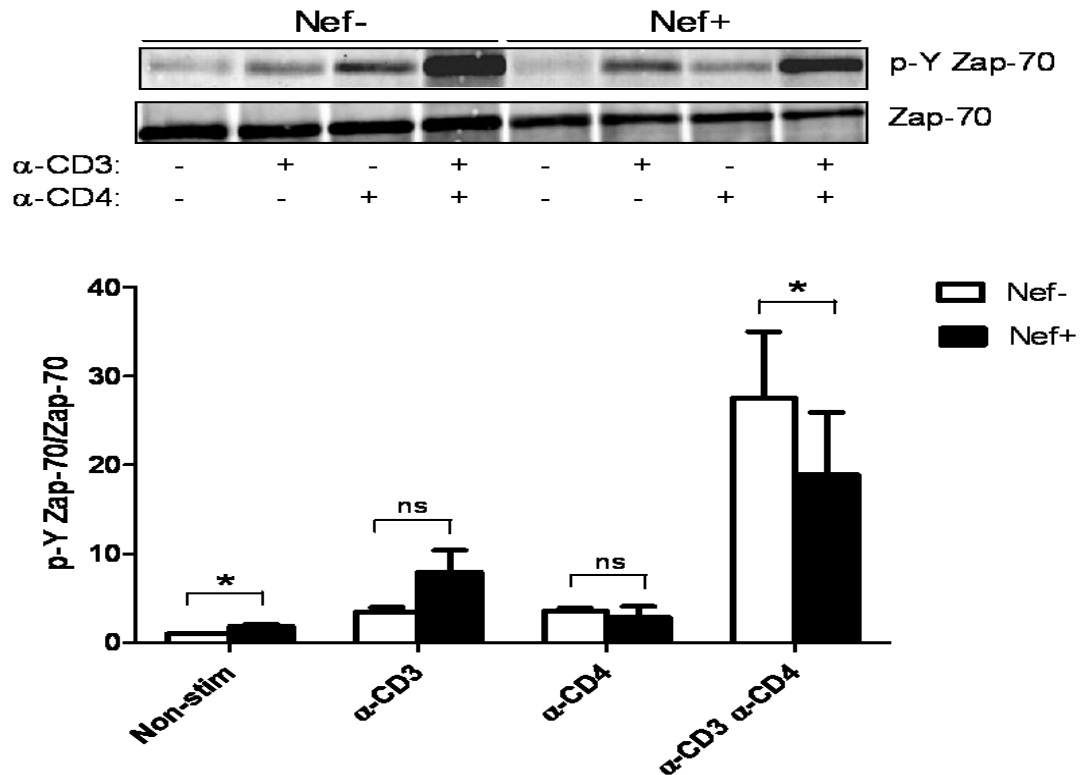


Figure 17 : La phosphorylation de Zap-70 est altérée sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à différentes stimulations : α -CD3 ϵ , α -CD4 et α -CD3 ϵ + α -CD4 pendant 5 minutes à 37⁰C avant la préparation du lysat cellulaire. Une immunoprécipitation avec le sérum polyclonal de lapin contenant l'anticorps α -Zap-70 a été effectuée et la phosphorylation en tyrosine a été détectée suite à l'immunobuvardage de type western avec l'anticorps α -p-Y (4G10). L'intensité de la phosphorylation a été reportée sur la quantité totale de Zap-70 dans l'immunoprécipitat déterminée avec l'anticorps α -Zap-70 (99F2). Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- à l'état non-stimulé s'est fait attribuer une valeur de 1. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

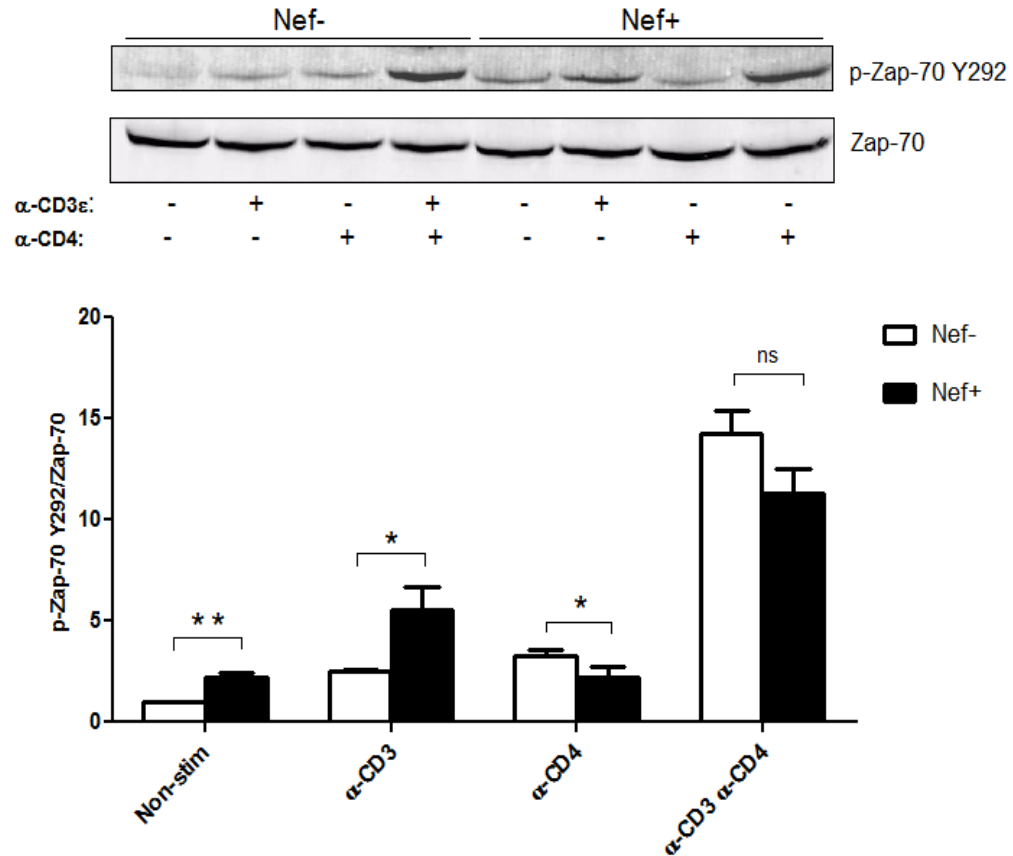


Figure 18A : Phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 292 comparable sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à différentes stimulations : α -CD3 ϵ , α -CD4 et α -CD3 ϵ + α -CD4 pendant 5 minutes à 37°C. Un immunobuvardage de type western a été effectué avec l'anticorps α -Zap-70 Y292 et l'intensité de la phosphorylation a été reportée sur la quantité totale de Zap-70 déterminée avec l'anticorps α -Zap-70 (99F2). Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- à l'état non-stimulé s'est fait attribuer une valeur de 1. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

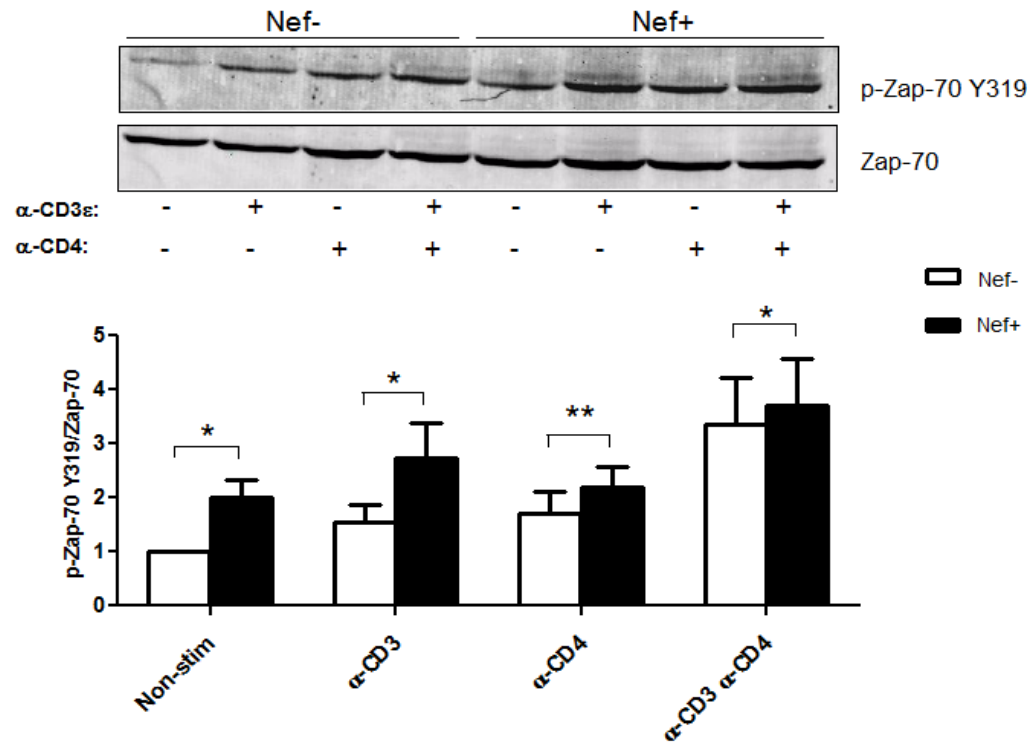


Figure 18B : Hyperphosphorylation de Zap-70 en tyrosine 319 sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes Nef- et Nef+ ont été isolés et soumis ou non à différentes stimulations : α -CD3 ϵ , α -CD4 et α -CD3 ϵ + α -CD4 pendant 5 minutes à 37⁰C. Un immunobuvardage de type western a été effectué avec l'anticorps α -Zap-70 Y319 et l'intensité de la phosphorylation a été reportée sur la quantité totale de Zap-70 déterminée avec un α -Zap-70 (99F2). Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- à l'état non-stimulé s'est fait attribuer une valeur de 1. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

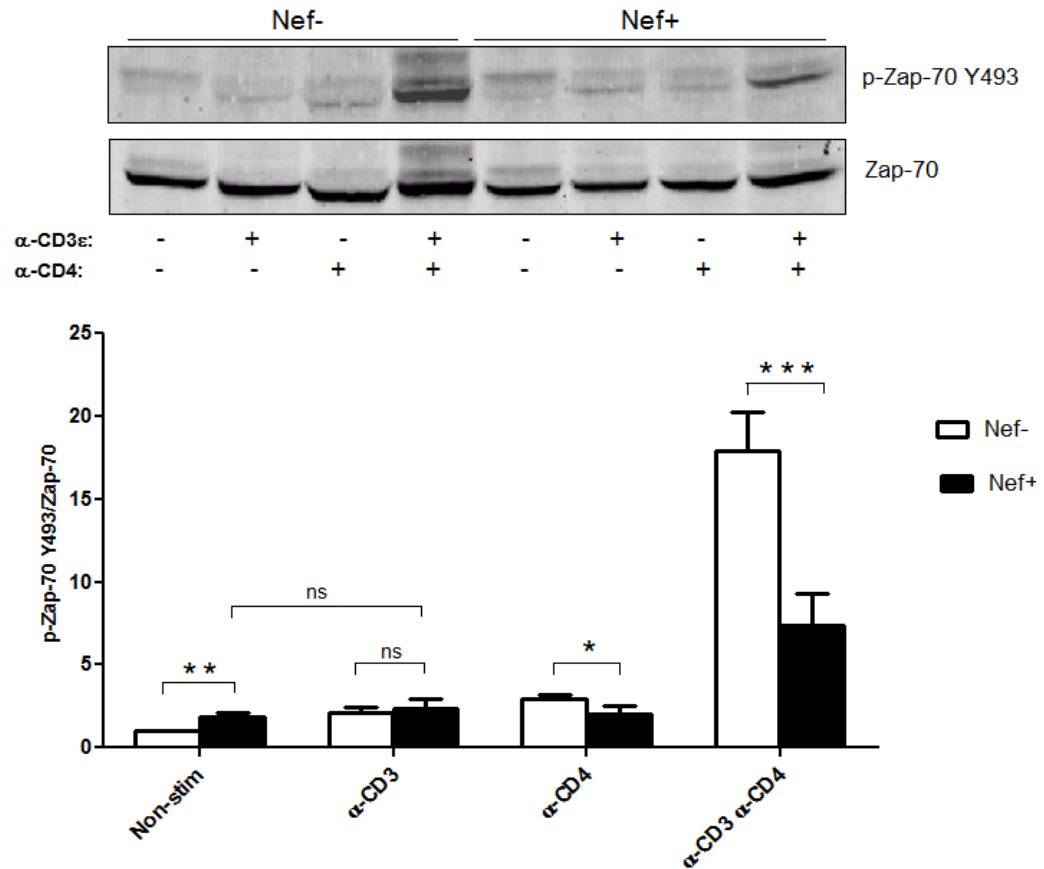


Figure 18C : Altération de la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 493 sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes Nef- et Nef+ ont été isolés et soumis ou non à différentes stimulations : α -CD3 ϵ , α -CD4 et α -CD3 ϵ + α -CD4 pendant 5 minutes à 37°C. Un immunobuvardage de type western a été effectué avec l'anticorps α -Zap-70 Y493 et l'intensité de la phosphorylation a été reportée sur la quantité totale de Zap-70 déterminée avec l'anticorps α -Zap-70 (99F2). Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- à l'état non-stimulé s'est fait attribuer une valeur de 1. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

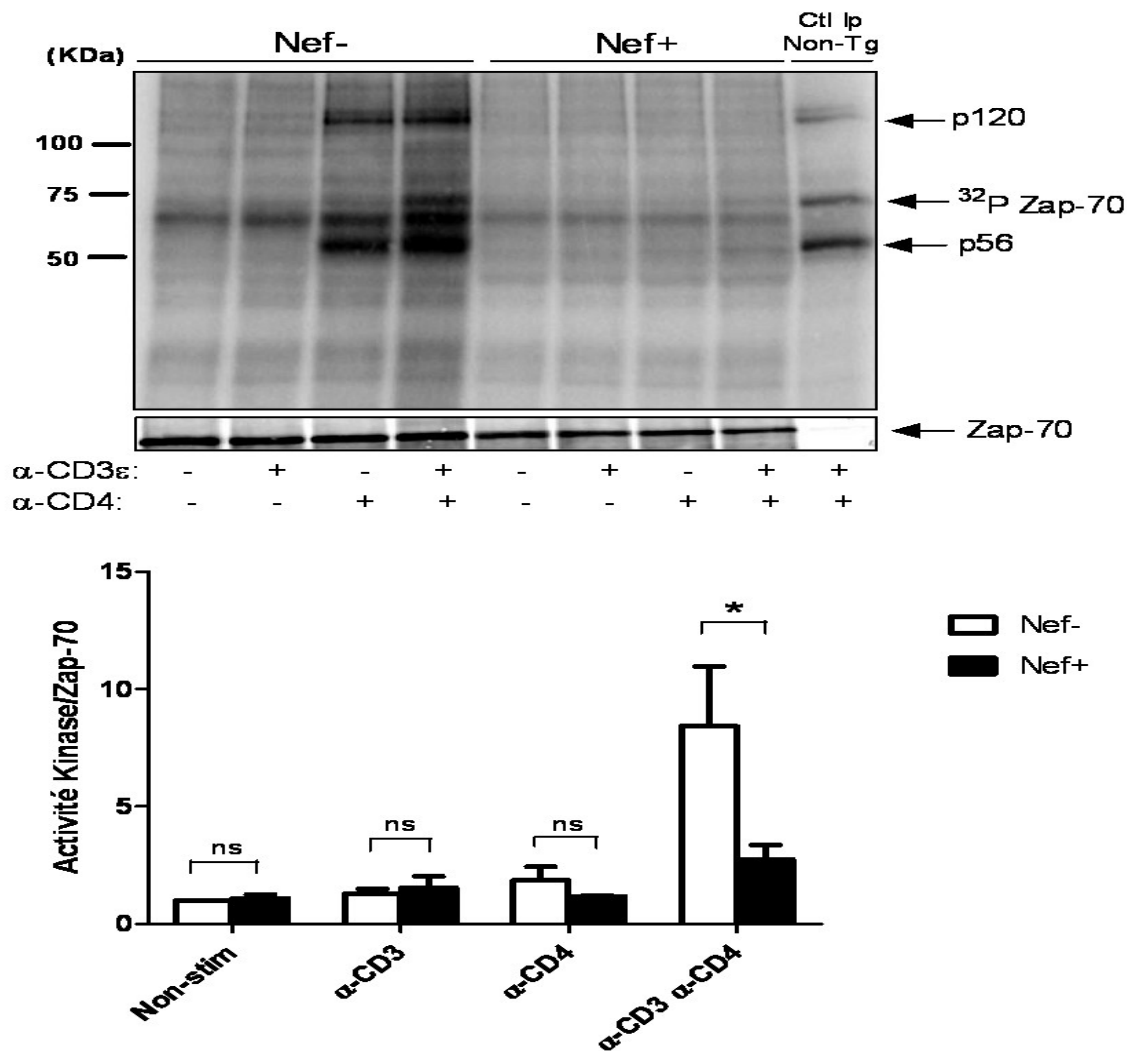


Figure 19A : Prévention de l'activation de Zap-70 par Lck sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à différentes stimulations : α -CD3 ϵ , α -CD4 et α -CD3 ϵ + α -CD4 pendant 5 minutes à 37°C avant la préparation du lysat cellulaire. Une immunoprécipitation avec un sérum polyclonal de lapin contenant l'anticorps α -Zap-70 a été effectuée et par la suite l'immunoprécipitat a été soumis à un essai kinase *in vitro* (IVKA) performé à température pièce utilisant le gamma ATP radioactif marqué au ³²P. Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- à l'état non-stimulé s'est fait attribuer une valeur de 1. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

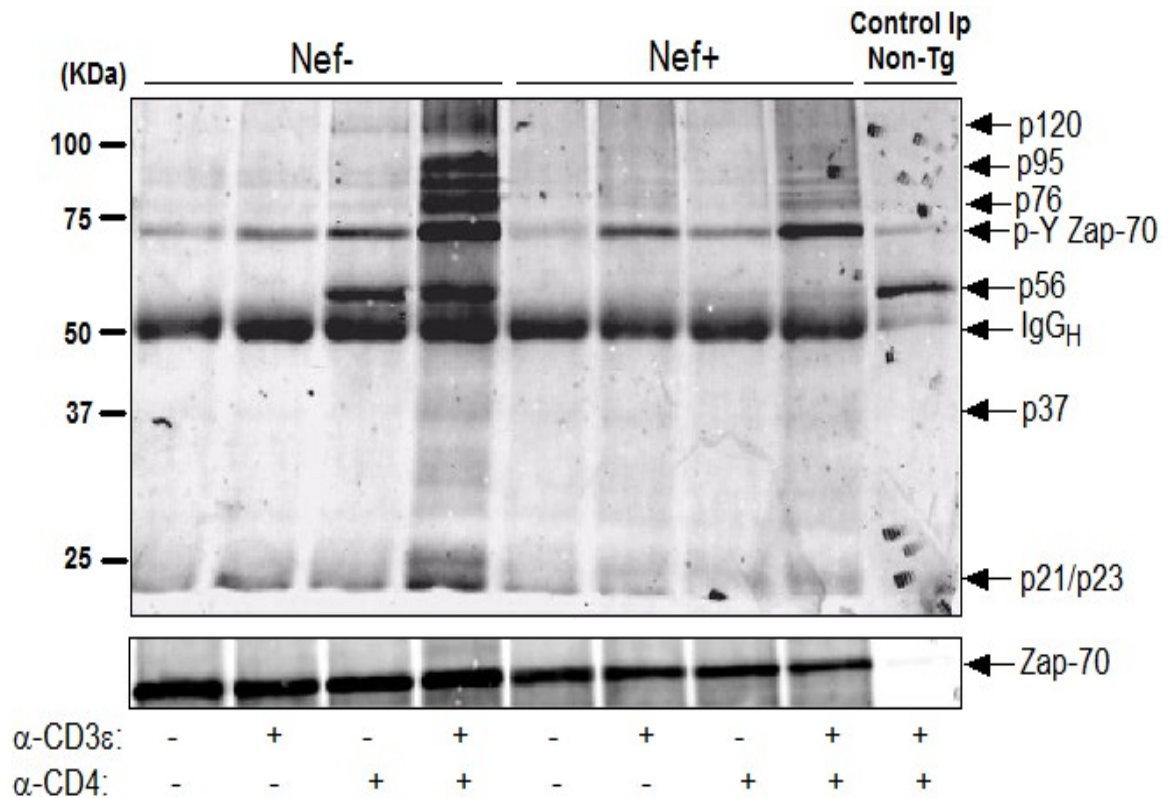


Figure 19B : Nef prévient la phosphorylation des substrats en aval de Zap-70 sur l'engagement du TcR/CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à différentes stimulations : α -CD3 ϵ , α -CD4 et α -CD3 ϵ + α -CD4 pendant 5 minutes à 37°C avant la préparation du lysat cellulaire. Une immunoprécipitation avec le sérum polyclonal de lapin contenant l'anticorps α -Zap-70 a été effectuée et la phosphorylation en tyrosine a été détectée suite à l'immunobuvardage de type western avec l'anticorps α -p-Y (4G10). Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3) qui ont donné des résultats similaires.

