

Université Paris Descartes

**Thèse pour obtenir le grade de DOCTEUR en Science
de la vie et de la Santé**

Ecole doctorale : Gc2iD/Bio SPC
Discipline : Biologie cellulaire

Macrophage et infection par le VIH-1 : perturbation des fonctions de clairance et d'activation

Présentée et soutenue publiquement le 24 Octobre 2014 par

Audrey DUMAS

Thèse dirigée par le **Dr. Florence NIEDERGANG**

Devant un jury composé de :

M le Dr. Alexandre BENMERAH	Président
Mme le Dr. Florence NIEDERGANG	Directrice de thèse
M le Dr. Eric GHIGO	Rapporteur
M le Dr. Bruno BEAUMELLE	Rapporteur
M le Dr. Arnaud MORIS	Examineur

Université Paris Descartes

**Thèse pour obtenir le grade de DOCTEUR en Science
de la vie et de la Santé**

Ecole doctorale Gc2iD/ Bio SPC
Discipline : Biologie cellulaire

Macrophage et infection par le VIH-1 : perturbation des fonctions de clairance et d'activation

Présentée et soutenue publiquement le 24 Octobre 2014 par

Audrey DUMAS

Thèse dirigée par le **Dr. Florence NIEDERGANG**

Devant un jury composé de :

M le Dr. Alexandre BENMERAH	Président
Mme le Dr. Florence NIEDERGANG	Directrice de thèse
M le Dr. Eric GHIGO	Rapporteur
M le Dr. Bruno BEAUMELLE	Rapporteur
M le Dr. Arnaud MORIS	Examineur

Résumé

La phagocytose, fonction fondamentale des macrophages, est un processus qui se décompose en deux étapes bien distinctes : les étapes précoces d'internalisation menant à la formation du phagosome et les étapes tardives de maturation du phagosome. Le virus de l'immunodéficience humaine de type I (VIH-1) infecte les macrophages, ce qui perturbe leurs fonctions. L'effet de l'infection virale dans ces cellules est peu caractérisé en comparaison des lymphocytes T. Des travaux antérieurs ont montré d'une part que l'étape précoce d'internalisation de larges particules et bactéries était bloquée de moitié dans les macrophages primaires humains infectés par le VIH-1 via Nef, la protéine de virulence majeure du virus et d'autre part, que la réponse cytokinique était atténuée chez les patients infectés. Ainsi, nous avons étudié l'effet du VIH-1 sur les étapes tardives de la phagocytose : la maturation du phagosome et l'activation des macrophages qui en résulte. Nous avons montré que le VIH-1 altère les étapes tardives de la phagocytose en inhibant la maturation du phagosome, définie par le recrutement de marqueurs tardifs de la voie d'endocytose, d'hydrolases et la production d'espèces réactives oxygénées. Malgré une pré-activation basale, les macrophages infectés par le VIH-1 sont incapables de répondre efficacement à une stimulation induite par phagocytose, ce qui conduit à une modulation de la réponse transcriptionnelle et cytokinique. La dynamique des microtubules et la migration centripète des phagosomes sont profondément affectées par le virus. De façon inattendue, la protéine virale Vpr est impliquée dans ces perturbations, alors que Nef ne joue pas de rôle notable. Nos résultats indiquent que les composants intracellulaires de la machinerie de tri endosomal sont détournés par le compartiment viral dans les macrophages infectés. Par cette étude, nous avons donc identifié la protéine Vpr comme nouveau modulateur de la dynamique des microtubules et du trafic intracellulaire, entraînant ainsi une altération profonde de la maturation du phagosome et de la clairance bactérienne dans les macrophages infectés. Ce travail contribue à mieux comprendre l'établissement d'infections opportunistes chez les patients infectés.

Mots clés : macrophages, maturation du phagosome, activation, HIV-1, Vpr, microtubules, clairance bactérienne, voie d'endocytose

Table des matières

Préambule	10
Introduction	14
Chapitre I : la phagocytose	14
I. Activation des récepteurs et mécanismes d'internalisation menant à la formation du phagosome	16
I.1. Activation des récepteurs phagocytaires	16
I.1.1. Les récepteurs phagocytaires et non phagocytaires	17
I.1.2. Phosphorylation des tyrosines : cas particulier du FcR.....	24
I.2. Mécanisme d'internalisation du FcR : remodelage membranaire	28
I.2.1. Polymérisation d'actine : Force motrice par excellence	29
I.2.2. Trafic membranaire apporté par l'exocytose focalisée	33
II. Maturation du phagosome et activation du macrophage	36
II.1. Mécanisme de la maturation du phagosome	36
II.1.1. Fissions et fusions avec la voie d'endocytose.....	37
II.1.2. Acidification du compartiment phagocytaire : la v-ATPase.....	42
II.1.3. Production d'espèces réactives de l'oxygène : NOX2	44
II.1.4. Production de peptides et d'agents microbiens	46
II.1.5. Régulation sous contrôle des microtubules	47
II.2. Activation du macrophage : origine de la réponse intercellulaire	54
II.2.1. Activation de kinases ou de complexes intracellulaires	54
II.2.2. Activation du CMH _{II} et production de cytokines	58
Chapitre II : le VIH-1 dans les macrophages	62
I. Le Virus de l'immunodéficience humaine de type 1, VIH-1	62
I.1. Epidémiologie et transmission du VIH	62
I.2. Physiopathologie du VIH-1	64
I.3. Structure du VIH-1	65
I.4. Régulation du cycle viral.....	66
I.4.1. Tropisme viral associé aux récepteurs de surface des cellules.....	67
I.4.2. Cycle viral	67
I.4.3. Facteurs de restriction.....	69
II. Le macrophage au centre de la pathogénèse de l'infection virale	71
II.1. Macrophage : réservoir viral.....	72
II.2. Dissémination du virus par les macrophages	74
II.2.1. Par contact direct : synapse virologique.....	74
II.2.2. Rôle central du macrophage dans l'infection du SNC	76
II.3. Sécrétion de cytokines et chimokines.....	77
II.4. Macrophage, co-infections et phagocytose.....	79
III. Implication de deux protéines régulatrices du VIH-1 : Nef et Vpr	83
III.1. Rôle de Nef dans la pathogénèse du VIH-1	84
III.1.1. Structure de la protéine Nef.....	84
III.1.2. Nef dans la pathogénèse du SIDA <i>in vivo</i>	85
III.1.3. Nef dans la pathogénèse de l'infection virale <i>in vitro</i>	86
III.2. Rôle de Vpr dans la pathogénèse de l'infection virale.....	89
III.2.1. Structure de la protéine Vpr	89
III.2.2. Vpr dans la pathogénèse du SIDA <i>in vivo</i>	91

III.2.3. Vpr dans la pathogenèse de l'infection virale <i>in vitro</i>	91
Objectif	98
Résultats	100
I. Résumé des principaux résultats.....	100
I.1. Altération de la maturation du phagosome par le VIH-1.....	100
I.2. Altération de l'activation des macrophages infectés par le VIH-1.....	102
I.3. Etape du cycle virale et protéines virales impliquées dans l'altération de la maturation du phagosome	104
I.4. Mécanismes impliqués dans l'altération de maturation du phagosome	105
II. Article soumis.....	108
Discussion/perspectives.....	157
I. Compartimentation cellulaire et clairance bactérienne.....	157
II. Rôle du cytosquelette de microtubules	161
III. Rôle du cycle viral et des facteurs viraux.....	164
IV. Signalisation intracellulaire et rôle putatif de Vpr.....	167
Références bibliographiques.....	172

Table des illustrations

Figure 1. Différenciation des macrophages <i>in vivo</i>	11
Figure 2. Polarisation des macrophages.....	12
Figure 3. Mécanisme de phagocytose.....	15
Figure 4. Récepteurs et signalisations mis en jeu lors de la phagocytose de microorganismes	17
Figure 5. La famille des récepteurs aux IgG, les récepteurs Fc γ	19
Figure 6. Cascades d'activation induites par les récepteurs Fc (FcR) et au complément C3bi (CR3) dans les macrophages	20
Figure 7. Structure de l'isoforme 1 du récepteur Scavenger de type A.....	23
Figure 8. Les différents récepteurs Toll like, leurs ligands et leurs protéines adaptatrices	24
Figure 9. Recrutement de tyrosines kinases en aval des récepteurs Fc γ	25
Figure 10. Domaines des deux isoformes de la protéine Hck, p61Hck et p59Hck	26
Figure 11. Cinétique d'apparition des phosphoinositides dans les étapes de formation du phagosome.....	28
Figure 12. Polymérisation d'actine et apport membranaire à la coupe phagocytaire des récepteurs Fc.....	29
Figure 13. Polymérisation de l'actine	29
Figure 14. Cycle des Rho GTPase	31
Figure 15. Structure de WASP et nucléation d'un filament d'actine branché par le complexe Arp2/3 et WASP.....	32
Figure 16. Structure, mécanisme de fusion et localisation intracellulaires des SNAREs	35
Figure 17. Maturation du phagosome dans les macrophages.	37
Figure 18. Structure des complexes HOPS et CORVET	40
Figure 19. Transition Rab5-Rab7 sur les phagosomes.....	40
Figure 20. Structure de la v-ATPase.....	44
Figure 21. Assemblage de la NADPH oxydase, NOX2	46
Figure 22. Structure et instabilité dynamique des microtubules.....	49
Figure 23. Structure de EB1. (Inspirée de Akhmanova and Steinmetz, 2008)	50
Figure 24. Structure des kinésines, dynéines cytoplasmiques et de la dynactine.....	51
Figure 25. Complexe RILP-RAB7- ORP1L- dynactine/dynéines au phagosome tardif	53
Figure 26. Cascades d'activation et structures des MAPK conventionnelles	56
Figure 27. Structure et activation du complexe NF- κ B, voie classique	57
Figure 28. Structure du CMH _I et du CMH _{II} présents à la surface membranaire des macrophages.	59
Figure 29. Mécanisme de maturation du phagosome et signalisation dans un macrophage ..	61
Figure 30. Estimation du nombre d'adultes et d'enfants vivants avec le VIH en 2012 sur le plan mondial	63
Figure 31. Les différentes phases de l'infection par le VIH, découpées suivant la charge virale et le taux de L _T CD4 ⁺ dans la circulation systémique.	65
Figure 32. Organisation génomique et représentation du virion mature du VIH-1	66
Figure 33. Cycle de réplication virale du VIH-1.....	69

Figure 34. Mécanisme de restriction du VIH-1 par APOBEC3G et BST2.....	71
Figure 35. Organisation des compartiments intracellulaires contenant les virions du VIH-1 dans les macrophages	73
Figure 36. Synapse virologique entre deux macrophages et un macrophage et un lymphocyte T	76
Figure 37. Modèle de la réponse des macrophages infectés par le VIH-1 au cours de la maladie	79
Figure 38. Co-infection VIH-1 et <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> ou <i>Salmonella Typhimurium</i> dans les macrophages	82
Figure 39. Motifs fonctionnels de la protéine Nef du VIH-1	85
Figure 40. Rôles de Nef dans la pathogenèse de l'infection virale <i>in vitro</i>	89
Figure 41. Structure tridimensionnelle de la protéine Vpr du VIH-1	90
Figure 42. Rôle de Vpr dans les cellules lymphoïdes et myéloïdes.	96
Figure 43. Résumé des objectifs de la thèse.....	99
Figure 44. Expression global et recrutement de LAMP1 sur les phagosomes dans les macrophages infectés et non infectés.	102
Figure 45. Variation d'expression des gènes par l'infection virale du VIH-1 dans les macrophages à l'état basal	104
Figure 46. Modèle proposé par lequel Vpr détournerait les composants du trafic intracellulaire afin d'altérer la maturation des phagosomes et la clairance bactérienne	108
Figure 47. Expression et activation de la protéine Vps41 dans des macrophages infectés par le VIH-1	161
Figure 48. Localisation subcellulaire de l'appareil de Golgi dans les macrophages après infection par le VIH-1	164
Figure 49. Rôle de Nef dans l'activation et la signalisation des macrophages infectés par le VIH-1	166

Abréviations

+ **TIPs** : Microtubule plus-end tracking proteins
 α SNAP : Attachment protein alpha
 β TrCP2 : β -transducin repeat-containing protein 2

A

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ANT : Adenosine Nucleotide Translocase
AP-1 : Adaptor-related protein complex 1
APC : Adenomatous Polyposis Coli protein
APOBEC3G : Apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G
ARD : Ankyrin repeat domain
ARF6 : ADP-ribosylation factor 6
ARN : Acide ribonucléique
ARNO : ARF nucleotide-binding site opener
Arp1 : Actin related protein 1
Arp2/3 : Actin-related protein 2/3
ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
Atg : Autophagy related gene
ATP : Adenosine triphosphate
AZT : Zidovudine

B

Bcl10 : B-cell lymphoma/leukemia 10
BST2 : Bone marrow stromal antigen 2

C

CapZ : Capping protein Z
CBF β : Core binding factor β
CCL/R : Chemokine (C-C motif) ligand/receptor
CCV : Clathrin-coated vesicles
CD : Cluster de Différenciation
Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog
CDK : Cyclin-Dependent Kinase
CH : Calponin Homology
CHO : Chinese hamster ovary
CLIP 170 : Cytoplasmic linker protein 170
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CORVET : C core vacuole/endosome tethering
CpG : Cytosine-phosphate-Guanine
CR : Récepteurs au complément
Ccz1 : Calcium caffeine zinc sensitivity 1
CTLD : C-type lectin-like domain
CUL-5 : Cullin-5
CXCL/R : Chemokine (C-X-C motif) ligand/receptor

D

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DCAF1 : Cul4-associated factor 1

DCV : Dense core vesicles
DDB1 : DNA damage-binding protein 1
E
EB : End binding
EBH : End binding homology
EEA1 : Early endosomal antigen 1
EHD3 : C-terminal Eps15 homology domain EHD ATPase protein 3
ELO : Elongin
Env : Enveloppe
ERK : Extracellular signal Regulated-Kinase
ESCRT : Endosomal sorting complexes required for transport
F
F-actin : Filamentous actin
Fc : Fragment cristallisable
FcR : Récepteur au Fc
FYCO1 : FYVE and coiled-coil domain containing 1
G
Gag : Group specific antigens
GAP : GTPase activating protein
GDP : Guanosine diphosphate
GEF : Guanine nucleotide exchange factor
GFP : Green fluorescent protein
GM-CFU : Granulocyte/macrophage colony-forming unit
GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Gp : Glycoprotein
GPI : Glycosylphosphatidylinositol
GST : Glutathione Sulfotransferase
GTP : Guanosine triphosphate
H
H2AX : Histone 2A variant x
HAART : Highly active antiretroviral therapy
HAD : HIV-associated dementia
HAND : HIV-Associated Neurocognitive Disorder
Hck : Hematopoietic cell kinase
HOPS : Homotypic fusion and protein sorting
HP1 : Heterochromatin protein 1
Hrs : Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
HSC : Hematopoietic stem cell
I
IAP : Antiapoptotic inhibitors of apoptosis
IC : Intracellular compartments
iC3b : inactivated C3b
IFN- γ : Interferon- γ
Ig : Immunoglobulines
IKK : I κ B kinase
IL- : Interleukin-
INF : Interferon
iNOS : inducible nitric oxide synthase
IRAK4 : Interleukin-1 receptor-associated kinase 4
IRF : Interferon regulatory transcription factor

ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

IκB : Inhibitor of κB

J

JNK : c Jun NH₂-terminal kinase

K

Kif : Kinesin family member

L

LAMP : Lysosomal-associated membrane protein

LAP : LC3 associated phagosome

LC3 : Microtubule-associated protein light chain 3

Lck : Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LDL : Low density lipoprotein

LL : Dileucine

LNTp : Long-term nonprogressors

LPS : Lipopolysaccharide

L_TCD4⁺ : Lymphocytes T CD4⁺

LTR : Long terminal repeat

Ly6C : Lymphocyte antigen 6C

M

M-CFU : Macrophage colony-forming unit

M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor

Mac1 : Macrophage-1 antigen

MAL/TIRAP : MyD88 adapter-like (Mal), also termed TIRAP Toll-Interleukin 1 Receptor (TIR) Domain Containing Adaptor Protein

MAP : Mitogen-activated protein

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MAPs : Microtubule-associated proteins

MARCO : Macrophage receptor with collagenous structure

MBL : Mannose Binding Lectin

MCP : Monocyte-specific chemokine

mDia1 : Diaphanous-related formin-1

MEK : Mitogen-activated protein kinase kinase

MICAL-L1 : Molecule interacting with CASL-like 1

MIP : Macrophage inflammatory protein

MKK : Mitogen-activated protein kinase kinase

MLC : Myosin light chain

Mon1 : Monensin sensitivity 1

MR : Mannose receptor

Mtb : *Mycobacterium. tuberculosis*

MTOC : Microtubule-organizing center

MVB : Multivesicular bodies

mVps34 : Mammalian homologue of yeast vacuolar protein sorting defective 34

MX1/2 : myxovirus resistance1/2

MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88

N

N-WASP : Neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome protein

NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

Nef : Negative factor

NEMO : Nuclear factor κB essential modulator

NF-κB : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK : Natural killer
NO : oxyde nitrique
NOX2 : NADPH oxydase 2
NLRP3 : Nod like receptor family pyrin domain containing protein 3
NSF : N-ethylmaleimide sensitive factor
O
OCRL : Oculocerebrorenal syndrome of Lowe
OMS : Organisation mondiale de la santé
ORPL1 : Oxysterol-binding protein-related protein 1
P
PAK : P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase
pH : potentiel hydrogène
PHA-P : Phytohemagglutinin-P
PI3K ou PI4K : Phosphatidylinositol 3- ou 4-kinase
PIC : Pre-integration complex
PKC : Protein kinase C
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate
Pol: Polymerase
Poly:IC : Polyinosinic-polycytidylic acid
PS : Phosphatidylserines
PxxP : motif poly-proline
Q
Q-SNAREs : Glutamine-SNAREs
R
R4/R5 : souches CXCR4/CCR5 tropiques
R-SNAREs : Arginine-SNAREs
Rabex-5 : Rab5 GEF
Rac : Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RANTES : Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RBX : RING-box protein
Rel : V-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
RER : Rough endoplasmic reticulum
Rev : Regulator of expression of virion protein
Rho : Ras homolog gene family member
RHR : Rel homology region
RILP : Rab interacting lysosomal protein
ROS : Reactive oxygen species
RT : Reverse transcriptase
RT PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction
S
SAPK/JNK : Stress-activated protein kinase/c-Jun NH(2)-terminal kinase
SBBC : *Sydney Blood Bank Cohort*
SER : Smooth endoplasmic *reticulum*
SH : SRC Homology
SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise
siRNA : Small interfering RNA
SKP1-CUL-F : S-phase kinase-associated protein 1
SLAMF1 : Signaling lymphocyte-activation molecule family
SLX4 : synthetic lethal of unknown function 4

SNAP : Synaptosomal associated protein
SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SNC : Système nerveux central
Sp1 : Specificity protein 1
SR-A : Scavenger de classe A
Src : Sarcoma
ST : *Salmonella* Typhimurium
STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3
STX : Syntaxine
Syk : Spleen tyrosine kinase
T
t-SNARES : target SNAREs
TAD : Trans-activating domain
TAR : Tat RNA responsive element
TCR : T cell receptor
TGN : Trans Golgi Network
Tat : trans-activating protein
TH : T helper
TIR : Toll/Interleukine-1 receptor homologous region
TLR : Toll like receptor
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
TRAM : TRIF-related adaptor molecule
TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
V
v-ATPase : vacuolar-type H⁺ -ATPase
v-SNAREs : vésicule SNAREs
VAMP : Vesicle associated membrane proteins
VCA : Verprolin homology, cofilin homology and acidic
VCC : Virus containing compartments
VDAC : Voltage-dependant anion channel
VEGF : Vascular endothelial growth factor
Vif : Viral infectivity factor
VIH-I : Virus de l'immunodéficience acquise de type I
VIS : Virus de l'immunodéficience simienne
Vpr : Viral protein R
VprPB : Vpr-binding protein
Vps : Vacuolar protein sorting
Vpu : Viral protein U
W
WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE : WASP-family verprolin-homologous protein

Préambule

L'organisme est un ensemble complexe composé d'environ 10 000 milliards de cellules et de 100 000 milliards de bactéries qui cohabitent et fonctionnent ensemble. Pour assurer cette fonction, le système immunitaire dispose d'un large panel de processus de contrôle et de défense. En effet, ce dernier est constitué par un ensemble d'éléments permettant la cohésion entre les différentes cellules de notre organisme. Il se décline suivant 2 types d'immunité : l'immunité innée et l'immunité acquise. L'immunité innée agit en étroite coopération avec l'immunité adaptative et joue un rôle majeur dans l'engagement des réponses immunitaires spécifiques. Parmi les cellules de l'immunité innée, certaines sont d'origine lymphoïde comme les cellules NK (Natural killer) et d'autres d'origine myéloïde comme les polynucléaires neutrophiles ou encore les monocytes/macrophages, cellules sur lesquelles portera l'ensemble de ma thèse.

Le terme de « macrophage » fut prononcé pour la première fois par Elie Metchnikoff à la fin du 19^{ème} siècle (pour revue Turk, 1991). C'est ainsi que dès lors, ces grosses cellules mononuclées (20 à 60 μ M de diamètre) des tissus, capables de phagocyter, ont été identifiées par leur taille et leur fonction (du grec, makros : grand, phagein : manger). Ces cellules, originaires de la moelle osseuse, proviennent de la transformation de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes en progéniteurs myéloïdes. Après diverses étapes de maturation dans la moelle osseuse et sous l'influence de facteurs de croissance, tels que le GM-CSF ou le M-CSF, les monocytes sont libérés dans le sang. Dotée d'une demi-vie relativement courte (2 à 3 jours), les monocytes migrent ensuite vers les tissus sous l'influence de facteurs chimioattractants. C'est lors de ce passage que les monocytes se différencient en macrophages. Contrairement aux monocytes, les macrophages ont une demi vie de plusieurs jours à plusieurs mois. De par leur grande plasticité, les macrophages adoptent différentes morphologies et appellations suivant leurs emplacements tissulaires : cellules de Kupffer (foie), Ostéoclastes (os), microglies (système nerveux central), ou encore macrophages alvéolaires (poumons).

Généralement, on en dénombre plusieurs types suivant leur origine, leur fonction et le stade de développement de l'organisme. Les macrophages primitifs, proviennent du sac vitellin et apparaissent pendant les premiers stades du développement embryonnaire. Ils s'auto-

renouvellent et se maintiennent dans les tissus adultes par une prolifération locale. Les macrophages provenant du foie fœtal immature s'apparentent à ceux trouvés chez l'adulte et sont présents dans la plupart des organes. Chez l'adulte, les macrophages dits « résidents » et les macrophages dits « recrutés ou inflammatoires » sont tous deux dérivés d'un précurseur hématopoïétique commun, comme vu précédemment. Les macrophages dits résidents, localisés dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, participent principalement à l'homéostasie des tissus. Les macrophages dit « recrutés ou inflammatoires » se déplacent sous l'influence d'un gradient de cytokines, chimiokines ou encore de débris bactériens au site de l'inflammation. Bien que la plupart des macrophages adultes proviennent de la différenciation de monocytes sanguins, les monocytes sont également précurseurs de macrophages résidents qui prolifèrent localement indépendamment de la condition inflammatoire du tissu et du recrutement de monocytes périphériques (pour revue Geissmann et al., 2010; Gordon, 2003; Gordon and Pluddemann, 2013; Gordon and Taylor, 2005; Murray et al., 2014) (Figure 1).

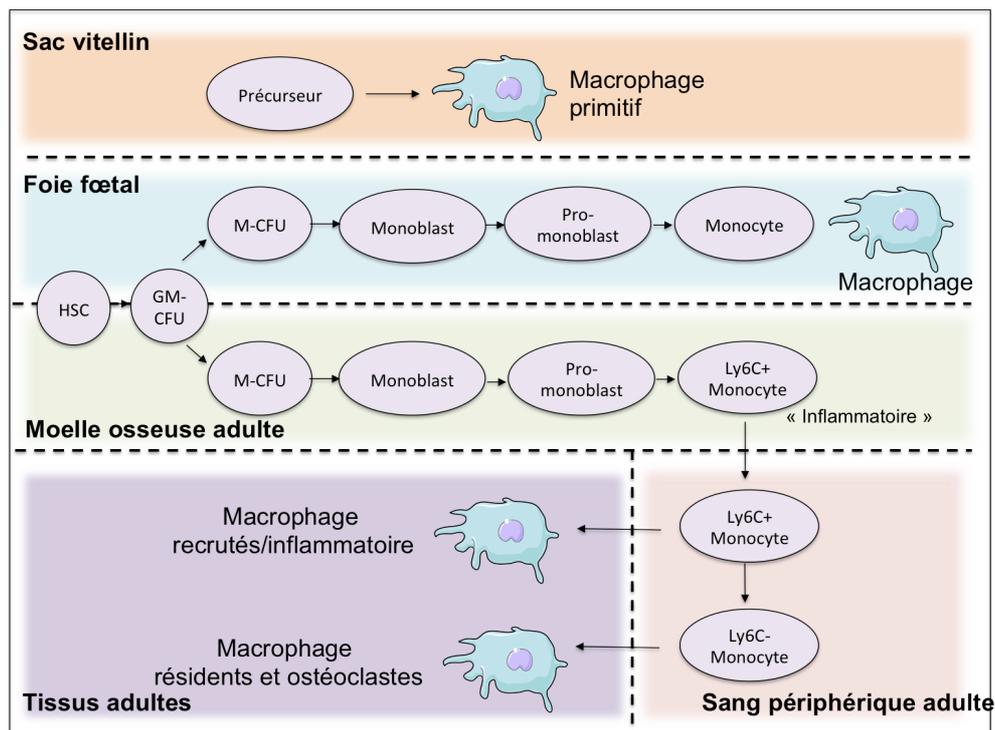


Figure 1. Différenciation des macrophages *in vivo*. Au stade du développement embryonnaire et foetal, les macrophages proviennent du sac vitellin et du foie fœtal. A l'âge adulte, les monocytes se différencient en macrophages ce qui leur confèrent différentes propriétés. Deux types de macrophages sont distinguables les macrophages dit « résidents », provenant des monocytes Ly6C- et les macrophages dit « recrutés et/ou activés » provenant des macrophages Ly6C+. HSC, hématopoïétique stem cell, GM-CFU, granulocyte/macrophage colony-forming, M-CFU, macrophage colony-forming unit (Inspirée de Geissmann et al., 2010; Gordon and Taylor, 2005).

Grâce à cet environnement cytokinique varié, les macrophages peuvent acquérir des fonctions phénotypiques distinctes, mais souvent controversées (pour revue Jaguin et al., 2013; Murray et al., 2014). Classiquement, il existe deux polarisations: la polarisation dite classique ou pro-inflammatoire (M1) et la polarisation dite alternative ou anti-inflammatoire (M2). Initialement, ce programme d'activation a été défini par l'activité antimicrobienne des macrophages. La polarisation dite classique est activée en réponse à une infection bactérienne via le lipopolysaccharide (LPS) et l'interféron- γ (IFN- γ). Elle résulte en l'hyper activation des macrophages associée à une capacité de phagocytose et bactéricide accrues. En revanche, la polarisation dite alternative, repose sur l'activation des macrophages par des infections parasitaires, via les interleukines 4 et 13. Sous cette configuration, le macrophage adopte des fonctions anti-parasitaires telles que la réparation et le remodelage tissulaire. Cette classification s'apparente à celle des lymphocytes T : TH1 et TH2 pour M1 et M2, respectivement. Mais contrairement aux lymphocytes, cette bi-catégorisation n'est pas si contrastée pour les macrophages (pour revue Biswas et al., 2012; Lawrence and Natoli, 2011; Mantovani et al., 2013; Murray et al., 2014) (Figure 2).

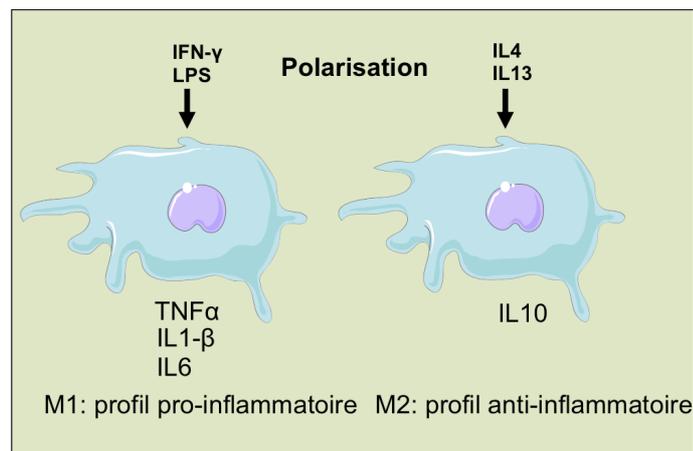


Figure 2. Polarisation des macrophages. Suite à un stimulus externe, le macrophage peut adopter deux polarisations différentes : une polarisation dite pro-inflammatoire (M1) et une polarisation dite anti-inflammatoire (M2).

Outre la variabilité de leur polarisation, les macrophages sont des cellules que l'on peut qualifier de multi-fonctionnelles et dont les enjeux sont cruciaux.

La fonction principale du macrophage est par excellence la phagocytose (pour revue Botelho and Grinstein, 2011; Flannagan et al., 2009; Flannagan et al., 2012). Tributaire de la réponse inflammatoire, ce mécanisme est à l'origine de l'internalisation et de l'élimination de micro-organismes, de corps apoptotiques, de débris cellulaires ou encore de lipides. Par cette

fonction, les macrophages contrôlent l'homéostasie lipidique, en permettant la régulation de l'accumulation de lipides dans le foie par le biais entre autre de leurs récepteurs Scavengers. Une ingestion trop élevée d'acides gras oxydés par les macrophages peut induire la formation de cellules spumeuses entraînant l'apparition de plaques, étape décisive dans le développement de la sclérose en plaques. De plus, la sur-activation accrue des macrophages peut être à l'origine de syndromes métaboliques tels que l'obésité (pour revue Biswas et al., 2012; Jantsch et al., 2014; McNelis and Olefsky, 2014; Prabhudas et al., 2014). Ces cellules jouent également un rôle clé dans le remodelage tissulaire telles que l'angiogenèse ou le développement, par l'absorption de composants de la matrice extracellulaire et par la sécrétion de facteurs cellulaires (VEGF, metalloprotéases...). Une surproduction de ces facteurs est souvent associée au développement de cancers, d'où l'importance de la finesse de leur régulation (pour revue Cook and Hagemann, 2013; Lawrence, 2011; Nucera et al., 2011). Par ailleurs, leur contribution dans la régulation de l'inflammation ne se limite pas uniquement à la phagocytose. Par leur capacité à réguler leur production de cytokines ou chimokines pro-inflammatoires et à présenter les antigènes par le CMH de classe II (CMH_{II}), les macrophages induisent l'infiltration et l'activation de nombreuses autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes T. Un mauvais contrôle de leur production de cytokines pro-inflammatoires peut mener à une inflammation systémique, des dommages vasculaires irréversibles, et une défaillance des organes, symptômes caractéristiques du sepsis (pour revue Cavaillon and Adib-Conquy, 2005; Stearns-Kurosawa et al., 2011).

Ainsi, de par sa plasticité cellulaire, et de par ses disparités fonctionnelles, le macrophage a donc une place centrale dans la préservation de l'intégrité de l'organisme. Comme nous venons de le voir, la phagocytose joue un rôle central dans l'homéostasie lipidique mais également dans les fonctions bactéricides et parasitocides du macrophage. De nombreux pathogènes tels que le virus de l'immunodéficience acquise de type I (VIH-I) (pour revue Cobos-Jimenez et al., 2011; Flannagan et al., 2009; Mazzolini et al., 2010) détournent ce processus d'internalisation et de dégradation, par des mécanismes peu connus à l'heure actuelle, et qui seront au cœur de mon manuscrit.

Introduction

Chapitre I : la phagocytose

La phagocytose est un mécanisme d'internalisation permettant la digestion de grosses particules ($> 0,5 \mu\text{m}$). Chez les eucaryotes protozoaires, comme les amibes *Dyctiostelium*, elle participe à la nutrition par la capture d'éléments présents dans leur environnement (Ryter and Hellio, 1980). Chez les eucaryotes métazoaires, la phagocytose est un mécanisme fondamental de la réponse innée et joue un rôle majeur dans le processus d'inflammation. En effet, elle contribue au remodelage des tissus lors du développement, à l'élimination de microorganismes pathogènes ou à sa présentation par le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH_{II}) (pour revue Aderem, 2002, 2003; Mantovani et al., 2013; Savina and Amigorena, 2007; Underhill and Ozinsky, 2002; Watts and Amigorena, 2001). Cette activité s'est spécialisée à certaines cellules appelées phagocytes professionnels : les polymorphonucléaires neutrophiles, les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages. Sous l'effet de signaux de « danger » portés par un micro-organisme ou un pathogène, ces cellules migrent vers la zone d'infection afin de neutraliser l'agent infectieux. L'interaction de molécules à la surface du pathogène avec les récepteurs spécifiques du phagocyte localisés à sa membrane conduit à l'activation d'une cascade de signalisation. Cette cascade initie l'internalisation du pathogène suivant une migration centripète vers la région périnucléaire, et induit sa dégradation par le recrutement d'hydrolases et d'espèces réactives oxygénées (ROS). Les produits issus de la dégradation ou peptides sont digérés intégralement ou peuvent être chargés sur les molécules du CMH_{II}. Dans cette deuxième configuration, le peptide chargé est présenté aux lymphocytes T afin de déclencher la réponse immunitaire spécifique (pour revue Mantegazza et al., 2013; Savina and Amigorena, 2007; Watts and Amigorena, 2001). Enfin, l'activation des macrophages s'accompagne également par la sécrétion, de cytokines, de chimiokines, de lysozymes, de défensines, de facteurs de croissance ou encore de protéases qui participent à la réponse intercellulaire lors de la réponse immunitaire et inflammatoire (pour revue Benoit et al., 2008; Blander, 2007b; Fairn and Grinstein, 2012; Flannagan et al., 2012; Haas, 2007; Martinez and Gordon, 2014) (Figure 3).

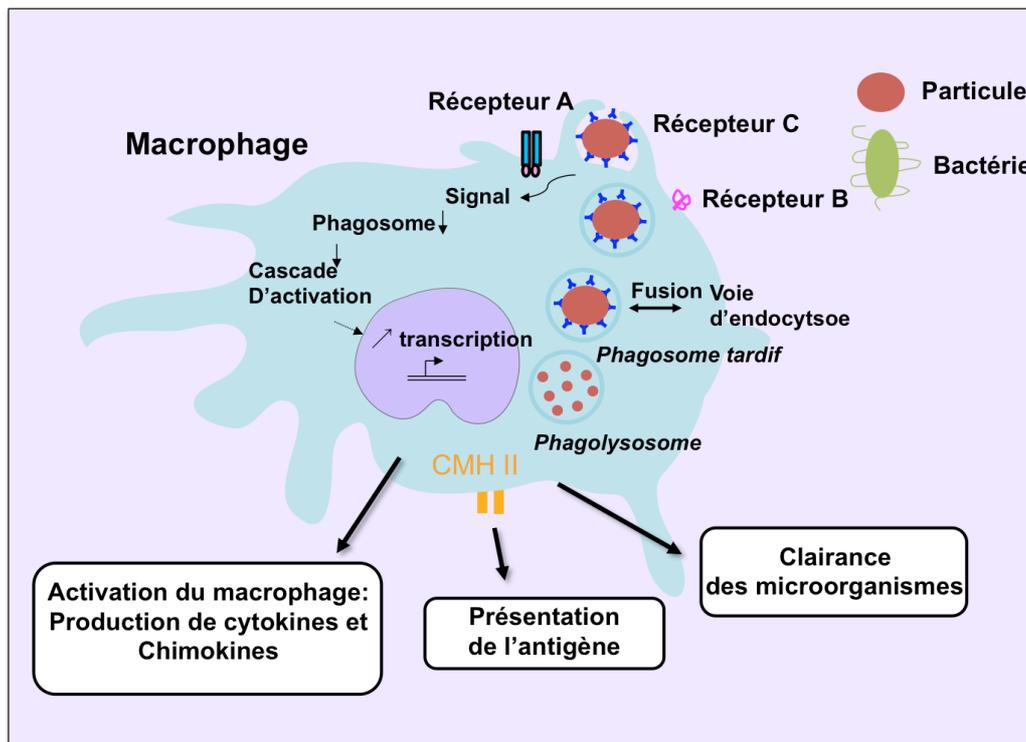


Figure 3. Mécanisme de phagocytose. Après la reconnaissance des récepteurs et de la particule ou de la bactérie, un phagosome se forme. La maturation du phagosome se fait via des fusions et fissions avec la voie d'endocytose. La particule ou la bactérie serait détruite dans le phagolysosome et éventuellement présentée par le CMH_{II} en surface des macrophages. De façon concomitante, les récepteurs de surface activent une cascade de signalisation permettant la production de cytokines et chimokines à l'origine de la réponse intercellulaire.

La phagocytose est donc un processus qui mène à la dégradation d'un pathogène extracellulaire ingéré. Elle se distingue de l'autophagie qui peut permettre la dégradation de pathogènes se trouvant dans le cytoplasme de la cellule, comme il a été très bien décrit pour *Shigella* (Thurston et al., 2012) ou comme cela peut arriver pour *M. tuberculosis* (Gutierrez et al., 2004). Plus communément, l'autophagie est déclenchée suite à un stress (carence de nutriments, hypoxie) et participe à l'homéostasie cellulaire en éliminant les agrégats de protéines ou encore les organelles tels que les mitochondries ou les péroxisomes. L'autophagosome est composé d'une double membrane qui se referme sur une partie du contenu cellulaire. Sa biogenèse et sa maturation sont en partie contrôlées par le recrutement d'une trentaine de protéines spécifiques nommées Atg (« Autophagy related gene ») participant à la formation de deux systèmes de conjugaison analogues aux systèmes d'ubiquitination des protéines. Le premier conjugué, formé des protéines Atg5-Atg12 associées à Atg16L1, permet le recrutement du deuxième complexe sur l'autophagosome en formation. Le second conjugué résulte de la liaison de la protéine Atg8 (appelée aussi LC3) à la phosphatidyléthanolamine, et s'incorpore à la membrane du pré-autophagosome. La

protéine LC3 existe sous deux formes : cytosolique, LC3-I, ou associée au phagosome, LC3-II. Bien que mécaniquement et topologiquement très distinctes, la phagocytose et l'autophagie partagent des similitudes aboutissant à un processus de dégradation lysosomale. En effet, des protéines impliquées dans la formation et la maturation du phagosome, comme les SNARES ou les Rab, ont été décrites pour participer à la biogénèse de l'autophagosome (Fader et al., 2009 ; Yamaguchi et al., 2009). Inversement, suite à la stimulation de récepteurs phagocytaires, tels que Dectine 1 (Ma et al., 2012), les TLR (Sanjuan et al., 2007) ou encore les FcR, et dans certaines conditions, la protéine LC3 peut être activée et localisée sur les phagosomes, on parle alors de LAP (LC3 associated phagosome). Ainsi l'autophagie et la phagocytose peuvent présenter certaines convergences du fait de leur association à la voie lysosomale, mais ces deux mécanismes restent cependant bien différents (pour revue Gomes and Dikic, 2014 ; Cemma and Brumell, 2012 ; Glick et al., 2010) et ce chapitre d'introduction sera focalisée sur la phagocytose.

I. Activation des récepteurs et mécanismes d'internalisation menant à la formation du phagosome

I.1. Activation des récepteurs phagocytaires

Les phagocytes expriment à leur surface un large spectre de récepteurs leur permettant de reconnaître des structures présentes à la surface des pathogènes. Alors que de nombreux récepteurs ont été décrits pour internaliser une particule spécifique (pour revue Canton et al., 2013; Joshi et al., 2006; Underhill and Goodridge, 2012; van Lookeren Campagne et al., 2007), la définition d'un récepteur phagocytaire est beaucoup plus délicate. En effet, la plupart des pathogènes ou corps apoptotiques disposent d'une structure complexe qui ne sera pas reconnue par un unique récepteur mais par la mobilisation de nombreux récepteurs différents et dont la contribution sera variable dans la phagocytose (pour revue Flannagan et al., 2012; Stuart and Ezekowitz, 2005; Underhill and Ozinsky, 2002). Les récepteurs dits phagocytaires se définissent par leur capacité intrinsèque à induire l'internalisation de la particule, lorsqu'ils sont exprimés en surface de cellules non phagocytaires. De par la grande variabilité de molécules de surface pouvant être reconnues, il existe une multitude de récepteurs. En effet, certains composés présents à la surface des bactéries comme le lipopolysaccharide (LPS), les peptidoglycanes, ou encore les phosphatidylserines (PS) en surface des corps apoptotiques nécessitent une interaction spécifique avec les récepteurs phagocytaires. Parmi les différents récepteurs phagocytaires sont répertoriés : les récepteurs

aux opsonines, les récepteurs aux lectines de type C ou encore les récepteurs Scavengers (pour revue Canton et al., 2013; Prabhudas et al., 2014; Stuart and Ezekowitz, 2005 ;Underhill and Ozinsky, 2002). Il existe des récepteurs qualifiés de « non phagocytaires » comme les récepteurs Toll-like (TLRs), et les récepteurs MARCO qui sont requis pour la reconnaissance du pathogène et participent de façon coopérative avec les récepteurs phagocytaires. Mais à la différence des récepteurs dits « phagocytaires », ces derniers ne sont pas suffisant pour déclencher à eux seuls la phagocytose (pour revue Akira and Takeda, 2004; Blander, 2007a; Moretti and Blander, 2014; Peiser et al., 2000) (Figure 4).

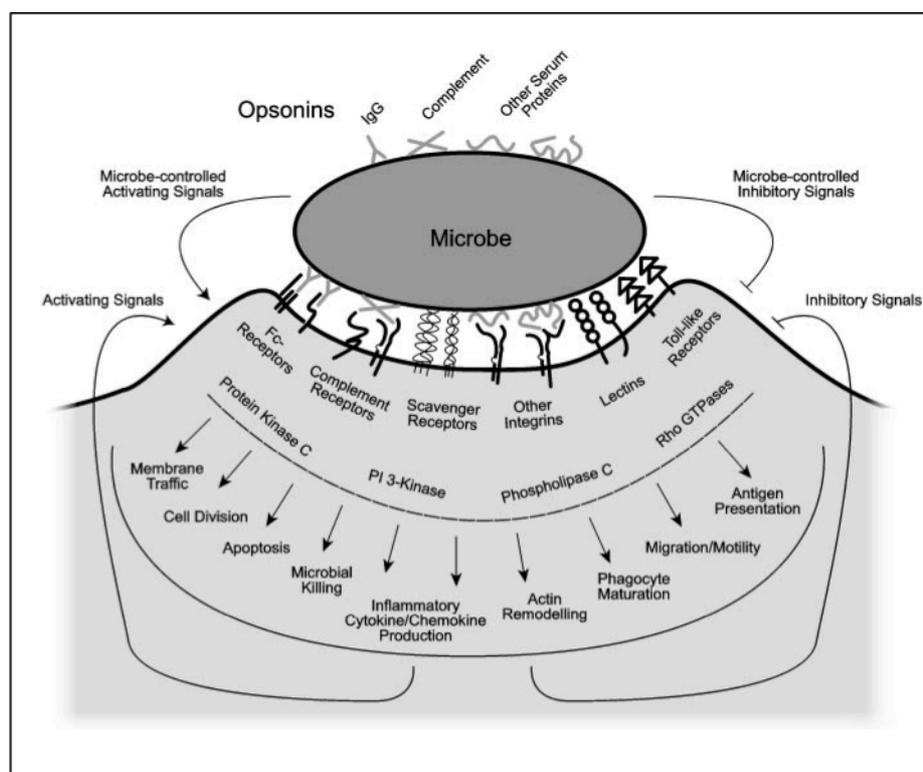


Figure 4. Récepteurs et signalisations mis en jeu lors de la phagocytose de microorganismes. De multiples récepteurs à la surface du phagocyte permettent la reconnaissance du microorganisme. Cette interaction permet l'internalisation de ce dernier et engage de nombreuses voies de signalisation responsables d'une phagocytose efficace et de l'activation du macrophage (D'après Underhill and Ozinsky, 2002).

I.1.1. Les récepteurs phagocytaires et non phagocytaires

I.1.1.1. Les récepteurs aux opsonines

Certaines particules peuvent être reconnues par des molécules solubles circulant dans le sang et dans les fluides interstitiels. Parmi ces molécules, on retrouve les immunoglobulines (Ig), les protéines du complément et les « Mannose Binding Lectin »

(MBL). Cette catégorie de molécules, appelées opsonines, permet le recouvrement spécifique de la surface des particules. Ce processus de recouvrement, appelé opsonisation, est une étape intermédiaire permettant la reconnaissance et l'internalisation des particules par les récepteurs phagocytaires. Actuellement les récepteurs aux opsonines les mieux caractérisés sont : les récepteurs du fragment cristallisable (Fc) des immunoglobulines (FcR) et les récepteurs au complément (CR) (pour revue Botelho and Grinstein, 2011; Deschamps et al., 2013; Groves et al., 2008; Ravetch and Clynes, 1998).

Les récepteurs Fc (FcR)

Les récepteurs Fc se déclinent en différentes classes suivant la nature des immunoglobulines avec lesquelles ils interagissent. Les récepteurs Fc γ (Fc γ R) reconnaissent les Ig de type G (IgG), les récepteurs Fc ϵ et Fc α interagissent avec les IgE et IgA, respectivement. On dénombre 2 types de Fc γ R : les récepteurs Fc γ R dits « activateurs » tels que le Fc γ RI (CD64), le Fc γ RIIA (CD32), et le Fc γ RIIIA (CD16), et les récepteurs Fc γ R dits « inhibiteurs » comme les récepteurs Fc γ RIIB. Les Fc γ R activateurs sont impliqués dans la phagocytose ou bien la cytotoxicité cellulaire, alors que les Fc γ R inhibiteurs régulent les conséquences de l'activation. Le Fc γ RI, le Fc γ RIIA et le Fc γ RIIIA sont exprimés par les monocytes humains, les macrophages et les neutrophiles. En revanche, chez les phagocytes murins, en dépit de la découverte récente du récepteur Fc γ RIV, le Fc γ RIIA est absent. Le Fc γ RIIA contient 2 domaines ITAM « immunoreceptor tyrosin-based activation motif » dans sa partie cytosolique qui sont phosphorylés lors de la liaison du ligand à son récepteur. Les Fc γ RI et Fc γ RIIIA s'associent avec les chaînes γ et ζ , dimère protéique, contenant les domaines ITAM suffisant à l'induction du signal. Il a été montré que la délétion du gène codant le Fc γ RI chez la souris entraîne une inhibition de la phagocytose du complexe immunitaire formé par les IgG2a. Cette même étude indique que cette délétion empêche également la présentation de l'antigène par le CMH_I et réduit la réponse inflammatoire (sécrétion de cytokines, cytotoxicité cellulaire) (Ioan-Facsinay et al., 2002). Contrairement aux Fc γ R activateurs, les Fc γ R inhibiteurs sont caractérisés par la présence, dans leur partie cytoplasmique du motif ITIM, inhibiteur de la phosphorylation des tyrosines (Figure 5). La phagocytose engagée par les FcR, se caractérise par la formation d'extensions membranaires autour de la particule. La présence d'actine polymérisée ou de protéines qui lui sont associées comme la vinculine se matérialise sous la forme d'un signal uniforme, typique de cette phagocytose. D'autre part, des études menées sur sa signalisation ont montré l'implication de deux petites protéines G essentielles à son mécanisme, Cdc42 et Rac1, sur lesquelles je reviendrai par la suite (Caron

and Hall, 1998; Massol et al., 1998) (Figure 6) (pour revue, Niedergang 2014 sous presse ; Aderem and Underhill, 1999; Botelho and Grinstein, 2011; Daeron and Lesourne, 2006; Deschamps et al., 2013; Joshi et al., 2006; Niedergang and Chavrier, 2004; Nimmerjahn and Ravetch, 2008)

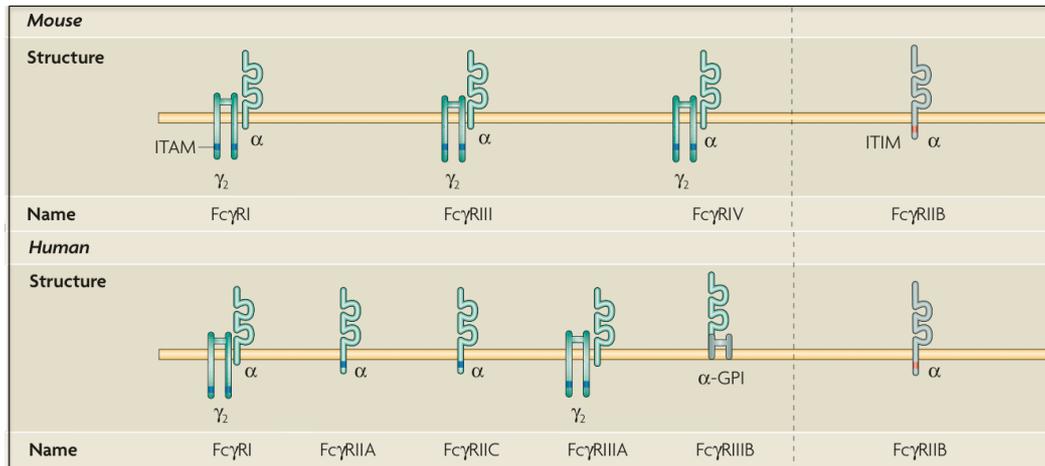


Figure 5. La famille des récepteurs aux IgG, les récepteurs Fcγ. On distingue deux types de récepteurs chez la souris et chez l'homme. Les récepteurs activateurs sont les récepteurs FcγRI, FcγRIII et FcγRIV chez la souris, et les FcγRI, FcγRIIA et FcγRIIIA chez l'homme. A l'exception du récepteur FcγRIIIB chez l'homme qui possède un ancrage GPI, ces récepteurs sont des glycoprotéines de membrane de type I qui utilisent le domaine d'activation des tyrosines, le domaine ITAM pour induire le signal. Les récepteurs inhibiteurs sont les récepteurs FcγRIIB, chez l'homme et la souris, et possèdent un domaine d'inhibition des tyrosines, le domaine ITIM (D'après Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

Les récepteurs au complément (CR)

Le complément est composé d'environ 35 protéines solubles ou membranaires présentes dans le sérum. Le composant majeur de ce dernier est la protéine C3. Le complément circule sous une forme non activée, et c'est suite à un signal de défense qu'il s'activera. Ainsi le système du complément fait partie de l'immunité innée et dont l'activation repose sur une cascade enzymatique. Actuellement, il existe 4 récepteurs au complément qui se déclinent de différentes façons: le CR1 (CD35), le CR2 (CD21), le CR3 (α M β 2, CD11b/CD18, ou Mac1) et le CR4 (α X β 2, CD11c/CD18, ou gp150/95). Seul le CR2 n'a pas été identifié en tant que récepteur phagocytaire. Le CR1 est constitué d'une seule chaîne transmembranaire et reconnaît un large spectre d'opsonines incluant des composants du complément : C1q, C4b, et C3b. Le CR3 et le CR4 sont des hétérodimères qui se partagent la chaîne β 2 et qui ont une chaîne α distincte α M ou CD11b, et α X ou CD11c, respectivement. Ces deux récepteurs reconnaissent le iC3b, fragment opsonisant dérivé de la protéine C3. La liaison de ce fragment à des bactéries ou immunoglobulines permet sa reconnaissance par le CR3. Il a été montré

que l'internalisation de particules opsonisées par le CR3 nécessite une activation préalable apportée par la stimulation au TNF α , au LPS ou encore à la fibronectine. In vitro, il est possible de mimer cette activation avec de l'ester de phorbol (PMA), provoquant l'ouverture et l'activation du CR3 via un signal « inside-out » (Wright and Meyer, 1986). Contrairement à la phagocytose dépendante du FcR où la formation d'extension membranaire est clairement visible au cours de la phagocytose, elle l'est beaucoup moins par celle engagée par le récepteur au complément. La particule semble « s'enfoncer » dans la cellule. Néanmoins, des études montrent la présence de replis membranaires ou une asymétrie de la membrane suite à cette phagocytose (Colucci-Guyon et al., 2005; Patel and Harrison, 2008). L'actine polymérisée et les protéines associées comme la vinculine ou la paxiline se matérialisent par un signal ponctiforme, lors de cette phagocytose. De plus, sa signalisation requiert une protéine G essentielle, la protéine RhoA (Caron and Hall, 1998) et des formines comme mDia1 (Colucci-Guyon et al., 2005; Lewkowicz et al., 2008) (Figure 6). (pour revue Groves et al., 2008; May and Machesky, 2001; Underhill and Ozinsky, 2002; van Lookeren Campagne et al., 2007 Aderem and Underhill, 1999; Ravetch and Clynes, 1998).

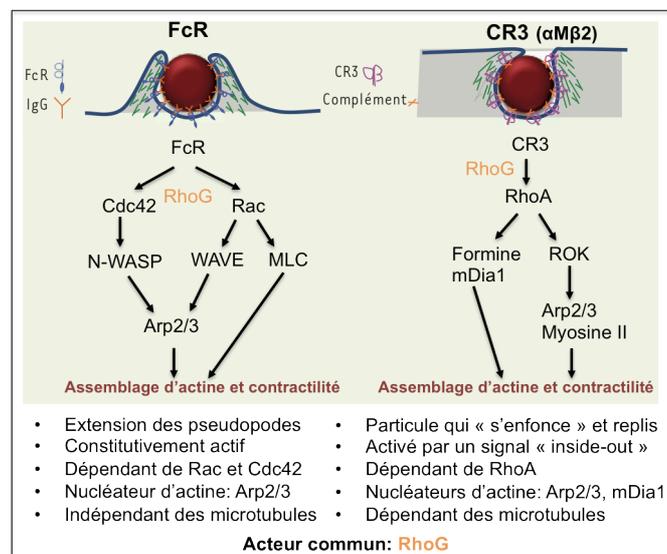


Figure 6. Cascades d'activation induites par les récepteurs Fc (FcR) et au complément C3bi (CR3) dans les macrophages. Alors que l'engagement de la phagocytose se fait par l'extension de pseudopodes autour de la particule pour le FcR, la phagocytose initiée par le CR3 est caractérisée par un enfoncement de la particule dans la cellule, marqué aussi par des replis membranaires. Cette dichotomie entre les deux récepteurs est également visible sur le plan moléculaire. L'activation du FcR, indépendante des microtubules, nécessite le recrutement de Cdc42 et de Rac qui recrutent N-WASP et WAVE, respectivement, afin d'activer le complexe Arp2/3. Ceci conduira à la nucléation et au remodelage d'actine, respectivement. Par ailleurs, Rac déclenche également la phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC) afin de contrôler la contractilité du phagosome. En revanche, l'activation de CR3, dépendante des microtubules, nécessite le recrutement de Rho qui activera la kinase ROK afin de recruter le complexe Arp2/3 ainsi que le recrutement de mDia1. Malgré une apparente disparité entre ces deux voies de signalisation menant à la polymérisation d'actine, elle partage toutes deux la protéine RhoG. (Inspirée de Niedergang 2014, sous presse ; Deschamps et al., 2013; Niedergang and Chavrier, 2004, 2005).

1.1.1.2. Les récepteurs aux lectines de types C

Les phagocytes expriment un large panel de lectines à leur surface. Elles sont caractérisées par la présence de un ou plusieurs domaines « C-type lectin-like domain » (CTLD). Les lectines se lient spécifiquement à un ose ou un oligoside présent généralement sur des carbohydrates, des glycoprotéines ou encore des glycolipides. Elles jouent un rôle majeur dans l'immunité en reconnaissant les glucides spécifiques de certains agents pathogènes infectieux (pour revue Goodridge et al., 2012; Kerrigan and Brown, 2009; Sancho and Reis e Sousa, 2012).

Le récepteur au mannose

Le récepteur au mannose (MR ou CD206) est une protéine transmembranaire de type I appartenant aux lectines de type C de groupe VI. Il est composé d'une région extracellulaire contenant un domaine riche en cystéines, d'un domaine de liaison à la fibronectine de type II et de 8 domaines CTLD. Il est également doté d'une région transmembranaire et d'une courte région cytoplasmique composé d'un seul résidu tyrosine. Structuralement, ce récepteur existe sous 2 conformations : une forme compacte et une forme relâchée (Boskovic et al., 2006). Initialement décrit pour être strictement exprimé dans les macrophages, ce récepteur est également présent à la surface d'autres cellules phagocytaires comme les cellules dendritiques (Avrameas et al., 1996). Le MR reconnaît de nombreux microorganismes comme *Candida albicans* et *Mycobacterium tuberculosis* (Marodi et al., 1991; Schlesinger, 1993). Cette reconnaissance se fait par la présence de sucres comme le mannose et le fucose ou encore de carbohydrates à la surface du microorganisme. L'expression de ce récepteur dans des cellules non phagocytaires induit la phagocytose de *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*. Cette étude montre que c'est la région cytoplasmique de ce récepteur qui est à l'origine de cette activité (Ezekowitz et al., 1990; Ezekowitz et al., 1991). D'autres études soutiennent également l'importance de ce récepteur dans la phagocytose. En effet, le blocage du MR par l'utilisation d'anticorps ou du mannane soluble diminue de trois fois la capacité d'ingestion de *Francisella tularensis* par les macrophages (Schulert and Allen, 2006). Il a été montré que l'actine filamenteuse (F-actin), la PKC α ou encore la myosine seraient impliquées dans la phagocytose engagée par le MR (Allen and Aderem, 1996). Cependant la voie de signalisation en aval de ce récepteur n'est pas encore clarifiée. Ainsi certains chercheurs proposent qu'à défaut d'être un récepteur phagocytaire au sens strict, le MR interagirait avec

d'autres molécules présentes à la surface des phagocytes afin d'induire l'internalisation de la particule (Le Cabec et al., 2005).

Le récepteur Dectin-1

Le récepteur Dectin-1 est une protéine transmembranaire de type II appartenant aux lectines de type C non classiques de groupe V. Il est composé d'une région extracellulaire contenant un domaine CTLD unique, d'une région transmembranaire, et d'une région cytoplasmique dotée d'un motif « ITAM-like ». Il existe deux isoformes majeures du récepteur Dectin-1, une codant la forme entière du récepteur, et l'autre codant une version clivée dans sa région cytoplasmique (Heinsbroek et al., 2006). Ces récepteurs sont exprimés à la surface de nombreuses cellules y compris les macrophages et les cellules dendritiques. Les récepteurs Dectin-1 reconnaissent de multiples microorganismes tels que *Pneumocystis carinii*, ou encore *Saccharomyces cerevisiae*, par le glucan β présents à leur surface (Saijo et al., 2007 ; Taylor et al., 2007). De façon similaire, à la phagocytose engagée par le FcR, la phagocytose induite par le récepteur Dectin-1 requiert la phosphorylation de la tyrosine située dans le motif ITAM. La tyrosine kinase Syk ne serait pas responsable de cette phosphorylation dans les macrophages, contrairement aux cellules dendritiques. Ceci suggère l'existence d'une autre voie de signalisation (Herre et al., 2004). L'utilisation de mutants dominants négatifs Cdc42 et Rac1, protéines indispensables à la phagocytose FcR, montre qu'elles sont également impliquées pour la phagocytose engageant les récepteurs Dectin-1 (Herre et al., 2004). Enfin, la Dectin-1 est capable de s'associer à la tetraspanine CD63 lors de la phagocytose, mais l'implication de ce complexe dans ce mécanisme n'est pas encore renseignée (Brown, 2006).

1.1.1.3. Les récepteurs Scavengers de classe A

Les récepteurs Scavengers de classe A (SR-A) sont composés d'une région cytoplasmique, d'une région transmembranaire, d'un domaine de liaison aux protéines « coiled coil domain », d'une ou de plusieurs régions contenant du collagène et d'un domaine riche en cystéines. Ces récepteurs ont été décrits initialement pour être présents majoritairement à la surface des macrophages, mais ils le sont également à la surface des cellules dendritiques. Il existe 3 isoformes majeures de ces récepteurs : SR-AI, SR-AII et SR-AIII. Ils reconnaissent divers ligands comme le LPS, les formes modifiées des lipoprotéines

de basse densité (LDL) ou encore la β amyloïde, peptide caractéristique du développement de la maladie d'Alzheimer. Des expériences de phagocytose réalisées dans des souris déficientes pour SRA-I/II montrent une réduction de la clairance de bactéries à Gram-positif par rapport à des souris sauvages (Thomas et al., 2000). Des études plus récentes, montrent l'implication de ces récepteurs dans l'internalisation de la β amyloïde. En effet, chez des souris déficientes pour SRA-I/II, on constate une réduction de 60% d'internalisation de β amyloïde par les microglies par rapport aux cellules contrôles (Chung et al., 2001; Zhang et al., 2014). Ces différentes expériences suggèrent donc l'importance de ces récepteurs dans l'internalisation. Cependant, du fait de leur grande diversité, il reste à éclaircir la contribution et les mécanismes de ces récepteurs dans son activité de phagocytose (pour revue Canton et al., 2013; Prabhudas et al., 2014 Jozefowski, 2012) (Figure 7).

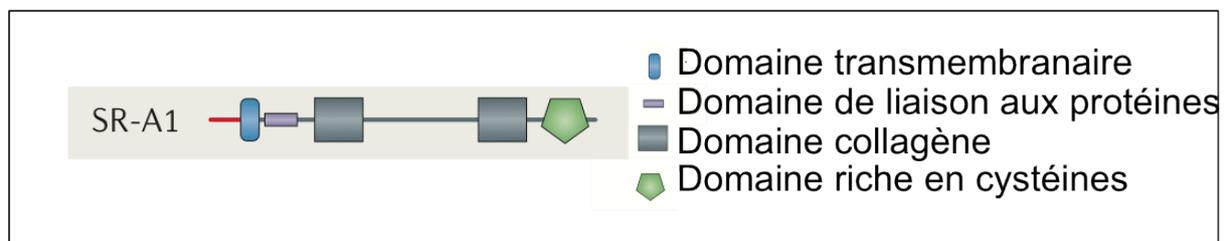


Figure 7. Structure de l'isoforme 1 du récepteur Scavenger de type A (D'après Canton et al., 2013)

1.1.1.4. Cas particulier : les récepteurs Toll like

Les récepteurs Toll like (TLR) sont au nombre de 10 chez l'homme et sont exprimés par les macrophages. Ce sont des glycoprotéines de membrane de type I. Ils sont composés d'un domaine cytoplasmique contenant un domaine conservé (TIR) et responsable de leur signalisation, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine extracellulaire variable riche en leucines. De par l'extrême variabilité de leur domaine extracellulaire, ils peuvent reconnaître différents ligands comme l'ARN double brin (TLR3), le LPS (TLR4) ou encore les CpG (TLR9). Les TLR1, TLR2 et TLR4 sont localisés à la surface de la cellule alors que les TLR3, TLR7 et TLR9 ne s'y trouvent pas à l'équilibre. Leur signalisation a été sujette à de nombreuses études. Actuellement, on dénombre 4 protéines adaptatrices pouvant se lier au domaine TIR du récepteur : le facteur de différenciation myéloïde 8 (MyD88), l'adaptateur de MyD88 en complexe avec la protéine associée TIR (MAL/TIRAP), l'activateur des interférons associé au récepteur Toll (TRIF) et la molécule associée au récepteur Toll (TRAM). La transduction du signal est réalisée par l'intermédiaire de ces adaptateurs qui, à

leur tour, activeront une cascade de protéines kinases et de facteurs de transcription responsables de la réponse inflammatoire (pour revue Akira and Takeda, 2004; Beutler, 2004). Bien que ces récepteurs soient considérés comme non phagocytaire au sens strict du terme, ils jouent un rôle majeur dans la phagocytose en activant sa réponse (pour revue Lee and Kim, 2007; Moretti and Blander, 2014; Watts, 2004). Des expériences menées sur les macrophages murins montrent que des ligands comme le CpG ou le LPS, spécifique des TLR, promeuvent l'internalisation de bactérie comme *E. coli* ou *Brucella abortus* (Doyle et al., 2004; Lee et al., 2013). Par ailleurs, les adaptateurs MyD88 ou IRAK4 sont induits lors de la phagocytose engagée par les récepteurs Scavengers (Doyle et al., 2004) (Figure 8).

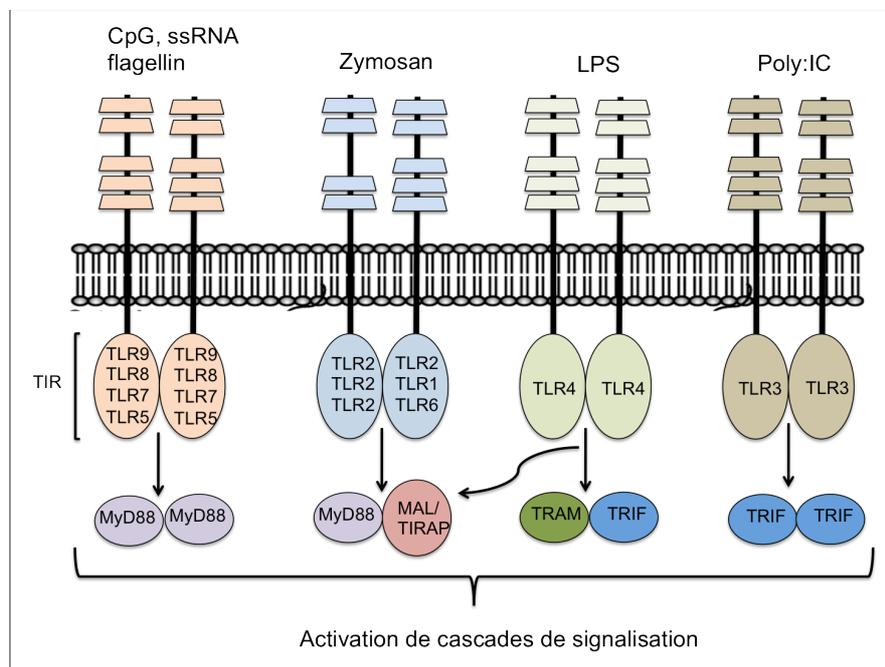


Figure 8. Les différents récepteurs Toll like, leurs ligands et leurs protéines adaptatrices. Les récepteurs Toll like sont nombreux (TLR8, TLR4 ou encore TLR3). L'activation de ces récepteurs se fait par leur ligand (CpG, LPS ou encore Poly inosine : cytosine, Poly :IC). Ils s'activent sous forme d'homodimères (TLR2 :TLR2) ou d'hétérodimères (TLR2 :TLR1). Par leur domaine TIR (Toll/Interleukine-1 receptor homologous region), ils s'associent à des protéines adaptatrices (MyD88, MAL/TIRAP, TRAM et TRIF) qui sont à l'origine de cascades d'activation permettant la transcription de gènes (Inspirée de Beutler, 2004).

I.1.2. Phosphorylation des tyrosines : cas particulier du FcR

La liaison des immunoglobulines sur les récepteurs Fc entraîne l'agrégation de ces récepteurs au site de phagocytose et induit une cascade d'activation. Ce premier mécanisme aboutit à une polymérisation d'actine rapide nécessaire à la formation de la coupe phagocytaire. Suite à l'agrégation de ces récepteurs, le domaine ITAM des récepteurs Fc est

phosphorylé par des protéines kinases. Cette phosphorylation rapide, se fait sur les résidus tyrosines du domaine ITAM et est essentielle à la polymérisation d'actine à la coupe phagocytaire (pour revue Berton et al., 2005; Cox and Greenberg, 2001; Flannagan et al., 2012; Groves et al., 2008; Joshi et al., 2006) (Figure 9).

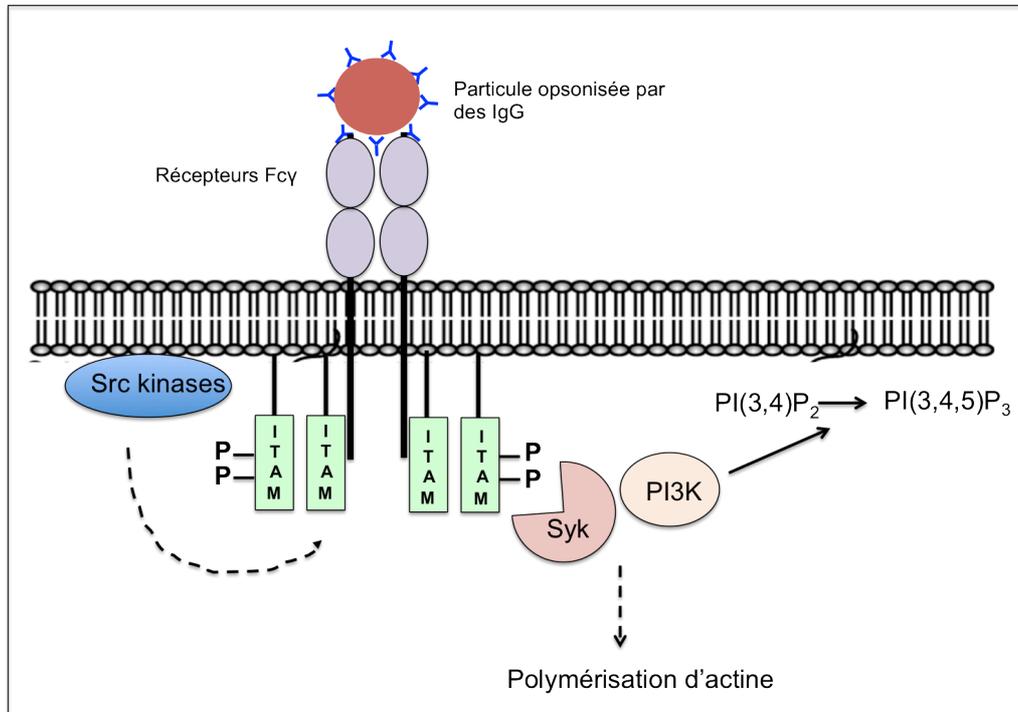


Figure 9. Recrutement de tyrosines kinases en aval des récepteurs Fc γ . Après l'interaction des récepteurs Fc γ avec la particule opsonisée, les récepteurs sont phosphorylés sur leur domaine ITAM par les kinases Src. Ces phosphorylations entraînent le recrutement de la protéine Syk à la coupe phagocytaire. Par ailleurs, les kinases PI3K régulent la production de phosphoinositides à la membrane. L'activation et le recrutement de ces différentes protéines, suivis d'une cascade d'activation permettront la polymérisation d'actine à la coupe phagocytaire.

