



Université
de Toulouse

THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Biophysique cellulaire

Présentée et soutenue par :

Patrice MASCALCHI

le : vendredi 20 janvier 2012

Titre :

ANALYSE PAR SUIVI DE PARTICULE UNIQUE A LA SURFACE
DE LYMPHOCYTES VIVANTS DE L'ORGANISATION DYNAMIQUE
DES RECEPTEURS CD4 ET CCR5 IMPLIQUES DANS L'INFECTION PAR LE VIH

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) - UPS/CNRS - UMR5089

Directeur(s) de Thèse :

Laurence SALOME, Directeur de Recherche

André LOPEZ, Directeur de Recherche

Rapporteurs :

Pierre-Emmanuel MILHIET, Directeur de Recherche

Fernando ARENZANA-SEISDEDOS, Directeur de Recherche

Membre(s) du jury :

Rémy POUPOT, Professeur d'Université (Président du Jury)

Hugues DE ROCQUIGNY, Chargé de Recherche (Examineur)

Fabrice DUMAS, Maître de Conférence (Examineur)

Résumé

L'infection de lymphocytes T CD4⁺ par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) débute par l'interaction séquentielle de la protéine d'enveloppe du virus gp120 avec le récepteur primaire CD4 puis avec un corécepteur, CCR5 dans la majorité des cas de primo-infection. La nécessité de cette double interaction suggère que l'efficacité du mécanisme d'entrée du VIH pourrait dépendre de l'organisation membranaire dynamique de ces deux récepteurs.

Pour étudier cette organisation à la surface de lymphocytes vivants, nous avons utilisé une technique de microscopie non invasive : le suivi de particule unique (SPT). Cette approche permet d'analyser la diffusion de constituants membranaires avec une grande résolution spatio-temporelle. En particulier, elle autorise la détection de transitions dans les modes de diffusion observés.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude systématique pour évaluer l'influence de la particule et de la méthode de calcul du coefficient de diffusion sur le résultat d'expériences de SPT. L'outil de calcul du coefficient de diffusion a été affiné par l'analyse de trajectoires générées par simulation numérique. L'étude s'est ensuite focalisée sur le cas d'une sonde lipidique diffusant dans une membrane modèle, suivie par l'intermédiaire de particules couplées à des anticorps. Nous avons montré que la précision de la technique de SPT était dépendante de la nature (quantum dots, or, latex), de la taille et du taux de couverture en anticorps des particules. Les quantum dots (QD) se sont avérés être les meilleurs candidats pour des expériences de SPT.

La deuxième partie de notre travail a consisté à suivre et analyser le mouvement des récepteurs CD4 et CCR5 marqués avec des QD, à la surface de lymphocytes immobilisés sur une lamelle de verre. Ces expériences ont montré qu'il existe pour chaque récepteur des sous-populations ayant des modes de diffusion distincts : aléatoire, confiné de manière permanente ou de manière transitoire. L'ajout de molécules déstabilisant l'interaction CD4-CCR5 (CD4 soluble, maraviroc) a ensuite révélé que celle-ci est à l'origine de leur confinement, mais seulement de manière partielle. De plus, le suivi du récepteur CD4 a été effectué en présence de la protéine d'enveloppe virale gp120. Les résultats obtenus indiquent que la gp120 a des effets opposés sur le comportement du récepteur, qui résulteraient d'une différence de comportement diffusionnel des complexes CD4-gp120 et CD4-gp120-CCR5.

L'ensemble de nos observations nous permet de poser les bases d'un modèle d'organisation membranaire dynamique de CD4 et CCR5 à la surface de lymphocytes vivants. Ces données constituent un point de départ vers la compréhension du lien présumé entre l'organisation dynamique des récepteurs et les premières étapes du processus d'infection par le VIH.

Mots-clés : CD4, CCR5, VIH, suivi de particule unique, quantum dot, organisation membranaire dynamique, gp120, maraviroc.

Abstract

Infection of CD4⁺ T lymphocytes by the human immunodeficiency virus (HIV) is initiated by the sequential interaction of the viral envelope protein gp120 with the primary receptor CD4 and then a coreceptor, CCR5 in most cases of primo-infection. The necessity of this double interaction suggests that the efficiency of the HIV entry process could depend on the dynamic membrane organization of these two receptors.

To study this organization at the surface of living lymphocytes, we used single particle tracking (SPT), a non-invasive microscopy approach. This technique allows for the analysis of the diffusion of membrane components with a high spatio-temporal resolution. In particular, it permits the detection of transitions between the different observed diffusion modes.