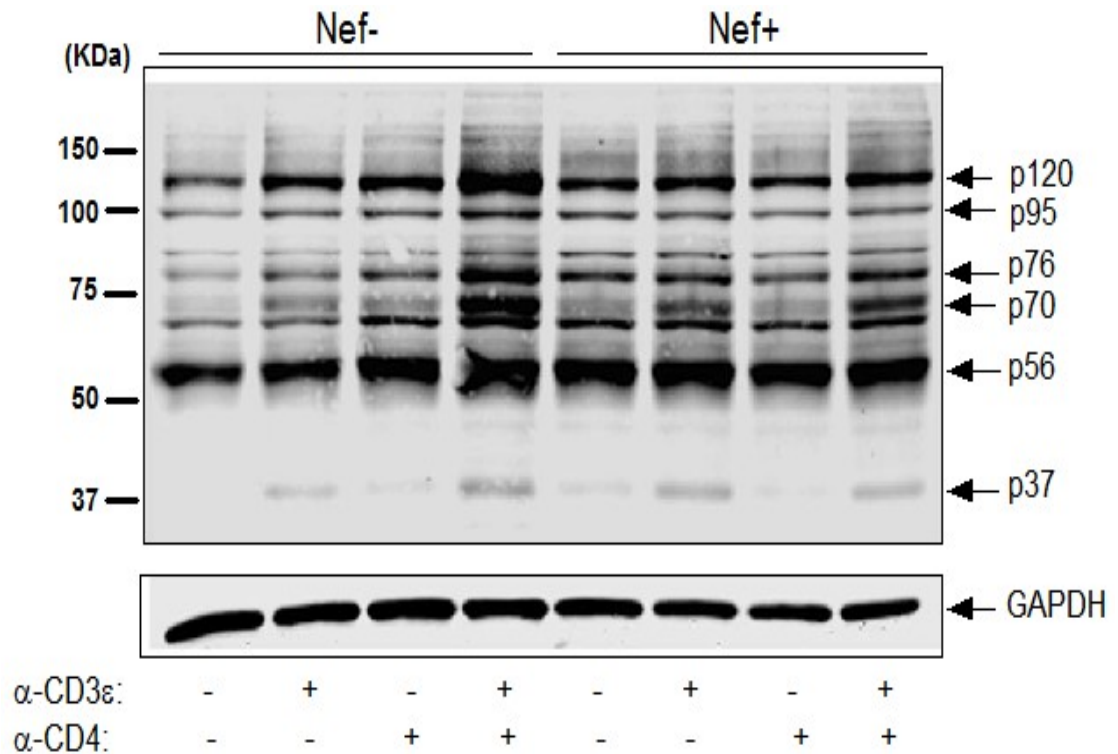


Figure 20A : Altération de la phosphorylation en tyrosine dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à différentes stimulations : α -CD3 ϵ , α -CD4 et α -CD3 ϵ + α -CD4 pendant 5 minutes à 37°C. Un immunobuvardage de type western a été effectué avec l'anticorps α -p-Y (4G10) pour détecter la phosphorylation des protéines en tyrosine et l'anticorps α -GAPDH utilisé comme contrôle de chargement interne.

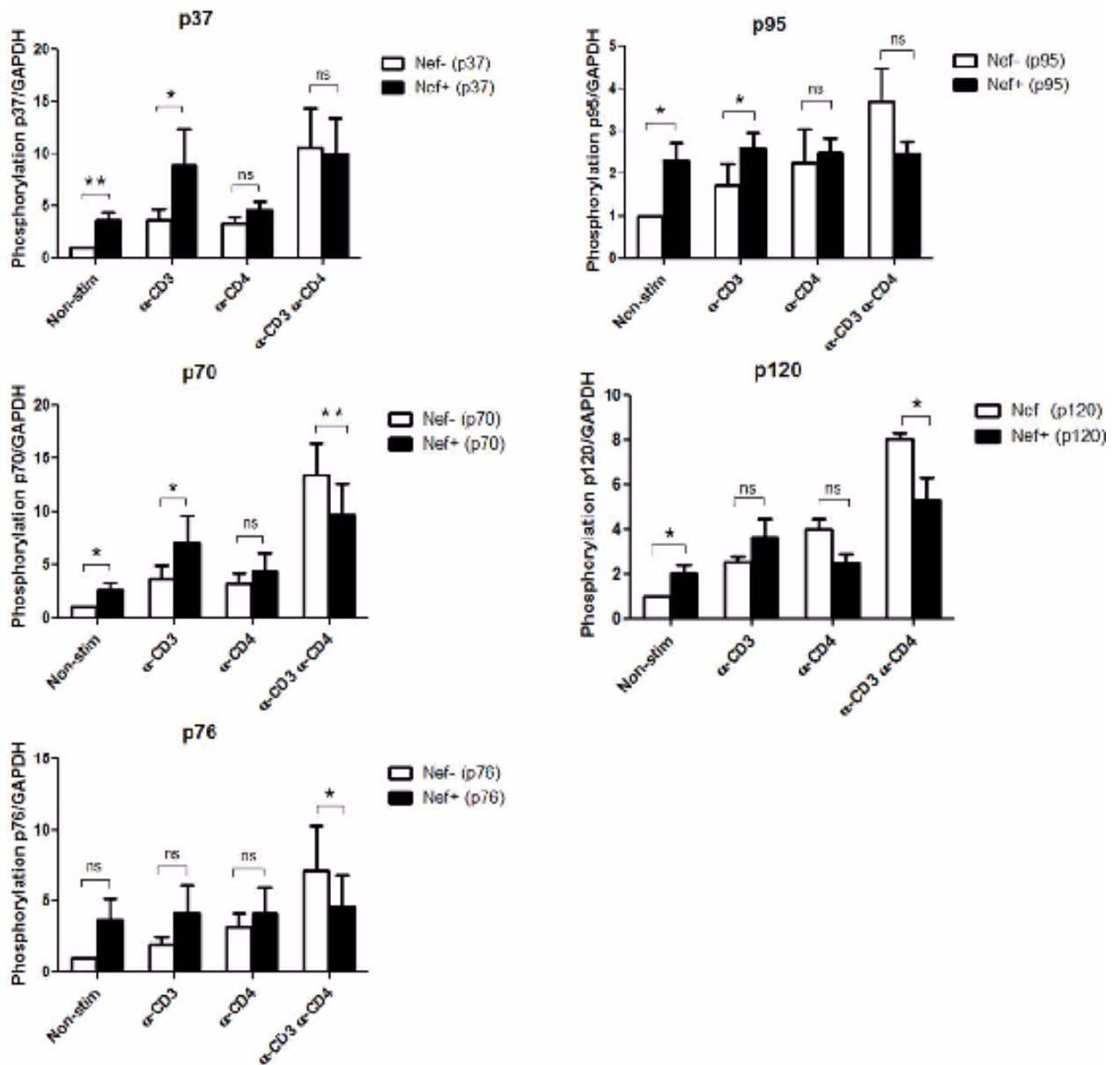


Figure 20B : Analyse statistique de la phosphorylation en tyrosine dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Pour chaque candidat, l'intensité de la phosphorylation en tyrosine a été reportée sur la quantité totale de GAPDH dans l'échantillon. Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- à l'état non-stimulé s'est fait attribuer une valeur de 1. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

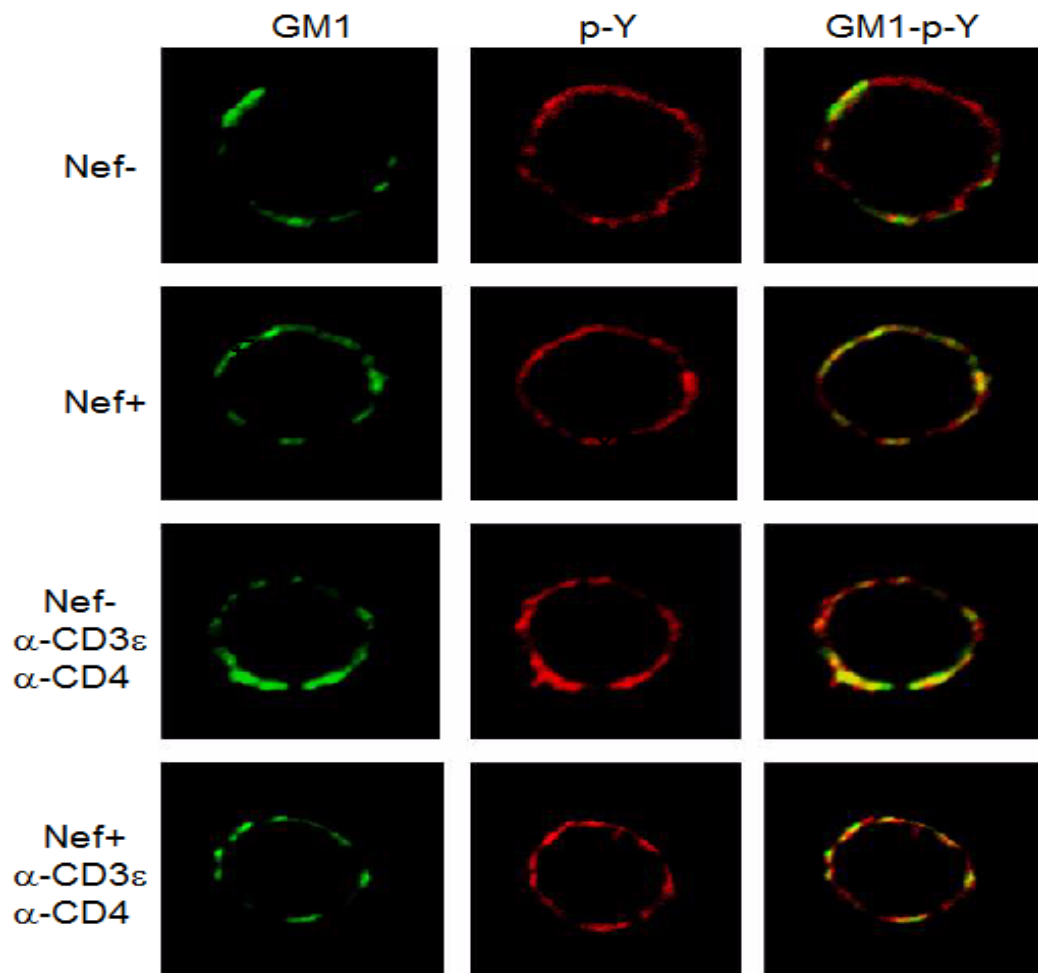


Figure 21A : La phosphorylation en tyrosine révélée en immunofluorescence est altérée dans les microdomaines membranaires des thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à une stimulation α -CD3 ϵ + α -CD4 de 5 minutes à 37⁰C. L'immunofluorescence en microscopie confocale a ensuite été procédée où la «Cholera Toxin Subunit B» a été utilisée pour marquer la fraction microdomaine membranaire (vert) et le marquage des protéines phosphotyrosines (rouge) a été détecté avec l'anticorps α -p-Y (4G10). L'analyse de 20 cellules (n=20) de la section située à l'équateur de la cellule a été représentative dans trois expériences indépendantes (n=3) qui ont donné des résultats similaires.

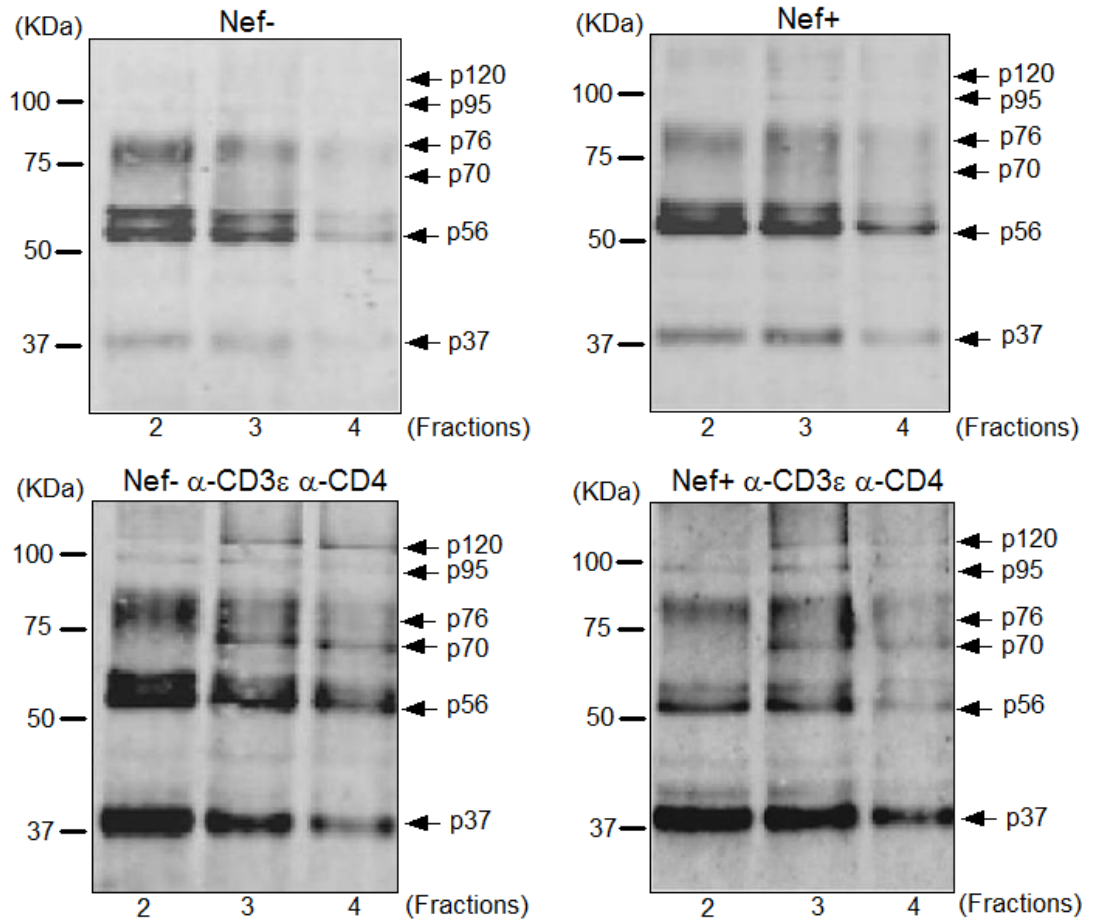


Figure 21B : La phosphorylation en tyrosine révélée par immunobuvardage est altérée dans les microdomaines membranaires des thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef- et Nef+ ont été soumis ou non à une stimulation α -CD3 ϵ + α -CD4 de 5 minutes à 37°C. Les suspensions de thymocytes ont été lysées dans 1% Brij 98 pendant 5 minutes à 37°C et les lysats ont été soumis à une ultracentrifugation sur gradient de sucrose à 40 000 rpm pendant 18 à 20 heures. Un aliquot de 30 μ l des fractions 2, 3 et 4, représentant les microdomaines membranaires, a été prélevé et les protéines ont été soumises à une électrophorèse SDS-PAGE. Le contenu en protéines phosphorylées en tyrosine a été détecté par immunobuvardage de type Western en utilisant l'anticorps α -p-Y (4G10). L'analyse a été effectuée dans trois expériences indépendantes (n=3) qui ont donné des résultats similaires.

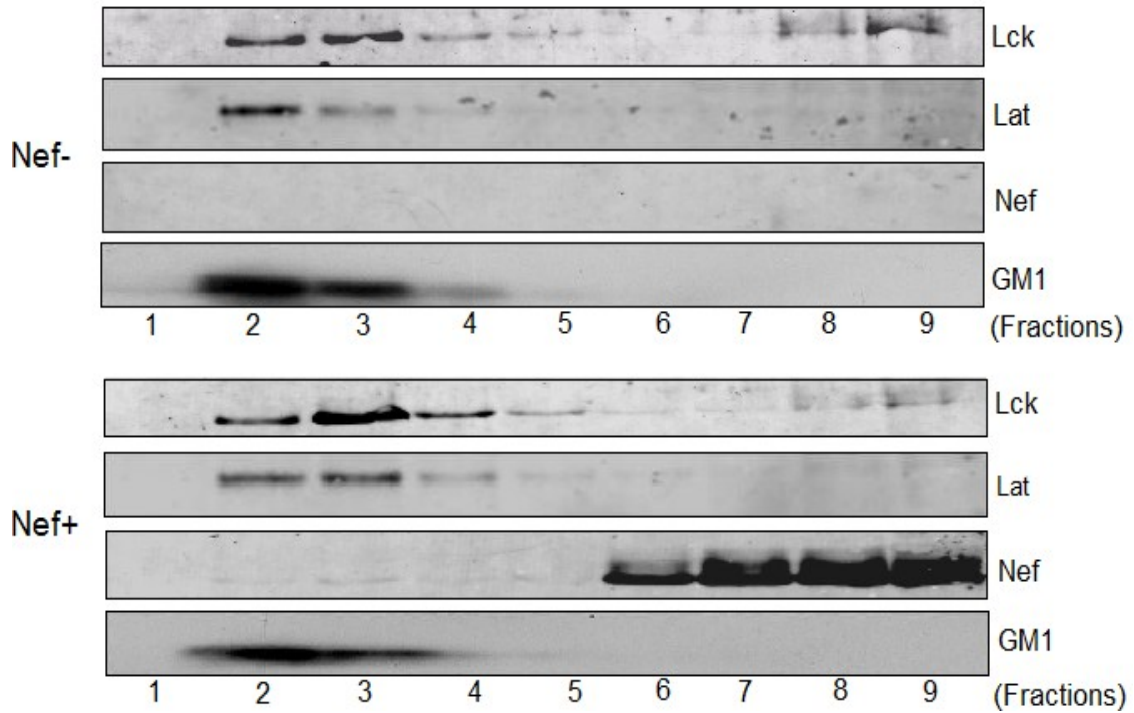


Figure 22 : Enrichissement de Lck dans les microdomaines membranaires des thymocytes CD4C/HIV^{Nef}. Les thymocytes isolés des souris Nef⁻ et Nef⁺ ont été lysés dans 1% Brij 98 pendant 5 minutes à 37⁰C et les lysats ont été soumis à une ultracentrifugation sur gradient de sucrose à 40 000 rpm pendant 18 à 20 heures. Un aliquot de 30 ul de chaque fraction a été prélevé et les protéines ont été soumises à une électrophorèse SDS-PAGE. Les contenus en Lck, LAT et Nef ont été détectés par immunobuvardage de type Western en utilisant les anticorps α -Lck (3A5), α -LAT (Santa Cruz) et α -Nef (JR-CSF) respectivement. La «Cholera Toxin Subunit B» a été utilisée pour marquer les microdomaines membranaires. Les analyses ont été effectuées dans trois expériences indépendantes (n=3) qui ont données des résultats similaires.