Les kinases Src : rôle de la tyrosine kinase Hck (Hematopoietic cell kinase)

Les récepteurs Fc γ ne possèdent pas d'activité kinase intrinsèque. Ainsi, la phosphorylation des domaines ITAM par des kinases de la famille Src est requise pour initier la signalisation de ces récepteurs. Les Src kinases responsables, en partie, de cette phosphorylation sont au nombre de trois : Hck, Lyn et Fgr. En effet, il a été montré que dans des macrophages murins issus d'une souris déficiente pour ces trois kinases la phagocytose dépendante du Fc γ est inhibée de 60%. La perte de l'activité simultanée de Hck, Lyn et Fgr entraîne une inhibition de la polymérisation d'actine à la coupe phagocytaire, ainsi qu'une diminution de l'activité de Syk, protéine activée en aval de la cascade de signalisation. En revanche, l'invalidation de

d'une de ces trois kinases n'est pas suffisante pour affecter drastiquement la phagocytose (Fitzer-Attas et al., 2000).

La protéine Hck est majoritairement exprimée dans les macrophages. Elle est composée d'un domaine riche en prolines (SH3), d'un domaine d'interaction avec les motifs à tyrosine phosphorylée (SH2) et d'un domaine responsable de son activité enzymatique (SH1) (Figure 10). Cette kinase peut passer d'une conformation inactive à une conformation active par des réactions catalytiques menées par des phosphorylations ou des déphosphorylations de la protéine. Elle est augmentée au cours de la différenciation myéloïde et existe sous deux isoformes : p59Hck et p61Hck. Elles diffèrent par leur localisation et leur cinétique d'apparition au cours de la phagocytose dans les macrophages. L'isoforme p59Hck est située préférentiellement à la membrane plasmique et est recrutée précocement à la coupe phagocytaire. L'isoforme p61Hck est située sur les lysosomes via son site de palmytation et de myristylation et apparaît sur le phagosome plus tardivement (Guet et al., 2008). La mutation du domaine de palmytation de p59Hck, qui est normalement présente à la membrane plasmique, redirige cette protéine sur les lysosomes contenant l'isoforme p61Hck (Carreno et al., 2000). Ce résultat suggère que la palmytation de p59Hck pourrait être le différentiel de localisation de cette protéine à la membrane plasmique ou sur les lysosomes, mais le mécanisme exact n'a pas encore été établi. Par ailleurs, l'expression de mutants constitutivement actifs de la protéine p59Hck ou celle de dominants négatifs pour p59Hck, dans des lignées de macrophages murins, montre que ces protéines sont impliquées dans la voie de signalisation dépendante des Fc γ R (Carreno et al., 2002). Hck permet l'activation de la kinase Syk, située en aval de la signalisation du récepteur Fc.

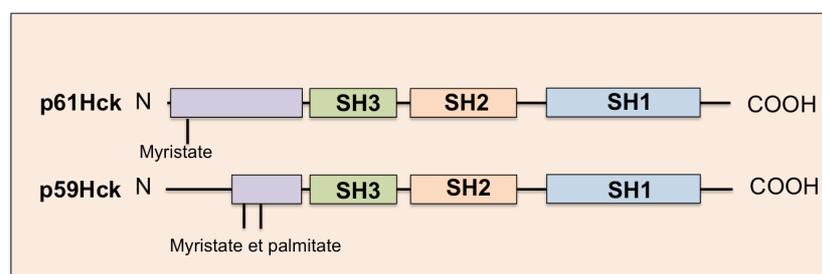


Figure 10. Domaines des deux isoformes de la protéine Hck, p61Hck et p59Hck. La protéine Hck est composée de trois domaines d'homologie aux kinases Src (SH1, SH2 et SH3). Ces deux isoformes diffèrent par la présence d'un myristate présent en N terminal pour p61Hck, et d'un domaine N terminal plus court pour p59Hck, marqué par un myristate et un palmitate (Inspirée de Guet et al., 2008).

La protéine kinase Syk

La protéine kinase Syk, exprimée dans les macrophages, joue un rôle majeur dans la cascade de signalisation menant à la polymérisation d'actine. En effet, l'utilisation d'une protéine chimère composée du domaine extracellulaire de liaison au récepteur Fc γ fusionnée à la région codante de la protéine Syk est suffisante pour induire la phosphorylation de protéines, la polymérisation d'actine et le déclenchement de la phagocytose (Cox et al., 1996). Elle intervient en aval de la signalisation des kinases Src. En effet, une fois les domaines ITAM du Fc γ R phosphorylés, Syk est recrutée rapidement à la membrane du phagosome en formation via son domaine d'homologie aux protéines Src (SH2). La déplétion de cette kinase dans les souris entraîne une diminution de la phagocytose dépendante du Fc γ R des macrophages. En revanche, elle n'inhibe pas complètement la polymérisation d'actine, mais bloque la formation de la coupe phagocytaire dans cette étude (Figure 9) (Crowley et al., 1997). L'implication de Syk dans la polymérisation d'actine étant peu claire, une étude récente menée par V. Jaumouillé apporte un nouvel éclairage sur la contribution de cette protéine dans la phagocytose induite par les Fc γ R. En effet, l'activation de Syk permettrait la restauration de la mobilité des récepteurs Fc γ R non engagés, restreinte par l'activation de la polymérisation d'actine lors de la phagocytose, en induisant la clairance de l'actine à la coupe phagocytaire (Jaumouille et al., 2014).

La protéine kinase de classe II, PI3K

Il existe 3 classes de PI3K mais seules deux interviennent dans la phagocytose : les PI3K de classe I et III. Ces kinases contrôlent la production de phosphoinositides. Les produits de la PI3K de classe I et III sont le 3,4,5-tri phosphate [PI(3,4,5)P₃] et le phosphatidylinositol 3-phosphate [PI(3)P], respectivement (Figure 9). L'utilisation de la wortmannine ou du LY294002, inhibiteurs des PI3K, bloque la phagocytose de particules opsonisées par des IgG dans les macrophages, mais pas la polymérisation d'actine (Araki et al., 1996). Des études montrent que lors de la phagocytose, le [PI(4,5)P₂], composé phosphorylé par la PI3K de classe I, serait présent transitoirement sur le phagosome en formation (Botelho et al., 2000). Le [PI(3,4,5)P₃], lui, est produit sous la coupe phagocytaire et disparaît immédiatement après la fermeture du phagosome. Sa cinétique d'apparition coïncide avec la cinétique de recrutement de la PI3K de classe I. La production de [PI(3)P] est plus tardive, et apparaît lors du début de la fermeture du phagosome. L'inhibition spécifique des kinases originaires de la production de ces trois composés joue un rôle important dans la formation et la fermeture du phagosome (Vieira et al., 2001) (Figure 11). Ce dernier résultat montre l'importance de ces composés dans le processus de formation du phagosome qui reste à clarifier (pour revue Botelho et al.,

2004; Flannagan et al., 2012; Vieira et al., 2002)

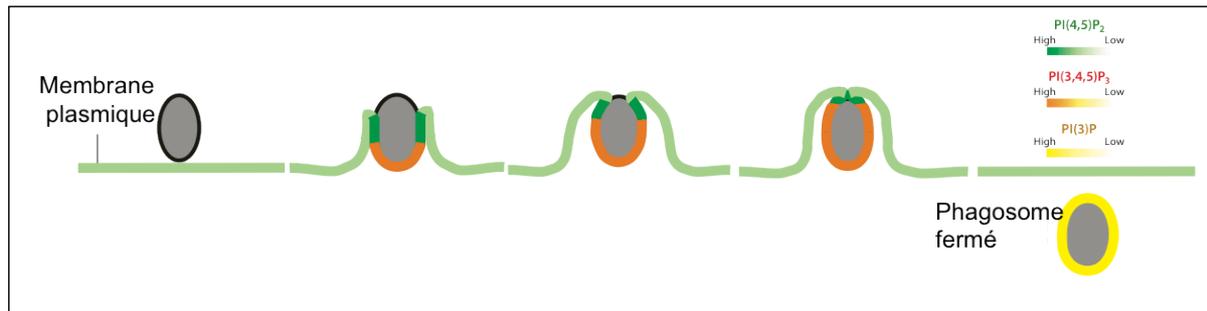


Figure 11. Cinétique d'apparition des phosphoinositides dans les étapes de formation du phagosome. Le $[PI(4,5)P_2]$ apparaît précocement et transitoirement dans les étapes de formation du phagosome. De façon concomitante à cette première apparition, le $[PI(3,4,5)P_3]$ augmente à la coupe phagocytaire et disparaît à la fermeture du phagosome. Le $[PI(3)P]$ s'accumule plus tardivement et est enrichi sur le phagosome précoce (D'après Flannagan et al., 2012).

I.2. Mécanisme d'internalisation du FcR : remodelage membranaire

Suite à l'activation des récepteurs, le macrophage internalise le microorganisme. Cette étape d'internalisation représente l'étape précoce de la phagocytose. Elle est caractérisée par la formation d'extensions membranaires, les pseudopodes, autour de la particule à internaliser. Deux composantes sont primordiales à la formation d'une coupe phagocytaire efficace et à la délivrance du phagosome : la polymérisation d'actine et le recrutement de compartiments de la voie d'endocytose. Pendant longtemps, il a été considéré que la force générée par l'actine était suffisante pour permettre l'extension de pseudopodes. Mais des études ont montré que la polymérisation d'actine était accompagnée d'un apport membranaire provenant de compartiments endosomaux, indispensable à l'extension de la membrane autour de particules de grande taille (3 μm). Ce mécanisme complexe fait intervenir de nombreuses protéines comme les petites protéines G, les myosines ou les SNARES (Figure 12) (pour revue Niedergang 2014 article sous presse ; Botelho and Grinstein, 2011; Braun and Niedergang, 2006; Deschamps et al., 2013; Flannagan et al., 2012; Groves et al., 2008; Niedergang and Chavrier, 2004, 2005)

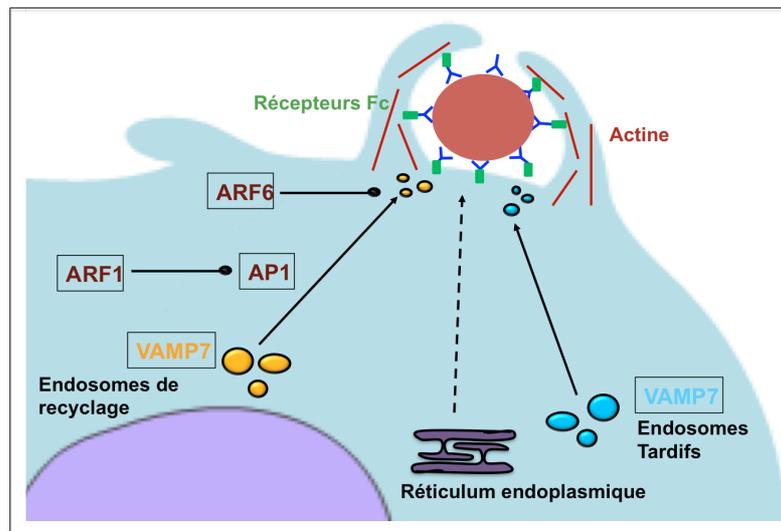


Figure 12. Polymérisation d'actine et apport membranaire à la coupe phagocytaire des récepteurs Fc. La formation de la coupe phagocytaire et sa fermeture est caractérisée par la polymérisation d'actine qui constitue la force motrice. Par ailleurs, cette étape nécessite un remodelage membranaire apporté par le recrutement de différents compartiments intracellulaires : les endosomes de recyclage, le réticulum endoplasmique, et les endosomes tardifs.

I.2.1. Polymérisation d'actine : Force motrice par excellence

Les filaments d'actine sont des polymères dynamiques formés par des monomères d'actine qui s'associent d'un côté, et qui se dissocient de l'autre (Figure 13). La formation de ces filaments requiert l'activité de nucléateurs et de protéines effectrices en aval de la signalisation. La polymérisation d'actine lors de la phagocytose dépendante du récepteur Fc est sous le contrôle du nucléateur Arp2/3. Les protéines effectrices en aval de cette signalisation sont Rac1, Cdc42 ou encore les protéines WASP.

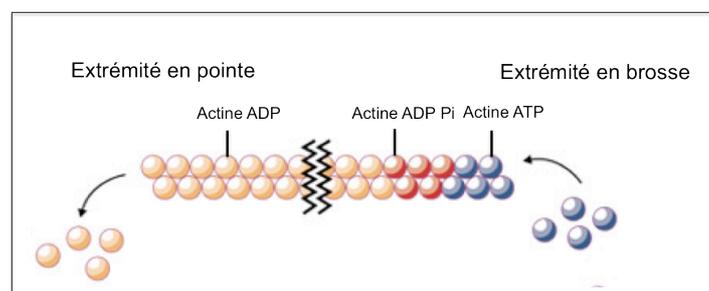


Figure 13. Polymérisation de l'actine. L'actine monomérique globulaire a un site de liaison qui lui permet de se lier à de l'ATP ou du GDP. Les monomères d'actine s'assemblent pour former un filament polarisé qui possède une extrémité riche en actine-F-ATP, appelée extrémité en brosse ou (+) ainsi qu'une extrémité en pointe ou (-) riche en actine-F-GDP. L'hydrolyse de l'ATP liée à l'actine lui permet ainsi de réguler son passage de l'état monomérique (actine-G) à la forme filamenteuse (actine-F) (D'après Littlefield and Fowler, 2002).

Contrôle local de la polymérisation d'actine par les GTPases

Les petites protéines G, Rac, et Cdc42 de la famille Rho jouent un rôle primordial dans le contrôle local de la polymérisation d'actine lors de l'étape d'internalisation de la phagocytose. L'activation des protéines G est régulée par des facteurs d'échanges (GEF : « guanine nucleotide exchange factor ») permettant l'échange entre les nucléotides GDP et GTP. La capacité intrinsèque des petites protéines G à hydrolyser les nucléotides GTP est faible. Cette réaction est donc catalysée par les protéines GAP (« GTPase activating protein »). Ce mécanisme de régulation leur confère deux états : actif lorsque la protéine est liée à son GTP et inactif lorsqu'elle est liée à son GDP (Figure 14). Cdc42 intervient rapidement dans la formation de la coupe phagocytaire. L'utilisation de mutants dominants négatifs de Cdc42 et de Rac1 dans une lignée de macrophages murins inhibe la phagocytose dépendante des récepteurs Fc. Ces mutants entraînent également une diminution de l'accumulation d'actine à la coupe phagocytaire (Caron and Hall, 1998). Des expériences de vidéomicroscopie et de biochimie montrent une activation précoce de Rac1 (1 min) après le déclenchement de la phagocytose dépendante du FcR alors que celle de Cdc42 est maximale à 10 min de phagocytose (Beemiller et al., 2010 ;Niedergang et al., 2003). La présence de Cdc42 à la coupe phagocytaire est concomitante avec la formation d'un anneau d'actine et de son accumulation à cette même localisation. Les deux isoformes de Rac, Rac1 et Rac2, montrent un patron d'expression différent. Rac1 s'accumule progressivement sur les pseudopodes de la coupe phagocytaire en formation, alors que l'accumulation de Rac2 est restreinte à sa base. Bien que localisés tous les deux au niveau de l'anneau d'actine, les conséquences du patron d'expression de Rac1 et Rac2 sur la dynamique de l'actine restent peu claires (Hoppe and Swanson, 2004 ;Swanson and Hoppe, 2004). Une étude récente menée par l'équipe E. Caron, remet un peu en question les expériences de mutants dominants négatifs et met l'accent sur l'implication d'une autre GTPase, RhoG, dans la phagocytose, bien que son mécanisme d'action ne soit pas très clair (Tzircotis et al., 2011).

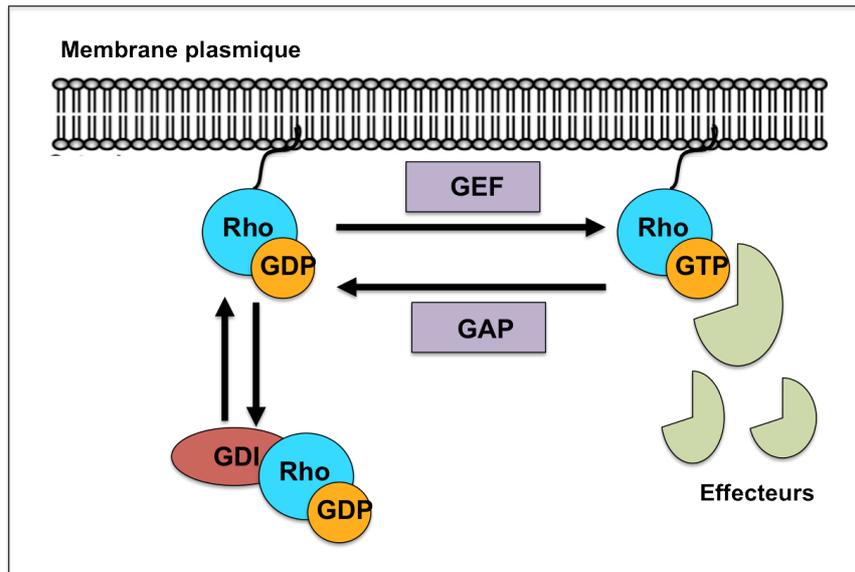


Figure 14. Cycle des Rho GTPase. Les protéines Rho sont des interrupteurs moléculaires. Elles cyclent entre un état inactif, liées au GDP et un état actif, liées au GTP où elles pourront interagir avec leurs effecteurs. L'échange du GDP en GTP se fait par les GEF. En revanche, l'hydrolyse du GTP en GTP est catalysée par les GAP. Les Rho GTPases sont également régulées par les GDI (« guanosine nucleotide dissociation inhibitors ») qui empêche les Rho-GDP de s'associer aux membranes.

Contrôle de la nucléation de l'actine par la protéine WASP et le complexe Arp2/3

Sous sa conformation active, la protéine Cdc42 interagit avec les protéines de la famille WASP (« Wiskott-Aldrich syndrome protein »). Suite à cette interaction, les protéines WASP changent de conformation et exposent leur domaine VCA (« verprolin homology, cofilin homology and acidic »). C'est par ce domaine que ces protéines lient et activent le complexe Arp2/3 nécessaire à la nucléation d'actine (Figure 15). Ce complexe Arp2/3 est localisé dans des régions riches en actine à la coupe phagocytaire (May et al., 1999) (pour revue Machesky and Insall, 1999). Parmi les différents membres de la famille WASP, la protéine WASP est la mieux caractérisée dans la phagocytose. Chez les macrophages de patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich où la protéine WASP est absente, la polymérisation d'actine à la coupe phagocytaire et la phagocytose dépendante du récepteur Fc sont altérées (Lorenzi et al., 2000). Des expériences de siRNA dirigées contre la protéine WASP endogène dans des macrophages confirment que la protéine est recrutée à la coupe phagocytaire et est primordiale pour la polymérisation d'actine, l'initiation de la coupe phagocytaire et donc une phagocytose efficace (Park and Cox, 2009; Tsuboi and Meerloo, 2007). Des expériences de dissociations artificielles entre le complexe Arp2/3 et WASP dans une lignée de macrophage mènent à la perte du recrutement d'actine à la coupe phagocytaire, à une diminution de la coupe phagocytaire et de la phagocytose qui en découle (May et al., 2000).

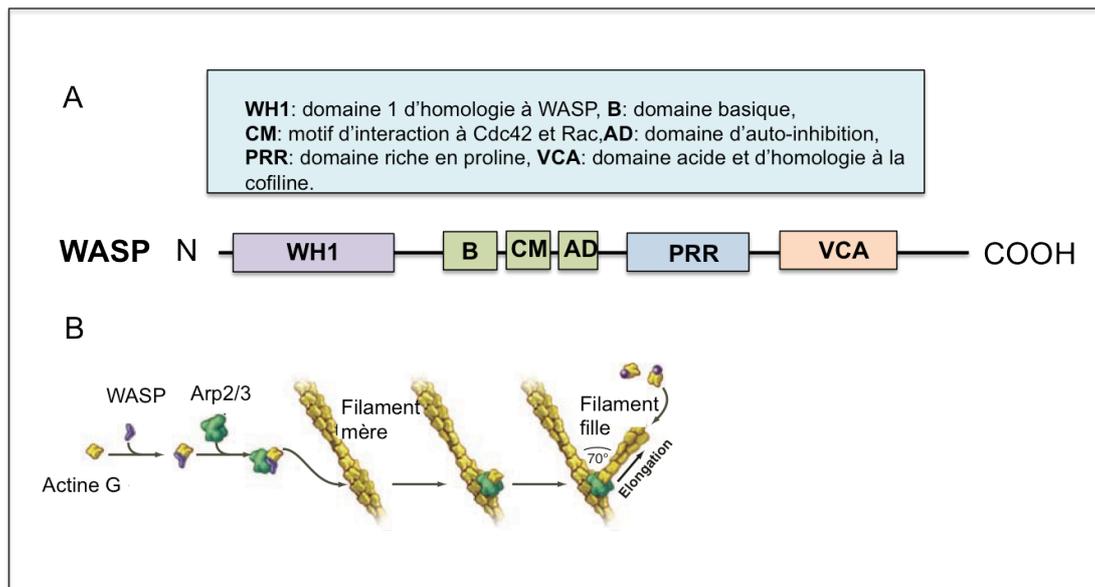


Figure 15. Structure de WASP et nucléation d'un filament d'actine branché par le complexe Arp2/3 et WASP. A. Domaine de WASP (Inspirée de Oda and Eto, 2013). B. La nucléation d'un filament d'actine est initiée par une liaison de WASP à l'actine G et au complexe Arp2/3. Ce complexe se lie au filament d'actine « mère » ce qui initie la croissance d'un nouveau filament d'actine « fille » (D'après Pollard and Cooper, 2009).

Rôle du $[PI(4,5)P_2]$ et des myosines dans la dynamique de l'actine et la contraction membranaire

Comme vu précédemment, le $[PI(4,5)P_2]$ est recruté à la coupe phagocytaire et sa présence est transitoire. Tout comme les petites protéines G, il participe à la régulation du remodelage du cytosquelette d'actine. Il est également l'un des activateurs de WASP (Higgs and Pollard, 2000) et interagit avec de nombreuses protéines. La production et la dégradation du $[PI(4,5)P_2]$ sont concomitantes avec la cinétique de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine lors de la formation de la coupe phagocytaire. En effet, durant la formation de la coupe phagocytaire, juste avant sa fermeture, la quantité de $[PI(4,5)P_2]$ diminue et le cytosquelette d'actine initie sa dépolymérisation à la base de la coupe (pour revue Scott et al., 2005; Yeung and Grinstein, 2007). La kinase $[PI(4)P(5)KI]$ serait probablement responsable de la synthèse locale du $[PI(4,5)P_2]$. En effet, l'inhibition de cette kinase empêche l'accumulation de $[PI(4,5)P_2]$ à la coupe phagocytaire, ce qui bloque l'internalisation et la polymérisation d'actine (Botelho et al., 2000; Coppolino et al., 2002).

Par ailleurs, la force motrice apportée par la polymérisation d'actine et de ses effecteurs pour former la coupe phagocytaire peut être complétée par celle des myosines. Ces protéines sont des moteurs moléculaires, capables d'interagir avec l'actine et jouent un rôle dans les mouvements cellulaires (pour revue Groves et al., 2008; Sellers, 2000). L'interaction des myosines avec le cytosquelette d'actine permet une activité contractile du cytoplasme lors de

la phagocytose (Swanson et al., 1999). Les myosines sont recrutées à différentes étapes de la formation du phagosome. Les myosines II, IXb, et IC ont été détectées sur le phagosome en formation. La myosine X participe à la formation du phagosome. De façon intéressante, il a été montré que la Myosine X est un effecteur de la PI3K pendant la phagocytose (Cox et al., 2002).

1.2.2. Trafic membranaire apporté par l'exocytose focalisée

La formation de la coupe phagocytaire autour de la particule induit l'internalisation d'une très grande surface membranaire. La membrane de la coupe phagocytaire provient pour sa majorité de la membrane plasmique. Cependant, l'augmentation de la surface membranaire est telle qu'elle nécessite d'un complément membranaire apporté par le recrutement de membranes additionnelles provenant de différents compartiments intracellulaires. La libération de membrane de ces compartiments intracellulaires est appelée exocytose focalisée. La provenance de ces membranes est variée. On peut compter les endosomes de recyclage, une sous-catégorie d'endosomes tardifs et le réticulum endoplasmique. Les petites protéines Rab, impliquées dans cette extension membranaire, constituent un lien entre l'apport membranaires et la signalisation menant à la polymérisation de l'actine.

Origine de la membrane

L'exocytose locale de vésicules de la voie d'endocytose joue un rôle important dans la formation de la coupe phagocytaire et donc celle de la formation du phagosome. L'implication du trafic cellulaire dans ce mécanisme a été montrée par des expériences menées en grande majorité sur les protéines SNAREs. Ces protéines sont à l'origine d'évènements de fusion au sein de la cellule. Ce sont des complexes composés de trois protéines : la « Synaptosomal associated protein-25KDa » (SNAP25), la syntaxine et la protéine « Vesicle Associated Membrane Protein » (VAMP). Le processus de fusion nécessite que le compartiment cible expose à sa membrane les protéines Q-SNAREs (glutamine-SNAREs), ou encore appelés t-SNAREs (target SNAREs) que sont les protéines SNAP25 et la syntaxine. De même la membrane de la vésicule adressée à ce compartiment est associée aux protéines R-SNAREs (arginine-SNAREs) appelées aussi v-SNAREs (vésicule SNAREs) que sont les protéines VAMP. Après fusion, ces protéines sont désassemblées par les protéines NSF, ATPase chaperonnes hexamériques, et peuvent être recyclées pour une nouvelle fusion (pour revue Fasshauer et al., 1998; Sollner et al., 1993; Swanton et al., 2000)

(Figure 16). Des études de microscopie électronique et de neutralisation des protéines VAMP3 et VAMP7 (ou TI-VAMP), associées aux endosomes de recyclage et tardifs, respectivement, indiquent que le recrutement de ces compartiments est nécessaire à la formation d'une coupe phagocytaire efficace (Braun et al., 2004; Niedergang et al., 2003; Bajno et al., 2000; Hackam et al., 1998). Par ailleurs, une approche protéomique sur des phagosomes purifiés à différents temps de phagocytose a révélé la présence sur les phagosomes de la calnexine et la calreticuline, deux protéines du réticulum endoplasmique (Garin et al., 2001). Cette expérience, qui a été l'objet d'une forte controverse, est toutefois étayée par l'observation de la syntaxine 18 et de Sec22, protéines SNAREs localisées au réticulum endoplasmique, au niveau de la membrane du phagosome lors des étapes précoces de phagocytose (Becker et al., 2005; Hatsuzawa et al., 2006). Ce dernier résultat témoigne donc d'un troisième apport membranaire nécessaire à l'extension de la membrane. Ainsi, on compte aujourd'hui trois apports membranaires indispensables à la formation de la coupe phagocytaire : les endosomes de recyclage, tardifs et le réticulum endoplasmique, dont l'apport membranaire est toujours controversé.

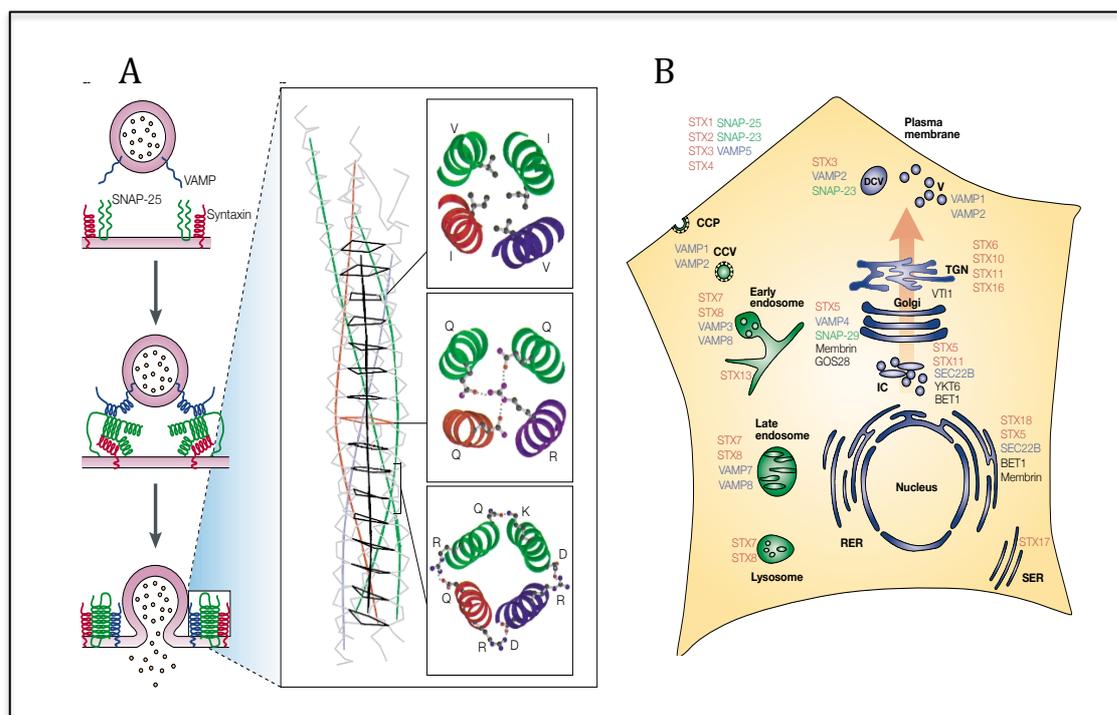


Figure 16. Structure, mécanisme de fusion et localisation intracellulaires des SNAREs. A. le complexe ternaire des SNAREs est formé de la protéine SNAP25, de la syntaxine, et de VAMP. Le complexe NSF/ α SNAP se fixe sur celui des SNAREs, ce qui permet le contact entre les deux membranes et leur fusion. L'hydrolyse de l'ATP par le NSF entraîne la dissociation du complexe et le recyclage des protéines. Le complexe des SNAREs de fusion est formé par l'association de 4 domaines en hélice : deux apportés par la SNAP25, et les autres proviennent de la syntaxine et VAMP. Dans la région centrale du complexe (rouge), des interactions ioniques se déroulent entre les acides aminés conservés glutamine (Q) et arginine (R). B. Chaque protéine SNARE est principalement localisée à l'équilibre au niveau de compartiments intracellulaires spécifiques. L'appariement spécifique des Q-SNAREs /R-SNAREs permet le contrôle de la fusion des différents compartiments. STX: syntaxine, CCV: vésicule recouverte de clathrine, DCV: vésicule à corps dense, RER: réticulum endoplasmique rugueux, SER: réticulum endoplasmique lisse, IC: compartiments intracellulaire, TGN: réseau trans-golgien, V: vésicule (D'après Chen and Scheller, 2001).

Régulateurs du trafic membranaire

Les régulateurs de l'exocytose focalisée ont commencé à être identifiés ces dernières années et permettent une connexion entre l'apport membranaire et la polymérisation d'actine nécessaire à la formation d'une coupe phagocytaire efficace. En effet, des approches de mutants dominants négatifs et d'interférence ARN ont montré que les petites protéines G, Rab11 et Rab35, qui contrôlent respectivement le recyclage lent et rapide à partir des endosomes sont nécessaires pour une phagocytose efficace (Damiani et al., 2004; Egami et al., 2011). De plus, une étude menée par S. Marion montre que la présence d'OCRL, dont les liens ont été montrés avec la protéine Rab35 lors de la cytokinèse (Dambournet et al., 2011) est requise pour l'hydrolyse du $[PI(4,5)P_2]$ et la dépolymérisation d'actine dans l'étape de formation du phagosome (Marion et al., 2012). Le recrutement d'OCRL repose sur celui de complexes

adaptateurs tels que AP-1, déjà montré pour être impliqué dans la formation du phagosome (Braun et al., 2007). Des études menées sur des macrophages indiquent que la présence d'OCRL et de AP-1 à la membrane est sous contrôle de la protéine Bcl10 qui coordonne la signalisation du complexe NF- κ B, complexe dont je reparlerai par la suite (Marion et al., 2012). Du fait du lien étroit qui existe entre Rab35 et ARF6 (Chesneau et al., 2012), et de l'implication de ARF6 dans le remodelage de l'actine, il est envisageable que Rab35 agissent à la fois via OCRL et ARF6 sur la dynamique du cytosquelette d'actine lors de la phagocytose. L'activation de ARF6 est importante pour le remodelage membranaire nécessaire à la formation de la coupe phagocytaire, car l'utilisation du dominant négatif ARF6 inhibe la phagocytose (Niedergang et al., 2003). Ainsi, ces différentes études suggèrent que l'exocytose focalisée ne constitue pas uniquement une source membranaire, mais elle apporte également des régulateurs de la signalisation vers l'actine polymérisée en vue d'une phagocytose efficace.

II. Maturation du phagosome et activation du macrophage

II.1. Mécanisme de la maturation du phagosome

La formation de la coupe phagocytaire et de sa fermeture est à l'origine de la formation du phagosome. Ce dernier subit des étapes de maturation aboutissant au phagolysosome, appelées étapes tardives de la phagocytose. Les phagosomes évoluent selon un processus de maturation qui repose sur des évènements de fusions et fissions successives avec des compartiments de la voie d'endocytose, pouvant être suivis par des marqueurs spécifiques (les protéines Rab, les SNAREs ou les lipides) (pour revue Bohdanowicz and Grinstein, 2010; Botelho et al., 2004; Haas, 2007). Cette maturation se finalise par la fusion du phagosome avec les lysosomes afin de dégrader le matériel ingéré. Elle s'accompagne d'une diminution progressive du pH phagosomal qui passe du pH extracellulaire de 7,4 à un pH de 4,5 caractéristique des lysosomes. Le faible pH des compartiments lysosomaux est assuré par la présence d'une pompe à protons, l'ATPase vacuolaire ou v-ATPase. Il conditionne également l'activité d'enzymes protéolytiques telles que les cathépsines. Par ailleurs, le recrutement du complexe NADPH oxydase sur les phagosomes est un élément essentiel et non négligeable à la dégradation du pathogène, par la production d'espèce réactives oxygénées (pour revue Fairn and Grinstein, 2012; Flannagan et al., 2009; Flannagan et al., 2012; Kinchen and Ravichandran, 2008; Vieira et al., 2002). Ces étapes tardives de la phagocytose sont aussi le témoin d'une migration centripète du phagosome vers la région

périnucléaire qui est sous contrôle des microtubules. Ainsi, tout au long de sa maturation le phagosome acquiert un certain nombre d'éléments qui induira la clairance du matériel ingéré (Figure 17).

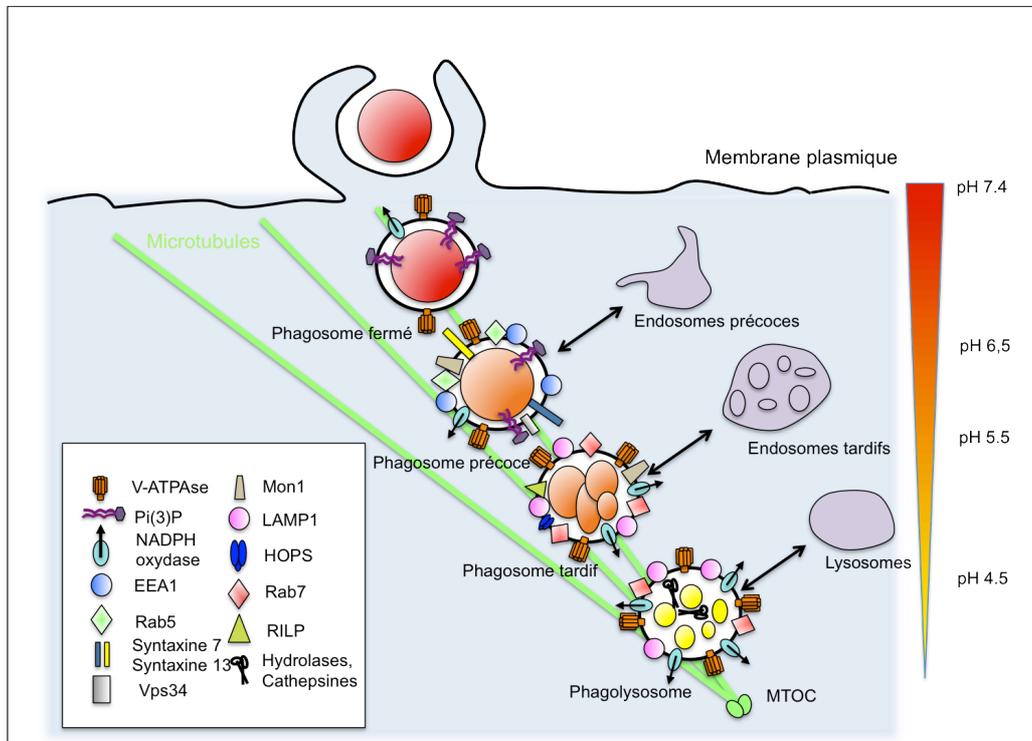


Figure 17. Maturation du phagosome dans les macrophages.

II.1.1. Fissions et fusions avec la voie d'endocytose

Le trafic membranaire intracellulaire requiert conjointement l'action des petites G de la famille des Rab et des protéines SNAREs. Les lipides sont également des composants essentiels de ce trafic. Tous trois permettent aux vésicules de se mouvoir, de s'ancrer, de fusionner et de fissionner avec les membranes. Ces protéines sont recrutées sur le phagosome à un stade donné. Leur apparition séquentielle sur le phagosome est le témoin d'un changement de stade de ce dernier. Ainsi, elles permettent de définir trois stades de la maturation du phagosome : le phagosome précoce, le phagosome tardif et le phagolysosome qui sera davantage marqué par une activité protéolytique et la production de ROS (pour revue Botelho and Grinstein, 2011; Botelho et al., 2004; Fairn and Grinstein, 2012; Flannagan et al., 2012; Scott et al., 2003; Vieira et al., 2002; Vieira et al., 2001).

Les Rabs et leur implication dans la transition « phagosome précoce-phagosome tardif »

Tous comme les petites protéines Rho vu précédemment, les Rab GTPases alternent entre une conformation active (Rab-GTP) et inactive (Rab-GDP) via le contrôle de GEFs et GAPs. Rab5 et Rab7 sont les deux protéines les mieux renseignées par leur action dans la maturation du phagosome. Rab5 est caractéristique du phagosome précoce et est requise pour la transition menant au phagosome tardif, identifié par la présence de Rab7 (Vieira et al., 2003). L'activation de Rab5 est induite par Rabex-5 (GEF) et la Rabaptin-5, via leur recrutement sur les endosomes précoces. Le complexe Rabex-5/Rabaptin-5 facilite la fusion entre les phagosomes et les endosomes précoces grâce à leur association avec la protéine EEA1 (« early endosomal antigen 1 »). En effet, des expériences d'interactions protéiques et de fusion des endosomes montrent la liaison de la forme active de Rab5 avec le complexe Rabex-5/Rabaptin-5 et EEA1 qui agissent en coopération pour permettre la fusion des endosomes (Christoforidis and Zerial, 2000). Cependant, ce mécanisme de recrutement n'est pas le seul impliqué et nécessite d'autres investigations tout comme celui permettant de comprendre la transition Rab5-Rab7 sur les phagosomes. Des expériences réalisées chez la levure montrent l'implication du complexe CORVET (« C core vacuole endosome tethering ») et HOPS (« homotypic fusion and protein sorting ») dans cette transition. Ces deux complexes partagent un corps composé de quatre protéines Vps (« Vacuolar protein sorting ») : Vps11, Vps16, Vps18 et Vps33, nécessaires à la formation de la vacuole chez la levure, et de deux sous-unités spécifiques : Vps3 et Vps8 pour le complexe CORVET et, Vps39 et Vps41 pour le complexe HOPS. Des expériences de GST pulldown indiquent une interaction entre le complexe CORVET et la protéine Vps21, homologue de Rab5 chez l'homme (Peplowska et al., 2007). Une fois recrutées sur les endosomes, les sous-unités Vps3 et Vps8 du complexe CORVET sont remplacées ou converties par les sous-unités Vps39 et Vps41 du complexe HOPS, respectivement. Vps39 et Vps41 interagissent avec Ypt7, homologue de Rab7 chez l'homme (Plemel et al., 2011), tous comme les protéines Mon1 et Ccz1, identifiés récemment (Nordmann et al., 2010) (Figure 18 et 19). Ces complexes sont donc à l'origine du mécanisme de conversion des Rab, témoignant du passage des endosomes précoces aux endosomes tardifs, et donc par analogie du phagosome au phagolysosome (Rink et al., 2005). Des expériences menées par l'équipe d'E. Ghigo ont montré dans des macrophages primaires murins que l'absence concomitante de Rab7 sur les phagosomes et l'inactivation de la sous-unité Vps41 du complexe HOPS par la forme virulente de *C. burnetii* est à l'origine de sa survie dans les macrophages. En empêchant, la protéine kinase p38 d'activer la protéine Vps41 par phosphorylation et donc son recrutement, la forme virulente de *C. burnetii*

bloquent la fusion entre les endosomes tardifs/lysosomes et les phagolysosomes, et donc le recrutement conséquent de la protéine Rab7 (Barry et al., 2012). L'acquisition de Rab7 sur les phagosomes tardifs et phagolysosome par fusion avec les endosomes tardifs et les lysosomes est donc cruciale dans la maturation du phagosome et sa fonction finale de clairance. Parmi les protéines qui seraient recrutées sur les phagosomes tardifs/phagolysosomes et nécessaires au recrutement de Rab7, on compte les protéines LAMP1 et 2 (« lysosomal-associated membrane protein 1 and 2 »). L'inactivation de ces deux protéines dans des cellules exprimant le récepteur Fc, montre une absence de recrutement de la protéine Rab7 sur les phagosomes et une absence de fusion des phagosomes avec les lysosomes après induction de la phagocytose (Huynh et al., 2007).

Hormis Rab5 et Rab7, d'autres Rab ont été décrites plus récemment pour être présentes sur les phagosomes. L'inactivation et l'utilisation de mutant dominant négatif de Rab10 dans des macrophages murins induisent un retard dans la maturation du phagosome qui se traduit par un retard de l'acquisition de EEA1 et LAMP1 sur les phagosomes précoces et tardifs, respectivement. Par ailleurs, cette étude indique que sa surexpression entraîne une meilleure clairance de *M. tuberculosis* (Cardoso et al., 2010). D'autres études montrent que c'est en invalidant la protéine Rab14 que la clairance de cette bactérie est restaurée. Enfin des expériences d'imagerie réalisées dans des macrophages murins surexprimant la protéine Rab20 montrent que cette protéine serait recrutée sur les phagosomes après celui de Rab5 et avant celui de Rab7. La forme inactive de Rab20 entraîne également un retard dans la maturation du phagosome (Egami and Araki, 2012). D'autres protéines Rab sont donc impliquées dans la maturation du phagosome comme les protéines Rab 20, Rab32, ou encore Rab34 (pour revue Seto et al., 2011). Ces différentes études montrent l'importance de l'acquisition de ces différents marqueurs dans la maturation du phagosome, mais les mécanismes exacts les impliquant sont loin d'être renseignés, tout comme la transition phagosomes tardifs-phagolysosome.

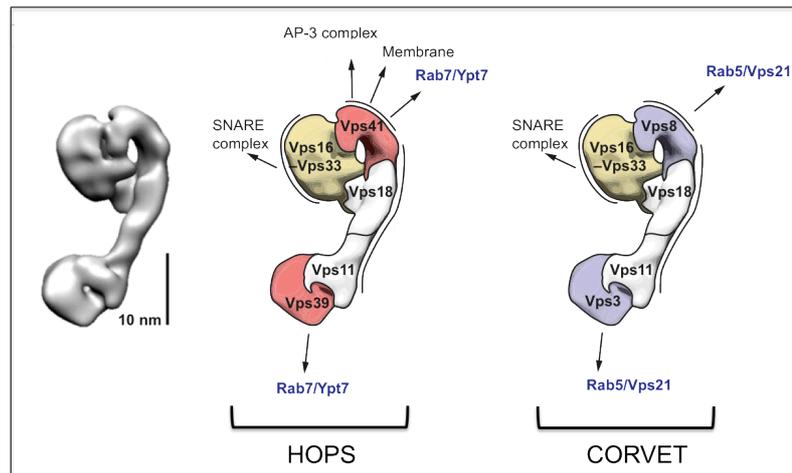


Figure 18. Structure des complexes HOPS et CORVET. La structure tridimensionnelle de HOPS est représentée à gauche. Le complexe HOPS possède 2 sites de liaison à Rab7 (rouge) opposés et lie les protéines SNAREs avec ses sous-unités Vps33 et 16. Le domaine Vps41 de HOPS lie la membrane et le complexe adaptateur AP-3. L'arrangement des sous-unités de CORVET est basé sur la structure de HOPS. Les sous-unités Vps8 et Vps3 de CORVET lient la protéine Rab5. Le complexe CORVET lie également les complexes SNAREs par les mêmes sous-unités que HOPS (D'après Balderhaar and Ungermann, 2013).

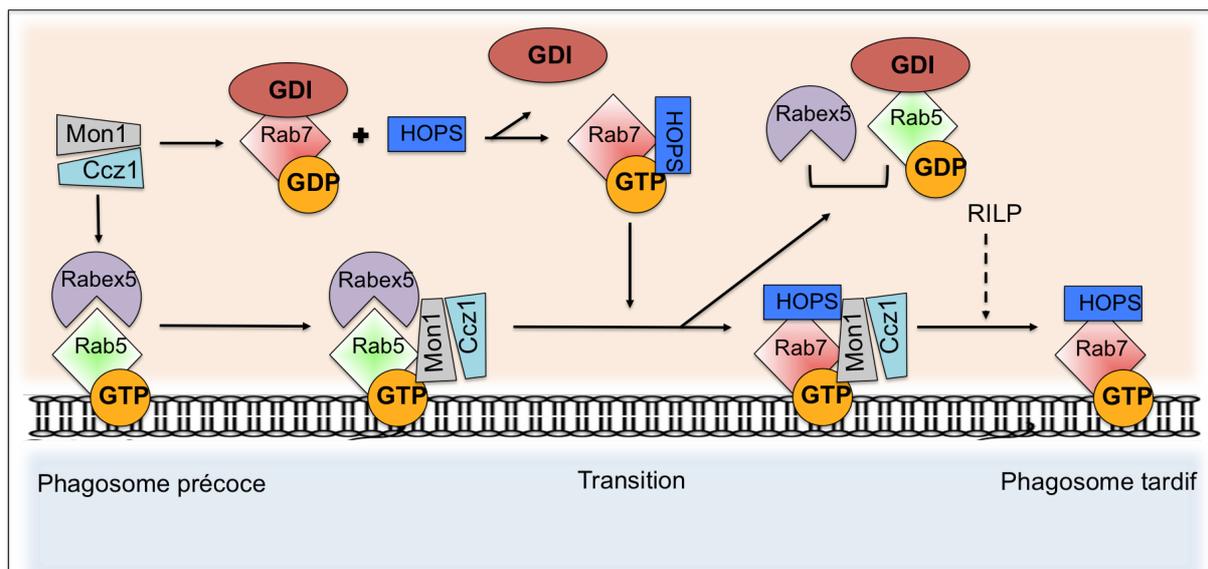


Figure 19. Transition Rab5-Rab7 sur les phagosomes. La liaison de Mon1-Ccz1 facilite la transition Rab5-Rab7 en retirant la GEF de Rab5 (Rabex 5) et en activant la GEF de Rab7 (HOPS) simultanément ou de façon séquentielle sur le phagosome. Ceci permet le retrait de la protéine Rab5 de la membrane et l'arrivée de la protéine Rab7, caractéristique des phagosomes tardifs (Inspirée de Wang et al., 2011).

Les SNAREs et leur implication dans la fusion des phagosomes avec les endosomes

Les protéines Rab et les SNAREs coopèrent dans la maturation du phagosome. Il est cependant intéressant de constater que beaucoup d'expériences ont été réalisées sur les endosomes et sont extrapolées dans la littérature au phagosome. L'équipe de M. Zerial a montré que la protéine NSF était présente au sein du complexe Rabex-5/rabaptine 5/EEA1 sur

la membrane de l'endosome et que son activité modulait la formation de ce complexe. Par ailleurs, des expériences de protéines recombinantes et de fusion ont montré que la syntaxine 13, présente sur les endosomes précoces, permettait la fusion de ces endosomes et interagissait avec la protéine EEA1 (McBride et al., 1999). En plus d'interagir avec la syntaxine 13, EEA1 interagit avec la syntaxine 6 et toutes deux colocalisent sur les endosomes précoces (Simonsen et al., 1999). Les cinétiques du recrutement de la syntaxine 13 et 7 montrent qu'elles sont toutes deux recrutées à différentes étapes de la maturation du phagosome. Alors que la syntaxine 13 commence à apparaître sur le phagosome après 5 min de phagocytose, la syntaxine 7 n'apparaît qu'après 10 min de phagocytose au moment de la disparition de la syntaxine 13. La syntaxine 13 serait donc caractéristique des phagosomes précoces et la syntaxine 7 des phagosomes tardifs/phagolysosome. En effet, la syntaxine 7 colocalise avec la protéine LAMP1 dans les phagosomes de macrophages de souris et sa cinétique de recrutement sur le phagosome suit celle de la protéine LAMP1. L'utilisation de dominant négatif de la syntaxine 7 bloque la maturation du phagosome, ce qui témoigne de son importance (Collins et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que la protéine VAMP8 permettait une fusion homotypique entre les endosomes précoces et tardifs. En effet, des expériences de microscopie électronique montrent sa présence sur ces deux types de compartiments (Antonin et al., 2000). Des expériences d'isolation de phagosomes ont permis la détection des syntaxines 2, 3 et 4 sur ces derniers, mais leur fonction respective sur ce compartiment n'est pas encore très claire (Hackam et al., 1996). Enfin récemment, des expériences de phagocytose dépendante du récepteur Fc ont été réalisées dans une lignée de macrophages de souris exprimant la protéine SNAP23. Après 120 min de phagocytose, les phagosomes ont été isolés et, la présence de SNAP23 et de marqueurs de phagosomes tardifs/phagolysosomes ont été détectés. La surexpression de cette protéine entraîne également une augmentation de l'activité des phagosomes (acidification et production de ROS) par rapport aux cellules témoins (Sakurai et al., 2012). Ces résultats indiquent l'importance des protéines SNAREs, support de la fusion des compartiments intracellulaires, dans la maturation du phagosome. Bien que ces expériences témoignent de leur présence sur les compartiments phagocytaires, leur rôle n'est pas bien défini.

Les lipides, caractéristiques des endosomes précoces et tardifs

Comme décrit précédemment, la protéine Rab5 est caractéristique du phagosome précoce. En plus d'être impliquée dans le recrutement de SNAREs via ses activateurs, Rab5 interagit avec la protéine mVps34, une PI3K de classe III. Elle est requise transitoirement sur le phagosome

où elle catalyse la formation du [PI(3)P]. Ce composé est essentiel à la poursuite de la maturation du phagosome et son absence est caractéristique d'une infection par *M. tuberculosis* (Vergne et al., 2003). L'inactivation de cette kinase et de la formation de son composé perturbent le bon déroulement de la maturation du phagosome (Araki et al., 1996; Vieira et al., 2001). Bien que l'accumulation du [PI(3)P] sur le phagosome dépende de la forme active de Rab5, le recrutement de Rab5 est indépendant de celui de mVps34 (Vieira et al., 2003). Ce résultat suggère que le recrutement de Rab5 sur le phagosome est antérieur à celui de mVps34. De plus, il coordonnerait son recrutement sur le phagosome et la formation locale du [PI(3)P]. Par ailleurs, des expériences réalisées chez la levure sembleraient montrer que les phosphoinositides pourraient être impliqués dans le recrutement du complexe HOPS à la membrane, en partie responsable de la transition Rab5-Rab7, vue précédemment. En effet, des expériences de purification du complexe HOPS montrent son interaction avec les phosphoinositides [PI(4)P], [PI(3,5)P₂] et [PI(4,5)P₂] (Stroupe et al., 2006). Les kinases impliquées dans ce mécanisme et le mécanisme en-lui même sont peu clairs. Il nécessiterait peut être une autre classe de kinase que sont les PI4K, ce qui pourrait expliquer que le recrutement et l'activation de la protéine Rab7 sur le phagosome tardif ne soient pas affectés par la Wortmannine, inhibiteur spécifique des PI3K (Vieira et al., 2003). Le phagolysosome lui serait marqué par l'absence de [PI(3)P] qui pourrait être du à la désactivation de la kinase Vps34, étant donné son rôle majeur dans la production de [PI(3)P] (Vieira et al., 2001).

II.1.2. Acidification du compartiment phagocytaire : la v-ATPase

L'acidification du compartiment phagocytaire en partie responsable de la diminution du pH intraphagosomal au cours de la maturation du phagosome est orchestrée par la pompe à protons v-ATPase. La diminution du pH intraphagosomal se fait progressivement lors de la maturation. Ainsi le phagosome précoce a un pH d'environ 5,5, le phagosome tardif de 5 et le phagolysosome de 4,5. Il est intéressant de remarquer que cette acidification est caractéristique des macrophages, d'autres phagocytes comme les cellules dendritiques conservent un pH plus alcalin dans leurs phagosomes via la pompe NADPH NOX2, dont je reparlerai par la suite (pour revue Blander and Medzhitov, 2006; Steinberg et al., 2007; Trombetta et al., 2003).

La v-ATPase est un complexe protéique multimérique composé par deux sous-complexes majeurs : V₁ et V₀. Le complexe V₁, cytosolique, comprend huit sous-unités différentes et permet l'hydrolyse de l'ATP. Le complexe V₀, membranaire, se compose de six

sous-unités différentes formant un pore et est responsable de la translocation des protons. Ces deux complexes sont étroitement liés car l'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie nécessaire au pompage de protons (Figure 20). Cette pompe est régulée au cours de la maturation du phagosome. Elle est acquise sur la membrane du phagosome précoce au départ de la maturation. Puis, sa régulation est contrôlée par un ensemble de protéines et un gradient ionique (comme H^+ , Cl^- , K^+ , Na^+). Cette régulation permet au pH intraphagosomal de passer de 7,5 à la membrane plasmique à 4,5 au phagolysosome nécessaire à la maturation du phagosome et à la clairance de microorganisme. Il a été montré que la v-ATPase interagissait avec les protéines ARF6 et ARNO (GEF de ARF6) sur les endosomes selon un gradient de pH. L'inhibition de cette pompe ou de l'acidification empêche le recrutement de ces deux protéines sur les endosomes (Maranda et al., 2001). Ce résultat témoigne de l'importance du maintien du pH dans les phagosomes lors de la maturation. Il serait responsable du recrutement et de l'activation de protéines régulant le trafic intracellulaire. Par ailleurs, il a été montré que la persistance de *M. tuberculosis* dans les phagosome des macrophages primaires humains serait en partie due à un manque d'acidification de ce dernier (Podinovskaia et al., 2013) qui conserverait les caractéristiques d'un phagosome précoce (pour revue Flanagan et al., 2009; Russell, 2001; Smith and May, 2013). L'absence d'acidification du phagosome dans ce contexte s'explique en partie par l'absence de recrutement de la pompe v-ATPase (Sturgill-Koszycki et al., 1994). Cette caractéristique n'est pas propre à cette bactérie, on la retrouve aussi chez *Histoplasma capsulatum* capable de modifier l'environnement des phagosomes. Cette bactérie survit dans des macrophages en modifiant et en maintenant le pH de sa vacuole à 6,5. Ceci passe par le blocage de l'acidification induite par la v-ATPase et la fusion des phagosomes avec les lysosomes (Strasser et al., 1999). Comme le témoignent ces deux exemples, un détournement de la pompe v-ATPase et de l'acidification peut avoir des conséquences dramatiques dans l'organisme en facilitant la survie de bactéries.

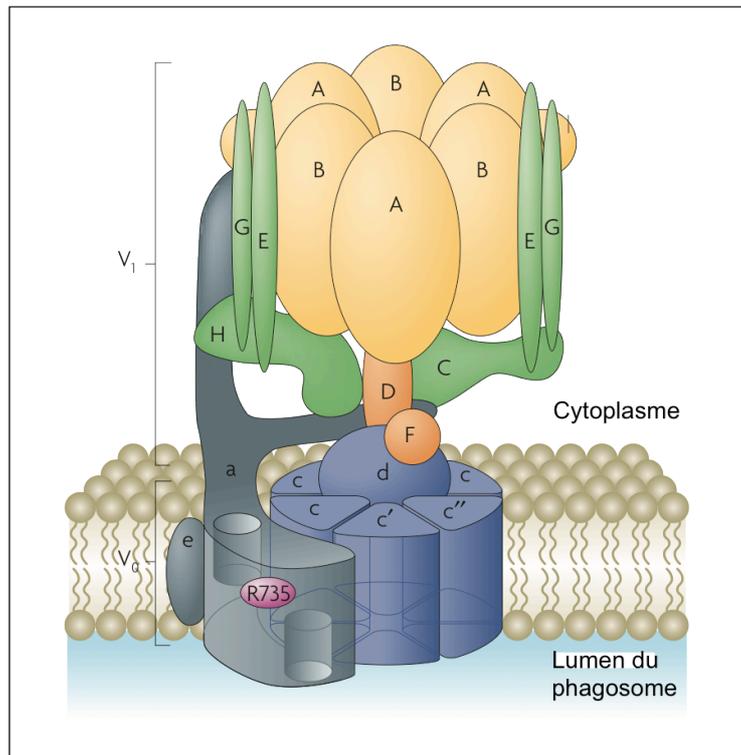


Figure 20. Structure de la v-ATPase. La v-ATPase est composée d'un domaine périphérique (V_1 , en orange) responsable de l'hydrolyse de l'ATP. Le domaine V_0 , transmembranaire (en gris et bleu), permet le transport de proton par la membrane. Le core V_1 composé des sous-unités A et B, participe à la liaison de l'ATP et son hydrolyse. Le domaine V_0 est constitué par un anneau de protéolipides (c, c' et c''). Les deux domaines sont connectés par les sous-unités D et F, ainsi que C, E, G, H, et a. La sous-unité a est requise pour le transport des protons grâce à son Arginine (R735). Elle agit comme un rotor et, par sa liaison avec la sous-unité d, contrôle le transport des protons (D'après Forgac, 2007).

II.1.3. Production d'espèces réactives de l'oxygène : NOX2

Comme nous venons de le voir, l'acidification des phagosomes est un processus indispensable aux différentes étapes de la maturation et sa régulation est majeure dans le contrôle de pathogènes. Elle est également soutenue par la production d'espèces réactives oxygénées. L'importance de la production de ROS dans le système immunitaire a été établie par une maladie génétique récessive rare : la granulomatose septique chronique (pour revue Stasia et al., 2009). Les patients souffrant de cette maladie sont sujets à des infections bactériennes et fongiques dues à leur incapacité à assembler une NADPH oxydase fonctionnelle, NOX2 (Quie et al., 1967).

La majorité de la production des ROS dans les phagosomes des macrophages est attribuée à la pompe NADPH oxydase, NOX2. Ce système contribue à la clairance des microorganismes par le macrophage. NOX2 est un complexe multimérique qui est assemblé en réponse à une stimulation pro-inflammatoire. Ce complexe est responsable de la

production d'un anion superoxide O_2^- . Il est composé du cytochrome b_{558} constitué des protéines $gp91^{phox}$ et $p22^{phox}$ qui permettent sa liaison à la membrane. La deuxième partie de ces constituants est cytosolique et se compose de $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$. Suite à son activation, les composants cytosoliques de ce complexe s'assemblent avec les GTPase Rac1 et Rac2, et le b_{558} . Cet assemblage à la membrane permet le transport des électrons à travers la membrane du phagosome pour former l'anion superoxyde. O_2^- est une espèce cytotoxique qui peut réagir avec le proton H^+ pour former du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , composé hautement cytotoxique. Alors que $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$ sont requis pour activer le cytochrome b_{558} à la membrane de la coupe phagocytaire, $p40^{phox}$ est nécessaire à l'activité de NOX2 sur le phagosome formé (pour revue Nunes et al., 2013 ;Bedard and Krause, 2007) (Figure 21). Sa fonction à la membrane du phagosome est dépendante la protéine mVps34 et de la production du [PI(3)P], vu précédemment (Anderson et al., 2010). Ce résultat soulève la question suivante : qu'advient-il de sa régulation dans le phagolysosome marqué par l'absence de [PI(3)P] ? Il est possible d'envisager des régulations alternatives prenant ainsi le relais dans ce compartiment phagosomal tardif. Grâce à un modèle de souris déficientes pour la protéine SLAMF1 (« signaling lymphocyte-activation molecule family »), il a été montré que cette protéine agit sur la maturation du phagosome en modulant l'activité du complexe NOX2. SLAMF1 est exprimée à la surface de la plupart des cellules hématopoïétiques et permet la modulation de nombreux signaux apportés par les cellules immunitaires. Dans des macrophages de souris déficientes pour SLAMF1, la production de O_2^- est atténuée en réponse à l'infection par *E. coli* par rapport aux macrophages témoins. Par ailleurs, des expériences d'imagerie indiquent que cette protéine contrôle la production locale de [PI(3)P] responsable de la liaison de $p40^{phox}$ à la membrane (Berger et al., 2010). Des expériences plus récentes ont montré que la protéine FYCO1 (« FYVE and coiled-coil domain containing 1 »), initialement décrite dans l'autophagie, était présente sur le phagosome et permettait sa régulation. Son absence dans des macrophages de souris, provoque un prolongement de l'accumulation de la protéine $p40^{phox}$ sur le phagosome, ce qui affecte le recrutement de LAMP1 (Ma et al., 2014). Ces différents résultats suggèrent l'importance du complexe NOX2 dans la maturation du phagosome et la clairance des bactéries. Mais malgré l'efficacité de ce système, des bactéries comme *S. Typhimurium* survivent dans les phagosomes et contrecarrent les effets de la production de ROS par leur matériel bactérien (De Groote et al., 1997).

En plus du H_2O_2 , les macrophages produisent de l'oxyde nitrique (NO^-) par une réaction de catalyse réalisée par l'enzyme iNOS (« inductible nitric oxide synthase »). La

production de NO^- est beaucoup plus lente que celle des ROS dont le complexe de formation préexiste sur les phagosomes. L'activation du macrophage par du LPS ou du $\text{TNF}\alpha$ est à l'origine de la transcription et de la production de l'enzyme iNOS. Le NO^- peut interagir avec de nombreux composés bactériens induisant leur clairance ou non (pour revue Chakravorty and Hensel, 2003; Mori and Gotoh, 2004).

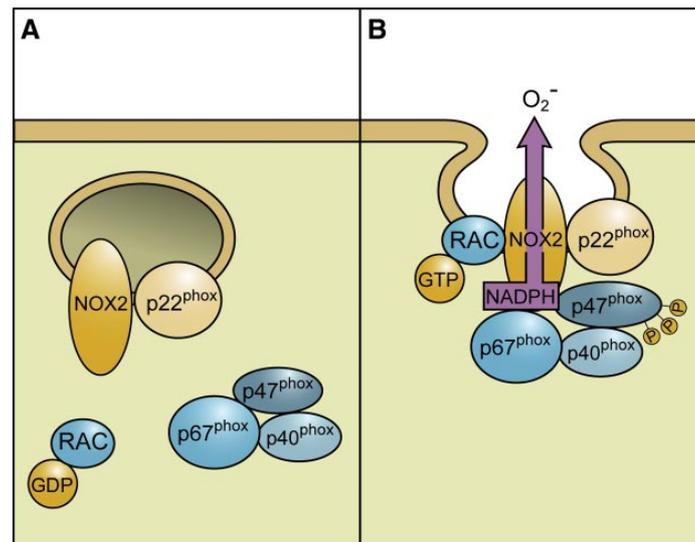


Figure 21. Assemblage de la NADPH oxydase, NOX2. A. Dans les macrophages non activés, NOX2 (ou gp91^{phox}) et p22^{phox} sont associés à la membrane de l'endosome. Après l'activation du macrophage par un microorganisme, Rac s'active en se liant à son GTP. La phosphorylation de p47^{phox} induit son changement de conformation, son interaction avec la p22^{phox} et le recrutement de p67^{phox} et p40^{phox} à la membrane de l'endosome. Une fois le complexe formé, NOX2 devient actif. Ceci conduit à la fusion de l'endosome avec le phagosome et la production de O_2^- (D'après Bedard and Krause, 2007).

II.1.4. Production de peptides et d'agents microbiens

La v-ATPase et la production de ROS par NOX2 ou de NO^- par iNOS, ne sont pas les seuls responsables de la clairance des microorganismes. Les macrophages disposent d'une batterie de peptides ou d'agents microbiens dans leur phagosome permettant la destruction des micro-organismes. Certains composants sont initialement présents dans les phagosomes précoces et leur activité est régulée par les composants du phagosome. D'autres sont exclusivement restreints au phagosome tardif ou phagolysosome. Parmi ces différents composants, on trouve les lysozymes, les défensines, ou encore les cathepsines (Flannagan et al., 2009; Flannagan et al., 2012; Wang, 2014; Zasloff, 2002).

Les lysozymes, hydrolases acides, détruisent la paroi bactérienne des bactéries à Gram-positif en catalysant l'hydrolyse des peptidoglycanes la constituant (Virgilio et al.,

1966) Les bactéries à Gram-négatif sont résistantes à leur action grâce à des couches externes de LPS qui les caractérisent, cependant certaines expériences suggèrent que les lysozymes peuvent également être responsable de leur inactivation (Masschalck et al., 2001). Les défensines, polypeptides cationiques, sont subdivisées en deux sous-groupes chez l'homme : les défensines α et β . Des expériences ont montré qu'elles se lient aux molécules chargées négativement à la surface du microorganisme. Consécutivement, elles induisent la perméabilisation des bactéries à Gram-positif ou à Gram-négatif en formant un canal multimérique permissif au passage des ions (Zhang et al., 2010b). Les cathepsines, enzymes protéolytiques, sont également présentes dans les endosomes et sont recrutées dans la partie luminale du phagosome après fusion. Cette famille d'enzymes est composée de sérines protéinases (cathepsines D et E) et de cystéines protéinases (cathepsines B, C, E, F, H, K, L, O, S, V, X, W). L'acidification de ces dernières promeut leur activation, mais il a été montré que cette activité peut également être contrôlée par la pompe NADPH oxydase (Rybicka et al., 2010). Ce complexe pourrait être à l'origine d'une distribution distincte entre les cathepsines H et S qui sont délivrées sur le phagosome précoces et tardifs, respectivement, mais il reste à le déterminer (Claus et al., 1998). Les cathepsines sont présentes sous deux formes : la forme mature (cathepsine) et la forme immature (pro-cathepsine) qui témoignent de leur activation (pour revue Berg et al., 1995).

II.1.5. Régulation sous contrôle des microtubules

Lors de sa maturation, le phagosome se déplace suivant un mouvement centripète allant de la périphérie de la cellule vers le noyau. Le phagosome précoce est celui qui est le plus proche de la périphérie du macrophage et le phagolysosome le plus proche du noyau. Ce mouvement intracellulaire des phagosomes est sous contrôle des microtubules. Ces derniers leur servent de rails lors de la migration. Certes, les microtubules jouent un rôle dans la migration des phagosomes mais leur contribution dans les événements de maturation du phagosome n'est pas très claire encore aujourd'hui (Blocker et al., 1998; Blocker et al., 1997; Harrison et al., 2003). Nous allons cependant essayer de montrer leur importance dans cette étape finale de la phagocytose.

Préambule général sur la structure et la dynamique des microtubules

Un filament de microtubules est composé de 13 protofilaments indépendants qui se réunissent pour former un cylindre creux de 25 nm de diamètre. La constitution de ces protofilaments se fait par l'assemblage d'hétérodimères de tubuline α et β . Ces hétérodimères sont alignés et interagissent latéralement le long des protofilaments pour former un microtubule. La formation d'un microtubule se déroule en deux étapes : une phase initiale limitante appelée nucléation (phase lente) suivie d'une phase d'élongation (phase rapide). L'ajout ou la suppression de dimères de tubuline peut se faire aux deux extrémités. Ainsi, l'orientation des hétérodimères confère par extension une polarité aux microtubules. La tubuline α est orientée vers une extrémité (-) et la tubuline β est orientée vers les extrémités (+) des microtubules (Wade and Hyman, 1997). In vitro, l'extrémité (+) présente une croissance plus rapide que l'extrémité (-) qui est plus lente (Nogales et al., 1999). Le « treadmilling » des microtubules, quantifié par microscopie photonique, résulte de l'équilibre entre l'addition de dimères de tubulines à l'extrémité (+) des microtubules et la dissociation de dimères à l'extrémité (-) (Walker et al., 1988). Les tubulines α et β sont des GTPases qui s'incorporent sous forme GTP dans le filament de microtubules en croissance. L'hydrolyse ou non du GTP de la tubuline β sera à l'origine de la dépolymérisation ou la polymérisation des microtubules (pour revue Nogales and Wang, 2006). Ainsi, un microtubule oscille en permanence entre des périodes de polymérisation (croissance) et de dépolymérisation (décroissance). Ce phénomène est appelé : instabilité dynamique. La transition de la croissance vers la décroissance est appelée « catastrophe » alors que la reprise de la croissance est qualifiée de « sauvetage » (Walker et al., 1988). Cette instabilité confère un caractère dynamique aux microtubules mettant en jeu de nombreuses protéines (Figure 22).