Firstly, we performed a systematic study to evaluate the influence of the particle and the method to calculate the diffusion coefficient on the results of SPT experiments. According to the analysis of trajectories generated by numerical simulations, we refined the calculation of the diffusion coefficient. We then focused our work on the case of a lipid probe diffusing in a model membrane, tracked by the mean of particles coupled to antibodies. We showed that the precision of the SPT technique is dependent on the material (quantum dot, gold, latex), the size and the antibody conjugation rate of the particle. Quantum dots (QD) appeared to be the best candidates for SPT experiments.

Secondly, we determined and analyzed the movement of CD4 and CCR5 receptors labeled with QD, at the surface of lymphocytes immobilized on glass coverslips. These experiments showed that both receptors exhibit three different diffusion modes: random, permanently or transiently confined diffusion. Addition of molecules that destabilize the CD4-CCR5 interaction (soluble CD4, maraviroc) revealed that it is responsible for their confinement, but only partially. Furthermore, CD4 movement was observed in the presence of the viral envelope protein. The results indicate that gp120 induces opposite effects on the dynamic behavior of the receptor, which could be the consequence of a differential diffusion of CD4-gp120 and CD4-gp120-CCR5 complexes.

All these observations allow us to establish the basis for a model of the dynamic membrane organization of CD4 and CCR5 at the surface of living lymphocytes. These data represent a starting-point for the understanding of the presumed relationship between the dynamic organization of the receptors and the first steps of the HIV infection process.

Keywords: CD4, CCR5, HIV, single particle tracking, quantum dot, dynamic membrane organization, gp120, maraviroc.

SOMMAIRE

Abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Avant-propos	

Introduction

1. Généralités sur le VIH, agent étiologique de la maladie SIDA	1
1.1. Historique de découverte	1
1.2. Diversité génétique	2
1.3. Origine géographique et épidémiologie	2
1.4. Transmission du virus à l'homme	4
1.5. Evolution de la pathologie	5
2. Structure du virus et partenaires moléculaires	7
2.1. Le VIH, un rétrovirus à ARN simple brin	7
2.1.1. Généralités sur les rétrovirus	7
2.1.2. Cas du VIH-1 : structure des sous-unités gp120 et gp41 de la protéine d'enveloppe	7
2.1.3. Le VIH, un rétrovirus dit « complexe »	10
2.2. Cycle viral du VIH et rôle des protéines virales	11
2.2.1. Etapes précoces : accrochage et entrée dans la cellule cible	11
2.2.2. Etapes intracellulaires vers l'intégration du génome de l'hôte	13
2.2.3. Production de nouveaux virions	14
2.3. Devenir des virions néo-synthétisés, tropisme cellulaire et récepteurs	15
2.3.1. Dissémination aléatoire de virions libres	15
2.3.2. Dissémination orientée par association des virions à une cellule	16
2.3.2.1. Interactions cellulaires à courte et longue distance	16
2.3.2.2. Synapse virologique et transmission du virus	17
2.4. Les récepteurs majoritaires utilisés par le VIH-1	19
2.4.1. Le récepteur primaire CD4	19
2.4.1.1. Structure	19
2.4.1.2. Expression	20
2.4.1.3. Interactions et fonctions	21
2.4.1.4. Interaction avec la protéine d'enveloppe virale gp120	21
2.4.1.5. Oligomérisation	22
2.4.2. Le corécepteur CCR5	22
2.4.2.1. CCR5, un récepteur aux chimiokines, couplé aux protéines G	22
2.4.2.2. Structure des RCPG et illustration avec le récepteur CCR5	23
2.4.2.3. Expression de CCR5	24
2.4.2.4. Interactions et fonctions	24
2.4.2.5. Interaction avec la protéine d'enveloppe virale gp120	27
2.4.2.6. Homo- et hétéro-oligomérisation	28
3. Les stratégies de lutte contre le virus	30
3.1. Mécanismes de lutte naturels	30
3.1.1. Réponse immunitaire	30