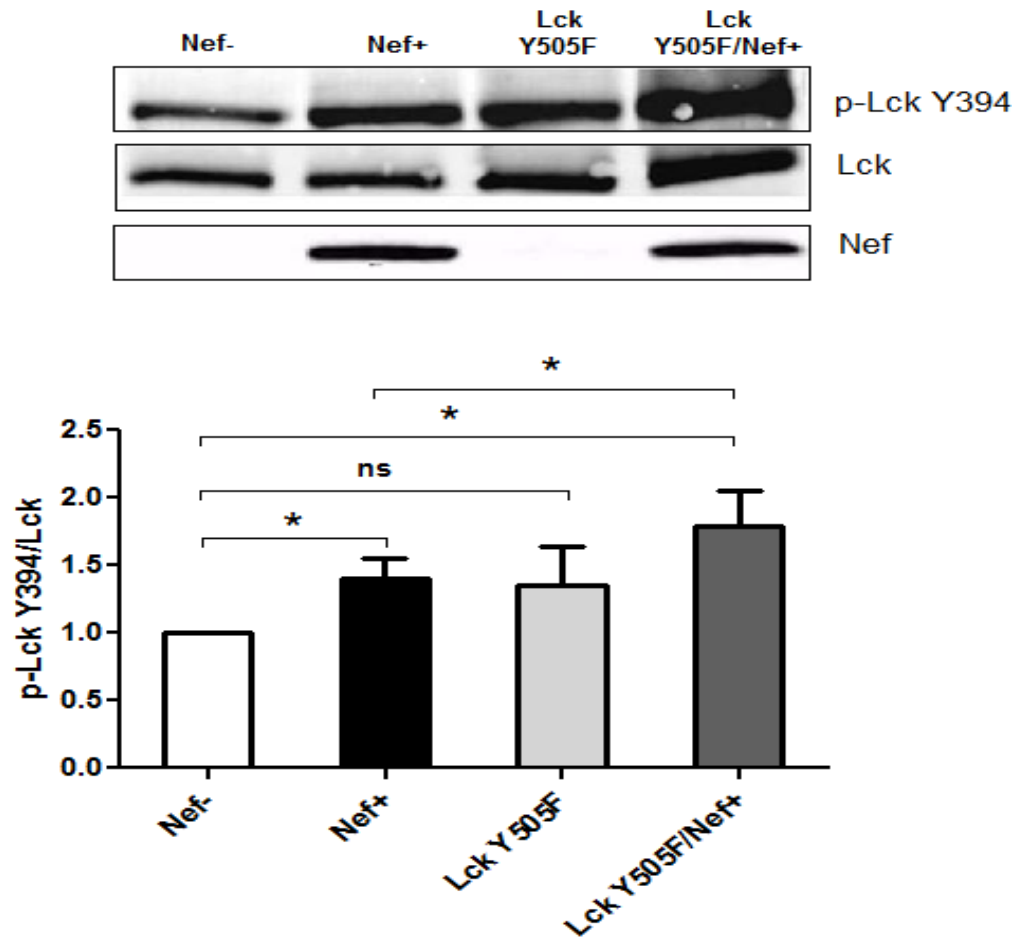


Figure 23A : Hyperphosphorylation de Lck en tyrosine 394 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+. Les thymocytes isolés des souris Nef-, Nef+, Lck Y505F et Lck Y505F/Nef+ ont été lysés pour la préparation du lysat cellulaire. Une immunoprécipitation avec l'anticorps α -Lck (3A5) a par la suite été effectuée et la phosphorylation en tyrosine 394 a été détectée avec l'anticorps α -p-SrcY416. L'intensité de la phosphorylation a été reportée sur la quantité totale de Lck dans l'immunoprécipitat déterminée avec le sérum polyclonal de lapin contenant l'anticorps α -Lck. Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- à l'état non-stimulé s'est fait attribuer une valeur de 1. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

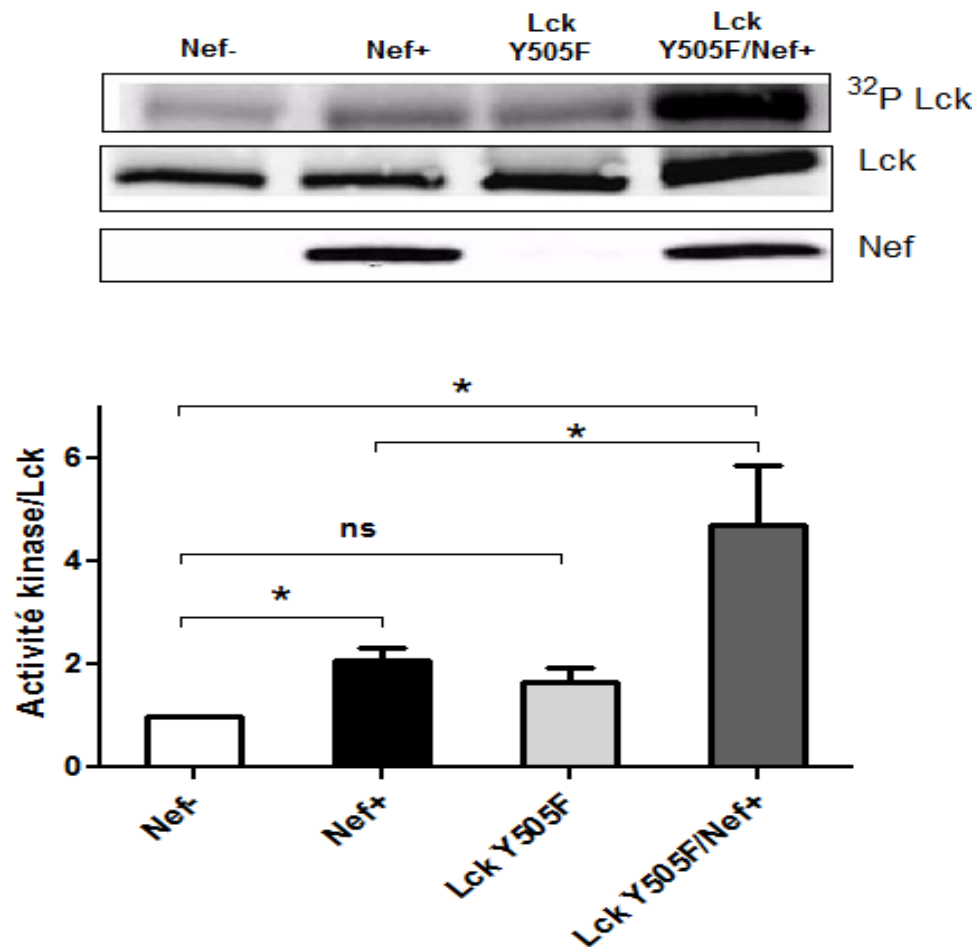


Figure 23B : Hyperactivation de Lck dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+. Les thymocytes isolés des souris Nef-, Nef+, Lck Y505F et Lck Y505F/Nef+ ont été lysés pour la préparation du lysat cellulaire. Une immunoprécipitation avec l'anticorps α -Lck (3A5) a par la suite été effectuée et l'immunoprécipitat a été soumis à un essai kinase *in vitro* (IVKA) qui a été réalisé à température pièce utilisant le gamma ATP radioactif marqué au ^{32}P . La quantification de l'activité kinase a été reportée sur la quantité totale de Lck dans l'immunoprécipitat déterminé avec le sérum polyclonal de lapin contenant l'anticorps α -Lck. Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- s'est fait attribuer une valeur de 1. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

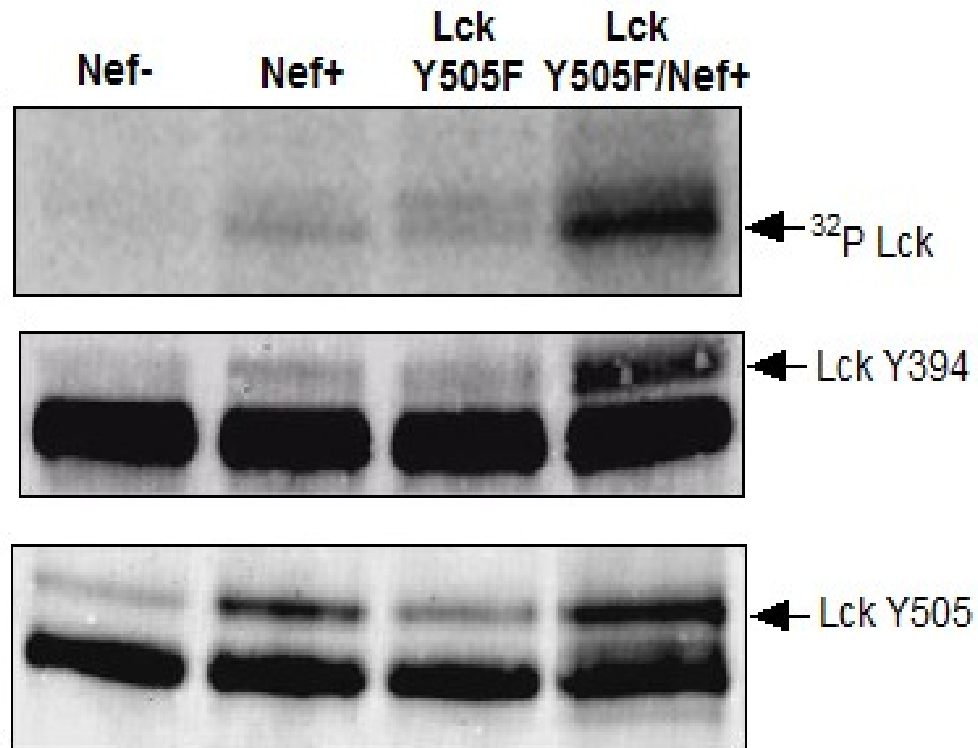


Figure 24 : Nef induit et active la forme DPho-active Lck dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+. Les thymocytes isolés des souris Nef-, Nef+, Lck Y505F et Lck Y505F/Nef+ ont été lysés pour la préparation du lysat cellulaire. Une immunoprécipitation avec l'anticorps α -Lck Y505 a par la suite été effectuée et l'immunoprécipitat a été soumis à un essai kinase *in vitro* (IVKA) qui a été réalisé à température pièce utilisant le gamma ATP radioactif marqué au ^{32}P . La forme de DPho-active Lck a été détectée de deux façons; par l'immunobuvardage de type western avec les anticorps α -Lck Y505 et α -p-Src Y416. Les analyses ont été effectuées dans trois expériences indépendantes (n=3) qui ont donné des résultats similaires.

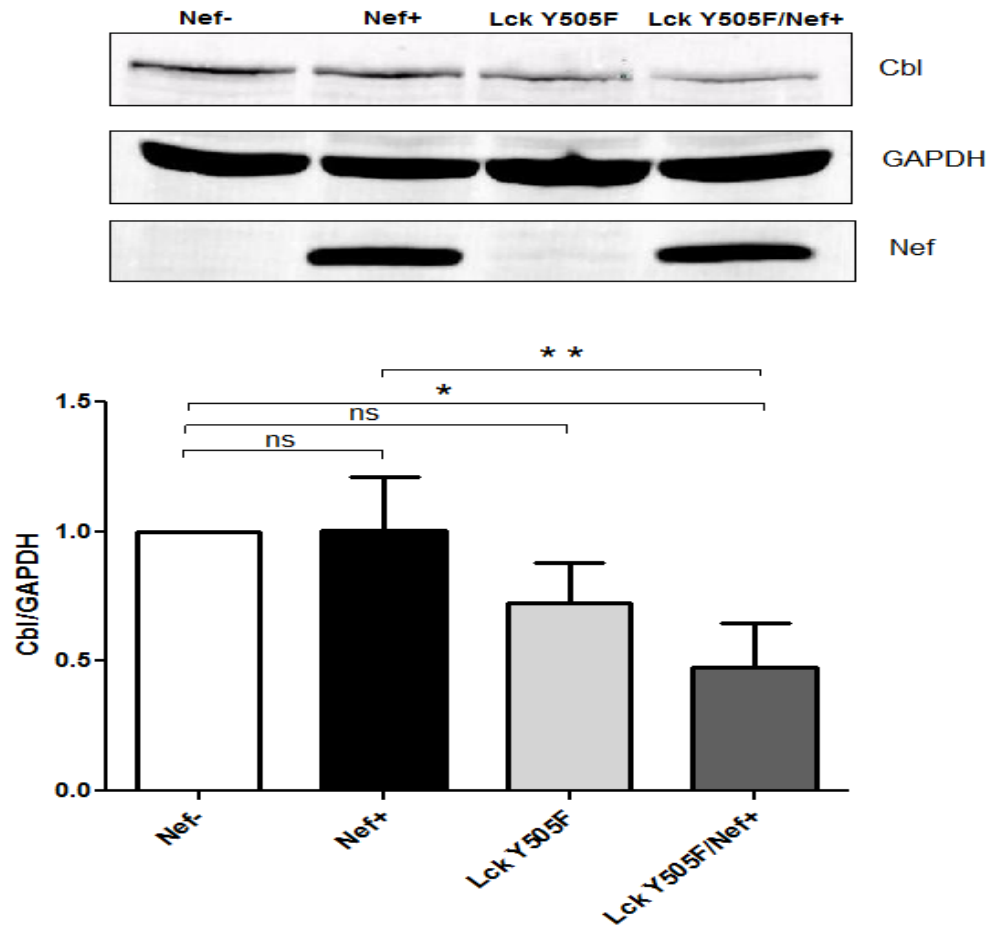


Figure 25 : Coopération entre Nef et la forme active de Lck pour la dégradation de c-Cbl dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+. Les thymocytes isolés des souris Nef-, Nef+, Lck Y505F et Lck Y505F/Nef+ ont été lysés pour la préparation du lysat cellulaire. Les niveaux de c-Cbl dans le lysat cellulaire ont été déterminés avec l'anticorps α -Cbl (7G10) et le contrôle du chargement interne a été déterminé avec l'anticorps α -GAPDH. Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- s'est fait attribuer une valeur de 1. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

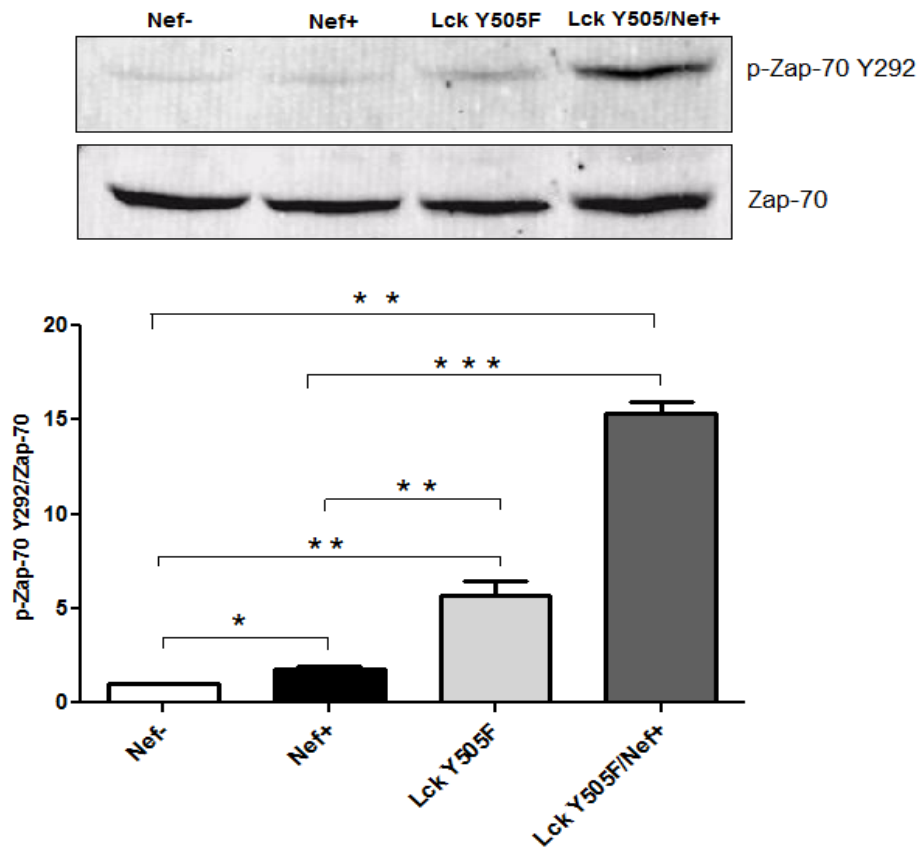


Figure 26A : Hyperphosphorylation de Zap-70 en tyrosine 292 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+. Les thymocytes isolés des souris Nef-, Nef+, Lck Y505F et Lck Y505F/Nef+ ont été lysés pour la préparation du lysat cellulaire. Un immunobuvardage de type western a été effectué avec l'anticorps α -Zap-70 Y292 et l'intensité de la phosphorylation a été reportée sur la quantité totale de Zap-70 détectée avec un α -Zap-70 (99F2). Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- s'est fait attribuer une valeur de 1. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

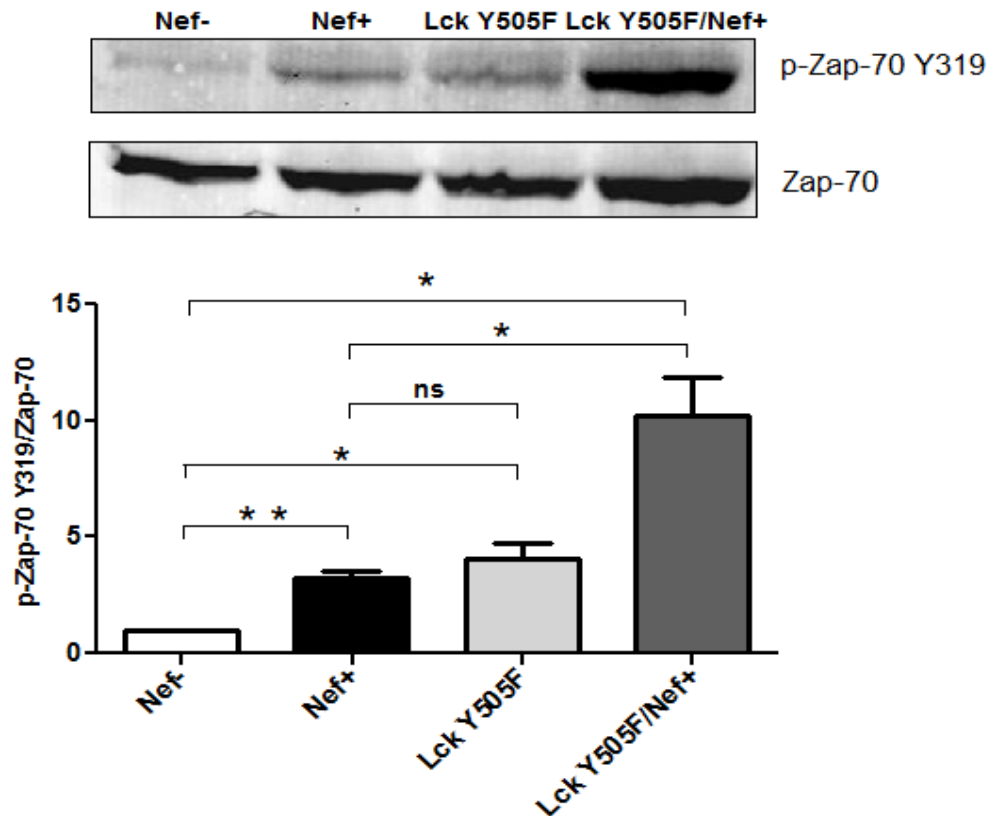


Figure 26B : Hyperphosphorylation de Zap-70 en tyrosine 319 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+. Les thymocytes isolés des souris Nef-, Nef+, Lck Y505F et Lck Y505F/Nef+ ont été lysés pour la préparation du lysat cellulaire. Un immunobuvardage de type western a été effectué avec l'anticorps α -Zap-70 Y319 et l'intensité de la phosphorylation a été reportée sur la quantité totale de Zap-70 détectée avec un α -Zap-70 (99F2). Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- s'est fait attribuer une valeur de 1. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