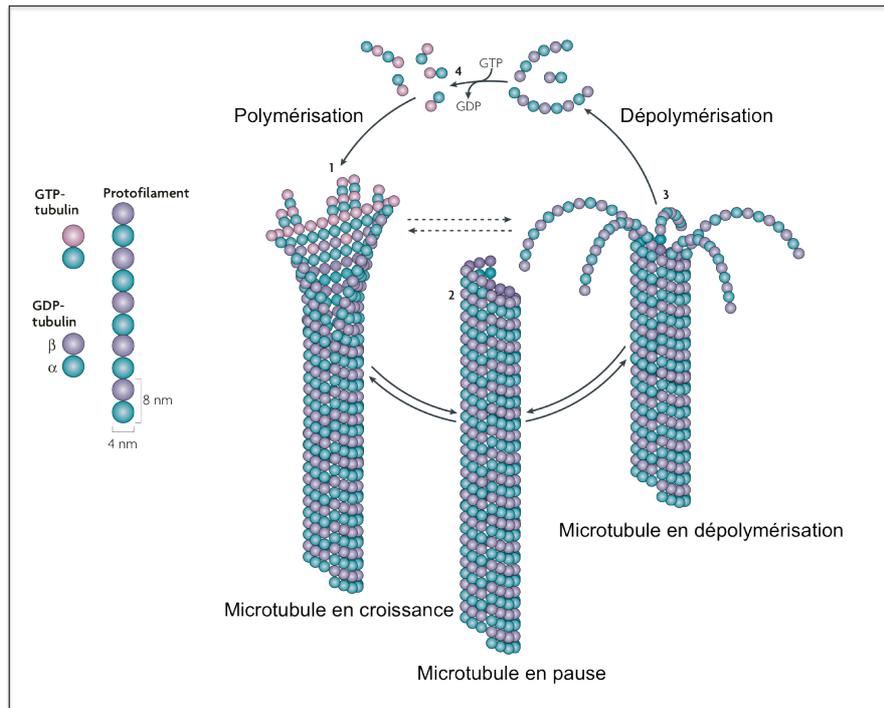


Figure 22. Structure et instabilité dynamique des microtubules. Lors de la polymérisation des microtubules, seule la molécule de GTP liée à la tubuline β est hydrolysable en GDP car la GTP liée à la tubuline α est protégée à l'intérieur du filament. Cette hydrolyse affecte la conformation du dimère et contrôle l'assemblage et la dynamique des microtubules. Comme l'hydrolyse du GTP de la tubuline β n'est pas couplée temporellement à la polymérisation, une coiffe contenant de la tubuline β liée au GTP se forme à l'extrémité en croissance. Le corps du microtubule est donc constitué majoritairement de dimères de tubuline β liée au GDP. Malgré leur conformation courbée, ils sont maintenus sous une forme rectiligne par la présence de la coiffe GTP. La perte de la coiffe GTP par hydrolyse provoque une diminution des contacts latéraux entre protofilaments et conduit à une dépolymérisation rapide du microtubule (D'après Akhmanova and Steinmetz, 2008).

Protéines associées aux microtubules (MAPs) présentes dans les macrophages

Dans la majorité des cellules, l'extrémité (-) présente au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC) ou centrosome est généralement stable. Au contraire, l'extrémité (+) est plus dynamique. Ainsi, la dynamique des microtubules est régulée par leur association avec d'autres protéines appelées les MAPs. Parmi ces protéines, on compte les protéines impliquées dans la stabilité des microtubules comme les protéines EB et d'autres impliquées dans le transport de vésicules le long des microtubules comme les kinésines et les dynéines.

Les protéines EB (« End binding »), composées de trois membres EB1, EB2 et EB3, appartiennent à la famille des +TIPs, protéines se liant aux extrémités (+) des microtubules. La liaison de ces protéines aux microtubules se fait par un domaine d'homologie de la calponine (CH) présent en N terminal. Elles se composent également d'un domaine de dimérisation (coiled-coil), d'un motif EEY/F permettant la liaison avec d'autres protéines (dynactine, APC) et d'un domaine d'homologie aux EB (EBH) (pour revue Akhmanova and

Steinmetz, 2008, 2010; Howard and Hyman, 2003) (Figure 23). EB1 a été identifié initialement dans une expérience de double hybride réalisée chez la levure par son interaction avec la protéine APC (« Adenomatous polyposis coli ») (Su et al., 1995). L'expression de EB1 est ubiquitaire (Su and Qi, 2001). La protéine EB1 se localise aux extrémités (+) des microtubules, au centrosome et au fuseau mitotique de la cellule en division (Morrison et al., 1998). Il a été montré que l'expression d'un dominant négatif de EB1 dans des cellules CHO altérait la croissance des microtubules (Komarova et al., 2009). Par ailleurs, des expériences indiquent une interaction entre les protéines EB1 et CLIP 170 qui est une autre protéine appartenant à la famille des +TIP (Komarova et al., 2005) impliquée dans la phagocytose du récepteur CR3 (Lewkowicz et al., 2008). Ainsi par ces interactions avec les microtubules et les MAPs, EB1 semble jouer un rôle important dans le maintien du cytosquelette des microtubules. De façon intéressante, il été montré récemment que EB1 était capable d'interagir avec les kinésines et les dynéines (Chen et al., 2014; Duellberg et al., 2014).

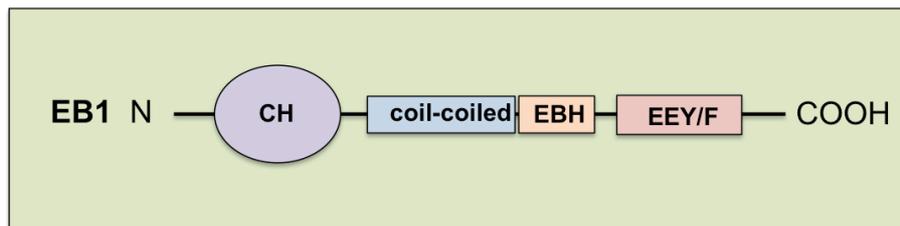


Figure 23. Structure de EB1. (Inspirée de Akhmanova and Steinmetz, 2008)

Les kinésines et les dynéines cytoplasmiques sont des ATPases qui assurent le transport bi-directionnel de vésicules de la membrane au centre de la cellule. Ces moteurs moléculaires se déplacent de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) ou de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) des microtubules, suivant un transport rétrograde ou antérograde, respectivement. Ce déplacement est associé à une hydrolyse d'ATP (pour revue Gennerich and Vale, 2009; Kardon and Vale, 2009; Mandelkow and Mandelkow, 2002). Les kinésines sont des tétramères composés de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Les deux chaînes lourdes forment une paire de têtes globulaires qui s'unissent pour se fixer aux microtubules (à l'origine de l'hydrolyse de l'ATP). Chaque tête est reliée à une queue qui fixe le cargo. (Figure 24). De nombreuses kinésines sont présentes dans les macrophages comme la kinésine 5B (Kif5B) ou la kinésine 1C (Kif1C). Des expériences de mutant dominant négatifs de la protéine Kif5B dans des macrophages murins altèrent la formation de pseudopodes lors de la phagocytose dépendante du récepteur Fc (Silver and Harrison, 2011).

De plus, l'absence de la protéine Kif1C dans les macrophages primaires humains entraîne une diminution de la formation de podosomes, structures importante pour la migration du macrophage (Kopp et al., 2006). Les dynéines se composent de deux chaînes lourdes et, de chaînes intermédiaires et légères. Chaque chaîne lourde comporte une grosse tête globulaire et un prolongement allongé qui possède le site de liaison aux microtubules. Les dynéines ne fonctionnent qu'après leur association à des complexes protéiques comme la dynactine, ce qui favorise la fixation des dynéines aux microtubules et leur attachement aux vésicules cytoplasmiques. La dynactine se compose de 11 sous-unités incluant la sous-unité p150^{glued} et Arp1 (actin related protein 1) (Figure 24) (pour revue Kardon and Vale, 2009; Schroer, 2004). Les dynéines et la dynactine sont également exprimées dans les macrophages. Des expériences de microscopie électronique dans des macrophages de souris montrent la forte accumulation des sous-unités Arp1 et p150^{glued} ainsi que des sous-unités caractéristiques des dynéines dans les endosomes précoces (Habermann et al., 2001). La fonction précise de la présence de ces deux types de protéines dans les compartiments intracellulaires des macrophages n'est pas bien comprise.

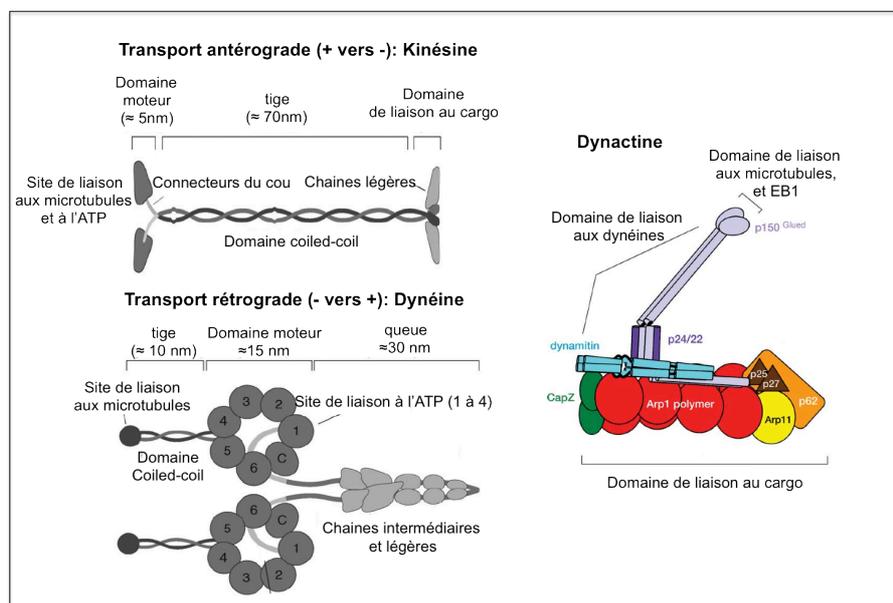


Figure 24. Structure des kinésines, dynéines cytoplasmiques et de la dynactine. Les kinésines et les dynéines sont responsables du transport de vésicules intracellulaires via le réseau de microtubules. Contrairement aux kinésines, les dynéines nécessitent un complexe protéique pour s'activer et se lier à un cargo : la dynactine. Cette dernière est composée de deux domaines structuraux majeurs : le domaine de liaison aux microtubules et aux protéines associées (EB1, kinésines, dynéines) est composé des protéines dynamitine/p50, p150^{Glued}, p24 et p22 et le domaine de liaison au cargo et à l'actine composé du filament Arp1, et CapZ et du complexe d'extrémité en pointe formé par Arp11, p25, p27 et p62 (D'après Gennerich and Vale, 2009; Schroer, 2004).

Régulation de la maturation des phagosomes par les microtubules

Comme nous l'avons vu ci-dessus les microtubules sont des structures dynamiques permettant la motilité et le transport de nombreuses protéines, d'ARN ou de compartiments vésiculaires. Ces caractéristiques sont donc des arguments favorables de leur implication dans la maturation du phagosome. En effet, pour parvenir au stade final de phagolysosome, le phagosome subit des échanges constants et transitoires avec les compartiments intracellulaires, via les SNAREs, les Rab et les lipides. Pour faciliter la rapidité de ces échanges, les compartiments phagocytaires et endosomaux doivent être très proches avant leur fusion. La dynamique des microtubules pourrait être à l'origine de leur proximité. Des expériences de microscopie électronique réalisées sur des macrophages de souris indiquent que le traitement au nocodazole affecte le recrutement de la protéine LAMP2 sur les phagosomes (Desjardins et al., 1994). Le nocodazole étant un inhibiteur pharmacologique qui dépolymérise les microtubules dynamiques, cette première expérience montre l'implication des microtubules dans les échanges entre les compartiments phagocytaires et ceux de la voie d'endocytose. Lors de la maturation du phagosome, la composition des membranes du phagosome change progressivement. En conséquence, le phagosome perd son habilité à fusionner avec les endosomes précoces et gagne celle à fusionner avec les lysosomes en se déplaçant le long des microtubules. Le parallélisme entre les deux voies suggèrent un positionnement afin des compartiments intracellulaires orchestré par les microtubules.

Par ailleurs, des expériences indiquent que certaines protéines associées indirectement aux microtubules jouent un rôle important dans la maturation des phagosome. Des expériences ont montré que la protéine RILP (« rab interacting lysosomal protein ») interagissait avec la forme active de Rab7 sur les phagosomes tardifs dans les macrophages de souris (Harrison et al., 2003) et la sous unité V₁G1 de la v-ATPase sur les endosomes tardifs des cellules Hela (De Luca et al., 2014). L'utilisation d'une forme tronquée de RILP rendant la protéine incapable de se lier à ses effecteurs inhibe la fusion des phagosomes avec les lysosomes dans les macrophages (Harrison et al., 2003). Des bactéries comme *Salmonella Typhimurium*, empêchent le recrutement de cette protéine, ce qui témoigne de sa persistance au sein des cellules (Harrison et al., 2004). La protéine RILP est le témoin d'un lien entre les microtubules et la maturation du phagosome. En effet, cette dernière se lie à la sous-unité p150^{glued} de la dynactine impliquée dans le transport de cargo le long des microtubules (Jordens et al., 2001). RILP ne se lie pas uniquement à Rab7, il interagit avec la sous-unité Vsp11 du complexe HOPS sur les endosomes tardifs via la protéine ORPL1 un senseur du

cholestérol. En l'absence de ORPL1, ce complexe n'est plus formé (van der Kant et al., 2013) (Figure 25).

La maturation du phagosome est coordonnée, comme le montrent les exemples-ci dessus, par des interactions avec la voie d'endocytose. L'apport d'enzymes lysosomales aux phagosomes par exemple peut faire intervenir d'autres compartiments intracellulaires comme l'appareil de Golgi. Ainsi le transport des vésicules et le positionnement de l'appareil de Golgi par rapport au phagosome doit être sous le contrôle des microtubules ou de protéines associées. En effet, des expériences d'imagerie réalisées sur des cellules issues de souris déficientes pour la chaîne lourde codant les dynéines montrent une dispersion totale de l'appareil de Golgi (Harada et al., 1998). Les protéines motrices de microtubules pourraient donc jouer un rôle dans le positionnement de l'appareil de Golgi et le transport de ses vésicules.

Ces différentes expériences suggèrent qu'en plus de son rôle dans la migration centripète des phagosomes, les microtubules pourraient contribuer à une régulation plus spécifique des différents événements inhérents à la maturation du phagosome.

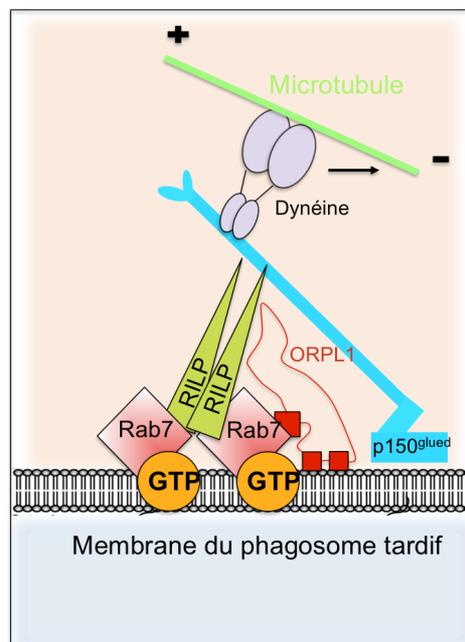


Figure 25. Complexe RILP-RAB7- ORP1L- dynactine/dynéines au phagosome tardif. Sous forme de dimère, RILP interagit avec les GTPases Rab7-GTP. Cette interaction favorise le recrutement et l'interaction de la dynactine/p150^{glued} et de ORP1L. La dynactine se lie à des moteurs moléculaires telles que les dynéines, le phagosome tardif est donc en connexion avec le réseau de microtubules.

II.2.Activation du macrophage : origine de la réponse intercellulaire

De façon concomitante à la maturation du phagosome, le macrophage activé par ses récepteurs induit une cascade de signalisation lui permettant la production de cytokines et l'activation de cellules immunitaires. Cette activation est la résultante de l'interaction des microorganismes avec leurs récepteurs décrits dans le I.1, mais également de la formation de complexe intracellulaire participant à la réponse inflammatoire, comme le complexe NF- κ B. Ce dernier est à l'origine de la transcription et de la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Ainsi, la présentation des antigènes par le CMH_{II} à la surface des macrophages et la sécrétion de cytokines permettent conjointement d'activer le recrutement de cellules immunitaires et la destruction des microorganismes internalisés par phagocytose (pour revue Benoit et al., 2008; Lee and Kim, 2007; Mantegazza et al., 2013; Mantovani et al., 2007; Martinez and Gordon, 2014; Moretti and Blander, 2014; Tabas and Glass, 2013). Par ailleurs, la littérature nous montre que le phagosome n'est pas qu'un compartiment intracellulaire passif et tend à être également le support de cette signalisation (pour revue Garin et al., 2001; Underhill and Goodridge, 2012).

II.2.1. Activation de kinases ou de complexes intracellulaires

Les MAPK p38, JNK, ERK1/2 : support de l'interaction du phagosome et de la signalisation.

Les MAP (« mitogen-activated protein ») kinases p38, ERK1/2 (« Extracellular signal Regulated-Kinase ») et JNK (« c Jun NH₂-terminal kinase ») sont des thréonines kinases exprimées par les macrophages et fondamentales à la réponse induite par les récepteurs phagocytaires comme les récepteurs Fc γ , Dectine 1 (I.1.1.1 et I.1.1.2) (pour revue Moretti and Blander, 2014 ;Nimmerjahn and Ravetch, 2008 ;Ravetch and Bolland, 2001), ou encore les récepteurs Toll like qui coopèrent avec les récepteurs phagocytaires (I.1.1.4) (pour revue Beutler, 2004; Underhill and Ozinsky, 2002). Elles jouent un rôle dans l'expression de gènes impliqués dans la mitose, le métabolisme cellulaire, la motilité, la survie l'apoptose et la différenciation (pour revue Cargnello and Roux, 2011). Dans le cas des récepteurs Fc γ , la phosphorylation en amont des domaines ITAM, recrutent un complexe protéique composé entre autre par la protéine Syk et les kinases Src (I.1.2). Ce complexe recrute et active, à son tour, des petites protéines G comme Ras, Rac/Cdc42 ou encore la kinase PKC qui activeront une série de kinases en amont des MAPK. Les MAP kinases kinases responsables de la

phosphorylation directe de ERK1/2 sont MEK1 et MEK2, celles responsables de la phosphorylation de p38 sont MKK3 et MKK6, et enfin MKK7 et MKK4 sont responsables de l'activation des JNK (pour revue Dong et al., 2002) (Figure 26). Dans le cas des TLR, ce sont les protéines adaptatrices Myd88, MAL/TIRAP, TRAM et TRIF qui initient l'activation de la signalisation de ces trois kinases par la protéine TRAF (pour revue Beutler, 2004). Des expériences réalisées dans les macrophages murins montrent que la phagocytose régulée par le TLR2 permet la fusion du phagosome avec les lysosomes via les protéines MyD88 et p38 (Blander and Medzhitov, 2004; Watts, 2004). D'autres expériences expliquent qu'au contraire p38 semblerait avoir un effet négatif sur la maturation du phagosome en empêchant le recrutement de la protéine EEA1 sur le phagosome précoce (Fratti et al., 2003a). Ces deux résultats suggèrent que l'activation de p38 doit être finement régulée afin de maintenir la poursuite de la maturation du phagosome. On pourrait considérer un modèle où p38 est inactivée en début de maturation du phagosome (phagosome précoce) et s'active en fin de maturation (phagosome tardif/phagolysosome). D'autre part, les protéines ERK1/2 ont été associées avec les microtubules dans des fibroblastes de souris (Reszka et al., 1995) ou dans des macrophages (Ding et al., 1996) et seraient présentes sur les endosomes après infection par un parasite (Boggiatto et al., 2014). Enfin les kinases JNK seraient spécifiquement impliquées dans la phagocytose de *Staphylococcus aureus* (Fang et al., 2014). Ces résultats suggèrent une importance majeure des MAPK dans les étapes cruciales de maturation du phagosome. Outre leur rôle dans le trafic intracellulaire comme décrit ci-dessus, l'activation de ces kinases entraîne le recrutement de facteurs de transcription comme AP-1, STAT3 ou encore l'activation du complexe NF- κ B qui sont à l'initiative de la transcription de nombreux gènes codant entre autres des cytokines pro-inflammatoires (pour revue Sabio and Davis, 2014) (Figure 26).

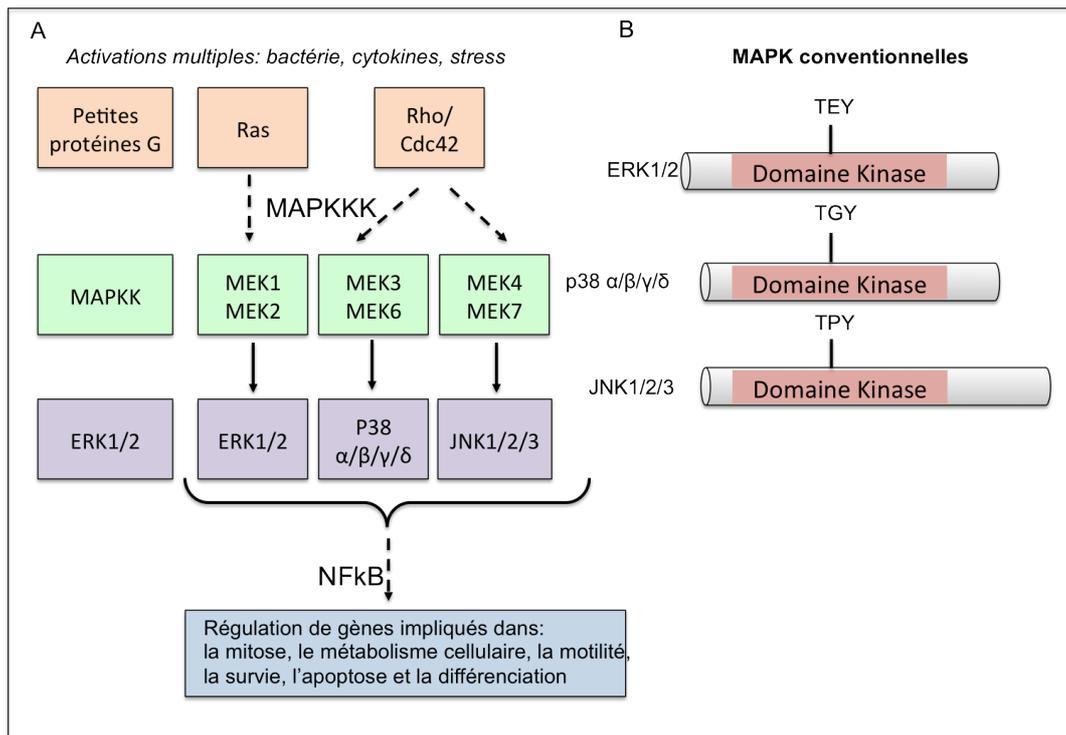


Figure 26. Cascades d'activation et structures des MAPK conventionnelles. A. Suite à un stress, l'internalisation d'une bactérie ou l'activation de cytokines, les macrophages vont activer des petites protéines G qui seront à l'origine du recrutement et de la phosphorylation des MAPK conventionnelles : ERK1/2, p38 et JNK1/2 ou 3. Ces dernières pourront alors activer des facteurs de transcription tels NF- κ B, initiateurs de la transcription de gènes impliqués dans la survie ou encore l'apoptose des cellules. B. Les MAPK conventionnelles possèdent toutes trois un domaine thréonine kinase flanqué d'une région N et C terminales de taille variable. Par ailleurs, elles disposent chacune d'un motif différent responsable de leur phosphorylation par les MAPKK. TEY: Thréonine, Acide glutamique, Tyrosine, TGY: Threonine, glycine, Tyrosine, TPY: Thréonine, proline, Tyrosine (Inspirée de Cargnello and Roux, 2011).

Le complexe NF- κ B, acteur fondamental de la réponse inflammatoire

La famille NF- κ B se compose de cinq membres : NF κ B1 (p105/p50), NF κ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB, c-Rel. Ils partagent un site de liaison à l'ADN hautement conservé et un domaine de dimérisation (RHR : « rel homolgy region »). RelA, RelB et c-Rel contiennent un site de transactivation (TAD) dans leur domaine C terminal qui leur permet d'activer la transcription de nombreux gènes. Les protéines p50 et p52 contiennent un site de répétition aux ankyrines (ARD) dans leur domaine C terminal, à la place du domaine TAD, ce qui les empêche d'activer la transcription de gènes sous forme d'homodimère. Ainsi, p50 et p52 sous forme d'homodimère ont une fonction de répresseurs, tandis que RelA, RelB et c-Rel sont des activateurs de la transcription. Ces complexes sont exprimés dans les macrophages. Dans les cellules restantes, toutes ces protéines existent sous formes d'homodimères ou hétérodimères et sont liées aux protéines inhibitrices : I κ B (I κ B α , I κ B β ou I κ B ϵ). Ces dernières séquestrent les protéines NF- κ B dans le cytoplasme. Après la stimulation des cellules par des

microorganismes via leurs récepteurs de surface, classiquement les protéines I κ B sont phosphorylées puis ubiquitinées par le complexe IKK formé de IKK α (IKK1), de IKK β (IKK2) et de IKK γ (NEMO). Ces modifications conduisent les protéines I κ B à être dégradées par le protéasome. La libération des dimères de NF- κ B induit leur translocation vers le noyau pour activer la transcription de gènes comme les cytokines pro-inflammatoires IL6, IL12p40, TNF α , IL1 β . Cette voie constitue la voie classique d'activation du complexe (pour revue Ghosh and Hayden, 2008; Ghosh and Karin, 2002; Ghosh et al., 1998) (Figure 27). La voie alternative diffère par l'implication de IKK α sous forme d'homodimère et non d'un complexe formé des trois isoformes de IKK, et de l'implication de RelB. Il a été montré que des macrophages de souris déficients pour le gène codant RelB, secrètent moins de cytokines TNF α et produisent trop de IL1 β par rapport à des macrophages témoins après stimulation au LPS (Caamano et al., 1999). De même, les macrophages déficients pour la protéine c-Rel surproduisent de l'IL6, mais produisent moins de TNF α (Grigoriadis et al., 1996). Ces résultats suggèrent que RelB et Relc sont nécessaires à la réponse inflammatoire du macrophage pour réguler les cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, l'inhibition de Rac1 dans les macrophages humains ou murins réduit l'activité de IKK et la translocation nucléaire de RelA (Marion et al., 2012; Naskar et al., 2014). Ces derniers résultats mettent en évidence une communication entre les protéines nécessaires à la formation de la coupe phagocytaire dépendante du récepteur Fc (Rac1) ou le recrutement de NOX2 sur le phagosome et celles permettant l'activation du macrophage (complexe NF- κ B).

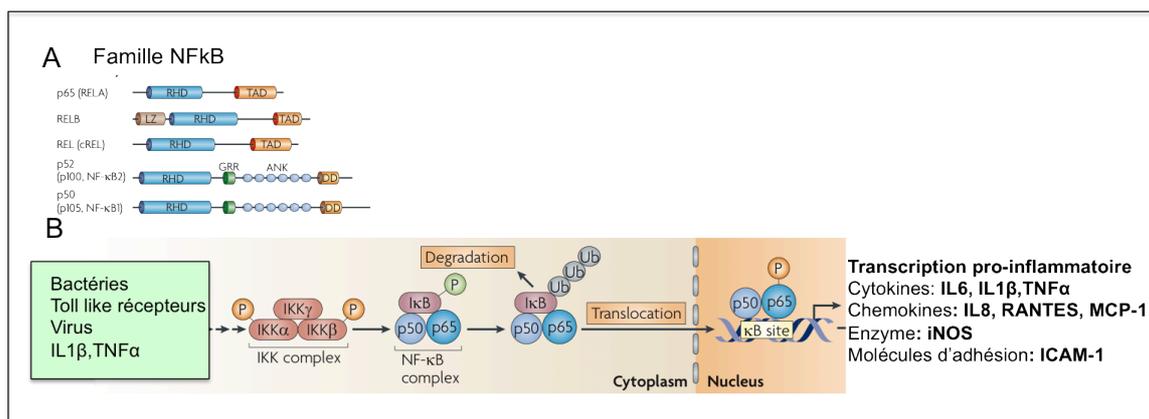


Figure 27. Structure et activation du complexe NF- κ B, voie classique. A. Structure des membres de la famille NF- κ B. RHD: domaine d'homologie à Rel, TAD: domaine de transactivation, GRR: domaine riche en glycines, ANK: motifs de répétition à l'ankyrin, DD: domaine de mort. B. Activation de la voie classique de NF- κ B. Suite à l'activation de la cellule par divers stimuli, le complexe IKK ubiquitine I κ B qui est envoyé au protéasome. Libérées de I κ B, les protéines p50 et p65 migrent au noyau où elles se fixent à l'ADN. Ceci permet la transcription de molécules pro-inflammatoires comme IL6, RANTES ou encore iNOS (D'après Ghosh and Hayden, 2008).

II.2.2. Activation du CMH_{II} et production de cytokines

Activation du CMH_{II} : initiation de la réponse intercellulaire

Même si les macrophages ne sont pas considérés comme les cellules présentatrices de l'antigène les plus puissantes, ils expriment les molécules du CMH_{II} à leur surface. Celles-ci leur confèrent une alternative à la dégradation terminale des pathogènes. L'exposition du CMH_{II} chargé de son peptide, à la surface des cellules, associée à des molécules de co-stimulation, permet l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (L_TCD4⁺). Le CMH de classe II est composé de deux chaînes polypeptidiques transmembranaires α et β . Chaque chaîne présente deux domaines « immunoglobuline like » associées de manière non covalente, $\alpha 1$ et $\alpha 2$ pour la chaîne α , et $\beta 1$ et $\beta 2$ pour la chaîne β . La liaison au peptide se fait par les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ (pour revue Castellino et al., 1997; Germain, 1994) (Figure 28). Les hydrolases présentes dans les phagosomes tardifs ou les phagolysosomes digèrent le matériel ingéré et cette dégradation génère des peptides qui vont pouvoir être chargés sur le CMH_{II} dans le phagosome tardif ou phagolysosome. Des expériences d'extraction de phagosomes après ingestion d'un peptide antigénique par des macrophages de souris montrent l'expression du CMH_{II}, de LAMP1 et du peptide antigénique sur ce compartiment (Ramachandra et al., 1999). La présence du CMH_{II} dans ces compartiments provient du stockage d'un pool de molécules du CMH_{II} néo synthétisées, présent dans les compartiments multivésiculaires (MVB). Puis par fusion des compartiments phagocytaires et de la voie d'endocytose le CMH_{II} est exprimé en surface des phagosomes. Le CMH_{II} chargé de son peptide sera alors exposé à la surface des macrophages pour activer les L_TCD4⁺ (pour revue Mantegazza et al., 2013; Neefjes et al., 2011; Niedergang and Chavrier, 2004). Ainsi par ce mécanisme, d'une part le macrophage active et recrute des cellules du système immunitaire pour l'aider dans l'éradication d'un microorganisme. D'autre part, il lui offre une seconde alternative dans le cas où la phagocytose n'a pas été suffisante pour dégrader le microorganisme. Des expériences de cytométrie en flux indiquent que dans des macrophages murins alvéolaires l'infection par *Brucella* diminue l'expression du CMH_{II}, ce qui affecte l'activation des lymphocytes T (Ferrero et al., 2014). Ce phénomène est également observable après l'infection des macrophages murins issus de la moelle osseuse par *Francisella tularensis* (Wilson et al., 2009). Ces différentes études suggèrent un rôle important du macrophage dans la réponse adaptative et de sa capacité à activer les autres cellules du système immunitaire.

Le macrophage peut également charger des peptides sur les molécules du CMH de classe I pour activer les lymphocytes T CD8⁺ par un processus de présentation croisée (pour revue Mantegazza et al., 2013; Watts and Amigorena, 2001).

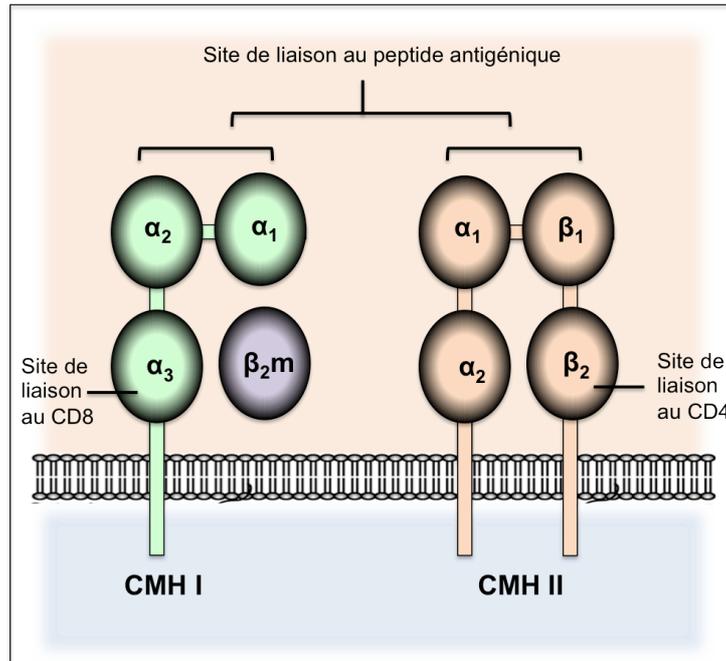


Figure 28. Structure du CMH_I et du CMH_{II} présents à la surface membranaire des macrophages.

Production de cytokines par les macrophages

L'activation des macrophages par les récepteurs phagocytaires est à l'origine d'une augmentation de production de cytokines et chimiokines. Ainsi, elles permettent aux macrophages d'activer directement et de recruter des cellules du système immunitaire. Parmi les cytokines pro-inflammatoires produites lors de la réponse inflammatoire, on compte l'IL1 α et β , l'IL6, le TNF α , l'IL12 ou encore INF α et INF β . L'IL1 α et β ont des activités biologiques similaires. Elles sont reconnues et activent les lymphocytes B, les neutrophiles et les macrophages. En effet, ces trois types cellulaires possèdent au moins l'une des deux chaînes du récepteur à l'IL1, ce qui favorise la fixation de ces interleukines aux récepteurs. L'IL1 β participe également à la réponse Th17 des lymphocytes T (pour revue Keyel, 2014; Mills et al., 2013). L'IL6 est une clé dans la régulation de l'inflammation aiguë et chronique. Elle participe à l'activation des lymphocytes T, permet leur multiplication et leur différenciation en Th17. Outre l'activation des lymphocytes T, elle induit également la différenciation des lymphocytes B en cellules plasmatoïdes productrices d'anticorps (pour revue, Fujimoto et al., 2011; Kishimoto, 1989; Mesquida et al., 2014). L'IL12 se distingue par

deux isoformes : IL12p40 et IL12p35. Elle permet l'activation des cellules NK ainsi que leur prolifération, leur propriété cytotoxique et leur production de cytokines. Elle contribue à la réponse Th1 des lymphocytes T (pour revue Vignali and Kuchroo, 2012). Le TNF α coordonne le recrutement et l'activation des neutrophiles et des cellules endothéliales (pour revue Carswell et al., 1975). Les interférons (INF) de type I α et β , connus pour leurs effets antiviraux, stimulent également les lymphocytes T cytotoxiques et les NK. Les macrophages sont également des producteurs de chimiokines. Le gradient formé par ces dernières induit la migration des leukocytes vers le site inflammatoire. Les chimokines sont réparties suivant deux classes en fonction de la distance séparant deux résidus cystéines conservés : les CXC et les CC. Parmi la liste exhaustive de chimokines, le macrophage produit du CCL2 (MCP1), du CCL3 (MIP-1 α), du CCL4 (MIP1 β), du CCL5 (RANTES), du CCL7 (MCP3), du CCL8 (MCP2), du CXCL1 (GRO α) et ou encore du CXCL8 (IL8) (pour revue Steinke and Borish, 2006). Pour exemple, MCP1, RANTES et MIP1 β recrutent tous les trois les monocytes, MCP1 et RANTES les cellules T mémoires et MIP1 β les cellules T naïves (Deshmane et al., 2009).

Pour résumer ce qui a été vu dans ce premier chapitre d'introduction, la phagocytose se décompose en deux étapes bien distinctes : les étapes précoces d'internalisation menant à la formation du phagosome et les étapes tardives de maturation du phagosome. Les premières étapes reposent sur une réorganisation du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique et sur un apport membranaire provenant de différents compartiments intracellulaires. Les étapes de maturation du phagosome sont caractérisée par une évolution du phagosome en phagolysosome, suivant un mouvement centripète contrôlé par les microtubules et coordonnée par des fusions et fissions avec des compartiments intracellulaires. Simultanément à la formation du phagosome, les récepteurs phagocytaires activés induisent une signalisation intracellulaire variée menant à la transcription de gènes et à la production de cytokines. Par ce mécanisme, les macrophages sollicitent ainsi le recrutement de plusieurs cellules du système immunitaire comme les cellules lymphocytaires. Cette dynamique membranaire et intracellulaire mobilise les principaux acteurs protéiques impliqués dans le trafic intracellulaire (Figure 29). De nombreux pathogènes détournent ce processus d'internalisation, de dégradation, et de signalisation, et c'est le cas du virus de l'immunodéficience acquise de type I (VIH-I) (Cobos-Jimenez et al., 2011; Flannagan et al., 2009; Mazzolini et al., 2010), qui a été au cœur de mon projet.

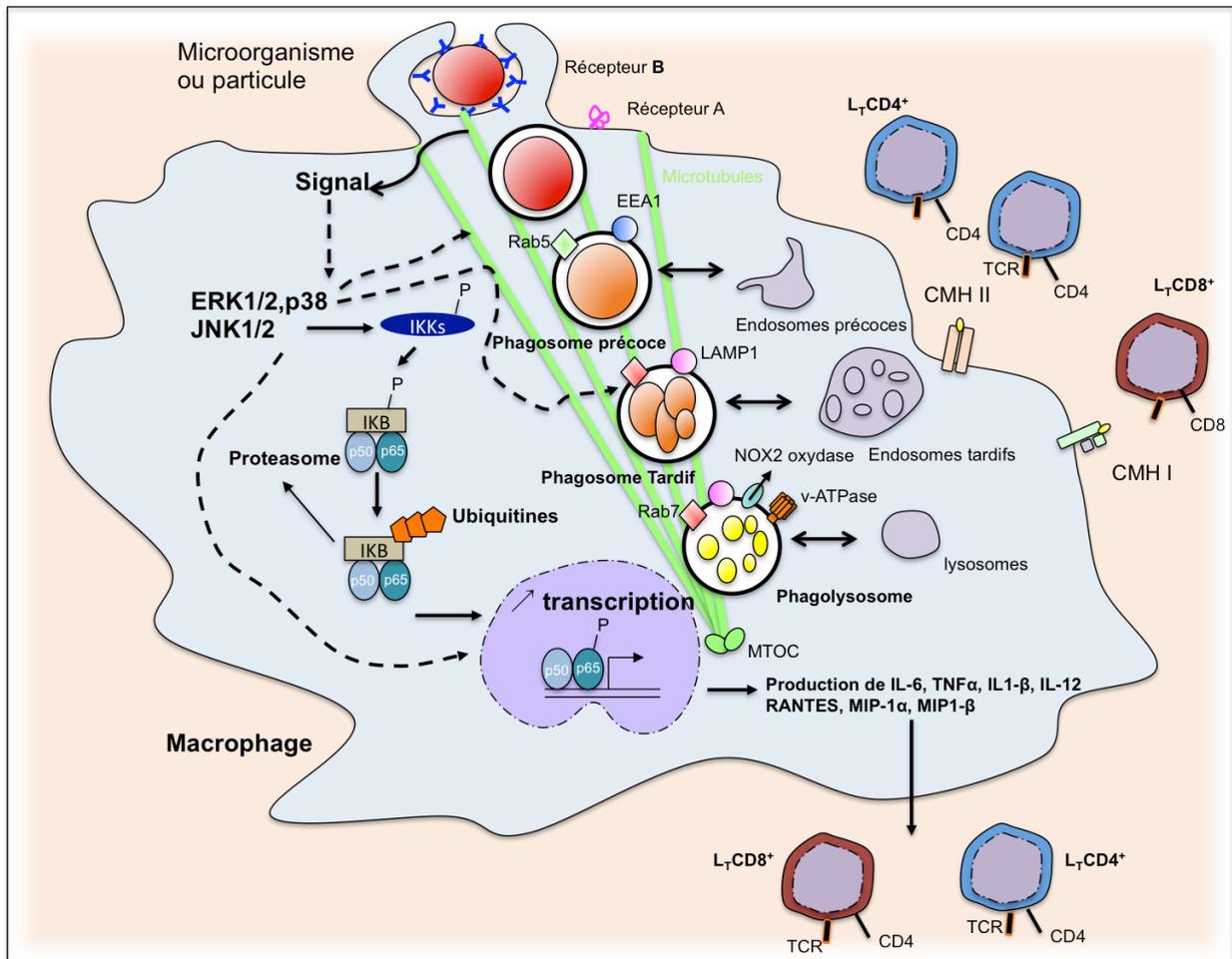


Figure 29. Mécanisme de maturation du phagosome et signalisation dans un macrophage. Les récepteurs de surface du macrophage reconnaissent une particule ou un microorganisme ce qui mène à son internalisation par phagocytose. Le microorganisme se retrouve alors enfermé dans un phagosome qui va suivre une maturation centripète via les microtubules et fusionner avec les compartiments de la voie d'endocytose via l'acquisition de marqueurs tels que Rab5 et Rab7. L'acidification progressive de ce compartiment (v-ATPase) et la production de ROS (NOX2), permettra la digestion du microorganisme qui sera dégradé ou présenté par les molécules du CMH_{II} et CMH_I à des lymphocytes T. Parallèlement, les récepteurs activés envoient des signaux dans la cellule ce qui permet le recrutement de MAPK conventionnelles (ERK1/2, p38, JNK1/2). Ces dernières pourront activer de nombreuses protéines comme IKK du complexe NF-κB. Activé, IKK libèrera les facteurs de transcription p50 et p65 qui se fixeront au promoteur pour initier la transcription de gènes. Parmi les gènes transcrits puis traduits, on compte les cytokines et chimokines pro-inflammatoires. Ces dernières seront libérées dans le milieu extracellulaire pour activer des cellules du système immunitaire. Il est à noter que ces différentes protéines de la signalisation participent également à la maturation du phagosome.

Chapitre II : le VIH-1 dans les macrophages

Le VIH est l'agent étiologique du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Le SIDA est une pandémie dont l'éradication n'est pas encore terminée. En tant que tel, il contribue à générer un problème de santé publique majeur. Malgré l'ensemble des moyens de lutte développés à l'heure actuelle, l'infection par le VIH reste à un niveau élevé sur le plan mondial. Cette infection virale est caractérisée par une déficience du système immunitaire et l'apparition de maladies opportunistes. La capacité du virus à échapper à la surveillance du système immunitaire lui permet d'affaiblir progressivement les mécanismes mis en place par les cellules du système immunitaire afin de l'éradiquer (Haas et al., 2011). Contrairement aux lymphocytes T, qui succombent rapidement à la suite de l'infection virale, les macrophages résistent à ses effets cytotoxiques, ce qui contribue à la pathogénèse du virus. Considérés comme un réservoir viral important, et de par leur capacité migratoire, les macrophages colonisent différents tissus pour disséminer le virus aux autres cellules par un contact direct ou indirect. De plus, le virus exploite également les aptitudes du macrophage à produire un large panel de cytokines et chimokines pour permettre sa réplication. Enfin, l'infection virale perturbe la clairance de bactéries comme *M. tuberculosis* ou *Salmonella Typhimurium* par les phagocytes, entraînant ainsi le développement de maladies opportunistes souvent mortelles chez les patients infectés (pour revue Chang et al., 2013; Gordon et al., 2010; Herbein et al., 2010; Koppensteiner et al., 2012; Tan and Sattentau, 2013).

I. Le Virus de l'immunodéficience humaine de type 1, VIH-1

I.1. Epidémiologie et transmission du VIH

L'épidémie du VIH est apparue après des infections zoonotiques avec le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) provenant du primate (pour revue Hahn et al., 2000; Sharp and Hahn, 2011). Il est réparti dans le monde sous deux formes : le VIH-1, forme mondialement étendue, et le VIH-2, forme minoritaire qui se restreint à l'Afrique de l'ouest, la France et le Portugal (pour revue Nyamweya et al., 2013). Ce virus est à l'origine de plus de 30 millions de morts, dont 1,6 millions en 2012. Actuellement, 35,3 millions de personnes vivent contaminées par le VIH dans le monde, dont 3,3 millions de nouveau cas recensés en 2012. Malgré l'ensemble des moyens de lutte, l'épidémie reste à un niveau élevée et recule de façon modeste. Les régions les plus touchées par le VIH sont l'Afrique sub-saharienne,

l'Amérique du Nord et Latine, l'Europe centrale ainsi que l'Asie Centrale, du Sud et du Sud-Est. Ces pays comptent à eux seuls 93% de cas d'infection dans le monde (Figure 30). En France, entre 120 000 et 180 000 personnes vivent avec le VIH en 2012 (Rapport UNAIDS 2013). Dans le développement de ma thèse, je me focaliserai sur le VIH-1. Il existe 3 modes de transmission du virus chez l'homme, par voie sexuelles, sanguine, par voie placentaire et par l'allaitement (pour revue De Cock et al., 2012). La transmission par voie sexuelle est retrouvée chez les personnes hétérosexuelles, homosexuelles, mais également chez une nouvelle catégorie de personnes les transgenres femmes (Baral et al., 2013). La transmission par voie sanguine peut se faire, en moindre mesure de nos jours lors d'une transfusion sanguine, mais surtout chez les toxicomanes par l'utilisation de seringues (Bergstrom and Abdul-Quader, 2010). Enfin, la transmission verticale par la mère à son enfant se fait par voie placentaire lors de la grossesse et de l'accouchement. Elle peut également se produire au cours de l'allaitement (Ackerman and Kwiek, 2013). La concentration du VIH présente dans les sécrétions vaginales ou dans le sang des hommes et des femmes est suffisante pour induire une transmission efficace du virus entre individus.

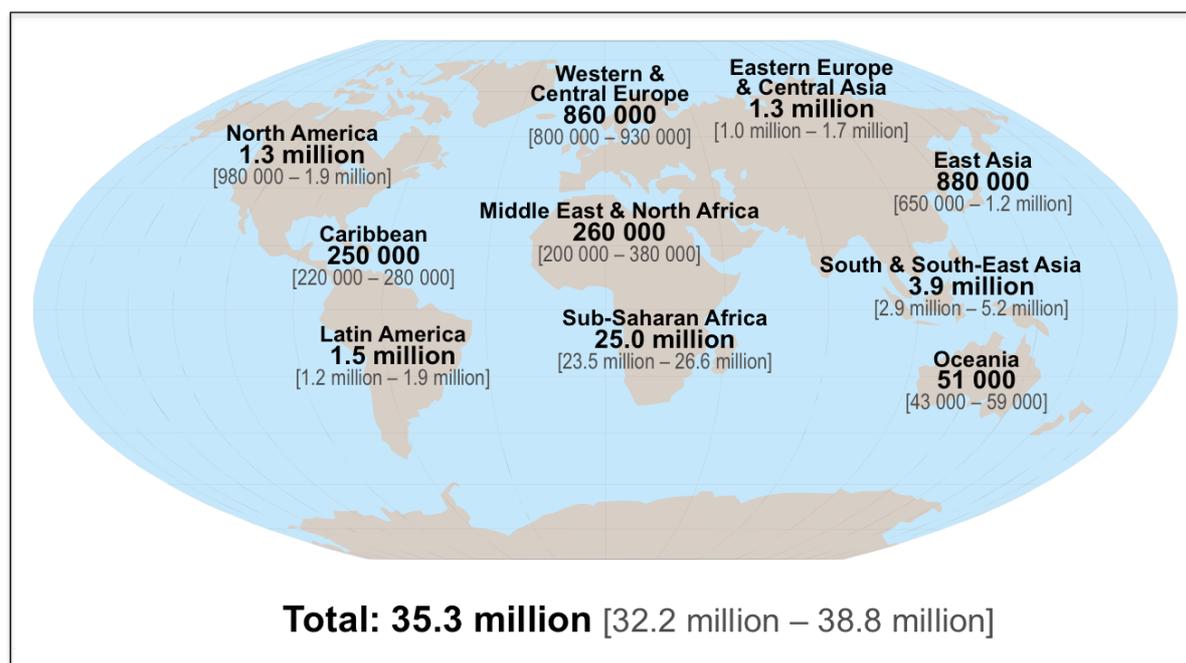


Figure 30. Estimation du nombre d'adultes et d'enfants vivants avec le VIH en 2012 sur le plan mondial. (D'après le rapport UNAIDS 2013)

I.2. Physiopathologie du VIH-1

L'infection par le VIH se décompose en plusieurs phases qui se suivent. La phase initiale, consécutive à la transmission du virus, est la phase éclipse. Lors de cette phase, l'infection virale est localement établie dans les tissus, mais sa présence est indétectable dans la circulation systémique. Sa durée est estimée à une dizaine de jours. La phase qui lui succède est la primo-infection. Elle est caractérisée par la dissémination du virus aux tissus lymphoïdes et à la circulation systémique. Durant cette phase, le VIH se réplique vivement pour atteindre son niveau d'infection maximale, puis sa réplication décroît rapidement. Cette phase dure environ une à deux semaines et est caractérisée par la chute du nombre de L_TCD4^+ , du fait de la réponse immunitaire. Puis, il vient la phase de latence ou asymptomatique, marquée par une absence de symptômes chez le patient. Lors de cette phase, la réplication du virus ou charge virale se stabilise grâce au maintien du taux de L_TCD4^+ . Elle a une durée variable selon les patients allant de quelques mois à quelques années. La phase finale correspond au stade SIDA. Elle se manifeste par un débordement du système immunitaire, marqué par une chute drastique du taux de L_TCD4^+ (inférieur à $200/mm^3$) et le développement de maladies opportunistes (Figure 31) (pour revue Bonhoeffer et al., 2003; Chang et al., 2013; Cohen et al., 2010).

Selon les rapports de l'organisation mondiale de la santé (OMS), la sévérité de l'infection virale chez les adolescents et les adultes se définit suivant 4 stades cliniques allant du moins au plus sévère, le dernier stade étant marqué par des septicémies à *Salmonella* non typhoïde ou encore des tuberculoses extra pulmonaires. La prise des traitements antirétroviraux est basée sur le taux de L_TCD4^+ présent dans l'organisme. Dans les situations de ressources limitées en 2010, elle était conseillée pour des patients dont le taux de L_TCD4^+ était inférieur à $350/mm^3$ au regard des symptômes (rapport OMS 2010). Dorénavant, l'OMS recommande un traitement plus précoce et relève de 350 à $500/mm^3$ la valeur de la numération des L_TCD4^+ . Cette nouvelle directive fait suite à des données chiffrées montrant que la précocité du traitement prolonge la vie des patients par un système immunitaire plus robuste (rapport OMS 2013) (Anglemyer et al., 2014; Cohen et al., 2013; Zolopa et al., 2009).

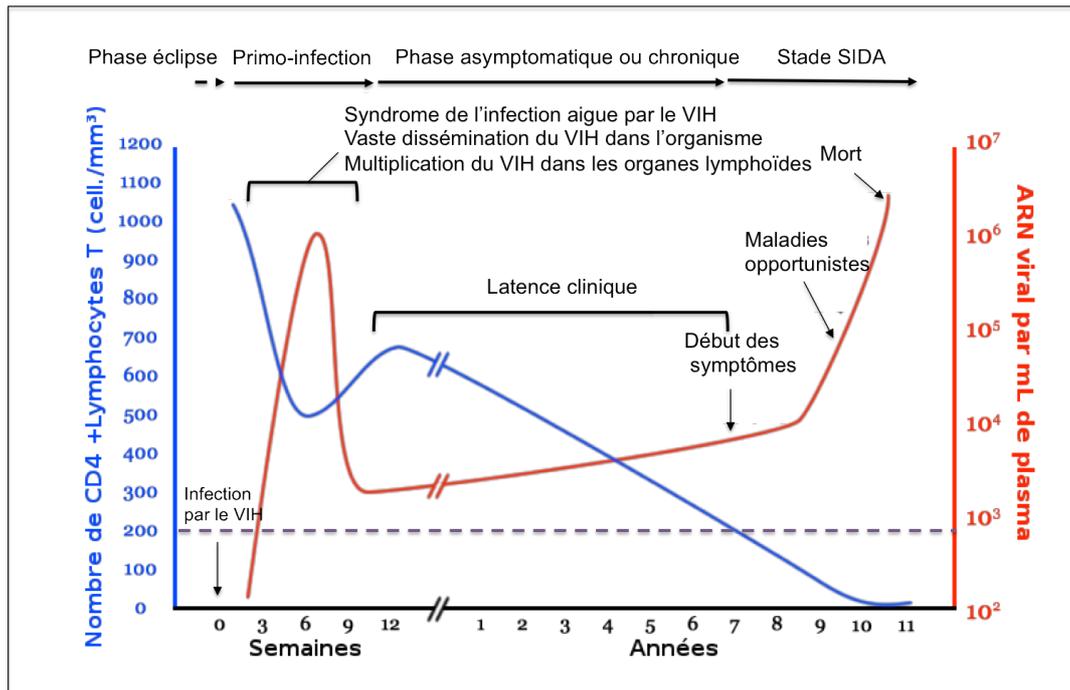


Figure 31. Les différentes phases de l'infection par le VIH, découpées suivant la charge virale et le taux de L_TCD4^+ dans la circulation systémique.

1.3. Structure du VIH-1

Le virus du VIH-1 est un lentivirus de la famille des rétrovirus. C'est donc un virus pathogène avec une période d'incubation très lente, qui établit une latence dans les cellules infectées et qui fatalement mène à la mort (pour revue Gonda, 1994). Sa forme est sphérique et son diamètre est de 90 nm (Briggs et al., 2003). Comme tous les lentivirus, il est enveloppé d'une bicouche lipidique provenant de la membrane plasmique de la cellule hôte. Il possède deux molécules d'ARN identiques. La structure de son génome est caractéristique des rétrovirus. Ce dernier code 16 protéines distinctes. Il code les polyprotéines de structures Env, Gag, et Gag-Pol qui sont clivées en protéines individuelles. Le précurseur Env (ou gp160) produit les deux protéines à l'origine de la formation de l'enveloppe virale et est responsable de l'attachement du virus aux cellules : la protéine de surface gp120, et la protéine transmembranaire gp41. Outre la protéine p6, le précurseur Gag (Pr55^{gag}) donne des protéines structurales de la matrice (p17), de la capsid (p24), et de la nucléocapsid (p7). Enfin, l'autocatalyse de la polyprotéine Gag-Pol (Pr160^{gag-pol}) génère la protéase, l'intégrase et la transcriptase inverse (RT ou reverse transcriptase), protéines qui assurent les fonctions enzymatiques du virus. Par ailleurs, le génome du VIH code deux protéines régulatrices Tat et Rev, responsables de la régulation de l'expression génique du virion. Enfin, il code quatre

autres protéines accessoires ou régulatrices : Vpu (« Viral protein U »), responsable de l'assemblage viral, Vif (« Viral infectivity factor »), Vpr (« Viral protein R») et Nef (« Negative factor ») (Figure 32). Ces protéines accessoires ne sont pas essentielles à la réplication virale *in vitro*, mais sont requises pour la réplication virale et la pathogenèse *in vivo*. En particulier, Tat, Vpr et Nef agissent sur la capacité du virus à échapper à la réponse anti-virale (pour revue Frankel and Young, 1998; Scarlata and Carter, 2003; Sierra et al., 2005; Tang et al., 1999).

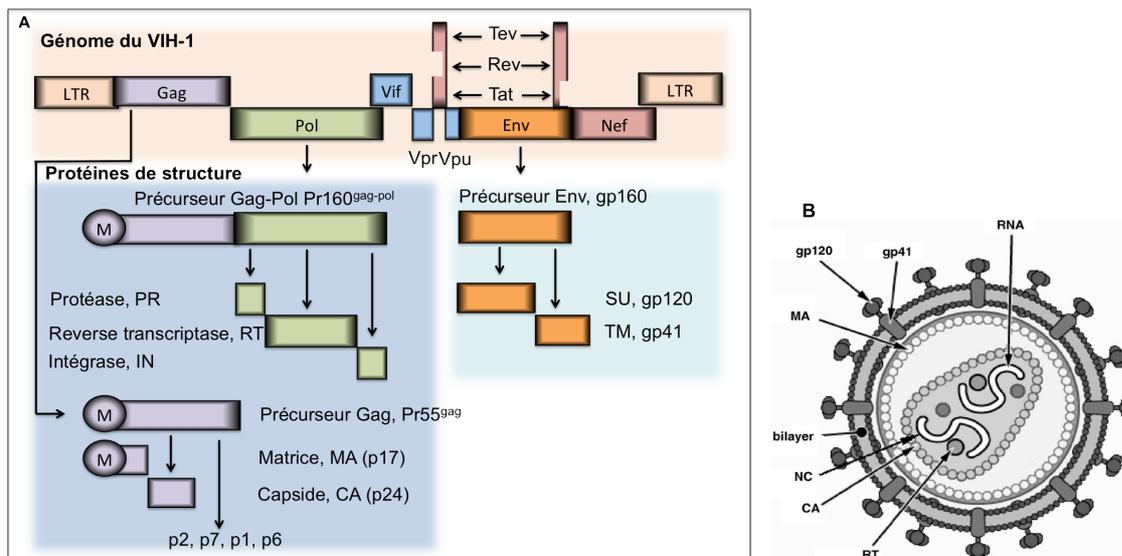


Figure 32. Organisation génomique et représentation du virion mature du VIH-1. A. La polyprotéine Gag est clivée en six sous-unités protéiques: la matrice (p17), la capsid (p24), la nucléocapsid (p7), le domaine tardif (p6), p2 et p1. Le clivage du précurseur Gag-Pol donne lieu à 3 enzymes: la protéase, la transcriptase inverse, et l'intégrase. Les deux protéines d'enveloppe, gp120 et gp41, résultent du clivage du précurseur Env. Les autres gènes *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat* et *rev*, sont produits dans des cadres de lecture ouverts superposant les gènes *pol* et *env*. Leur transcription est régulée par l'activité des LTR, présents aux deux extrémités du génome viral (Inspirée de Peterlin and Trono, 2003). B. Représentation du virion mature du VIH-1. Le virion mature du VIH-1 possède deux molécules d'ARN contenues dans la capsid du VIH, ainsi que certaines protéines virales énoncées ci-dessus, comme Vif (D'après Sierra et al., 2005).

I.4. Régulation du cycle viral

Le VIH-1 infecte de façon productive les $LTCD4^+$ activés et les macrophages. D'une façon générale, le cycle répliatif est similaire dans les deux types cellulaires mais diffère sur certains points.

I.4.1. Tropisme viral associé aux récepteurs de surface des cellules

Le VIH-1 infecte les L_TCD4^+ et les macrophages en se liant à leurs récepteurs de surface CD4 et leurs corécepteurs CXCR4 ou CCR5. L'expression de ces deux corécepteurs qui sont également des récepteurs aux chimiokines a permis de classer le VIH selon deux catégories, les souches CXCR4 tropiques (R4) et les souches CCR5 tropiques (R5). Ainsi, l'entrée du VIH-1 dans les macrophages et les lymphocytes était considérée comme sélective en étant associée aux corécepteurs CCR5 et CXCR4, respectivement. Pendant longtemps la divergence de tropisme des souches virales reposait sur leur capacité à induire la formation de syncytia dans les cellules. En effet, les souches qui avaient une prépondérance à former des syncytia et donc caractéristiques de la progression de la maladie étaient attribuées aux souches de tropisme X4, alors que les souches n'induisant pas de syncytia étaient plutôt de tropisme R5, ce qui est remis en question aujourd'hui (Michaels et al., 1988; Tersmette et al., 1989). Il existe des souches de virus à tropisme R4/R5, soit capables de se lier à l'un des deux récepteurs aux chimiokines présents en surface des cellules (Berger et al., 1998). Par ailleurs, des expériences de cytométrie en flux et de RT PCR indiquent l'expression des deux corécepteurs, CCR5 et CXCR4, à la surface des macrophages et des lymphocytes activés, et une infection par les deux souches virales de tropisme X4 ou R5 (Marechal et al., 2001; Naif et al., 1998; Verani et al., 1998). De plus, des expériences réalisées sur les macrophages des personnes ayant le gène codant le corécepteur CCR5 dépourvu de 32 paires de bases montrent une résistance à l'infection pour la plupart des souches virales de tropisme R5 ou X4 et une séquestration du CCR5 dans les cellules, apportée par la mutation (Bergamaschi and Pancino, 2010; Rana et al., 1997). Ces différents résultats témoignent donc de l'évidence d'un double tropisme pour les macrophages avec une préférence pour les souches R5 plutôt qu'une bi-catégorisation macrophages et lymphocytes pour la reconnaissance d'une souche virale tropique donnée.

I.4.2. Cycle viral

L'entrée du VIH dans les cellules se fait par endocytose (Miyachi et al., 2009) ou macropinocytose (Marechal et al., 2001) dans les macrophages, ou encore par fusion de la bicouche lipidique du virus avec la membrane plasmique de la cellule hôte qui est menée par les glycoprotéines de l'enveloppe virale, gp120 et gp41. Le virus se fixe à la surface de la cellule en s'associant au récepteur CD4 qui reconnaît la protéine d'enveloppe virale gp120.

Cette première interaction permet le recrutement de corécepteurs à la surface de la cellule, CCR5 et CXCR4, principalement présents sur les macrophages et les L_TCD4⁺, respectivement. L'interaction de la gp120 au récepteur CD4 mène à un changement conformationnel du complexe protéique de l'enveloppe et à l'interaction de la protéine gp41 aux corécepteurs (pour revue Frankel and Young, 1998; Gomez and Hope, 2005; Tang et al., 1999; Uchil and Mothes, 2009). Cette fixation engendre la fusion du virus à la cellule hôte, sa décapsidation et sa transcription inverse, via la reverse transcriptase. La reverse transcriptase possède trois activités enzymatiques distinctes : la polymérisation d'ADN à partir de l'ARN viral, une activité RNase H, et la polymérisation d'ADN à partir de l'ADN viral nouvellement synthétisé. Ainsi, à partir d'une amorce cellulaire liée au génome viral, l'ARN génomique viral simple brin est converti en ADN viral double brin. Cette étape permet également la génération de longues répétitions terminales identiques (LTR) à chaque extrémité du génome viral (pour revue Harrich and Hooker, 2002; Nermut and Fassati, 2003). Ensuite, l'association de l'ADN double brin du virus avec des protéines cellulaires et virales forme un complexe nucléoprotéique, appelé complexe de pré-intégration (« pre-integration complexe », PIC). Ce complexe de pré-intégration est amené au noyau par la machinerie d'import nucléaire et la protéine Vpr. L'ADN viral est ensuite intégré à l'ADN cellulaire par l'action de l'intégrase (pour Craigie, 2012; Nisole and Saib, 2004). L'étape de transcription qui succède à l'étape d'intégration est sous le contrôle de l'ARN polymérase II, de Tat, et de facteurs de transcriptions comme NF- κ B ou Sp1. Elle permet la transcription de l'ARN du génome viral et d'ARN messagers correspondant aux protéines du virus (pour revue Van Lint et al., 2013). Ces différents transcrits sont ensuite exportés hors du noyau dans le cytoplasme pour la traduction et contribueront à la formation de virions. L'assemblage des virions matures, sous le contrôle de la protéine Gag, se fera dans des compartiments intracellulaires dans le macrophage avant leur relargage dans le milieu extracellulaire, alors qu'il a lieu à la membrane pour les lymphocytes T (Figure 33) (pour revue Benaroch et al., 2010; Peterlin and Trono, 2003; Sierra et al., 2005; Stevenson, 2003).

Des outils pharmacologiques ont été développés et mis au point afin de bloquer le cycle viral à différentes étapes. Parmi ces inhibiteurs pharmacologiques, on trouve l'Efavirenz, l'AZT (appelé aussi zidovudine) ou le Raltégravir. L'Efavirenz et l'AZT agissent sur la transcriptase inverse afin de bloquer la transcription de l'ARN viral en ADN viral. En revanche, le Raltégravir inhibe l'intégrase nécessaire à l'intégration de l'ADN viral au génome cellulaire. Par ailleurs, l'entrée du virus dépendante des corécepteurs CCR5, peut

également être bloquée par des inhibiteurs comme le Maraviroc (pour revue Dorr et al., 2005; Serrao et al., 2009).

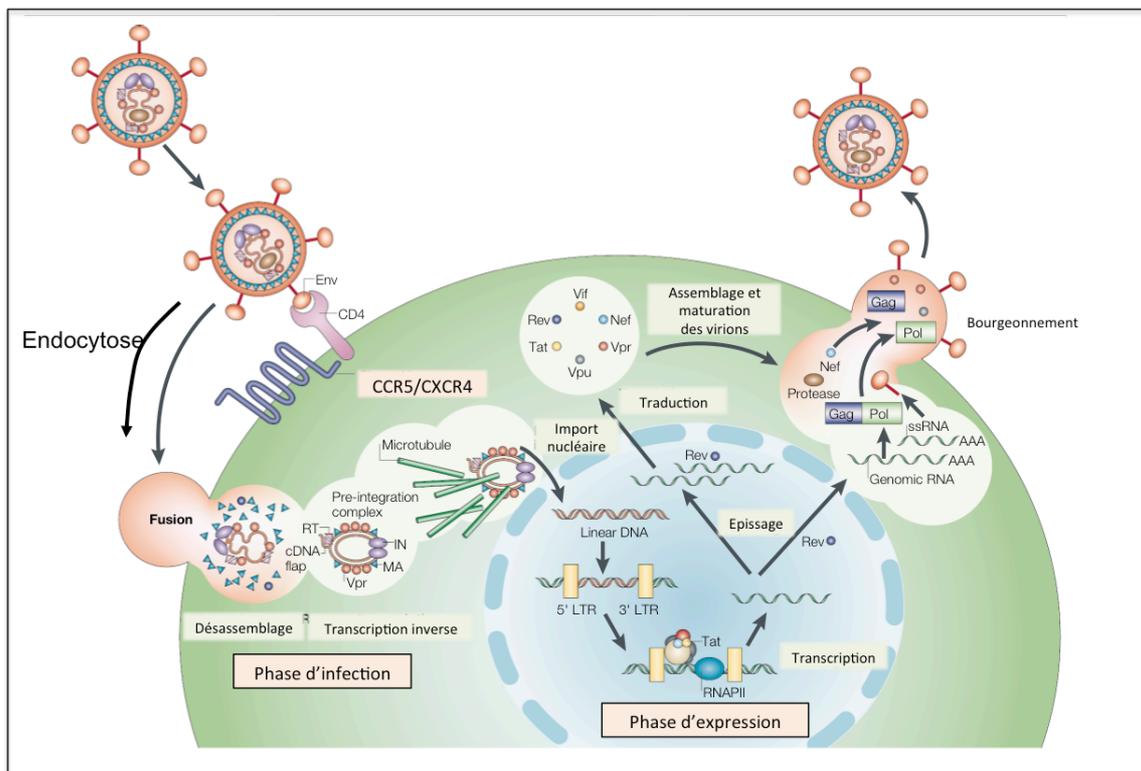


Figure 33. Cycle de réplication virale du VIH-1. L'enveloppe (Env) du VIH-1 se lie à son récepteur CD4, puis subit un changement de conformation pour interagir à l'un des corécepteurs CCR5 ou CXCR4. Le virus pénètre dans la cellule par fusion des membranes ou endocytose. Le désassemblage de la capside libère le complexe de pré-intégration (PIC). Ce dernier migre vers un pore nucléaire, sous le contrôle des microtubules. La transcription inverse est initiée dans le cytoplasme. La pénétration de PIC dans le noyau se fait par l'intermédiaire de nombreux signaux d'adressage au noyau contenus dans les protéines de matrice, via l'intégrase et via Vpr. Dans le cas des lymphocytes, les protéines structurales et enzymatiques sont synthétisées vers le site d'assemblage dans des régions riches en microdomaines membranaires lipidiques. Gag recrute des composants des compartiments multivésiculaires au site de bourgeonnement. Dans le cas des macrophages, l'assemblage des virions matures se fait dans des compartiments intracellulaires, sous le contrôle de Gag. Enfin, les néo-virions sont libérés de la cellule infectée (D'après Peterlin and Trono, 2003).

I.4.3. Facteurs de restriction

Afin de lutter contre la progression du virus, les cellules humaines ont développé des stratégies antivirales impliquant des facteurs de restriction cellulaires inductibles par les interférons comme APOBEC3G, BST2/tetherin, SAMHD1 (pour revue Harris et al., 2012 ;Neil and Bieniasz, 2009) ou encore MX2 (Goujon et al., 2013) et dont les effets peuvent être contrecarrés par le virus. Je me focaliserai ici uniquement sur les facteurs de restriction en lien avec les protéines virales spécifique du VIH de type 1 telles que Vif et Vpu.