3.1.1.1. Réponse immunitaire innée	30
3.1.1.2. Réponse immunitaire adaptative	32
3.1.2. Polymorphismes et infection par le VIH	34
3.2. Moyens thérapeutiques	35
3.2.1. Thérapies actuelles	35
3.2.2. Nouvelles approches	38
3.2.2.1. Eliminer les réservoirs	38
3.2.2.2. Limiter l'activation immunitaire	38
3.2.2.3. Transplantation autologue de cellules résistantes au VIH	38
3.2.2.4. Stratégie vaccinale	39
3.2.2.5. Inhibiteurs de la liaison du virus aux récepteurs	39
4. La membrane plasmique, lieu d'entrée du virus et début du cycle viral	40
4.1. La membrane plasmique	40
4.1.1. Découverte des membranes cellulaires	40
4.1.2. Composition de la membrane plasmique	40
4.1.2.1. Lipides membranaires	40
4.1.2.2. Protéines membranaires	42
4.1.2.3. Le glycocalyx	43
4.1.3. Evolution du modèle de la membrane plasmique	43
4.2. Les domaines membranaires	45
4.2.1. Origines moléculaires	45
4.2.1.1. Radeaux lipidiques	45
4.2.1.2. Compartimentation impliquant le cytosquelette	47
4.2.1.3. Interactions protéines-protéines	48
4.2.2. Rôles dans les fonctions cellulaires	49
4.3. Distribution hétérogène de CD4 et CCR5 à la surface des cellules cibles du VIH	51
4.3.1. Rôle du cholestérol et des sphingolipides	51
4.3.2. Rôle du cytosquelette d'actine	53
4.4. Plusieurs complexes CD4-gp120-CCR5 sont impliqués dans l'entrée du virus	54
4.5. Interaction constitutive des récepteurs CD4 et CCR5	57
4.6. Organisation membranaire dynamique des récepteurs du VIH	58
4.6.1. Outils d'étude de la dynamique de constituants membranaires	58
4.6.2. CD4 et CCR5 : beaucoup de mesures de diffusion, peu d'études des domaines membranaires	60
5. Projet de thèse	65

Chapitre I :

Mise au point du suivi de particule unique avec des Quantum dots

1. Suivi de Particule Unique	66
1.1. Principe et applications	66
1.2. Différentes particules utilisées	67

2. Choix des Quantum dots pour l'étude des récepteurs CD4 et CCR5 en SPT	67
2.1. Caractéristiques des QD	68
2.2. Fonctionnalisation et stratégies d'accrochage à la molécule d'intérêt	70
3. Montage du microscope pour le SPT avec les QD-655	72
3.1. Description du dispositif	72
3.2. Caméra d'acquisition et objectif	73
4. Traitement des données	76
4.1. Détection des QD et reconnexion des trajectoires	77
4.2. Tri des trajectoires analysables	81
5. Analyse de la diffusion des récepteurs	82
5.1. Déplacement quadratique moyen (MSD)	83
5.2. Intérêt du D_{1-2}	84
5.3. MSD et modes de diffusion	84
5.3.1. Diffusion aléatoire ou brownienne	84
5.3.2. Diffusion dirigée	85
5.3.3. Diffusion confinée	85
5.4. Index de confinement et détection de confinements transitoires	87
5.5. Limite de résolution de l'analyse et catégorie « immobiles »	88

Chapitre II :
Influence de la particule dans des expériences de SPT :
étude sur système membranaire modèle

1. Présentation de l'étude réalisée	92
2. Article n°1	94
3. Discussion	117

Chapitre III :
Mise au point du SPT sur des cellules pertinentes vis-à-vis du VIH

1. Choix de la lignée cellulaire	121
1.1. Expression des récepteurs CD4 et CCR5	121
1.2. Stratégie d'immobilisation sur lamelle de verre	123
2. Choix des anticorps anti-CD4 et anti-CCR5	125
2.1. Anticorps anti-CD4	125
2.2. Anticorps anti-CCR5	125
3. Optimisation du protocole de marquage des cellules avec les QD	129
4. Marquage des récepteurs CD4 et CCR5 avec les QD	133
4.1. Spécificité de marquage de CD4	134
4.2. Influence du lot de QD sur les résultats	135
4.3. Spécificité de marquage de CCR5	136

Chapitre IV : Suivi de CD4 et CCR5, récepteurs du VIH, à la surface d'une lignée lymphocytaire humaine

1. Etude du récepteur CD4	138
1.1. A l'état basal : 20°C / 37°C	138
1.1.1. Article n°2	139
1.1.2. Discussion	145
→ <i>Modèle d'organisation membranaire dynamique</i>	148
1.2. Diffusion de CD4 en présence de CD4 soluble (CD4s)	149
→ <i>Résultats</i>	150
→ <i>Bilan de l'effet du CD4s</i>	153
1.3 Diffusion de CD4 en présence de maraviroc	154
→ <i>Résultats</i>	154
→ <i>Bilan de l'effet du maraviroc et modèle d'organisation membranaire dynamique</i>	158
2. Etude du récepteur CCR5	159
2.1. Diffusion à l'état basal	160
→ <i>Résultats</i>	160
→ <i>Bilan du comportement de CCR5 à l'état basal</i>	162
2.2. Diffusion de CCR5 en présence de maraviroc	162
→ <i>Résultats</i>	163
→ <i>Bilan de l'effet du maraviroc et modèle d'organisation membranaire dynamique</i>	165
3. Diffusion de CD4 en présence de la protéine d'enveloppe virale gp120	168
3.1. Etude à température ambiante	168
→ <i>Résultats</i>	168
→ <i>Bilan de l'effet de la gp120 à 20°C</i>	171
3.2. Etude à 37°C	173
→ <i>Résultats</i>	173
→ <i>Bilan de l'effet de la gp120 à 37°C</i>	175