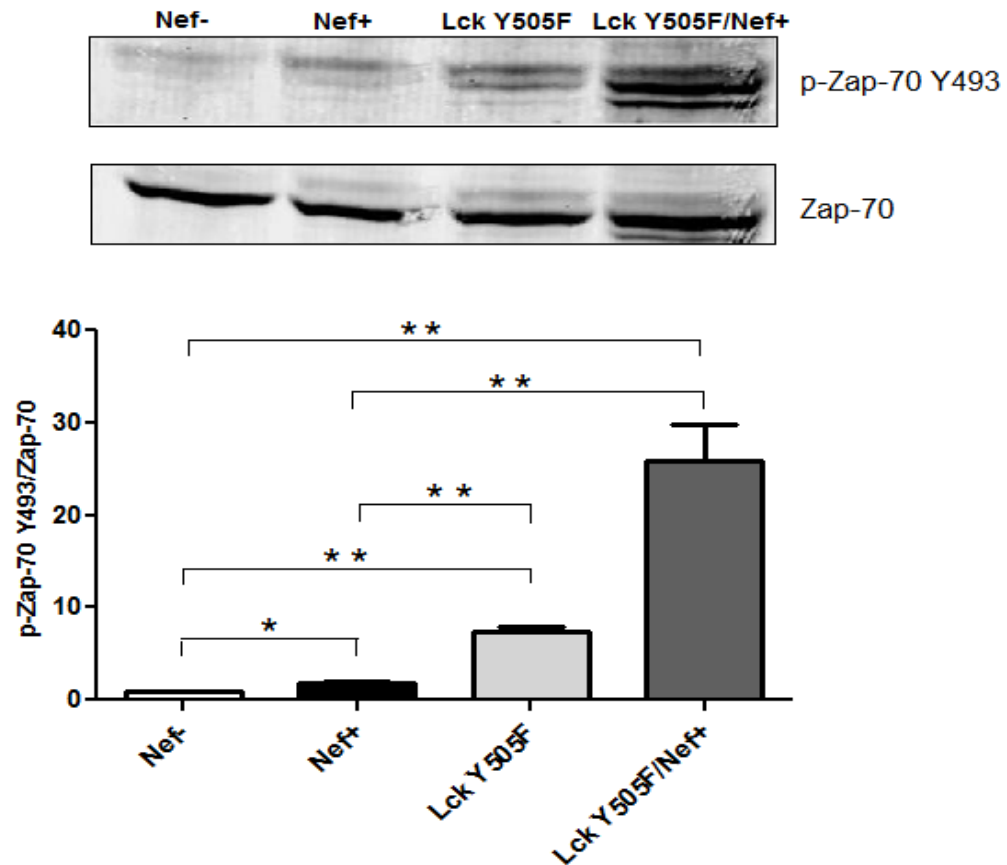


Figure 26C : Sauvetage de la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 493 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+. Les thymocytes isolés des souris Nef-, Nef+, Lck Y505F et Lck Y505F/Nef+ ont été lysés pour la préparation du lysat cellulaire. Un immunobuvardage de type western a été effectué avec l'anticorps α -Zap-70 Y493 et l'intensité de la phosphorylation a été reportée sur la quantité totale de Zap-70 détectée avec un α -Zap-70 (99F2). Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- s'est fait attribuer une valeur de 1. Les données ont été représentatives de trois expériences indépendantes (n=3), où le test t Student a été effectué pour comparer la représentabilité des résultats entre un groupe témoin et un autre groupe. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

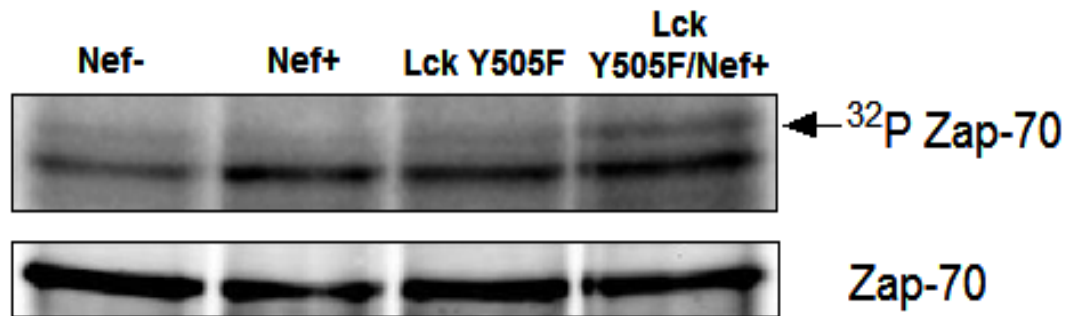


Figure 27 : Sauvetage de la fonction de Lck à activer Zap-70 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+. Les thymocytes isolés des souris Nef-, Nef+, Lck Y505F et Lck Y505F/Nef+ ont été lysés pour la préparation du lysat cellulaire. Une immunoprécipitation avec un sérum de lapin contenant l'anticorps α -Zap-70 a par la suite été effectuée et l'immunoprécipitat a été soumis à un essai kinase *in vitro* (IVKA) à température pièce utilisant le gamma ATP radioactif marqué au ^{32}P . L'intensité de l'activité kinase a été reportée sur la quantité totale de Zap-70 dans l'immunoprécipitat déterminée avec l'anticorps α -Zap-70 (99F2). Les analyses ont été effectuées dans deux expériences indépendantes (n=2) qui ont donné des résultats similaires.

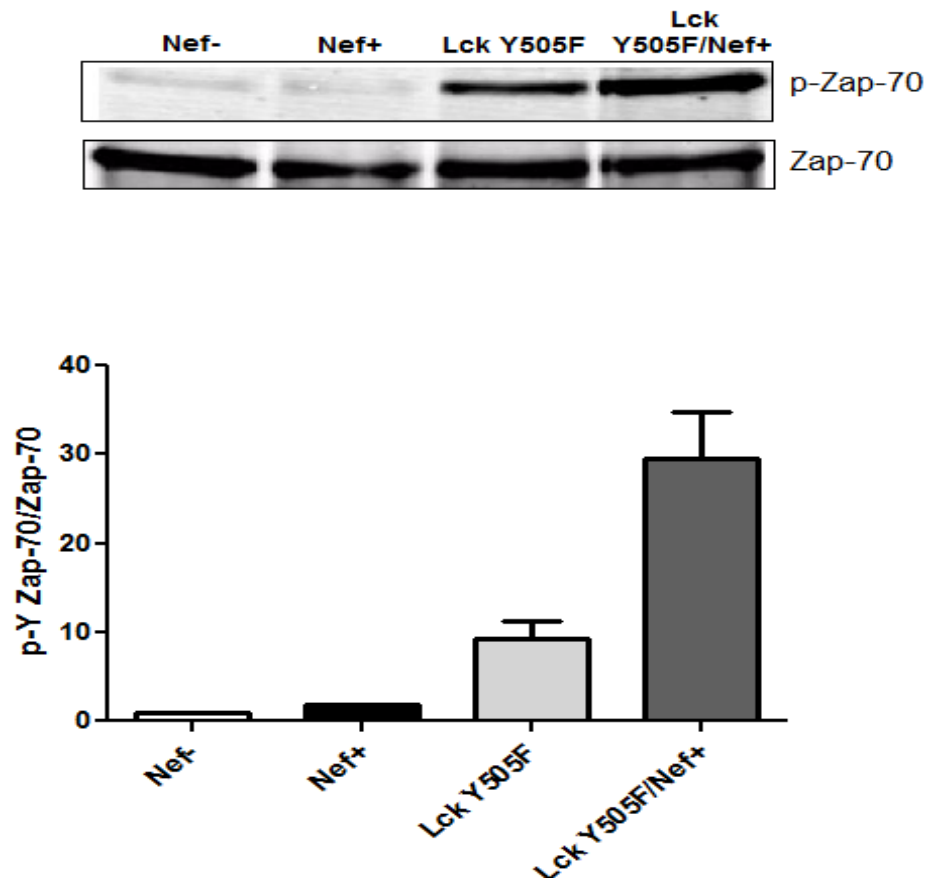


Figure 28 : Sauvetage de la fonction de Lck à phosphoryler Zap-70 dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+. Les thymocytes isolés des souris Nef-, Nef+, Lck Y505F et Lck Y505F/Nef+ ont été lysés pour la préparation du lysat cellulaire. Une immunoprécipitation avec le sérum polyclonal de lapin contenant l'anticorps α -Zap-70 a été effectuée et la phosphorylation en tyrosine a été détectée suite à l'immunobuvardage de type western avec l'anticorps α -p-Y (4G10). L'intensité de la phosphorylation a été reportée sur la quantité totale de Zap-70 dans l'immunoprécipitat déterminée avec l'anticorps α -Zap-70 (99F2). Le ratio obtenu pour le contrôle Nef- à l'état non-stimulé s'est fait attribuer une valeur de 1. Les analyses ont été effectuées dans deux expériences indépendantes (n=2) et les données sont présentées comme étant la moyenne \pm l'écart-type.

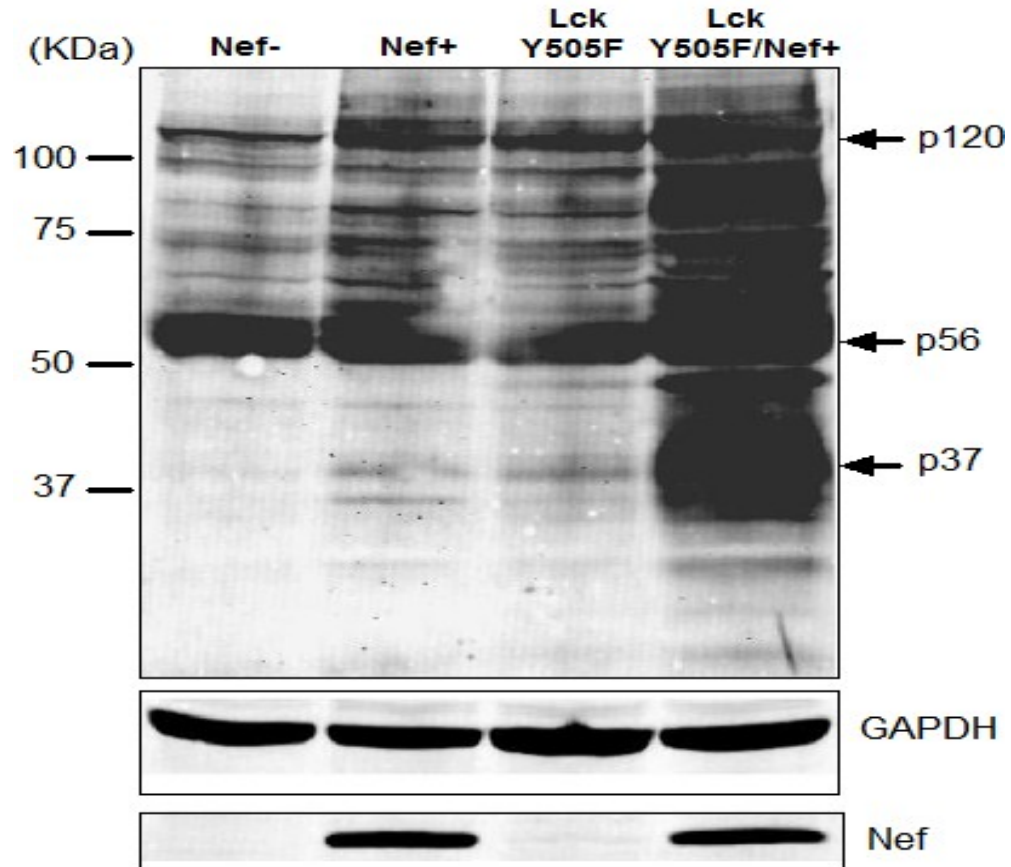


Figure 29 : Hyperphosphorylation des protéines phosphotyrosines dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+. Les thymocytes isolés des souris Nef-, Nef+, Lck Y505F et Lck Y505F/Nef+ ont été lysés pour la préparation du lysat cellulaire. Un immunobuvardage de type western a été effectué avec l'anticorps α -p-Y (4G10) et l'intensité de la phosphorylation a été reportée sur la quantité totale de protéines dans les échantillons déterminée avec un α -GAPDH. Les analyses ont été effectuées dans trois expériences indépendantes ($n=3$) qui ont donné des résultats similaires.

CHAPITRE 7 : DISCUSSION

Le blocage de la transition des cellules DP vers CD4⁺ SP dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef} associé à une altération de la fonction de Lck est récupérable par l'expression de la forme constitutivement active de Lck Y505F

Nous avons rapporté que Nef induit dans notre modèle murin du SIDA, différents phénotypes dans le thymus : la déplétion des cellules DP, la baisse d'expression du corécepteur de surface CD4 ainsi qu'un dysfonctionnement de la transition des cellules DP vers CD4⁺ SP. Bien que le sauvetage du phénotype soit partiel en raison de la persistance de la baisse de régulation du corécepteur CD4, la transition des cellules DP vers CD4⁺ SP s'est effectuée normalement sur l'expression de la forme constitutivement active de Lck Y505F (**Figure 10, p.76**). Ces données suggèrent fortement une altération de la signalisation CD4-Lck dont la principale fonction du CD4 s'effectue par le transport de Lck à la synapse immunologique pour en réguler son accumulation à la proximité du TcR (Artyomov et *al*, 2010). Au niveau moléculaire, des altérations à ce niveau affecteront l'intensité ainsi que la durée du signal par le TcR, deux caractéristiques d'une importance cruciale à la maturation des thymocytes. L'intensité du signal par le TcR est connue pour déterminer le nombre de thymocytes à subir la sélection positive tandis que la durée du signal serait davantage impliquée dans la transition des cellules DP pour générer soit une cellule CD4⁺ SP ou CD8⁺ SP (Singer et *al*, 2008). L'implication de Nef à ces niveaux illustre bien l'importance d'étudier davantage les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de Lck par Nef pour mieux comprendre son rôle dans la pathogenèse du SIDA.

La délocalisation de Lck par Nef altère sa régulation et le protège contre la dégradation par c-Cbl

L'utilisation des approches biochimique et d'immunofluorescence nous ont permis de démontrer dans cette étude, plusieurs dysfonctionnements au niveau de la régulation de Lck. Dans un premier temps, nous avons démontré que les thymocytes Nef⁺ expriment plus de Lck, phénotype associé à une augmentation constitutive de son activité kinase intrinsèque. Par contre, Nef empêche la suractivation de Lck suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ α -CD4 (**Figure 12, p.80**) et dans ces mêmes conditions, les niveaux de la forme active de Lck (détecté par un α -p-Src Y416), sont plus élevés (**Figure 11A, p.77**), laissant croire que Lck n'est pas rapidement disponible pour lier la queue cytoplasmique du corécepteur CD4 pour être ensuite activé suite à une stimulation par un α -CD4. Parallèlement à ce résultat, nous avons démontré que la stimulation par un α -CD3 ϵ + α -CD4 n'influence aucunement les niveaux des formes actives et totales de Lck et, par le fait même, le ratio p-Lck Y394/Lck. (**Figures 11A-B-C, p.77-78-79**), Ces résultats suggèrent fortement que Lck est résistant à la dégradation dans les thymocytes Nef⁺. Nous avons également observé une importante accumulation de Lck dans des structures intracellulaires (**Figure 13A, p.80**). Ce résultat va de pair avec une récente étude effectuée dans les cellules Jurkat, où les auteurs ont démontré le potentiel de différents allèles de Nef à séquestrer Lck dans les endosomes (Haller et al, 2007). Fait intéressant, cette observation s'est répercutée également dans les thymocytes primaires de souris transgéniques exprimant Nef (**Figure 13A, p.81**). Par contre, nous n'avons pas démontré dans cette étude si cette accumulation de Lck était due à un effet direct de Nef ou était la conséquence de la baisse de régulation du corécepteur CD4. L'utilisation du modèle murin transgénique «CD4 tailless», où la queue cytoplasmique du corécepteur CD4 est déléetée, pourrait répondre à cette question considérant l'inhabileté du CD4 à séquestrer Lck (Killeen et Littman, 1993). Toutefois, l'allèle mutant de Nef L164A/L165A a été démontré pour altérer la distribution de Lck sans toutefois induire la baisse de la régulation du corécepteur CD4, suggérant que le mécanisme

menant à l'accumulation de Lck serait potentiellement un effet direct de Nef (Craig et *al*, 1998; Toulouze et *al*, 2006). Bien que la résistance de Lck à la dégradation puisse en partie être associée à sa délocalisation, d'autres facteurs semblent interférer dans ce processus. La fraction non-négligeable de Lck localisée à l'équateur de la cellule semble également résister à la dégradation, puisque les niveaux de Lck sont demeurés inchangés suite à l'engagement du TcR/CD4 (**Figure 11B, p.78**). L'échec lors de la dégradation de Lck pourrait également impliquer une altération de la fonction de c-Cbl, connue pour réguler les niveaux de TcR et de plusieurs tyrosines kinases, dont Lck, via le mécanisme d'ubiquitination pour la dégradation par le protéasome (Rao et *al*, 2002). Bien que la fraction de Lck localisée dans la section située à l'équateur de la cellule colocalise avec c-Cbl dans les thymocytes Nef⁺ à l'état stimulé, l'engagement du TcR/CD4 n'a toutefois pas entraîné de hausse subséquente de la colocalisation (**Figure 15A, p.83**), ce qui suggère une altération au niveau du recrutement de c-Cbl à la membrane. Par contre, nous devons également considérer la différente distribution de Lck dans la section située à l'équateur de la cellule dans les thymocytes Nef⁺, qui se concentre davantage dans les microdomaines membranaires (**Figure 13B, p.81; Figure 22, p.96**). Cette distribution pourrait également affecter son association avec c-Cbl. Jusqu'à présent, l'échec lors de la dégradation de Lck demeure un mécanisme à éclaircir, mais quoi qu'il en soit, la faible colocalisation suite à l'engagement du TcR/CD4 pourrait en partie être responsable de l'accumulation de Lck en présence de Nef. Mis à part la dégradation de Lck, c-Cbl pourrait s'impliquer différemment dans la signalisation par le TcR par l'entremise de son domaine SH2 et SH3 et assurer une fonction de protéine adaptatrice lors de l'assemblage de plusieurs complexes (Buday et *al*, 1996; Koretzky et Myung, 2001). La détermination de la fonction de c-Cbl, que ce soit pour exercer sa fonction ubiquitine ligase ou adaptatrice, est régulée entre autres par sa phosphorylation spécifique sur ses résidus tyrosines. En accord avec une étude effectuée dans les dernières années (Yang et Anderson, 2005), nous avons démontré l'habileté de Nef à induire l'hyperphosphorylation constitutive de c-Cbl en tyrosine (**Figure 14, p.82**) et que ce mécanisme requiert l'activité kinase de Lck (**Figure 16, p.85**). Ce résultat indique que

Nef collabore avec Lck dans la modulation du profil de phosphorylation de c-Cbl, et probablement de sa fonction. Jusqu'à présent, les résultats suggèrent que Nef exploite davantage la fonction adaptatrice de c-Cbl à l'égard de la fonction ubiquitine ligase pour contrôler l'état d'activation cellulaire. L'étude plus détaillée du profil de phosphorylation de c-Cbl pourrait nous donner plus d'informations sur les mécanismes de régulation puisque plusieurs sites spécifiques de phosphorylation bien caractérisés sont attribuables à une fonction spécifique (Thien et Langdon, 1998). Ces informations pourraient également nous permettre de mieux comprendre comment Nef prend avantage du double rôle de c-Cbl. D'ailleurs, une étude effectuée dans les cellules Jurkat a démontré que Nef pouvait inhiber l'activité ubiquitine ligase de c-Cbl, mécanisme à travers lequel l'enzyme E2 ligase UBCH7 qui normalement associée à c-Cbl, se voit séquestrer par Nef dans le cytoplasme (Simmons et *al*, 2005). Nous ne connaissons pas encore les mécanismes exacts utilisés par Nef dans la régulation de Lck et c-Cbl, mais les résultats nous portent à croire que Nef module la régulation spatio-temporelle entre ces deux effecteurs. L'échec lors de la dégradation de Lck par c-Cbl pourrait contribuer à l'augmentation de son activité catalytique (**Figure 12, p.80**) et par conséquent la hausse des niveaux rapportés dans les thymocytes Nef+ (**Figure 11B, p.78**).