APOBEC3G (« apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G » ou CEM15) est une cytidine déaminase cellulaire qui, durant la transcription inverse, provoque le changement d'une cytosine (C) en uracile (U) dans le brin de polarité négatif de l'ADNc viral (pour revue Harris et al., 2002). Même si dans ces conditions, la transcription inverse peut avoir lieu (inefficacement), la conversion de C en U, entraîne une hypermutation de la guanine (G) en adénine (A) dans le brin de la polarité positive de l'ADNc viral qui est souvent néfaste pour le virus (Zhang et al., 2003). Cette réaction se produit lors de l'encapsidation de APOBEC3G dans le virion, via sa liaison avec la nucléocapside. De ce fait, APOBEC3G peut interférer sur le génome viral lors du prochain cycle viral. Pour contrecarrer cet effet, le virus a également développé sa propre stratégie, via la protéine Vif. En effet, Vif accélère la dégradation post-traductionnelle de APOBEC3G. Vif se lie à la protéine cellulaire dans le cytoplasme via le complexe protéique qu'elle forme avec le complexe E3 ligase composé des protéines CUL5, ELOB, ELOC, RBX et le facteur de transcription CBF β (Jager et al., 2012; Mehle et al., 2004; Yu et al., 2003). Ce complexe entraîne la poly-ubiquitination et la dégradation de APOBEC3G. CBF β est essentiel à la stabilité de Vif et à la dégradation de APOBEC3G (Jager et al., 2012). A terme, en dégradant la protéine APOBEC3G, la protéine Vif réduit significativement les niveaux intracellulaires de la protéine cellulaire. Elle empêche son incorporation dans la particule virale et son effet néfaste sur le virus (Figure 34) (Kao et al., 2003).

La protéine BST2 (« Bone marrow STromal antigen 2 », appelée aussi Tetherine ou CD317) est un facteur de restriction cellulaire qui agit sur les étapes tardives du cycle viral, en empêchant la libération des particules virales matures dans le milieu extracellulaire. La tetherine séquestre physiquement les particules virales à la surface des cellules infectées, puis elles seraient ré-intériorisées au sein de compartiments endosomaux pour être dégradées (Miyakawa et al., 2009; Neil et al., 2006). La protéine Vpu, impliquée dans le relargage des virions à la surface de la cellule se lie physiquement à la tetherine (Kobayashi et al., 2011). Vpu recrute et se lie également à la β TrCP2, un composant du complexe ubiquitine ligase SKP1-CUL-F. Ce complexe à l'instar de Vpu, induit une diminution de l'expression de BST2 à la membrane et sa dégradation dans les lysosomes (Iwabu et al., 2009). En accord avec un adressage de BST2 vers la voie de dégradation lysosomale, le rôle majeur de Rab7, protéine régulatrice du trafic endo/lysosomal, a été révélé dans ce processus (Caillet et al., 2011). Par ailleurs, la β TrCP2 augmenterait l'ubiquitination de BST2 ce qui favoriserait sa reconnaissance par les protéines ESCRT via HRS, et donc sa dégradation dépendante des lysosomes (Janvier et al., 2011). D'autres études ont également montré qu'un second

mécanisme dépendant de Vpu, mais indépendant de la β TrCP2, induirait la séquestration de BST2 dans des compartiments intracellulaires la protégeant ainsi de la dégradation (Figure 34) (Dube et al., 2011; Tervo et al., 2011).

Enfin, la protéine MX2 (« myxovirus resistance 2 », ou encore appelée MXB) a été décrite récemment pour inhiber la réplication virale dans différents types cellulaires, incluant les macrophages. MX2 inhibe l'infection par le VIH après son entrée dans la cellule, en empêchant l'accumulation dans le noyau et l'intégration de l'ADN proviral dans la chromatine de la cellule hôte (Goujon et al., 2013). Ces différentes expériences suggèrent que les facteurs de restriction inductibles par les interférons constituent une cible potentielle afin d'éradiquer le virus, bien que celui-ci essaye de trouver des moyens pour parer leur effets.

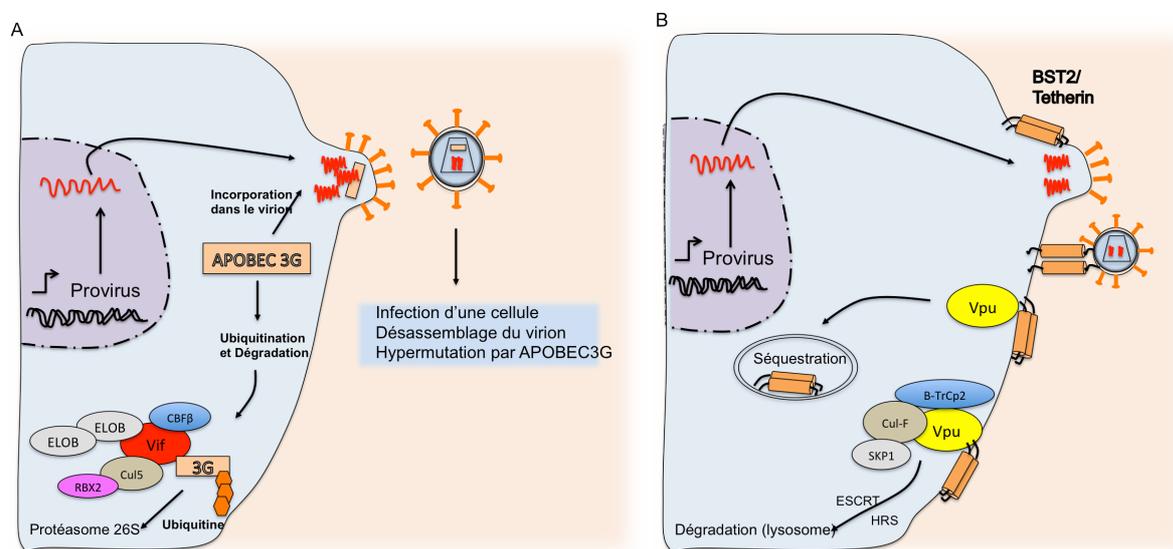


Figure 34. Mécanisme de restriction du VIH-1 par APOBEC3G et BST2. A. APOBEC3G est incorporé dans un nouveau virion. Ce dernier ciblera une cellule pour l'infecter. En se désassemblant, il libère l'ARN viral mais également APOBEC3G qui agira sur l'ADNc viral durant la transcription inverse dans le cytoplasme de la cellule infectée, aboutissant ainsi à une hypermutation. La protéine virale Vif contrecarre la restriction de APOBEC3G en se liant à CBF β et à un complexe E3 ligase afin d'ubiquitiner APOBEC3G et de diriger la protéine au protéasome pour sa dégradation. B. BST2 empêche physiquement la libération des virions de la cellule infectée. Vpu contrecarre la restriction de BST2 en la séquestrant dans un compartiment intracellulaire ou bien recrute un complexe E3 ubiquitine ligase pour diriger la protéine dans les lysosomes où elle sera dégradée (Inspirée de Harris et al., 2012).

II. Le macrophage au centre de la pathogénèse de l'infection virale

Découvert en 1983 pour cibler les lymphocytes T CD4⁺ (Barre-Sinoussi et al., 1983), le VIH infecte également les macrophages (pour revue Burdo et al., 2013; Kuroda, 2010; Verani et al., 2005; Wahl et al., 2006). Les macrophages contribuent à la pathogénèse du virus

par différents aspects : i) à former des réservoirs de longues durées de vie car ils sont résistants aux effets cytopathiques du virus, ii) à transmettre et à disséminer le virus via des contacts cellulaires, iii) à relarguer des produits tels que les cytokines et les chimokines qui modèlent un environnement favorable au virus, et enfin iv) à jouer un rôle important dans le développement de maladies bactériennes opportunistes associées (Tuberculose, Salmonellose). En effet, si l'incidence des maladies opportunistes telles que candidose, les infections à cytomégalovirus est réduite par les thérapies actuelles, les co-infections VIH et *Mycobacterium tuberculosis* sont encore très répandues et ont causé la mort de nombreuses personnes, surtout en Afrique subsaharienne.

II.1. Macrophage : réservoir viral

Les macrophages jouent un rôle important dans la pathogénese du virus. Contrairement aux L_TCD4^+ , les macrophages ne meurent pas après une infection virale mais ces derniers sont résistants aux effets cytopathiques du virus. En effet, à la différence des L_TCD4^+ infectés par le VIH qui présentent une réplication virale rapide et qui meurent rapidement après l'infection, les macrophages survivent des jours voire des mois en accumulant les particules virales dans de larges vacuoles intracellulaires (Raposo et al., 2002; Sharova et al., 2005). De plus, l'équipe de P. Benaroch a montré que ces compartiments, dépourvus de la pompe v-ATPase, étaient incapables de s'acidifier (Jouve et al., 2007), ce qui pourrait suggérer une explication de leur persistance. Ces propriétés confèrent donc aux macrophages un statut de réservoir viral mis en place après l'infection et pouvant persister chez des patients subissant une thérapie anti-retrovirale hautement active (HAART) (Montaner et al., 2006). La nature de ces compartiments à l'instar de l'assemblage des particules virales pour former de nouveaux virions est variée. Des expériences de microscopie électronique réalisées dans des macrophages primaires humains indiquent la présence du CMH_{II} et de la tétraspanine CD63 dans ces compartiments (Raposo et al., 2002). Par ailleurs, d'autres expériences révèlent la présence de LAMP1, CD9, CD53, CD81 et CD82 (Deneka et al., 2007; Jouve et al., 2007; Kramer et al., 2005; Pelchen-Matthews et al., 2003). Comme le témoignent ces différentes expériences la provenance de ces compartiments est variable. Ces compartiments pourraient s'apparenter à des corps multivésiculaires (MVB) (Raposo et al., 2002), ou bien à des endosomes tardifs (Pelchen-Matthews et al., 2003), ou encore correspondre à une invagination de la membrane plasmique (Figure 35) (Bennett et al., 2009; Deneka et al., 2007). Tout comme la provenance des compartiments contenant les virions

(VCC), la libération des virions dans le milieu extracellulaire est sujette à controverse. Des expériences indiquent que les VCC seraient reliés à des tubes formés lors de l'invagination de la membrane plasmique. Selon cette hypothèse, le relargage des virions serait direct (Bennett et al., 2009; Deneka et al., 2007). D'autres expériences montrent qu'au contraire, ces compartiments seraient « libres » dans le cytoplasme de la cellule et la fusion de ces compartiments avec la membrane plasmique entraînerait la libération des virions, relargage indirect (Pelchen-Matthews et al., 2003; Raposo et al., 2002). Cette seconde hypothèse serait sous-tendue par l'implication des microtubules dans le maintien et le transport des compartiments. En effet, le traitement au nocodazole des macrophages primaires humains délocalise ces compartiments, normalement périphériques, vers la région perinucléaire. De plus, la kinésine, Kif3A, serait liée aux VCC et son inhibition entraînerait un défaut de relargage des virions (Gaudin et al., 2012). Ce dernier effet est également observable après le blocage du récepteur scavenger CD36 présent dans les VCC (Berre et al., 2013). Ainsi toutes ces expériences convergent vers l'existence d'un compartiment intracellulaire non acide sous contrôle des microtubules ou lié à la membrane plasmique qui serait à l'origine de la réplication de virions, de leur persistance dans le macrophage et de sa dissémination.

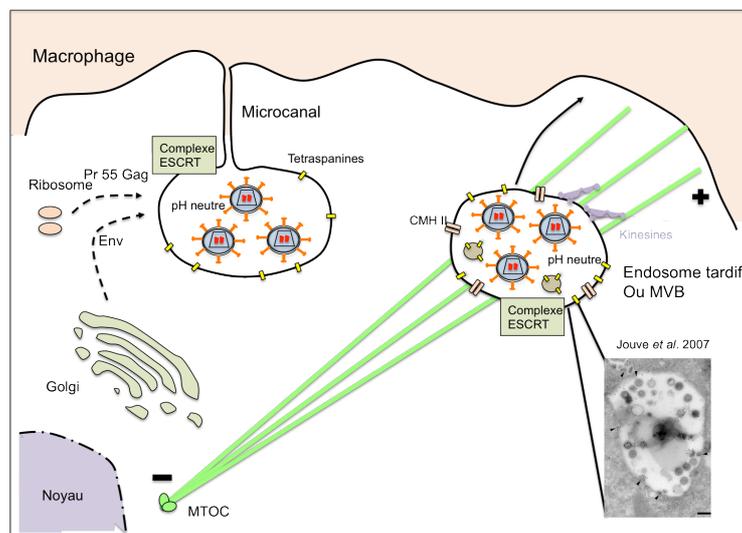


Figure 35. Organisation des compartiments intracellulaires contenant les virions du VIH-1 dans les macrophages. Le génome viral du VIH-1 est transcrit dans le noyau puis transporté dans le cytoplasme jusqu'au compartiment contenant le virus (VCC). L'enveloppe Env du VIH-1 est synthétisée dans le réticulum endoplasmique, puis transite par l'appareil de Golgi avant d'atteindre le VCC. Enfin, Gag est synthétisé via les ribosomes cytoplasmiques libres pour être transportée jusqu'aux VCC. Les protéines ESCRT et les microdomaines riches en tétraspanines et cholestérol participent à l'assemblage des virions aux VCC. Les virions néosynthétisés sont soit stockés dans des compartiments reliés à la membrane par des microcanaux, soit libres dans le cytoplasme mais sous contrôle des microtubules via des kinésines pour atteindre la membrane plasmique. L'image de microscopie électronique associée à ce schéma représente un VCC contenant des virions dans un macrophage primaire humain (Jouve et al., 2007). (Inspirée de Benaroch et al., 2010; Gaudin et al., 2013).

II.2. Dissémination du virus par les macrophages

La plasticité multiple des monocytes/macrophages ainsi que leur capacité de migration permettent à ces derniers de propager l'infection virale à travers tout l'organisme. Ils peuvent d'une part transmettre le virus aux organes lymphoïdes, par des contacts directs avec les cellules lymphocytaires et d'autre part traverser la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le système nerveux central. Ce dernier deviendra alors un réservoir viral à l'initiative de pathologies dévastatrices pour les fonctions cérébrales (pour revue Ghafouri et al., 2006; Gras and Kaul, 2010; Kumar et al., 2014; Waki and Freed, 2010).

II.2.1. Par contact direct : synapse virologique

Comme nous venons de le voir, les macrophages sont des réservoirs viraux capables de relarguer le virus dans le milieu extracellulaire (Raposo et al., 2002). Cependant, leur implication dans la pathogénèse ne s'arrête pas là. Le VIH-1 peut être transmis aux autres cellules directement par relargage des virions libres, mais les macrophages peuvent également disséminer le virus par un contact direct avec d'autres macrophages et des cellules lymphocytaires comme les L_TCD4^+ et les L_TCD8^+ , selon un processus de transmission cellule-cellule (Carr et al., 1999). Cette seconde alternative implique en partie la formation de la synapse virologique (pour revue Piguet and Sattentau, 2004), où les macrophages sont des membres actifs. En effet, les particules virales nouvellement assemblées, et stockées, ont la capacité d'infecter des cellules naïves, ce qui mène à un recrutement organisé des particules virales aux sites de contact. La synapse virologique est formée entre les cellules pour transférer des virus nouvellement assemblés dans les macrophages (*cis*-infection) ou capturés dans le milieu extracellulaire (*trans*-infection). Ces deux types de transfert impliquent : i) une accumulation des virus dans des compartiments riches en tétraspanines ii) que les compartiments soient accessibles à la surface de la cellule, et iii) que les compartiments intracellulaires soient relocalisés à la synapse virologique après un contact avec la cellule cible (Garcia et al., 2008).

Bien que la formation de cette synapse virologique soit décrite principalement avec les cellules dendritiques (Coleman et al., 2013), des observations suggèrent l'implication des macrophages. Des études de microscopie sur des macrophages indiquent l'existence de la formation de cette synapse. Pour ce faire, les auteurs ont mis au point un système *in vivo* reposant sur la protéine Pr55^{Gag}. L'induction de ce système n'interfère ni dans l'assemblage ni

dans le relargage des virions. Ainsi, il a été montré que dans des macrophages primaires humains infectés, les particules virales s'accumulent, vraisemblablement par l'intermédiaire de la protéine Pr55^{Gag}, à la membrane plasmique et dans un compartiment interne contenant les tétraspanines CD81 et CD82. La co-culture de ces cellules avec des lymphocytes T montre que le virus, présent dans les macrophages, bouge rapidement pour atteindre la synapse virologique. Dans ce système la protéine Env, ne semble pas être requise dans la formation de la synapse et le mouvement de Pr55^{Gag} (Gousset et al., 2008). D'autres expériences montrent que la co-culture de macrophages infectés par le VIH-1 avec des L_TCD4⁺ induit un recrutement de Pr55^{Gag}, Env et du récepteur CD4 à la synapse virologique après une heure de co-culture. Par ailleurs, il apparaît que cette synapse est transitoire, avec 5 à 10% de L_TCD4⁺ marqués pour la protéine Gag (6 heures après co-culture) (Groot et al., 2008) (Figure 36). Ces expériences témoignent de l'existence de cette synapse, mais les mécanismes inhérents à cette dernière sont inconnus dans les macrophages. Le cytosquelette d'actine et les microtubules pourraient être impliqués dans ce mécanisme comme ils le sont pour les lymphocytes (Rudnicka et al., 2009) ou les cellules dendritiques (Felts et al., 2010). La synapse virologique est un moyen de transmission, mais les macrophages peuvent également présenter les épitopes du VIH-1 par le CMH_I aux lymphocytes T CD8⁺ (Buseyne et al., 2001). Ainsi, par ces différents mécanismes qui demandent à être approfondis, les macrophages peuvent transmettre le virus aux cellules lymphoïdes, ce qui contribue à leur destruction (Herbein et al., 1998) ou à la latence du virus (Evans et al., 2013).

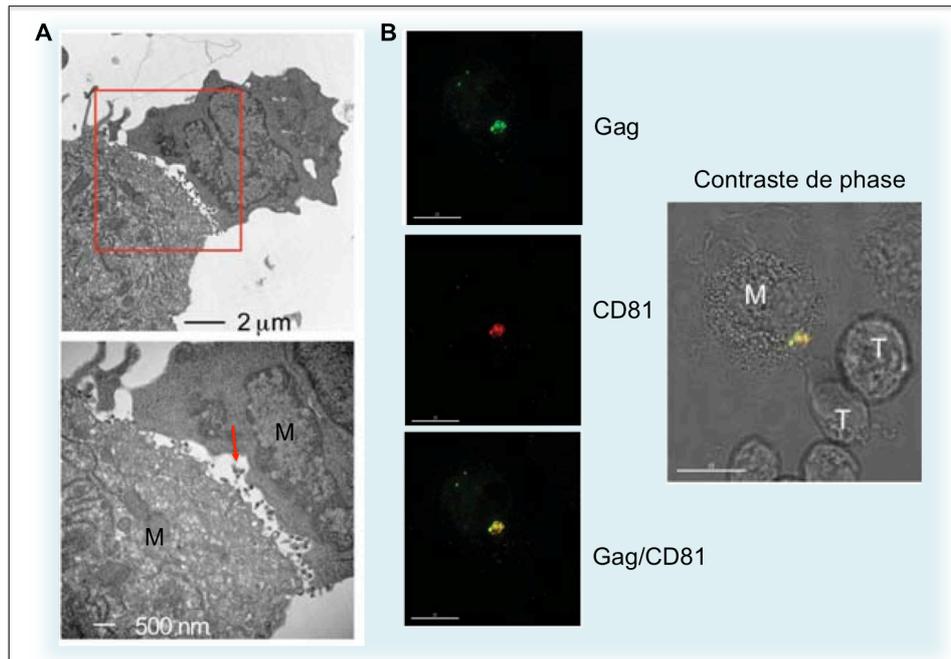


Figure 36. Synapse virologique entre deux macrophages et un macrophage et un lymphocyte T. (D'après Gousset et al., 2008). Les macrophages ont été infectés par le virus du VIH-1 pseudotypé exprimant une protéine Gag étiquetée. A. Image de microscopie électronique témoignant de l'accumulation des particules virales à la synapse virologique formée entre deux macrophages. Le panel du bas est un agrandissement du carré rouge présent sur le panel du haut. La flèche rouge pointe les particules virales assemblées à la jonction entre les deux macrophages. B. Gag s'accumule à la synapse virologique formée entre un macrophage et un lymphocyte T et colocalise avec la tétraspanine CD81. Une à deux heures après la coculture des macrophages infectés par le VIH-1 et des lymphocytes T, les cellules ont été fixées et marquées pour la protéine CD81 (rouge). La protéine Gag (vert) et la tétraspanine CD81 (rouge) colocalisent (jaune), et sont situés à la synapse virologique (image de contraste de phase). Echelle : 15 μm. M: macrophage primaire humain, T: lymphocyte (Jurkat).

II.2.2. Rôle central du macrophage dans l'infection du SNC

Les macrophages infectés par le VIH-1 migrent au sein de tout l'organisme ce qui permet la réplication du virus dans des organes non lymphoïdes comme le cerveau en traversant la barrière hémato-encéphalique (pour revue Burdo et al., 2013; Cobos-Jimenez et al., 2011; Koppensteiner et al., 2012). Ceci favorise le développement de maladies responsables de troubles neurologiques et neuropsychologiques (HAND) et de démence (HAD) bien que cette dernière maladie soit en déclin (pour revue Deeks, 2011). En effet, précocement après l'infection par le VIH-1, le virus transite par les monocytes/macrophages et atteint le système nerveux central (SNC) où il infecte les macrophages périvasculaires, les microglies, et parfois même les astrocytes. Des expériences d'hybridation in situ, et de microscopie électronique sur des coupes de cerveaux de patients atteints d'encéphalite montrent la présence de macrophages contenant des particules virales dans le lobe frontal du

cerveau (Koenig et al., 1986). Les astrocytes ne sont normalement pas considérés comme de grands producteurs du VIH-1. Ils composent la majorité des cellules du cerveau et leur rôle est essentiel dans le maintien des fonctions cérébrales. Cependant des expériences récentes indiquent également la présence d'ADN viral dans ce type cellulaire (Churchill et al., 2009), probablement due à un transfert des virions par les macrophages périvasculaires. La réplication du virus dans les macrophages et l'activation des microglies sont à l'origine d'une forte production virale et de cytokines pro-inflammatoires. La production de chimokines comme le CCL2 par les macrophages infectés augmente la migration des monocytes et des macrophage du sang vers la barrière hémato-encéphalique. En effet, des expériences de migration réalisées à partir de monocytes infectées par le VIH-1 montrent que ces cellules traversent plus facilement le modèle de barrière hémato-encéphalique en réponse au CCL2 en comparaison des cellules non infectées. La spécificité de cette chimokine repose sur le fait que les monocytes infectés ne traversent pas la barrière en réponse à d'autres chimokines produites par les macrophages infectés comme le CCL3 ou le CCL5 (Eugenin et al., 2006). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de CCL2 dans les astrocytes est induite par un contact de ces cellules avec le TNF α membranaire exprimé par les macrophages infectés par le VIH-1 (Muratori et al., 2010). Ainsi par leur capacité migratoire, les macrophages infectés par le VIH-1 peuvent coloniser le CNS qui devient un véritable réservoir viral à son tour. Ce dernier peut étendre l'infection aux tissus périphériques comme les méninges. Une des protéines virales qui tient un rôle essentiel dans la neurotoxicité et dans l'induction conséquente de neuropathologies est la protéine virale Tat (Rappaport et al., 1999).

II.3.Sécrétion de cytokines et chimokines

Comme il a été exposé dans la première partie, les macrophages sont de grands producteurs de cytokines, et par cette production accrue, ils contribuent à la pathogénèse du virus (pour revue Cassol et al., 2009; Herbein and Varin, 2010; Poli and Fauci, 1992). En effet, l'infection par le VIH-1 engage les macrophages à répondre par une forte production de cytokines et chimokines pro-inflammatoire contribuant ainsi à l'activation chronique du système immunitaire observée chez les patients. Ces derniers produisent un large panel de cytokines et de chimokines pro-inflammatoire comme le TNF α , IL1- β , IL6, le CCL3 (MIP-1 α), le CCL4 (MIP-1 β) ou encore le CCL5 (RANTES) (Birx et al., 1990; Porcheray et al., 2006). Des expériences de blocage du récepteur CD4 dans les macrophages montrent que la production du TNF α et de IL1- β est induite par la liaison du virus à ce récepteur (Merrill et

al., 1989). D'autres expériences réalisées sur une lignée de macrophages indiquent que IL1- β et IL6 agissent en synergie pour stimuler la réplication du virus (Poli et al., 1994). L'IL-6 agit également avec le TNF α pour stimuler la production virale, la transcription d'ARN viral et son augmentation dans les macrophages infectés (Poli et al., 1990). Toutes ces cytokines sont donc impliquées dans la réplication du virus, mais également dans l'inhibition des récepteurs d'entrée du virus comme le CCR5 et le CD4. Par ce mécanisme, le virus accélère sa transcription et sa production en bloquant l'entrée de nouveau virus. Ceci favorise l'extension du réservoir viral dans le macrophage. Les protéines virales telles que Nef et Tat, qui sont exprimées précocement dans le cycle viral, contribuent également à la production de ces cytokines. En effet, dans les microglies, Tat augmente l'expression de TNF α , IL1- β , IL6, et CCL3 (Sheng et al., 2000). Tat peut également être à l'origine de la production de CCL3, et CCL4 dans les macrophages (Swingler et al., 1999). Ces protéines jouent un rôle important dans la formation du réservoir des macrophages en agissant sur la transcription via les régions LTR du génome viral. La production accrue de ces cytokines et chimokines favorise non seulement la réplication virale mais active également les cellules lymphocytaires.

Plus tardivement en réponse à une infection virale persistante et au contact de bactéries environnantes, les macrophages vont essayer de se protéger en produisant des interférons de type I INF α , INF- β et de l'IL10. En effet, il a été montré que l'IL10 était responsable de l'inhibition de la production virale dans les macrophages via une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoire comme l'IL6 et TNF α (Weissman et al., 1994). L'IL10 contribue également au blocage de la réplication virale en inhibant la réverse transcription dans les macrophages (Montaner et al., 1994). En contre partie, l'IL10 participe à la suppression de l'activité antivirale des lymphocytes (Brooks et al., 2008). Les interférons de type I, INF α et INF- β , inhibent la réplication virale dans les macrophages (Meylan et al., 1993). Ainsi par la production de cytokines, les macrophages permettent au virus de se répliquer, ce qui légitime la persistance du réservoir viral au sein ces derniers. Les protéines telles que Nef et Tat amplifient cette réplication. La sécrétion de ces cytokines entraîne le recrutement de cellules immunitaires et initie le début de leur apoptose qui deviendra accrue avec la progression de la maladie (Figure 37).

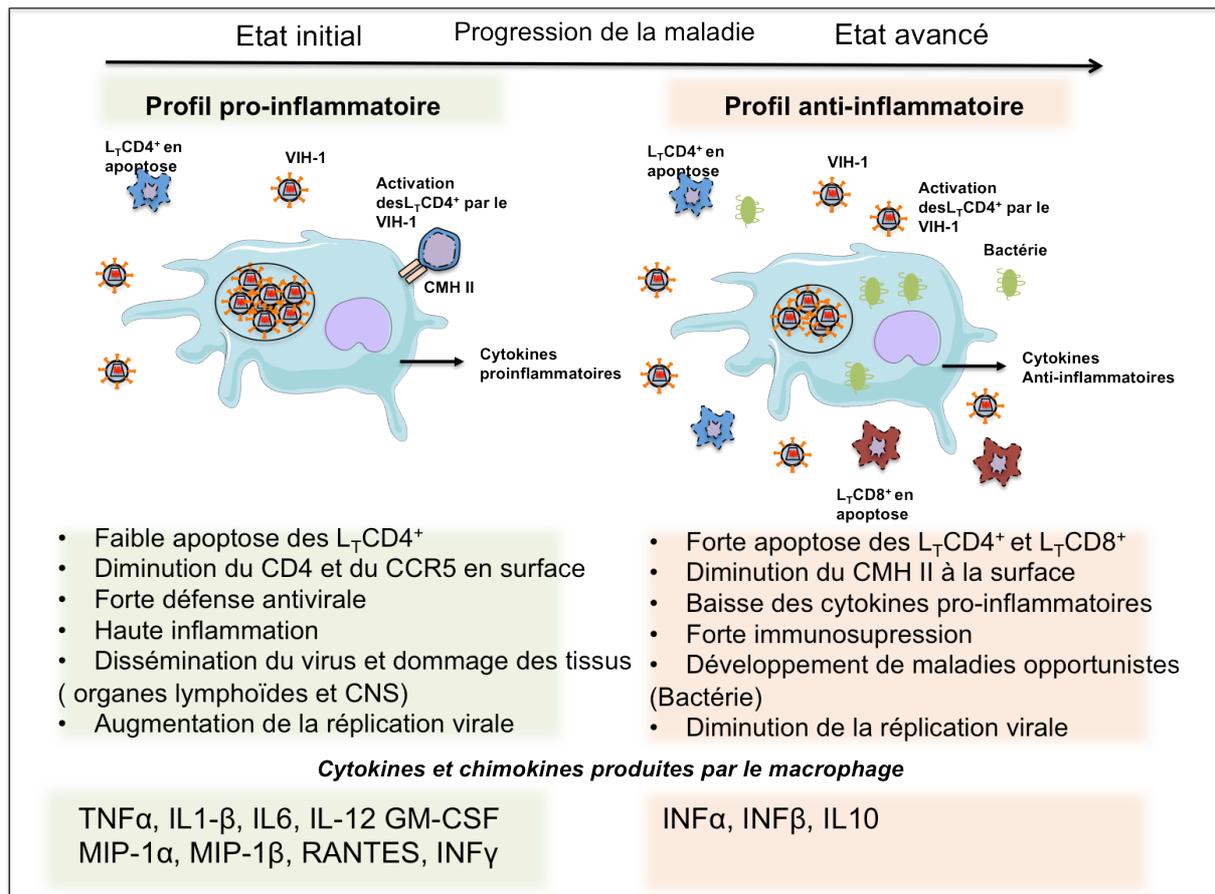


Figure 37. Modèle de la réponse des macrophages infectés par le VIH-1 au cours de la maladie (Inspirée de Herbein and Varin, 2010).

II.4. Macrophage, co-infections et phagocytose

Comme nous l'avons vu précédemment, les patients infectés par le VIH-1 succombent au développement de maladies opportunistes comme la tuberculose ou la salmonellose (I.1). Selon des données de l'OMS, la propension mondiale de personnes étant co-infectées par le VIH et *Mycobacterium tuberculosis* est d'environ 14 millions (Rapport OMS 2011). Actuellement, aucune donnée statistique ne nous permet d'établir clairement la part de co-infection de la forme non invasive de Salmonella et du VIH dans le monde, mais le taux d'incidence annuel est estimé entre 2000 et 7500 cas pour 100 000 adultes infectés par le VIH-1 en Afrique (Feasey et al., 2012). Les Salmonelles et les Mycobactéries partagent quelques caractéristiques communes, elles sont résistantes aux antibiotiques et sont prépondérantes chez les patients infectés par le VIH, plus spécifiquement dans certaines régions de l'Afrique Subsaharienne. Les patients infectés par le VIH-1 dans ces régions, ont permis le développement et la découverte de nouvelles souches émergentes de *Salmonella*

Typhimurium, principalement impliquées dans ces co-infections (pour revue Gordon, 2008; Gordon et al., 2002). Malgré ces quelques facteurs communs, ces deux bactéries diffèrent sur de nombreux critères. *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) et *Salmonella* Typhimurium (ST) sont toutes deux des bactéries intracellulaires, gram-positives et gram-négatives, respectivement. *Mtb* est la bactérie responsable de la tuberculose chez l'homme, alors que ST induit des gastroentérites non létales chez l'homme ou des infections systémiques. La transmission de *Mtb* à l'homme se fait essentiellement par voie aérienne alors que pour ST, la transmission est principalement par voie orale (alimentation). *Mtb* colonise principalement les poumons où il est au contact des macrophages alvéolaires. ST colonise normalement l'intestin, mais lors de l'infection par le VIH, cette bactérie est disséminée dans tout l'organisme, traverse la barrière intestinale, passe dans la circulation systémique et peut ainsi se retrouver au contact de macrophages (Figure 38) (pour revue Gordon et al., 2002; Ibarra and Steele-Mortimer, 2009; Russell, 2001).

Ces deux types d'infections bactériennes se développent rapidement et facilement chez les personnes infectées par le VIH-1 à cause d'un système immunitaire défaillant et affaibli, comme nous avons pu le voir précédemment. La plupart des infections bactériennes sont neutralisées par la fonction des phagocytes comme les macrophages via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la phagocytose. En effet, l'apoptose des macrophages alvéolaires consécutive à une infection bactérienne entraîne une élimination efficace de ces bactéries sous le contrôle de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α (Kornfeld et al., 1999; Russell, 2001). Or des études ont montré que la co-infection, *Mtb*/VIH, dans les macrophages induisait une baisse de la sécrétion de TNF α , qui serait à l'origine de la persistance de *Mtb* chez les patients infectés par le VIH-1 et du développement de la tuberculose. En effet, *in vitro* des macrophages infectés par le VIH-1 et coinfectés par *Mtb* entrent moins en apoptose que des macrophages non infectés par le VIH-1. Ces résultats ont été confortés par la même observation sur des macrophages alvéolaires de patients infectés par le VIH-1 ou non. Le mécanisme d'action par lequel agirait *Mtb* dans les macrophages infectés par le VIH, serait une diminution de cytokines suite à la réduction de la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B (Patel et al., 2007). Si le virus semble agir sur *Mtb*, *Mtb* semble également avoir des effets sur ce dernier. En effet, des expériences de transcriptomique ont mis en évidence une similarité entre le profil d'expression des gènes exprimés lors de la coinfection VIH/*Mtb* et l'infection *Mtb* seule dans les macrophages. Ce qui suggère que la réponse à l'infection par *Mtb* domine celle induite par la réponse au VIH

(Maddocks et al., 2009). D'autres résultats vont dans ce sens. En effet, des expériences réalisées sur des macrophages primaires humains infectés par le VIH-1 et co-infectés par *Mtb* montrent que *Mtb* serait à l'origine d'une inhibition de la réplication virale en affectant la reverse transcription du génome viral dans les macrophages (Goletti et al., 2004) bien que ce dernier résultat soit sujet à controverse (Hoshino et al., 2002). Des résultats obtenus à partir de macrophages de patients atteints de tuberculose et co-infectés par le VIH-1 ont montré que *Mtb* était localisé dans des phagosomes non acides incapables de fusionner avec les lysosomes (Mwandumba et al., 2004). Ce dernier résultat corrobore avec la localisation et la persistance de *Mtb* dans des phagosomes précoces marqués par une absence d'acidification dans les macrophages non infectés (Podinovskaia et al., 2013).

Les études *in vitro* de l'incidence de l'infection par le VIH-1 sur la forme invasive de *Salmonella* dans les macrophages sont moins nombreuses. Il a cependant été mis en évidence que l'infection par une souche émergente de *Salmonella* Typhimurium (ST313) chez des patients infectés par le VIH-1 était responsable de 63% de mortalité contre 13 % chez les patients non infectés (Gordon, 2008 ;Gordon et al., 2007). Par ailleurs, des données transcriptomiques obtenues sur du sang de patients infectés par le VIH-1 et co-infecté par *Salmonella* Typhimurium indiquent une atténuation de gènes impliqués dans l'inflammation (réponse aux interférons, facteur de transcription de la voie NF- κ B) tels que ceux codant pour le complexe NF- κ B. En contre partie, cette analyse montre une régulation plus forte de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN cellulaire et virale (Schreiber et al., 2011). Des résultats antérieurs montrent que dans les macrophages alvéolaires de patients infectés par le VIH-1, et co-infectés avec ST, il y a une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α , IL-12) mais également anti-inflammatoires telles que IL-10 par rapport à des macrophages non infectés par le VIH-1. Cette même étude suggère que la dérégulation de ces cytokines ne serait pas à l'origine d'un défaut d'internalisation et de clairance de la bactérie (Figure 38) (Gordon et al., 2007). Une des explications qui pourrait être à l'origine de la persistance de ces bactéries dans les macrophages infectés par le VIH, serait peut-être un défaut de maturation de sa vacuole par le non recrutement de la pompe v-ATPase, ou bien celle de la NADPH oxydase. Ainsi tous ces résultats soutiennent l'idée que le VIH offre un environnement favorable au développement de ces bactéries chez les patients infectés qui se traduit par un dysfonctionnement multiple, et notamment celui de la clairance bactérienne par la phagocytose.

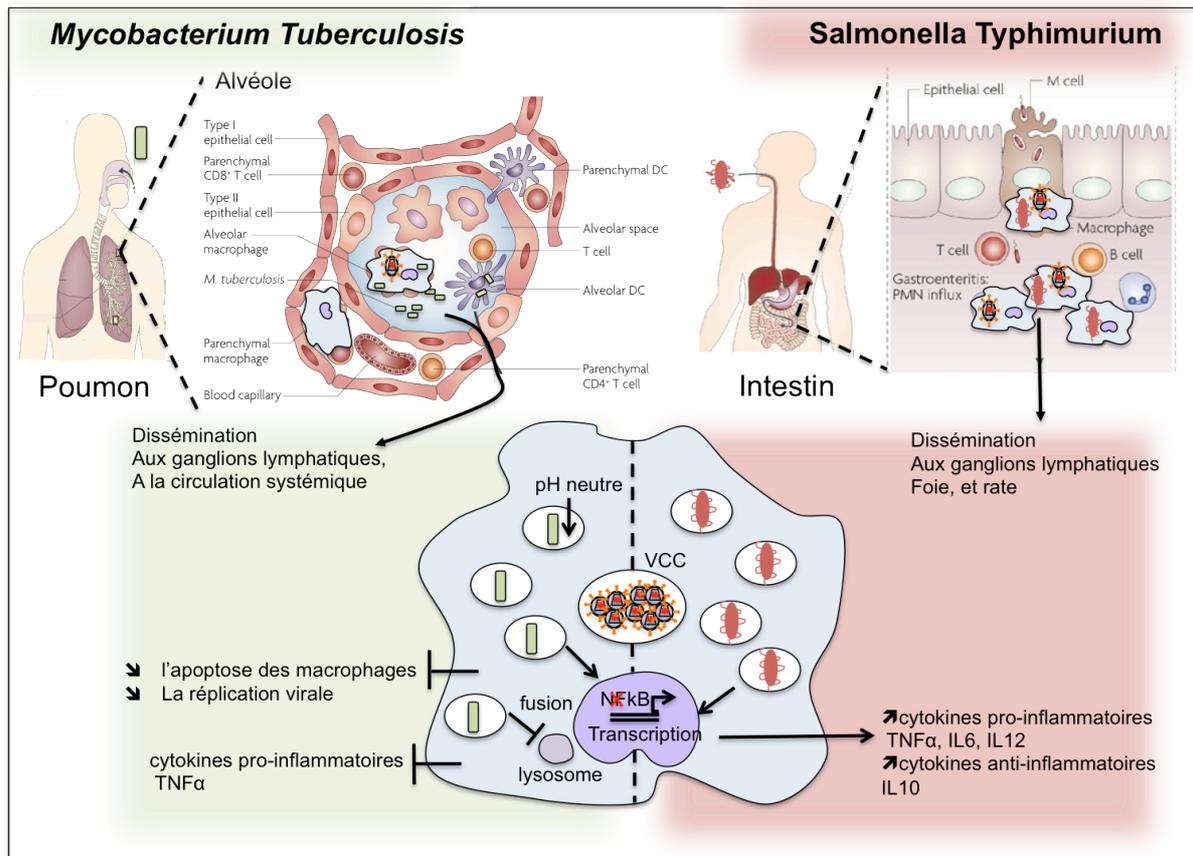


Figure 38. Co-infection VIH-1 et *Mycobacterium Tuberculosis* ou *Salmonella Typhimurium* dans les macrophages. (Inspirée de Griffiths et al., 2010; Haraga et al., 2008)

L'étude des co-infections entre le VIH-1 et les bactéries pathogènes ne permet pas de distinguer l'impact de l'infection virale sur la capacité de survie des bactéries qui ont elles-mêmes des propriétés intracellulaires spécifiques. Pour simplifier les modèles expérimentaux, des expériences ont été réalisées avec des particules inertes ciblant certains récepteurs comme les FcR, les CR3 ou les récepteurs inflammatoires (Dectine, mannose, TLR) via le zymosan. Ces différentes études, y compris celle menée dans notre laboratoire, ont montré *in vitro* que les étapes d'internalisation de la phagocytose des macrophages impliquant ces différents récepteurs étaient inhibées par le VIH-1, sans atténuer l'association des particules aux cellules (Azzam et al., 2006; Kedzierska et al., 2002; Leeansyah et al., 2007; Mazzolini et al., 2010). De façon plus précise, cette inhibition est conséquente à la perturbation du remodelage membranaire nécessaire à une phagocytose efficace, par la protéine Nef. Cette protéine virale en interagissant avec les complexes adaptateurs AP-1 entiers et clivés perturbe l'exocytose focalisée provenant des endosomes tardifs marqués par VAMP3 et TNF α , sans inhiber celle des endosomes tardifs marqués par VAMP7 ainsi que la polymérisation de l'actine à la coupe

phagocytaire (Mazzolini et al., 2010). Il est à noter cependant que l'inhibition de l'internalisation de particules ou bactéries n'est pas totale, et donc la moitié d'entre elles se retrouvent internalisées, sans pour autant être détruites (Biggs et al., 1995; Mazzolini et al., 2010). La phagocytose, de l'internalisation aux étapes de maturation du phagosome, joue un rôle majeur dans le développement de maladies opportunistes. Ainsi les études menées *in vitro* sur les macrophages infectés par le VIH-1 apporteront un nouvel éclairage sur les mécanismes mis en jeu afin de limiter le développement de pathogène dans l'organisme après cette infection virale (Biggs et al., 1995; Crowe et al., 1994; Ludlow et al., 2012; Michailidis et al., 2012).

III. Implication de deux protéines régulatrices du VIH-1 : Nef et Vpr

En infectant les cellules du système immunitaire (L_TCD4^+ , macrophages et cellules dendritiques), le VIH-1 affaiblit considérablement la réponse immunitaire mise en place par les cellules. Le génome de ce virus code pour différentes protéines dites accessoires, Vif, Vpu, Vpr, et Nef. La protéine Nef (Facteur Négatif) est un facteur majeur de virulence du VIH-1, elle est présente abondamment lors des étapes précoces du cycle viral et joue un rôle important dans la pathogénèse du virale (Gorry et al., 2007; O'Neill et al., 2006). Nef perturbe un nombre important d'évènements cellulaires, elle provoque le changement de différents complexes protéiques intracellulaires, modifie l'expression des gènes et des récepteurs de surface, bloque la présentation antigénique ainsi que la transduction de signaux (pour revue Foster and Garcia, 2008; Kirchhoff et al., 2008; Witkowski and Verhasselt, 2013). Par ailleurs, la protéine Vpr est présente à deux moments dans le cycle viral. Elle apparaît précocement dans les virions nouvellement formés (Tungaturthi et al., 2003), mais également *de novo* durant les phases tardives de l'infection (Schwartz et al., 1991). Ceci lui confère un rôle essentiel dans la réplication du virus. Tout comme Nef, Vpr est à l'initiative de modifications intracellulaires agissant sur le cycle cellulaire, l'activité transcriptionnelle du virus et de la cellule, ou encore la motilité de complexes protéiques viraux (pour revue Andersen et al., 2008; Guenzel et al., 2014; Kogan and Rappaport, 2011; Planelles and Benichou, 2009).

III.1. Rôle de Nef dans la pathogénèse du VIH-1

III.1.1. Structure de la protéine Nef

Nef est une protéine dite accessoire de 27 à 29 kDa dans le VIH-1. Elle est produite très rapidement au cours du cycle viral et en grande quantité (Gorry et al., 2007; O'Neill et al., 2006). Sa structure et ses différentes propriétés sont très conservées parmi les lentivirus comme le HIV-1, SIV-1 et SIV-2. En effet, sur un total de 186 souches de virus, issues de cinq sous-types différents, le degré moyen d'identité des séquences de Nef s'élève à 84% (Geyer and Peterlin, 2001). Son étude structurale déterminée par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire et par cristallographie à rayons X a permis de déterminer 4 domaines inhérents à la protéine : un domaine N terminal flexible, myristylé et de taille variable permettant l'ancrage à la membrane, suivi d'une boucle riche en prolines, un domaine core très conservé et une boucle flexible en C terminal. Le domaine riche en prolines est relié au domaine core de la protéine par des interactions hydrophobes (Geyer and Peterlin, 2001). Des études ont également montré que Nef oscillait entre deux conformations lui permettant ainsi d'être exprimée à la membrane ou dans le cytosol de la cellule. La conformation fermée de Nef bloque toutes ses interactions avec les autres protéines, par le repliement de son domaine N et C terminal sur le domaine core. La conformation ouverte au contraire, permet le dépliement de la protéine et expose les domaines de Nef pour d'éventuelles interactions. Des études montrent que le changement de conformation de Nef s'explique par l'attachement de la protéine à la membrane via son site de myristylation (Breuer et al., 2006; Geyer et al., 1999). Par ailleurs, Nef est également capable de s'oligomériser. L'oligomérisation de la protéine la stabilise à la membrane et augmente l'activité de la kinase Hck, avec laquelle elle interagit par son motif poly-proline (PxxP) (Ye et al., 2004). Nef interagit également avec le domaine cytoplasmique du récepteur CD4 par son motif dileucine (LL) (Preusser et al., 2001). Il a été proposé que la dimérisation de Nef est requise pour diminuer l'expression de ce récepteur à la membrane, et agir sur la réplication virale (Figure 34) (Poe and Smithgall, 2009). Tous ces résultats indiquent que la protéine Nef adopte différentes conformations lui permettant d'interagir avec des protéines cellulaires et d'être impliquée dans la pathogénèse du VIH-1.

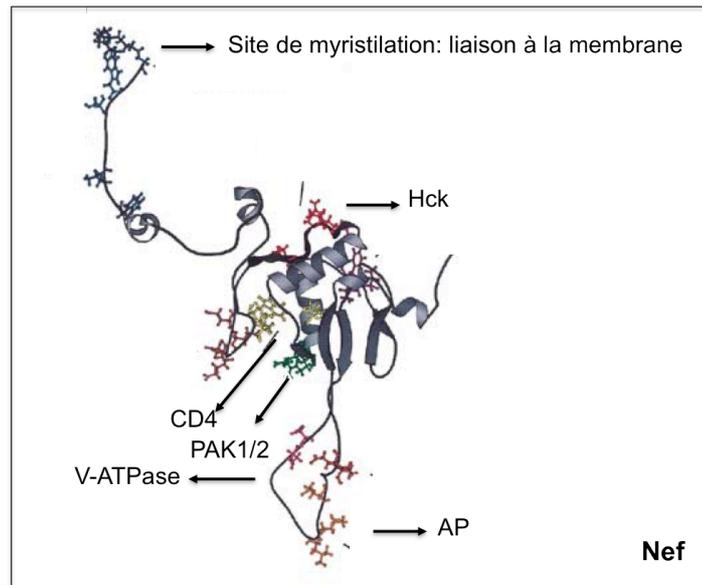


Figure 39. Motifs fonctionnels de la protéine Nef du VIH-1. Nef interagit avec différentes protéines intracellulaires. Les motifs impliqués dans ces interactions sont nombreux et sont indiqués sur la structure tridimensionnelle complète de Nef. Nef interagit avec les protéines AP par ses motifs ENTSSL ou di-aspartiques, les protéines Hck ou Lck par son motif PxxP, la protéine CD4 par son motif LL, les protéines PAK1/2 par son résidu F195, et la v-ATPase par son motif DD ou ED (Inspirée de Benichou and Benmerah, 2003; Geyer et al., 2001)

III.1.2. Nef dans la pathogénèse du SIDA *in vivo*

La portée de Nef dans la pathogénèse du virus du VIH a été mise en évidence chez certains patients en phase asymptomatique prolongée (Long Term Non Progressor, LNTP) peu de temps après avoir découvert son importance chez des macaques infectés par le SIVmac239 (Kestler et al., 1991). Ces patients sont caractérisés par le maintien du nombre de L_TCD4^+ à un niveau stable après avoir été infectés par le VIH-1, retardant ainsi le développement de la maladie menant au stade SIDA. Il a été montré que chez l'un de ces patients, la protéine Nef était mutée et probablement tenue pour responsable de ce phénotype (Kirchhoff et al., 1995). Mais l'évidence la plus marquante de la contribution de Nef dans la pathogénèse réside dans une cohorte de banque de Sang de Sydney (SBBC). Cette cohorte provient de sang de patients atteint par le VIH caractérisés par de faibles symptômes cliniques associés au VIH. Il a été montré que ces patients présentaient tous un gène muté pour *nef*, retardant ainsi l'échéance du stade SIDA (Deacon et al., 1995). Par la suite, des expériences réalisées sur des souris transgéniques exprimant la protéine Nef sous le contrôle du promoteur CD4C ont conforté l'aptitude de la protéine Nef à promouvoir la maladie. En effet, ces souris transgéniques développent une maladie semblable au SIDA avec des symptômes caractéristiques de l'infection par le VIH-1 (Hanna et al., 1998). Tous ces exemples montrent

donc l'importance de Nef dans l'accélération de la progression de la maladie, par sa contribution dans la maintenance d'une charge virale élevée, et la diminution du nombre de L_TCD4^+ .

III.1.3. Nef dans la pathogenèse de l'infection virale *in vitro*

Nef et trafic intracellulaire

Comme toutes les protéines dites accessoires du VIH-1, Nef est une protéine plurifonctionnelle qui intervient au cours de l'infection en modifiant des voies métaboliques, en altérant la signalisation intracellulaire (Figure 40) et le cytosquelette d'actine, essentiels au fonctionnement de la cellule infectée. Ces mécanismes permettent d'optimiser la réplication virale et de limiter les mécanismes de défense de la cellule. Sa capacité à moduler le trafic intracellulaire de protéines membranaire sur les cellules infectées s'avère de loin la plus documentée (pour revue Benichou and Benmerah, 2003; Witkowski and Verhasselt, 2013). En effet, par ses nombreux motifs Nef est capable d'interagir avec les complexes adaptateurs (AP) impliqués dans le trafic de protéines membranaires, comme le DC-SIGN, le CD4, le CMH_I ou le CMH_{II} (pour revue Foster and Garcia, 2008).

Les protéines AP servent de plateformes pour transporter des vésicules à la membrane plasmique (AP-2), au niveau du trans-Golgi et des endosomes (AP-1, AP-3 et AP-4). Il a été montré que les motifs de Nef responsables de sa liaison aux complexes AP sont les motifs ENTSSL ou un motif di-aspartique DD174-175 contenu dans sa région C-terminale (Geyer and Peterlin, 2001; Lindwasser et al., 2008; Mazzolini et al., 2010).

DC SIGN est une protéine membranaire exprimée à la surface des macrophages. Elle est importante dans la formation de la synapse virologique formée par les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Sol-Foulon et al., 2002) et donc probablement dans celle formée par les macrophages et les lymphocytes T ou les macrophages vu précédemment. Nef est responsable de son augmentation à la membrane via l'inhibition de son endocytose. Pour que ce phénomène opère, le motif di-leucine de DC-SIGN interagit avec les motifs acides E160 et di leucine LL164-165 de Nef. L'intégrité de ces motifs est également nécessaire pour que cette protéine puisse interagir avec les complexes AP1 et AP3 et pour les stabiliser à la membrane des endosomes (Coleman et al., 2006).

Nef est également garante de la diminution du récepteur CD4 à la surface des cellules. Ce récepteur est crucial pour l'infection des cellules mais également pour activer les lymphocytes T. Des expériences de siRNA dans un modèle de drosophiles ont montré que la diminution de surface du CD4 était dépendante de la protéine Nef via son motif dileucine et par une

interaction directe avec les protéines AP2 (Aiken et al., 1994; Chaudhuri et al., 2007). Cette inhibition du récepteur CD4 par Nef a également été rapportée dans des macrophages primaires humains (Brown et al., 2004). La diminution des récepteurs CD4 de surface des cellules diminue l'efficacité de la réponse immunitaire et favorise la réplication du virus dans les monocytes en augmentant le pouvoir infectieux de ces virions (Laguette et al., 2009). Par ailleurs, Nef est capable de s'associer avec la v-ATPase. En effet, des expériences d'interaction protéique ont montré que Nef et la sous-unité catalytique de la v-ATPase pouvait interagir, et ainsi contribuer à l'internalisation du récepteur CD4 (Lu et al., 1998). Sachant que Nef interagit avec la v-ATPase, cela pourrait expliquer la persistance de certaines bactéries dans les macrophages enclins à des co-infections.

Nef diminue aussi l'expression de surface dans les macrophages du CMH_I et des molécules de costimulation des lymphocytes T, C80/CD86, indispensables à leur activation et leur survie. Par ce mécanisme, les macrophages sont incapables de stimuler des cellules T naïves. Par ailleurs, ces expériences montrent que Nef interagit avec ces différents récepteurs et les relocalise dans des compartiments Rab11 positifs proche de l'appareil de Golgi (Chaudhry et al., 2005; Chaudhry et al., 2008). Nef interagit également avec le CMH_{II} et diminue son expression de surface à la membrane. Cette stratégie lui permet d'empêcher la présentation de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigène. En effet, des expériences réalisées sur des lignées de monocytes, humains ou de souris, transfectés pour exprimer la protéine Nef, indiquent une diminution de l'expression de surface du CMH_{II}. Ce résultat est aussi observable après l'infection de monocytes humains par le virus du VIH-1 complet en comparaison de l'infection par le virus du VIH-1 dépourvu de la protéine Nef. D'après des expériences de cytométrie de flux et de microscopie, le CMH_{II} semble être relocalisé dans des compartiments lysosomaux (Chaudhry et al., 2007).

Enfin, Nef interagit avec des régulateurs de l'autophagie, telle que la Becline 1, dans les macrophages. Cette interaction permet au VIH-1 de contrôler les flux d'autophagie des cellules et de réguler le rendement de la production virale. L'utilisation d'un mutant de Nef pour son domaine dileucine montre que ce motif est en partie responsable de ce mécanisme (Kyei et al., 2009)

Toutes ces expériences suggèrent que Nef est donc capable d'interagir avec des protéines de surface et intracellulaires du macrophage impliquées dans la voie d'endocytose pour favoriser la réplication du virus et l'inactivation des cellules lymphocytaires.

Nef et signalisation

La protéine Nef est également capable d'activer ou de s'associer avec des protéines de la signalisation intracellulaire pour augmenter la réplication virale (Herbein et al., 2010; Herbein et al., 2008; Varin et al., 2003). En effet, des expériences réalisées dans une lignée de monocytes montre que Nef exogène est capable d'activer le complexe NF- κ B, en dégradant la protéine I κ B. De manière plus spécifique Nef exogène active les régions LTR du VIH après une stimulation par NF- κ B, ce qui augmente la réplication virale (Varin et al., 2003). Par ailleurs, l'activation du complexe NF- κ B par la forme myristylée de Nef induit la production d'INF β dans les macrophages primaires humains (Mangino et al., 2007).

Des expériences de cinétique réalisées dans des macrophages primaires humains indiquent que la protéine recombinante de Nef est capable d'activer rapidement la phosphorylation de trois MAPK importantes impliquées dans la survie cellulaire : Erk1/2, p38 et JNK (Mangino et al., 2007). L'analyse transcriptionnelle de macrophages primaires humains traités avec la protéine recombinante Nef expose un profil de cytokines pro-inflammatoire élevé. En effet, Nef est responsable de l'augmentation de production du TNF α , de IL-6, de MIP-1 α et MIP-1 β (Olivetta et al., 2003). Ces différentes expériences indiquent que Nef détourne également des protéines de la signalisation intracellulaires pour permettre au VIH-1 de se répliquer (Figure 40).

Nef et cytosquelette d'actine et de microtubules

Enfin, la protéine Nef est impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine et dans une moindre mesure de celui des microtubules. En effet, le virus doit détourner la barrière physique que représente le cytosquelette dans la cellule hôte. De même la mobilité des particules virales est facilitée dans la cellule ces structures intracellulaires. Ces stratégies lui permettent le transport intracellulaire, la libération des virions par contact direct ou indirect avec les cellules (pour revue Fackler and Krausslich, 2006; Stolp and Fackler, 2011). Actuellement peu de données ont été obtenues dans les macrophages. Cependant, il a été montré que l'expression de Nef dans des cellules Hela dépolymérisait le cytosquelette d'actine (Campbell et al., 2004). La protéine Nef s'associe et active les protéines de la famille PAK dans les lymphocytes T. Ces protéines sont des serines/threonines kinases connues pour être impliquées dans le réarrangement du cytosquelette d'actine. Sous l'effet de Nef, elles contrôlent la phosphorylation de la cofiline et la migration des lymphocytes T (Stolp et al., 2009). Par ailleurs, Nef affecte la formation des synapses immunologiques formées par le contact des cellules dendritiques avec les lymphocytes T, en interagissant avec de nombreuses

protéines impliquées dans la dynamique du cytosquelette, comme Vav qui est une GEF des petites protéines G. Cette perturbation implique une baisse du recrutement des récepteurs T (TCR) probablement lié à un défaut du cytosquelette (Fackler et al., 1999; Fenard et al., 2005; Haller et al., 2006; Thoulouze et al., 2006). Enfin, des expériences indiquent que Nef est capable d'accumuler la protéine Lck dans des compartiments intracellulaires afin d'empêcher son recrutement à la synapse immunologique et l'activation des lymphocytes T. La liaison de Nef par son motif PxxP avec le domaine SH3 de Lck provoque l'accumulation de cette protéine kinase au sein de compartiments intracellulaires. Cet effet de Nef est dépendant de l'intégrité du réseau de microtubules (Haller et al., 2007). Ces différents résultats sont en faveur d'une contribution du cytosquelette d'actine et en moindre mesure celui des microtubules pour la formation de synapse virologique et la migration cellulaire (Figure 40).

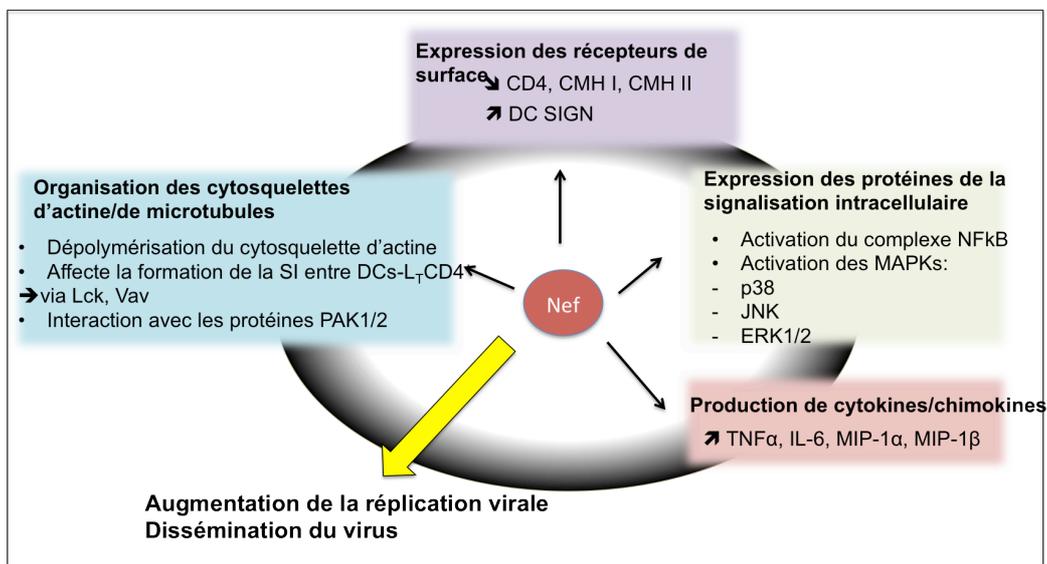


Figure 40. Rôles de Nef dans la pathogenèse de l'infection virale *in vitro*. Nef est une protéine multifonctionnelle, qui agit sur toutes les fonctions de la cellule via ses interactions intracellulaires. Par ce mécanisme, la protéine Nef permet l'augmentation de la réplication du virus et sa dissémination aux cellules environnantes.

III.2. Rôle de Vpr dans la pathogenèse de l'infection virale

III.2.1. Structure de la protéine Vpr

Vpr est une protéine accessoire et de régulation du cycle viral de 14 kDa. Cette protéine virale est très conservée parmi les lentivirus. Elle est présente à deux instants précis dans le cycle viral. Elle apparaît précocement dans les virions nouvellement formés via son interaction avec la protéine p6, précurseurs de Gag. Elle est donc présente dans le cytoplasme

des cellules nouvellement infectées (Tungaturthi et al., 2003). Par ailleurs, elle apparaît également durant la phase tardive de l'infection. En effet, Vpr est exprimée *de novo* par le virus, à partir de l'ARN messager tardif (Schwartz et al., 1991). Des études de spectroscopie à résonance magnétique nucléaire nous apprennent que Vpr est structurée par une boucle flexible riche en arginines et chargée positivement en C terminal, d'un core hydrophobe entouré de 3 hélices α et d'une boucle en N terminal également très flexible et chargée négativement (Figure 41) (Morellet et al., 2003). Contrairement à Nef, Vpr ne possède pas de site d'ancrage à la membrane. Cependant des études de liaison à l'ADN et de perméabilisation, montrent que le domaine C terminal riche en arginines est capable de déstabiliser les membranes, ce qui pourrait expliquer l'aptitude de cette protéine à traverser la bicouche lipidique des membranes (Coeytaux et al., 2003). Des études de biochimie et de spectroscopie à résonance magnétique indiquent que la troisième hélice α de Vpr est riche en leucines et présente un site hydrophobe, sûrement responsable de l'oligomérisation de la protéine ainsi que de sa liaison à des protéines intracellulaires (Bolton and Lenardo, 2007; Schuler et al., 1999; Wang et al., 1996). Des mutations de Vpr affectant son oligomérisation empêchent l'apoptose des cellules induites par Vpr (Stewart et al., 1997). Ces résultats suggèrent que, de façon analogue à la protéine Nef, Vpr possède différents motifs dans sa structure responsables de sa liaison à des protéines intracellulaires et pouvant ainsi contribuer à la pathogénèse du VIH-1.

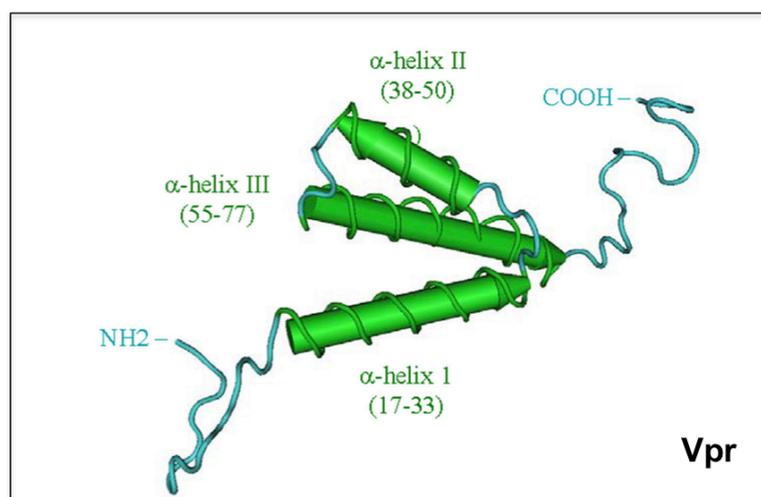


Figure 41. Structure tridimensionnelle de la protéine Vpr du VIH-1. La protéine Vpr est composée d'un « core » formé de trois hélices α , encadré par deux boucles flexibles en N et C terminal. Les trois hélices α (17-33, 38-50 et 55-77) sont de couleur verte. Les boucles et les domaines flexibles de la protéine Vpr sont bleus (D'après Guenzel et al., 2014).

III.2.2. Vpr dans la pathogénèse du SIDA *in vivo*

Contrairement à Nef qui est explicitement impliquée dans la pathologie du SIDA, la contribution de Vpr est moins évidente *in vivo*. Cependant certaines études montrent que cette protéine contribuerait à la pathologie de l'infection du VIH-1. D'une part, de premières études réalisées sur les singes macaques infectés par le SIVmac suggèrent que l'absence du gène *vpr* ou des mutations de ce dernier témoigneraient d'une diminution de la réplication du virus et d'un retard dans la progression de la maladie (Gibbs et al., 1995; Lang et al., 1993). D'autre part, des études plus récentes sur les LNTP ont montré que certains de ces patients possédaient des mutations de Vpr pouvant expliquer sa contribution dans la pathogénèse. En effet, ils sont caractérisés par une forte virémie mais pas de baisse significative du taux de lymphocytes L_TCD4^+ . L'isolation des souches virales du VIH les ayant infectés a montré une mutation du virus dans la partie N terminal du gène Vpr (Q3R) (Somasundaran et al., 2002). De plus, des études ont montré sur une autre cohorte de patients LNTP que le virus VIH-1 présentait également une mutation localisée dans la partie C terminal de Vpr (R77Q). Cette mutation est présente dans 80% de leur cohorte (Lum et al., 2003). De façon intéressante, ces deux mutants de Vpr induisent un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose des cellules de façon moins efficace que la protéine Vpr complète.

Ainsi ces différentes expériences suggèrent l'implication de la protéine Vpr dans la progression de la maladie qui semble contribuer à la hausse de la cytotoxicité et à l'augmentation de la réplication virale.

III.2.3. Vpr dans la pathogénèse de l'infection virale *in vitro*

Contrairement à son implication directe dans la pathogénèse menant au stade SIDA *in vivo*, la plurifonctionnalité de Vpr dans la pathogénèse de l'infection virale *in vitro* est beaucoup plus renseignée. Tout comme la protéine Nef, Vpr est impliquée dans de nombreuses fonctionnalités de la cellule contribuant à la réplication efficace du virus et à sa transmission.

La protéine Vpr joue un rôle critique lors de l'infection des lymphocytes T (cellules qui se divisent) mais elle joue également un rôle notable dans l'infection des macrophages (« cellules qui ne se divisent pas ») (Balliet et al., 1994; Balotta et al., 1993). Vpr est impliquée dans l'import nucléaire du complexe de pré-intégration (PIC), l'activation de longues répétitions terminales identiques (LTR) du VIH, l'induction de l'arrêt du cycle

cellulaire en phase G2 et l'apoptose des lymphocytes infectés. Tout ceci nécessite une coordination de Vpr avec les protéines intracellulaires et de la signalisation pour mener à bien le détournement de la machinerie cellulaire à son profit (pour revue Andersen et al., 2008; Herbein et al., 2010; Naghavi and Goff, 2007; Planelles and Benichou, 2009; Stolp and Fackler, 2011

Vpr et import nucléaire du PIC

L'importation du PIC au noyau est essentielle au virus pour permettre sa réplication. Cette importation est régie en partie par la protéine Vpr (Figure 42). L'importation de ce complexe tient au fait que Vpr interagit avec l'importine α (Kamata et al., 2005; Popov et al., 1998; Vodicka et al., 1998) pour accéder au noyau et qu'elle interagit avec des complexes du pore nucléaire comme la nucléoporeine CG1 (Le Rouzic et al., 2002). Des expériences de microscopie à fluorescence ont montré que Vpr était localisée à la membrane du noyau dans les macrophages, et que Vpr contribuait à augmenter la production virale. Des mutations dans la première hélice α de Vpr la rendant incapable de s'associer à l'importine α induisent une relocalisation de Vpr dans le cytoplasme et une diminution de la réplication virale (Jacquot et al., 2007). Ce mécanisme de transit de Vpr du cytoplasme au noyau suggère l'implication des microtubules, mais les expériences visant à mettre en relation Vpr et le réseau de microtubules ne sont que faiblement renseignées. Seules deux publications pourraient suggérer d'un tel lien. Des expériences de vidéomicroscopie réalisées dans des cellules humaines exprimant les récepteurs CD4 et le CCR5 indiquent que la protéine Vpr colocalise partiellement avec la tubuline et que l'inhibition des dynéines entraînent une relocalisation de Vpr en périphérie de l'enveloppe nucléaire (McDonald et al., 2002). Ces résultats vont dans le même sens que ceux publiés récemment, montrant que la dépolymérisation des microtubules entraîne une réduction de l'infection. De plus, l'inhibition de la kinésine Kif4A entraîne une réduction de l'infection précoce du VIH, soit de la production d'ADN viral (Sabo et al., 2013). Ces résultats suggèrent que la protéine Vpr pourrait se servir des microtubules pour permettre au complexe de préintégration d'atteindre le noyau et donc d'induire une réplication efficace du virus, mais aucune évidence claire n'est véritablement établie entre la protéine Vpr et le cytosquelette de la cellule.

Vpr et cycle cellulaire

Par ailleurs, Vpr inhibe le cycle cellulaire en phase G2 dans les cellules qui se divisent (Figure 42) (He et al., 1995; Subbramanian et al., 1998 ; Re et al., 1995).

A l'heure actuelle, cette caractéristique de Vpr n'est attribuée qu'aux lymphocytes T, cellules qui se divisent. Cependant étant donnée la découverte de macrophages qui se divisent localement dans certains tissus (Jenkins et al., 2011; Molawi and Sieweke, 2013), malgré le fait qu'ils aient atteint leur différenciation finale, ce dogme de l'inhibition du cycle cellulaire par Vpr pourrait être étendu et caractérisé dans les macrophages. L'arrêt en phase G2/M des cellules est contrôlé par des protéines kinase dépendantes de cyclines (CDK). Les CDK sont présentes sous deux configurations : actives si elles sont liées à une cycline, et inactives si elles sont phosphorylées sur un site d'inhibition. La transition G2/M est régulée par le complexe CDK p34^{cdc2} et la cycline B (Morgan, 1995). Des expériences de biologie moléculaire réalisées dans des cellules Hela indiquent que la protéine Vpr est responsable de l'augmentation de la phosphorylation de p34^{cdc2}. Cette phosphorylation rend cette kinase inactive ce qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (He et al., 1995; Re et al., 1995). L'inactivation de ce complexe par Vpr n'est pas direct, mais Vpr interagit avec des protéines en amont de ce dernier comme la protéine 14-3-3 dans une expérience de double hybride (Kino et al., 2005) ou Cd25 (Goh et al., 2004), toutes deux responsables de la poursuite du cycle cellulaire en l'absence de Vpr. L'arrêt du cycle en phase G2/M est également attribué à la capacité de Vpr à s'associer à un complexe protéique composé de DCAF1/VprB, et d'un complexe E3 ligase, formé par DDB1 et Cul4, qui est responsable de la polyubiquitination et de la dégradation de protéines (Le Rouzic et al., 2008). Des approches d'interférence ARN et de purification de la protéine VprB indiquent que cette protéine est essentielle à l'arrêt du cycle G2/M induite par Vpr (Belzile et al., 2007) via le recrutement de VprB par la protéine SLX4 (Laguette et al., 2014). Cette dernière cible pourrait expliquer la résistance des macrophages à l'apoptose. Des expériences de RT PCR ont montré une corrélation entre l'arrêt en phase G2/M du cycle cellulaire par Vpr et l'augmentation de réplication de l'ADN viral (Subbramanian et al., 1998).