Conclusion et Perspectives

177

Références bibliographiques

189

Annexe : Matériels et Méthodes

211

Abréviations

Ac	Anticorps
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMPC	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN(m)	Acide RiboNucléique (messenger)
BSA	Bovine Serum Albumine
CCR5	C-C chemokine receptor type 5
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD4s	CD4 soluble
CF	Carboxy-Fluorescéine
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOPE	1,2-DiOleoyl-sn-glycero-3-PhosphoEthanolamine
DPBS	Dulbecco Phosphate Buffer Saline
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
EMCCD	Electron-Multiplying Charge-Coupled Device
gp120	glycoprotéine 120
gp41	glycoprotéine 41
HEK	Human Embryonic Kidney
MES	2-(N-Morpholino)EthaneSulfonic acid
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MLV	Multi-Lamellar Vesicles
MOPS	N-MORpholino-3-Propane Sulfonic acid
MSD	Mean Square Displacement (Déplacement Quadratique Moyen)
MTT	Multiple Target Tracing
NA	Numerical Aperture (Ouverture Numérique)
NBD	7-Nitro-2-1,3-BenzoxaDiazol-4-yl
PC	PhosphoCholine
PhycoE	PhycoErythrine
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine
px	pixel
QD	Quantum Dot
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNase	RiboNucléase
SA	Streptavidine
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SPT	Single Particle Tracking (Suivi de Particule Unique)
SUV	Small Unilamellar Vesicles
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TCR	T Cell Receptor
u. a.	unités arbitraires
VIH	Virus de l'Immunodéficiency Humaine

Liste des figures

1.	Arbre phylogénétique des différentes souches de VIH et VIS (S pour Simien).	3
2.	Situation épidémiologique pour le VIH dans le monde en 2009.	4
3.	Évolution de la charge virale et du système immunitaire au cours de l'infection par le VIH.	5
4.	Structure détaillée du VIH : schéma et reconstitution 3D par tomographie.	8
5.	Modélisation 3D des spicules à la surface de virions VIS.	9
6.	Structure des sous-unités de la protéine d'enveloppe Env.....	9
7.	Séquence du génome du virus VIH-1.	10
8.	Cycle viral du VIH, en 12 étapes.	11
9.	L'entrée du VIH dans la cellule cible est un processus multi-étapes séquentiel.	12
10.	Contact étroit entre une cellule présentatrice d'antigène (CPA) et un lymphocyte T. .	17
11.	Contact entre une CPA et un lymphocyte, un espace favorable à la transmission du VIH.	18
12.	Structure du récepteur CD4.....	20
13.	Structure schématique d'un RCPG et différents types d'interactions ligands-RCPG...	23
14.	Séquence protéique du récepteur CCR5 et vue de la face externe de la structure 3D d'un RCPG.....	25
15.	Schéma de la signalisation via les RCPG.....	26
16.	Modélisation du trimère de protéines d'enveloppe virale avec les récepteurs CD4 et CXCR4.	28
17.	Internalisation du récepteur CCR5 par complémentation via des homo- ou hétéro-dimères.	29
18.	Structure schématique d'une immunoglobuline G1 et exemple de fonction à médiation cellulaire.	32
19.	Les différents sites de la protéine d'enveloppe virale reconnus par les anticorps neutralisants.....	33
20.	Structure d'un glycérophospholipide et formules des différents groupements polaires.	41
21.	Asymétrie de composition lipidique de la membrane plasmique.....	42
22.	Les différents types de protéines membranaires.	43
23.	Schéma de la membrane plasmique.	44
24.	Cliché de microscopie électronique à transmission d'une cellule épithéliale et de son glycocalyx.....	44
25.	Composition lipidique et protéique des "rafts".	46
26.	Internalisation de protéines membranaires via deux voies différentes impliquant ou non les rafts.	50
27.	Images de virions (VIS et VIH) par tomographie et cryo-microscopie électronique. .	55
28.	Contacts entre une particule virale (VIH-1) et une cellule T.	56
29.	Principe du retour de fluorescence après photodégradation (FRAP).....	59
30.	Caractéristiques physiques et optiques des Quantum dots (QD).	69
31.	Exemple de variation de l'intensité de fluorescence d'un QD due à son clignotement.	70
32.	Comparaison des différents types de QD par marquage cellulaire et comptage.....	71
33.	Schéma du montage microscopique pour l'observation des QD en fluorescence et des cellules en lumière blanche.	72
34.	Spectres d'excitation et d'émission des QD-655 et filtres choisis.....	73
35.	Impact du choix du grossissement sur l'observation des QD.	74