Nef altère la fonction de Lck dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef}

Malgré la délocalisation de Lck dans les thymocytes Nef+, nous avons démontré que la phosphorylation en tyrosine par la voie du TcR requiert l'activité kinase de Lck (**Figure 16, p.85**). Par l'utilisation de 10 μ M PP2, nous avons tel qu'attendu inhibé la phosphorylation de Lck mais également la phosphorylation d'un large éventail de substrats en aval. Ces résultats suggèrent que la fraction de Lck restante à la membrane est active et responsable de l'initiation des premiers événements à la synapse immunologique. Nous pensons que l'enrichissement de Lck dans les microdomaines membranaires pourrait se localiser sur le TcR ou à proximité. Cette hypothèse serait en accord avec

l'hyperphosphorylation constitutive en tyrosine des composantes de la voie du TcR par un mécanisme indépendant du corécepteur CD4 (**Figures 20A-B, p.92-93**). Par contre, le mécanisme par lequel Nef active Lck et contribue à l'hyperphosphorylation constitutive demeure toujours imprécis, mais pourrait s'effectuer à travers une interaction directe entre le domaine PxxP de Nef et le domaine SH3 de Lck comme répertorié dans certains travaux (Briese *et al*, 2005; Colette *et al*, 1996, Dutartre *et al*, 1998). Puisque Nef est dépourvue d'activité enzymatique, un mécanisme plausible serait que la liaison de Nef induirait un changement de conformation de Lck qui pourrait favoriser son autophosphorylation, processus associé à son activité catalytique. Par contre, la liaison entre Nef et Lck a toujours été rapportée dans des conditions non-physiologiques, où Nef et Lck étaient surexprimées. Dans notre système *in vivo*, où Nef et Lck sont exprimées à des niveaux physiologiques, la co-immunoprécipitation ne nous a pas permis jusqu'à présent de détecter l'existence d'une liaison directe entre ces deux effecteurs. Ce résultat laisse croire que cette interaction pourrait s'effectuer de façon transitoire et serait, par conséquent, difficilement détectable. D'une autre part, la hausse de l'activité catalytique de Lck ainsi que l'hyperphosphorylation des composantes de la voie du TcR indépendamment du corécepteur CD4 pourrait en partie s'effectuer indirectement, sans liaison entre Nef et Lck. Ce mécanisme pourrait être causé par la baisse de la régulation du corécepteur CD4, augmentant ainsi le niveau de Lck libres dans la cellule (Van Laethem *et al*, 2007). Alternativement, puisque le corécepteur CD4 séquestre Lck, la baisse de régulation du CD4 par Nef peut libérer Lck, ce qui potentiellement pourrait rendre les thymocytes plus sensibles à la signalisation par le TcR. Pour supporter cette hypothèse, nous avons également démontré que les thymocytes Nef⁺ répondent faiblement à la stimulation par un α -CD3 ϵ α -CD4 (**Figures 20A-B, p.92-93**), ce qui concorde bien également avec l'inhabileté de Lck à phosphoryler ses substrats dans ces conditions (**Figure 12, p.80**). Puisque l'amplification du signal par le TcR requiert la contribution du corécepteur CD4, les résultats suggèrent que la fonction du corécepteur CD4 à séquestrer et apporter Lck à la synapse immunologique est largement diminuée par l'expression de Nef. Au niveau

moléculaire, nous avons démontré que malgré l'augmentation de son activité catalytique, Lck ne peut efficacement activer Zap-70, où l'activité maximale de Zap-70 était comparable à celle dans les thymocytes Nef- et n'a atteint qu'un rendement de 28% suite à l'engagement du TcR/CD4 (**Figure 19A, p.90**). En lien avec ce résultat, nous avons démontré un dysfonctionnement de Lck envers la phosphorylation de Zap-70 et cela spécifiquement sur la tyrosine en position 493. Le rendement de la phosphorylation sur ce site suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ α -CD4 n'a atteint que 40% celui obtenu dans les thymocytes Nef- (**Figures 18C, p.89**). Malgré le fait que plusieurs autres sites de phosphorylation soient impliqués dans la régulation de Zap-70, la phosphorylation en tyrosine 493 semble jouer un rôle déterminant dans la régulation de son activité catalytique. D'ailleurs, il a été démontré dans certaines études de mutagenèse que Lck était incapable d'activer Zap-70 lorsque la tyrosine 493 était mutée par une phénylalanine (Kong et al, 1996; Mège et al, 1996; Wange et al, 1995). Toutefois, l'hyperphosphorylation des tyrosines 292 et 319 (**Figures 18A-B, p.87-88**) ajoutée à la diminution de la phosphorylation totale en tyrosine observée suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ α -CD4 (**Figure 17, p.86**) suggère même que d'autres sites de phosphorylation de Zap-70, à l'exception de la tyrosine 493, soient altérés en présence de Nef. Quoi qu'il en soit, la faible contribution du corécepteur CD4 à participer au processus d'activation de Lck (**Figure 12, p.80**) ainsi qu'à la phosphorylation de Zap-70 démontre l'inefficacité du CD4 à séquestrer et apporter une quantité suffisante de Lck à proximité du TcR pour complètement activer Zap-70. Pour cette raison, nous croyons que la spécificité de Lck à phosphoryler Zap-70 dans les thymocytes Nef⁺ pourrait être reliée au débalancement du ratio Lck libre/Lck liée au corécepteur CD4. Les résultats semblent indiquer que la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 319 dépendrait davantage de l'activité catalytique du Lck libre que celle associée au corécepteur CD4. Cette affirmation concorde bien avec la sensibilité de la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 319 suite à l'engagement seul du TcR, où environ 82% de la phosphorylation totale sur ce site s'est effectuée dans ces conditions. Quant à la tyrosine 493, étroitement corrélée à l'activation de Zap-70, dépendrait davantage de

l'activité kinase de Lck associée au corécepteur CD4, ce qui pourrait expliquer la faible activité catalytique de Zap-70 dans les thymocytes Nef⁺. Bien que les mécanismes par lesquels Lck active Zap-70 demeurent assez complexes, les résultats suggèrent fortement que Lck colocalise qu'en partie avec Zap-70, pour ainsi permettre sa phosphorylation sur certains sites sans toutefois pouvoir l'activer pleinement. Il est tout probable que Nef réduit la spécificité ou l'accessibilité de Lck pour le site de phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 493. Il serait intéressant de déterminer si ce mécanisme est la conséquence d'un effet direct de Nef, soit en bloquant le site de phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 493 ou indirect en changeant la distribution de Lck à la membrane.

Nef contrôle par l'entremise de Lck les événements de phosphorylation à la synapse immunologique

Suite à l'engagement du TcR/CD4, Zap-70 est recrutée à la membrane et devient un effecteur central dont plusieurs substrats dépendent de son activité kinase. La phosphorylation de ses substrats et tout spécialement de la protéine adaptatrice LAT, va permettre la formation du SMAC et l'amplification du signal par le recrutement de plusieurs effecteurs (Tuosto *et al*, 2001; Hashimoto *et al*, 2010). Pour supporter les résultats qui suggèrent fortement que Nef prévient l'activation de Zap-70 par Lck, nous avons démontré, suite à l'immunoprécipitation du complexe comprenant Zap-70, une hypophosphorylation de plusieurs substrats de tailles moléculaires comprises entre 75-100 kDa (**Figure 19B, p.91**). Cette observation a d'ailleurs été confirmée pour les substrats p76 et p95, potentiellement SLP-76 et Vav, à partir d'extraits totaux de thymocytes. Nous avons démontré que malgré le fait que ces substrats soient hyperphosphorylés à l'état non-stimulé, l'engagement du TcR ou du TcR/CD4 n'a permis aucune hausse subséquente de la phosphorylation (**Figure 20A-B, p.92-93**). Bien que l'identification de ces substrats n'ait pas encore été confirmée, SLP-76 et Vav représentent deux candidats dont la fonction dans

le cytosquelette d'actine dépend largement de l'activité catalytique de Zap-70 (Barda-Saad et al, 2010; Raab et al, 1997). Une altération de la régulation de ces deux effecteurs pourrait en partie expliquer l'inhibition de la polymérisation de l'actine rapportée en présence de Nef (Haller, 2007; Rudolph et al, 2009). Quoi qu'il en soit, l'engagement du TcR/CD4 a été suivi d'un blocage de la phosphorylation à la synapse immunologique, processus que nous avons démontré par immunofluorescence et purification biochimique des microdomaines membranaires. Les deux approches nous ont permis d'arriver à la même conclusion et de démontrer une étroite corrélation entre la hausse de l'activité kinase de Lck et l'augmentation de la phosphorylation en tyrosine dans les microdomaines membranaires. Également, à l'exception de LAT, la faible hausse de la phosphorylation suite à l'engagement du TcR/CD4 supporte bien les résultats montrant la prévention de l'activation de Zap-70 par Nef dans le processus d'amplification du signal à la synapse immunologique (**Figures 21A-B, p.94-95**). Quant à l'hyperphosphorylation de LAT, il a été démontré que Lck pouvait directement contribuer à sa phosphorylation (Jiang et Cheng, 2007). En comparant les niveaux d'activation de Lck et Zap-70 à la synapse immunologique, les résultats suggèrent fortement que la signalisation par le TcR en présence de Nef dépendrait principalement de l'activité catalytique de Lck. Ces événements semblent en quelque sorte mener à l'exclusion de Zap-70, ce qui pourrait en partie expliquer le blocage lors de la transmission du signal par le TcR. Ce processus serait associé au dysfonctionnement de la transition des cellules DP vers CD4⁺ SP.

Le sauvetage de la fonction de Lck dans la phosphorylation de Zap-70 est associé à la génération des cellules CD4⁺ SP dans les thymocytes Lck Y505F/Nef+

Plusieurs mécanismes d'action de Nef sur Lck pourraient expliquer le sauvetage de la fonction de Lck et de la génération des cellules CD4⁺ SP. Une donnée préliminaire issue

de notre laboratoire a préalablement démontré que l'expression de Lck dans les thymocytes Lck Y505F/Nef⁺ était augmentée d'environ deux fois comparativement aux thymocytes Nef⁺ (Chrobak et *al*, 2010). Selon notre hypothèse de départ disant que Nef réduit l'accumulation de Lck à proximité du TcR, cette hausse d'expression de Lck pourrait contribuer à rétablir les niveaux de Lck disponibles à la signalisation par le TcR. Également, nous avons démontré que malgré la faible expression de la forme constitutivement active de Lck Y505F, Nef a la capacité d'augmenter l'activité kinase intrinsèque de Lck de façon phénoménale (**Figure 23B, p.98**). Les résultats suggèrent que Nef lie et/ou active préférentiellement la forme constitutivement active de Lck Y505F, probablement parce que Lck adopterait une configuration tridimensionnelle plus favorable. Étonnamment, nous avons observé que Nef a également un effet sur le ratio des différentes formes moléculaires de Lck, spécialement en augmentant la forme phosphorylée sur les tyrosines 394 et 505 simultanément. Jusqu'à récemment, cette forme active de Lck était observée qu'uniquement suite à un traitement des cellules au peroxyde d'hydrogène (Harwick et Sefton, 1997). Par contre, une récente étude a démontré que cette forme, désignée DPho-active Lck, était exprimée dans plusieurs populations de lymphocytes avec une activité catalytique comparable à la forme active de Lck phosphorylée que sur la tyrosine 394 (Nika et *al*, 2010). En accord avec les résultats de Nika et *al*, l'essai kinase *in vitro* a démontré que cette forme était catalytiquement active (**Figure 24, p.99**). De plus, nous avons démontré que l'expression de Nef favorise la génération de la forme DPho-active Lck et que ce mécanisme pourrait être amplifié suite à une hausse de son activité kinase. Les résultats supportent bien les données d'une étude où les auteurs ont démontré que Nef pouvait activer Hck sans la déphosphorylation du site inhibiteur en tyrosine 501 (Lerner et *al*, 2002), suggérant que Nef pourrait utiliser un mécanisme d'action similaire dans le processus d'activation des Src kinases. Jusqu'à maintenant, aucun effet biologique n'a été démontré suite au débalancement des différentes formes moléculaires de Lck. Par contre, ces mécanismes de régulation distincts pourraient être en faveur de l'accumulation de Lck et l'augmentation de son activité catalytique en présence de Nef. Dans la récente

étude de Nika et *al*, les auteurs ont émis l'hypothèse que la génération de la forme DPho-active Lck pourrait être le résultat d'une différente distribution de Lck à la membrane, où la forme active phosphorylée en tyrosine 394 serait soumise à une plus forte activité kinase de Csk et, par conséquent, serait à l'abri de l'activité phosphatase de CD45. Ce mécanisme préserverait la phosphorylation en tyrosine 505. Fait intéressant, cette hypothèse corrèle avec nos résultats précédents qui ont démontré un enrichissement de Lck dans les microdomaines membranaires (**Figure 13B, p.81; Figure 22, p.96**), où Csk réside et CD45 est exclus (Rodgers et Rose, 1996; Tani-ichi et *al*, 2005). Quoique ce soit le mécanisme exact, Nef semble avoir un effet catalyseur sur la forme constitutivement active de Lck Y505F. Cette forte augmentation de l'activité kinase de Lck détectée dans les thymocytes doubles transgéniques Lck Y505F/Nef⁺ coïncide étroitement avec la chute drastique de l'expression de c-Cbl, où nous avons observé une baisse d'expression d'approximativement 50% comparativement aux thymocytes Nef⁺ (**Figure 25, p.100**). Les résultats indiquent que Nef et la forme constitutivement active de Lck Y505F collaborent dans le processus de dégradation de c-Cbl. Puisque la PKC θ est connue pour être activée dans le «Nef-associated kinase complex» (NAKC) contenant Lck (White et *al*, 2008), un des mécanismes pourrait l'impliquer dans le processus d'ubiquitination et de dégradation de c-Cbl par le protéasome, comme rapporté dans un récent ouvrage (Gruber et *al*, 2009). Quoiqu'il en soit, puisque c-Cbl est requis pour la dégradation de Lck, cela pourrait également expliquer l'importante accumulation de Lck à proximité du TcR pour contribuer au sauvetage de la phosphorylation de Zap-70 en tyrosine 493 (**Figure 26C, p.103**), rapportée pour être altérée dans les thymocytes Nef⁺. Fait intéressant, le niveau d'augmentation de la phosphorylation en tyrosine 493 détecté dans les thymocytes Lck Y505F/Nef⁺ a été comparable à celui mesuré dans les thymocytes Nef⁻ suite à une stimulation par un α -CD3 ϵ α -CD4 (**Figures 18C p.89; 26C, p.103**). Ce niveau de phosphorylation en absence de stimuli suggère fortement que la signalisation par le TcR est beaucoup moins dépendante du corécepteur CD4. Également, ces résultats indiquent que Lck a retrouvé sa capacité de phosphoryler Zap-70 en tyrosine 493 (**Figures 26C, p.103**),

mécanisme directement impliqué dans l'augmentation de son activité catalytique (**Figure 27, p.104**). La forte activité kinase de Lck semble contrer les effets négatifs de Nef rapportés dans les thymocytes Nef⁺. L'altération de la spécificité de phosphorylation par Nef a d'ailleurs été évaluée en comparant les niveaux de phosphorylation de Zap-70 entre les thymocytes Nef⁺ et Lck Y505F. Pour une phosphorylation de Lck en tyrosine 394 (**Figure 23A, p.97**) et une activité kinase similaire (**Figures 23B, p.98**), les niveaux de phosphorylation de Zap-70 sur les tyrosines 292 et 493 ont été largement inférieurs dans les thymocytes Nef⁺, avec des rendements d'environ 31% et 23% respectivement (**Figures 26A-C; p.101-103**). Toutefois, la phosphorylation en tyrosine 319 a été moins affectée, avec un rendement d'environ 80% de celle détectée dans les thymocytes Lck Y505F. Ces résultats supportent fortement l'hypothèse que la délocalisation de Lck et le déséquilibre du ratio de Lck libres/Lck liées au corécepteur CD4 modifie la spécificité de Lck envers la phosphorylation de Zap-70 sur certains sites. En continuité avec cette affirmation, nous croyons que la spécificité d'action de Zap-70 pour ses substrats, en dépit de sa faible activité kinase, pourrait également être modifiée en présence de Nef. Une expérience dans laquelle serait mesurée que la contribution de Zap-70 pour la phosphorylation envers des sites spécifiques de LAT, son premier substrat en aval, pourrait permettre d'établir une corrélation entre la spécificité de la kinase et les altérations retrouvées dans la voie du TcR. Quoiqu'il en soit, l'action de Nef sur la modulation de l'activité et de la spécificité d'un éventail de kinases, dont en autres PAK2, confère à Nef un avantage pour la régulation de l'intensité et de la durée du signal par le TcR, processus associés aux divers phénotypes.

Finalement, la faible expression de la forme constitutivement active de Lck Y505F en présence de Nef indique que le seuil d'activité par Lck et Zap-70 est atteint, comme l'a démontré l'hyperphosphorylation de tous les substrats en aval de ces deux kinases dont spécialement LAT (**Figure 29, p.106**). Les résultats suggèrent fortement que le rétablissement de la fonction de Lck associé à la hausse de la signalisation par le TcR, contribue au sauvetage de la génération des cellules CD4⁺ dans les thymocytes Lck Y505F/Nef⁺, ce qui confirme que Nef altère la fonction de Lck dans les thymocytes Nef⁺.

CHAPITRE 8 : Conclusion

Nos données ont démontré que Nef altère la fonction de Lck dans les thymocytes de souris CD4C/HIV^{Nef}, ayant pour conséquences la déplétion et le blocage de la transition des cellules DP vers CD4⁺. Toutefois, ce phénotype a été sauvé par la faible expression de la forme constitutivement active de Lck Y505F. L'intensité et la durée du signal par le TcR sont deux facteurs clés impliqués dans le processus de maturation des lymphocytes et sont largement dépendants de l'activité catalytique de Lck et de son habileté à lier la queue cytoplasmique du corécepteur CD4. La régulation spatio-temporelle de Lck s'effectue de façon très précise et la baisse d'expression du corécepteur de surface CD4 dans les thymocytes CD4C/HIV^{Nef} affecte la localisation de Lck et, par conséquent, semble diminuer l'efficacité de son recrutement à proximité du TcR. La protection de Lck contre la dégradation par l'ubiquitine ligase c-Cbl et le contrôle de sa spécificité à phosphoryler et à activer la kinase Zap-70, représente des mécanismes moléculaires employés par Nef pour contrôler l'intensité et la durée du signal par le TcR. Bien que la signalisation par le TcR soit dans un état d'activation constitutive largement dépendant de l'activité kinase de Lck, elle ne répond pas efficacement aux stimuli, que se soit par le TcR, le corécepteur CD4 ou encore par les deux simultanément. Le contrôle du métabolisme de la cellule par Nef pourrait contribuer à un environnement intracellulaire favorable à la réplication du VIH-1. Finalement, cette étude nous a permis de mieux comprendre comment Nef modifie la signalisation par le TcR par l'entremise de Lck. Concrètement, cela pourrait contribuer à la mise en place d'une stratégie qui mènerait à l'utilisation de drogues pouvant agoniser et augmenter l'activité catalytique de Lck pour contrer les effets de Nef sur la déplétion et la maturation des cellules CD4⁺ SP dans la pathogenèse du SIDA.

Bibliographie

Site internet : <http://www.unaids.org>

Références bibliographiques

- Adamson CS, Salzwedel K, Freed EO. 2009. «Virus maturation as a new HIV-1 therapeutic target». *Expert Opin Ther Target* 13(8):895-908.
- Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. 1994. «Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain». *Cell* 76(5):853-64.
- Aiken C, Trono D. 1995. «Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis». *J Virol.* 69(8):5048-56.
- Aldrovandi GM, Zack JA. 1996. «Replication and pathogenicity of human immunodeficiency virus type 1 accessory gene mutants in SCID-hu mice». *J Virol.* 3:1505-11.
- Alexander M, Bor YC, Ravichandran KS, Hammarskjöld ML, Rekosh D. 2004. «Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with lipid rafts to downmodulate cell surface CD4 and class I major histocompatibility complex expression and to increase viral infectivity». *J Virol.* 78(4):1685-96.
- Anderson SJ, Levin SD, Perlmutter RM. 1993. «Protein tyrosine kinase p56lck controls allelic exclusion of T-cell receptor beta-chain genes». *Nature* 365(6446):552-554.
- Arhel N, Lehmann M, Clauss K, Nienhaus GU, Piguet V, Kirchhoff F. 2009. «The inability to disrupt the immunological synapse between infected human T cells and APCs distinguishes HIV-1 from most other primate lentiviruses». *J Clin Invest.* 119(10):2965-75.
- Arold ST, Baur AS. 2001. «Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein». *Trends Biochem Sci.* 26(6):356-63.
- Arold S, Franken P, Strub MP, Hoh F, Benichou S, Benarous R, Dumas C. 1997. «The crystal structure of HIV-1 Nef protein bound to the Fyn kinase SH3 domain suggests a role for this complex in altered T cell receptor signalling». *Structure.* 5(10):1361-72.
- Arold S., R. O'Brien, P. Franken, M. P. Strub, F. Hoh, C. Dumas, and J. E. Ladbury. 1998. «RT loop flexibility enhances the specificity of Src family SH3 domains for HIV-1 Nef». *Biochemistry* 37:14683-14691.