Ainsi, ces données suggèrent que la protéine Vpr détourne le cycle cellulaire ou active des complexes protéiques impliqués dans la dégradation de protéines pour permettre une meilleure réplication virale.

Vpr et apoptose

L'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 est suivi par l'apoptose de certaines cellules infectées via la protéine Vpr, comme les lymphocytes T (Figure 42). En effet, l'apoptose de ces cellules est consécutive à l'interaction de Vpr avec la porine VDAC (« voltage-dependant anion channel ») et la protéine ANT (« Adenosine Nucleotide Translocase »), responsable de la

perméabilité de la membrane des mitochondries. Ces interactions ouvrent les pores des mitochondries provoquant ainsi leur gonflement, le relargage de cytochrome C et l'activation des caspases 9 et 3 (Jacotot et al., 2001). La protéine p53 pourrait également être impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose de certaines cellules (Moon and Yang, 2006; Sawaya et al., 1998). Contrairement à son effet dans les lymphocytes T, Vpr n'induit pas l'apoptose des macrophages. Des expériences indiquent que dans les macrophages, Vpr n'induit pas la baisse de protéines anti-apoptotiques comme les IAP (« antiapoptotique inhibitors of apoptosis ») ou Bcl2 ce qui expliquerait en partie leur résistance à l'apoptose (Busca et al., 2012), et favoriserait la réplication virale et donc le maintien du réservoir viral dans les macrophages.

Ces différentes données indiquent que les cellules qui se divisent comme les lymphocytes T sont sujettes à l'apoptose suite à un arrêt du cycle cellulaire, contrairement aux cellules qui ne se divisent pas comme les macrophages. Ainsi, en agissant sur les protéines pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques, la protéine Vpr entraîne un affaiblissement de la réponse immunitaire par la baisse du taux de L_TCD4^+ et une augmentation de la réplication virale dans les macrophages.

Vpr et signalisation intracellulaire

Enfin, Vpr induit l'activation du promoteur viral en agissant sur les LTR du VIH-1 ce qui résulte en l'augmentation de la réplication virale (Figure 42). L'arrêt du cycle cellulaire en G2 est également concomitant avec la réplication virale dans les lymphocytes T primaires.

L'interaction de Vpr avec les facteurs de transcription Sp1 et TFIIB est nécessaire pour initier la transcription via les LTR du génome viral dans les lymphocytes et les macrophages (Gummuluru and Emerman, 1999; Sweet et al., 1998; Wang et al., 1995). L'activation des régions LTR du VIH par Vpr nécessite des sites de liaison aux facteurs de transcription (NF- κ B, Sp1, la boîte TATA, TAR (« tat responsive RNA responsive element ») (McAllister et al., 2000; Wang et al., 1995) et dépend de l'aptitude de Vpr à stimuler et interagir avec les co-activateurs p300/CBP. Ceci induit une interaction coopérative entre la protéine p65/RelA de NF κ B et le complexe CyclineB/p34^{cdc2} (Felzien et al., 1998). Ces résultats suggèrent que Vpr n'agit pas seul sur les régions LTR du VIH-1 mais par l'intermédiaire du recrutement de cofacteurs (Agostini et al., 1996) Par ailleurs, les interactions de Vpr et Tat sont nécessaires pour promouvoir l'activité transcriptionnelle des LTR du VIH-1 (Sawaya et al., 2000). Des expériences réalisées dans les macrophages ont permis de montrer l'importance de l'activation des régions LTR du VIH pour la réplication virale. La transfection de la protéine

recombinante de Vpr dans les macrophages primaires suggère que cette dernière permet l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B. Ces deux protéines se lient aux régions LTR du VIH, les auteurs montrent que Vpr stimule la réplication virale via les régions LTR du VIH (Varin et al., 2005). La réduction de la production de p24 observée dans des macrophages infectés par le VIH-1 dépourvu de la protéine Vpr peut être restaurée par l'addition de la protéine recombinante Vpr dans le milieu de culture (Eckstein et al., 2001). Ainsi en stimulant les régions LTR du VIH par le recrutement et l'activation de complexes protéiques, Vpr est à l'initiative de la réplication du virus dans les macrophages. De par ces différents mécanismes transcriptionnels, Vpr a également un effet important sur des fonctions cellulaires du macrophage comme la diminution de l'expression de surface des molécules de co-stimulation des lymphocytes T, CD80/CD86 ce qui limite sa fonction de présentation d'antigène (Muthumani et al., 2005). De façon similaire, Vpr entraîne une baisse de la production des chimokines RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β dans les macrophages (Muthumani et al., 2000). Le mécanisme n'est pas expliqué mais on pourrait imaginer que Vpr module la production de cytokines en interférant avec le complexe NF- κ B.

Ces différents résultats témoignent de l'importance de Vpr pour la réplication virale dans les macrophages et de son rôle létal pour les lymphocytes T (Figure 42) mais très peu de données nous informent actuellement de son action sur le trafic de compartiments intracellulaires et le cytosquelette de la cellule dont la désorganisation par Nef est beaucoup plus renseignée.

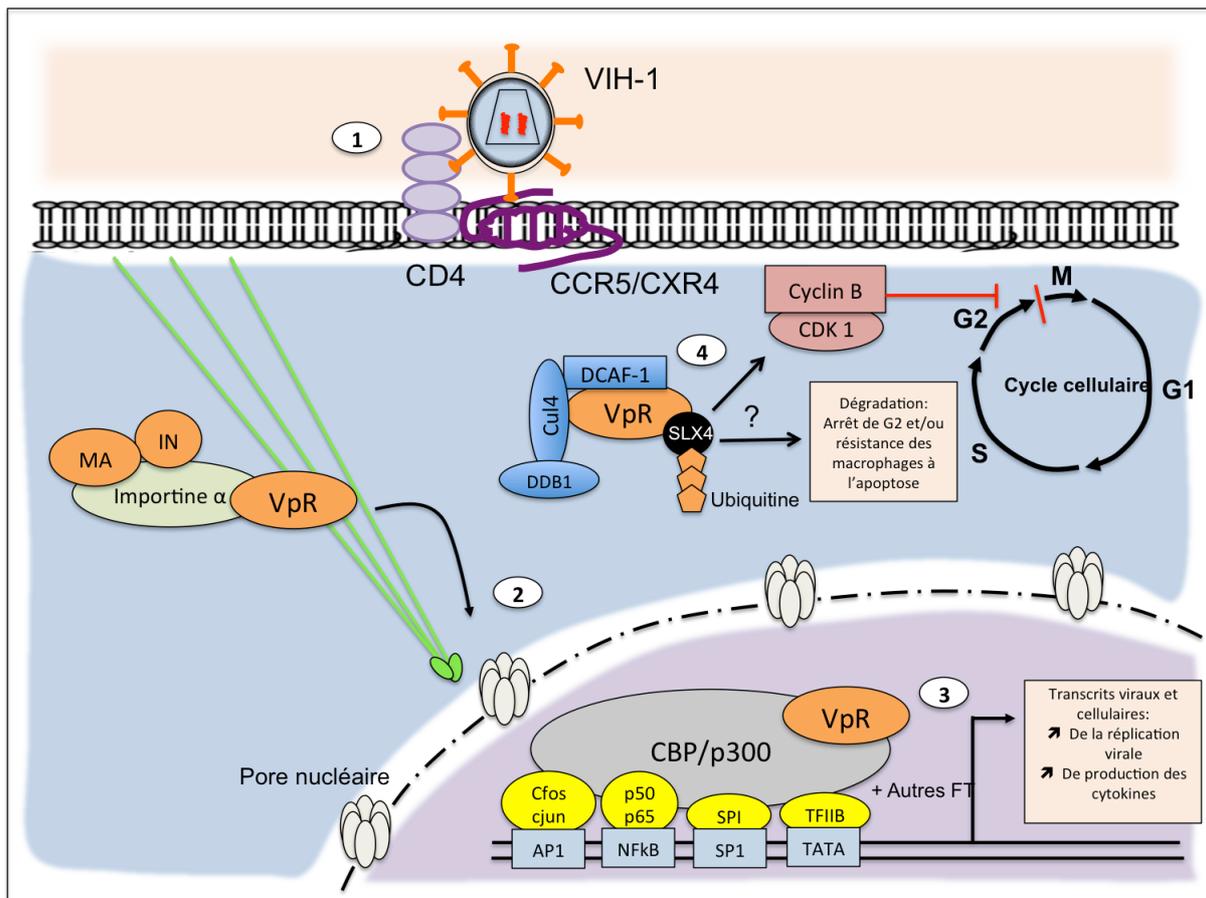


Figure 42. Rôle de Vpr dans les cellules lymphoïdes et myéloïdes. 1. Le VIH-1 entre dans les cellules par reconnaissance des récepteurs CD4 et des co-récepteurs CCR5 ou CXCR4. L'entrée du virus dans les cellules induit le désassemblage de la capside qui libère le matériel génétique et les protéines virales. 2. Vpr permet la liaison du PIC (Matrice (MA), IN (intégrase), ADN proviral à l'importine α et aux nucléoprines, ce qui facilite l'entrée du provirus dans le noyau des macrophages. Ce transit se fait vraisemblablement sous le contrôle des microtubules. 3. Vpr lie le co-activateur CBP (complexe de liaison aux facteurs de transcription)/p300, qui permet le recrutement de nombreux facteurs de transcription comme Sp1 ou NF- κ B. Ces derniers se lient sur les éléments de réponse situés sur le promoteur. Ceci permet l'augmentation de la production du virus et de gènes cellulaires impliqués dans la résistance des macrophages à l'apoptose. 4. Vpr induit également l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 dans les cellules qui se divisent, ce qui augmente la réplication virale. De façon intéressante, les propriétés biochimiques qui contribuent à cet effet sont importantes pour la réplication du virus dans les cellules qui ne se divisent pas. Ces propriétés sont dépendantes entre autre du recrutement de la protéine SLX4 par Vpr via une interaction avec le complexe ubiquitine ligase Cul4A- DDB1, et DCAF-1. Ainsi les facteurs impliqués dans l'arrêt de la phase G2 et l'inhibition de l'apoptose pourraient être similaires ou différents (Inspirée de Kogan and Rappaport, 2011).

En résumé de cette seconde partie, les patients infectés par le VIH-1 sont sujets au développement de maladies opportunistes par des co-infections avec des bactéries telles que *M. tuberculosis* ou *Salmonella Typhimurium*. Ces co-infections accélèrent la mort des patients infectés par le VIH-1, via la persistance des bactéries dans l'organisme. Ce virus prend pour cible les lymphocytes T, les cellules dendritiques mais également les macrophages. Des études ont montré que le VIH-1 perturbait l'organisation du cytosquelette d'actine, le trafic et la signalisation intracellulaire. Ces perturbations sont essentiellement dépendantes de la protéine virale Nef, impliquée dans la pathogénèse. Ce facteur de virulence du VIH-1 interagit avec de nombreuses protéines intracellulaires pour perturber les voies de signalisation, le trafic membranaire et intracellulaire en utilisant le réseau ou les protéines associées au cytosquelette d'actine. Ces perturbations permettent au virus d'échapper au système immunitaire, favorisant ainsi sa réplication et sa dissémination dans tout l'organisme. Ainsi, face à la persistance intracellulaire de pathogènes dans les macrophages et suite aux résultats du laboratoire montrant le rôle de Nef dans l'inhibition de l'étape d'entrée de la phagocytose, il était légitime d'étudier de façon détaillée l'effet de l'infection par le VIH-1 sur l'activation et les étapes tardives de la phagocytose, ainsi que la contribution de protéines virales tels que Nef.

Objectif

Les macrophages, cellules du système immunitaire issues de la différenciation tissulaire des monocytes circulants, jouent un rôle crucial dans la préservation de l'intégrité de l'organisme. A l'interface entre l'immunité innée et adaptative, ils représentent une niche pour les pathogènes intracellulaires. Ces phagocytes professionnels ont pour rôle premier de détruire les pathogènes ingérés par le mécanisme de phagocytose. Ce mécanisme se décompose en deux étapes : l'étape précoce d'internalisation, et les étapes tardives de maturation du phagosome menant à la destruction du pathogène. De façon concomitante à la phagocytose, les macrophages activés par leurs récepteurs de surface induisent une cascade de signalisation participant à la réponse inflammatoire. Par ailleurs, les macrophages représentent une cible importante pour le VIH-1. Par leur susceptibilité à l'infection permettant une réplication virale productive, et leur résistance aux effets cytotoxiques, ces cellules participent à la dissémination virale dans l'organisme, ainsi qu'à l'établissement de réservoirs viraux persistants et au développement de maladies bactériennes et fongiques opportunistes. Les macrophages infectés par le VIH-1 présentent des propriétés de phagocytose et d'activation altérées.

Des travaux antérieurs, au laboratoire, ont permis de montrer que le facteur de virulence majeur du VIH-1 Nef, dans le contexte d'une infection virale, joue un rôle majeur dans le développement de ces altérations fonctionnelles. Le virus du VIH-1, par le biais de la protéine Nef, inhibe l'étape précoce d'internalisation de la phagocytose de 50 % par sa capacité à perturber le trafic vésiculaire (Mazzolini et al., 2010).

Compte tenu du fait que l'infection par le VIH-1 était à l'origine d'une inhibition partielle de la phagocytose, mon travail de thèse a constitué à étudier le devenir des particules ayant la capacité d'être internalisée dans les macrophages infectés par le VIH-1.

Ainsi, dans ce contexte, j'ai eu pour objectif d'une part, de caractériser les effets de l'infection virale par le VIH-1 sur : i) les étapes tardives de la phagocytose, ie les fonctions de clairance du macrophage résultant de la maturation du phagosome et ii) l'activation qui en découle. Par ailleurs, il s'agissait de déterminer les protéines virales et les mécanismes cellulaires associés à ces processus (Figure 43).

Ce travail a fait l'objet de l'écriture d'une publication soumise en Aout 2014.

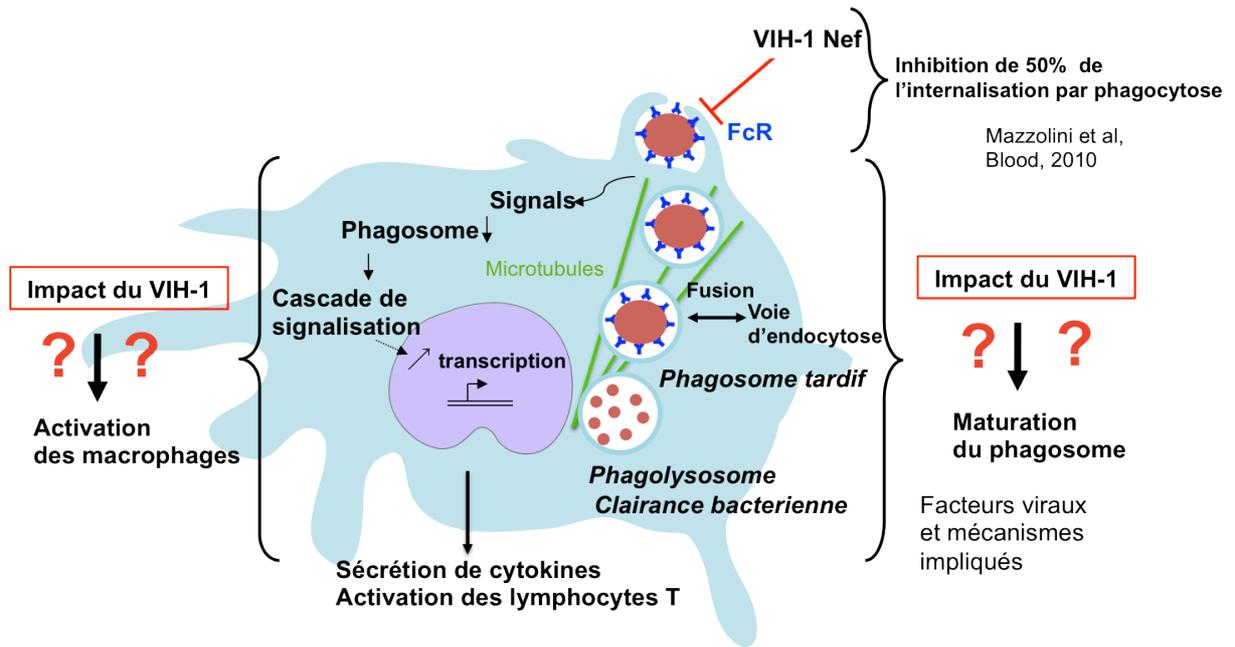


Figure 43 Résumé des objectifs de la thèse.

Résultats

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à des travaux portant sur les mécanismes d'internalisation des cellules dendritiques (Le Roux et al., 2012) et l'étude de différentes souches de *S. Typhimurium* dans les macrophages (Deschamps, en cours d'écriture) que je ne présenterai pas ici. Dans cette troisième partie, je me focaliserai sur mes principaux résultats qui font actuellement l'objet d'un manuscrit soumis pour publication, auxquels j'ai ajouté des résultats annexes ne figurant pas dans le manuscrit soumis.

Inhibition de la maturation du phagosome dans les macrophages par la protéine virale Vpr

L'infection par le VIH-1 affecte les fonctions du macrophage *in vivo* et *in vitro*, ce qui contribue au développement de maladies opportunistes. Les macrophages de patients infectés par le VIH-1 et les macrophages dérivés de monocytes *in vitro* ont une activité de phagocytose inhibée (Collman et al., 2003; Kedzierska and Crowe, 2002). Des résultats antérieurs au laboratoire ont montré que le facteur de virulence du VIH-1, Nef, inhibe l'étape précoce d'internalisation de la phagocytose de 50 % en empêchant le recrutement de compartiments intracellulaires nécessaires à la formation d'une coupe phagocytaire efficace (Mazzolini et al., 2010).

Comme l'internalisation par phagocytose de diverses cibles n'était que partiellement inhibée par le VIH-1 dans les macrophages, mon projet de thèse a consisté à étudier et caractériser les étapes tardives de la phagocytose, l'activation qu'il en résulte ainsi que les protéines virales impliquées dans ce mécanisme.

I. Résumé des principaux résultats

I.1. Altération de la maturation du phagosome par le VIH-1

Afin d'initier cette étude, nous avons suivi le recrutement de marqueurs précoces et tardifs de la maturation du phagosome, EEA1 et LAMP1, respectivement, dans les macrophages infectés. Pour ce faire, nous avons évalué par microscopie à fluorescence

l'absence ou la présence de ces deux protéines sur les phagosomes en établissant un code reposant sur la formation d'un anneau quasi uniforme et fermé de ces marqueurs. L'infection par le VIH-1 des macrophages primaires humains induit une baisse du recrutement de LAMP1 sur les phagosomes de 24 à 64 % après 20 min et 1 h de phagocytose en comparaison des cellules non infectées, mais n'affecte pas le recrutement de EEA1 (Figure 1 Article). Cette inhibition n'est pas liée à un défaut d'expression de la protéine dans les macrophages infectés, puisque la quantification du niveau d'expression de LAMP1 par Western Blot nous apprend que son expression est identique voir supérieure dans les cellules infectées en comparaison des cellules non infectées (Figures 44A et B). De manière intéressante, ce résultat est également observable après 1 h de phagocytose induite par un autre récepteur aux opsonines, le récepteur CR3 (Figure 44C).

De plus, nous avons observé une diminution de l'activité hydrolytique et de la production d'espèces réactives oxygénées après 3 heures de phagocytose dans les macrophages infectés par le VIH-1 en comparaison des macrophages non infectés (Figures 2 C-D Article). L'obtention de ce résultat a été rendue possible grâce à l'utilisation de billes de silicate opsonisées par des IgG, couplées à deux fluorochromes, et sensibles à la présence d'hydrolases ou d'espèce réactives oxygénées dans le phagosome (Figures 2 A-B Article). L'altération de la maturation du phagosome observée dans les macrophages primaires humains infectés par le VIH-1 est confortée par un défaut de clairance bactérienne. Des expériences de survies (test à la gentamicine) de bactéries invasives comme *Salmonella* Typhimurium ou commensales comme *E. coli*, montrent une atténuation de leur clairance après 24 h d'internalisation (Figures 2 E-F Article). Ce résultat a été surprenant, car contrairement à *Salmonella* Typhimurium qui est une bactérie pathogène connue pour être invasive via son appareil de sécrétion de type III, et pour survivre dans les macrophages en changeant son programme d'expression de gènes, la bactérie *E. coli* ne dispose pas d'un tel programme de survie intracellulaire. Un dernier résultat apporté par des expériences de localisation subcellulaire du virus et des phagosomes indique que les différentes perturbations observées sont propres au compartiment phagocytaire qui semble être distinct de celui du virus (VCC) (Figure 2G Article).

A la lumière de ces premiers résultats, le VIH-1 altère les étapes tardives de maturation du phagosome, ce qui aboutit à un défaut de clairance bactérienne par les macrophages.

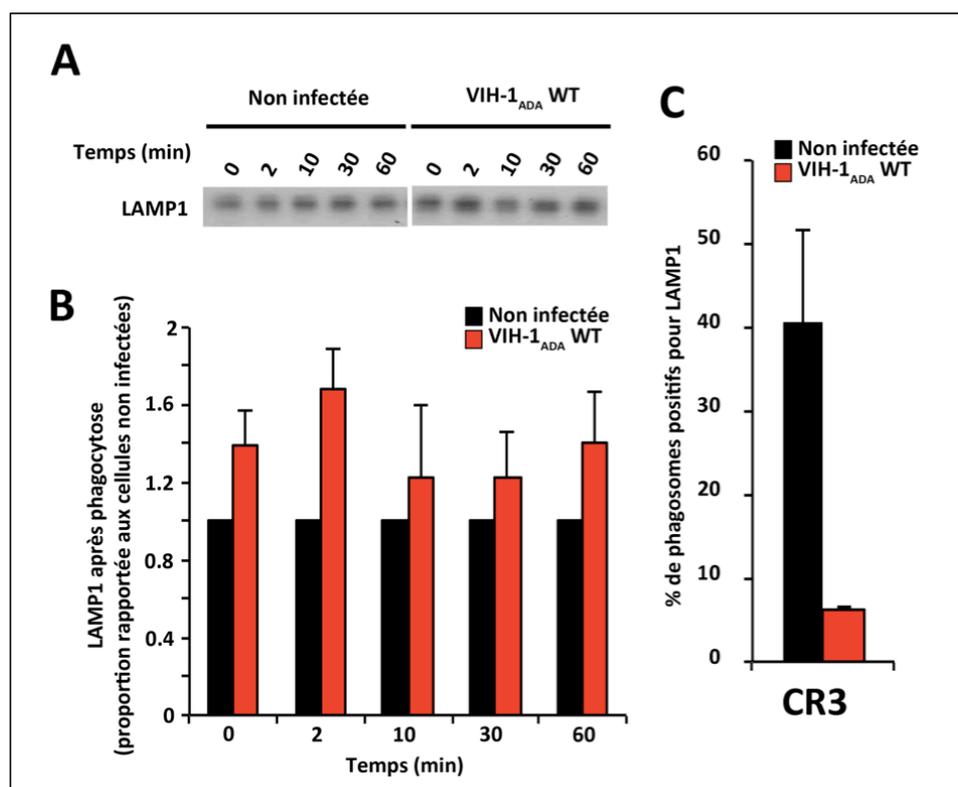


Figure 44 Expression globale et recrutement de LAMP1 sur les phagosomes dans les macrophages infectés et non infectés. Les macrophages primaires humains ont été infectés (barres rouges) ou non (barres noires) pendant 8 jours avec le virus du VIH-1_{ADA} WT avant d'être incubés avec des globules rouges opsonisés par des IgG (A-B) ou des IgM + complément à différents temps (C). A-B Le lysat total des macrophages a été analysé par Western Blot avec un anti-LAMP1. Les résultats sont exprimés en proportion rapportée aux cellules non infectées à chacun des temps de phagocytose. C. Le nombre de phagosomes positifs pour LAMP1 a été compté pour 10 cellules par condition (environ 200 phagosomes). Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre total de phagosomes présents après 1h de phagocytose induite par le récepteur CR3. Les deux graphiques représentent la moyenne \pm écart type de 2 expériences indépendantes.

1.2. Altération de l'activation des macrophages infectés par le VIH-1

Afin de déterminer si les défauts de maturation observés pourraient se lier conjointement à un défaut de signalisation des macrophages infectés, nous avons disséqué quelques cascades de signalisation en aval des récepteurs phagocytaires. Les MAPkinases conventionnelles étant impliquées dans le processus de maturation du phagosome et dans l'activation de facteurs de transcription comme NF κ B, nous avons regardé leur état d'activation dans les macrophages infectés par le VIH-1. A l'état basal, la phosphorylation de SAPK/JNK, ERK1/2, p38 et p65/RelA par Western Blot dans les macrophages infectés est plus élevée que dans les macrophages non infectés. Suite à la stimulation du FcR, la phosphorylation de ERK1/2 est amoindrie dans les macrophages infectés en comparaison des macrophages non infectés. Ce résultat indique que l'infection virale induit une pré-activation

des macrophages incapables de répondre efficacement à une stimulation par phagocytose (Figures 3 A-F Article). Etant donné que le défaut d'activation des macrophages énoncé ci-dessus pourrait être suivi d'une altération de la transcription de gènes, nous avons initié une analyse transcriptionnelle globale. Pour ce faire, nous avons mis en contact des macrophages primaires infectés ou non avec le VIH-1_{ADA}WT avec des globules rouges opsonisés par les IgG ou non (basal), ou encore la forme invasive de *Salmonella* Typhimurium pendant 1 heure. Après l'extraction des ARNs cellulaires, et une analyse transcriptomique de ces derniers, il apparaît que le profil d'expression des gènes est fortement modifié dans les macrophages infectés en comparaison des macrophages non infectés et cela peu importe la stimulation initiale (Figures 3G-H Article). Ce résultat témoigne de la forte empreinte du VIH-1 dans les macrophages, surpassant celle de la stimulation initiale. De façon plus précise, l'analyse par le logiciel Ingenuity, nous informe que le VIH-1 fait varier l'expression de gènes tels que LAMP3 (DC-LAMP), RILPL1, de facteurs de restriction comme MX2, et de gènes relatifs à la réponse aux interférons (Figure 45). De plus, l'analyse semi-quantitative de la production de cytokines dans les macrophages infectés après 6 heures de stimulation ou non atteste d'une diminution de ces dernières (ie, IL8, IL6, MCP-1) par rapport aux macrophages non infectés (Figure 3I Article). Enfin, afin de placer le macrophage dans le contexte de la réponse immunitaire, nous avons regardé si ce dernier était capable d'activer de façon précoce les lymphocytes T. Pour ce faire le surnageant des macrophages infectés ou non et les lymphocytes T primaires ont été mis en contact pendant 72 heures. Les lymphocytes ont également été pré-activés par du PHA-P durant les 48 dernières heures de co-culture. Le résultat montre que le surnageant des macrophages non infectés potentialise l'activation des lymphocytes, via l'augmentation de l'expression du CD25, alors que le surnageant des macrophages infectés ne permet pas cette augmentation (Figure 3J Article).

Ainsi, ces différents résultats témoignent d'une profonde altération de l'activation des macrophages infectés par le VIH-1 et de leur faculté à produire des cytokines.

p-value	FD	Gene	Nom des gènes
4,77E-02	2,902	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27
1,14E-03	1,750	IFI35	interferon-induced protein 35
1,22E-03	2,251	IFI44	interferon-induced protein 44
6,26E-03	7,097	IFI44L	interferon-induced protein 44-like
2,06E-02	1,894	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6
7,19E-04	1,555	IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1
4,49E-04	3,897	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
1,65E-03	2,810	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
3,74E-04	2,404	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
2,67E-03	1,841	IFIT5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5
4,31E-03	2,345	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3
4,35E-02	1,531	IFNA17	interferon, alpha 17
2,01E-03	2,555	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier
9,10E-03	1,625	ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa
8,96E-04	4,032	MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78
1,29E-04	2,815	MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)
1,62E-02	-1,523	RILPL1	Rab interacting lysosomal protein-like 1
2,17E-03	4,716	LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3

Figure 45. Variation d'expression des gènes par l'infection virale du VIH-1 dans les macrophages à l'état basal. Les macrophages ont été infectés ou non par le VIH-1_{ADA}WT pendant 8 jours. Suite à une extraction des ARN, une analyse transcriptomique a été réalisée par l'utilisation de puces Affymetrix picosIV2 humanGene1.0 ST. Le logiciel Ingenuity a permis d'effectuer une comparaison entre les gènes des macrophages infectés et non infectés à l'état basal. Ce tableau résume la variation d'expression de gènes sélectionnés après l'infection virale des macrophages issus de 3 donneurs différents. p-value ≤ 0.05 , FD : Fold-Change ≥ 1.5 .

1.3. Etape du cycle virale et protéines virales impliquées dans l'altération de la maturation du phagosome

Le VIH-1 étant responsable de l'altération de la maturation du phagosome, nous nous sommes intéressés par la suite au cycle viral et aux protéines virales susceptibles d'être impliquées dans cette inhibition. Pour ce faire, nous avons réalisé en premier lieu une cinétique d'infection s'étalant sur 8 jours d'infection. L'altération du recrutement de LAMP1 sur les phagosomes est notable après 6 jours d'infection des macrophages en comparaison des macrophages non infectés, et n'est pas observable durant les 3 premiers jours de l'infection (Figure 4A Article). Suite à cette première observation, nous avons décidé d'utiliser un inhibiteur pharmacologique précoce du cycle viral, le Raltégravir. Ce dernier inhibe l'étape d'intégration du virus au génome. L'usage du Raltégravir nous a permis de démontrer que les défauts de maturation sont dépendants de l'intégration du virus au génome de la cellule, car il

permet une restauration totale de l'acquisition de LAMP1 sur les phagosomes après 1h de phagocytose (Figure 4B Article). Sachant que l'étape d'internalisation de la phagocytose est inhibée par la protéine Nef, nous avons regardé si le défaut de maturation observé n'était pas une conséquence de celui de l'internalisation. L'utilisation d'un virus dépourvu de la protéine Nef, nous indique que ce facteur de virulence n'est pas impliqué dans les étapes tardives de maturation, soit l'acquisition de LAMP1 sur les phagosomes (Figure 4D Article). Souhaitant rester dans le contexte d'une infection virale et ayant à disposition un virus dépourvu pour une autre protéine virale, nous avons testé l'impact de l'absence de Vpr dans le contexte d'une infection virale. De façon surprenante, l'utilisation d'un virus dépourvu de la protéine Vpr dans les macrophages, restaure l'acquisition de LAMP1 sur les phagosomes après 1h de phagocytose (Figure 4E Article). Par contre, il ne compense pas l'inhibition d'internalisation initiale de phagocytose (Figure 4G Article), qui est bien dépendante de la protéine Nef (Figures 4C et F Article) et comme nous l'avons déjà montré (Mazzolini et al., 2010). Ce dernier résultat a été déroutant, car aucune donnée dans la littérature ne mentionne une éventuelle relation entre Vpr et la voie d'endocytose. Il a été conforté par des expériences de surexpression de la protéine Vpr dans les macrophages de souris ou primaires humains, qui témoignent d'une diminution du recrutement de la protéine LAMP1 après 1h de phagocytose (Figures 4 H-I Article).

Ces résultats attestent donc de la nécessité de l'intégration du génome virale à l'ADN cellulaire, et de l'expression de la protéine Vpr pour altérer la maturation du phagosome. L'absence d'implication de la protéine Nef dans ce mécanisme souligne que les défauts de maturation du phagosome ne relèvent pas d'une simple conséquence de l'inhibition précoce de l'internalisation.

1.4. Mécanismes impliqués dans l'altération de maturation du phagosome

Après avoir déterminé l'implication de la protéine virale Vpr dans l'altération de la maturation du phagosome, nous avons cherché à savoir par quel mécanisme le virus détourne cette maturation sur le plan cellulaire. Au début de mon étude, ayant constaté par microscopie que les phagosomes semblaient être davantage situés en périphérie de la cellule dans les macrophages infectés par rapport aux macrophages non infectés, nous avons investigué dans

ce sens. Pour ce faire, nous avons établi une distance relative entre les phagosomes et le noyau : si le phagosome est situé à une distance théorique de deux phagosomes par rapport au noyau, il est considéré comme périphérique ; si le phagosome est collé au noyau, ou situé dans la distance correspondant à l'emplacement de deux phagosomes par rapport au noyau, il est considéré comme central. Ce comptage nous permis d'évaluer la distance des phagosomes par rapport au noyau au cours de la phagocytose (Figure 5B Article). Nous avons constaté qu'entre 20 min et 1 h de phagocytose, les phagosomes sont davantage situés en périphérie dans les macrophages infectés en comparaison des macrophages non infectés, et que ce défaut de migration est partiellement mais significativement dépendant de la protéine Vpr (Figures 5A et C Article). Un tel défaut peut avoir plusieurs origines : un défaut de migration vers le centre de la cellule, un problème d'ancrage des phagosomes dans la région périnucléaire ou un ralentissement de la migration des phagosomes au centre de la cellule, nous avons donc réalisé des expériences de vidéomicroscopie sur des macrophages infectés. L'utilisation d'un virus étiqueté par la GFP et la mise au point des expériences sur le microscope confocal installé dans le laboratoire L3 nous ont permis de suivre la progression des phagosomes en temps réel dans les cellules infectées. Nous avons ensuite calculé la distance des phagosomes par rapport au noyau au cours du temps. Ainsi, nous avons observé que la localisation périphérique des phagosomes dans les macrophages infectés était étroitement liée à un ralentissement de la migration des phagosomes vers la région périnucléaire des cellules, dès le début de leur internalisation (Figures 5 D-E Article). N'ayant actuellement aucun virus codant pour la GFP et dépourvu de la protéine Vpr, nous n'avons pas pu savoir si cette observation était également dépendante de la protéine Vpr. Cependant, la migration centripète des phagosomes au cours de la phagocytose étant dépendante des microtubules, nous avons ensuite entrepris d'étudier la dynamique des microtubules. Pour ce faire, nous avons évalué la capacité des microtubules à se dépolymériser après un traitement des cellules au nocodazole. De façon intéressante, nous n'avons observé aucune différence entre le réseau de microtubules des cellules infectées et non infectées à l'état basal. Cependant, la cinétique de repolymérisation des microtubules est plus lente dans les macrophages infectés par rapport aux macrophages non infectés, et semble dépendre partiellement de la protéine Vpr (Figure 6A Article). Après avoir observé un défaut de dynamique des microtubules dans les cellules infectées, nous avons analysé la localisation de protéines associées aux microtubules dynamiques. Les protéines de la famille + TIP stabilisent les microtubules et sont à l'origine de fonctions locales de ces derniers, nous avons donc étudié la localisation d'un membre de cette famille, EB1. L'étude de la localisation de EB1 par microscopie et l'analyse de sa forme

en comètes, nous montrent une réduction de la localisation des comètes EB1 décorant les extrémités (+) des microtubules dans les macrophages infectés par rapport au macrophages non infectés. L'utilisation d'un virus dépourvu de la protéine Vpr restaure le phénotype de EB1 qui est comparable aux cellules non infectées (Figures 6 B-C Article). Pour évaluer le lien entre les défauts de maturation du phagosome et ceux de la dynamique des microtubules dans les macrophages infectés, nous avons regardé si des événements de fusions ou fissions avec les endosomes de tri ne pourraient pas être à l'origine de ces altérations. Pour ce faire, nous avons étudié la localisation subcellulaire d'une protéine impliquée dans la tubulation des endosomes de recyclage, la protéine EHD3 (« Esp15-homology domain ATPase protein 3 »). Nous avons observé que cette protéine est fortement recrutée sur les VCC, alors que sa distribution est homogène dans les macrophages non infectés (Figures 7A Article). EHD3 étant un partenaire de MICAL-L1 (« Molecule Interacting with CASL-Like 1 »), nous avons également regardé la distribution de cette autre protéine dans les macrophages. De façon surprenante, l'infection virale induit une forte tubulation de MICAL-L1 dans les macrophages, en comparaison des macrophages non infectés ou infectés par le virus dépourvu de la protéine Vpr (Figure 7B Article). Des expériences de siRNA dirigés contre le gène MICAL-L1 montrent une diminution de 41 % du recrutement de LAMP1 sur les phagosomes après 1h de phagocytose dans des macrophages primaires (Figures 7 C-D Article).

Ces résultats suggèrent que la protéine Vpr du VIH-1 détournerait la machinerie de tri impliquant les protéines EHD3/MICAL-L1 et la migration centripète des microtubules via la protéine EB1 afin d'altérer la maturation du phagosome.

En résumé ces différents résultats indiquent que les étapes tardives de la phagocytose sont affectées dans les macrophages primaires infectés par le VIH-1, menant ainsi à l'altération de la maturation du phagosome et à un défaut de clairance bactérienne. De façon concomitante, la cascade d'activation induite par les récepteurs phagocytaires de surface est moins efficace, ce qui entraîne une diminution de sécrétion des cytokines. L'utilisation de souches mutantes pour le VIH-1, nous a révélé que le facteur de virulence Nef ne joue pas de rôle prépondérant dans ces modifications. En revanche, la protéine virale Vpr semble clairement impliquée dans les défauts de maturation du phagosome. Vpr est crucial pour perturber la dynamique des microtubules et la localisation de EB1, ce qui conduit à un ralentissement des phagosomes pour atteindre le centre de la cellule. De plus, certains composants de la machinerie de tri sont détournés par le VIH-1 ce qui contribue à la

désorganisation de la maturation du phagosome. Ainsi, nous avons identifié la protéine virale Vpr en tant que régulateur majeur des microtubules et responsable du détournement du trafic intracellulaire dans les macrophages infectés (Figure 46).

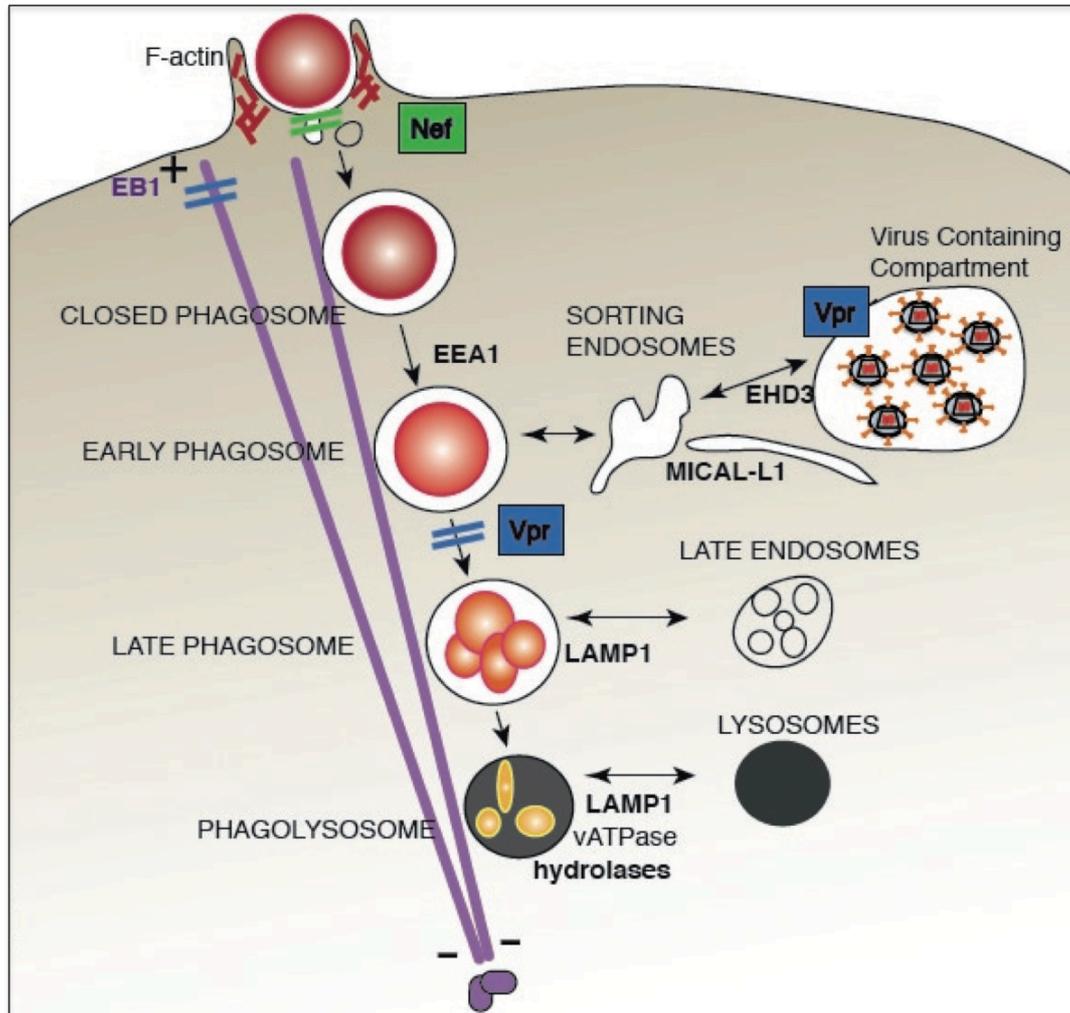


Figure 46. Modèle proposé par lequel Vpr détournerait les composants du trafic intracellulaire afin d'altérer la maturation des phagosomes et la clairance bactérienne.

II. Article soumis

L'article, incorporé dans le manuscrit et développé ci-dessous, est présenté tel qu'il a été soumis pour publication le 28 Aout 2014 pour le journal Cell Development.

Phagosomal maturation is impaired in HIV infected macrophages by the viral protein Vpr controlling microtubule dynamics and EHD3/MICAL-L1 trafficking.

Running title: Phagolysosome biogenesis is impaired by HIV-1 Vpr

Audrey Dumas^{1,2,3}, Floriane Herit^{1,2,3}, Gabrielle Lê-Bury^{1,2,3}, Florence Marie-Anaïs^{1,2,3}, Julie Mazzolini^{1,2,3,4}, Thomas Guilbert^{1,2,3}, Pierre Bourdoncle^{1,2,3}, David G. Russell⁵, Serge Benichou^{1,2,3}, Ahmed Zahraoui^{1,2,3} and Florence Niedergang^{1,2,3}.

1. Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France.

2. CNRS, UMR 8104, Paris, France.

3. Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

4. Present address: University of Birmingham, CRUK growth factor group, Edgbaston, Birmingham B15 2TT, United Kingdom.

5. Cornell University, Department of Microbiology and Immunology, College of Veterinary Medicine, Ithaca, New York 14853, United States of America.

Correspondence address: Dr Florence Niedergang, florence.niedergang@inserm.fr

Institut Cochin, Biology of Phagocytes group, Infection, Immunity and Inflammation Department

22 rue Méchain, 75014 Paris, France.

Tél: 00 33 1 40 51 64 21, Fax: 00 33 1 40 51 64 30

Key words: endocytic trafficking and sorting; HIV-1; macrophages; microtubules; phagosome maturation; signaling; Vpr.

ABSTRACT

A major function of macrophages is phagocytosis and bacterial clearance. Here, we demonstrate that HIV-1 infection of macrophages perturbs late phagocytic events and inhibits the maturation of phagosomes, defined by the presence of late endocytic markers, hydrolases and reactive oxygen species. HIV-1 infected macrophages exhibited a higher basal level of activation but appeared unable to respond efficiently to phagocytic triggers, and the bacterial clearance was reduced. Unexpectedly, the viral protein Vpr was crucial to perturb phagosome maturation, while the viral factor Nef was not. We showed that the microtubule dynamics, EB1 localisation and centripetal movement of phagosomes were critically impaired in a Vpr-dependent manner. In addition, the EHD3/ MICAL-L1 endosomal sorting machinery was hijacked to the virus-containing compartments. Thus, we identify in HIV-1 infected macrophages Vpr as a modulator of the microtubule dynamics and endocytic trafficking, leading to strong alterations in phagolysosome biogenesis.

INTRODUCTION

Macrophages play crucial functions at the interface between innate and adaptive immunity and also represent niches for intracellular pathogens. They are professional phagocytes that take up pathogens and debris through a wide variety of receptors including receptors for surface determinants such as the Toll-like receptors, receptors for mannose or beta glucans (Dectin-1) (Canton et al., 2013; Flannagan et al., 2012; Underhill and Goodridge, 2012). Other receptors recognize opsonins, ie molecules of the immune system covering the surface of microorganisms. Among these are receptors for Fc portion of immunoglobulins (FcR) or receptors for complement. The interaction between these receptors and their ligands induces signaling cascades that lead to strong and transient actin polymerization, plasma membrane remodeling and pseudopod extension around the particulate material (Deschamps et al., 2013; Flannagan et al., 2012). The closed compartment that forms, the phagosome, quickly loses its actin coat and undergoes a series of fusion and fission with compartments of the endocytic machinery (Botelho and Grinstein, 2011; Fairn and Grinstein, 2012; Flannagan et al., 2009). It acquires successively markers of the early, recycling, late endosomes to eventually fuse with lysosomes. This progressive maturation into a phagolysosomal compartment is accompanied by an acidification of the compartment and its enrichment in hydrolases and reactive oxygen species (ROS), which progressively leads to a degradative compartment. The molecular machineries required for these fusion and fission events are thought to be the same as for endosome maturation (Fairn and Grinstein, 2012; Flannagan et al., 2009; Scott et al., 2014). Concomitantly, there is a motor-based migration on microtubules towards the cell center to reach a perinuclear localization where lysosomes are located (Blocker et al., 1998; Harrison et al., 2003).

Complex signaling cascades, which involve MAP kinases and signaling to NF- κ B pathway, are initiated downstream of surface phagocytic receptors, first to generate a profound and transient actin and membrane reorganization during phagosome formation, eventually to activate gene transcription and pro-inflammatory cytokines secretion (Lee and Kim, 2007; Mantovani et al., 2007; Moretti and Blander, 2014). These cytokines help shape the specific immune response, together with the presentation of microbial-derived peptides to T lymphocytes, and also participate in pathogen clearance by macrophages.

The Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) infects and kills T cells, which profoundly damages the host specific immune response but also integrates into memory T cells and long-lived macrophages, establishing a chronic infection (Carter and Ehrlich, 2008; Koppensteiner et al., 2012b). Because macrophages are thought to retain viruses in an infectious form, and potentially to release them in a delayed manner and in different locations, they are proposed to be important for virus dissemination and pathogenesis. HIV-1 infection impairs the functions of macrophages both *in vivo* and *in vitro*, which might contribute to the development of opportunistic diseases. Macrophages from HIV-1-infected patients or monocyte-derived macrophages infected *in vitro* show impaired phagocytosis activity (Collman et al., 2003; Kedzierska and Crowe, 2002). Impaired phagocytosis was also reported in a population of small alveolar macrophages in HIV-infected patients (Jambo et al., 2014). We previously showed that HIV-1, via the viral factor Nef (Negative Factor), indeed impacts on phagocytosis by inhibiting the membrane remodeling events that are required for efficient phagosome formation (Mazzolini et al., 2010). Nef, one of the six regulatory genes of HIV-1, is a major virulence factor that is highly expressed early during virus replication (Foster and Garcia, 2008; Witkowski and Verhasselt, 2013). It interacts with many host cell factors,

leading to perturbation of intracellular trafficking, signaling and actin remodeling. Another regulatory viral protein, Vpr, is specifically incorporated into virus particles. Vpr has several described activities, including cell cycle arrest at the G2/M transition, induction of apoptosis, control of the reverse transcription process and modulation of the HIV-1 mutation rate (Guenzel et al., 2014; Kogan and Rappaport, 2011; Planelles and Benichou, 2009).

Here, we show that the late steps of phagocytosis are impaired in HIV-infected primary human macrophages, leading to alteration in phagosome maturation and bacterial clearance. The concomitant activation cascades are also less efficiently triggered downstream of surface receptors, which leads to a defective cytokine secretion. Using mutant strains of HIV-1, we demonstrate that Vpr is unexpectedly involved in the perturbation of phagosome maturation, while Nef is not a major viral effector. We further show that Vpr is crucial to perturb microtubule dynamics and the localization of plus-end tracking proteins EB1. This impacts the centripetal movement of phagosomes on microtubules and hence, an efficient maturation. In addition, the endocytic sorting machinery based on EHD3 / MICAL-L1 was hijacked by the viral compartment. Therefore, we identify Vpr as a major regulator of microtubules with impact on subcellular trafficking, which perturbs phagolysosome biogenesis and pathogen clearance.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Information on antibodies and reagents, cell culture, viral production and infection, phagocytosis assay and phagosome measurements, depolymerization/ repolymerization of microtubules, live cell imaging, phagosomal bead assay and flow cytometry analysis, T lymphocytes activation, bacterial growth and plating assay, Western Blots, microarray analysis, cytokine arrays and statistics are all reported.

Antibodies and reagents. The following primary antibodies were used: purified rabbit anti-Sheep Red Blood Cells (SRBC) (IGN Biochemicals), rabbit anti-p65/RelA (sc 372, Santa Cruz Biotechnology), rabbit monoclonal anti-phospho-p65 (Ser536) (3033, Cell Signaling technology), mAb anti-tubulin (T-5168; Sigma-Aldrich), mAb anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) and anti-p44/42 MAPK (9106 and 9102, respectively Cell Signaling Technology), rabbit monoclonal anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) and anti-SAPK/JNK (4668 and 9258, respectively, Cell signaling), rabbit monoclonal anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) and rabbit anti-p38 (9215 and 9212, respectively, Cell Signaling Technology), mAb anti-EHD3 (H00030845-M01, Abnova Corporation), rabbit polyclonal anti-MICAL-L1 (homemade (Abou-Zeid et al., 2011)), mouse monoclonal anti-LAMP1 (555798, BD Biosciences), mouse monoclonal anti-EEA1 (610456, BD Biosciences), anti-CD25-PE (BD Biosciences) mouse monoclonal anti-EB1 (BD Biosciences), goat anti-p24 HIV-1 (4999-9007, AbD serotec).

Secondary antibodies were AMCA-, Cy2-, Cy3-labeled F(ab')₂ anti-mouse IgG, Cy5-labeled F(ab')₂ anti-human IgG, AMCA-, Cy5-labeled F(ab')₂ anti-rabbit IgG, Cy5-labeled F(ab')₂ anti-rat IgG and Cy2-labeled F(ab')₂ anti-goat IgG, HRP-labeled anti-mouse and

anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch). Alexa350/633-coupled phalloidins were from Molecular Probes (Invitrogen).

siRNA sequences targeting MICAL-L1 are: 5'-GUCCCAGUAUUACAACCACUU-3' (siRNA#1) and 5'GUGGAGCCUAGAGUGGAACAA-3' (siRNA#2).

Carboxylated 3 mm silica H2DCFDA-OxyBURST and DQ-BSA beads were as described (Podinovskaia et al., 2013). Phytohemagglutinin (PHA-P) and nocodazole were from Sigma-Aldrich. Raltegravir was a kind gift from Gianfranco Pancino (Institut Pasteur, Paris).

Cell culture, transfection and transduction

Human primary macrophages were isolated from blood of healthy donors (Etablissement Français du Sang Ile-de-France, Site Saint Vincent-de-Paul, Trinité or Saint-Antoine) by density gradient sedimentation in Ficoll (GE Healthcare), followed by adhesion on plastic at 37°C during 2h and culture in the presence of complete culture medium [RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 µg/ml streptomycin/penicillin and 2 mM L-glutamine (Invitrogen/Gibco)] containing 10 ng/ml rhM-CSF (R&D systems) (Mazzolini et al., 2010). Treatment with siRNA was obtained after 72h with RNAiMAX reagent (Invitrogen)(Marion et al., 2012). Human primary T lymphocytes were obtained by negative selection on magnetic beads according to the manufacturer's instructions (Stemcell Technologies).

RAW264.7 macrophages were grown and transfected as described (Niedergang et al., 2003). Transient nucleofection of 5 days differentiated monocytes ($5 \cdot 10^5$ cells/cuvette) with expression plasmids was performed as described (Jacquot et al., 2007; Mazzolini et al., 2010).

Viral production and infection

Proviral infectious clones of the macrophage-tropic virus isolate ADA (HIV-1ADAWT), and the same clone disrupted for the Nef ORF (HIV-1ADA Δ Nef) were described (Mazzolini et al., 2010). Proviral infectious clones of the macrophage-tropic virus isolate YU-2 (HIV-1Yu2WT) and the same clone disrupted for the Vpr gene HIV-1Yu2 Δ Vpr were described (Mansky, 1996; Mansky et al., 2000). The HIV-1Gag-iGFP carrying an R5-tropic envelope with the V3-loop V92th014.12 was a kind gift of Michael Schindler (Koppensteiner et al., 2012a). Stocks of viruses were obtained by transfection of HEK 293T cells (Human Embryonic Kidney 293, ATCC®CRL-1573TM, 2x10⁶) with 6 μ g of the corresponding proviral DNA, using Fugene as recommended by the manufacturer (Roche). VSV-G pseudotyped virus (HIV-1ADA-VSV-GWT) was generated by transfection of HEK 293 T cells with 1.5 μ g of VSG-G vector (pMD.G) along with 4.5 μ g of HIV-1 proviral DNA (HIV-1ADAWT). Supernatants of the transfected cells were collected after 48 h, filtered, stored at -80°C and quantified for the HIV-1 CAp24 antigen by ELISA (Innotests HIV Antigen mAb, Innogenetics, France). Viral titres were assessed by infection of the indicator cells HeLa TZM-bl (bearing the β -galactosidase gene under the control of HIV-1 LTR, NIH reagent program) with serial dilutions of the stocks, followed by a β -galactosidase coloration of the cells and counting of blue cells.

Monocytes differentiated into macrophages for 11 days were seeded in 6-well plates at a density of 5.10⁵-1.10⁶ cells/well and cultivated in complete culture medium. For the microscopy experiments, the cells were detached after 10 days of differentiation, put on coverslip at 2.10⁵ cells/well. At 11 days of differentiation, HIV-1 viruses (MOI 0,03) were added. Viruses were washed after 1 or 2 days, for HIV-1 VSV-G pseudotyped or WT, respectively, and cells were kept for 8 days or the indicated times before functional

assays.

Phagocytosis assay and Phagosome measurements

Phagocytosis assays mediated by Fc or CR3 receptors were performed with adherent cells plated on glass coverslips (Braun et al., 2004). For microscopy, RBC were washed in PBS1X and incubated with anti-RBC antibodies for 30 min at RT, then washed and resuspended in serum-free medium. After internalization of the IgG-RBC for the indicated times, cells were fixed in 4% PFA (Sigma) / 4% sucrose for 45 min at 4°C and external RBC were labeled for 10 min with labeled F(ab')₂ anti- mouse or anti-rabbit IgG in PBS/BSA 1 %. Cells were then permeabilized with 0.05 % saponine before labeling of the intracellular RBC with AMCA-labeled F(ab')₂ anti-rabbit IgG and/or other primary antibodies in PBS/saponine 0.05 %/BSA 1 %. Mounting medium was Fluoromont-GTM (eBioscience). To quantify phagocytosis, the ratio: number of internalized RBC / number of [internalized+bound] RBC was calculated in 10 cells - 50 cells (> 200 phagosomes) randomly chosen on the coverslips, corresponding to the phagocytic index, by the differential between phase contrast and fluorescent SRBC. The index obtained was divided by the index obtained for control cells and expressed as a percentage of control cells. To quantify the recruitment of LAMP1 on the phagosomes, images were acquired and the presence of the marker on the phagosomes was analyzed on a yes/no basis (> 200 phagosomes per condition). The number of LAMP1 positive phagosomes was divided by the number of total phagosomes per condition and expressed as percentage. A minimum of 3 independent experiments was performed. Image acquisition was performed on an inverted wide field microscope (Leica DMI6000, Leica microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) with a 100x (1.4 NA) objective and a

MicroMAX camera (Princeton Instruments). Z-series of images were taken at 0.2- μm increments and deconvolution was performed with the software Huygens (Scientific Volume Imaging). Analyses were performed using homemade ImageJ (NIH) routines.

To quantify the number of comet-shaped structures in EB1-labeled macrophages, Z projection of maximum intensities of the images, TopHatFilter and a fixed threshold were used to segment and calculated the circularity of all objects. Then ellipsoid objects (circularity < 0.5) corresponding to comets were counted.

Depolymerisation/repolymerisation of Microtubules

After 8 days of infection, macrophages were incubated in complete culture medium with or without Nocodazole (10 μM) during 1 hour at 37°C, 5% CO₂. After washing with cold complete culture medium, cells were placed at 37°C for various times before fixation with ethanol 100% at -20°C during 10 min and PFA 4% at room temperature during 15 min. Cells were then permeabilized with 0.15% Triton (Sigma) at 4°C during 2 min, before labeling with antibodies and image analysis as described above.

Live cell imaging of phagocytosis in HIV-1 infected primary macrophages

To follow phagocytosis on HIV-1-GFP-infected or non-infected cells, images were recorded every min during 2 h on a Spinning Disk confocal (Yokogawa CSU-X1M1) inverted microscope (Leica DMI6000) equipped with a CoolSnap HQ² camera (Photometrics) and a heated chamber and CO₂ in the BSL3 laboratory. HIV-1-GFP and SRBCs were visualized by fluorescence and phase contrast with a 100 X, 1.4 NA, PH DIC

objective. Acquisition was performed with MetaMorph 7.5.5 (Molecular Devices). The movies were analyzed using Image J with the Manual Tracking Plugin (Fabrice Cordelières, Institut Curie, Orsay). Distances relative to the nucleus were calculated in μm and the traveled distances were calculated and plotted against time. The slopes were calculated with linear regression.

Phagosomal bead assay and flow cytometry analysis

H2DCFDA-OxyBURST beads are coupled to dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) and Alexa Fluor 633-SE (Molecular Probes, USA). Oxidized substrate emits a fluorescent signal at 520 nm when excited at 490 nm, and Alexa Fluor 633 emits at 647 nm when excited at 633 nm. DQ BSA beads are coupled to DQ green BSA and a calibration Alexa Fluor 633-SE. Hydrolyzed substrate emits at 520 nm when excited at 490 nm (Podinovskaia et al., 2013). Beads were extensively washed

and incubated with HIV-1 or mock infected macrophages in 6-well plates in serum-free medium at 37°C. At each time point, cells were detached and washed twice before to be fixed with PFA 4% during 45 min at 4°C. PFA was neutralized with NH_4Cl (50 mM in PBS1X). Cells were washed with PBS1X and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, BD Bioscience). The emission at 520 (Substrate) and 650 (Calibrator) were recorded after excitation at 488 and 635 nm, respectively. Analysis was performed using CellQuest Pro software (BD Bioscience). The number of cells containing substrate-positive beads was divided by the total number of cells containing beads and the result is expressed as a percentage.

T lymphocytes activation

To measure the activation of T lymphocytes and the expression of CD25, primary human T lymphocytes (3×10^5) were incubated with supernatants of primary human macrophages infected or not with HIV-1ADAWT from the same donor or culture medium alone in 6 wells plate during 24h before adding PHA-P at (1 mg/ml) for another 48h. The median of CD25 fluorescence was analyzed by flow cytometry (AccuriTMC6, BD Bioscience). The results are expressed as a percentage of the control (culture medium alone).

Bacterial growth and plating assay

E. coli laboratory strain (XL1-blue) and *Salmonella* Typhimurium (ATCC14028 (Niedergang et al., 2000) or 4/74 (Kroger et al., 2013)) were grown overnight at 37°C with shaking in Luria-Bertani (LB) broth, then subcultured without shaking for 4-5h in LB containing 300 mM NaCl (*S. Typhimurium*) or not (*E. coli*). The absorbance at 600 nm of the bacterial suspensions was used to determine the multiplicity of infection, by estimating that 10^9 bacteria per ml give an A600 of 1. The inoculum dose was then calculated by plating serial dilutions onto LB agar plates. MDM were infected at a multiplicity of infection of 50 in 6 well plates. After a 30 min incubation at 37°C in 5% CO₂, the cells were washed 2 times with sterile PBS, once with complete RPMI medium supplemented with 50 µg/ml of gentamicin and then incubated in the latter medium for the indicated times. At each time point, cells were washed twice with PBS and lysed with 0.5% Triton X100 in PBS. The number of viable bacteria present at

each time point was determined by plating serial dilutions on LB agar plates.

Western Blots

Macrophages were lysed for 15 min at 4°C in lysis buffer (20 mM Tris HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 50 mM NaF, 1mM Sodium Orthovanadate, supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic). Lysates were centrifuged at 10 000 g during 10 min at 4°C. The post-nuclear supernatants were kept and equal amount of proteins (BCA dosage kit, Pierce) was analyzed by SDS- PAGE. Proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore) and incubated in blocking solution TBS 1X/ 0.1% Tween-20 supplemented with 0.5% BSA for 2 hours. Blots were rinsed with TBS 1X / 0.1% Tween-20 and antibodies were incubated in the blocking solution. Detection was performed using ECL substrate (GE Healthcare).

Microarray analysis

RNA was extracted using RNeasy® Plus mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. After quality checks (Bioanalyser 2100 Agilent RNA6000 nano chip kit), 50 ng of total RNA were reverse transcribed following the Ovation PicoSL WTA System V2 (Nugen). The resulting double strand cDNA was used for amplification based on SPIA technology. After purification according to Nugen protocol, 2.5 ug of single strand DNA was used for fragmentation and biotin labeling using Encore Biotin Module (Nugen). After control of fragmentation using Bioanalyzer 2100, cDNA was hybridized to GeneChip® human Gene 1.0 ST (Affymetrix) at 45°C for 17 hours. Chips

were then washed on the fluidic station FS450 following specific protocols (Affymetrix) and scanned using the GCS3000 7G. The image was then analyzed with the Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data (cel files) and metrics for Quality Controls. The observations of some of these metrics and the study of the distribution of raw data showed no outlier experiment.

Data were normalized using RMA algorithm in Bioconductor with the custom CDF vs 16 (Nucleic Acid Research 33 (20), e175). Statistical analysis were carried out with the use of Partek® GS. All data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE59991 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE59991>).

First, variations in gene expression were analyzed using unsupervised hierarchical clustering and PCA to assess data from technical bias and outlier samples. To find differentially expressed genes, we applied a three way ANOVA for each gene and made pair wise Tukey's post hoc tests between groups. Then, we used p-values and fold changes to filter and select differentially expressed genes. DEGs enrichment analyses were carried out through the use of Ingenuity (Ingenuity® Systems, USA).

Cytokine arrays

Supernatants of primary macrophages were collected after 6h of stimulation and incubated with membranes containing primary antibody against different cytokines as indicated by the manufacturer (RayBio® Human Cytokines Antibody Array kit, Cliniscience). Each dot corresponds to a different cytokine. The ECL signal was quantified and the semi-quantitative results were summarized in a table.

Statistics

The statistical significance of the data was tested with an unpaired Student's t test.

Differences were considered significant if P value was less than .05 (*) and .005 (**).

RESULTS

HIV-infection impairs the acquisition of late but not early endocytic markers on phagosomes

We showed previously that phagosome formation is altered in HIV-infected macrophages (Mazzolini et al., 2010). However, this blockage is only partial, and particles are still internalized, albeit at a reduced frequency. To further characterize the defect in phagocytic functions observed in macrophages infected with HIV-1, we analyzed the later steps of phagosome maturation using opsonized particles as a model (opsonized sheep red blood cells, IgG-SRBCs). Monocytes from healthy donors were differentiated into macrophages (MDM) with rhM-CSF for 11 days and then infected with HIV-1_{ADA}WT for 8 days. Infected macrophages were then allowed to phagocytose IgG-SRBCs for various times before fixation (Figure 1), permeabilization and labeling with anti-LAMP1, a marker of late endosomes/ lysosomes (Scott et al., 2014), and anti-p24 antibodies to detect HIV-1-infected cells. As shown in Figure 1A, while the majority of internalized SRBCs were surrounded by a relatively continuous LAMP1 staining in non-infected macrophages after 20 min or 60 min, the LAMP1 staining of phagosomes in HIV-infected macrophages was either absent, or present as scattered vesicles around the SRBCs, which was not scored as a positive recruitment. Accordingly, the quantification indicates that the recruitment of LAMP1 was inhibited by 24 to 64 % depending on the time point analyzed (Figure 1C). The recruitment of LAMP1 on phagosomes of p24-negative cells of the same coverslips in HIV-1-infected conditions was not inhibited indicating that there was no bystander effect in neighboring p24-negative cells in these experimental conditions (not shown). Interestingly, the recruitment of the early

endosomal marker EEA1 was not modified in HIV-infected macrophages, this marker being lost progressively after 10-20 min (Figure 1B). Therefore, our results point to a defect in acquisition of late, but not early, endocytic markers on phagosomes in HIV-infected macrophages.

Phagosome maturation and bacterial clearance are perturbed by HIV-1 infection

We then analyzed the luminal content of phagosomes in HIV-infected macrophages using 3 μm carboxylated silica beads coated with IgG to target FcR. These beads were coupled to fluorophores sensitive to the hydrolytic activity (DQ-BSA beads) or to the oxidative burst (H2DCFDA-OxyBURST beads), as well as a pH-insensitive calibration fluorophore to correct for variation in phagocytosis (Podinovskaia et al., 2013; Yates and Russell, 2008) (Figure 2A). MDM infected with HIV-1_{ADA-VSV-GWT} or non-infected controls were incubated for various times at 37°C with beads, then analyzed by flow cytometry focusing on the population of cells having captured beads (Figure 2 A-D). The hydrolytic activity was detectable after 1.5 h of contact with beads in control conditions. In HIV-infected macrophages, we observed that the hydrolytic activity was markedly reduced in comparison to non-infected MDM (between 23 and 80 % depending on the time, Figure 2C). The oxidative burst was detected as soon as 20-30 min till 3 h after contact with the H2DCFDA-OxyBURST beads in non-infected MDM. In HIV-1-infected macrophages, the signal was reduced at each time point, from 58 to 92% of the control condition (Figure 2D). Therefore, there is a marked decrease in the production of ROS in HIV-1 infected macrophages. Together with the data reported in Figure 1, these results indicate that phagosome maturation as defined by the acquisition of lysosomal markers, hydrolytic activity and the superoxide burst is impaired in HIV-1-infected macrophages.

Phagocytosis of microorganisms potentially leads to degradation of the ingested material. Some pathogens, such as *Salmonella* Typhimurium are invasive facultative intracellular bacteria that have evolved highly adapted gene expression programs to shape the vacuole in which they reside. We compared the intracellular survival of *Salmonella* Typhimurium in HIV-1_{ADA-VSV-G}^{WT}-infected versus non-infected macrophages using a gentamicin-plating assay (Figure 2 E). The bacterial survival was assessed by counting the number of intracellular bacteria 8 and 24 h post-incubation. The data are expressed as a ratio, ie index of survival, expressed relative to non-infected macrophages. Intracellular *Salmonella* Typhimurium survived 2.3 ± 0.1 fold better in HIV-infected macrophages as compared with control cells. Surprisingly, when we analyzed the entry and survival of a laboratory strain of *E. coli* using the same method, we observed a highly enhanced (4.0 ± 1 fold) intracellular survival of bacteria after 24 h (Figure 2F). This is remarkable, because *E. coli*, unlike *Salmonella* Typhimurium, has no specific intracellular survival strategies.

Together, these results indicate that the altered phagosomal maturation leads to a strong defect in bacterial clearance in HIV-1-infected macrophages.

Considering that the virus-containing endosomal compartment observed in HIV-infected human macrophages was reported to be less acidic and hence potentially less degradative (Jouve et al., 2007), we analyzed the contacts between the viral compartment and FcR-mediated phagosomes (Figure 2G). We did not observe major colocalization between the p24 staining that detects the site of virions assembly and the phagosomes containing internalized particles. Therefore, these results suggest that the defects in phagosome maturation that we observed are not a direct consequence of

modification of the phagosomal compartments due to the virus assembly in these compartments.

Modification of signaling pathways and cytokine secretion downstream of phagocytic receptors in HIV-1 infected macrophages

To gain insights in the defect in phagocytic functions in HIV-infected macrophages, we set out to dissect the signaling cascades downstream of the engagement of surface receptors. As detailed previously, MDM were infected for 8 days with HIV-1_{ADA}WT and incubated for various times with IgG-opsonized SRBCs to induce a phagocytic trigger. After various times of contact, cells were lysed and analyzed by Western blotting to detect activation of the MAP (mitogen-activated protein) kinases p38, ERK1/2(Extracellular Signal regulated-Kinase) and SAP/JNK (c Jun NH₂-terminal kinase). These kinases play a role in the maturation process of the phagosomes (Moretti and Blander, 2014) and also in activation of transcription factors such as NF-κB that leads to subsequent induction of secretion of proinflammatory cytokines. We noticed that the basal phosphorylation of SAP/JNK, ERK1/2 and p38, as well as p65/RelA, was higher in HIV-1 infected macrophages than in non-infected cells (Figure 3 A-D). After stimulation of FcR, however, the phosphorylation of ERK1/2 was markedly reduced in HIV-1-infected macrophages as compared with non-infected cells (Figure 3 E, F). Quantification of the results indicated that there are two waves of activation of ERK1/2 in control cells with peaks at 10 and 180 min, but no peak of phosphorylation in HIV-1-infected macrophages.

Therefore, our results indicate that the HIV-1 infection of macrophages induced a basal “pre-activation” of the cells that dampened the cellular response downstream of the engagement of the phagocytic receptors.