36.	Importance de la taille des pixels dans la détection d'objets proches.....	75
37.	Schéma des étapes de traitement des données de SPT.....	76
38.	Déroulement des trois étapes principales de l'algorithme MTT.....	77
39.	Hypothèses utilisées dans le test de rapport de vraisemblance.....	78
40.	Représentation des zones de recherches lors de la reconnexion des positions des QD.....	80
41.	Superposition de l'image d'une cellule en lumière blanche et de QD à sa surface (épifluorescence), ainsi que des trajectoires correspondantes.....	82
42.	Trajectoires caractéristiques observées en SPT et courbes de MSD correspondantes.....	83
43.	Outil de détection des confinements transitoires.....	88
44.	Calcul des limites de résolution à partir du MSD de QD immobilisés.....	89
45.	Niveaux d'expression des récepteurs CD4 et CCR5 de plusieurs lignées cellulaires..	121
46.	Niveaux d'expression des récepteurs CD4 et CCR5 de la lignée lymphocytaire J.CCR5.....	122
47.	Immobilisation des cellules sur des lamelles recouvertes de polylysine.....	124
48.	Test de fixation de la gp120 à CCR5 en présence ou non d'anticorps anti-CCR5.....	126
49.	Evaluation de la constante d'affinité (KD) des anticorps par cytométrie en flux.....	127
50.	L'anticorps T21/8 n'inhibe pas la liaison CD4s-CCR5.....	128
51.	La liaison de l'anticorps T21/8 n'est pas inhibée en présence de maraviroc.....	129
52.	Importance de la composition du tampon des QD sur leur fixation non spécifique au verre.....	130
53.	Influence de la composition du tampon de dilution des QD sur leur clignotement.....	131
54.	Saturation des streptavidines des QD en fonction de la concentration en biotine libre.....	133
55.	Choix des concentrations QD / anticorps pour le marquage spécifique de CD4.....	134
56.	Différences de marquage de CD4 selon le lot de QD et l'anticorps anti-CD4 utilisé..	135
57.	Saturation des streptavidines des QD en fonction de la quantité de biotine libre.....	136
58.	Marquage spécifique de CCR5 avec l'anticorps T21/8.....	137
59.	Distribution des rayons des domaines détectés pour CD4 à 20°C et à 37°C.....	146
60.	Précision de l'analyse de la diffusion confinée en fonction du rayon des domaines obtenus.....	147
61.	Modèle d'organisation membranaire dynamique du récepteur CD4.....	148
62.	Schéma de la stratégie de suivi de CD4 en présence de CD4s.....	149
63.	Proportions des différents modes de diffusion observés pour CD4 en présence de CD4s ou non.....	150
64.	Distribution des coefficients de diffusion des récepteurs CD4 selon le mode de diffusion, et selon la présence de CD4s ou non.....	152
65.	Distribution des rayons des domaines détectés pour CD4 en présence de CD4s ou non.....	151
66.	Schéma de la stratégie de suivi de CD4 en présence de maraviroc.....	154
67.	Proportions des différents modes de diffusion observés pour CD4 en présence de CD4s ou non.....	155
68.	Distribution des coefficients de diffusion des récepteurs CD4 selon le mode de diffusion, et selon la présence de maraviroc ou non.....	156
69.	Distribution des rayons des domaines détectés pour CD4 en présence de maraviroc ou non.....	157
70.	Modèle d'organisation membranaire dynamique des récepteurs CD4 et CCR5.....	159
71.	Proportions des différents modes de diffusion observés pour CCR5 à l'état basal.....	160
72.	Histogramme de distribution des D pour les récepteurs CCR5 diffusant aléatoirement à l'état basal.....	161