- Arora, V. K., B. L. Fredericksen, and J. V. Garcia. 2002. «Nef: agent of cell subversion». *Microbes Infect.* 4:189-199.
- Artyomov MN, Lis M, Devadas S, Davis MM, Chakraborty AK. 2010. «CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(39):16916-21.
- Ashe JM, Wiest DL, Abe R, Singer A. 1999. «ZAP-70 protein promotes tyrosine phosphorylation of T cell receptor signaling motifs (ITAMs) in immature CD4(+)8(+) thymocytes with limiting p56(lck)». *J Exp Med.* 189(7):1163-8.
- Atkins KM, Thomas L, Youker RT, Harriff MJ, Pissani F, You H, Thomas G. 2008. «HIV-1 Nef Binds PACS-2 to Assemble a Multikinase Cascade That Triggers Major Histocompatibility Complex Class I (MHC-I) Down-regulation: ANALYSIS USING SHORT INTERFERING RNA AND KNOCK-OUT MICE». *J Biol Chem.* 283:11772-11784.
- Bachand, F., Yao, X. J., Hrimech, M., Rougeau, N. & Cohen, E. 1999. «Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 Gag precursor». *J Biol Chem.* 274, 9083–9091.
- Badley AD, Pilon AA, Landay A, Lynch DH. 2000. «Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis». *Blood* 96(9):2951-64.
- Badour K, Zhang J, Shi F, Leng Y, Collins M, Siminovitch KA. 2004. «Fyn and PTP-PEST-mediated regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) tyrosine phosphorylation is required for coupling T cell antigen receptor engagement to WASp effector function and T cell activation». *J Exp Med.* 199(1):99-112.
- Bamburg, J. R., and B. W. Bernstein. 2008. «ADF/cofilin». *Curr. Biol.* 18:273-275.
- Bandres JC, Shaw AS, Ratner L. 1995. «HIV-1 Nef protein downregulation of CD4 surface expression: relevance of the lck binding domain of CD4». *Virology* 207:338–41.
- Baniyash M. 2004. «TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response». *Nat Rev Immunol.* 4(9):675-87.
- Bannwarth S, Gatignol A. 2005. «HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host». *Curr HIV Res.* 3:61–71.

- Barda-Saad M, Shirasu N, Pauker MH, Hassan N, Perl O, Balbo A, Yamaguchi H, Houtman JC, Appella E, Schuck P, Samelson LE. 2010. «Cooperative interactions at the SLP-76 complex are critical for actin polymerization». *EMBO J.* 29(14):2315-28.
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. 1983. «Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)». *Science* 220(4599):868-71.
- Baur A S, Sass G, Laffert B, Willbold D, Cheng-Mayer C and Peterlin B M. 1997. «The N-terminus of Nef from HIV-1/SIV associates with a protein complex containing Lck and a serine kinase». *Immunity* 6:283–291.
- Baur A S, Sawai E T, Dazin P, Fantl W J, Cheng-Mayer C, Peterlin B M. 1994. «HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization». *Immunity* 1:373–384.
- Benichou S, Bomsel M, Bodéus M, Durand H, Douté M, Letourneur F, Camonis J, Benarous R. 1994. «Physical interaction of the HIV-1 Nef protein with beta-COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic». *J Biol Chem.* 269(48):30073-6.
- Berkowitz R.D., Luban J., Goff S.P. 1993. «Specific binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein and nucleocapsid protein to viral RNAs detected by RNA mobility shift assays». *J. Virol.* 67:7190–7200.
- Blagoveshchenskaya AD, Thomas L, Feliciangeli SF, Hung CH, Thomas G. 2002. «HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway». *Cell* 111(6):853-66.
- Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. 1997. «The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(5):1925-30.
- Boggon, T.J., and Eck, M.J. 2004. «Structure and regulation of Src family kinases». *Oncogene* 23:7918–7927.
- Bour S, Schubert U, Strebel K. 1995. «The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation». *J Virol.* 69:1510–1520.

- Bosco, M. C., R. E. Curiel, A. H. Zea, M. G. Malabarba, J. R. Ortaldo, and I. Espinoza-Delgado. 2000. «IL-2 signaling in human monocytes involves the phosphorylation and activation of p59hck». *J.Immunol.* 164:4575-4585.
- Briese L, Preusser A, Willbold D. 2005. «Mapping the binding site of full length HIV-1 Nef on human Lck SH3 by NMR spectroscopy». *J Biomed Sci.* 12(3):451-6.
- Briggs SD, Scholtz B, Jacque JM, Swingler S, Stevenson M, Smithgall TE. 2001. «HIV-1 Nef promotes survival of myeloid cells by a Stat3-dependent pathway». *J Biol Chem.* 276(27):25605-11.
- Briggs SD, Sharkey M, Stevenson M, Smithgall TE. 1997. «SH3-mediated Hck tyrosine kinase activation and fibroblast transformation by the Nef protein of HIV-1». *J Biol Chem.* 272(29):17899-902.
- Brown PO. 1997. «Integration». In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Brown, M. T. and J. A. Cooper. 1996. «Regulation, substrates and functions of src». *Biochim.Biophys.Acta* 1287:121-149.
- Brown, A., X. Wang, E. Sawai, and C. Cheng-Mayer. 1999. «Activation of the PAK-related kinase by human immunodeficiency virus type 1 Nef in primary human peripheral blood lymphocytes and macrophages leads to phosphorylation of a PIX-p95 complex». *J. Virol.* 73:9899-9907.
- Bryant, M., and L. Ratner. 1990. «Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:523–527.
- Buday L, Khwaja A, Sipeki S, Faragó A, Downward J. 1996. «Interactions of Cbl with two adapter proteins, Grb2 and Crk, upon T cell activation». *J Biol Chem.* 271(11):6159-63.
- Buonocore L, Rose JK. 1993. Blockade of human immunodeficiency virus type 1 production in CD4+ T cells by an intracellular CD4 expressed under control of the viral long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:2695–2699.
- Bushman FD, Craigie R. 1991. «Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA». *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:1339–43.

- Butticaz C, Michielin O, Wyniger J, Telenti A, Rothenberger S. 2007. «Silencing of both beta-TrCP1 and HOS (beta-TrCP2) is required to suppress human immunodeficiency virus type 1 Vpu-mediated CD4 down-modulation». *J Virol.* 81:1502–1505.
- Campbell EM, Nunez R, Hope TJ. 2004. «Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity». *J Virol.* 78(11):5745-55.
- Carréno, S., M. E. Gouze, S. Schaak, L. J. Emorine, and I. Maridonneau-Parini. 2000. «Lack of palmitoylation redirects p59Hck from the plasma membrane to p61Hck-positive lysosomes». *J. Biol. Chem.* 275: 36223–36229.
- Chan AC, Dalton M, Johnson R, Kong GH, Wang T, Thoma R, Kurosaki T. 1995. «Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function». *EMBO J.* 14(11):2499-508.
- Chan D, Kim P. 1998. «HIV entry and its inhibition». *Cell* 93(5):681–4.
- Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D. 1998. «Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx». *Science* 281(5384):1860-3.
- Chang, F., Re, F., Sebastian, S., Sazer, S. & Luban, J. 2004. «HIV-1 Vpr induces defects in mitosis, cytokinesis, nuclear structure, and centrosomes». *Mol Biol Cell* 15:1793–1801.
- Chaudhry, A., S. R. Das, A. Hussain, S. Mayor, A. George, V. Bal, S. Jameel, and S. Rath. 2005. «The Nef protein of HIV-1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs». *J. Immunol.* 175:4566-4574.
- Cheng, H., J. P. Hoxie, and W. P. Parks. 1999. «The conserved core of human immunodeficiency virus type 1 Nef is essential for association with Lck and for enhanced viral replication in T-lymphocytes». *Virology* 264:5-15.
- Cheng-Mayer C., Seto D., Tateno M., Levy J.A. 1988. «Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host». *Science* 240:80–82.
- Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. 1996. «The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates». *Cell* 85(7):1135-48.

- Choi HJ, Smithgall TE. 2004. «Conserved residues in the HIV-1 Nef hydrophobic pocket are essential for recruitment and activation of the Hck tyrosine kinase». *J Mol Biol.* 343(5):1255-68.
- Chowers MY, Spina CA, Kwoh TJ, Fitch NJ, Richman DD, Guatelli JC. 1994. «Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene». *J Virol.* 68(5):2906-14.
- Chrobak P, Simard MC, Bouchard N, Ndolo TM, Guertin J, Hanna Z, Dave V, Jolicoeur P. 2010. «HIV-1 Nef disrupts maturation of CD4+ T cells through CD4/Lck modulation». *J Immunol.* 185(7):3948-59.
- Coetzer M, Nedellec R, Cilliers T, Meyers T, Morris L, Mosier DE. 2011. «Extreme genetic divergence is required for coreceptor switching in HIV-1 subtype C». *J Acquir Immune Defic Syndr.* 56(1):9-15.
- Craig HM, Pandori MW, Guatelli JC. 1998. «Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity». *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:11229-11234.
- Chu PC, Wu J, Liao XC, Pardo J, Zhao H, Li C, Mendenhall MK, Pali E, Shen M, Yu S, Taylor VC, Aversa G, Molineaux S, Payan DG, Masuda ES. 2004. «A novel role for p21-activated protein kinase 2 in T cell activation». *J Immunol.* 172(12):7324-34.
- Clark S.J., Saag M.S., Decker W.D., Campbell-Hill S., Roberson J.L., Veldkamp P.J., Kappes J.C., Hahn B.H., Shaw G.M. 1991. «High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection». *N. Engl. J. Med.* 324:954-960.
- Coffin, J.M. 1990. «Retroviridae and their replication». In B.N. Fields and D.M. Knipe (eds.) *Virology.* p1437-1500. *Raven Press.* New York, N.Y.
- Coffin J.M. 1992. «Structure and classification of retroviruses». In *The Retroviridae* (ed. J.A. Levy) 1:19-50. *Plenum Press,* New York.
- Coffin J.M. 1992a. «Structure and classification of retroviruses». In *The retroviridae* (ed. J.A. Levy) 19-49. *Plenum Press,* New York.
- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. 1997. «Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA». *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (NY).

- Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL, Baltimore D. 1999. «The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells». *Immunity*.10:661–71.
- Collette Y, Dutartre H, Benziane A, Olive D. 1997. «The role of HIV-1 Nef in T-cell activation: Nef impairs induction of Th1 cytokines and interacts with the Src family tyrosine kinase Lck». *Res Virol*.148(1):52-8.
- Collette Y, Dutartre H, Benziane A, Ramos M, Benarous R, Harris M and Olive D. 1996. «Physical and functional interaction of Nef with Lck». HIV-1 Nef-induced T-cell signalling defects; *J. Biol. Chem.* 271:6333–6341.
- Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. 1998. «HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes». *Nature* 391:397–401.
- Cooke, M. P. and R. M. Perlmutter. 1989. «Expression of a novel form of the fyn proto-oncogene in hematopoietic cells». *New Biol.* 1:66-74.
- Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA, Hunter T. 1986. «Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation». *Science* 231(4744):1431-4.
- Corbitt G, Bailey AS, Williams G. 1990. «HIV infection in Manchester, 1959». *Lancet*. 336(8706):51.
- Crise B, Buonocore L, Rose JK. 1990. «CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor». *J Virol*. 64:5585–5593.
- Cullen BR. 1998. «HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell». *Cell* 93(5):685-92.
- Dannull J., Surovoy A., Jung G., Moelling K. 1994. «Specific binding of HIV-1 nucleocapsid protein to PSI RNA in vitro requires N-terminal zinc finger and flanking basic residues». *EMBO J.* 13:1525–1533.
- Davis SJ, van der Merwe PA. 2011. «Lck and the nature of the T cell receptor trigger». *Trends Immunol.* 32(1):1-5.

- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. 1996. «Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1». *Nature* 381(6584):661-6.
- deRocquigny H., Gabus C., Vincent A., Fournie-Zaluski M.C., Roques B.P., Darlix J.-L. 1992. «Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers». *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:6472–6476.
- Di Bartolo V, Mège D, Germain V, Pelosi M, Dufour E, Michel F, Magistrelli G, Isacchi A, Acuto O. 1999. «Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signalling». *J Biol Chem.* 274(10):6285-94.
- Ding J, Das K, Hsio Y, Sarafianos SG, Clark ADJ, Jacobo-Molina A, Tantillo C, Hughes SH, Arnold E. 1998. «Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8Å resolution». *J Mol Biol.* 284:1095–1111.
- Djordjevic JT, Schibeci SD, Stewart GJ, Williamson P. 2004. «HIV type 1 Nef increases the association of T cell receptor (TCR)-signaling molecules with T cell rafts and promotes activation-induced raft fusion». *AIDS Res Hum Retroviruses.* 20(5):547-55.
- Dutartre, H., M. Harris, D. Olive, and Y. Collette. 1998. «The human immunodeficiency virus type 1 Nef protein binds the Src-related tyrosine kinase Lck SH2 domain through a novel phosphotyrosine independent mechanism». *Virology* 247:200-211.
- Duus KM, Miller ED, Smith JA, Kovalev GI, Su L. 2001. «Separation of human immunodeficiency virus type 1 replication from nef-mediated pathogenesis in the human thymus». *J Virol.* 75(8):3916-24.
- Dykstra M, Cherukuri A, Sohn HW, Tzeng SJ, Pierce SK. 2003. «Location is everything: lipid rafts and immune cell signalling». *Annu Rev Immunol.* 21:457-81.
- Earl PL, Moss B, Doms RW. 1991. «Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein». *J Virol.* 65(4):2047-55.

- Eck MJ, Shoelson SE, Harrison SC. 1993. «Recognition of a high-affinity phosphotyrosyl peptide by the Src homology-2 domain of p56lck». *Nature* 362(6415):87-91.
- Egberink H, Horzinek MC. 1992. «Animal immunodeficiency viruses». *Vet Microbiol.* 33(1-4):311-31.
- Erdtmann L, Janvier K, Raposo G, Craig HM, Benaroch P, Berlioz-Torrent C, Guatelli JC, Benarous R, Benichou S. 2000. «Two independent regions of HIV-1 Nef are required for connection with the endocytic pathway through binding to the mu 1 chain of AP1 complex». *Traffic* 1(11):871-83.
- Fackler OT, Kienzle N, Kremmer E, Boese A, Schramm B, Klimkait T, Kücherer C, Mueller-Lantzsch N. 1997. «Association of human immunodeficiency virus Nef protein with actin is myristoylation dependent and influences its subcellular localization». *Eur J Biochem.* 247(3):843-51.
- Fackler OT, Lu X, Frost JA, Geyer M, Jiang B, Luo W, Abo A, Alberts AS, Peterlin BM. 2000. «p21-activated kinase 1 plays a critical role in cellular activation by Nef». *Mol Cell Biol.* 20(7):2619-27.
- Fackler OT, Luo W, Geyer M, Alberts AS, Peterlin BM. 1999. «Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions». *Mol Cell.* 3(6):729-39.
- Felzien, L. K., Woffendin, C., Hottiger, M. O., Subbramanian, R. A., Cohen, E. A. & Nabel, G. J. 1998. «HIV transcriptional activation by the accessory protein, VPR, is mediated by the p300 co-activator». *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5281–5286.
- Fenard D, Yonemoto W, de Noronha C, Cavrois M, Williams SA, Greene WC. 2005. «Nef is physically recruited into the immunological synapse and potentiates T cell activation early after TCR engagement». *J Immunol.* 175(9):6050-7.
- Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA, Schreiber SL. 1994. «Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions». *Science* 266(5188):1241-7.
- Fisher AG, Ensoli B, Ivanoff L, Chamberlain M, Petteway S, Ratner L, Gallo RC, Wong-Staal F. 1987. «The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro». *Science* 237:888–893.
- Foti M, Mangasarian A, Piguet V, Lew DP, Krause KH, Trono D, Carpentier JL. 1997. «Nef-mediated clathrin-coated pit formation». *J Cell Biol.* 139:37-47.

- Frank S J, Samelson L E and Klausner R D. 1990. «The structure and signalling functions of the invariant T cell receptor components». *Semin. Immunol.* 2:89–97.
- Freed EO, Myers DJ, Risser R. 1990. «Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(12):4650-4.
- Freund J, Kellner R, Konvalinka J, Wolber V, Kräusslich HG, Kalbitzer HR. 1994. «A possible regulation of negative factor (Nef) activity of human immunodeficiency virus type 1 by the viral protease». *Eur J Biochem.* 223(2):589-93.
- Friedrichson T, Kurzchalia TV. 1998. «Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking». *Nature* 394(6695):802-5.
- Fuentes GM, Rodriguez-Rodriguez L, Palaniappan C, Fay PJ, Bambara RA. 1996. «Strand displacement synthesis of the long terminal repeats by HIV reverse transcriptase». *J Biol Chem.* 271:1966–1971.
- Funke I, Hahn A, Rieber EP, Weiss E, Riethmüller G. 1987. «The cellular receptor (CD4) of the human immunodeficiency virus is expressed on neurons and glial cells in human brain». *J Exp Med.* 165(4):1230-5.
- Gaines H., von Sydow M.A., von Stedingk L.V., Biberfeld G., Bottiger B., Hansson L.O., Lundbergh P., Sonnerborg A.B., Wasserman J., Strannegaard O.O. 1990. «Immunological changes in primary HIV-1 infection». *AIDS* 4:995–999.
- Ganser-Pornillos BK, von Schwedler UK, Stray KM, Aiken C, Sundquist WI. 2004. «Assembly properties of the human immunodeficiency virus type 1 CA protein». *J Virol.* 78(5):2545-52.
- Garcia JV, Miller AD. 1991. «Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef». *Nature* 350:508–11.
- Geleziunas R, Bour S, Wainberg MA. 1994. «Cell surface down-modulation of CD4 after infection by HIV-1». *FASEB J.* 8(9):593-600.
- Geleziunas R, Xu W, Takeda K, Ichijo H, Greene WC. 2001. «HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell». *Nature* 410(6830):834-8.

- Gelkop S, Gish GD, Babichev Y, Pawson T, Isakov N. 2005. «T cell activation-induced CrkII binding to the Zap70 protein tyrosine kinase is mediated by Lck-dependent phosphorylation of Zap70 tyrosine 315». *J Immunol.* 175(12):8123-32.
- Geyer M, Munte CE, Schorr J, Kellner R, Kalbitzer HR. 1999. «Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein». *J Mol Biol.* 289(1):123-38.
- Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, and M. De Wilde. 1989. «Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells». *Cell* 59:103–112.
- Goila-Gaur R, Strebel K. 2008. «HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity». *Retrovirology* 5:51.
- Gonda MA, Braun MJ, Clements JE, Pyper JM, Wong-Staal F, Gallo RC, Gildea RV. 1986. «Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(11):4007-11.
- Göttlinger H.G., Dorfman T., Sodroski J.G., Haseltine W.A. 1991. «Effect of mutations affecting the p6 Gag protein on human immunodeficiency virus particle release». *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:3195–3199.
- Göttlinger, H. G., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1989. «Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:5781– 5785.
- Greenberg ME, Bronson S, Lock M, Neumann M, Pavlakis GN, Skowronski J. 1997. «Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation». *Embo J.* 16:6964-6976.
- Greenway A, Azad A and McPhee D. 1995. «Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits activation pathways in peripheral blood mononuclear cells and T-cell lines». *J. Virol.* 69:1842–1850.
- Greenway A, Azad A, Mills J and McPhee D. 1996. «Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds directly to Lck and mitogen-activated protein kinase, inhibiting kinase activity». *J. Virol.* 70:6701–6708.