To further analyze the impact of HIV-1 infection on the activation of macrophages upon a phagocytic stimulus, we performed transcriptomic analysis on HIV-infected and uninfected macrophages from three different donors. Cells were infected with HIV-1_{ADA}WT for 8 days, and then placed in contact with non-opsonized SRBCs (basal), IgG-opsonized SRBCs, or invasive *S. Typhimurium* for 1 h, to detect early responses (Schreiber et al., 2011). Unsupervised hierarchical clustering of all HIV-infected or non-infected conditions was conducted to produce a dendrogram based on similarities in gene expression profiles across all groups (Figure 3G). The analysis revealed strong grouping of HIV-infected and non-infected conditions, whatever the phagocytic stimulus applied. This shows that the imprinting of HIV infection was very strong, even when the cells were stimulated with invasive bacteria with a considerable TLR4-activating capacity. Ingenuity gene ontology analysis was used to further examine the functional attributes of the genes differentially-expressed between the groups (Figure 3H). Focusing on a selected set of signaling pathways, we observed important differences in gene expression due to HIV infection (“IL8”, “TLR”, “NF-kB”), even when cells were subjected to a phagocytic trigger. These results reveal a strong modification of gene expression in the HIV-1 infected cells, which is remarkable, considering the relatively low percentage of infected cells in these experiments (around 35 %).

To further examine macrophage activation, we used a cytokine array to detect various cytokines and chemokines in a semi-quantitative manner in the supernatant of cells, 6h after stimulation (Figure 3I). There was a reduced production of cytokines in the supernatant of cells infected with HIV-1_{ADA}WT, both in resting conditions and after a

phagocytic stimulus, than in non-infected cells. We also analyzed the effect of these supernatants on early activation of T cells, to assess the impact of macrophage infection on immune responses. For this, primary human T lymphocytes were purified, incubated for 72 h with conditioned medium from HIV-infected and control macrophages, or with medium alone, and activated in the presence of PHA-P for the last 48 h. The expression of CD25, an early activation marker of T cells, was increased after incubation with the supernatant of non-infected macrophages as compared with medium alone. The conditioned medium from HIV-infected macrophages abolished the potentiating effect of the macrophages conditioned medium with the stimulation by PHA-P. Together, these results demonstrate that HIV-1 infection profoundly affects the activation status of the macrophages and their cytokine production capacities.

The perturbation of phagosome maturation in macrophages requires viral DNA integration and expression of the viral factor Vpr

To better understand how HIV perturbs the functions of the macrophages, we infected the primary human macrophages with HIV-1_{ADA}WT for various times, 2, 3, 6 or 8 days, and phagosomal maturation was assessed by LAMP1 recruitment as in Figure 1. There was no significant inhibition of phagosomal maturation after 2 or 3 days (Figure 4A), however, we observed a marked inhibition of the recruitment of LAMP1 on the phagosomes after 6 or 8 days of HIV infection. Moreover, the inhibition of phagosomal maturation by HIV-1 was not observed when macrophages were treated with integrase inhibitor Raltegravir, indicating that viral integration was necessary (Figure 4B). By contrast, the capacity of macrophages to ingest IgG-opsonized particles was progressively reduced with time of infection (Figure 4C). Because Nef is known to perturb cell functions, we analyzed phagosome maturation in macrophages infected

with *nef*-deleted HIV-1 variants. We observed that Nef was not significantly involved in inhibiting recruitment of LAMP1 (Figure 4D), while we confirmed that it was important for the internalization step (Figure 4C and (Mazzolini et al., 2010)). Most importantly, infection of macrophages with a HIV-1 strain deleted for the Vpr factor showed a recovery of the recruitment of LAMP1 on phagosomes, indicating that Vpr was essential for the virus to inhibit phagosome maturation (Figure 4E). There was however no difference between HIV-_{YU-2}WT and HIV-_{YU-2}ΔVpr on the efficiency of the internalization step of phagocytosis (Figure 4G), demonstrating that, unlike Nef, Vpr is not involved in the early phagosome formation. To analyze if the expression of Vpr alone could induce a defect in phagosome maturation, we transiently transfected the RAW264.7 murine macrophages and primary human macrophages to express GFP-Vpr and allowed the cells to phagocytose IgG-opsonized SRBCs as in Figure 1. We had to focus on cells with moderate levels of expression to avoid toxic effects and observed that expression of GFP-Vpr in RAW264.7 cells induced a significant defect in LAMP1 recruitment to phagosomes, while GFP-Nef did not (Figure 4H). Transient nucleofection of human MDM also led to a 30 % inhibition of LAMP1 recruitment (Figure 4I), indicating that expression of Vpr alone was sufficient to alter the recruitment of this late phagosomal marker.

Together, these data clearly demonstrate the impairment of phagosome maturation in human macrophages is not a consequence of the perturbation of Nef-dependent early membrane remodeling events and that the virus evolved with two factors to inhibit entry and maturation. Unexpectedly, Vpr was identified as a major regulator of phagosome maturation in HIV-infected macrophages.

The centripetal movement of phagosomes is slower in HIV-infected macrophages

Next, we investigated the subcellular localization of phagosome containing IgG-opsonized SRBCs following uptake (Figure 5A). While in control macrophages 66.3 ± 0.7 % of phagosomes reached the cell center within 20 min, and 88.1 % after 60 min, only 30 % of the phagosomes were at the cell center in HIV-infected macrophages after 20 min, and 44 % after 60 min, with much variability. The movement of the phagosomes to the cell center was delayed in macrophages infected with HIV-1_{ADA}WT, and this delay was partially dependent on Vpr (Figure 5C, $p < 0.05$).

To further characterize the centripetal movement of phagosomes, we followed their movement in living HIV-1 infected macrophages (Figure 5D,E) using a spinning disk confocal microscope and HIV-1Gag-iGFP, which generates infectious virions in primary macrophages ((Gaudin et al., 2013; Koppensteiner et al., 2012a). Phagosome movements were recorded every min for 2 h post-uptake. The movements were slower in HIV-infected macrophages immediately following uptake (Figure 5E). Therefore, the peripheral location of phagosomes in HIV-infected macrophages appears a consequence of a slowdown in the intracellular trafficking of the newly formed phagosomes.

The microtubule network dynamics is perturbed in HIV-infected macrophages

To better understand the perturbation of phagosome movement in HIV-infected macrophages, a microtubule-dependent process (Blocker et al., 1998; Harrison et al., 2003), we investigated the microtubule network in HIV-1 infected macrophages (Figure 6). MDM controls and cells infected with HIV-_{YU-2}WT or HIV-_{YU-2} Δ Vpr for 8 days were treated with nocodazole to depolymerize the microtubules (Figure 6A). After extensive

washes, the cells were placed in medium without nocodazole and the repolymerization of microtubules was analyzed on cells fixed at different times. While there was no striking difference between HIV-1 infected or control cells in steady state conditions (basal), differences were observed during the “washout” experiment. The microtubule repolymerization was slower in HIV-1 infected MDM compared to non-infected cells. The phenotype was intermediate in MDM infected with a *vpr-deleted* HIV-1 mutant. Therefore, the infection of macrophages with HIV-1 perturbs the microtubule dynamics.

Proteins that localize to growing microtubule plus ends, collectively called +TIPs, such as EB1 (Akhmanova and Steinmetz, 2010; Gouveia and Akhmanova, 2010), are important to stabilize microtubules and confer local functions of the microtubule cytoskeleton. Therefore, we analyzed the localization of EB1 in HIV-infected and control macrophages (Figure 6B,C). We observed in HIV-1 infected macrophages a reduced localization of EB1 to the comet-shaped structures that normally decorate the plus ends of microtubules. This reduction was not apparent in HIV- Δ Vpr- infected cells.

Together, our results show that HIV-1 infection affects the dynamics of the microtubule network in a Vpr-dependent manner in primary human macrophages.

Defect in recruitment of the endosomal sorting machinery in HIV-infected macrophages

The defect in microtubule dynamics could be responsible for a defect in endosomal sorting events necessary for phagosome maturation. Thus, we investigated the localization of the C-terminal Eps15 homology domain EHD ATPase protein 3 (EHD3), which is involved in tubulation on recycling endosomes (Cai et al, 2013). Analysis of

optical sections showed that it was strongly recruited to virus-containing compartments (Figure 7A). In addition, the EHD3 interaction partner MICAL-L1 distribution was also modified in HIV-1 infected macrophages, where more membrane tubules were observed as compared with non-infected macrophages or macrophages infected with the *vpr-deleted* virus (Figure 7B). MICAL-L1 has been reported to control sorting/recycling on endosomes (Abou-Zeid et al., 2011). We knocked down its expression in MDM and observed clear disorganization of the internalized phagosomes and a $41 \pm 8 \%$ defect in the recruitment of LAMP1 on phagosomes after 1h of phagocytosis (Figure 7C,D, $p < 0.05$).

Together, these results point to perturbation of the microtubule-based centripetal movement of the phagosome and hijacking of the EHD3/ MICAL-L1 sorting machinery by HIV-1 in a Vpr-dependent manner.

DISCUSSION

In the present study, we report that HIV-1-infected human macrophages show profound alterations of their functions that lead to impairment of cytokine release and bacterial clearance. Importantly, we found that the Vpr viral factor was involved in defects in phagosome maturation and showed for the first time that it impacts microtubule dynamics and endocytic sorting events implicating the EHD3/ MICAL-L1 machinery.

We demonstrated that the maturation of phagosomes into degradative phagolysosomes was impaired in HIV-infected macrophages. This maturation process is complex, and incorporates a wide range of biological activities, including the intraphagosomal superoxide burst, the degree of acidification, the extent of phagosome–lysosome fusion, and proteolytic capacity of lysosomes (Botelho and Grinstein, 2011; Fairn and Grinstein, 2012; Flannagan et al., 2009; Flannagan et al., 2012; Russell and Yates, 2007). Because activation of murine bone marrow-derived macrophages was described to modify the early phagosomal degradative capacities (Yates et al., 2007), impairment of phagosomal maturation in HIV-infected macrophages could be linked to the « pre-activated » status that we observed. In addition, activation of macrophages as well as HIV infection had been reported previously to induce stabilization of the microtubules network (Patel et al., 2009; Sabo et al., 2013). The phagosomal defect that we described, however, seems to be specific to an established HIV-1 viral infection, because we did not observe the same defects following other activation treatments (Suppl. Figure 1). Of note, the viral containing compartment (VCC) itself was shown to be less acidic than late endosomes in human macrophages (Jouve et al., 2007). Because we did not observe a massive colocalization of the viral capsid and the phagosomal content, the defect in phagosomal maturation that we describe does not seem to be related to the presence of

the virus within the phagosome as they are compartmentally-segregated.

The perturbation of phagosomal maturation described here requires integration of the proviral genome and the establishment of a complete viral cycle. In addition, the defects in phagosome formation (Mazzolini et al., 2010) and in phagosome maturation (this study) clearly rely on different steps of the viral cycle and different viral factors. This correlates with the temporal expression of the two proteins, as Nef is expressed abundantly early during virus replication, while Vpr is expressed later (Guenzel et al., 2014; Planelles and Benichou, 2009; Witkowski and Verhasselt, 2013). The effects on late events of phagosome maturation and activation are not a consequence of Nef's known ability to partially inhibit the formation of phagosomes in HIV-1 infected macrophages (Mazzolini et al., 2010), and to modify intracellular trafficking and signaling (Fackler and Baur, 2002; Foster and Garcia, 2008; Witkowski and Verhasselt, 2013). Importantly, we show that Vpr was involved in the microtubule network dynamics and intracellular trafficking modifications underlying deficient phagosome maturation upon HIV infection. Vpr is a small basic protein conserved among human HIV-1 and HIV-2, and SIV. It was reported to regulate cell cycle progression, reverse transcription and viral DNA nuclear import (Guenzel et al., 2014; Kogan and Rappaport, 2011; Planelles and Benichou, 2009; Strebel, 2013) and microtubule-based movement of Vpr has been suggested for early trafficking of internalized viral particles (McDonald et al., 2002). The data detailed in the current study indicate that, following establishment of infection and integration of the viral genome, Vpr interferes with microtubule-dependent vesicular trafficking and impairs normal phagolysosome biogenesis.

The initial formation of phagosomes is dependent upon the actin cytoskeleton, but later

intracellular trafficking of phagosomes to the cell center is mediated predominantly by microtubules (Blocker et al., 1998; Blocker et al., 1996; Desjardins et al., 1994; Harrison et al., 2003). As for other intracellular compartments, several explanations could account for the peripheral localization of phagosomes in HIV-1 infected macrophages, including a difference in the speed or directionality of the centripetal movement or a normal movement towards the cell center followed by a defective anchoring at the cell center. By live cell imaging of HIV-infected macrophages, we observed that the movement of phagosomes was slower following formation of the closed internalized compartment. The velocities that we recorded are of similar magnitude to those speeds already reported (Blocker et al., 1998; Harrison et al., 2003). Importantly, treating the cells with low doses of nocodazole or taxol, which are now known to displace the +TIPs such as EB1 (Akhmanova and Steinmetz, 2010; Gouveia and Akhmanova, 2010), slowed down the perinuclear accumulation of phagosomes approximately two-fold (Blocker et al., 1998). Therefore, the mislocalization of EB1 at the plus ends of microtubules that is induced by HIV-1 Vpr could account for the perturbation of centripetal migration of phagosomes. Consistent with this hypothesis, it has been shown that microtubule plus-end tracking of dynein in neurons and filamentous fungi is critical for correct initiation of retrograde cargo transport (Moughamian and Holzbaur, 2012; Zhang et al., 2010). More recently, an elegant *in vitro* reconstitution system determined that EB1 recruits p150Glued to target the dynein/dynactin complex to the plus ends of microtubules (Duellberg et al., 2014). Therefore, the defect in centripetal movement in HIV-1 infected macrophages may be the consequence of a defect in the initial loading of dynein motors on the plus ends of microtubules to initiate the retrograde movement. The differential location of phagosomes in infected or uninfected, control macrophages could also impact on the efficiency of fusion with other endosomal and lysosomal compartments,

thus delaying acquisition of hydrolytic activities. There are indeed connections between the microtubule cytoskeleton and the machinery that drives membrane fusion. The Rab7 interacting lysosomal protein (RILP), which is an effector of Rab7 and a marker of late endosomes/phagosomes, binds to the v-ATPase complex, to p150Glued, to the Vps11 subunit of the HOPS complex via ORPL1, and is important in the biogenesis of phagolysosomes and bacterial clearance (De Luca et al., 2014; Harrison et al., 2004; Harrison et al., 2003; Johansson et al., 2007; van der Kant et al., 2013). In our study, we report modified trafficking events implicating the Eps15-homology domain APTase protein (EHD3) and MICAL-L1, which participate in sorting events by controlling tubulation at the level of recycling or late endosomes (Abou-Zeid et al., 2011; Cai et al., 2013; Naslavsky and Caplan, 2011). We show for the first time that MICAL-L1 is required for efficient phagosomal maturation. Unexpectedly, EHD3 was highly enriched on the viral compartment. This sequestration could impair its function in the endocytic/phagocytic trafficking and therefore contribute to the defect in phagosomal maturation in HIV-1 infected macrophages.

Our data argue for a model (graphical abstract, Figure 46) in which the phagosomes formed in HIV-1 infected macrophages do not move efficiently onto the microtubules to reach the cell center and show impaired sorting events that are a consequence of the hijacking of the EHD3 and MICAL-L1 components of the sorting machinery, and their re-location to the endosomal virus-containing compartment. An established viral cycle and Vpr expression are required to mediate these events. Altogether, these results provide a more mechanistic understanding of the defects in bacterial killing and clearance that contribute to the establishment of opportunistic infections in HIV-infected patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sébastien Jacques and Florent Dumont (GENOM'IC facility, Institut Cochin), EFS (Saint Vincent de Paul, Trinité and Saint-Antoine) for buffy coat supply, Marie N'Guyen (Institut Pasteur Paris) for her help with the Imagestream technology, Clarisse Berlioz-Torrent (Institut Cochin) for help with viral production, Chantal Deschamps (Institut Cochin) and Melita Gordon (University of Liverpool) for discussions.

This work was supported by grants from Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites (ANRS, AO2012-2 CSS1) to FN and SB, Agence Nationale de la Recherche (2011 BSV3 025 02) and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM DEQ20130326518) to FN. DGR acknowledges support from The National Institutes of Health, USA, award HL100928. JM was supported by a doctoral fellowship from ANRS. AD was supported by doctoral fellowships from Université Paris Descartes and Sidaction.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1. Delay in recruitment of late but not early endocytic markers on phagosomes in HIV-1 infected macrophages.

(A) Primary human macrophages differentiated for 11 days were infected with HIV-1_{ADA} WT or mock infected for 8 days. The cells were incubated for different times with IgG-SRBCs at 37°C. Macrophages were fixed, permeabilized and labeled with AMCA-anti-rabbit IgG to detect the total SRBCs (not shown), anti-p24 followed by Cy2-anti-goat IgG (upper line), anti-LAMP1 (3rd line) or EEA1 (not shown) followed by Cy3-anti-mouse IgG, and anti-tubuline followed by Cy5-anti-human IgG (not shown). Particles internalized in phagosomes are also detectable by phase contrast (2nd line). Merged images (lower line) show SRBCs in blue, LAMP1 in green, and microtubules in red. Z stacks of wild field fluorescent images were acquired, deconvoluted and then treated with ImageJ. Bar, 10 µm.

The number of phagosomes positive for LAMP1 (B) or EEA1 (C) was counted for at least 10 cells per condition. Results are expressed as a percentage of total phagosome number ± SEM (n=3, > 200 phagosomes per condition).

Figure 2. HIV-1 infection of macrophages inhibits phagosomal hydrolytic and oxidative activity and bacterial clearance.

Primary human macrophages were infected with HIV-1_{ADA-VSV-G} WT or mock infected for 8 days before incubation with IgG-opsionized beads for various times. (A) Schematic representation of the detection of hydrolytic activity with DQ-BSA beads and oxidative activity with H2DCFDA-OxyBURST beads within the phagosomes. Modified substrates emit at 520 nm (sensor) and calibration fluorochrome emits at 647 nm (calibrator).

(B) At different times of incubation, cells were placed on ice, resuspended with cold PBS1X, fixed and analyzed by flow cytometry. The percentage of cells containing beads with a modified sensor fluorescence, X axis, (R2) was divided by the total number of cells containing beads (positive for calibrator, Y axis, R1 + R2). Results are expressed as a percentage of cells with phagosomes containing detected hydrolytic (C) or oxidative (D) activity. One representative experiment out of 3 is shown.

(E) Primary human macrophages were infected with HIV-1_{ADA-VSV-G}WT (red bars) or mock infected (black bars) for 8 days before contact with invasive *S. Typhimurium* (E) or *E. coli* (F), incubation in the presence of gentamicin for various time points, lysis and plating. (E) The number of intracellular *S. Typhimurium* at 24h was divided by the number of bacteria at 8h in HIV-1-infected or non-infected macrophages and results are expressed as related to non-infected cells. (F) The number of intracellular *E. coli* at 24h was divided by the number of bacteria at 1h in HIV-1-infected or non-infected macrophages and results are expressed as related to non-infected cells in at least two independent experiments.

(G) Primary human macrophages were treated as in Figure 1A. Cells were incubated for 1 h with IgG-SRBCs at 37°C. Macrophages were fixed, permeabilized and labeled with anti-p24 followed by Cy2-anti-goat IgG (left panel) and AMCA-anti-rabbit IgG to detect the total SRBCs (left panel). Merged images and inserts with details show no presence of p24 in phagosomes. Bar, 10 μ m.

Figure 3. Activation status of HIV-1-infected macrophages and signaling response to phagocytic triggers. Primary human macrophages were non-infected or infected with HIV-1_{ADA}WT for 8 days. Total lysates were subjected to Western blotting with anti-phospho-ERK1/2 (A), anti-phospho p38 (B), anti-phospho SAPK/JNK (C) and anti-

phospho p65/RelA (D). The chemiluminescent signal was quantified and expressed as related to the non-infected condition, showing basal activation by HIV-infection. (E) Macrophages infected for 8 days were incubated for different times with IgG-SRBCs at 37°C, then lysed and analyzed by Western Blot with anti-phospho ERK1/2 and anti-ERK1/2. Results are expressed as a fold increase related to the basal condition for non-infected or HIV-1 infected cells (F). Means \pm SEM of three different experiments are plotted. See also Figure S1.

(G) Primary human macrophages from 3 different donors were infected with HIV-1_{ADA} WT or mock-infected for 8 days. They were incubated or not (basal) with IgG-SRBCs (FcR) or *Salmonella* Typhimurium (4/74 strain) during 1 hour at 37°C, then lysed and RNA of each sample was analyzed with Affymetrix picosIV2 humanGene1.0 ST arrays. Gene up-regulated in P are in red, and gene down-regulated in P are in blue. p value : 0.05. Genes: 558. (H) Schematic distribution after gene ontology classification in 12 selected signaling pathways enriched with pval<0.05. (I) Human macrophages were infected with HIV-1_{ADA} WT or mock-infected for 8 days. They were incubated or not (basal) with IgG-SRBCs (FcR), with complement-SRBCs (CR3) or *Salmonella* Typhimurium (4/74 strain) during 6 h at 37°C. Supernatants were collected and analyzed on human cytokine antibody arrays. Semi-quantitative analysis was performed and the results presented as a table with arrows indicating the differential expression as compared to non-infected conditions. Three independent experiments were performed with similar results.

(J) Primary human macrophages were infected with HIV-1_{ADA} WT or not for 8 days. Primary human T lymphocytes from the same donor were incubated with conditioned supernatants from macrophages or medium as a control and incubated with for 24 h before adding PHA-P for another 48h to induce a polyclonal stimulation of T cells.

Surface expression of CD25 was then analyzed by flow cytometry as a marker of early T cell activation. Results are expressed as a percentage of T cells incubated with medium alone. The means \pm SEM of three different experiments and three donors are plotted.

Figure 4. Integration of HIV-1 and the viral factor Vpr are important for the phagosome maturation defect.

(A) Primary human macrophages were non-infected (black bars) or infected with HIV-1_{ADA} WT (red bars) for 2, 3, 6 or 8 days. At each time point, the cells were incubated for 1 h with IgG-SRBCs at 37°C, fixed and permeabilized. Then, they were labeled with Cy5-anti-rabbit IgG to detect the total SRBCs, an anti-p24 followed by Cy2-anti-goat IgG to detect the infected cells, and an anti-LAMP1, followed by Cy3-anti-mouse IgG. Z stacks of fluorescence images were acquired and analyzed with Image J. The number of phagosomes positive for LAMP1 was calculated for 10 cells (> 200 phagosomes) per condition at each time point. Results are expressed as a percentage of total phagosomes. The means \pm SEM from two independent experiments are plotted.

(B) Primary human macrophages were non-infected (black bars), infected with HIV-1_{ADA} WT alone (red bars) or in the presence of Raltegravir (violet bars) at 10 mM for 8 days. Data were analyzed as in (A).

(C) Primary human macrophages were non-infected or infected with HIV-1_{ADA}WT or HIV-1_{ADA} Δ Nef for 2, 3, 6 or 8 days. At each time point, the cells were incubated for 1 h with IgG-SRBCs at 37°C and fixed. External and internal SRBCs were counted and the efficiency of phagocytosis was calculated for non-infected cells (black bars), HIV-1_{ADA}WT-infected cells (red bars) and 10 HIV-1_{ADA} Δ Nef (green bars). Results are expressed as a percentage of control non-infected cells. The means \pm SEM of 3 independent experiments are plotted.

(D, F) Primary human macrophages were non-infected (black bars) or infected with HIV-1_{ADA}WT (red bars) or HIV-1_{ADA}ΔNef (green bars) for 8 days. Cells were treated and results analyzed as in (A) and (C), respectively. The means ± SEM from five independent experiments are plotted.

(E, G) Primary human macrophages were non-infected (black bars) or infected with HIV-1_{YU-2}WT (red bars) or HIV-1_{YU-2}ΔVpr (blue bars) for 8 days. Cells were treated and results analyzed as in (A) and (C), respectively. The means ± SEM from five independent experiments are plotted.

(H) Murine macrophages (RAW264.7) were transiently transfected to express Vpr-GFP (blue hatched bars) or Nef-GFP (green hatched bars). Cells were then allowed to phagocytose IgG-SRBCs for 1h, fixed, permeabilized and labeled to detect internal SRBCs and murine LAMP1. The number of LAMP1-positive phagosomes was counted and expressed as a percentage of control GFP-negative cells. The means ± SEM of three independent experiments are plotted ($p < 0.05$ for Vpr-GFP).

(I) MDM were nucleofected at day 5 of differentiation to express HA-Vpr. They were then treated as in (D) and with anti-HA antibodies. The number of LAMP1-positive phagosomes was counted and expressed as a percentage of control HA-negative cells.

Figure 5. Centripetal movement of phagosomes is inhibited in HIV-1 infected macrophages.

(A, B) Primary human macrophages were non-infected (black bars) or infected with HIV-1_{ADA}WT (red bars) for 8 days. The cells were incubated for different time points with IgG-SRBCs at 37°C, then fixed and permeabilized. They were labeled and analyzed as described in Figure 1. Peripheral SRBCs, situated at a distance to the nucleus of more than two SRBCs diameter, were counted in at least 10 cells (> 200 phagosomes) per

condition at each time point. Results are expressed as percentage of total number of SRBCs. The means \pm SEM of two independent experiments are plotted.

(C) Primary human macrophages were non-infected (black bars) or infected with HIV-1_{YU-2}WT (red bars) or HIV-1_{YU-2} Δ Vpr (blue bars) for 8 days. Cells were incubated with IgG-SRBCs for 1h at 37°C and then analyzed as in (A). The means \pm SEM of three independent experiments are plotted.

(D) Primary human macrophages were infected with HIV-1Gag-iGFP for 8 days, then incubated with IgG-SRBCs at 37°C under the spinning disk confocal microscope equipped with 5% CO₂ and a heated chamber. Images were recorded every min for 120 min. Gallery of phase contrast images of non-infected (upper panels, see also Movie S1) and HIV-1Gag-iGFP infected (lower panels, see also Movie S2) cells. Bar, 10 μ m.

(E) Primary human macrophages were treated as in (D). The distances covered by internal phagosomes were measured and plotted against time. The speed was calculated by linear regression.

Figure 6. HIV-1 and Vpr perturb the microtubule dynamics and localization of the +TIP EB1

(A) Primary human macrophages were non-infected (upper panels), infected with HIV-1_{YU-2}WT (middle panels) or HIV-1_{YU-2} Δ Vpr (lower panels) for 8 days. Cells were treated or not (basal) with nocodazole at 10 μ M during 1 hour at 37°C. After washing, cells were fixed (time 0) or incubated at 37°C without nocodazole for the indicated times before fixation. Macrophages were then labeled with an anti-p24, followed by Cy2-anti-goat IgG (not shown) and an anti-tubuline, followed by Cy3-anti-mouse IgG. Images are Z projection of stacks of representative tubuline pattern. Bar, 10 μ m.

(B) Primary human macrophages were non-infected (upper panels), infected with HIV-1_{YU-2}WT (middle panels) or HIV-1_{YU-2}ΔVpr (lower panels) for 8 days. The cells were then fixed and stained with an anti-p24, followed by Cy2-anti-goat IgG (not shown) and an anti-EB1, followed by Cy3-anti-mouse IgG. Stack of images were acquired (left panels) and analyzed to define (right panels) and quantify (C) the comet-shaped ellipsoid objects. (C) Macrophages were treated as in B and the number of EB1-positive comets ($n > 2000$ comets per condition) was counted in 12 non-infected (black bars), 12 HIV-1_{YU-2}WT infected (red bars) and 12 HIV-1_{YU-2}ΔVpr (blue bars) cells. Results are expressed as a percentage of control non-infected cells. The means \pm SEM of three independent experiments are plotted.

Figure 7. HIV-1 and Vpr perturb and hijack the EHD3/MICAL-L1 sorting machinery

(A) Primary human macrophages were non-infected (upper panels), infected with HIV-1_{YU-2}WT (middle panels) or HIV-1_{YU-2}ΔVpr (lower panels) for 8 days. The cells were then fixed and stained with an anti-p24, followed by Cy2-anti-goat IgG (left panels) and an anti-EHD3 (A) or anti-MICAL-L1 (B), followed by Cy3-anti-mouse IgG (right panels). Stack of images were acquired and deconvoluted, showing recruitment of EHD3 on the viral compartment and modification of the pattern of MICAL-L1 positive structures.

(C) Human monocytes differentiated in macrophages for 5 days were treated with control siRNA or siRNA against MICAL-L1 (#1 and #2) for 72h. They were then allowed to phagocytose IgG-opsonized SRBCs for 1h, fixed and stained to detect SRBCs with Cy3-anti-rabbit IgG (not shown) and LAMP1 with anti-LAMP1 followed by DyLight 549-anti-mouse IgG (left panels). SRBCs are also detected with phase contrast (right panel). Bar, 10 μ m.

(D) Cells were treated as in (C) and LAMP1 acquisition was quantified as in Figure 1. Results are expressed as a percentage of control cells. The means \pm SEM of three independent experiments are plotted ($p < 0.05$).

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGEND

Supplemental Figure 1 : Signaling response to FcR-mediated stimulation in HIV-1 infected or agonist-stimulated primary human macrophages.

Primary human macrophages differentiated for 11 days with rhMCSF were non-infected, infected with HIV-1ADAWT, or treated with LPS or Poly-IC for 8 days. The cells were then incubated for different times with IgG-SRBCs at 37°C, then lysed and analyzed by Western Blot with anti-phospho-ERK1/2, then stripped and blotted with anti-ERK1/2 or anti-clathrin as a loading control. A representative experiment out of three is presented.

Supplemental Movie S1 and S2: centripetal movement of phagosomes is inhibited in HIV-1 infected macrophages.

Primary human macrophages were infected with HIV-1Gag-iGFP (Movie S2) or not (Movie S1) for 8 days, then incubated with IgG-SRBCs at 37°C under the spinning disk confocal microscope equipped with 5% CO₂ and a heated chamber. Images were recorded every min for 120 min.

REFERENCES

- Abou-Zeid, N., Pandjaitan, R., Sengmanivong, L., David, V., Le Pavec, G., Salamero, J., and Zahraoui, A. (2011). MICAL-like1 mediates epidermal growth factor receptor endocytosis. *Mol Biol Cell* *22*, 3431-3441.
- Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2010). Microtubule +TIPs at a glance. *J Cell Sci* *123*, 3415-3419.
- Blocker, A., Griffiths, G., Olivo, J.C., Hyman, A.A., and Severin, F.F. (1998). A role for microtubule dynamics in phagosome movement. *J Cell Sci* *111 (Pt 3)*, 303-312.
- Blocker, A., Severin, F.F., Habermann, A., Hyman, A.A., Griffiths, G., and Burkhardt, J.K. (1996). Microtubule-associated protein-dependent binding of phagosomes to microtubules. *J Biol Chem* *271*, 3803-3811.
- Botelho, R.J., and Grinstein, S. (2011). Phagocytosis. *Curr Biol* *21*, R533-538.
- Cai, B., Giridharan, S.S., Zhang, J., Saxena, S., Bahl, K., Schmidt, J.A., Sorgen, P.L., Guo, W., Naslavsky, N., and Caplan, S. (2013). Differential roles of C-terminal Eps15 homology domain proteins as vesiculators and tubulators of recycling endosomes. *J Biol Chem* *288*, 30172-30180.
- Canton, J., Neculai, D., and Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol* *13*, 621-634.
- Carter, C.A., and Ehrlich, L.S. (2008). Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. *Annu Rev Microbiol* *62*, 425-443.
- Collman, R.G., Perno, C.F., Crowe, S.M., Stevenson, M., and Montaner, L.J. (2003). HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *J Leukoc Biol* *74*, 631-634.
- De Luca, M., Cogli, L., Progida, C., Nisi, V., Pascolutti, R., Sigismund, S., Di Fiore, P.P., and Bucci, C. (2014). RILP regulates vacuolar ATPase through interaction with the V1G1 subunit. *J Cell Sci* *127*, 2697-2708.
- Deschamps, C., Echard, A., and Niedergang, F. (2013). Phagocytosis and cytokinesis: do cells use common tools to cut and to eat? Highlights on common themes and differences. *Traffic* *14*, 355-364.
- Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G., and Griffiths, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* *124*, 677-688.
- Duellberg, C., Trokter, M., Jha, R., Sen, I., Steinmetz, M.O., and Surrey, T. (2014). Reconstitution of a hierarchical +TIP interaction network controlling microtubule end tracking of dynein. *Nat Cell Biol*.
- Fackler, O.T., and Baur, A.S. (2002). Live and let die: Nef functions beyond HIV replication. *Immunity* *16*, 493-497.
- Fairn, G.D., and Grinstein, S. (2012). How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol* *33*, 397-405.
- Flannagan, R.S., Cosio, G., and Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* *7*, 355-366.
- Flannagan, R.S., Jaumouille, V., and Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annual review of pathology* *7*, 61-98.
- Foster, J.L., and Garcia, J.V. (2008). HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology* *5*, 84.
- Gaudin, R., Berre, S., Cunha de Alencar, B., Decalf, J., Schindler, M., Gobert, F.X., Jouve, M., and Benaroch, P. (2013). Dynamics of HIV-containing compartments in macrophages reveal sequestration of virions and transient surface connections. *PLoS One* *8*, e69450.

- Gouveia, S.M., and Akhmanova, A. (2010). Cell and molecular biology of microtubule plus end tracking proteins: end binding proteins and their partners. *International review of cell and molecular biology* 285, 1-74.
- Guenzel, C.A., Herate, C., and Benichou, S. (2014). HIV-1 Vpr-a still "enigmatic multitasker". *Frontiers in microbiology* 5, 127.
- Harrison, R.E., Brumell, J.H., Khandani, A., Bucci, C., Scott, C.C., Jiang, X., Finlay, B.B., and Grinstein, S. (2004). Salmonella impairs RILP recruitment to Rab7 during maturation of invasion vacuoles. *Mol Biol Cell* 15, 3146-3154.
- Harrison, R.E., Bucci, C., Vieira, O.V., Schroer, T.A., and Grinstein, S. (2003). Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol* 23, 6494-6506.
- Jacquot, G., Le Rouzic, E., David, A., Mazzolini, J., Bouchet, J., Bouaziz, S., Niedergang, F., Pancino, G., and Benichou, S. (2007). Localization of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope: impact on Vpr functions and virus replication in macrophages. *Retrovirology* 4, 84.
- Jambo, K.C., Banda, D.H., Kankwatira, A.M., Sukumar, N., Allain, T.J., Heyderman, R.S., Russell, D.G., and Mwandumba, H.C. (2014). Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function. *Mucosal immunology*.
- Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V.M., and Neefjes, J. (2007). Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betall spectrin. *J Cell Biol* 176, 459-471.
- Jouve, M., Sol-Foulon, N., Watson, S., Schwartz, O., and Benaroch, P. (2007). HIV-1 buds and accumulates in "nonacidic" endosomes of macrophages. *Cell Host Microbe* 2, 85-95.
- Kedzierska, K., and Crowe, S.M. (2002). The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr Med Chem* 9, 1893-1903.
- Kogan, M., and Rappaport, J. (2011). HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology* 8, 25.
- Koppensteiner, H., Banning, C., Schneider, C., Hohenberg, H., and Schindler, M. (2012a). Macrophage internal HIV-1 is protected from neutralizing antibodies. *J Virol* 86, 2826-2836.
- Koppensteiner, H., Brack-Werner, R., and Schindler, M. (2012b). Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology* 9, 82.
- Lee, M.S., and Kim, Y.J. (2007). Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* 76, 447-480.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2007). New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 37, 14-16.
- Marion, S., Mazzolini, J., Herit, F., Bourdoncle, P., Kambou-Pene, N., Hailfinger, S., Sachse, M., Ruland, J., Benmerah, A., Echard, A., *et al.* (2012). The NF-kappaB Signaling Protein Bcl10 Regulates Actin Dynamics by Controlling AP1 and OCRL-Bearing Vesicles. *Dev Cell* 23, 954-967.
- Mazzolini, J., Herit, F., Bouchet, J., Benmerah, A., Benichou, S., and Niedergang, F. (2010). Inhibition of phagocytosis in HIV-1-infected macrophages relies on Nef-dependent alteration of focal delivery of recycling compartments. *Blood* 115, 4226-4236.
- McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M., and Hope, T.J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* 159, 441-452.
- Moretti, J., and Blander, J.M. (2014). Insights into phagocytosis-coupled activation of pattern recognition receptors and inflammasomes. *Curr Opin Immunol* 26, 100-110.
- Moughamian, A.J., and Holzbaur, E.L. (2012). Dynactin is required for transport initiation from the distal axon. *Neuron* 74, 331-343.

- Naslavsky, N., and Caplan, S. (2011). EHD proteins: key conductors of endocytic transport. *Trends Cell Biol* 21, 122-131.
- Niedergang, F., Colucci-Guyon, E., Dubois, T., Raposo, G., and Chavrier, P. (2003). ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J Cell Biol* 161, 1143-1150.
- Patel, P.C., Fisher, K.H., Yang, E.C., Deane, C.M., and Harrison, R.E. (2009). Proteomic analysis of microtubule-associated proteins during macrophage activation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8, 2500-2514.
- Planelles, V., and Benichou, S. (2009). Vpr and its interactions with cellular proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 339, 177-200.
- Podinovskaia, M., Lee, W., Caldwell, S., and Russell, D.G. (2013). Infection of macrophages with *Mycobacterium tuberculosis* induces global modifications to phagosomal function. *Cell Microbiol* 15, 843-859.
- Russell, D.G., and Yates, R.M. (2007). TLR signalling and phagosome maturation: an alternative viewpoint. *Cell Microbiol* 9, 849-850.
- Sabo, Y., Walsh, D., Barry, D.S., Tinaztepe, S., de Los Santos, K., Goff, S.P., Gundersen, G.G., and Naghavi, M.H. (2013). HIV-1 induces the formation of stable microtubules to enhance early infection. *Cell Host Microbe* 14, 535-546.
- Schreiber, F., Lynn, D.J., Houston, A., Peters, J., Mwafulirwa, G., Finlay, B.B., Brinkman, F.S., Hancock, R.E., Heyderman, R.S., Dougan, G., *et al.* (2011). The human transcriptome during nontyphoid *Salmonella* and HIV coinfection reveals attenuated NFkappaB-mediated inflammation and persistent cell cycle disruption. *J Infect Dis* 204, 1237-1245.
- Scott, C.C., Vacca, F., and Gruenberg, J. (2014). Endosome maturation, transport and functions. *Seminars in cell & developmental biology* 31, 2-10.
- Strebel, K. (2013). HIV accessory proteins versus host restriction factors. *Current opinion in virology* 3, 692-699.
- Underhill, D.M., and Goodridge, H.S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* 12, 492-502.
- van der Kant, R., Fish, A., Janssen, L., Janssen, H., Krom, S., Ho, N., Brummelkamp, T., Carette, J., Rocha, N., and Neefjes, J. (2013). Late endosomal transport and tethering are coupled processes controlled by RILP and the cholesterol sensor ORP1L. *J Cell Sci* 126, 3462-3474.
- Witkowski, W., and Verhasselt, B. (2013). Contributions of HIV-1 Nef to immune dysregulation in HIV-infected patients: a therapeutic target? *Expert opinion on therapeutic targets* 17, 1345-1356.
- Yates, R.M., Hermetter, A., Taylor, G.A., and Russell, D.G. (2007). Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. *Traffic* 8, 241-250.
- Yates, R.M., and Russell, D.G. (2008). Real-time spectrofluorometric assays for the luminal environment of the maturing phagosome. *Methods Mol Biol* 445, 311-325.
- Zhang, J., Zhuang, L., Lee, Y., Abenza, J.F., Penalva, M.A., and Xiang, X. (2010). The microtubule plus-end localization of *Aspergillus* dynein is important for dynein-early-endosome interaction but not for dynein ATPase activation. *J Cell Sci* 123, 3596-3604.

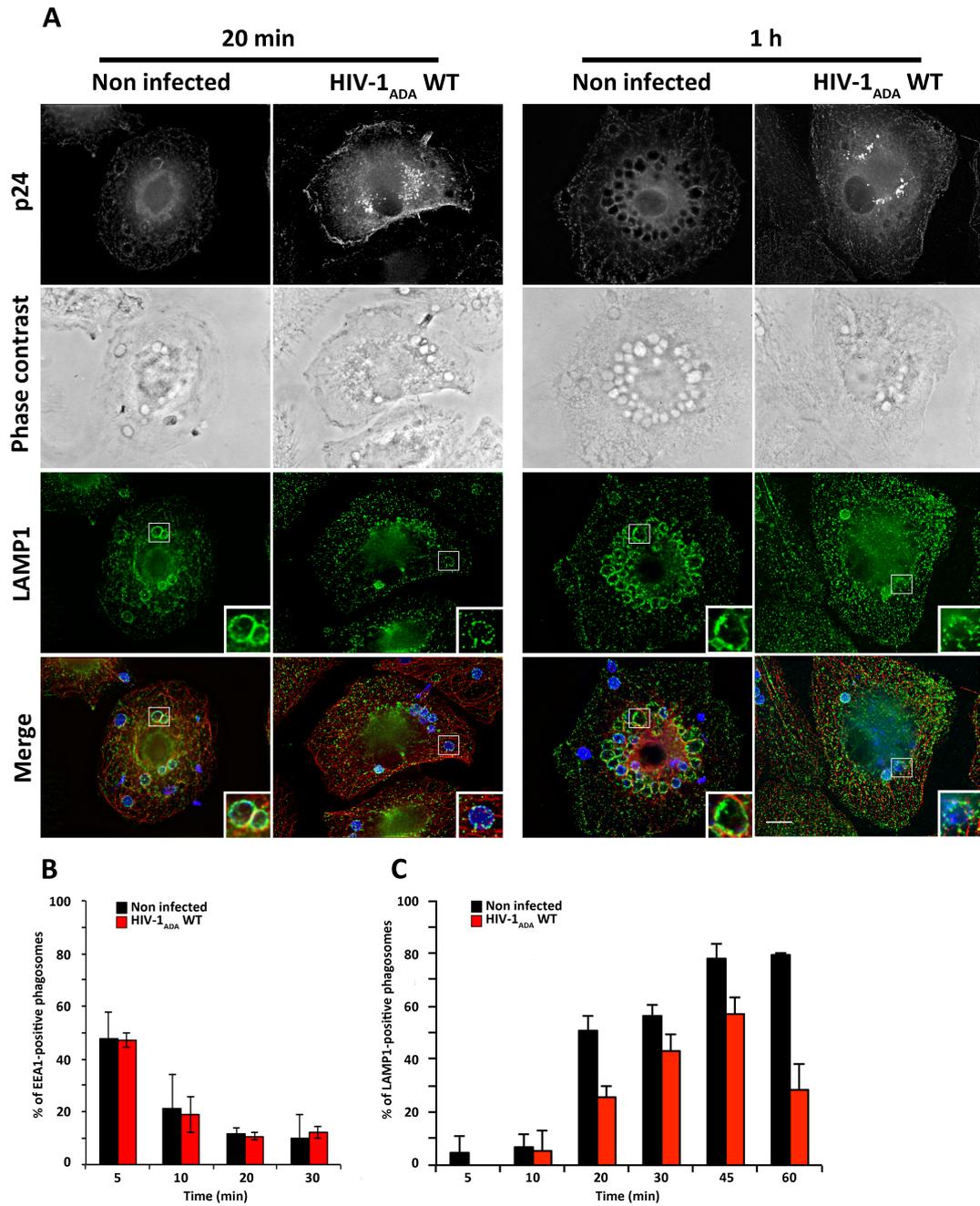


Figure 1

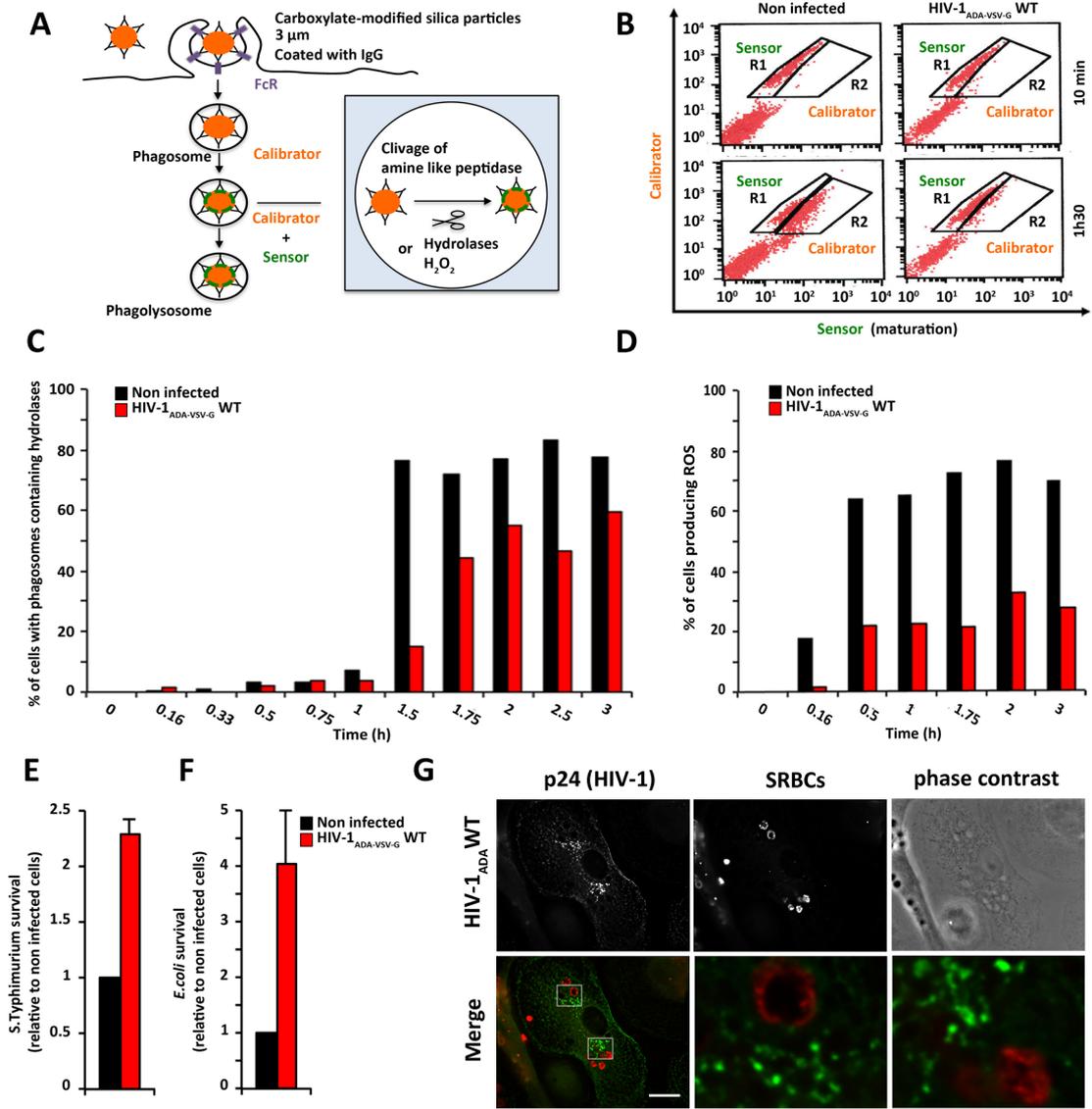


Figure 2

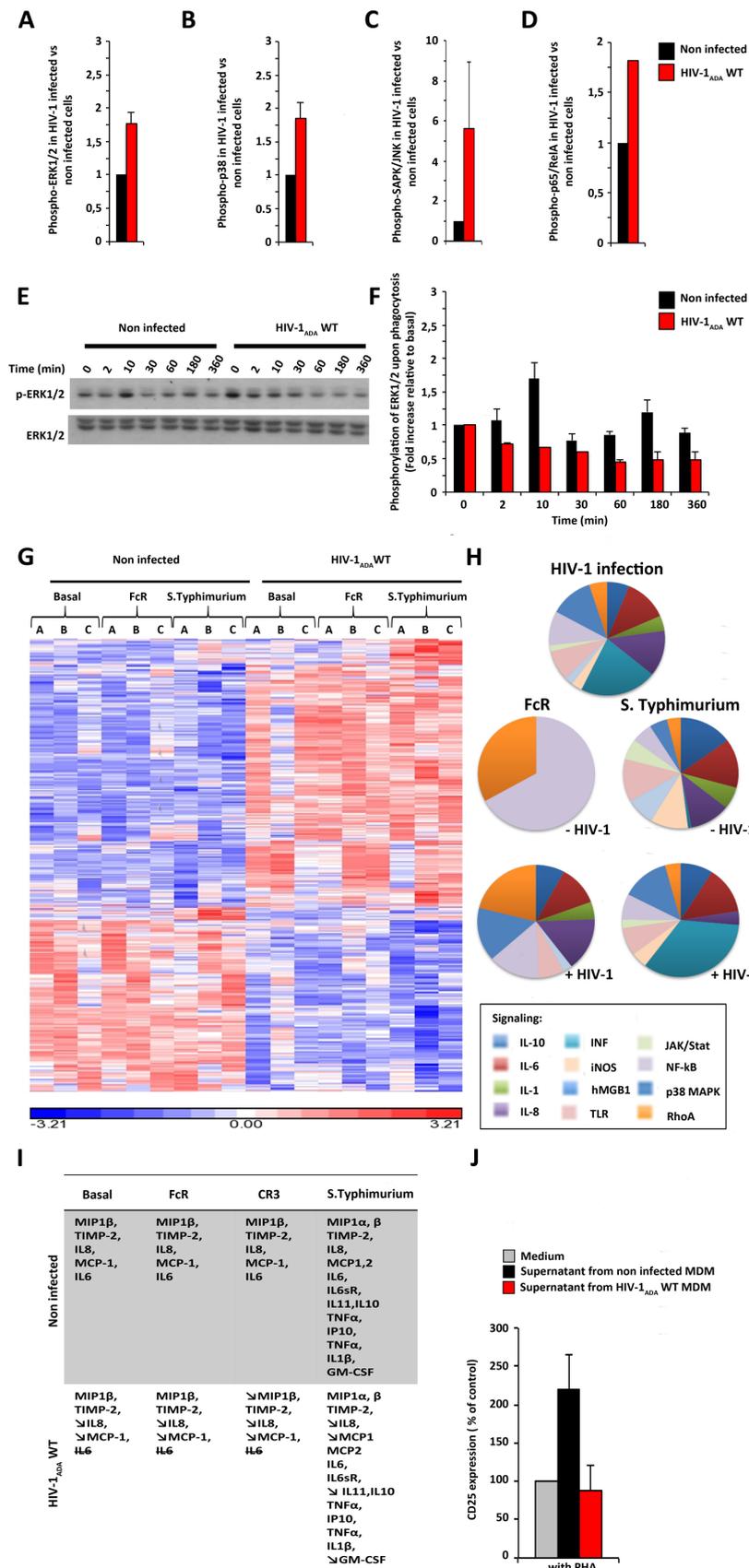


Figure 3

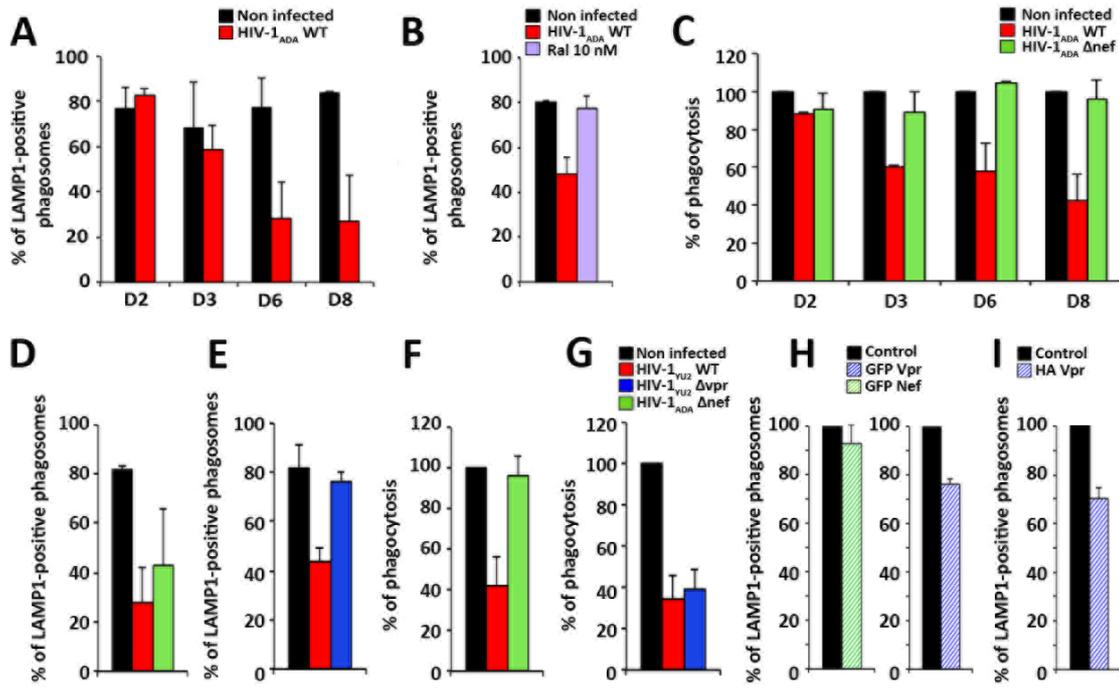


Figure 4

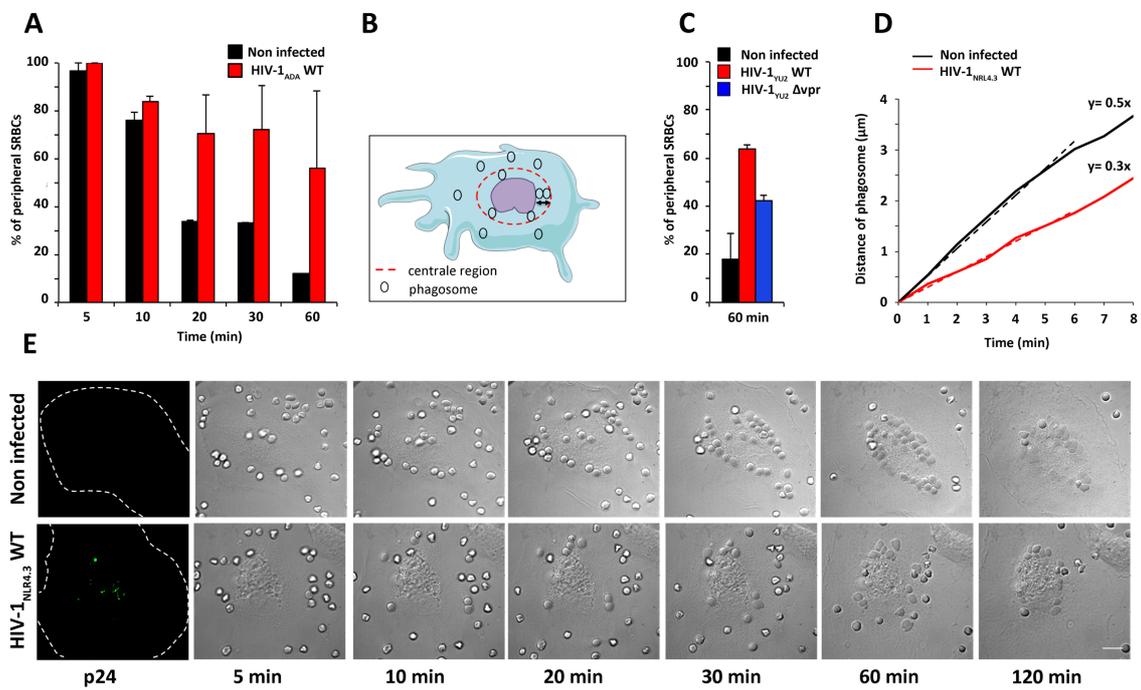


Figure 5

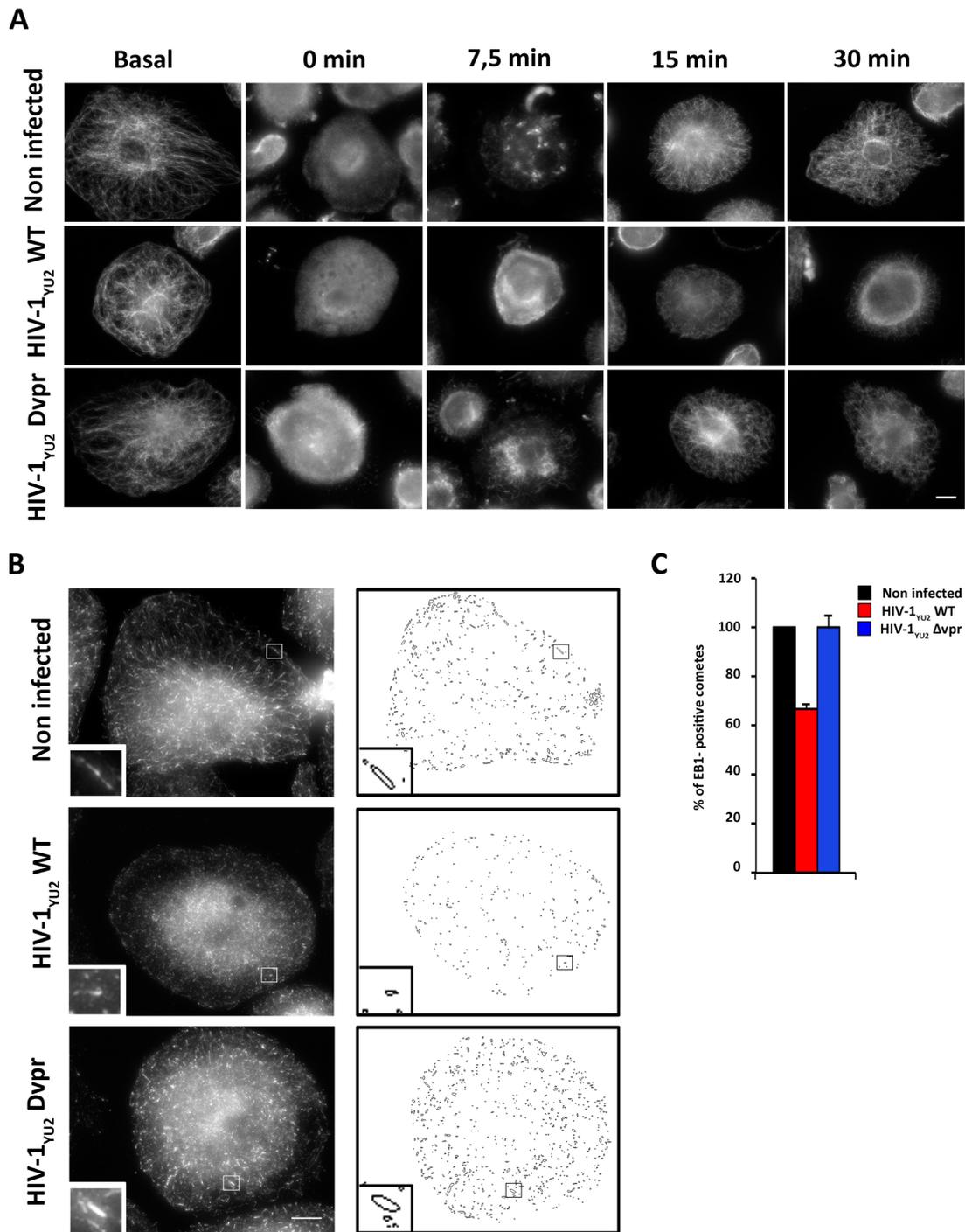


Figure 6

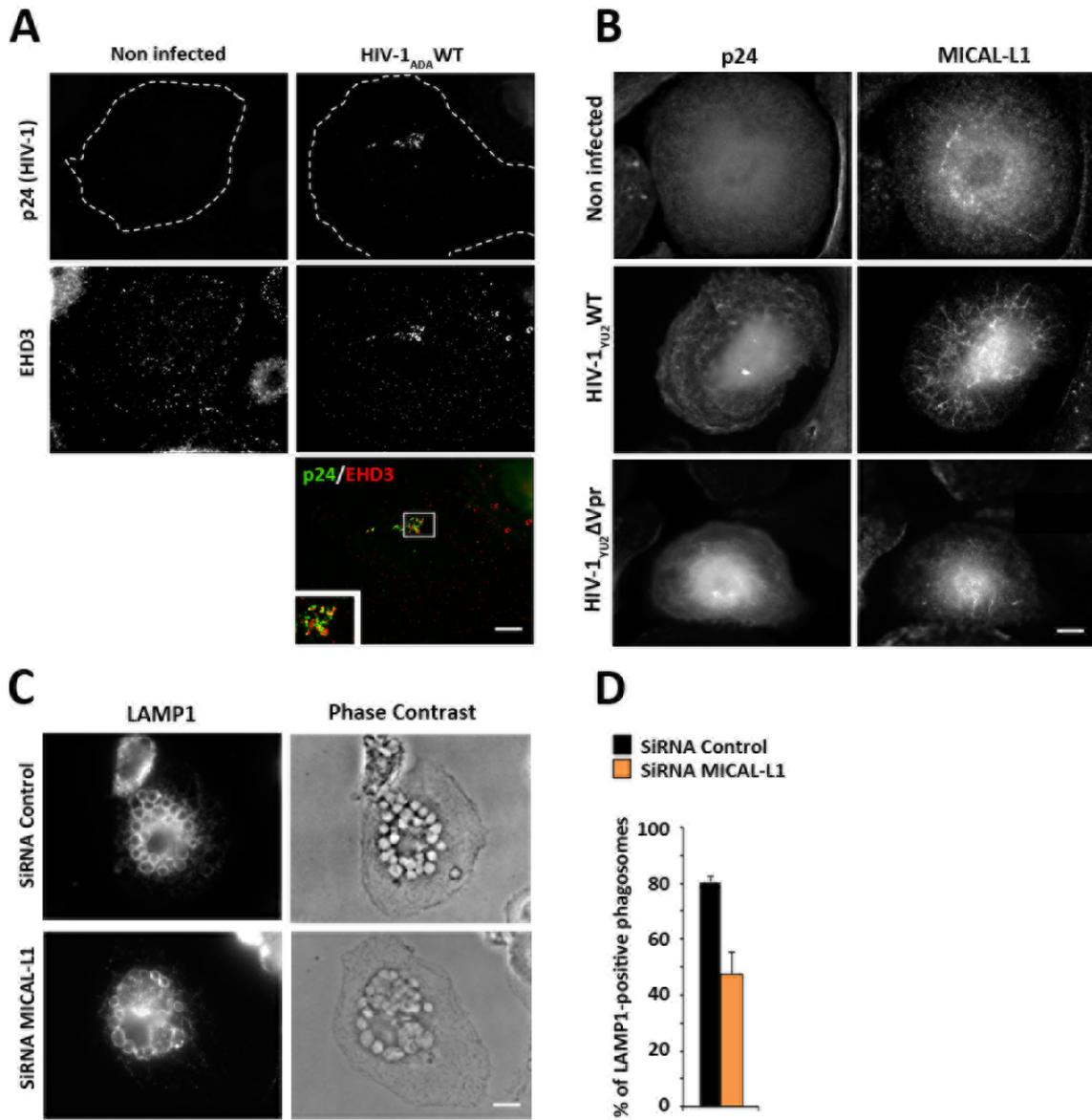
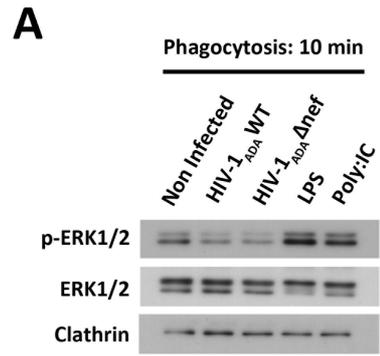


Figure 7



Supplementary Figure 1

Discussion/perspectives

La maturation du phagosome est une étape fondamentale de la phagocytose. Elle est définie par l'évolution d'un phagosome fermé en phagolysosome. Cette étape se finalise par la dégradation de divers microorganismes et s'accompagne de l'activation des macrophages caractérisée par la transcription de gènes et la sécrétion de cytokines jouant de rôles multiples lors de l'inflammation. Pour être efficace, elle nécessite, entre autre, des fusions et fissions avec la voie d'endocytose, une acidification progressive, et un enrichissement en hydrolases et espèce réactives oxygénées. Ces derniers confèrent ainsi des propriétés distinctes au phagosome évolutif, qui suit une migration centripète vers la région périnucléaire le long des microtubules. De nombreux pathogènes, comme *C. burnetii*, *M. tuberculosis*, *S. Typhimurium*, ou encore le VIH-1, comme nous venons de le voir, sont capables de détourner la maturation du phagosome à leur profit, ce qui a pour conséquence une diminution de la clairance du matériel ingéré (pour revue Amer and Swanson, 2002; Blocker et al., 1997; Blocker et al., 1996; Flanagan et al., 2012; Scott et al., 2003; Smith and May, 2013; Vieira et al., 2002). Des observations cliniques et des résultats obtenus *in vitro*, y compris lors de ce travail, ont révélé que les macrophages infectés présentent une déficience de phagocytose et de production de cytokines, favorisant le développement de maladies opportunistes (Biggs et al., 1995; Crowe et al., 1994; Mazzolini et al., 2010). De façon inattendue, la protéine virale Vpr, connue pour détourner de nombreux composants intracellulaires afin de faciliter la réplication virale, s'est révélée être impliquée dans l'inhibition de la maturation du phagosome induite par le VIH-1.

I. Compartimentation cellulaire et clairance bactérienne

Lors de ce travail de thèse, nous avons constaté une diminution de l'acquisition du marqueur LAMP1 sur les phagosomes issus de la stimulation de différents récepteurs (FcR, CR3) dans des macrophages infectés par diverses souches du VIH-1 (Figure 1 et 4 Article, Figure 44). Ceci suggère que le défaut de maturation des phagosomes observé est lié à un mécanisme commun inhérent à l'évolution du phagosome en phagolysosome et aux récepteurs aux opsonines, indépendamment de la souche virale utilisée. Ce mécanisme n'est pas sans rappeler, celui de *M. tuberculosis* et *L. pneumophila* dans les macrophages qui

restent confinés dans les macrophages dans un phagosome précoce, marqué par l'absence de Rab7 et/ou LAMP1 (Roy et al., 1998; Via et al., 1997). Dans le cas de notre étude, nous n'avons pas investigué le recrutement de petites protéines G, comme Rab5 et Rab7, sur le phagosome, mais il semble évident que de telles expériences pourraient nous apporter des informations complémentaires sur le stade bloqué dans la maturation du phagosome. Compte tenu de la présence de EEA1 sur les phagosomes des macrophages infectés ou non dans notre modèle, la protéine Rab5 pourrait également être recrutée sur le phagosome précoce, via une activation coopérative de Rabex-5 et de la Rabaptin-5 (Christoforidis and Zerial, 2000). Le mécanisme d'inhibition de la protéine LAMP1 ne semble pas être lié à la persistance de marqueurs précoces sur le phagosome, comme c'est le cas après stimulation des macrophages avec l'INF γ (Pei et al., 2014). La diminution de EEA1 sur le phagosome est observable et identique dans les macrophages infectés et non infectés (Figure 1 Article). En revanche, la réduction drastique de LAMP1 sur le phagosome, pourrait être le témoin d'un problème de fusion entre les endosomes et les phagosomes tardifs, suggérant un défaut d'acquisition de la protéine Rab7 (Desjardins et al., 1994; Huynh et al., 2007; Huynh et al., 2010). Afin de répondre à un éventuel blocage de la transition Rab5-Rab7, nous avons initié des expériences portant sur le complexe HOPS, en collaboration avec l'équipe de E. Ghigo. Cette équipe a montré que l'activation du complexe HOPS était indispensable à la maturation du phagosome menant à la clairance de *C. burnetii* dans les macrophages primaires de souris (Barry et al., 2012). Nous avons donc analysé par Western Blot, l'activation d'une des sous unités de ce complexe, la protéine Vps41, sur des lysats de macrophages primaires humains infectés ou non par le VIH-1. Les résultats préliminaires nous informent que la quantité de la protéine Vps41 est identique dans les macrophages infectés et non infectés à l'état basal et ne montrent aucune phosphorylation de Vps41 dans les deux conditions (Figure 47). Il faudrait maintenant regarder le profil d'activation de Vps41 après induction de la phagocytose induite par le récepteur Fc, qui pourrait varier entre la condition infectée et non infectée et ainsi renforcer le blocage de la maturation du phagosome au stade tardif. Pour des raisons techniques, cette expérience n'a pas pu être réalisée en parallèle de la première. Par ailleurs, les données de l'analyse transcriptomique témoignent d'une forte augmentation de l'expression du gène DC-LAMP (appelée aussi, CD208, ou LAMP3) dans les macrophages infectés par le VIH-1 (Figure 45). Cette observation pourrait soutenir l'hypothèse selon laquelle, le VIH-1 bloquerait la maturation du phagosome en le maintenant dans une configuration intermédiaire, dépourvu de la protéine LAMP1, mais caractérisée par l'acquisition de nouveaux marqueurs, comme il a déjà été observé pour les VCC (Berre et al.,

2013). En effet, la protéine LAMP3, homologue de CD68 dans les macrophages, est une protéine caractéristique des cellules dendritiques matures qui se localisent dans des compartiments positifs pour le CMH_{II} après stimulation des cellules par du LPS ou du dextran (de Saint-Vis et al., 1998; Geissmann et al., 2002). Elle pourrait donc marquer des compartiments moins dégradatifs dans les macrophages infectés par le VIH-1.