73.	Distributions des rayons des confinements continus et transitoires détectés pour CCR5.....	161
74.	Schéma de la stratégie de suivi de CCR5 en présence de maraviroc.....	162
75.	Proportions des différents modes de diffusion observés pour CCR5 en présence de maraviroc ou non.....	163
76.	Distribution des coefficients de diffusion des récepteurs CCR5 selon le mode de diffusion, et selon la présence de maraviroc ou non.	164
77.	Distribution des rayons des domaines détectés pour CCR5 en présence de maraviroc ou non.	165
78.	Modèle d'organisation membranaire dynamique des récepteurs CD4 et CCR5.	167
79.	Schéma de la stratégie de suivi de CD4 en présence de gp120.....	168
80.	Proportions des différents modes de diffusion observés pour CCR5 en présence de gp120 ou non, à température ambiante.	169
81.	Distribution des coefficients de diffusion des récepteurs CD4 selon le mode de diffusion, et selon la présence de gp120 ou non.	170
82.	Distribution des rayons des domaines détectés pour CD4 en présence de gp120 ou non, à 20°C.....	171
83.	Proportions des différents modes de diffusion observés pour CCR5 en présence de gp120 ou non, à 37°C.....	173
84.	Distribution des coefficients de diffusion des récepteurs CD4 confinés transitoirement, selon la présence de gp120 ou non.....	174
85.	Distribution des rayons des domaines détectés pour CD4 en présence de gp120 ou non, à 37°C.....	175
86.	Composition de la chambre d'observation pour les expériences de SPT.	216
87.	Images de bicouches en fluorescence permettant de détecter d'éventuels défauts.	219
88.	Protocole de marquage des cellules pour des expériences de SPT.	221

Liste des tableaux

1.	Médicaments anti-VIH approuvés par la fédération américaine des aliments et drogues (FDA).....	36
2.	Résultats des différentes études par FRAP du récepteur CD4.....	61
3.	Résultats des différentes études par FRAP du récepteur CCR5.....	63
4.	Choix de la valeur optimale pour le paramètre T_{off}	80
5.	Proportions des QD ayant 0, 1, 2 anticorps ou plus selon la loi de Poisson.	132
6.	Moyennes des coefficients de diffusion et des tailles de domaines mesurés pour $CD4 \pm CD4s$ en fonction du type de diffusion.....	151
7.	Moyennes des coefficients de diffusion et des tailles de domaines mesurés pour $CD4 \pm MVC$ en fonction du type de diffusion.....	157
8.	Moyennes des coefficients de diffusion et des tailles de domaines mesurés pour $CCR5 \pm MVC$ en fonction du type de diffusion.	165
9.	Moyennes des coefficients de diffusion et des tailles de domaines mesurés pour $CD4 \pm gp120$ à 20°C, en fonction du type de diffusion.....	169
10.	Moyennes des coefficients de diffusion et des tailles de domaines mesurés pour $CD4 \pm gp120$ à 20°C, en fonction du type de diffusion.....	175

Avant-propos

Les travaux présentés ici correspondent à l'utilisation d'une technique de microscopie à l'interface entre la biologie et la physique, appliquée à la compréhension de mécanismes moléculaires impliqués dans l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), l'agent étiologique de la maladie du SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise). Il est donc nécessaire de connaître dans un premier temps les caractéristiques générales de cette maladie.

Le projet de thèse s'intéresse aux premières étapes du cycle viral, à savoir l'entrée du virus dans les cellules cibles *via* l'interaction de sa protéine d'enveloppe avec des récepteurs membranaires de la cellule hôte. C'est pourquoi nous allons ensuite nous concentrer sur la description détaillée du virus, de manière à bien comprendre quels sont les constituants moléculaires impliqués dans ces étapes précoces de l'infection.

De nos jours, de nombreuses stratégies de lutte contre le virus ont été imaginées et testées. Pourtant, aucun médicament ne permet de l'éliminer, et aucun vaccin ou thérapie préventive n'est connu pour empêcher l'infection. Etant donné que notre étude vise à mieux connaître le processus d'infection pour pouvoir peut-être suggérer de nouvelles stratégies thérapeutiques, il est important de préciser quelles sont les défenses naturelles de l'homme qui existent vis-à-vis du virus, et quels sont les médicaments qui aident à limiter l'infection.

Ces bases nous permettront ensuite d'aborder les connaissances sur l'environnement membranaire qui correspond au lieu d'entrée du virus, et ainsi présenter le contexte scientifique du projet de thèse.