- Greenway A L, Dutartre H, Allen K, McPhee D A, Olive D and Collette Y. 1999. «Simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 1 nef proteins show distinct patterns and mechanisms of Src kinase activation». *J. Virol.* 73:6152–6158
- Greenway AL, McPhee DA, Allen K, Johnstone R, Holloway G, Mills J, Azad A, Sankovich S, Lambert P. 2002. «Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis». *J Virol.* 76(6):2692-702.
- Greenway AL, McPhee DA, Grgacic E, Hewish D, Lucantoni A, Macreadie I, Azad A. 1994. «Nef 27, but not the Nef 25 isoform of human immunodeficiency virus-type 1 pNL4.3 down-regulates surface CD4 and IL-2R expression in peripheral blood mononuclear cells and transformed T cells». *Virology.* 198(1):245-56.
- Grewe B, Uberla K. 2010. «The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: ménage à trois during the early phase of the lentiviral replication cycle». *J Gen Virol.* 91(8):1893-7.
- Groom, H. C., Anderson, E. C. & Lever, A. M. 2009. «Rev: beyond nuclear export». *J Gen Virol.* 90:1303–1318.
- Groves, T., P. Smiley, M. P. Cooke, K. Forbush, R. M. Perlmutter, and C. J. Guidos. 1996. «Fyn can partially substitute for Lck in T lymphocyte development». *Immunity* 5:417-428.
- Gruber T, Hermann-Kleiter N, Hinterleitner R, Fresser F, Schneider R, Gastl G, Penninger JM, Baier G. 2009. «PKC-theta modulates the strength of T cell responses by targeting Cbl-b for ubiquitination and degradation». *Sci Signal.* 23;2(76):ra30.
- Grzesiek S, Bax A, Hu JS, Kaufman J, Palmer I, Stahl SJ, Tjandra N, Wingfield PT. 1997. «Refined solution structure and backbone dynamics of HIV-1 Nef». *Protein Sci.* 6:1248-1263.
- Grzesiek S, Stahl SJ, Wingfield PT, Bax A. 1996. «The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef». Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* 35(32):10256-61.
- Guy B, Kieny MP, Riviere Y, Le Peuch C, Dott K, Girard M, Montagnier L, Lecocq JP. 1987. «HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product». *Nature* 330:266-269.

- Haller C, Rauch S, Fackler OT. 2007. «HIV-1 Nef employs two distinct mechanisms to modulate Lck subcellular localization and TCR induced actin remodelling». *PLoS One*. 2(11):1212.
- Hanna Z, Kay DG, Rebai N, Guimond A, Jothy S, Jolicoeur P. 1998. «Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice». *Cell* 95(2):163-75.
- Hanna Z, Priceputu E, Chrobak P, Hu C, Dugas V, Goupil M, Marquis M, de Repentigny L, Jolicoeur P. 2009. «Selective expression of human immunodeficiency virus Nef in specific immune cell populations of transgenic mice is associated with distinct AIDS-like phenotypes». *J Virol*. 83(19):9743-58.
- Hanna, Z., X. Weng, D. G. Kay, J. Poudrier, C. Lowell, and P. Jolicoeur. 2001. «The pathogenicity of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Nef in CD4C/HIV transgenic mice is abolished by mutation of its SH3-binding domain, and disease development is delayed in the absence of Hck». *J. Virol*. 75: 9378–9392.
- Hardwick JS, Sefton BM. 1997. «The activated form of the Lck tyrosine protein kinase in cells exposed to hydrogen peroxide is phosphorylated at both Tyr-394 and Tyr-505». *J Biol Chem*. 272(41):25429-32.
- Hashimoto-Tane A, Yokosuka T, Ishihara C, Sakuma M, Kobayashi W, Saito T. 2010. «T-cell receptor microclusters critical for T-cell activation are formed independently of lipid raft clustering». *Mol Cell Biol*. 30(14):3421-9.
- Hazenbergh, M. D., S. A. Otto, B. H. van Benthem, M. T. Roos, R. A. Coutinho, J. M. Lange, D. Hamann, M. Prins, and F. Miedema. 2003. «Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS». *AIDS* 17:1881-1888.
- Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. 2003. «CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells». *Annu Rev Immunol*. 21:107-37.
- Hiscott J, Kwon H, Génin P. 2001. «Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway». *J Clin Invest*. 107(2):143-51.
- Hochrein JM, Wales TE, Lerner EC, Schiavone AP, Smithgall TE, Engen JR. 2006. «Conformational features of the full-length HIV and SIV Nef proteins determined by mass spectrometry». *Biochemistry*. 45(25):7733-9.

- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. 1995. «Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection». *Nature*. 373(6510):123-6.
- Hodge DR, Dunn KJ, Pei GK, Chakrabarty MK, Heidecker G, Lautenberger JA, Samuel KP. 1998. «Binding of c-Raf1 kinase to a conserved acidic sequence within the carboxyl-terminal region of the HIV-1 Nef protein». *J Biol Chem*. 273(25):15727-33.
- Horak I D, Gress R E, Lucas P J, Horak E M, Waldmann T A and Bolen J B. 1991. «T-lymphocyte interleukin 2-dependent tyrosine protein kinase signal transduction involves the activation of p56lck». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1996– 2000.
- Horenkamp FA, Breuer S, Schulte A, Lülff S, Weyand M, Saksela K, Geyer M. 2011. «Conformation of the dileucine based sorting motif in HIV-1 Nef revealed by intermolecular domain assembly». *Traffic*. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01205.x.
- Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC. 1998. «Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance». *Science*. 282:1669–1675.
- Huber HE, McCoy JM, Sehra JS, Richardson CC. 1989. «Human Immunodeficiency Virus 1 reverse transcriptase». *J Biol Chem*.264:4669–4678.
- Hubbard SR, Till JH. 2000. «Protein tyrosine kinase structure and function». *Annu Rev Biochem*. 69:373-98.
- Iafate AJ, Bronson S, Skowronski J. 1997. «Separable functions of Nef disrupt two aspects of T cell receptor machinery: CD4 expression and CD3 signaling». *EMBO J*. 16(4):673-84.
- Jabbar MA, Nayak DP. 1990. «Intracellular interaction of human immunodeficiency virus type 1 (ARV-2) envelope glycoprotein gp160 with CD4 blocks the movement and maturation of CD4 to the plasma membrane». *J Virol*. 64:6297–6304.
- Janardhan A, Swigut T, Hill B, Myers MP, Skowronski J. 2004. «HIV-1 Nef binds the DOCK2-ELMO1 complex to activate rac and inhibit lymphocyte chemotaxis». *PLoS Biol*. 2(1):E6.
- Jiang Y, Cheng H. . 2007. «Evidence of LAT as a dual substrate for Lck and Syk in T lymphocytes». *Leuk Res*. 31(4):541-5.

- Johnson DR, Bhatnagar RS, Knoll LJ, Gordon JI. 1994. «Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation». *Annu Rev Biochem.* 63:869-914.
- Jowett, J. B., Xie, Y. M. & Chen, I. S. Y. 1999. «The presence of human immunodeficiency virus type 1 Vpr correlates with a decrease in the frequency of mutations in a plasmid shuttle vector». *J Virol* 73:7132–7137.
- Kabouridis PS, Janzen J, Magee AL, Ley SC. 2000. «Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes». *Eur J Immunol.* 30(3):954-63.
- Kanazawa S, Ilić D, Hashiyama M, Noumura T, Yamamoto T, Suda T, Aizawa S. 1996. «p59fyn-p125FAK cooperation in development of CD4+CD8+ thymocytes». *Blood* 87(3):865-70.
- Karn J. 1999. «Tackling Tat». *J Mol Biol.* 293:235–254.
- Kedzierska K, Vardaxis NJ, Jaworowski A, Crowe SM. 2001. «FcγR-mediated phagocytosis by human macrophages involves Hck, Syk, and Pyk2 and is augmented by GM-CSF». *J Leukoc Biol.* 70(2):322-8.
- Killeen N, Littman DR. 1993. «Helper T-cell development in the absence of CD4-p56lck association». *Nature.* 364(6439):729-32.
- Kestler III, H.W., Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D., Desrosiers, R.C., 1991. «Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS». *Cell* 65 (4):651-662.
- Klotman ME, Kim S, Buchbinder A, DeRossi A, Baltimore D, Wong-Staal F. 1991. «Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(11):5011-5.
- Knarr, G., S. Modrow, A. Todd, M. J. Gething, and J. Buchner. 1999. «Bip-binding sequences in HIV gp160. Implications for the binding specificity of bip». *J. Biol. Chem.* 274:29850-29857.
- Koegl M, Zlatkine P, Ley SC, Courtneidge SA, Magee AI. 1994. «Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif». *Biochem J.* 303(3):749-53.

- Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. 1992. «Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor». *Science* 256:1783–1790.
- Komuro, I., Y. Yokota, S. Yasuda, A. Iwamoto, and K. S. Kagawa. 2003. «CSF induced and HIV-1-mediated distinct regulation of Hck and C/EBPβ represent a heterogeneous susceptibility of monocyte-derived macrophages to M-tropic HIV-1 infection». *J. Exp. Med.* 198:443–453.
- Kong G, Dalton M, Bubeck Wardenburg J, Straus D, Kurosaki T, Chan AC. 1996. «Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function». *Mol Cell Biol.* 16(9):5026-35.
- Koretzky, G.A., and Myung, P.S. 2001. «Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins». *Nat. Rev. Immunol.* 1:95–107.
- Krautkrämer E, Giese SI, Gasteier JE, Muranyi W, Fackler OT. 2004. «Human immunodeficiency virus type 1 Nef activates p21-activated kinase via recruitment into lipid rafts». *J Virol.* 78(8):4085-97.
- Kunert R, Rümer F, Katinger H. 1998. «Molecular characterization of five neutralizing anti-HIV type 1 antibodies: identification of nonconventional D segments in the human monoclonal antibodies 2G12 and 2F5». *AIDS Res Hum Retroviruses.* 14(13):1115-28.
- Lama J. 2003. «The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection». *Curr HIV Res.* 1(2):167-84.
- Lama J, Mangasarian A, Trono D. 1999. «Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner». *Curr Biol.* 9(12):622–31.
- Latour S, Veillette A. 2001. «Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signalling». *Curr Opin Immunol.* 13:299-306.
- Lee, C. H., B. Leung, M. A. Lemmon, J. Zheng, D. Cowburn, J. Kuriyan, and K. Saksela. 1995. «A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein». *EMBO J.* 14:5006-5015.

- Lemp G.F., Payne S.F., Rutherford G.W., Hessel N.A., Winkelstein W., Jr., Wiley J.A., Moss A.R., Chaisson R.E., Chen R.T., Feigal D.W., Jr., Thomas P.A., Werdegar D. 1990b. «Projections of AIDS morbidity and mortality in San Francisco». *J. Am. Med. Assoc.* 263:1497–1501.
- Lerner EC, Smithgall TE. 2002. «SH3-dependent stimulation of Src-family kinase autophosphorylation without tail release from the SH2 domain in vivo». *Nat Struct Biol.* 9(5):365-9.
- Lichtenberg U, Quintrell N, Bishop JM. 1992. «Human protein-tyrosine kinase gene HCK: expression and structural analysis of the promoter region». *Oncogene* 7(5):849-58.
- Lim WA, Richards FM, Fox RO. 1994. «Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains». *Nature* 372(6504):375-9.
- Lock, P., S. Ralph, E. Stanley, I. Boulet, R. Ramsay, and A. R. Dunn. 1991. «Two isoforms of murine hck, generated by utilization of alternative translational initiation codons, exhibit different patterns of subcellular localization». *Mol. Cell. Biol.* 11:4363–4370.
- Louis, J. M., I. T. Weber, J. Tozser, G. M. Clore, and A. M. Gronenborn. 2000. «HIV-1 protease: maturation, enzyme specificity, and drug resistance». *Adv. Pharmacol.* 49:111-146.
- Lu X, Wu X, Plemenitas A, Yu H, Sawai E T, Abo A, Peterlin B M. 1996. «CDC42 and Rac1 are implicated in the activation of the Nef-associated kinase and replication of HIV-1». *Curr Biol.* 6:1677–1684.
- Lundquist CA, Tobiume M, Zhou J, Unutmaz D, Aiken C. 2002. «Nef-mediated downregulation of CD4 enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary T lymphocytes». *J Virol.* 76(9):4625–33.
- Lupher ML Jr, Rao N, Eck MJ, Band H. 1999. «The Cbl protooncoprotein: a negative regulator of immune receptor signal transduction». *Immunol Today* 20(8):375-82.
- Magnan A, Di Bartolo V, Mura AM, Boyer C, Richelme M, Lin YL, Roure A, Gillet A, Arrieumerlou C, Acuto O, Malissen B, Malissen M. 2001. «T cell development and T cell responses in mice with mutations affecting tyrosines 292 or 315 of the ZAP-70 protein tyrosine kinase». *J Exp Med.* 194(4):491-505.

- Maldarelli F, Chen MY, Willey RL, Strebel K. 1993. «Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein». *J Virol.* 67:5056–5061.
- Mangasarian A, Foti M, Aiken C, Chin D, Carpentier JL, Trono D. 1997. «The HIV-1 Nef protein acts as a connector with sorting pathways in the Golgi and at the plasma membrane». *Immunity.* 6(1):67-77.
- Manninen A, Hiipakka M, Vihinen M, Lu W, Mayer BJ, Saksela K. 1998. «SH3-Domain binding function of HIV-1 Nef is required for association with a PAK-related kinase». *Virology.* 250(2):273-82.
- Manninen A, Renkema GH, Saksela K. 2000. «Synergistic activation of NFAT by HIV-1 nef and the Ras/MAPK pathway». *J Biol Chem.* 275(22):16513-7.
- Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strebel K, Benarous R. 1998. «A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif». *Mol Cell.* 1:565–574.
- Martins-Green M, Bixby JL, Yamamoto T, Graf T, Sudol M. 2000. «Tissue specific expression of Yrk kinase: implications for differentiation and inflammation». *Int J Biochem Cell Biol.* 32(3):351-64.
- Mège D, Di Bartolo V, Germain V, Tuosto L, Michel F, Acuto O. 1996. «Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signaling pathways». *J Biol Chem.* 271(51):32644-52.
- Mellors J.W., Munoz A., Giorgi J.V., Margolick J.B., Tassoni C.J., Gupta P., Kingsley L.A., Todd J.A., Saah A.J., Detels R., Phair J.P., Rinaldo C.R., Jr. 1997. «Plasma viral load and CD4⁺ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection». *Ann. Intern. Med.* 126:946–954.
- Mellors J.W., Rinaldo C.R.J., Gupta P., White R.M., Todd J.A., Kingsley L.A. 1996. «Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma». *Science.* 272:1167–1170.
- Meng F, Lowell CA. 1998. «A beta 1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration». *EMBO J.* 17(15):4391-403.

- Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I, Greene WC, Feinberg MB. 1994. «The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages». *J Exp Med.* 179(1):101-13.
- Moarefi, I., M. LaFevre-Bernt, F. Sicheri, M. Huse, C. H. Lee, J. Kuriyan, and W. T. Miller. 1997. «Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement». *Nature* 385:650–653.
- Molina TJ, Kishihara K, Siderovski DP, van Ewijk W, Narendran A, Timms E, Wakeham A, Paige CJ, Hartmann KU, Veillette A, et al. 1992. «Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck». *Nature* 357(6374):161-4.
- Moss A.R., Bacchetti P. 1989. «Natural history of HIV infection». *AIDS* 3:55–61.
- Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D. 1994. «Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses». *Retroviridae Springer-Verlag*, Vienna.
- Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D. 1995. «Virus taxonomy». *Sixth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses Springer Verlag*, New York.
- Musacchio A, Noble M, Pauptit R, Wierenga R, Saraste M. 1992. «Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain». *Nature.* 359(6398):851-5.
- Myszka DG, Sweet RW, Hensley P, Brigham-Burke M, Kwong PD, Hendrickson WA, Wyatt R, Sodroski J, Doyle ML. 2000. «Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(16):9026-31.
- Nada S, Okada M, MacAuley A, Cooper JA, Nakagawa H. 1991. «Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src». *Nature* 351(6321):69-72.
- Nedellec R, Coetzer M, Shimizu N, Hoshino H, Polonis VR, Morris L, Mårtensson UE, Binley J, Overbaugh J, Mosier DE. 2009. «Virus entry via the alternative coreceptors CCR3 and FPRL1 differs by human immunodeficiency virus type 1 subtype». *J Virol.* 83(17):8353-63.
- Neil SJ, Eastman SW, Jouvenet N, Bieniasz PD. 2006. «HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane». *PLoS Pathog.* 2:e39.

- Niederman TM, Hastings WR, Ratner L. 1993. «Myristoylation-enhanced binding of the HIV-1 Nef protein to T cell skeletal matrix». *Virology* 197(1):420-5.
- Nika K, Soldani C, Salek M, Paster W, Gray A, Etzensperger R, Fugger L, Polzella P, Cerundolo V, Dushek O, Höfer T, Viola A, Acuto O. 2010. «Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction». *Immunity* 32(6):766-77.
- Nunn M F, Marsh J W. 1996. «Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a member of the p21-activated kinase family». *J Virol.* 70:6157–6161.
- O'Neill E, Kuo LS, Krisko JF, Tomchick DR, Garcia JV, Foster JL. 2006. «Dynamic evolution of the human immunodeficiency virus type 1 pathogenic factor, Nef». *J Virol.* 80(3):1311-20.
- Ono A, Freed EO. 1999. «Binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag to membrane: role of the matrix amino terminus». *J Virol.* 73(5):4136-44.
- Ono A, Orenstein JM, Freed EO. 2000. «Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly». *J Virol.* 74(6):2855-66.
- Oroszlan, S., and R. B. Luftig. 1990. «Retroviral proteinases». *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 157:153-185.
- Overduin M, Rios CB, Mayer BJ, Baltimore D, Cowburn D. 1992. «Three-dimensional solution structure of the src homology 2 domain of c-abl». *Cell* 70(4):697-704.
- Paige LA, Nadler MJ, Harrison ML, Cassady JM, Geahlen RL. 1993. «Reversible palmitoylation of the protein-tyrosine kinase p56lck». *J Biol Chem.* 268(12):8669-74.
- Pal, R., M. S. Reitz, Jr., E. Tschachler, R. C. Gallo, M. G. Sarngadharan, and F. D. Veronese. 1990. «Myristoylation of gag proteins of HIV-1 plays an important role in virus assembly». *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 6:721–730.
- Pamer E, Cresswell P. 1998. «Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing». *Annu Rev Immunol.* 16:323-58.
- Pandori MW, Fitch NJ, Craig HM, Richman DD, Spina CA, Guatelli JC. 1996. «Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein». *J Virol.* 70(7):4283-90.

- Pantaleo G., Graziosi C., Fauci A.S. 1993a. «New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection». *N. Engl. J. Med.* 328:327–335.
- Pelosi M, Di Bartolo V, Mounier V, Mège D, Pascussi JM, Dufour E, Blondel A, Acuto O. 1999. «Tyrosine 319 in the interdomain B of ZAP-70 is a binding site for the Src homology 2 domain of Lck». *J Biol Chem.* 274(20):14229-37.
- Peng B, Robert-Guroff M. 2001. «Deletion of N-terminal myristoylation site of HIV Nef abrogates both MHC-1 and CD4 down-regulation». *Immunol Lett.* 78(3):195-200.
- Perlmutter, R. M., J. D. Marth, D. B. Lewis, R. Peet, S. F. Ziegler, and C. B. Wilson. 1988. «Structure and expression of lck transcripts in human lymphoid cells». *J.Cell Biochem.* 38:117-126.
- Piatak M., Jr., Saag M.S., Yang L.C., Clark S.J., Kappes J.C., Luk K.C., Hahn B.H., Shaw G.M., Lifson J.D. 1993. «High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR». *Science* 259:1749–1754.
- Picard, C., J. Gabert, D. Olive, and Y. Collette. 2004. «Altered splicing in hematological malignancies reveals a tissue-specific translational block of the Src-family tyrosine kinase fyn brain isoform expression». *Leukemia* 18:1737-1739.
- Piguet V, Gu F, Foti M, Demarex N, Gruenberg J, Carpentier JL, Trono D. 1999. «Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes». *Cell* 97(1):63-73.
- Piguet V, Schwartz O, Le Gall S, Trono D. 1999. «The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors». *Immunol Rev.* 168:51-63.
- Piguet V, Trono D. 1999. «The Nef protein of primate lentiviruses». *Rev Med Virol.* 9(2):111-20.
- Piguet V, Wan L, Borel C, Mangasarian A, Demarex N, Thomas G, Trono D. 2000. «HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes». *Nat Cell Biol.* 2(3):163-7.
- Pizzato M, Helander A, Popova E, Calistri A, Zamborlini A, Palu G, Gottlinger HG. 2007. «Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(16):6812–7.