Nous avons observé que l'inhibition de la maturation du phagosome est caractérisée par l'absence du recrutement de marqueurs endocytiques, mais elle est également étayée par une diminution de fonctions phagosomales fondamentales : l'activité hydrolytique/protéolytique et la production d'espèces réactives oxygénées (Figure 2 Article). Ces deux caractéristiques sont essentielles à la fonction bactéricide ou parasiticide terminale du phagolysosome (Nunes et al., 2013; Podinovskaia et al., 2013; Sacks and Sher, 2002; Yates et al., 2005). Des études menées sur l'activation de macrophages murins dérivés de la moelle osseuse ont montré qu'elle modifie les capacités de dégradation du phagosome précoce (Yates et al., 2007). Ceci pourrait soutenir l'hypothèse qu'une « pré-activation » spécifique des macrophages infectés par le VIH-1 serait le support d'un défaut de la maturation du phagosome (Figure 3 Article). De plus, l'activation des macrophages, par le VIH-1 entre autre, entraîne une stabilisation du réseau de microtubules (Patel et al., 2009; Sabo et al., 2013), dont la dynamique est affectée dans notre modèle. Le VIH-1 est capable de modifier des gènes relatifs à la signalisation de l'enzyme iNOS, responsable de la production de NO (Figure 3 Article) (Chakravorty and Hensel, 2003). Des champignons comme *Blastomyces dermatidis* inhibent l'activité enzymatique de iNOS, par un mécanisme inconnu à l'heure d'aujourd'hui, ce qui confère un environnement propice à leur résistance dans les macrophages (Rocco et al., 2011). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle le VIH-1, en interagissant avec iNOS ou d'autres protéines responsables de la production de NO, favoriserait la réplication ou le maintien de bactéries dans un compartiment faiblement dégradatif, comme c'est le cas dans notre modèle de globules rouges opsonisés. *S. Typhimurium* contrecarre les effets des ROS par son matériel bactérien (De Groote et al., 1997). La protéine SNAP23 est une protéine SNARE qui contribue indirectement à la production de ROS dans les phagosomes. L'utilisation d'un dominant négatif de cette protéine entraîne une diminution drastique de la production de ces derniers ainsi que des composants du complexe de la NADPH oxydase (Sakurai et al., 2012). Ainsi, compte tenu de l'aptitude du VIH-1 à diminuer le recrutement de protéines phagosomales, il serait possible d'envisager que le virus interagisse avec cette SNARE ou des composants de la NADPH oxydase, comme p40^{phox} ou gp91^{phox} afin de contrôler la production de ROS dans les

macrophages. Enfin, il a été montré que le VIH-1 était maintenu dans un compartiment non acide, le VCC, via l'exclusion de la v-ATPase (Jouve et al., 2007) et que la protéine Nef interagissait avec la v-ATPase (Lu et al., 1998). Dans notre cas, les VCC et les phagosomes semblent être deux compartiments intracellulaires distincts (Figure 2 Article). Il serait possible que le VIH-1 interfère dans l'acidification des compartiments intracellulaires via une interaction directe avec la v-ATPase, et qu'il soit ainsi à l'origine d'une modification du pH dans les phagosomes soutenant ainsi les effets qu'il opère sur l'activité hydrolytique et la production de ROS.

Ces différents résultats suggèrent qu'en détournant les composants de compartiments intracellulaires, le VIH-1 favorise un environnement faiblement dégradatif au phagosome propice à la résistance et à la réplication de bactéries pathogènes ou commensales intracellulaires, comme le suggère le test de survie de *Salmonella* Typhimurium et *E. coli* (Figure 2 E et F Article).

Actuellement, peu de données nous informent sur le mécanisme de persistance de bactéries pathogènes comme *Salmonella* Typhimurium ou *Mycobacterium tuberculosis* dans les macrophages infectés par le VIH-1, bien que de nombreux cas de co-infections soient répertoriés par l'OMS. Dans notre modèle, nous avons montré que le VIH-1 permettait l'arrêt de la maturation du phagosome dans un stade intermédiaire (présence de EEA1, absence de LAMP1) caractérisé par une faible activité dégradative (ROS, hydrolases). Ainsi, il serait possible d'envisager que ces caractéristiques démontrées via un modèle basé sur des globules rouges soient transposables à ces deux pathogènes. D'autant plus, que lors de simples infections par *Salmonella* ou *Mycobacterium*, ces deux bactéries sont capables de détourner des composants du trafic intracellulaire (iNOS, EEA1, NADPH oxydase, Vps34, RILP) par leur matériel bactérien en faveur d'une meilleure survie intracellulaire (Davis et al., 2007; Fratti et al., 2001; Fratti et al., 2003b; Gallois et al., 2001; Harrison et al., 2004; Via et al., 1997).

Ainsi, le modèle de détournement du trafic intracellulaire par le VIH-1 que nous proposons pourrait être à l'origine de celui qui témoigne en partie de la persistance de bactéries pathogènes dans le cas de co-infections et serait critique pour la persistance de bactéries commensales qui ne disposent pas de programme de survie intracellulaire, comme *E. coli*.

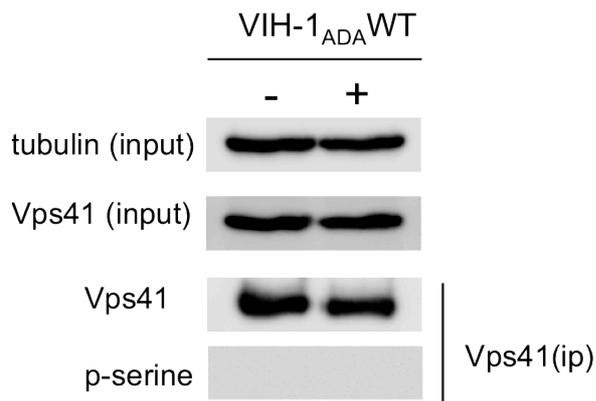


Figure 47. Expression et activation de la protéine Vps41 dans des macrophages infectés par le VIH-1. Les macrophages primaires humains ont été non infectés ou infectés pendant 8 jours avec le VIH-1_{ADA} WT. A l'état basal, les lysats totaux des macrophages à ont été soumis au Western Blot avec un anti-tubuline (ligne 1) et un anti-Vps41 (ligne 2). Sur ces lysats, une immunoprécipitation anti-Vps41 a été réalisée (ligne 3), suivi d'un anti-phospho Serine de Vps41 (ligne 4).

II. Rôle du cytosquelette de microtubules

La phagocytose est un mécanisme en partie régenté par le cytosquelette de la cellule. La formation initiale de la coupe phagocytaire est dépendante du cytosquelette d'actine, alors que les étapes de maturation du phagosome sont sous le contrôle des microtubules. Ces derniers servent de rails au phagosome qui se déplace de la périphérie de la cellule vers la région périnucléaire suivant un mouvement centripète (Blocker et al., 1998; Blocker et al., 1997; Blocker et al., 1996; Desjardins et al., 1994; Harrison and Grinstein, 2002). La localisation périphérique des phagosomes observées dans les macrophages infectés par le VIH-1 (Figure 5 Article) pourrait s'expliquer par une différence de vitesse ou directionnelle des phagosomes suivant un mouvement centripète, ou bien un défaut d'ancrage des phagosomes dans la région périnucléaire de la cellule. Des expériences de vidéomicroscopie sur des macrophages ont permis de nous affranchir de ces différentes hypothèses. En effet, nous n'avons pas observé de problèmes d'ancrage ou de mouvement browniens des phagosomes dans les macrophages infectées. Cependant, nous avons constaté que le mouvement des phagosomes pour atteindre la région périnucléaire était plus lent dans les macrophages infectés en comparaison des macrophages non infectés. La vélocité enregistrée a une magnitude identique à celles déjà reportées (Figure 5 Article) (Blocker et al., 1998; Harrison et al., 2003). Afin de détecter la localisation des phagosomes suivant le réseau de microtubules nous avons initié des expériences de vidéomicroscopie en présence de paclitaxel fluorescent. Ce dernier est une drogue, qui à fortes doses, stabilise le réseau de microtubules, mais qui, à de faibles concentrations devrait permettre de marquer les microtubules sans déstabiliser leur dynamique. Nous avons donc utilisé cette sonde fluorescente à des concentrations comprises entre 1 et 0,5 μM . Mais nous avons toutefois rencontré des difficultés à l'utilisation de ce produit. En effet, suite à l'ajout du paclitaxel sur les cellules, ce dernier s'incorpore bien dans

les microtubules mais le signal devient de plus en plus fort au cours du temps et semble stabiliser le réseau de microtubules. Il faudrait donc poursuivre la mise au point de cette technique afin d'atteindre la concentration requise pour ne pas stabiliser le réseau de microtubule tout en gardant une fluorescence détectable par le microscope. Le traitement des cellules avec de faibles doses de nocodazole ou taxol, connu pour retirer les protéines de la famille (+) TIP comme EB1 de l'extrémité (+) des microtubules (Akhmanova and Steinmetz, 2010; Gouveia and Akhmanova, 2010), diminue d'environ 2 fois la vitesse d'accumulation des phagosomes en région périnucléaire (Blocker et al., 1998). Bien que nous n'ayons pas encore montré ce résultat *in vivo*, le défaut de localisation de EB1 sur l'extrémité (+) des microtubules induite par le VIH-1 observé *in vitro* (Figure 6 Article) pourrait être une des explications de la perturbation de la migration centripète des phagosomes. En parallèle, nous avons également testé l'implication d'une seconde protéine de la famille des (+) TIP, CLIP-170. L'infection virale ne nous a révélé aucun phénotype particulier en terme de localisation cellulaire de la protéine CLIP-170, ce qui témoigne de la spécificité de la protéine EB1 dans notre modèle. De façon consistante avec l'hypothèse selon laquelle Vpr perturbe la localisation de protéines impliquées dans la dynamique des microtubules témoignant d'un défaut de migration centripète des phagosomes, il a été montré que le recrutement de dynéines sur les extrémités (+) des microtubules dans les neurones et les moisissures filamenteuses était critique pour l'initiation du transport de cargo dans le sens rétrograde (Moughamian and Holzbaur, 2012; Zhang et al., 2010a). Des études récentes basées sur un système de reconstitution *in vitro* ont déterminé que la protéine EB1 était à l'origine du recrutement de la protéine p150^{Glued} afin de permettre au complexe dynéine/dynactine de se fixer sur l'extrémité (+) des microtubules (Duellberg et al., 2014). Ainsi, le défaut de migration centripète des microtubules pourrait être apparenté à un défaut initial de chargement de moteurs dynéines cytoplasmiques sur l'extrémité (+) des microtubules, mécanisme initiateur du transport rétrograde. Le différentiel de localisation des phagosomes apporté par les dynéines dans les macrophages infectés ou non infectés pourrait avoir un impact sur l'efficacité des phagosomes à fusionner avec les endosomes et les lysosomes (Desjardins et al., 1994). Il serait donc envisageable qu'un tel mécanisme soit à l'origine de l'inhibition du recrutement de LAMP1 sur les phagosomes ainsi que du retard de l'activité hydrolytique. Il existe déjà des connexions entre le cytosquelette de microtubules et la machinerie de fusion des compartiments intracellulaires. La protéine RILP, qui est un effecteur de Rab7 et un marqueur des endosomes/phagosomes, lie le complexe v-ATPase, la sous unité p150^{Glued} du complexe dynactine, la sous-unité Vps11 du complexe HOPS via ORPL1. Ces interactions sont

essentielles à la biogenèse des phagosomes et à la clairance bactérienne (De Luca et al., 2014; Harrison et al., 2004; Harrison et al., 2003; van der Kant et al., 2013). En adéquation avec ce mécanisme, le transcriptome nous informe d'une diminution partielle du transcrit RILP like 1 dans les macrophages infectés en comparaison des macrophages non infectés (Figure 45). Ce résultat suggère donc un rôle potentiel de cette protéine dans le modèle que nous proposons.

Dans notre étude nous avons également rapporté que la modification du trafic intracellulaire impliquait les protéines EHD3 et MICAL-L1 (Figure 7 Article). Ces deux protéines participent aux événements de tri intracellulaires, en contrôlant le niveau de tubulation des endosomes de recyclage et tardifs, et font l'objet d'études approfondies dans notre laboratoire (Abou-Zeid et al., 2011; Cai et al., 2013; Naslavsky and Caplan, 2011). De façon inattendue, EHD3 est fortement enrichi sur le compartiment viral (VCC) et la protéine MICAL-L1 est fortement tubulée en présence du virus du VIH-1. La séquestration de EHD3 dans les VCC pourrait avoir un impact sur les fonctions de cette protéine et sur celles de MICAL-L1 dans le trafic endocyttaire/phagocytaire ce qui contribuerait au défaut de maturation du phagosome dans les macrophages infectés par le VIH-1. D'autant plus que l'extinction du gène MICAL-L1 entraîne une diminution du recrutement de LAMP1 sur les phagosomes (Figure 7 Article). Il nécessiterait une investigation supplémentaire de la protéine EHD3, via des expériences de siRNA dirigées contre le gène EHD3, suivies de sa restauration, afin de nous éclaircir sur les mécanismes précis mis en jeu dans le contexte d'une infection virale.

Enfin, l'apport lysosomal aux phagosomes peut également faire intervenir d'autres compartiments intracellulaires comme l'appareil de Golgi. Le transport de vésicules et le positionnement de l'appareil de Golgi par rapport au phagosome est vraisemblablement sous le contrôle du réseau de microtubules via les dynéines (Harada et al., 1998). De ce fait, nous avons initié des expériences de localisation subcellulaire de l'appareil de Golgi dans les macrophages infectés et non infectés par le VIH-1, à l'état basale, en l'absence de stimulation phagocytaire. Les premiers résultats semblent attester d'une dispersion partielle de l'appareil de Golgi dans les macrophages infectés par le VIH-1 (Figure 48). Si ces résultats se confirment, ils pourraient constituer une preuve supplémentaire du rôle crucial des microtubules et des protéines qui lui sont associées dans notre modèle.

Les macrophages infectés semblent donc subir une réorganisation complète de leur compartiment intracellulaire via le détournement du réseau de microtubules et de protéines impliquées dans le tri intracellulaire, ce qui facilite la persistance de bactéries dans les compartiments phagocytaires.

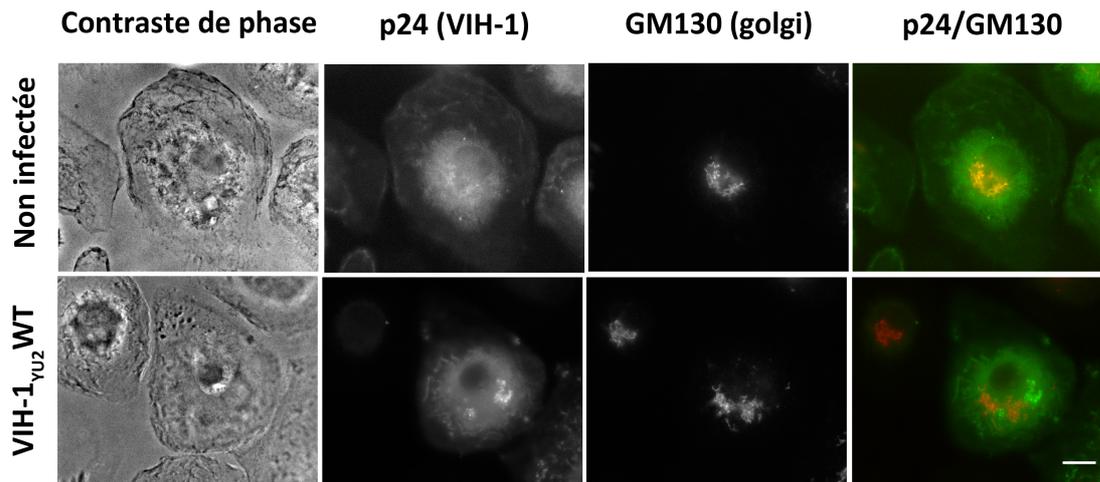


Figure 48. Localisation subcellulaire de l'appareil de Golgi dans les macrophages après infection par le VIH-1. Les macrophages primaires humains différenciés pendant 11 jours ont été infectés par le VIH-1_{YU2}WT pendant 8 jours. Les cellules ont été fixées, perméabilisées puis marquées avec un anti-p24 (VIH-1) suivi d'un IgG-anti-goat-Cy2, et avec un anti-GM130 (golgi) suivi d'un IgG-anti-mouse-Cy3. Les cellules sont également visibles en contraste de phase. La superposition des images montre le p24 en vert et le golgi en rouge. Des piles en Z des images fluorescentes ont été acquises et une seule des sections est représentée. Images représentatives de 3 expériences indépendante. Echelle, 10µm.

III. Rôle du cycle viral et des facteurs viraux

La perturbation de la maturation du phagosome décrite ici nécessite de l'intégration du virus au génome et d'un cycle viral complètement exécuté (Figure 4 Article). Le traitement des macrophages par du Raltégravir, drogue pharmacologique inhibant l'action de l'intégrase du VIH-1 (Serrao et al., 2009), nous a permis de confirmer l'importance de l'étape d'intégration du virus au génome dans la réduction du recrutement de LAMP1 sur les phagosomes. Cependant l'usage de cette drogue ne nous renseigne pas sur l'étape précise du cycle viral qui pourrait intervenir en amont de l'intégration. L'utilisation de drogues comme l'AZT (azidothymidine, appelée encore Zidovudine) ou l'Efavirenz, inhibiteurs pharmacologiques nucléosidiques ou non nucléosidiques de la reverse transcriptase respectivement, pourraient attester d'un éventuel blocage plus précoce du cycle viral (Tomasselli and Henrikson, 2000). Le Saquinavir nous informerait d'un potentiel défaut lié à la protéase virale (la Porte, 2009). Ainsi, un complément d'utilisation de drogues arrêtant le cycle viral à différentes étapes pourrait nous renseigner de façon plus fine sur l'étape du cycle viral indispensable au blocage de la maturation du phagosome.

Dans notre modèle, nous avons trouvé que la protéine Nef n'était pas le régulateur majeur de la perturbation des étapes tardives de maturation (Figure 4 Article). Cette observation est en corrélation avec l'expression différentielle et temporelle des deux protéines

virales que sont Nef et Vpr. Alors que Nef est exprimée abondamment et précocement lors de la réplication du virus, Vpr est exprimée plus tardivement (Guenzel et al., 2014; Planelles and Benichou, 2009; Witkowski and Verhasselt, 2013). En dépit du fait que Nef est connue pour inhiber partiellement la formation du phagosome dans les macrophages infectés par le VIH-1 (Mazzolini et al., 2010), et modifier le trafic et la signalisation intracellulaire (Foster et al., 2011; Foster and Garcia, 2008; Witkowski and Verhasselt, 2013), les effets sur les étapes tardives de la maturation du phagosome et sur l'activation sont indépendants de la protéine Nef (Figure 49). Dès lors, les défauts de maturation n'apparaissent pas comme une simple conséquence des effets de Nef sur la formation précoce du phagosome. De façon surprenante, nous avons mis en évidence dans cette étude que la protéine virale Vpr est impliquée dans les modifications de la dynamique des microtubules et le trafic intracellulaire sous-jacents au défaut de maturation après une infection par le VIH-1. Vpr est une protéine de petite taille très conservée parmi les lentivirus (VIH-1, VIH-2 et VIS). Il a été rapporté qu'elle régule la progression du cycle cellulaire, la transcription inverse et l'import nucléaire de l'ADN viral (Guenzel et al., 2014; Kogan and Rappaport, 2011; Planelles and Benichou, 2009). D'autres expériences témoignent d'une localisation partielle de Vpr sur les microtubules dans les étapes précoces d'internalisation du virion (McDonald et al., 2002). Les données de la littérature nous informent très peu d'un lien éventuel entre la protéine Vpr et le cytosquelette de microtubules, contrairement aux protéines virales Tat, Gag et Env dont les liens avec les microtubules tendent à être élucidés (Gaudin et al., 2013; Giacca, 2005; Matarrese and Malorni, 2005; Naghavi and Goff, 2007). Ne disposant à l'heure actuelle, d'aucun virus dépourvu de la protéine Vpr et exprimant la GFP, nous n'avons pas pu savoir si le ralentissement de migration des phagosomes était dépendant de la protéine Vpr. Cependant, compte tenu du fait que Vpr semble être à l'origine du défaut de localisation de EB1 dans les macrophages infectés, nous avons réalisé une première expérience d'immuno-précipitation contre la protéine EB1 dans les macrophages infectés avec le virus complet ou dépourvu de la protéine Vpr, puis fait une analyse de spectrométrie de masse. Malheureusement, cette expérience ne nous a révélé aucun lien entre les protéines EB1, Vpr ou toute autre protéine impliquée dans l'altération de la maturation du phagosome. Cette expérience n'ayant été effectuée qu'une seule fois dans des conditions non optimales, et connaissant la variabilité des macrophages primaires humains et du faible taux d'infection viral par le VIH-1, nous ne pouvons rien conclure de définitif quant à cette première expérience qui demande davantage d'investigation. Par ailleurs, étant donné que la protéine recombinante de Vpr est capable à elle seule d'induire un certain défaut de maturation dans les macrophages primaires humains

et murins (Figure 4 Article), il serait possible d'envisager une seconde stratégie visant à utiliser la protéine recombinante Vpr étiquetée afin d'évaluer ses différents partenaires en s'affranchissant ainsi de la faible infection virale, et de l'absence d'anticorps anti-Vpr. Ce dernier résultat est intéressant, car il n'était pas évident d'une part que la simple induction de Vpr, dépourvue de son contexte viral, induise un défaut de maturation et d'autre part que le résultat soit également confirmé sur une lignée de macrophages murins, les RAW264.7, connus pour leur faible capacité de dégradation (observée antérieurement par Florence Niedergang).

Ainsi ces résultats suggèrent qu'après l'établissement d'un cycle viral complet mené par l'intégration du virus au génome, Vpr interfère, de façon dépendante des microtubules, sur le trafic vésiculaire des endosomes vers le compartiment virale afin de perturber la formation des phagolysosomes.

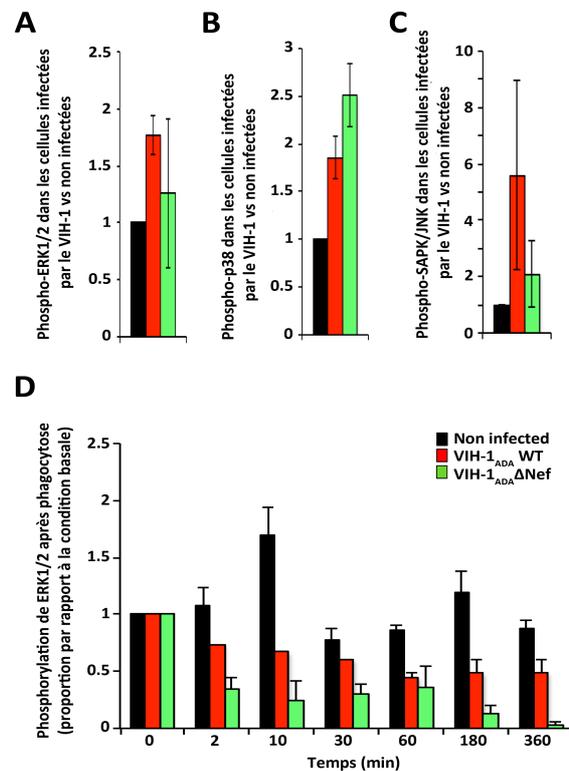


Figure 49. Rôle de Nef dans l'activation et la signalisation des macrophages infectés par le VIH-1. Les macrophages ont été non infectés ou infectés pendant 8 jours avec le VIH-1_{ADA}WT ou le VIH-1_{ADA}ΔNef. Les lysats totaux des macrophages ont été soumis au Western Blot avec un anti phospho-ERK1/2 (A), un anti-phospho p38 (B), et un anti-phospho SAPK/JNK (C). Le signal de chimioluminescence a été quantifié et est exprimée par rapport à la condition non infectée, montrant ainsi l'activation basale par le VIH-1_{ADA}WT ou le VIH-1_{ADA}ΔNef. (D) Après avoir été infectées pendant 8 jours, les macrophages ont été incubés à 37°C à différents temps avec des globules rouges opsonisés par des IgG. Puis les cellules ont été lysées et analysées par Western Blot avec un anti phospho-ERK1/2. Les résultats sont exprimés en proportion de phosphorylation par rapport à la condition basale pour les cellules non infectées (barres noires), les cellules infectées par le VIH-1_{ADA}WT (barres rouges) ou par le VIH-1_{ADA}ΔNef (barres vertes). Les graphiques représentent la moyenne ± écart type de 3 expériences indépendantes.

IV. Signalisation intracellulaire et rôle putatif de Vpr

Les expériences relatives à l'activation des macrophages ne nous renseignent pas à l'heure actuelle sur l'implication directe de Vpr dans les défauts de pré-activation des macrophages infectés et de l'atténuation de la réponse du macrophage qui en résulte. Des expériences ont montré que Vpr était à l'origine d'une diminution de cytokines pro-inflammatoires (Muthumani et al., 2000) et que cette protéine permettait l'activation de facteurs de transcriptions comme NFκB (Varin et al., 2005), également observée à la coupe phagocytaire (Marion et al., 2012). Il serait donc possible d'envisager que la diminution des cytokines comme RANTES, MIP-1α observée (Figure 3 Article) dans notre modèle soit en partie due aux fonctions de transactivation du promoteur du génome par Vpr via la modulation du complexe NFκB. Par la technique d'Imagestream, nous avons déjà initié des expériences visant à étudier la translocation nucléaire de la sous-unité RelA/p65 du complexe NFκB dans les macrophages primaires infectés. Cette technique combine à la fois la technique de microscopie et de cytométrie de flux. Les premiers résultats apportés par l'analyse des cellules infectées semblent suggérer une augmentation de la translocation nucléaire de RelA par rapport aux cellules non infectées. Sous forme d'homodimère, la protéine p50 du complexe NFκB n'a pas la capacité d'activer la transcription de gène et notamment de cytokines pro-inflammatoire (Kastenbauer and Ziegler-Heitbrock, 1999), cette observation n'a encore jamais été reportée pour la sous-unité RelA. Ainsi, il serait intéressant de poursuivre des expériences visant à étudier si cette protéine agit sous forme d'homo ou hétérodimères avec la protéine p50 par exemple, ce qui pourrait constituer une explication de la baisse des cytokines. De plus, afin d'attester de l'implication de Vpr dans ce système, ces expériences seraient à compléter par l'utilisation du virus dépourvu de la protéine Vpr. S'il s'avère que Vpr est impliquée dans la diminution de cytokines, ce résultat pourrait conforter l'effet de Vpr sur la diminution d'activation des lymphocytes T, déjà supportée par son action sur les molécules de co-stimulation des lymphocytes T, CD80/CD86 (Muthumani et al., 2005).

Tout comme le complexe NFκB qui est un senseur de l'inflammation, l'inflammasome NLRP3 (« Nod like receptor family pyrin domain containing protein 3 ») associé à la protéine adaptatrice ASC permet de réguler et de contrôler la sécrétion de cytokines, comme IL1-β et IL18, dans les macrophages via l'activation de la caspase 1 ce qui contribue en partie à la clairance de bactéries et à l'activation des lymphocytes (Akira et al., 2013; Bauernfeind and Hornung, 2013; Chen and Schroder, 2013). Bien que nous n'ayons fait aucune investigation à

l'heure actuelle sur ce complexe, il serait possible d'envisager son implication dans la diminution des cytokines secrétées par les macrophages infectés, l'activation qui en résulte et la diminution de clairance bactérienne. De plus, des études ont montré que ce complexe pouvait être activé par la production de ROS (Cruz et al., 2007; Zhou et al., 2011). Notre étude ne s'est focalisée que sur une diminution locale de la production de ROS dans les phagosomes. Il serait possible de concevoir une extension de la réduction de ROS généralisée au cytosol de la cellule par le VIH-1, ce qui contribuerait à l'inactivation de l'inflammasome et par extension au défaut d'activation et de clairance bactérienne observée. Par ailleurs, une étude récente montre que la formation du complexe NLRP3 est coordonnée par les microtubules et les moteurs dynéines (Misawa et al., 2013). Nous avons montré que Vpr perturbait le trafic intracellulaire via le réseau de microtubules. Il ne serait pas inconcevable de penser que Vpr pourrait interférer dans la formation de ce complexe via son action nouvellement découverte, sur le réseau de microtubules.

Les expériences de signalisation montrent que les protéines ERK1/2 et p38 sont suractivées suite à l'infection virale (Figure 3 Article). Il a été déjà montré que les protéines ERK1/2 sont associées aux microtubules (Ding et al., 1996; Reszka et al., 1995) et peuvent être localisées sur des endosomes après infection par un parasite (Boggiatto et al., 2014). Sachant que Vpr semble interagir avec des protéines associées au réseau de microtubules pour perturber le trafic des compartiments intracellulaires, il serait possible d'envisager que Vpr agisse directement ou indirectement avec les protéines ERK1/2 en les délocalisant de leur emplacement intracellulaire et/ou en les maintenant dans un statut hyperactif afin que ces dernières n'aient plus d'action sur la dynamique des microtubules, sur leur potentielle implication dans la biogénèse des phagolysosomes et sur la signalisation intracellulaire en tant qu'activateurs de facteurs de transcription. Cette hypothèse témoignerait ainsi d'un éventuel lien entre les défauts d'activation et de maturation observés. Par ailleurs, il a été montré que la protéine p38 α en interagissant avec la protéine Vps11 du complexe HOPS, était responsable de son activation transitoire par phosphorylation et entraînait la transition du phagosome précoce en phagosome tardif/phagolysosome (Barry et al., 2012). La sur-activation de p38 par le VIH-1 pourrait rendre cette protéine incapable d'activer de façon appropriée la protéine Vps11 et donc entraînerait un blocage de la maturation du phagosome. Ces différentes hypothèses ainsi que l'absence de pic de phosphorylation de ERK1/2 suite à l'induction de la phagocytose dans les macrophages infectés (Figure 3 Article) pourraient étayer l'hypothèse qui constituerait à dire que la sur-activation, par le VIH-1, des protéines de la signalisation entraînerait une anergie fonctionnelle spécifique des macrophages les rendant incapables de

répondre à un stimulus externe. Ce mécanisme semble spécifique du VIH-1 puisque les macrophages présentent une activation normale suite à une pré-activation de 8 jours avec divers activateurs comme le LPS ou le Poly: IC (Figure 1 supplémentaire Article).

Les données apportées par l'analyse transcriptionnelle des macrophages infectés et non infectés par le VIH-1, nous informent que le virus module des gènes relatifs à la réponse aux interférons de type I et aux facteurs de restriction inductibles par ces derniers comme ISG15 (Yanguéz et al., 2013) ou Mx2 (Goujon et al., 2013) (Figure 45). Les interférons de type I, dont la production est contrôlée transcriptionnellement par les IRF, et les facteurs de restriction inductibles par ces derniers constituent de bons atouts anti-viraux produits par la cellule hôte pour diminuer la réplication du virus, amoindrir la réplication de certaines bactéries et augmenter la production de cytokines pro-inflammatoire. En contre partie, le virus essaye de parer à ces restrictions en agissant avec des éléments intracellulaires (Bieniasz, 2004; Harris et al., 2012; Hughes et al., 2012; Malireddi and Kanneganti, 2013; Marsili et al., 2012). Compte tenu des mécanismes d'action du virus pour les contrecarrer, et de la liaison de Vpr à des complexes ubiquitine ligase (Le Rouzic et al., 2008), il serait possible d'imaginer que Vpr agit sur les modulateurs de la réponse anti-virale en les ciblant au protéasome. Ceci diminuerait la réponse finale des macrophages lors de l'internalisation d'un pathogène et la production de cytokines responsable de l'activation de cellules immunitaires comme les lymphocytes T lors de la réponse adaptative.

Enfin, la divergence du rôle de Vpr repose actuellement sur la dichotomie entre les lymphocytes T, cellules qui se divisent et les macrophages, cellules qui ne se divisent pas. Dorénavant, cette observation est à moduler. En effet, des expériences décrites dans la littérature et des observations au microscope de ma part suggèrent que les macrophages sont capables de se multiplier bien qu'ils soient à un stade de différenciation terminal (Ginhoux and Jung, 2014; Molawi and Sieweke, 2013; Sieweke and Allen, 2013). Pour exemple, l'analyse par cytométrie de flux de l'incorporation au BrdU, témoin de la prolifération cellulaire, indique la prolifération d'une sous-population de macrophages pleuraux suite à une infection par *L. sigmodontis* (Jenkins et al., 2011) ou encore de macrophages issus de l'utérus ou du myomètre d'une souris gestante (Tagliani et al., 2011). Ainsi, toutes les fonctions de Vpr décrites sur l'arrêt du cycle cellulaire ou l'induction d'apoptose dans les lymphocytes T (Andersen et al., 2008; Guenzel et al., 2014; Tungaturthi et al., 2003) pourraient également être revisitées et transposables à ces différentes populations locales de macrophages. D'autant plus que le transcriptome réalisé sur les macrophages infectés montrent une profonde modification des protéines relatives aux histones connus pour être impliqués dans la

progression du cycle cellulaire et que Vpr a déjà été décrit pour interagir ou modifier l'expression de protéines associés à la chromatine comme, SNF2h, HP1 α et γ , ou H2AX (Shimura et al., 2011; Taneichi et al., 2011; Zimmerman et al., 2004).

Ainsi, ces différents résultats et hypothèses confortent le rôle majeur du macrophage dans la réponse innée et adaptative ce qui lui confère une haute responsabilité dans la réponse intercellulaire et par extension dans la conservation de l'intégrité de notre organisme. Sa paralysie par le VIH-1, entraîne une baisse profonde de son activité, en terme de dégradation des pathogènes et d'activation des cellules du système immunitaire, ce qui participe à l'accélération du développement de maladies opportunistes et à la pathogénèse. La protéine virale Vpr, qui jusqu'à lors était considérée comme une protéine accessoire agissant principalement sur l'augmentation de la réplication virale, s'avère être fortement impliquée dans la réorganisation de compartiments intracellulaires et du cytosquelette de microtubules dans les macrophages, afin de détourner la biogénèse des phagolysosomes.

Mon travail ouvre ainsi une nouvelle perspective du rôle de la protéine Vpr dans les fonctions de « réservoirs » viraux et bactériens des macrophages infectés par le VIH-1 ainsi que de l'« anergie fonctionnelle » qui en résulte. De plus, il constitue un support mécanistique pouvant contribuer à la compréhension d'infections ou de co-infections par le VIH-1 et *M. tuberculosis* ou *S. Typhimurium*, dont les mécanismes de persistance ne sont pas très renseignés à l'heure actuelle et dont les cas recensés ne sont pas négligeable. Enfin, ce travail peut également servir de référence pour appréhender des pathologies, autres que celles associées au VIH-1, pour lesquelles les fonctions des macrophages pourraient être altérées comme c'est le cas lors d'inflammations chroniques (cancers, asthme, athérosclérose, diabète de type II, obésité). Pour exemple, il a été rapporté que les macrophages alvéolaires de patients asthmatiques ou atteints d'athérosclérose présentaient un défaut d'internalisation de cellules apoptotiques (Fitzpatrick et al., 2008; Huynh et al., 2005; Schrijvers et al., 2005). Par ailleurs, il a également été constaté que les macrophages *db/db* issus d'un modèle murin d'obésité, représentatif de la pathologie chez l'homme, avaient une internalisation d'acides gras libres altérée Hellmann et al., 2013. Il serait donc possible d'imaginer que ces défauts se traduisent ensuite par une altération de clairance du matériel ingéré, dont les mécanismes pourraient découler de notre modèle. De plus, ces différentes pathologies sont associées à des modifications de la signalisation intracellulaires touchant, des régulateurs comme les complexes NLRP3, NF κ B ou les MAPkinases. Une comparaison des différents

transcriptomes des macrophages issus de patients atteints par le VIH-1 et de ceux associés à ces différentes pathologies pourraient nous informer des similitudes qui existent entre ces pathologies et donc permettre une meilleure compréhension du mécanisme général affectant la biologie des macrophage dans le cas d'une inflammation.

Références bibliographiques

- Abou-Zeid, N., Pandjaitan, R., Sengmanivong, L., David, V., Le Pavec, G., Salamero, J., and Zahraoui, A. (2011). MICAL-like1 mediates epidermal growth factor receptor endocytosis. *Molecular biology of the cell* *22*, 3431-3441.
- Ackerman, W.t., and Kwiek, J.J. (2013). Role of the placenta in adverse perinatal outcomes among HIV-1 seropositive women. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi* *80*, 90-94.
- Aderem, A. (2002). How to eat something bigger than your head. *Cell* *110*, 5-8.
- Aderem, A. (2003). Phagocytosis and the inflammatory response. *The Journal of infectious diseases* *187 Suppl 2*, S340-345.
- Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* *17*, 593-623.
- Agostini, I., Navarro, J.M., Rey, F., Bouhamdan, M., Spire, B., Vigne, R., and Sire, J. (1996). The human immunodeficiency virus type 1 Vpr transactivator: cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIB. *Journal of molecular biology* *261*, 599-606.
- Aiken, C., Konner, J., Landau, N.R., Lenburg, M.E., and Trono, D. (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* *76*, 853-864.
- Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature reviews Molecular cell biology* *9*, 309-322.
- Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2010). Microtubule +TIPs at a glance. *Journal of cell science* *123*, 3415-3419.
- Akira, S., Misawa, T., Satoh, T., and Saitoh, T. (2013). Macrophages control innate inflammation. *Diabetes, obesity & metabolism* *15 Suppl 3*, 10-18.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology* *4*, 499-511.
- Allen, L.A., and Aderem, A. (1996). Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *The Journal of experimental medicine* *184*, 627-637.
- Amer, A.O., and Swanson, M.S. (2002). A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Current opinion in microbiology* *5*, 56-61.
- Andersen, J.L., Le Rouzic, E., and Planelles, V. (2008). HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Experimental and molecular pathology* *85*, 2-10.
- Anderson, K.E., Chessa, T.A., Davidson, K., Henderson, R.B., Walker, S., Tolmachova, T., Gryb, K., Rausch, O., Seabra, M.C., Tybulewicz, V.L., *et al.* (2010). PtdIns3P and Rac direct the assembly of the NADPH oxidase on a novel, pre-phagosomal compartment during FcR-mediated phagocytosis in primary mouse neutrophils. *Blood* *116*, 4978-4989.
- Anglemyer, A., Rutherford, G.W., Easterbrook, P.J., Horvath, T., Vitoria, M., Jan, M., and Doherty, M.C. (2014). Early initiation of antiretroviral therapy in HIV-infected adults and adolescents: a systematic review. *Aids* *28 Suppl 2*, S105-118.
- Antonin, W., Holroyd, C., Fasshauer, D., Pabst, S., Von Mollard, G.F., and Jahn, R. (2000). A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function. *The EMBO journal* *19*, 6453-6464.
- Araki, N., Johnson, M.T., and Swanson, J.A. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *The Journal of cell biology* *135*, 1249-1260.
- Avrameas, A., McIlroy, D., Hosmalin, A., Autran, B., Debre, P., Monsigny, M., Roche, A.C., and Midoux, P. (1996). Expression of a mannose/fucose membrane lectin on human dendritic cells. *European journal of immunology* *26*, 394-400.
- Azzam, R., Kedzierska, K., Leeansyah, E., Chan, H., Doischer, D., Gorry, P.R., Cunningham, A.L., Crowe, S.M., and Jaworowski, A. (2006). Impaired complement-mediated phagocytosis by HIV type-1-infected human monocyte-derived macrophages involves a cAMP-dependent mechanism. *AIDS research and human retroviruses* *22*, 619-629.

- Bajno, L., Peng, X.R., Schreiber, A.D., Moore, H.P., Trimble, W.S., and Grinstein, S. (2000). Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *The Journal of cell biology* 149, 697-706.
- Balderhaar, H.J., and Ungermann, C. (2013). CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *Journal of cell science* 126, 1307-1316.
- Balliet, J.W., Kolson, D.L., Eiger, G., Kim, F.M., McGann, K.A., Srinivasan, A., and Collman, R. (1994). Distinct effects in primary macrophages and lymphocytes of the human immunodeficiency virus type 1 accessory genes vpr, vpu, and nef: mutational analysis of a primary HIV-1 isolate. *Virology* 200, 623-631.
- Balotta, C., Lusso, P., Crowley, R., Gallo, R.C., and Franchini, G. (1993). Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides targeted to the vpr gene inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in primary human macrophages. *Journal of virology* 67, 4409-4414.
- Baral, S.D., Poteat, T., Stromdahl, S., Wirtz, A.L., Guadamuz, T.E., and Beyrer, C. (2013). Worldwide burden of HIV in transgender women: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases* 13, 214-222.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., *et al.* (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
- Barry, A.O., Boucherit, N., Mottola, G., Vadovic, P., Trouplin, V., Soubeyran, P., Capo, C., Bonatti, S., Nebreda, A., Toman, R., *et al.* (2012). Impaired stimulation of p38alpha-MAPK/Vps41-HOPS by LPS from pathogenic *Coxiella burnetii* prevents trafficking to microbicidal phagolysosomes. *Cell host & microbe* 12, 751-763.
- Bauernfeind, F., and Hornung, V. (2013). Of inflammasomes and pathogens--sensing of microbes by the inflammasome. *EMBO molecular medicine* 5, 814-826.
- Becker, T., Volchuk, A., and Rothman, J.E. (2005). Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4022-4026.
- Bedard, K., and Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 87, 245-313.
- Beemiller, P., Zhang, Y., Mohan, S., Levinsohn, E., Gaeta, I., Hoppe, A.D., and Swanson, J.A. (2010). A Cdc42 activation cycle coordinated by PI 3-kinase during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Molecular biology of the cell* 21, 470-480.
- Belzile, J.P., Duisit, G., Rougeau, N., Mercier, J., Finzi, A., and Cohen, E.A. (2007). HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1-CUL4AVPRBP E3 ubiquitin ligase. *PLoS pathogens* 3, e85.
- Benaroch, P., Billard, E., Gaudin, R., Schindler, M., and Jouve, M. (2010). HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology* 7, 29.
- Benichou, S., and Benmerah, A. (2003). [The HIV nef and the Kaposi-sarcoma-associated virus K3/K5 proteins: "parasites" of the endocytosis pathway]. *Medecine sciences : M/S* 19, 100-106.
- Bennett, A.E., Narayan, K., Shi, D., Hartnell, L.M., Gousset, K., He, H., Lowekamp, B.C., Yoo, T.S., Bliss, D., Freed, E.O., *et al.* (2009). Ion-abrasion scanning electron microscopy reveals surface-connected tubular conduits in HIV-infected macrophages. *PLoS pathogens* 5, e1000591.
- Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J.L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *Journal of immunology* 181, 3733-3739.
- Berg, T., Gjoen, T., and Bakke, O. (1995). Physiological functions of endosomal proteolysis. *The Biochemical journal* 307 (Pt 2), 313-326.
- Bergamaschi, A., and Pancino, G. (2010). Host hindrance to HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Retrovirology* 7, 31.
- Bergstrom, A.M., and Abdul-Quader, A.S. (2010). Injection drug use, HIV and the current response in selected low-income and middle-income countries. *Aids* 24 Suppl 3, S20-29.
- Berger, E.A., Doms, R.W., Fenyo, E.M., Korber, B.T., Littman, D.R., Moore, J.P., Sattentau, Q.J., Schuitemaker, H., Sodroski, J., and Weiss, R.A. (1998). A new classification for HIV-1. *Nature* 391, 240.
- Berger, S.B., Romero, X., Ma, C., Wang, G., Faubion, W.A., Liao, G., Compeer, E., Keszei, M., Rameh, L., Wang, N., *et al.* (2010). SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nature immunology* 11, 920-927.
- Berre, S., Gaudin, R., Cunha de Alencar, B., Desdoutis, M., Chabaud, M., Naffakh, N., Rabaza-Gairi, M., Gobert, F.X., Jouve, M., and Benaroch, P. (2013). CD36-specific antibodies block release of HIV-1 from

infected primary macrophages and its transmission to T cells. *The Journal of experimental medicine* 210, 2523-2538.

Berton, G., Mocsai, A., and Lowell, C.A. (2005). Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends in immunology* 26, 208-214.

Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257-263.

Bieniasz, P.D. (2004). Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nature immunology* 5, 1109-1115.

Biggs, B.A., Hewish, M., Kent, S., Hayes, K., and Crowe, S.M. (1995). HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* 154, 6132-6139.

Birx, D.L., Redfield, R.R., Tencer, K., Fowler, A., Burke, D.S., and Tosato, G. (1990). Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection. *Blood* 76, 2303-2310.

Biswas, S.K., Chittechath, M., Shalova, I.N., and Lim, J.Y. (2012). Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunologic research* 53, 11-24.

Blander, J.M. (2007a). Coupling Toll-like receptor signaling with phagocytosis: potentiation of antigen presentation. *Trends in immunology* 28, 19-25.

Blander, J.M. (2007b). Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence. *Cellular microbiology* 9, 290-299.

Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2004). Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 304, 1014-1018.

Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2006). On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nature immunology* 7, 1029-1035.

Blocker, A., Griffiths, G., Olivo, J.C., Hyman, A.A., and Severin, F.F. (1998). A role for microtubule dynamics in phagosome movement. *Journal of cell science* 111 (Pt 3), 303-312.

Blocker, A., Severin, F.F., Burkhardt, J.K., Bingham, J.B., Yu, H., Olivo, J.C., Schroer, T.A., Hyman, A.A., and Griffiths, G. (1997). Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. *The Journal of cell biology* 137, 113-129.

Blocker, A., Severin, F.F., Habermann, A., Hyman, A.A., Griffiths, G., and Burkhardt, J.K. (1996). Microtubule-associated protein-dependent binding of phagosomes to microtubules. *The Journal of biological chemistry* 271, 3803-3811.

Boggiatto, P.M., Martinez, P.A., Pullikuth, A., Jones, D.E., Bellaire, B., Catling, A., and Petersen, C. (2014). Targeted extracellular signal-regulated kinase activation mediated by *Leishmania amazonensis* requires MP1 scaffold. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 16, 328-336.

Bohdanowicz, M., and Grinstein, S. (2010). Vesicular traffic: a Rab SANDwich. *Current biology : CB* 20, R311-314.

Bolton, D.L., and Lenardo, M.J. (2007). Vpr cytopathicity independent of G2/M cell cycle arrest in human immunodeficiency virus type 1-infected CD4+ T cells. *Journal of virology* 81, 8878-8890.

Bonhoeffer, S., Funk, G.A., Gunthard, H.F., Fischer, M., and Muller, V. (2003). Glancing behind virus load variation in HIV-1 infection. *Trends in microbiology* 11, 499-504.

Boskovic, J., Arnold, J.N., Stilion, R., Gordon, S., Sim, R.B., Rivera-Calzada, A., Wienke, D., Isacke, C.M., Martinez-Pomares, L., and Llorca, O. (2006). Structural model for the mannose receptor family uncovered by electron microscopy of Endo180 and the mannose receptor. *The Journal of biological chemistry* 281, 8780-8787.

Botelho, R.J., and Grinstein, S. (2011). Phagocytosis. *Current biology : CB* 21, R533-538.

Botelho, R.J., Scott, C.C., and Grinstein, S. (2004). Phosphoinositide involvement in phagocytosis and phagosome maturation. *Current topics in microbiology and immunology* 282, 1-30.

Botelho, R.J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A., York, J.D., Meyer, T., and Grinstein, S. (2000). Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *The Journal of cell biology* 151, 1353-1368.

Braun, V., Deschamps, C., Raposo, G., Benaroch, P., Benmerah, A., Chavrier, P., and Niedergang, F. (2007). AP-1 and ARF1 control endosomal dynamics at sites of FcR mediated phagocytosis. *Molecular biology of the cell* 18, 4921-4931.

- Braun, V., Fraissier, V., Raposo, G., Hurbain, I., Sibarita, J.B., Chavrier, P., Galli, T., and Niedergang, F. (2004). TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *The EMBO journal* 23, 4166-4176.
- Braun, V., and Niedergang, F. (2006). Linking exocytosis and endocytosis during phagocytosis. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 98, 195-201.
- Breuer, S., Gerlach, H., Kolaric, B., Urbanke, C., Opitz, N., and Geyer, M. (2006). Biochemical indication for myristoylation-dependent conformational changes in HIV-1 Nef. *Biochemistry* 45, 2339-2349.
- Briggs, J.A., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H.G., and Fuller, S.D. (2003). Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *The EMBO journal* 22, 1707-1715.
- Brooks, D.G., Ha, S.J., Elsaesser, H., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Oldstone, M.B. (2008). IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 20428-20433.
- Brown, A., Moghaddam, S., Kawano, T., and Cheng-Mayer, C. (2004). Multiple human immunodeficiency virus type 1 Nef functions contribute to efficient replication in primary human macrophages. *The Journal of general virology* 85, 1463-1469.
- Brown, G.D. (2006). Macrophage receptors and innate immunity: insights from dectin-1. *Novartis Foundation symposium* 279, 114-123; discussion 123-116, 216-119.
- Burdo, T.H., Lackner, A., and Williams, K.C. (2013). Monocyte/macrophages and their role in HIV neuropathogenesis. *Immunological reviews* 254, 102-113.
- Busca, A., Saxena, M., and Kumar, A. (2012). Critical role for antiapoptotic Bcl-xL and Mcl-1 in human macrophage survival and cellular IAP1/2 (cIAP1/2) in resistance to HIV-Vpr-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 287, 15118-15133.
- Buseyne, F., Le Gall, S., Boccaccio, C., Abastado, J.P., Lifson, J.D., Arthur, L.O., Riviere, Y., Heard, J.M., and Schwartz, O. (2001). MHC-I-restricted presentation of HIV-1 virion antigens without viral replication. *Nature medicine* 7, 344-349.
- Caamano, J., Alexander, J., Craig, L., Bravo, R., and Hunter, C.A. (1999). The NF-kappa B family member RelB is required for innate and adaptive immunity to *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* 163, 4453-4461.
- Cai, B., Giridharan, S.S., Zhang, J., Saxena, S., Bahl, K., Schmidt, J.A., Sorgen, P.L., Guo, W., Naslavsky, N., and Caplan, S. (2013). Differential roles of C-terminal Eps15 homology domain proteins as vesiculators and tubulators of recycling endosomes. *The Journal of biological chemistry* 288, 30172-30180.
- Caillet, M., Janvier, K., Pelchen-Matthews, A., Delcroix-Genete, D., Camus, G., Marsh, M., and Berlioz-Torrent, C. (2011). Rab7A is required for efficient production of infectious HIV-1. *PLoS pathogens* 7, e1002347.
- Campbell, E.M., Nunez, R., and Hope, T.J. (2004). Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *Journal of virology* 78, 5745-5755.
- Canton, J., Neculai, D., and Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature reviews Immunology* 13, 621-634.
- Cardoso, C.M., Jordao, L., and Vieira, O.V. (2010). Rab10 regulates phagosome maturation and its overexpression rescues Mycobacterium-containing phagosomes maturation. *Traffic* 11, 221-235.
- Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 75, 50-83.
- Caron, E., and Hall, A. (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282, 1717-1721.
- Carr, J.M., Hocking, H., Li, P., and Burrell, C.J. (1999). Rapid and efficient cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus infection from monocyte-derived macrophages to peripheral blood lymphocytes. *Virology* 265, 319-329.
- Carreno, S., Caron, E., Cougoule, C., Emorine, L.J., and Maridonneau-Parini, I. (2002). p59Hck isoform induces F-actin reorganization to form protrusions of the plasma membrane in a Cdc42- and Rac-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 277, 21007-21016.
- Carreno, S., Gouze, M.E., Schaak, S., Emorine, L.J., and Maridonneau-Parini, I. (2000). Lack of palmitoylation redirects p59Hck from the plasma membrane to p61Hck-positive lysosomes. *The Journal of biological chemistry* 275, 36223-36229.

- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 3666-3670.
- Cassol, E., Cassetta, L., Rizzi, C., Alfano, M., and Poli, G. (2009). M1 and M2a polarization of human monocyte-derived macrophages inhibits HIV-1 replication by distinct mechanisms. *Journal of immunology* 182, 6237-6246.
- Castellino, F., Zhong, G., and Germain, R.N. (1997). Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Human immunology* 54, 159-169.
- Cavaillon, J.M., and Adib-Conquy, M. (2005). Monocytes/macrophages and sepsis. *Critical care medicine* 33, S506-509.
- Cemna, M., and Brumell, J.H. (2012). Interactions of pathogenic bacteria with autophagy systems. *Current biology* : CB 22, R540-545.
- Chakravorty, D., and Hensel, M. (2003). Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5, 621-627.
- Chang, C.C., Crane, M., Zhou, J., Mina, M., Post, J.J., Cameron, B.A., Lloyd, A.R., Jaworowski, A., French, M.A., and Lewin, S.R. (2013). HIV and co-infections. *Immunological reviews* 254, 114-142.
- Chaudhry, A., Das, S.R., Hussain, A., Mayor, S., George, A., Bal, V., Jameel, S., and Rath, S. (2005). The Nef protein of HIV-1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs. *Journal of immunology* 175, 4566-4574.
- Chaudhry, A., Das, S.R., Jameel, S., George, A., Bal, V., Mayor, S., and Rath, S. (2007). A two-pronged mechanism for HIV-1 Nef-mediated endocytosis of immune costimulatory molecules CD80 and CD86. *Cell host & microbe* 1, 37-49.
- Chaudhry, A., Das, S.R., Jameel, S., George, A., Bal, V., Mayor, S., and Rath, S. (2008). HIV-1 Nef induces a Rab11-dependent routing of endocytosed immune costimulatory proteins CD80 and CD86 to the Golgi. *Traffic* 9, 1925-1935.
- Chaudhuri, R., Lindwasser, O.W., Smith, W.J., Hurley, J.H., and Bonifacino, J.S. (2007). Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *Journal of virology* 81, 3877-3890.
- Chen, K.W., and Schroder, K. (2013). Antimicrobial functions of inflammasomes. *Current opinion in microbiology* 16, 311-318.
- Chen, Y., Rolls, M.M., and Hancock, W.O. (2014). An EB1-kinesin complex is sufficient to steer microtubule growth in vitro. *Current biology* : CB 24, 316-321.
- Chen, Y.A., and Scheller, R.H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 98-106.
- Chesneau, L., Dambournet, D., Machicoane, M., Kouranti, I., Fukuda, M., Goud, B., and Echard, A. (2012). An ARF6/Rab35 GTPase cascade for endocytic recycling and successful cytokinesis. *Current biology* : CB 22, 147-153.
- Christoforidis, S., and Zerial, M. (2000). Purification and identification of novel Rab effectors using affinity chromatography. *Methods* 20, 403-410.
- Chung, H., Brazil, M.I., Irizarry, M.C., Hyman, B.T., and Maxfield, F.R. (2001). Uptake of fibrillar beta-amyloid by microglia isolated from MSR-A (type I and type II) knockout mice. *Neuroreport* 12, 1151-1154.
- Churchill, M.J., Wesselingh, S.L., Cowley, D., Pardo, C.A., McArthur, J.C., Brew, B.J., and Gorry, P.R. (2009). Extensive astrocyte infection is prominent in human immunodeficiency virus-associated dementia. *Annals of neurology* 66, 253-258.
- Claus, V., Jahraus, A., Tjelle, T., Berg, T., Kirschke, H., Faulstich, H., and Griffiths, G. (1998). Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *The Journal of biological chemistry* 273, 9842-9851.
- Cobos-Jimenez, V., Booiman, T., Hamann, J., and Kootstra, N.A. (2011). Macrophages and HIV-1. *Current opinion in HIV and AIDS* 6, 385-390.
- Coeytaux, E., Coulaud, D., Le Cam, E., Danos, O., and Kichler, A. (2003). The cationic amphipathic alpha-helix of HIV-1 viral protein R (Vpr) binds to nucleic acids, permeabilizes membranes, and efficiently transfects cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 18110-18116.
- Cohen, M.S., Gay, C.L., Busch, M.P., and Hecht, F.M. (2010). The detection of acute HIV infection. *The Journal of infectious diseases* 202 Suppl 2, S270-277.

- Cohen, M.S., Smith, M.K., Muessig, K.E., Hallett, T.B., Powers, K.A., and Kashuba, A.D. (2013). Antiretroviral treatment of HIV-1 prevents transmission of HIV-1: where do we go from here? *Lancet* *382*, 1515-1524.
- Coleman, C.M., Gelais, C.S., and Wu, L. (2013). Cellular and viral mechanisms of HIV-1 transmission mediated by dendritic cells. *Advances in experimental medicine and biology* *762*, 109-130.
- Coleman, S.H., Hitchin, D., Noviello, C.M., and Guatelli, J.C. (2006). HIV-1 Nef stabilizes AP-1 on membranes without inducing ARF1-independent de novo attachment. *Virology* *345*, 148-155.
- Collins, R.F., Schreiber, A.D., Grinstein, S., and Trimble, W.S. (2002). Syntaxins 13 and 7 function at distinct steps during phagocytosis. *Journal of immunology* *169*, 3250-3256.
- Collman, R.G., Perno, C.F., Crowe, S.M., Stevenson, M., and Montaner, L.J. (2003). HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *Journal of leukocyte biology* *74*, 631-634.
- Colucci-Guyon, E., Niedergang, F., Wallar, B.J., Peng, J., Alberts, A.S., and Chavrier, P. (2005). A role for mammalian diaphanous-related formins in complement receptor (CR3)-mediated phagocytosis in macrophages. *Current biology : CB* *15*, 2007-2012.
- Cook, J., and Hagemann, T. (2013). Tumour-associated macrophages and cancer. *Current opinion in pharmacology* *13*, 595-601.
- Coppolino, M.G., Dierckman, R., Loijens, J., Collins, R.F., Pouladi, M., Jongstra-Bilen, J., Schreiber, A.D., Trimble, W.S., Anderson, R., and Grinstein, S. (2002). Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase Ialpha impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis. *The Journal of biological chemistry* *277*, 43849-43857.
- Cox, D., Berg, J.S., Cammer, M., Chingwundoh, J.O., Dale, B.M., Cheney, R.E., and Greenberg, S. (2002). Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nature cell biology* *4*, 469-477.
- Cox, D., Chang, P., Kurosaki, T., and Greenberg, S. (1996). Syk tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly. *The Journal of biological chemistry* *271*, 16597-16602.
- Cox, D., and Greenberg, S. (2001). Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Seminars in immunology* *13*, 339-345.
- Craigie, R. (2012). The molecular biology of HIV integrase. *Future virology* *7*, 679-686.
- Crowe, S.M., Vardaxis, N.J., Kent, S.J., Maerz, A.L., Hewish, M.J., McGrath, M.S., and Mills, J. (1994). HIV infection of monocyte-derived macrophages in vitro reduces phagocytosis of *Candida albicans*. *Journal of leukocyte biology* *56*, 318-327.
- Crowley, M.T., Costello, P.S., Fitzer-Attas, C.J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V.L., and DeFranco, A.L. (1997). A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages. *The Journal of experimental medicine* *186*, 1027-1039.
- Cruz, C.M., Rinna, A., Forman, H.J., Ventura, A.L., Persechini, P.M., and Ojcius, D.M. (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *The Journal of biological chemistry* *282*, 2871-2879.
- Daeron, M., and Lesourne, R. (2006). Negative signaling in Fc receptor complexes. *Advances in immunology* *89*, 39-86.
- Dambournet, D., Machicoane, M., Chesneau, L., Sachse, M., Rocancourt, M., El Marjou, A., Formstecher, E., Salomon, R., Goud, B., and Echard, A. (2011). Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nature cell biology* *13*, 981-988.
- Damiani, M.T., Pavarotti, M., Leiva, N., Lindsay, A.J., McCaffrey, M.W., and Colombo, M.I. (2004). Rab coupling protein associates with phagosomes and regulates recycling from the phagosomal compartment. *Traffic* *5*, 785-797.
- Davis, A.S., Vergne, I., Master, S.S., Kyei, G.B., Chua, J., and Deretic, V. (2007). Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes. *PLoS pathogens* *3*, e186.
- De Cock, K.M., Jaffe, H.W., and Curran, J.W. (2012). The evolving epidemiology of HIV/AIDS. *Aids* *26*, 1205-1213.
- De Groote, M.A., Ochsner, U.A., Shiloh, M.U., Nathan, C., McCord, J.M., Dinauer, M.C., Libby, S.J., Vazquez-Torres, A., Xu, Y., and Fang, F.C. (1997). Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 13997-14001.

- De Luca, M., Cogli, L., Progida, C., Nisi, V., Pascolutti, R., Sigismund, S., Di Fiore, P.P., and Bucci, C. (2014). RILP regulates vacuolar ATPase through interaction with the VIG1 subunit. *Journal of cell science* *127*, 2697-2708.
- de Saint-Vis, B., Vincent, J., Vandenabeele, S., Vanbervliet, B., Pin, J.J., Ait-Yahia, S., Patel, S., Mattei, M.G., Banchereau, J., Zurawski, S., *et al.* (1998). A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* *9*, 325-336.
- Deacon, N.J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D.J., McPhee, D.A., Greenway, A.L., Ellett, A., Chatfield, C., *et al.* (1995). Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* *270*, 988-991.
- Deeks, S.G. (2011). HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annual review of medicine* *62*, 141-155.
- Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E., and Marsh, M. (2007). In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *The Journal of cell biology* *177*, 329-341.
- Deschamps, C., Echard, A., and Niedergang, F. (2013). [Phagocytosis and cytokinesis: highlights on common themes and differences]. *Medecine sciences : M/S* *29*, 1004-1009.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* *29*, 313-326.
- Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G., and Griffiths, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *The Journal of cell biology* *124*, 677-688.
- Ding, A., Chen, B., Fuortes, M., and Blum, E. (1996). Association of mitogen-activated protein kinases with microtubules in mouse macrophages. *The Journal of experimental medicine* *183*, 1899-1904.
- Dong, C., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annual review of immunology* *20*, 55-72.
- Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C., *et al.* (2005). Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *49*, 4721-4732.
- Doyle, S.E., O'Connell, R.M., Miranda, G.A., Vaidya, S.A., Chow, E.K., Liu, P.T., Suzuki, S., Suzuki, N., Modlin, R.L., Yeh, W.C., *et al.* (2004). Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *The Journal of experimental medicine* *199*, 81-90.
- Dube, M., Paquay, C., Roy, B.B., Bego, M.G., Mercier, J., and Cohen, E.A. (2011). HIV-1 Vpu antagonizes BST-2 by interfering mainly with the trafficking of newly synthesized BST-2 to the cell surface. *Traffic* *12*, 1714-1729.
- Duellberg, C., Trokter, M., Jha, R., Sen, I., Steinmetz, M.O., and Surrey, T. (2014). Reconstitution of a hierarchical +TIP interaction network controlling microtubule end tracking of dynein. *Nature cell biology*.
- Eckstein, D.A., Sherman, M.P., Penn, M.L., Chin, P.S., De Noronha, C.M., Greene, W.C., and Goldsmith, M.A. (2001). HIV-1 Vpr enhances viral burden by facilitating infection of tissue macrophages but not nondividing CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* *194*, 1407-1419.
- Egami, Y., and Araki, N. (2012). Rab20 regulates phagosome maturation in RAW264 macrophages during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *PloS one* *7*, e35663.
- Egami, Y., Fukuda, M., and Araki, N. (2011). Rab35 regulates phagosome formation through recruitment of ACAP2 in macrophages during Fc gamma R-mediated phagocytosis. *Journal of cell science* *124*, 3557-3567.
- Eugenin, E.A., Osiecki, K., Lopez, L., Goldstein, H., Calderon, T.M., and Berman, J.W. (2006). CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *26*, 1098-1106.
- Evans, V.A., Kumar, N., Filali, A., Procopio, F.A., Yegorov, O., Goulet, J.P., Saleh, S., Haddad, E.K., da Fonseca Pereira, C., Ellenberg, P.C., *et al.* (2013). Myeloid dendritic cells induce HIV-1 latency in non-proliferating CD4+ T cells. *PLoS pathogens* *9*, e1003799.

- Ezekowitz, R.A., Sastry, K., Bailly, P., and Warner, A. (1990). Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *The Journal of experimental medicine* 172, 1785-1794.
- Ezekowitz, R.A., Williams, D.J., Koziel, H., Armstrong, M.Y., Warner, A., Richards, F.F., and Rose, R.M. (1991). Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351, 155-158.
- Fackler, O.T., and Krausslich, H.G. (2006). Interactions of human retroviruses with the host cell cytoskeleton. *Current opinion in microbiology* 9, 409-415.
- Fackler, O.T., Luo, W., Geyer, M., Alberts, A.S., and Peterlin, B.M. (1999). Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions. *Molecular cell* 3, 729-739.
- Fader, C.M., Sanchez, D.G., Mestre, M.B., and Colombo, M.I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 1901-1916.
- Fairn, G.D., and Grinstein, S. (2012). How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends in immunology* 33, 397-405.
- Fang, L., Wu, H.M., Ding, P.S., and Liu, R.Y. (2014). TLR2 mediates phagocytosis and autophagy through JNK signaling pathway in *Staphylococcus aureus*-stimulated RAW264.7 cells. *Cellular signalling* 26, 806-814.
- Fasshauer, D., Eliason, W.K., Brunger, A.T., and Jahn, R. (1998). Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry* 37, 10354-10362.
- Feasey, N.A., Dougan, G., Kingsley, R.A., Heyderman, R.S., and Gordon, M.A. (2012). Invasive nontyphoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet* 379, 2489-2499.
- Felts, R.L., Narayan, K., Estes, J.D., Shi, D., Trubey, C.M., Fu, J., Hartnell, L.M., Ruthel, G.T., Schneider, D.K., Nagashima, K., *et al.* (2010). 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse between dendritic cells and T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 13336-13341.
- Felzien, L.K., Woffendin, C., Hottiger, M.O., Subbramanian, R.A., Cohen, E.A., and Nabel, G.J. (1998). HIV transcriptional activation by the accessory protein, VPR, is mediated by the p300 co-activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 5281-5286.
- Fenard, D., Yonemoto, W., de Noronha, C., Cavrois, M., Williams, S.A., and Greene, W.C. (2005). Nef is physically recruited into the immunological synapse and potentiates T cell activation early after TCR engagement. *Journal of immunology* 175, 6050-6057.
- Ferrero, M.C., Hielpos, M.S., Carvalho, N.B., Barrionuevo, P., Corsetti, P.P., Giambartolomei, G.H., Oliveira, S.C., and Baldi, P.C. (2014). Key role of Toll-like receptor 2 in the inflammatory response and major histocompatibility complex class II downregulation in *Brucella abortus*-infected alveolar macrophages. *Infection and immunity* 82, 626-639.
- Fitzer-Attas, C.J., Lowry, M., Crowley, M.T., Finn, A.J., Meng, F., DeFranco, A.L., and Lowell, C.A. (2000). Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *The Journal of experimental medicine* 191, 669-682.
- Fitzpatrick, A.M., Holguin, F., Teague, W.G., and Brown, L.A. (2008). Alveolar macrophage phagocytosis is impaired in children with poorly controlled asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 121, 1372-1378, 1378 e1371-1373.
- Flannagan, R.S., Cosio, G., and Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature reviews Microbiology* 7, 355-366.
- Flannagan, R.S., Jaumouille, V., and Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annual review of pathology* 7, 61-98.
- Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 917-929.
- Foster, J.L., Denial, S.J., Temple, B.R., and Garcia, J.V. (2011). Mechanisms of HIV-1 Nef function and intracellular signaling. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 6, 230-246.
- Foster, J.L., and Garcia, J.V. (2008). HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology* 5, 84.
- Frankel, A.D., and Young, J.A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual review of biochemistry* 67, 1-25.

- Fratti, R.A., Backer, J.M., Gruenberg, J., Corvera, S., and Deretic, V. (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *The Journal of cell biology* *154*, 631-644.
- Fratti, R.A., Chua, J., and Deretic, V. (2003a). Induction of p38 mitogen-activated protein kinase reduces early endosome autoantigen 1 (EEA1) recruitment to phagosomal membranes. *The Journal of biological chemistry* *278*, 46961-46967.
- Fratti, R.A., Chua, J., Vergne, I., and Deretic, V. (2003b). Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 5437-5442.
- Fujimoto, M., Nakano, M., Terabe, F., Kawahata, H., Ohkawara, T., Han, Y., Ripley, B., Serada, S., Nishikawa, T., Kimura, A., *et al.* (2011). The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of immunology* *186*, 32-40.
- Gallois, A., Klein, J.R., Allen, L.A., Jones, B.D., and Nauseef, W.M. (2001). Salmonella pathogenicity island 2-encoded type III secretion system mediates exclusion of NADPH oxidase assembly from the phagosomal membrane. *Journal of immunology* *166*, 5741-5748.
- Garcia, E., Nikolic, D.S., and Piguet, V. (2008). HIV-1 replication in dendritic cells occurs through a tetraspanin-containing compartment enriched in AP-3. *Traffic* *9*, 200-214.
- Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J.F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., and Desjardins, M. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *The Journal of cell biology* *152*, 165-180.
- Gaudin, R., de Alencar, B.C., Arhel, N., and Benaroch, P. (2013). HIV trafficking in host cells: motors wanted! *Trends in cell biology* *23*, 652-662.
- Gaudin, R., de Alencar, B.C., Jouve, M., Berre, S., Le Boudier, E., Schindler, M., Varthaman, A., Gobert, F.X., and Benaroch, P. (2012). Critical role for the kinesin KIF3A in the HIV life cycle in primary human macrophages. *The Journal of cell biology* *199*, 467-479.
- Geissmann, F., Dieu-Nosjean, M.C., Dezutter, C., Valladeau, J., Kayal, S., Leborgne, M., Brousse, N., Saeland, S., and Davoust, J. (2002). Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *The Journal of experimental medicine* *196*, 417-430.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* *327*, 656-661.
- Gennerich, A., and Vale, R.D. (2009). Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Current opinion in cell biology* *21*, 59-67.
- Germain, R.N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* *76*, 287-299.
- Geyer, M., Fackler, O.T., and Peterlin, B.M. (2001). Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO reports* *2*, 580-585.
- Geyer, M., Munte, C.E., Schorr, J., Kellner, R., and Kalbitzer, H.R. (1999). Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein. *Journal of molecular biology* *289*, 123-138.
- Geyer, M., and Peterlin, B.M. (2001). Domain assembly, surface accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef. *FEBS letters* *496*, 91-95.
- Ghafouri, M., Amini, S., Khalili, K., and Sawaya, B.E. (2006). HIV-1 associated dementia: symptoms and causes. *Retrovirology* *3*, 28.
- Ghosh, S., and Hayden, M.S. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nature reviews Immunology* *8*, 837-848.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* *109 Suppl*, S81-96.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology* *16*, 225-260.
- Giacca, M. (2005). HIV-1 Tat, apoptosis and the mitochondria: a tubulin link? *Retrovirology* *2*, 7.
- Gibbs, J.S., Lackner, A.A., Lang, S.M., Simon, M.A., Sehgal, P.K., Daniel, M.D., and Desrosiers, R.C. (1995). Progression to AIDS in the absence of a gene for vpr or vpx. *Journal of virology* *69*, 2378-2383.
- Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature reviews Immunology* *14*, 392-404.
- Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology* *221*, 3-12.