INTRODUCTION

1. Généralités sur le VIH, agent étiologique de la maladie SIDA

1.1. Historique de découverte

Une nouvelle maladie fut identifiée en juin 1981 lorsque des membres du « Center for Disease Control » d'Atlanta furent informés de plusieurs cas originaux d'infections opportunistes et de sarcomes de Kaposi touchant une population d'homosexuels. Suite au rapport de ce profil pathologique, d'autres cas sont identifiés en Europe occidentale, en particulier en France par l'intermédiaire des Dr J. Leibovitch et W. Rozenbaum (Montagnier, 2010). La maladie est rapidement corrélée aux symptômes de forte immunodépression et d'infections observés chez certains patients hémophiles ou transfusés. Cette affection profonde du système immunitaire est alors nommée Syndrome de l'ImmunoDéfiance Acquise (SIDA). Cependant, l'origine de cette maladie est alors inconnue. Sachant que les individus hémophiles ont reçu des solutions concentrées de facteur VIII ou XI purifiées avec des filtres anti-bactériens, l'agent étiologique ne peut ni être un champignon, ni une bactérie de taille normale. L'équipe du Dr L. Montagnier se lance alors à la recherche d'un virus et finit par isoler un candidat à partir de cultures de lymphocytes T activés de patient. Le virus se révèle avoir des caractéristiques différentes de la famille des HTLV, pour *Human T cell Leukemia Virus*, qui s'attaquent pourtant eux aussi aux lymphocytes chez l'homme. Les chercheurs proposent le nom de LAV, pour *Lymphadenopathy Associated Virus* (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983). L'année suivante, l'équipe du Dr R.C. Gallo décrivent un virus identique qu'ils baptisent HTLV-III (Zagury *et al.*, 1984). La communauté scientifique reconnaît ce virus comme agent étiologique de la maladie SIDA, et le renomme par la suite selon l'acronyme VIH-1, pour Virus de l'ImmunoDéfiance Humaine 1.

En 1986, le Dr L. Montagnier et ses collaborateurs isolent une seconde souche du virus, baptisée VIH-2, qui provoque les mêmes symptômes cliniques et présente des caractéristiques structurales similaires, mais induit chez les patients la production d'anticorps anti-protéine d'enveloppe virale différents de ceux correspondant au VIH-1 (Clavel *et al.*, 1986).

Il est intéressant de noter qu'en dépit des nombreux travaux réalisés sur le virus, un groupe « d'opposants » dirigés par le Dr P. Duesberg remet en cause l'association du VIH avec la maladie, proposant que la cause est plutôt un abus de drogue et de rapports sexuels (Duesberg, 1988). Cette théorie provoqua de nombreuses réactions (Duesberg, 1995; Cohen, 1994; Andrews, 1995).

1.2. Diversité génétique

Depuis la découverte du virus, les nombreuses analyses du génome des souches virales observées chez les patients sidéens montrent qu'il existe une très grande diversité génétique, en particulier pour les gènes de l'enveloppe virale. Ainsi, les différents virus sont classés en deux groupes, VIH-1 et -2, eux-mêmes divisés en sous-groupes (M, N et O pour le VIH-1) (fig. 1). Un quatrième groupe appelé P a été découvert très récemment pour le VIH-1 (Plantier *et al.*, 2009). Le sous-groupe M, largement majoritaire, est à nouveau subdivisé en sous-types ou « clades » : A à D, F à H, puis J à K. Par souci de simplicité, ces souches sont désignées sans préciser leur appartenance au sous-groupe M (ex : HIV-1B). Cette diversité a pour origine un taux de mutations important provoquées principalement par deux facteurs. Le premier concerne la transcriptase inverse (voir § 2.2) qui n'a pas la capacité à corriger ses erreurs lors de la synthèse du brin d'ADN à partir de l'ARN viral. Le taux d'erreur a été estimé entre 1/1700 et 1/7500, ce qui se traduit par environ 1 à 5 erreurs par copie d'ADN viral (Preston *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988). Le deuxième facteur est la possibilité de recombinaison génétique aléatoire entre deux virus infectant simultanément une même cellule.

1.3. Origine géographique et épidémiologie

L'origine du virus est difficile à définir étant donné le manque d'échantillons de patients infectés datés du milieu du XX^e siècle. En effet, le cas le plus ancien remonte à 1959, recensé à Kinshasa (anciennement Léopoldville) dans l'actuelle République démocratique du Congo. D'autres cas antérieurs aux années 1980 sont relevés en Europe et aux Etats-Unis. Cependant, si l'on se réfère à la diversité génétique des souches virales, nous pouvons estimer que plus on observe de variabilité, plus les souches ont eu le temps d'évoluer. Ce raisonnement conduit alors à l'hypothèse d'une origine en Afrique Centrale, compatible avec le fait que selon l'arbre phylogénétique (fig. 1), les souches de VIH-1 M, N et O correspondraient à des transmissions indépendantes du chimpanzé (SIV_{CPZ}) à l'homme. La souche VIH-2 semble en revanche être l'origine de transmissions indépendantes du singe Sooty Mangabey (SIV_{SM}) à l'homme, renvoyant à l'Afrique de l'Ouest. Depuis les années 1990, l'infection par le VIH-1 est devenue pandémique et est aujourd'hui présente sur toute la surface du globe, alors que le VIH-2 est resté très concentré à la région Ouest de l'Afrique (Montagnier, 1999; Levy, 2009). Au total, on dénombre à l'heure actuelle près de 33,3 millions de séropositifs à travers le monde, avec une grande majorité en Afrique Subsaharienne, soit 22,5 millions (fig. 2). Durant l'année 2009, 2,7 millions de personnes ont été nouvellement infectées, et 2 millions de décès