- Pollard, V. W. and Malim, M. H. 1998. «The HIV-1 Rev protein». *Annu. Rev. Microbiol.* 52:491–532.
- Pope M, Haase A. 2003. «Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection». *Nat Med* 9(7):847–52.
- Prats A.-C., Sarin L., Gabus C., Litvak S., Keith G., Darlix J.-L. 1988. «Small finger protein of avian and murine retroviruses has nucleic acid annealing activity and positions the replication primer tRNA onto genomic RNA». *EMBO J.* 7:1777–1783.
- Price DH. 2000. «P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II». *Mol Cell Biol.* 20:2629–2634.
- Pulkkinen K, Renkema GH, Kirchhoff F, Saksela K. 2004. «Nef associates with p21-activated kinase 2 in a p21-GTPase-dependent dynamic activation complex within lipid rafts». *J Virol.* 78(23):12773-80.
- Qian D, Lev S, van Oers NS, Dikic I, Schlessinger J, Weiss A. 1997. «Tyrosine phosphorylation of Pyk2 is selectively regulated by Fyn during TCR signalling». *J Exp Med.* 185(7):1253-9.
- Quaranta MG, Mattioli B, Spadaro F, Straface E, Giordani L, Ramoni C, Malorni W, Viora M. 2003. «HIV-1 Nef triggers Vav-mediated signaling pathway leading to functional and morphological differentiation of dendritic cells». *FASEB J.* 17(14):2025-36.
- Raab M, da Silva AJ, Findell PR, Rudd CE. 1997. «Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2». *Immunity* 6(2):155-64.
- Rao N, Miyake S, Reddi AL, Douillard P, Ghosh AK, Dodge IL, Zhou P, Fernandes ND, Band H. 2002. «Negative regulation of Lck by Cbl ubiquitin ligase». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(6):3794-9.
- Rauch, S., K. Pulkkinen, K. Saksela, and O. T. Fackler. 2008. «Human immunodeficiency virus type 1 Nef recruits the guanine exchange factor Vav1 via an unexpected interface into plasma membrane microdomains for association with p21-activated kinase 2 activity». *J. Virol.* 82:2918-2929.
- Renkema GH, Manninen A, Mann DA, Harris M, Saksela K. 1999. «Identification of the Nef-associated kinase as p21-activated kinase 2». *Curr Biol.* 9(23):1407-10.

- Renkema GH, Manninen A, Saksela K. 2001. «Human immunodeficiency virus type 1 Nef selectively associates with a catalytically active subpopulation of p21-activated kinase 2 (PAK2) independently of PAK2 binding to Nck or beta-PIX». *J Virol.* 75(5):2154-60.
- Renkema GH, Saksela K. 2000. «Interactions of HIV-1 NEF with cellular signal transducing proteins». *Front Biosci.* 5:268-83.
- Resh MD. 1999. «Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins». *Biochim Biophys Acta.* 1451(1):1-16.
- Riggs NL, Craig HM, Pandori MW, Guatelli JC. 1999. «The dileucine-based sorting motif in HIV-1 Nef is not required for down-regulation of class I MHC». *Virology.* 258(2):203-7.
- Rock KL, Goldberg AL. 1999. «Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides». *Annu Rev Immunol.* 17:739-79.
- Rodgers W, Rose JK. 1996. «Exclusion of CD45 inhibits activity of p56^{lck} associated with glycolipid-enriched membrane domains». *J. Cell Biol.* 135:1515–23
- Rogel, M. E., Wu, L. I. & Emerman, M. 1995. «The human immunodeficiency virus type 1 *vpr* gene prevents cell proliferation during chronic infection». *J Virol.* 69:882–888.
- Rudd CE, Trevillyan JM, Dasgupta JD, Wong LL, Schlossman SF. 1988. «The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(14):5190-4.
- Rudolph JM, Eickel N, Haller C, Schindler M, Fackler OT. 2009. «Inhibition of T-cell receptor-induced actin remodeling and relocalization of Lck are evolutionarily conserved activities of lentiviral Nef proteins». *J Virol.* 83(22):11528-39.
- Saksela K, Cheng G, Baltimore D. 1995. «Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef⁺ viruses but not for down-regulation of CD4». *EMBO J.* 14(3):484-91.
- Sawai, E. T., A. Baur, H. Struble, B. M. Peterlin, J. A. Levy, and C. Cheng-Mayer. 1994. «Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a cellular serine kinase in T lymphocytes». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:1539-1543.

- Sawai E T, Khan I H, Montbriand P M, Peterlin B M, Cheng-Mayer C, Luciw P A. 1996. «Activation of PAK by HIV and SIV Nef: importance for AIDS in rhesus macaques». *Curr Biol.* 6:1519–1527.
- Sawaya, B. E., Khalili, K., Gordon, J., Taube, R. & Amini, S. 2000. «Cooperative interaction between HIV-1 regulatory proteins Tat and Vpr modulates transcription of the viral genome». *J Biol Chem.* 275:35209–35214.
- Schrager, J. A. and J. W. Marsh. 1999. «HIV-1 Nef increases T cell activation in a stimulus-dependent manner». *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:8167-8172.
- Schindler M, Rajan D, Specht A, Ritter C, Pulkkinen K, Saksela K, Kirchhoff F. 2007. «Association of Nef with p21-activated kinase 2 is dispensable for efficient human immunodeficiency virus type 1 replication and cytopathicity in ex vivo-infected human lymphoid tissue». *J Virol.* 81(23):13005-14.
- Schubert U, Strebel K. 1994. «Differential activities of the human immunodeficiency virus type 1-encoded Vpu protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartments». *J Virol.* 68:2260–2271.
- Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. 1996. «Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein». *Nat Med.* 2:338–42.
- Shaw AS, Chalupny J, Whitney JA, Hammond C, Amrein KE, Kavathas P, Sefton BM, Rose JK. 1990. «Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase». *Mol Cell Biol.* 10(5):1853-62.
- Sicheri F, Kuriyan J. 1997. «Structures of Src-family tyrosine kinases». *Curr Opin Struct Biol.* 7(6):777-85.
- Sicheri F, Moarefi I, Kuriyan J. 1997. «Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck». *Nature.* 385(6617):602-9.
- Simmons A, Aluvihare V, McMichael A. 2001. «Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators». *Immunity* 14:763–77.

- Simmons A, Gangadharan B, Hodges A, Sharrocks K, Prabhakar S, García A, Dwek R, Zitzmann N, McMichael A. 2005. «Nef-mediated lipid raft exclusion of UbcH7 inhibits Cbl activity in T cells to positively regulate signalling». *Immunity* 23(6):621-34.
- Simons K, Toomre D. 2000. «Lipid rafts and signal transduction». *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(1):31-9.
- Singer A, Adoro S, Park JH. 2008. «Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice». *Nat Rev Immunol.* 8(10):788-801.
- Smart JE, Oppermann H, Czernilofsky AP, Purchio AF, Erikson RL, Bishop JM. 1981. «Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src)». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(10):6013-7.
- Smith, J.A. and R. Daniel. 2006. «Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses». *ACS Chem Biol.* 1(4):217-26.
- Smith BL, Krushelnycky BW, Mochly-Rosen D, Berg P. 1996. «The HIV nef protein associates with protein kinase C theta». *J Biol Chem.* 271(28):16753-7.
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. 2009. «T cell activation». *Annu Rev Immunol.* 27:591-619.
- Sol-Foulon, N., A. Moris, C. Nobile, C. Boccaccio, A. Engering, J. P. Abastado, J. M. Heard, Y. van Kooyk, and O. Schwartz. 2002. «HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread». *Immunity* 16:145-155.
- Spearman P, Horton R, Ratner L, Kuli-Zade I. 1997. «Membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein in vivo supports a conformational myristyl switch mechanism». *J Virol.* 71(9):6582-92.
- Spina CA, Kwoh TJ, Chowder MY, Guatelli JC, Richman DD. 1994. «The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes». *J Exp Med.* 179(1):115-23.
- Stangler, T., T. Tran, S. Hoffmann, H. Schmidt, E. Jonas, and D. Willbold. 2007. «Competitive displacement of full-length HIV-1 Nef from the Hck SH3 domain by a high-affinity artificial peptide». *Biol. Chem.* 388:611–615.

- Stevenson M, Meier C, Mann AM, Chapman N, Wasiaik A. 1988. «Envelope glycoprotein of HIV induces interference and cytolysis resistance in CD4+ cells: mechanism for persistence in AIDS». *Cell* 53:483–496.
- Stolp, B., M. Reichman-Fried, L. Abraham, X. Pan, S. I. Giese, S. Hannemann, P. Goulimari, E. Raz, R. Grosse, and O. T. Fackler. 2009. «HIV-1 Nef interferes with host cell motility by deregulation of Cofilin». *Cell Host Microbe* 6:174-186.
- Stove, V., I. Van de Walle, E. Naessens, E. Coene, C. Stove, J. Plum, and B. Verhasselt. 2005. «Human immunodeficiency virus Nef induces rapid internalization of the T-cell coreceptor CD8 $\alpha\beta$ ». *J. Virol.* 79:11422-11433.
- Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA. 1987. «The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity». *Nature* 328(6132):728-30.
- Stumptner-Cuvelette, P., S. Morchoisne, M. Dugast, S. Le Gall, G. Raposo, O. Schwartz, and P. Benaroch. 2001. «HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:12144-12149.
- Suzu S, Harada H, Matsumoto T, Okada S. 2005. «HIV-1 Nef interferes with M-CSF receptor signaling through Hck activation and inhibits M-CSF bioactivities». *Blood* 105(8):3230-7.
- Tani-ichi S, Maruyama K, Kondo N, Nagafuku M, Kabayama K, Inokuchi J, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Yagita H, Kawano S, Kosugi A. 2005. «Structure and function of lipid rafts in human activated T cells». *Int Immunol.* 17(6):749-58.
- Taylor SS, Knighton DR, Zheng J, Ten Eyck LF, Sowadski JM. 1992. «Structural framework for the protein kinase family». *Annu Rev Cell Biol.* 8:429-62.
- Thien CB, Langdon WY. 1998. «c-Cbl: a regulator of T cell receptor-mediated signalling». *Immunol Cell Biol.* 76(5):473-82.
- Thien CB, Scaife RM, Papadimitriou JM, Murphy MA, Bowtell DD, Langdon WY. 2003. «A mouse with a loss-of-function mutation in the c-Cbl TKB domain shows perturbed thymocyte signaling without enhancing the activity of the ZAP-70 tyrosine kinase». *J Exp Med.* 197(4):503-13.
- Thomas, S. M. and J. S. Brugge. 1997. «Cellular functions regulated by Src family kinases». *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 13:513-609.

- Thoulouze, M. I., N. Sol-Foulon, F. Blanchet, A. Dautry-Varsat, O. Schwartz, and A. Alcover. 2006. «Human immunodeficiency virus type-1 infection impairs the formation of the immunological synapse». *Immunity* 24:547-561.
- Timson Gauen LK, Kong AN, Samelson LE, Shaw AS. 1992. «p59fyn tyrosine kinase associates with multiple T-cell receptor subunits through its unique amino-terminal domain». *Mol Cell Biol.* 12(12):5438-46.
- Tindall B., Cooper D.A. 1991. «Primary HIV infection: Host responses and intervention strategies». *AIDS* 5:1–14.
- Tokunaga, K., E. Kiyokawa, M. Nakaya, N. Otsuka, A. Kojima, T. Kurata, and M. Matsuda. 1998. «Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 virion entry by dominant-negative Hck». *J. Virol.* 72:6257–6259.
- Tolstrup, M., L. Ostergaard, A. L. Laursen, S. F. Pedersen, and M. Duch. 2004. «HIV/SIV escape from immune surveillance: focus on Nef». *Curr. HIV Res.* 2:141-151.
- Trible RP, Emert-Sedlak L, Smithgall TE. 2006. «HIV-1 Nef selectively activates Src family kinases Hck, Lyn, and c-Src through direct SH3 domain interaction». *J Biol Chem.* 281(37):27029-38.
- Tuosto L, Parolini I, Schröder S, Sargiacomo M, Lanzavecchia A, Viola A. 2001. «Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation». *Eur J Immunol.* 31(2):345-9.
- Turner JM, Brodsky MH, Irving BA, Levin SD, Perlmutter RM, Littman DR. 1990. «Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs». *Cell* 60(5):755-65.
- Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pöhlmann S, Doms RW, Cunningham AL. 2002. «Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets». *Nat Immunol.* 3(10):975-83.
- Van Laethem F, Sarafova SD, Park JH, Tai X, Pobezinsky L, Guinter TI, Adoro S, Adams A, Sharrow SO, Feigenbaum L, Singer A. 2007. «Deletion of CD4 and CD8 coreceptors permits generation of alphabetaT cells that recognize antigens independently of the MHC». *Immunity* 27(5):735-50.

- van Oers NS, Lowin-Kropf C, Finlay D, Connolly K, Weiss A. 1996. «alpha beta T cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases». *Immunity* 5:429–436.
- Varma R, Mayor S. 1998. «GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface». *Nature* 394(6695):798-801.
- Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. 1988. «The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck». *Cell* 55(2):301-8.
- Veillette A, Horak I D, Horak E M, Bookman M A and Bolen J B. 1988. «Alterations of the lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (p56lck) during T-cell activation». *Mol. Cell. Biol.* 8:4353–4361.
- Vilhardt F, Plastre O, Sawada M, Suzuki K, Wiznerowicz M, Kiyokawa E, Trono D, Krause KH. 2002. «The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation». *J Biol Chem.* 277(44):42136-43.
- Vincent, P., E. Priceputu, D. Kay, K. Saksela, P. Jolicoeur, and Z. Hanna. 2006. «Activation of p21-activated kinase 2 and its association with Nef are conserved in murine cells but are not sufficient to induce an AIDS-like disease in CD4C/HIV transgenic mice». *J. Biol. Chem.* 281:6940-6954.
- Vodicka, M. A., Koepf, D. M., Silver, P. M. & Emerman, M. 1998. «HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection». *Genes Dev* 12:175–185.
- von Schwedler UK, Stray KM, Garrus JE, Sundquist WI. 2003. «Functional surfaces of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein». *J Virol.* 77(9):5439-50.
- Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. 1998. «A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA». *Cell* 92:451–462.
- Waksman G, Shoelson SE, Pant N, Cowburn D, Kuriyan J. 1993. «Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms». *Cell.* 72(5):779-90.
- Wang JK, Kiyokawa E, Verdin E, Trono D. 2000. «The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(1):394-9.

- Wange RL, Guitián R, Isakov N, Watts JD, Aebersold R, Samelson LE. 1995. «Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70». *J Biol Chem.* 270(32):18730-3.
- Wei BL, Arora VK, Foster JL, Sodora DL, Garcia JV. 2003. «In vivo analysis of Nef function». *Curr HIV Res.* 1(1):41-50.
- Weiss A. 1993. «T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases». *Cell* 73:209–212.
- Weiss A and Littman D R. 1994. «Signal transduction by lymphocyte antigen receptors». *Cell* 76:263–274.
- Welker R, Harris M, Cardel B, Kräusslich HG. 1998. «Virion incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Nef is mediated by a bipartite membrane-targeting signal: analysis of its role in enhancement of viral infectivity». *J Virol.* 72(11):8833-40.
- Welker R, Kottler H, Kalbitzer HR, Kräusslich HG. 1996. «Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase». *Virology* 219(1):228-36.
- Wildum S, Schindler M, Münch J, Kirchhoff F. 2006. «Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection». *J Virol.* 80(16):8047-59.
- Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. 1992. «Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes». *J Virol.* 66:226–234.
- Williams JC, Weijland A, Gonfloni S, Thompson A, Courtneidge SA, Superti-Furga G, Wierenga RK. 1997. «The 2.35 Å crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions». *J Mol Biol.* 274(5):757-75.
- Witte V, Laffert B, Gintschel P, Krautkrämer E, Blume K, Fackler OT, Baur AS. 2008. «Induction of HIV transcription by Nef involves Lck activation and protein kinase C theta raft recruitment leading to activation of ERK1/2 but not NF kappa B». *J Immunol.* 181(12):8425-32.
- Wyatt R, Sodroski J 1998. «The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens». *Science* 280(5371):1884–8.

- Wolf D, Giese SI, Witte V, Krautkrämer E, Trapp S, Sass G, Haller C, Blume K, Fackler OT, Baur AS. 2008. «Novel (n)PKC kinases phosphorylate Nef for increased HIV transcription, replication and perinuclear targeting». *Virology* 370(1):45-54.
- Wolf D, Witte V, Laffert B, Blume K, Stromer E, Trapp S, d'Aloja P, Schürmann A, Baur AS. 2001. «HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals». *Nat Med.* 7(11):1217-24.
- Wu, Y. and J. W. Marsh. 2001. «Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA». *Science* 293:1503-1506.
- Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B. 1998. «Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation». *Immunity* 8(6):723-32.
- Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ, Harrison SC. 1999. «Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism». *Mol Cell.* 3(5):629-38.
- Xu XN, Laffert B, Screaton GR, Kraft M, Wolf D, Kolanus W, Mongkolsapay J, McMichael AJ, Baur AS. 1999. «Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain». *J Exp Med.* 189(9):1489-96.
- Yang P, Henderson AJ. 2005. «Nef enhances c-Cbl phosphorylation in HIV-infected CD4+ T lymphocytes». *Virology* 336(2):219-28.
- Yang OO, Nguyen PT, Kalams SA, Dorfman T, Gottlinger HG, Stewart S, Chen IS, Threlkeld S, Walker BD. 2002. «Nef-mediated resistance of human immunodeficiency virus type 1 to antiviral cytotoxic T lymphocytes». *J Virol.* 76:1626-1631.
- Yewdell JW, Hill AB. 2002. «Viral interference with antigen presentation». *Nat Immunol.* 3(11):1019-25.
- Yoo S, Myszka DG, Yeh C, McMurray M, Hill CP, Sundquist WI. 1997. «Molecular recognition in the HIV-1 capsid/cyclophilin A complex». *J Mol Biol.* 269(5):780-95.
- Yu H, Rosen MK, Shin TB, Seidel-Dugan C, Brugge JS, Schreiber SL. 1992. «Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site». *Science* 258(5088):1665-8.

- Zamoyska R, Basson A, Filby A, Legname G, Lovatt M, Seddon B. 2003. «The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation». *Immunol Rev.* 191:107-18.
- Zauli G, Gibellini D, Secchiero P, Dutartre H, Olive D, Capitani S, Collette Y. 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):1000-10.
- Zheng, Y.H., N. Lovsin, and B.M. Peterlin. 2005.« Newly identified host factors modulate HIV replication». *Immunol Lett.* 97(2):225-34.
- Zheng YH, Plemenitas A, Fielding CJ, Peterlin BM. 2003. «Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(14):8460–5.

ANNEXE 1

Liste des tampons

Analyse cytométrique

-**Tampon de FACS** : PBS + 2% FCS + 0,01% NaN₃

-**Tampon de blocage** : PBS + 20% FCS + 0,02% NaN₃

Lyse cellulaire et immunoprécipitation

-**Tampon de lyse (MLB)** : 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 1% triton, 2mM EDTA, 4 mM d'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄), de 10 mM de fluorure de sodium (NaF), 1 mM de phénylméthylsulfonil (PMSF) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases.

Essai kinase *in vitro*

-**Tampon KEB**: 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 0,5% triton, 2mM EDTA

-**Tampon KAB**: 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM NaCl, 0,5% triton, 10 mM MgCl₂

Purification des microdomaines membranaires

-**Tampon de lyse** : 50 mM HEPES, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2mM d'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄) 10 mM de fluorure de sodium (NaF), 1 mM de phénylméthylsulfonil (PMSF)

Immunofluorescence en microscopie confocale

-Tampon de perméabilisation : PBS 0,1% Triton-X-100

-Tampon de blocage : PBS 5% BSA

-Tampon de lavage : PBS

Electrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage de type western

-Tampon d'électrophorèse : 62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycérol, 2% SDS, 5% β -mercaptoéthanol et 0,00625% bleu de bromophénol

-Tampon de transfert : 10 mM Tris, 96 mM glycine, et 15% méthanol

Immunodétection des protéines

-Tampon de blocage : TBS 5% BSA

-Tampon de lavage : TBS contenant 0,1% Tween-20