- Goh, W.C., Manel, N., and Emerman, M. (2004). The human immunodeficiency virus Vpr protein binds Cdc25C: implications for G2 arrest. *Virology* 318, 337-349.
- Goletti, D., Carrara, S., Vincenti, D., Giacomini, E., Fattorini, L., Garbuglia, A.R., Capobianchi, M.R., Alonzi, T., Fimia, G.M., Federico, M., *et al.* (2004). Inhibition of HIV-1 replication in monocyte-derived macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of infectious diseases* 189, 624-633.
- Gomes, L.C., and Dikic, I. (2014). Autophagy in antimicrobial immunity. *Molecular cell* 54, 224-233.
- Gomez, C., and Hope, T.J. (2005). The ins and outs of HIV replication. *Cellular microbiology* 7, 621-626.
- Gonda, M.A. (1994). Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 724, 22-42.
- Goodridge, H.S., Underhill, D.M., and Toret, N. (2012). Mechanisms of Fc receptor and dectin-1 activation for phagocytosis. *Traffic* 13, 1062-1071.
- Gordon, M.A. (2008). Salmonella infections in immunocompromised adults. *The Journal of infection* 56, 413-422.
- Gordon, M.A., Banda, H.T., Gondwe, M., Gordon, S.B., Boeree, M.J., Walsh, A.L., Corkill, J.E., Hart, C.A., Gilks, C.F., and Molyneux, M.E. (2002). Non-typhoidal salmonella bacteraemia among HIV-infected Malawian adults: high mortality and frequent recrudescence. *Aids* 16, 1633-1641.
- Gordon, M.A., Gordon, S.B., Musaya, L., Zijlstra, E.E., Molyneux, M.E., and Read, R.C. (2007). Primary macrophages from HIV-infected adults show dysregulated cytokine responses to Salmonella, but normal internalization and killing. *Aids* 21, 2399-2408.
- Gordon, M.A., Kankwatira, A.M., Mwafulirwa, G., Walsh, A.L., Hopkins, M.J., Parry, C.M., Faragher, E.B., Zijlstra, E.E., Heyderman, R.S., and Molyneux, M.E. (2010). Invasive non-typhoid salmonellae establish systemic intracellular infection in HIV-infected adults: an emerging disease pathogenesis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 50, 953-962.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology* 3, 23-35.
- Gordon, S., and Pluddemann, A. (2013). Tissue macrophage heterogeneity: issues and prospects. *Seminars in immunopathology* 35, 533-540.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology* 5, 953-964.
- Gorry, P.R., McPhee, D.A., Verity, E., Dyer, W.B., Wesselingh, S.L., Learmont, J., Sullivan, J.S., Roche, M., Zaunders, J.J., Gabuzda, D., *et al.* (2007). Pathogenicity and immunogenicity of attenuated, nef-deleted HIV-1 strains in vivo. *Retrovirology* 4, 66.
- Goujon, C., Moncorge, O., Bauby, H., Doyle, T., Ward, C.C., Schaller, T., Hue, S., Barclay, W.S., Schulz, R., and Malim, M.H. (2013). Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502, 559-562.
- Gousset, K., Ablan, S.D., Coren, L.V., Ono, A., Soheilian, F., Nagashima, K., Ott, D.E., and Freed, E.O. (2008). Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages. *PLoS pathogens* 4, e1000015.
- Gouveia, S.M., and Akhmanova, A. (2010). Cell and molecular biology of microtubule plus end tracking proteins: end binding proteins and their partners. *International review of cell and molecular biology* 285, 1-74.
- Gras, G., and Kaul, M. (2010). Molecular mechanisms of neuroinvasion by monocytes-macrophages in HIV-1 infection. *Retrovirology* 7, 30.
- Griffiths, G., Nystrom, B., Sable, S.B., and Khuller, G.K. (2010). Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. *Nature reviews Microbiology* 8, 827-834.
- Grigoriadis, G., Zhan, Y., Grumont, R.J., Metcalf, D., Handman, E., Cheers, C., and Gerondakis, S. (1996). The Rel subunit of NF-kappaB-like transcription factors is a positive and negative regulator of macrophage gene expression: distinct roles for Rel in different macrophage populations. *The EMBO journal* 15, 7099-7107.
- Groot, F., Welsch, S., and Sattentau, Q.J. (2008). Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses. *Blood* 111, 4660-4663.
- Groves, E., Dart, A.E., Covarelli, V., and Caron, E. (2008). Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 1957-1976.
- Guenzel, C.A., Herate, C., and Benichou, S. (2014). HIV-1 Vpr-a still "enigmatic multitasker". *Frontiers in microbiology* 5, 127.

- Guiet, R., Poincloux, R., Castandet, J., Marois, L., Labrousse, A., Le Cabec, V., and Maridonneau-Parini, I. (2008). Hematopoietic cell kinase (Hck) isoforms and phagocyte duties - from signaling and actin reorganization to migration and phagocytosis. *European journal of cell biology* 87, 527-542.
- Gummuluru, S., and Emerman, M. (1999). Cell cycle- and Vpr-mediated regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression in primary and transformed T-cell lines. *Journal of virology* 73, 5422-5430.
- Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., and Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753-766.
- Haas, A. (2007). The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* 8, 311-330.
- Haas, A., Zimmermann, K., and Oxenius, A. (2011). Antigen-dependent and -independent mechanisms of T and B cell hyperactivation during chronic HIV-1 infection. *Journal of virology* 85, 12102-12113.
- Habermann, A., Schroer, T.A., Griffiths, G., and Burkhardt, J.K. (2001). Immunolocalization of cytoplasmic dynein and dynactin subunits in cultured macrophages: enrichment on early endocytic organelles. *Journal of cell science* 114, 229-240.
- Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Bennett, M.K., Klip, A., Grinstein, S., and Manolson, M.F. (1996). Characterization and subcellular localization of target membrane soluble NSF attachment protein receptors (t-SNAREs) in macrophages. Syntaxins 2, 3, and 4 are present on phagosomal membranes. *Journal of immunology* 156, 4377-4383.
- Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Sjolín, C., Schreiber, A.D., Trimble, W.S., and Grinstein, S. (1998). v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11691-11696.
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M., and Sharp, P.M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287, 607-614.
- Haller, C., Rauch, S., and Fackler, O.T. (2007). HIV-1 Nef employs two distinct mechanisms to modulate Lck subcellular localization and TCR induced actin remodeling. *PloS one* 2, e1212.
- Haller, C., Rauch, S., Michel, N., Hannemann, S., Lehmann, M.J., Keppler, O.T., and Fackler, O.T. (2006). The HIV-1 pathogenicity factor Nef interferes with maturation of stimulatory T-lymphocyte contacts by modulation of N-Wasp activity. *The Journal of biological chemistry* 281, 19618-19630.
- Hanna, Z., Kay, D.G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S., and Jolicoeur, P. (1998). Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 95, 163-175.
- Harada, A., Takei, Y., Kanai, Y., Tanaka, Y., Nonaka, S., and Hirokawa, N. (1998). Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *The Journal of cell biology* 141, 51-59.
- Haraga, A., Ohlson, M.B., and Miller, S.I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature reviews Microbiology* 6, 53-66.
- Harrich, D., and Hooker, B. (2002). Mechanistic aspects of HIV-1 reverse transcription initiation. *Reviews in medical virology* 12, 31-45.
- Harris, R.S., Hultquist, J.F., and Evans, D.T. (2012). The restriction factors of human immunodeficiency virus. *The Journal of biological chemistry* 287, 40875-40883.
- Harris, R.S., Petersen-Mahrt, S.K., and Neuberger, M.S. (2002). RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Molecular cell* 10, 1247-1253.
- Harrison, R.E., Brumell, J.H., Khandani, A., Bucci, C., Scott, C.C., Jiang, X., Finlay, B.B., and Grinstein, S. (2004). Salmonella impairs RILP recruitment to Rab7 during maturation of invasion vacuoles. *Molecular biology of the cell* 15, 3146-3154.
- Harrison, R.E., Bucci, C., Vieira, O.V., Schroer, T.A., and Grinstein, S. (2003). Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Molecular and cellular biology* 23, 6494-6506.
- Harrison, R.E., and Grinstein, S. (2002). Phagocytosis and the microtubule cytoskeleton. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 80, 509-515.
- Hatsuzawa, K., Tamura, T., Hashimoto, H., Hashimoto, H., Yokoya, S., Miura, M., Nagaya, H., and Wada, I. (2006). Involvement of syntaxin 18, an endoplasmic reticulum (ER)-localized SNARE protein, in ER-mediated phagocytosis. *Molecular biology of the cell* 17, 3964-3977.
- He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D.O., and Landau, N.R. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *Journal of virology* 69, 6705-6711.

- Heinsbroek, S.E., Taylor, P.R., Rosas, M., Willment, J.A., Williams, D.L., Gordon, S., and Brown, G.D. (2006). Expression of functionally different dectin-1 isoforms by murine macrophages. *Journal of immunology* *176*, 5513-5518.
- Hellmann, J., Zhang, M.J., Tang, Y., Rane, M., Bhatnagar, A., and Spite, M. (2013). Increased saturated fatty acids in obesity alter resolution of inflammation in part by stimulating prostaglandin production. *Journal of immunology* *191*, 1383-1392.
- Herbein, G., Gras, G., Khan, K.A., and Abbas, W. (2010). Macrophage signaling in HIV-1 infection. *Retrovirology* *7*, 34.
- Herbein, G., Mahlknecht, U., Batliwalla, F., Gregersen, P., Pappas, T., Butler, J., O'Brien, W.A., and Verdin, E. (1998). Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* *395*, 189-194.
- Herbein, G., and Varin, A. (2010). The macrophage in HIV-1 infection: from activation to deactivation? *Retrovirology* *7*, 33.
- Herbein, G., Varin, A., Larbi, A., Fortin, C., Mahlknecht, U., Fulop, T., and Aggarwal, B.B. (2008). Nef and TNFalpha are coplayers that favor HIV-1 replication in monocytic cells and primary macrophages. *Current HIV research* *6*, 117-129.
- Herre, J., Marshall, A.S., Caron, E., Edwards, A.D., Williams, D.L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Reis e Sousa, C., Gordon, S., and Brown, G.D. (2004). Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* *104*, 4038-4045.
- Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *The Journal of cell biology* *150*, 1311-1320.
- Hoppe, A.D., and Swanson, J.A. (2004). Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis. *Molecular biology of the cell* *15*, 3509-3519.
- Hoshino, Y., Nakata, K., Hoshino, S., Honda, Y., Tse, D.B., Shioda, T., Rom, W.N., and Weiden, M. (2002). Maximal HIV-1 replication in alveolar macrophages during tuberculosis requires both lymphocyte contact and cytokines. *The Journal of experimental medicine* *195*, 495-505.
- Howard, J., and Hyman, A.A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* *422*, 753-758.
- Hughes, R., Towers, G., and Noursadeghi, M. (2012). Innate immune interferon responses to human immunodeficiency virus-1 infection. *Reviews in medical virology* *22*, 257-266.
- Huynh, K.K., Eskelinen, E.L., Scott, C.C., Malevanets, A., Saftig, P., and Grinstein, S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *The EMBO journal* *26*, 313-324.
- Huynh, K.K., Plumb, J.D., Downey, G.P., Valvano, M.A., and Grinstein, S. (2010). Inactivation of macrophage Rab7 by Burkholderia cenocepacia. *Journal of innate immunity* *2*, 522-533.
- Huynh, M.L., Malcolm, K.C., Kotaru, C., Tilstra, J.A., Westcott, J.Y., Fadok, V.A., and Wenzel, S.E. (2005). Defective apoptotic cell phagocytosis attenuates prostaglandin E2 and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid in severe asthma alveolar macrophages. *American journal of respiratory and critical care medicine* *172*, 972-979.
- Ibarra, J.A., and Steele-Mortimer, O. (2009). Salmonella--the ultimate insider. *Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. Cellular microbiology* *11*, 1579-1586.
- Ioan-Facsinay, A., de Kimpe, S.J., Hellwig, S.M., van Lent, P.L., Hofhuis, F.M., van Ojik, H.H., Sedlik, C., da Silveira, S.A., Gerber, J., de Jong, Y.F., *et al.* (2002). FcgammaRI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity* *16*, 391-402.
- Iwabu, Y., Fujita, H., Kinomoto, M., Kaneko, K., Ishizaka, Y., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K. (2009). HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *The Journal of biological chemistry* *284*, 35060-35072.
- Jacotot, E., Ferri, K.F., El Hamel, C., Brenner, C., Druillennec, S., Hoebeke, J., Rustin, P., Metivier, D., Lenoir, C., Geuskens, M., *et al.* (2001). Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *The Journal of experimental medicine* *193*, 509-519.
- Jacquot, G., Le Rouzic, E., David, A., Mazzolini, J., Bouchet, J., Bouaziz, S., Niedergang, F., Pancino, G., and Benichou, S. (2007). Localization of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope: impact on Vpr functions and virus replication in macrophages. *Retrovirology* *4*, 84.
- Jager, S., Kim, D.Y., Hultquist, J.F., Shindo, K., LaRue, R.S., Kwon, E., Li, M., Anderson, B.D., Yen, L., Stanley, D., *et al.* (2012). Vif hijacks CBF-beta to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* *481*, 371-375.

- Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., and Lecureur, V. (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular immunology* 281, 51-61.
- Jantsch, J., Binger, K.J., Muller, D.N., and Titze, J. (2014). Macrophages in homeostatic immune function. *Frontiers in physiology* 5, 146.
- Janvier, K., Pelchen-Matthews, A., Renaud, J.B., Caillet, M., Marsh, M., and Berlioz-Torrent, C. (2011). The ESCRT-0 component HRS is required for HIV-1 Vpu-mediated BST-2/tetherin down-regulation. *PLoS pathogens* 7, e1001265.
- Jaumouille, V., Farkash, Y., Jaqaman, K., Das, R., Lowell, C.A., and Grinstein, S. (2014). Actin cytoskeleton reorganization by Syk regulates Fcgamma receptor responsiveness by increasing its lateral mobility and clustering. *Developmental cell* 29, 534-546.
- Jenkins, S.J., Ruckerl, D., Cook, P.C., Jones, L.H., Finkelman, F.D., van Rooijen, N., MacDonald, A.S., and Allen, J.E. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332, 1284-1288.
- Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R., and Neeffjes, J. (2001). The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Current biology : CB* 11, 1680-1685.
- Joshi, T., Butchar, J.P., and Tridandapani, S. (2006). Fcgamma receptor signaling in phagocytes. *International journal of hematology* 84, 210-216.
- Jouve, M., Sol-Foulon, N., Watson, S., Schwartz, O., and Benaroch, P. (2007). HIV-1 buds and accumulates in "nonacidic" endosomes of macrophages. *Cell host & microbe* 2, 85-95.
- Jozefowski, S. (2012). [The role of the class A scavenger receptors, SR-A and MARCO, in the immune system. Part 2. Contribution to recognition and phagocytosis of pathogens as well as induction of immune response]. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej* 66, 120-131.
- Kamata, M., Nitahara-Kasahara, Y., Miyamoto, Y., Yoneda, Y., and Aida, Y. (2005). Importin-alpha promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *Journal of virology* 79, 3557-3564.
- Kao, S., Khan, M.A., Miyagi, E., Plishka, R., Buckler-White, A., and Strebel, K. (2003). The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *Journal of virology* 77, 11398-11407.
- Kardon, J.R., and Vale, R.D. (2009). Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 854-865.
- Kastenbauer, S., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1999). NF-kappaB1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. *Infection and immunity* 67, 1553-1559.
- Kedzierska, K., and Crowe, S.M. (2002). The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Current medicinal chemistry* 9, 1893-1903.
- Kedzierska, K., Ellery, P., Mak, J., Lewin, S.R., Crowe, S.M., and Jaworowski, A. (2002). HIV-1 down-modulates gamma signaling chain of Fc gamma R in human macrophages: a possible mechanism for inhibition of phagocytosis. *Journal of immunology* 168, 2895-2903.
- Kerrigan, A.M., and Brown, G.D. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 214, 562-575.
- Kestler, H.W., 3rd, Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D., and Desrosiers, R.C. (1991). Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65, 651-662.
- Keyel, P.A. (2014). How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine* 69, 136-145.
- Kinchen, J.M., and Ravichandran, K.S. (2008). Phagosome maturation: going through the acid test. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 781-795.
- Kino, T., Gragerov, A., Valentin, A., Tsopanomalou, M., Ilyina-Gragerova, G., Erwin-Cohen, R., Chrousos, G.P., and Pavlakis, G.N. (2005). Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to 14-3-3 proteins and facilitates complex formation with Cdc25C: implications for cell cycle arrest. *Journal of virology* 79, 2780-2787.
- Kirchhoff, F., Greenough, T.C., Brettler, D.B., Sullivan, J.L., and Desrosiers, R.C. (1995). Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *The New England journal of medicine* 332, 228-232.

- Kirchhoff, F., Schindler, M., Specht, A., Arhel, N., and Munch, J. (2008). Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 2621-2636.
- Kishimoto, T. (1989). The biology of interleukin-6. *Blood* 74, 1-10.
- Kobayashi, T., Ode, H., Yoshida, T., Sato, K., Gee, P., Yamamoto, S.P., Ebina, H., Strebel, K., Sato, H., and Koyanagi, Y. (2011). Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *Journal of virology* 85, 932-945.
- Koenig, S., Gendelman, H.E., Orenstein, J.M., Dal Canto, M.C., Pezeshkpour, G.H., Yungbluth, M., Janotta, F., Aksamit, A., Martin, M.A., and Fauci, A.S. (1986). Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233, 1089-1093.
- Kogan, M., and Rappaport, J. (2011). HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology* 8, 25.
- Komarova, Y., De Groot, C.O., Grigoriev, I., Gouveia, S.M., Munteanu, E.L., Schober, J.M., Honnappa, S., Buey, R.M., Hoogenraad, C.C., Dogterom, M., *et al.* (2009). Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *The Journal of cell biology* 184, 691-706.
- Komarova, Y., Lansbergen, G., Galjart, N., Grosveld, F., Borisy, G.G., and Akhmanova, A. (2005). EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Molecular biology of the cell* 16, 5334-5345.
- Kopp, P., Lammers, R., Aepfelbacher, M., Woehlke, G., Rudel, T., Machuy, N., Steffen, W., and Linder, S. (2006). The kinesin KIF1C and microtubule plus ends regulate podosome dynamics in macrophages. *Molecular biology of the cell* 17, 2811-2823.
- Koppensteiner, H., Brack-Werner, R., and Schindler, M. (2012). Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology* 9, 82.
- Kornfeld, H., Mancino, G., and Colizzi, V. (1999). The role of macrophage cell death in tuberculosis. *Cell death and differentiation* 6, 71-78.
- Kramer, B., Pelchen-Matthews, A., Deneka, M., Garcia, E., Piguet, V., and Marsh, M. (2005). HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood cells, molecules & diseases* 35, 136-142.
- Kumar, A., Abbas, W., and Herbein, G. (2014). HIV-1 latency in monocytes/macrophages. *Viruses* 6, 1837-1860.
- Kuroda, M.J. (2010). Macrophages: do they impact AIDS progression more than CD4 T cells? *Journal of leukocyte biology* 87, 569-573.
- Kyei, G.B., Dinkins, C., Davis, A.S., Roberts, E., Singh, S.B., Dong, C., Wu, L., Kominami, E., Ueno, T., Yamamoto, A., *et al.* (2009). Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *The Journal of cell biology* 186, 255-268.
- la Porte, C.J. (2009). Saquinavir, the pioneer antiretroviral protease inhibitor. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 5, 1313-1322.
- Laguette, N., Bregnard, C., Bouchet, J., Benmerah, A., Benichou, S., and Basmaciogullari, S. (2009). Nef-induced CD4 endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 host cells: role of p56lck kinase. *Journal of virology* 83, 7117-7128.
- Laguette, N., Bregnard, C., Hue, P., Basbous, J., Yatim, A., Larroque, M., Kirchhoff, F., Constantinou, A., Sobhian, B., and Benkirane, M. (2014). Premature activation of the SLX4 complex by Vpr promotes G2/M arrest and escape from innate immune sensing. *Cell* 156, 134-145.
- Lang, S.M., Weeger, M., Stahl-Hennig, C., Coulibaly, C., Hunsmann, G., Muller, J., Muller-Hermelink, H., Fuchs, D., Wachter, H., Daniel, M.M., *et al.* (1993). Importance of vpr for infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *Journal of virology* 67, 902-912.
- Lawrence, T. (2011). Macrophages and NF-kappaB in cancer. *Current topics in microbiology and immunology* 349, 171-184.
- Lawrence, T., and Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature reviews Immunology* 11, 750-761.
- Le Cabec, V., Emorine, L.J., Toesca, I., Cougoule, C., and Maridonneau-Parini, I. (2005). The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor. *Journal of leukocyte biology* 77, 934-943.
- Le Roux, D., Le Bon, A., Dumas, A., Taleb, K., Sachse, M., Sikora, R., Julithe, M., Benmerah, A., Bismuth, G., and Niedergang, F. (2012). Antigen stored in dendritic cells after macropinocytosis is released unprocessed from late endosomes to target B cells. *Blood* 119, 95-105.

- Le Rouzic, E., Morel, M., Ayinde, D., Belaidouni, N., Letienne, J., Transy, C., and Margottin-Goguet, F. (2008). Assembly with the Cul4A-DDB1DCAF1 ubiquitin ligase protects HIV-1 Vpr from proteasomal degradation. *The Journal of biological chemistry* 283, 21686-21692.
- Le Rouzic, E., Mousnier, A., Rustum, C., Stutz, F., Hallberg, E., Dargemont, C., and Benichou, S. (2002). Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *The Journal of biological chemistry* 277, 45091-45098.
- Lee, J.J., Kim, D.H., Kim, D.G., Lee, H.J., Min, W., Rhee, M.H., Cho, J.Y., Watarai, M., and Kim, S. (2013). Toll-like receptor 4-linked Janus kinase 2 signaling contributes to internalization of *Brucella abortus* by macrophages. *Infection and immunity* 81, 2448-2458.
- Lee, M.S., and Kim, Y.J. (2007). Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annual review of biochemistry* 76, 447-480.
- Leeansyah, E., Wines, B.D., Crowe, S.M., and Jaworowski, A. (2007). The mechanism underlying defective Fcγ receptor-mediated phagocytosis by HIV-1-infected human monocyte-derived macrophages. *Journal of immunology* 178, 1096-1104.
- Lewkowicz, E., Herit, F., Le Clainche, C., Bourdoncle, P., Perez, F., and Niedergang, F. (2008). The microtubule-binding protein CLIP-170 coordinates mDial and actin reorganization during CR3-mediated phagocytosis. *The Journal of cell biology* 183, 1287-1298.
- Lindwasser, O.W., Smith, W.J., Chaudhuri, R., Yang, P., Hurley, J.H., and Bonifacino, J.S. (2008). A diacidic motif in human immunodeficiency virus type 1 Nef is a novel determinant of binding to AP-2. *Journal of virology* 82, 1166-1174.
- Littlefield, R., and Fowler, V.M. (2002). A minor actin catastrophe. *Nature cell biology* 4, E209-211.
- Lorenzi, R., Brickell, P.M., Katz, D.R., Kinnon, C., and Thrasher, A.J. (2000). Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis. *Blood* 95, 2943-2946.
- Lu, X., Yu, H., Liu, S.H., Brodsky, F.M., and Peterlin, B.M. (1998). Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4. *Immunity* 8, 647-656.
- Ludlow, L.E., Zhou, J., Tippett, E., Cheng, W.J., Hasang, W., Rogerson, S.J., and Jaworowski, A. (2012). HIV-1 inhibits phagocytosis and inflammatory cytokine responses of human monocyte-derived macrophages to *P. falciparum* infected erythrocytes. *PloS one* 7, e32102.
- Lum, J.J., Cohen, O.J., Nie, Z., Weaver, J.G., Gomez, T.S., Yao, X.J., Lynch, D., Pilon, A.A., Hawley, N., Kim, J.E., *et al.* (2003). Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *The Journal of clinical investigation* 111, 1547-1554.
- Ma, J., Becker, C., Lowell, C.A., and Underhill, D.M. (2012). Dectin-1-triggered recruitment of light chain 3 protein to phagosomes facilitates major histocompatibility complex class II presentation of fungal-derived antigens. *The Journal of biological chemistry* 287, 34149-34156.
- Ma, J., Becker, C., Reyes, C., and Underhill, D.M. (2014). Cutting edge: FYCO1 recruitment to dectin-1 phagosomes is accelerated by light chain 3 protein and regulates phagosome maturation and reactive oxygen production. *Journal of immunology* 192, 1356-1360.
- Machesky, L.M., and Insall, R.H. (1999). Signaling to actin dynamics. *The Journal of cell biology* 146, 267-272.
- Maddocks, S., Scandurra, G.M., Nourse, C., Bye, C., Williams, R.B., Slobedman, B., Cunningham, A.L., and Britton, W.J. (2009). Gene expression in HIV-1/*Mycobacterium tuberculosis* co-infected macrophages is dominated by *M. tuberculosis*. *Tuberculosis* 89, 285-293.
- Malireddi, R.K., and Kanneganti, T.D. (2013). Role of type I interferons in inflammasome activation, cell death, and disease during microbial infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 3, 77.
- Mandelkow, E., and Mandelkow, E.M. (2002). Kinesin motors and disease. *Trends in cell biology* 12, 585-591.
- Mangino, G., Percario, Z.A., Fiorucci, G., Vaccari, G., Manrique, S., Romeo, G., Federico, M., Geyer, M., and Affabris, E. (2007). In vitro treatment of human monocytes/macrophages with myristoylated recombinant Nef of human immunodeficiency virus type 1 leads to the activation of mitogen-activated protein kinases, IκB kinases, and interferon regulatory factor 3 and to the release of beta interferon. *Journal of virology* 81, 2777-2791.
- Mantegazza, A.R., Magalhaes, J.G., Amigorena, S., and Marks, M.S. (2013). Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic* 14, 135-152.
- Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A., and Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology* 229, 176-185.

- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2007). New vistas on macrophage differentiation and activation. *European journal of immunology* 37, 14-16.
- Maranda, B., Brown, D., Bourgoïn, S., Casanova, J.E., Vinay, P., Ausiello, D.A., and Marshansky, V. (2001). Intra-endosomal pH-sensitive recruitment of the Arf-nucleotide exchange factor ARNO and Arf6 from cytoplasm to proximal tubule endosomes. *The Journal of biological chemistry* 276, 18540-18550.
- Marechal, V., Prevost, M.C., Petit, C., Perret, E., Heard, J.M., and Schwartz, O. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *Journal of virology* 75, 11166-11177.
- Marion, S., Mazzolini, J., Herit, F., Bourdoncle, P., Kambou-Pene, N., Hailfinger, S., Sachse, M., Ruland, J., Benmerah, A., Echard, A., *et al.* (2012). The NF-kappaB signaling protein Bcl10 regulates actin dynamics by controlling AP1 and OCRL-bearing vesicles. *Developmental cell* 23, 954-967.
- Marodi, L., Korchak, H.M., and Johnston, R.B., Jr. (1991). Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *Journal of immunology* 146, 2783-2789.
- Marsili, G., Remoli, A.L., Sgarbanti, M., Perrotti, E., Fragale, A., and Battistini, A. (2012). HIV-1, interferon and the interferon regulatory factor system: an interplay between induction, antiviral responses and viral evasion. *Cytokine & growth factor reviews* 23, 255-270.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 6, 13.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Van Haver, E.G., and Michiels, C.W. (2001). Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Applied and environmental microbiology* 67, 339-344.
- Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J.C., and Chavrier, P. (1998). Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *The EMBO journal* 17, 6219-6229.
- Matarrese, P., and Malorni, W. (2005). Human immunodeficiency virus (HIV)-1 proteins and cytoskeleton: partners in viral life and host cell death. *Cell death and differentiation* 12 Suppl 1, 932-941.
- May, R.C., Caron, E., Hall, A., and Machesky, L.M. (2000). Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcgammaR or CR3. *Nature cell biology* 2, 246-248.
- May, R.C., Hall, M.E., Higgs, H.N., Pollard, T.D., Chakraborty, T., Wehland, J., Machesky, L.M., and Sechi, A.S. (1999). The Arp2/3 complex is essential for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *Current biology* : CB 9, 759-762.
- May, R.C., and Machesky, L.M. (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of cell science* 114, 1061-1077.
- Mazzolini, J., Herit, F., Bouchet, J., Benmerah, A., Benichou, S., and Niedergang, F. (2010). Inhibition of phagocytosis in HIV-1-infected macrophages relies on Nef-dependent alteration of focal delivery of recycling compartments. *Blood* 115, 4226-4236.
- McAllister, J.J., Phillips, D., Millhouse, S., Conner, J., Hogan, T., Ross, H.L., and Wigdahl, B. (2000). Analysis of the HIV-1 LTR NF-kappaB-proximal Sp site III: evidence for cell type-specific gene regulation and viral replication. *Virology* 274, 262-277.
- McBride, H.M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R., and Zerial, M. (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* 98, 377-386.
- McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M., and Hope, T.J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *The Journal of cell biology* 159, 441-452.
- McNelis, J.C., and Olefsky, J.M. (2014). Macrophages, Immunity, and Metabolic Disease. *Immunity* 41, 36-48.
- Mehle, A., Goncalves, J., Santa-Marta, M., McPike, M., and Gabuzda, D. (2004). Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes & development* 18, 2861-2866.
- Merrill, J.E., Koyanagi, Y., and Chen, I.S. (1989). Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha can be induced from mononuclear phagocytes by human immunodeficiency virus type 1 binding to the CD4 receptor. *Journal of virology* 63, 4404-4408.
- Mesquida, M., Leszczynska, A., Llorens, V., and Adan, A. (2014). Interleukin-6 blockade in ocular inflammatory diseases. *Clinical and experimental immunology* 176, 301-309.

- Meylan, P.R., Guatelli, J.C., Munis, J.R., Richman, D.D., and Kornbluth, R.S. (1993). Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages. *Virology* 193, 138-148.
- Michaels, J., Price, R.W., and Rosenblum, M.K. (1988). Microglia in the giant cell encephalitis of acquired immune deficiency syndrome: proliferation, infection and fusion. *Acta neuropathologica* 76, 373-379.
- Michailidis, C., Giannopoulos, G., Vigklis, V., Armenis, K., Tsakris, A., and Gargalianos, P. (2012). Impaired phagocytosis among patients infected by the human immunodeficiency virus: implication for a role of highly active anti-retroviral therapy. *Clinical and experimental immunology* 167, 499-504.
- Mills, K.H., Dungan, L.S., Jones, S.A., and Harris, J. (2013). The role of inflammasome-derived IL-1 in driving IL-17 responses. *Journal of leukocyte biology* 93, 489-497.
- Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Lee, H., Zou, J., Saitoh, T., and Akira, S. (2013). Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nature immunology* 14, 454-460.
- Miyakawa, K., Ryo, A., Murakami, T., Ohba, K., Yamaoka, S., Fukuda, M., Guatelli, J., and Yamamoto, N. (2009). BCA2/Rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. *PLoS pathogens* 5, e1000700.
- Miyauchi, K., Kim, Y., Latinovic, O., Morozov, V., and Melikyan, G.B. (2009). HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* 137, 433-444.
- Molawi, K., and Sieweke, M.H. (2013). Transcriptional control of macrophage identity, self-renewal, and function. *Advances in immunology* 120, 269-300.
- Montaner, J.S., Hogg, R., Wood, E., Kerr, T., Tyndall, M., Levy, A.R., and Harrigan, P.R. (2006). The case for expanding access to highly active antiretroviral therapy to curb the growth of the HIV epidemic. *Lancet* 368, 531-536.
- Montaner, L.J., Griffin, P., and Gordon, S. (1994). Interleukin-10 inhibits initial reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and mediates a virostatic latent state in primary blood-derived human macrophages in vitro. *The Journal of general virology* 75 (Pt 12), 3393-3400.
- Moon, H.S., and Yang, J.S. (2006). Role of HIV Vpr as a regulator of apoptosis and an effector on bystander cells. *Molecules and cells* 21, 7-20.
- Morellet, N., Bouaziz, S., Petitjean, P., and Roques, B.P. (2003). NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *Journal of molecular biology* 327, 215-227.
- Moretti, J., and Blander, J.M. (2014). Insights into phagocytosis-coupled activation of pattern recognition receptors and inflammasomes. *Current opinion in immunology* 26, 100-110.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.
- Mori, M., and Gotoh, T. (2004). Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *The Journal of nutrition* 134, 2820S-2825S; discussion 2853S.
- Morrison, E.E., Wardleworth, B.N., Askham, J.M., Markham, A.F., and Meredith, D.M. (1998). EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. *Oncogene* 17, 3471-3477.
- Moughamian, A.J., and Holzbaur, E.L. (2012). Dynactin is required for transport initiation from the distal axon. *Neuron* 74, 331-343.
- Muratori, C., Mangino, G., Affabris, E., and Federico, M. (2010). Astrocytes contacting HIV-1-infected macrophages increase the release of CCL2 in response to the HIV-1-dependent enhancement of membrane-associated TNFalpha in macrophages. *Glia* 58, 1893-1904.
- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., *et al.* (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41, 14-20.
- Muthumani, K., Hwang, D.S., Choo, A.Y., Mayilvahanan, S., Dayes, N.S., Thieu, K.P., and Weiner, D.B. (2005). HIV-1 Vpr inhibits the maturation and activation of macrophages and dendritic cells in vitro. *International immunology* 17, 103-116.
- Muthumani, K., Kudchodkar, S., Pappasavvas, E., Montaner, L.J., Weiner, D.B., and Ayyavoo, V. (2000). HIV-1 Vpr regulates expression of beta chemokines in human primary lymphocytes and macrophages. *Journal of leukocyte biology* 68, 366-372.
- Mwandumba, H.C., Russell, D.G., Nyirenda, M.H., Anderson, J., White, S.A., Molyneux, M.E., and Squire, S.B. (2004). Mycobacterium tuberculosis resides in nonacidified vacuoles in endocytically competent alveolar macrophages from patients with tuberculosis and HIV infection. *Journal of immunology* 172, 4592-4598.

- Naghavi, M.H., and Goff, S.P. (2007). Retroviral proteins that interact with the host cell cytoskeleton. *Current opinion in immunology* 19, 402-407.
- Naif, H.M., Li, S., Alali, M., Sloane, A., Wu, L., Kelly, M., Lynch, G., Lloyd, A., and Cunningham, A.L. (1998). CCR5 expression correlates with susceptibility of maturing monocytes to human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* 72, 830-836.
- Naskar, D., Maiti, G., Chakraborty, A., Roy, A., Chattopadhyay, D., and Sen, M. (2014). Wnt5a-Rac1-NF-kappaB homeostatic circuitry sustains innate immune functions in macrophages. *Journal of immunology* 192, 4386-4397.
- Naslavsky, N., and Caplan, S. (2011). EHD proteins: key conductors of endocytic transport. *Trends in cell biology* 21, 122-131.
- Neeffjes, J., Jongsma, M.L., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews Immunology* 11, 823-836.
- Neil, S., and Bieniasz, P. (2009). Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 29, 569-580.
- Neil, S.J., Eastman, S.W., Jouvenet, N., and Bieniasz, P.D. (2006). HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS pathogens* 2, e39.
- Nermut, M.V., and Fassati, A. (2003). Structural analyses of purified human immunodeficiency virus type 1 intracellular reverse transcription complexes. *Journal of virology* 77, 8196-8206.
- Niedergang, F., and Chavrier, P. (2004). Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Current opinion in cell biology* 16, 422-428.
- Niedergang, F., and Chavrier, P. (2005). Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Current topics in microbiology and immunology* 291, 43-60.
- Niedergang, F., Colucci-Guyon, E., Dubois, T., Raposo, G., and Chavrier, P. (2003). ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *The Journal of cell biology* 161, 1143-1150.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews Immunology* 8, 34-47.
- Nisole, S., and Saib, A. (2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 1, 9.
- Nogales, E., and Wang, H.W. (2006). Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why? *Current opinion in cell biology* 18, 179-184.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A., and Downing, K.H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96, 79-88.
- Nordmann, M., Cabrera, M., Perz, A., Brocker, C., Ostrowicz, C., Engelbrecht-Vandre, S., and Ungermann, C. (2010). The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Current biology : CB* 20, 1654-1659.
- Nucera, S., Biziato, D., and De Palma, M. (2011). The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration. *The International journal of developmental biology* 55, 495-503.
- Nunes, P., Demarex, N., and Dinauer, M.C. (2013). Regulation of the NADPH oxidase and associated ion fluxes during phagocytosis. *Traffic* 14, 1118-1131.
- Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K.L., and Macallan, D.C. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Reviews in medical virology* 23, 221-240.
- O'Neill, E., Kuo, L.S., Krisko, J.F., Tomchick, D.R., Garcia, J.V., and Foster, J.L. (2006). Dynamic evolution of the human immunodeficiency virus type 1 pathogenic factor, Nef. *Journal of virology* 80, 1311-1320.
- Oda, A., and Eto, K. (2013). WASPs and WAVES: from molecular function to physiology in hematopoietic cells. *Seminars in cell & developmental biology* 24, 308-313.
- Olivetta, E., Percario, Z., Fiorucci, G., Mattia, G., Schiavoni, I., Dennis, C., Jager, J., Harris, M., Romeo, G., Affabris, E., *et al.* (2003). HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation. *Journal of immunology* 170, 1716-1727.
- Park, H., and Cox, D. (2009). Cdc42 regulates Fc gamma receptor-mediated phagocytosis through the activation and phosphorylation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and neural-WASP. *Molecular biology of the cell* 20, 4500-4508.

- Patel, N.R., Zhu, J., Tachado, S.D., Zhang, J., Wan, Z., Saukkonen, J., and Koziel, H. (2007). HIV impairs TNF-alpha mediated macrophage apoptotic response to Mycobacterium tuberculosis. *Journal of immunology* 179, 6973-6980.
- Patel, P.C., Fisher, K.H., Yang, E.C., Deane, C.M., and Harrison, R.E. (2009). Proteomic analysis of microtubule-associated proteins during macrophage activation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8, 2500-2514.
- Patel, P.C., and Harrison, R.E. (2008). Membrane ruffles capture C3bi-opsonized particles in activated macrophages. *Molecular biology of the cell* 19, 4628-4639.
- Pei, G., Repnik, U., Griffiths, G., and Gutierrez, M.G. (2014). Identification of an immune-regulated phagosomal Rab cascade in macrophages. *Journal of cell science* 127, 2071-2082.
- Peiser, L., Gough, P.J., Kodama, T., and Gordon, S. (2000). Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of Escherichia coli: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infection and immunity* 68, 1953-1963.
- Pelchen-Matthews, A., Kramer, B., and Marsh, M. (2003). Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *The Journal of cell biology* 162, 443-455.
- Peplowska, K., Markgraf, D.F., Ostrowicz, C.W., Bange, G., and Ungermann, C. (2007). The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis. *Developmental cell* 12, 739-750.
- Peterlin, B.M., and Trono, D. (2003). Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nature reviews Immunology* 3, 97-107.
- Piguet, V., and Sattentau, Q. (2004). Dangerous liaisons at the virological synapse. *The Journal of clinical investigation* 114, 605-610.
- Planelles, V., and Benichou, S. (2009). Vpr and its interactions with cellular proteins. *Current topics in microbiology and immunology* 339, 177-200.
- Plemel, R.L., Lobingier, B.T., Brett, C.L., Angers, C.G., Nickerson, D.P., Paulsel, A., Sprague, D., and Merz, A.J. (2011). Subunit organization and Rab interactions of Vps-C protein complexes that control endolysosomal membrane traffic. *Molecular biology of the cell* 22, 1353-1363.
- Podinovskaia, M., Lee, W., Caldwell, S., and Russell, D.G. (2013). Infection of macrophages with Mycobacterium tuberculosis induces global modifications to phagosomal function. *Cellular microbiology* 15, 843-859.
- Poe, J.A., and Smithgall, T.E. (2009). HIV-1 Nef dimerization is required for Nef-mediated receptor downregulation and viral replication. *Journal of molecular biology* 394, 329-342.
- Poli, G., Bressler, P., Kinter, A., Duh, E., Timmer, W.C., Rabson, A., Justement, J.S., Stanley, S., and Fauci, A.S. (1990). Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *The Journal of experimental medicine* 172, 151-158.
- Poli, G., and Fauci, A.S. (1992). The role of monocyte/macrophages and cytokines in the pathogenesis of HIV infection. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 60, 246-251.
- Poli, G., Kinter, A.L., and Fauci, A.S. (1994). Interleukin 1 induces expression of the human immunodeficiency virus alone and in synergy with interleukin 6 in chronically infected U1 cells: inhibition of inductive effects by the interleukin 1 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 108-112.
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208-1212.
- Popov, S., Rexach, M., Ratner, L., Blobel, G., and Bukrinsky, M. (1998). Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *The Journal of biological chemistry* 273, 13347-13352.
- Porcheray, F., Samah, B., Leone, C., Dereuddre-Bosquet, N., and Gras, G. (2006). Macrophage activation and human immunodeficiency virus infection: HIV replication directs macrophages towards a pro-inflammatory phenotype while previous activation modulates macrophage susceptibility to infection and viral production. *Virology* 349, 112-120.
- Prabhudas, M., Bowdish, D., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., Krieger, M., Loike, J., Means, T.K., Moestrup, S.K., et al. (2014). Standardizing scavenger receptor nomenclature. *Journal of immunology* 192, 1997-2006.

- Preusser, A., Briese, L., Baur, A.S., and Willbold, D. (2001). Direct in vitro binding of full-length human immunodeficiency virus type 1 Nef protein to CD4 cytoplasmic domain. *Journal of virology* 75, 3960-3964.
- Quie, P.G., White, J.G., Holmes, B., and Good, R.A. (1967). In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *The Journal of clinical investigation* 46, 668-679.
- Ramachandra, L., Song, R., and Harding, C.V. (1999). Phagosomes are fully competent antigen-processing organelles that mediate the formation of peptide:class II MHC complexes. *Journal of immunology* 162, 3263-3272.
- Rana, S., Besson, G., Cook, D.G., Rucker, J., Smyth, R.J., Yi, Y., Turner, J.D., Guo, H.H., Du, J.G., Peiper, S.C., *et al.* (1997). Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation. *Journal of virology* 71, 3219-3227.
- Raposo, G., Moore, M., Innes, D., Leijendekker, R., Leigh-Brown, A., Benaroch, P., and Geuze, H. (2002). Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* 3, 718-729.
- Rappaport, J., Joseph, J., Croul, S., Alexander, G., Del Valle, L., Amini, S., and Khalili, K. (1999). Molecular pathway involved in HIV-1-induced CNS pathology: role of viral regulatory protein, Tat. *Journal of leukocyte biology* 65, 458-465.
- Ravetch, J.V., and Bolland, S. (2001). IgG Fc receptors. *Annual review of immunology* 19, 275-290.
- Ravetch, J.V., and Clynes, R.A. (1998). Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annual review of immunology* 16, 421-432.
- Re, F., Braaten, D., Franke, E.K., and Luban, J. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *Journal of virology* 69, 6859-6864.
- Reszka, A.A., Seger, R., Diltz, C.D., Krebs, E.G., and Fischer, E.H. (1995). Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8881-8885.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122, 735-749.
- Rocco, N.M., Carmen, J.C., and Klein, B.S. (2011). *Blastomyces dermatitidis* yeast cells inhibit nitric oxide production by alveolar macrophage inducible nitric oxide synthase. *Infection and immunity* 79, 2385-2395.
- Roy, C.R., Berger, K.H., and Isberg, R.R. (1998). *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Molecular microbiology* 28, 663-674.
- Rudnicka, D., Feldmann, J., Porrot, F., Wietgreffe, S., Guadagnini, S., Prevost, M.C., Estaquier, J., Haase, A.T., Sol-Foulon, N., and Schwartz, O. (2009). Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. *Journal of virology* 83, 6234-6246.
- Russell, D.G. (2001). *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 569-577.
- Rybicka, J.M., Balce, D.R., Khan, M.F., Krohn, R.M., and Yates, R.M. (2010). NADPH oxidase activity controls phagosomal proteolysis in macrophages through modulation of the luminal redox environment of phagosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 10496-10501.
- Ryter, A., and Hellio, R. (1980). Electron-microscope study of *Dictyostelium discoideum* plasma membrane and its modifications during and after phagocytosis. *Journal of cell science* 41, 75-88.
- Sabio, G., and Davis, R.J. (2014). TNF and MAP kinase signalling pathways. *Seminars in immunology* 26, 237-245.
- Sabo, Y., Walsh, D., Barry, D.S., Tinaztepe, S., de Los Santos, K., Goff, S.P., Gundersen, G.G., and Naghavi, M.H. (2013). HIV-1 induces the formation of stable microtubules to enhance early infection. *Cell host & microbe* 14, 535-546.
- Sacks, D., and Sher, A. (2002). Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature immunology* 3, 1041-1047.
- Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S.H., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., *et al.* (2007). Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nature immunology* 8, 39-46.

- Sakurai, C., Hashimoto, H., Nakanishi, H., Arai, S., Wada, Y., Sun-Wada, G.H., Wada, I., and Hatsuzawa, K. (2012). SNAP-23 regulates phagosome formation and maturation in macrophages. *Molecular biology of the cell* *23*, 4849-4863.
- Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annual review of immunology* *30*, 491-529.
- Sanjuan, M.A., Dillon, C.P., Tait, S.W., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, J.L., Withoff, S., *et al.* (2007). Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* *450*, 1253-1257.
- Savina, A., and Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological reviews* *219*, 143-156.
- Sawaya, B.E., Khalili, K., Gordon, J., Taube, R., and Amini, S. (2000). Cooperative interaction between HIV-1 regulatory proteins Tat and Vpr modulates transcription of the viral genome. *The Journal of biological chemistry* *275*, 35209-35214.
- Sawaya, B.E., Khalili, K., Mercer, W.E., Denisova, L., and Amini, S. (1998). Cooperative actions of HIV-1 Vpr and p53 modulate viral gene transcription. *The Journal of biological chemistry* *273*, 20052-20057.
- Scarlat, S., and Carter, C. (2003). Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochimica et biophysica acta* *1614*, 62-72.
- Schlesinger, L.S. (1993). Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *Journal of immunology* *150*, 2920-2930.
- Schreiber, F., Lynn, D.J., Houston, A., Peters, J., Mwfulirwa, G., Finlay, B.B., Brinkman, F.S., Hancock, R.E., Heyderman, R.S., Dougan, G., *et al.* (2011). The human transcriptome during nontyphoid *Salmonella* and HIV coinfection reveals attenuated NF κ B-mediated inflammation and persistent cell cycle disruption. *The Journal of infectious diseases* *204*, 1237-1245.
- Schrijvers, D.M., De Meyer, G.R., Kockx, M.M., Herman, A.G., and Martinet, W. (2005). Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *25*, 1256-1261.
- Schroer, T.A. (2004). Dynactin. *Annual review of cell and developmental biology* *20*, 759-779.
- Schuler, W., Wecker, K., de Rocquigny, H., Baudat, Y., Sire, J., and Roques, B.P. (1999). NMR structure of the (52-96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: molecular insights into its biological functions. *Journal of molecular biology* *285*, 2105-2117.
- Schulert, G.S., and Allen, L.A. (2006). Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor. *Journal of leukocyte biology* *80*, 563-571.
- Schwartz, S., Felber, B.K., and Pavlakis, G.N. (1991). Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing. *Virology* *183*, 677-686.
- Scott, C.C., Botelho, R.J., and Grinstein, S. (2003). Phagosome maturation: a few bugs in the system. *The Journal of membrane biology* *193*, 137-152.
- Scott, C.C., Dobson, W., Botelho, R.J., Coady-Osberg, N., Chavrier, P., Knecht, D.A., Heath, C., Stahl, P., and Grinstein, S. (2005). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *The Journal of cell biology* *169*, 139-149.
- Sellers, J.R. (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochimica et biophysica acta* *1496*, 3-22.
- Serrao, E., Odde, S., Ramkumar, K., and Neamati, N. (2009). Raltegravir, elvitegravir, and metoogravir: the birth of "me-too" HIV-1 integrase inhibitors. *Retrovirology* *6*, 25.
- Seto, S., Tsujimura, K., and Koide, Y. (2011). Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. *Traffic* *12*, 407-420.
- Sharova, N., Swingler, C., Sharkey, M., and Stevenson, M. (2005). Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans. *The EMBO journal* *24*, 2481-2489.
- Sharp, P.M., and Hahn, B.H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* *1*, a006841.
- Sheng, W.S., Hu, S., Hegg, C.C., Thayer, S.A., and Peterson, P.K. (2000). Activation of human microglial cells by HIV-1 gp41 and Tat proteins. *Clinical immunology* *96*, 243-251.
- Shimura, M., Toyoda, Y., Iijima, K., Kinomoto, M., Tokunaga, K., Yoda, K., Yanagida, M., Sata, T., and Ishizaka, Y. (2011). Epigenetic displacement of HP1 from heterochromatin by HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation. *The Journal of cell biology* *194*, 721-735.

- Sierra, S., Kupfer, B., and Kaiser, R. (2005). Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 34, 233-244.
- Sieweke, M.H., and Allen, J.E. (2013). Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* 342, 1242974.
- Silver, K.E., and Harrison, R.E. (2011). Kinesin 5B is necessary for delivery of membrane and receptors during FcγR-mediated phagocytosis. *Journal of immunology* 186, 816-825.
- Simonsen, A., Gaullier, J.M., D'Arrigo, A., and Stenmark, H. (1999). The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6. *The Journal of biological chemistry* 274, 28857-28860.
- Smith, L.M., and May, R.C. (2013). Mechanisms of microbial escape from phagocyte killing. *Biochemical Society transactions* 41, 475-490.
- Sol-Foulon, N., Moris, A., Nobile, C., Boccaccio, C., Engering, A., Abastado, J.P., Heard, J.M., van Kooyk, Y., and Schwartz, O. (2002). HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity* 16, 145-155.
- Sollner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H., and Rothman, J.E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409-418.
- Somasundaran, M., Sharkey, M., Brichacek, B., Luzuriaga, K., Emerman, M., Sullivan, J.L., and Stevenson, M. (2002). Evidence for a cytopathogenicity determinant in HIV-1 Vpr. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9503-9508.
- Stasia, M.J., Cathebras, P., Lutz, M.F., and Durieu, I. (2009). [Chronic-granulomatous disease]. *La Revue de medecine interne / fondee par la Societe nationale francaise de medecine interne* 30, 221-232.
- Stearns-Kurosawa, D.J., Osuchowski, M.F., Valentine, C., Kurosawa, S., and Remick, D.G. (2011). The pathogenesis of sepsis. *Annual review of pathology* 6, 19-48.
- Steinberg, B.E., Huynh, K.K., and Grinstein, S. (2007). Phagosomal acidification: measurement, manipulation and functional consequences. *Biochemical Society transactions* 35, 1083-1087.
- Steinke, J.W., and Borish, L. (2006). 3. Cytokines and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* 117, S441-445.
- Stevenson, M. (2003). HIV-1 pathogenesis. *Nature medicine* 9, 853-860.
- Stewart, S.A., Poon, B., Jowett, J.B., and Chen, I.S. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *Journal of virology* 71, 5579-5592.
- Stolp, B., and Fackler, O.T. (2011). How HIV takes advantage of the cytoskeleton in entry and replication. *Viruses* 3, 293-311.
- Stolp, B., Reichman-Fried, M., Abraham, L., Pan, X., Giese, S.I., Hannemann, S., Goulimari, P., Raz, E., Grosse, R., and Fackler, O.T. (2009). HIV-1 Nef interferes with host cell motility by deregulation of Cofilin. *Cell host & microbe* 6, 174-186.
- Strasser, J.E., Newman, S.L., Ciralo, G.M., Morris, R.E., Howell, M.L., and Dean, G.E. (1999). Regulation of the macrophage vacuolar ATPase and phagosome-lysosome fusion by *Histoplasma capsulatum*. *Journal of immunology* 162, 6148-6154.
- Stroupe, C., Collins, K.M., Fratti, R.A., and Wickner, W. (2006). Purification of active HOPS complex reveals its affinities for phosphoinositides and the SNARE Vam7p. *The EMBO journal* 25, 1579-1589.
- Stuart, L.M., and Ezekowitz, R.A. (2005). Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* 22, 539-550.
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J., and Russell, D.G. (1994). Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263, 678-681.
- Su, L.K., Burrell, M., Hill, D.E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1995). APC binds to the novel protein EB1. *Cancer research* 55, 2972-2977.
- Su, L.K., and Qi, Y. (2001). Characterization of human MAPRE genes and their proteins. *Genomics* 71, 142-149.
- Subramanian, R.A., Kessous-Elbaz, A., Lodge, R., Forget, J., Yao, X.J., Bergeron, D., and Cohen, E.A. (1998). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages. *The Journal of experimental medicine* 187, 1103-1111.
- Swanson, J.A., and Hoppe, A.D. (2004). The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Journal of leukocyte biology* 76, 1093-1103.

- Swanson, J.A., Johnson, M.T., Beningo, K., Post, P., Mooseker, M., and Araki, N. (1999). A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *Journal of cell science* 112 (Pt 3), 307-316.
- Swanton, E., Bishop, N., Sheehan, J., High, S., and Woodman, P. (2000). Disassembly of membrane-associated NSF 20S complexes is slow relative to vesicle fusion and is Ca(2+)-independent. *Journal of cell science* 113 (Pt 10), 1783-1791.
- Sweet, M.J., Stacey, K.J., Ross, I.L., Ostrowski, M.C., and Hume, D.A. (1998). Involvement of Ets, rel and Sp1-like proteins in lipopolysaccharide-mediated activation of the HIV-1 LTR in macrophages. *Journal of inflammation* 48, 67-83.
- Swingler, S., Mann, A., Jacque, J., Brichacek, B., Sasseville, V.G., Williams, K., Lackner, A.A., Janoff, E.N., Wang, R., Fisher, D., *et al.* (1999). HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nature medicine* 5, 997-1003.
- Tabas, I., and Glass, C.K. (2013). Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* 339, 166-172.
- Tagliani, E., Shi, C., Nancy, P., Tay, C.S., Pamer, E.G., and Erlebacher, A. (2011). Coordinate regulation of tissue macrophage and dendritic cell population dynamics by CSF-1. *The Journal of experimental medicine* 208, 1901-1916.
- Tan, J., and Sattentau, Q.J. (2013). The HIV-1-containing macrophage compartment: a perfect cellular niche? *Trends in microbiology* 21, 405-412.
- Taneichi, D., Iijima, K., Doi, A., Koyama, T., Minemoto, Y., Tokunaga, K., Shimura, M., Kano, S., and Ishizaka, Y. (2011). Identification of SNF2h, a chromatin-remodeling factor, as a novel binding protein of Vpr of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 6, 177-187.
- Tang, H., Kuhen, K.L., and Wong-Staal, F. (1999). Lentivirus replication and regulation. *Annual review of genetics* 33, 133-170.
- Taylor, P.R., Tsoni, S.V., Willment, J.A., Dennehy, K.M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S., *et al.* (2007). Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nature immunology* 8, 31-38.
- Tersmette, M., Gruters, R.A., de Wolf, F., de Goede, R.E., Lange, J.M., Schellekens, P.T., Goudsmit, J., Huisman, H.G., and Miedema, F. (1989). Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *Journal of virology* 63, 2118-2125.
- Tervo, H.M., Homann, S., Ambiel, I., Fritz, J.V., Fackler, O.T., and Keppler, O.T. (2011). beta-TrCP is dispensable for Vpu's ability to overcome the CD317/Tetherin-imposed restriction to HIV-1 release. *Retrovirology* 8, 9.
- Thomas, C.A., Li, Y., Kodama, T., Suzuki, H., Silverstein, S.C., and El Khoury, J. (2000). Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *The Journal of experimental medicine* 191, 147-156.
- Thoulouze, M.I., Sol-Foulon, N., Blanchet, F., Dautry-Varsat, A., Schwartz, O., and Alcover, A. (2006). Human immunodeficiency virus type-1 infection impairs the formation of the immunological synapse. *Immunity* 24, 547-561.
- Thurston, T.L., Wandel, M.P., von Muhlinen, N., Foeglein, A., and Randow, F. (2012). Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482, 414-418.
- Tomasselli, A.G., and Heinrikson, R.L. (2000). Targeting the HIV-protease in AIDS therapy: a current clinical perspective. *Biochimica et biophysica acta* 1477, 189-214.
- Trombetta, E.S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M., and Mellman, I. (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299, 1400-1403.
- Tsuboi, S., and Meerloo, J. (2007). Wiskott-Aldrich syndrome protein is a key regulator of the phagocytic cup formation in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 282, 34194-34203.
- Tungaturthi, P.K., Sawaya, B.E., Singh, S.P., Tomkowicz, B., Ayyavoo, V., Khalili, K., Collman, R.G., Amini, S., and Srinivasan, A. (2003). Role of HIV-1 Vpr in AIDS pathogenesis: relevance and implications of intravirion, intracellular and free Vpr. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 57, 20-24.
- Turk, J.L. (1991). Metchnikoff revisited. *Journal of the Royal Society of Medicine* 84, 579-580.
- Tzircotis, G., Braga, V.M., and Caron, E. (2011). RhoG is required for both FcgammaR- and CR3-mediated phagocytosis. *Journal of cell science* 124, 2897-2902.

- Uchil, P.D., and Mothes, W. (2009). HIV Entry Revisited. *Cell* 137, 402-404.
- Underhill, D.M., and Goodridge, H.S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nature reviews Immunology* 12, 492-502.
- Underhill, D.M., and Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual review of immunology* 20, 825-852.
- van der Kant, R., Fish, A., Janssen, L., Janssen, H., Krom, S., Ho, N., Brummelkamp, T., Carette, J., Rocha, N., and Neefjes, J. (2013). Late endosomal transport and tethering are coupled processes controlled by RILP and the cholesterol sensor ORP1L. *Journal of cell science* 126, 3462-3474.
- Van Lint, C., Bouchat, S., and Marcello, A. (2013). HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* 10, 67.
- van Lookeren Campagne, M., Wiesmann, C., and Brown, E.J. (2007). Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cellular microbiology* 9, 2095-2102.
- Varin, A., Decrion, A.Z., Sabbah, E., Quivy, V., Sire, J., Van Lint, C., Roques, B.P., Aggarwal, B.B., and Herbein, G. (2005). Synthetic Vpr protein activates activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and NF-kappaB and stimulates HIV-1 transcription in promonocytic cells and primary macrophages. *The Journal of biological chemistry* 280, 42557-42567.
- Varin, A., Manna, S.K., Quivy, V., Decrion, A.Z., Van Lint, C., Herbein, G., and Aggarwal, B.B. (2003). Exogenous Nef protein activates NF-kappa B, AP-1, and c-Jun N-terminal kinase and stimulates HIV transcription in promonocytic cells. Role in AIDS pathogenesis. *The Journal of biological chemistry* 278, 2219-2227.
- Verani, A., Gras, G., and Pancino, G. (2005). Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons. *Molecular immunology* 42, 195-212.
- Verani, A., Pesenti, E., Polo, S., Tresoldi, E., Scarlatti, G., Lusso, P., Siccardi, A.G., and Vercelli, D. (1998). CXCR4 is a functional coreceptor for infection of human macrophages by CXCR4-dependent primary HIV-1 isolates. *Journal of immunology* 161, 2084-2088.
- Vergne, I., Chua, J., and Deretic, V. (2003). Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca²⁺/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *The Journal of experimental medicine* 198, 653-659.
- Via, L.E., Deretic, D., Ulmer, R.J., Hibler, N.S., Huber, L.A., and Deretic, V. (1997). Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *The Journal of biological chemistry* 272, 13326-13331.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J., and Grinstein, S. (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. *The Biochemical journal* 366, 689-704.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J., Rameh, L., Brachmann, S.M., Matsuo, T., Davidson, H.W., Schreiber, A., Backer, J.M., Cantley, L.C., and Grinstein, S. (2001). Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *The Journal of cell biology* 155, 19-25.
- Vieira, O.V., Bucci, C., Harrison, R.E., Trimble, W.S., Lanzetti, L., Gruenberg, J., Schreiber, A.D., Stahl, P.D., and Grinstein, S. (2003). Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Molecular and cellular biology* 23, 2501-2514.
- Vignali, D.A., and Kuchroo, V.K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology* 13, 722-728.
- Virgilio, R., Gonzalez, C., Munoz, N., and Mendoza, S. (1966). Electron microscopy of *Staphylococcus aureus* cell wall lysis. *Journal of bacteriology* 91, 2018-2024.
- Vodicka, M.A., Koepp, D.M., Silver, P.A., and Emerman, M. (1998). HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes & development* 12, 175-185.
- Wade, R.H., and Hyman, A.A. (1997). Microtubule structure and dynamics. *Current opinion in cell biology* 9, 12-17.
- Wahl, S.M., Greenwell-Wild, T., and Vazquez, N. (2006). HIV accomplices and adversaries in macrophage infection. *Journal of leukocyte biology* 80, 973-983.
- Waki, K., and Freed, E.O. (2010). Macrophages and Cell-Cell Spread of HIV-1. *Viruses* 2, 1603-1620.
- Walker, R.A., O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A., Erickson, H.P., and Salmon, E.D. (1988). Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *The Journal of cell biology* 107, 1437-1448.
- Wang, G. (2014). Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals* 7, 545-594.

- Wang, L., Mukherjee, S., Jia, F., Narayan, O., and Zhao, L.J. (1995). Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. *The Journal of biological chemistry* *270*, 25564-25569.
- Wang, L., Mukherjee, S., Narayan, O., and Zhao, L.J. (1996). Characterization of a leucine-zipper-like domain in Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* *178*, 7-13.
- Wang, T., Ming, Z., Xiaochun, W., and Hong, W. (2011). Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. *Cellular signalling* *23*, 516-521.
- Watts, C. (2004). Immunology. The bell tolls for phagosome maturation. *Science* *304*, 976-977.
- Watts, C., and Amigorena, S. (2001). Phagocytosis and antigen presentation. *Seminars in immunology* *13*, 373-379.
- Weissman, D., Poli, G., and Fauci, A.S. (1994). Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 induction of virus. *AIDS research and human retroviruses* *10*, 1199-1206.
- Wilson, J.E., Katkere, B., and Drake, J.R. (2009). Francisella tularensis induces ubiquitin-dependent major histocompatibility complex class II degradation in activated macrophages. *Infection and immunity* *77*, 4953-4965.
- Witkowski, W., and Verhasselt, B. (2013). Contributions of HIV-1 Nef to immune dysregulation in HIV-infected patients: a therapeutic target? *Expert opinion on therapeutic targets* *17*, 1345-1356.
- Wright, S.D., and Meyer, B.C. (1986). Phorbol esters cause sequential activation and deactivation of complement receptors on polymorphonuclear leukocytes. *Journal of immunology* *136*, 1759-1764.
- Yamaguchi, H., Nakagawa, I., Yamamoto, A., Amano, A., Noda, T., and Yoshimori, T. (2009). An initial step of GAS-containing autophagosome-like vacuoles formation requires Rab7. *PLoS pathogens* *5*, e1000670.
- Yanguéz, E., Garcia-Culebras, A., Frau, A., Llompert, C., Knobeloch, K.P., Gutierrez-Erlandsson, S., Garcia-Sastre, A., Esteban, M., Nieto, A., and Guerra, S. (2013). ISG15 regulates peritoneal macrophages functionality against viral infection. *PLoS pathogens* *9*, e1003632.
- Yates, R.M., Hermetter, A., and Russell, D.G. (2005). The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic* *6*, 413-420.
- Yates, R.M., Hermetter, A., Taylor, G.A., and Russell, D.G. (2007). Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. *Traffic* *8*, 241-250.
- Ye, H., Choi, H.J., Poe, J., and Smithgall, T.E. (2004). Oligomerization is required for HIV-1 Nef-induced activation of the Src family protein-tyrosine kinase, Hck. *Biochemistry* *43*, 15775-15784.
- Yeung, T., and Grinstein, S. (2007). Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis. *Immunological reviews* *219*, 17-36.
- Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., and Yu, X.F. (2003). Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* *302*, 1056-1060.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* *415*, 389-395.
- Zhang, H., Su, Y.J., Zhou, W.W., Wang, S.W., Xu, P.X., Yu, X.L., and Liu, R.T. (2014). Activated scavenger receptor A promotes glial internalization of abeta. *PloS one* *9*, e94197.
- Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R.J., Zhang, C., Arunachalam, S.C., and Gao, L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* *424*, 94-98.
- Zhang, J., Zhuang, L., Lee, Y., Abenza, J.F., Penalva, M.A., and Xiang, X. (2010a). The microtubule plus-end localization of Aspergillus dynein is important for dynein-early-endosome interaction but not for dynein ATPase activation. *Journal of cell science* *123*, 3596-3604.
- Zhang, Y., Lu, W., and Hong, M. (2010b). The membrane-bound structure and topology of a human alpha-defensin indicate a dimer pore mechanism for membrane disruption. *Biochemistry* *49*, 9770-9782.
- Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* *469*, 221-225.
- Zimmerman, E.S., Chen, J., Andersen, J.L., Ardon, O., Dehart, J.L., Blackett, J., Choudhary, S.K., Camerini, D., Nghiem, P., and Planelles, V. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G2 arrest requires Rad17 and Hus1 and induces nuclear BRCA1 and gamma-H2AX focus formation. *Molecular and cellular biology* *24*, 9286-9294.
- Zolopa, A., Andersen, J., Powderly, W., Sanchez, A., Sanne, I., Suckow, C., Hogg, E., and Komarow, L. (2009). Early antiretroviral therapy reduces AIDS progression/death in individuals with acute opportunistic infections: a multicenter randomized strategy trial. *PloS one* *4*, e5575.

Resumé

La phagocytose, fonction fondamentale des macrophages, est un processus qui se décompose en deux étapes bien distinctes : les étapes précoces d'internalisation menant à la formation du phagosome et les étapes tardives de maturation du phagosome. Le virus de l'immunodéficience humaine de type I (VIH-1) infecte les macrophages, ce qui perturbe leurs fonctions. L'effet de l'infection virale dans ces cellules est peu caractérisé en comparaison des lymphocytes T. Des travaux antérieurs ont montré d'une part que l'étape précoce d'internalisation de larges particules et bactéries était bloquée de moitié dans les macrophages primaires humains infectés par le VIH-1 via Nef, la protéine de virulence majeure du virus et d'autre part, que la réponse cytokinique était atténuée chez les patients infectés. Ainsi, nous avons étudié l'effet du VIH-1 sur les étapes tardives de la phagocytose : la maturation du phagosome et l'activation des macrophages qui en résulte. Nous avons montré que le VIH-1 altère les étapes tardives de la phagocytose en inhibant la maturation du phagosome, définie par le recrutement de marqueurs tardifs de la voie d'endocytose, d'hydrolases et la production d'espèces réactives oxygénées. Malgré une pré-activation basale, les macrophages infectés par le VIH-1 sont incapables de répondre efficacement à une stimulation induite par phagocytose, ce qui conduit à une modulation de la réponse transcriptionnelle et cytokinique. La dynamique des microtubules et la migration centripète des phagosomes sont profondément affectées par le virus. De façon inattendue, la protéine virale Vpr est impliquée dans ces perturbations, alors que Nef ne joue pas de rôle notable. Nos résultats indiquent que les composants intracellulaires de la machinerie de tri endosomal sont détournés par le compartiment viral dans les macrophages infectés. Par cette étude, nous avons donc identifié la protéine Vpr comme nouveau modulateur de la dynamique des microtubules et du trafic intracellulaire, entraînant ainsi une altération profonde de la maturation du phagosome et de la clairance bactérienne dans les macrophages infectés. Ce travail contribue à mieux comprendre l'établissement d'infections opportunistes chez les patients infectés.

Mots clés : macrophages, maturation du phagosome, activation, HIV-1, Vpr, microtubules, clairance bactérienne, voie d'endocytose

Abstract

Phagocytosis, a crucial function of macrophages, is composed of two well defined steps : the early step of internalization leading to phagosome formation and the late step of phagosome maturation. The immunodeficiency virus type I (HIV-1) infects macrophages, which disturbs their functions. The effects of HIV-1 infection are poorly characterized in this cell type compared to T lymphocytes. Previous results have already shown that the early step of internalization of large particles and bacteria are half blocked by Nef in HIV-1 infected primary macrophages and that the cytokine response is attenuated in infected patients. Thus, we have studied the effect of HIV-1 infection on the late step of phagocytosis : phagosome maturation and the resulting macrophage activation. We shown that HIV-1 impairs late phagocytic events affecting the phagosome maturation, as defined by late endocytic markers and hydrolases recruitment, and reactivities oxygens species production. HIV-1 infected macrophages exhibited a basal preactivation but appeared unable to respond efficiently to phagocytic triggers leading to cytokine and transcriptional modifications. Centripetal migration of phagosomes and microtubule dynamics were deeply altered upon viral infection. Surprisingly, the Vpr viral protein was implicated in these perturbations, while Nef was not. Our results revealed that elements of the endosomal sorting machinery were hijacked to the virus-containing compartments in HIV-infected macrophages. With this study, we identify Vpr as a modulator of the microtubule dynamics and intracellular trafficking, leading to alterations in phagosome maturation and bacterial clearance in HIV-1 infected macrophages. This work contribute to better understanding of the establishment of opportunistic infections in HIV-infected patients.

Key words : macrophages, phagosome maturation, activation, HIV-1, Vpr, microtubules, bacterial clearance, endocytic pathways.