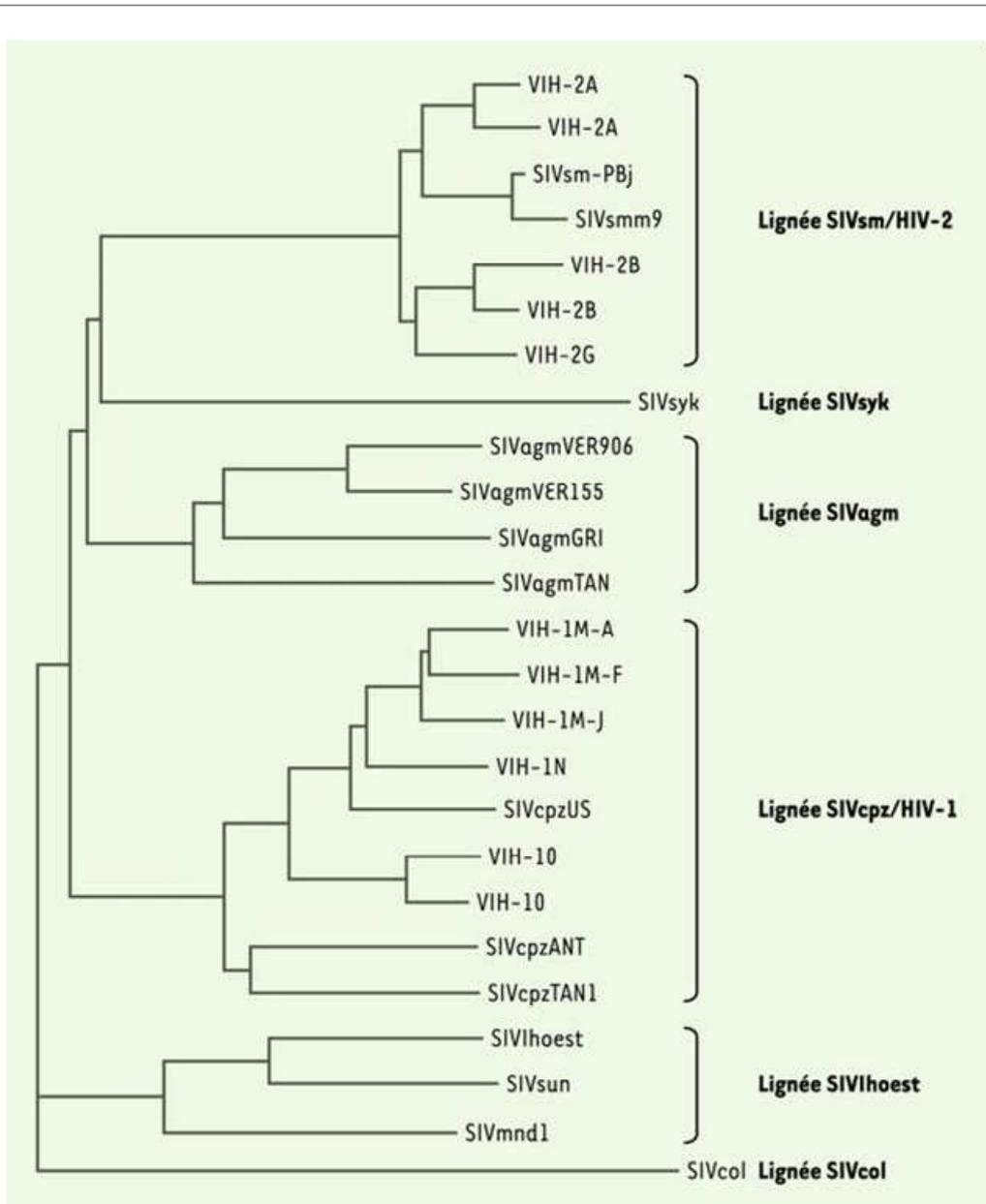
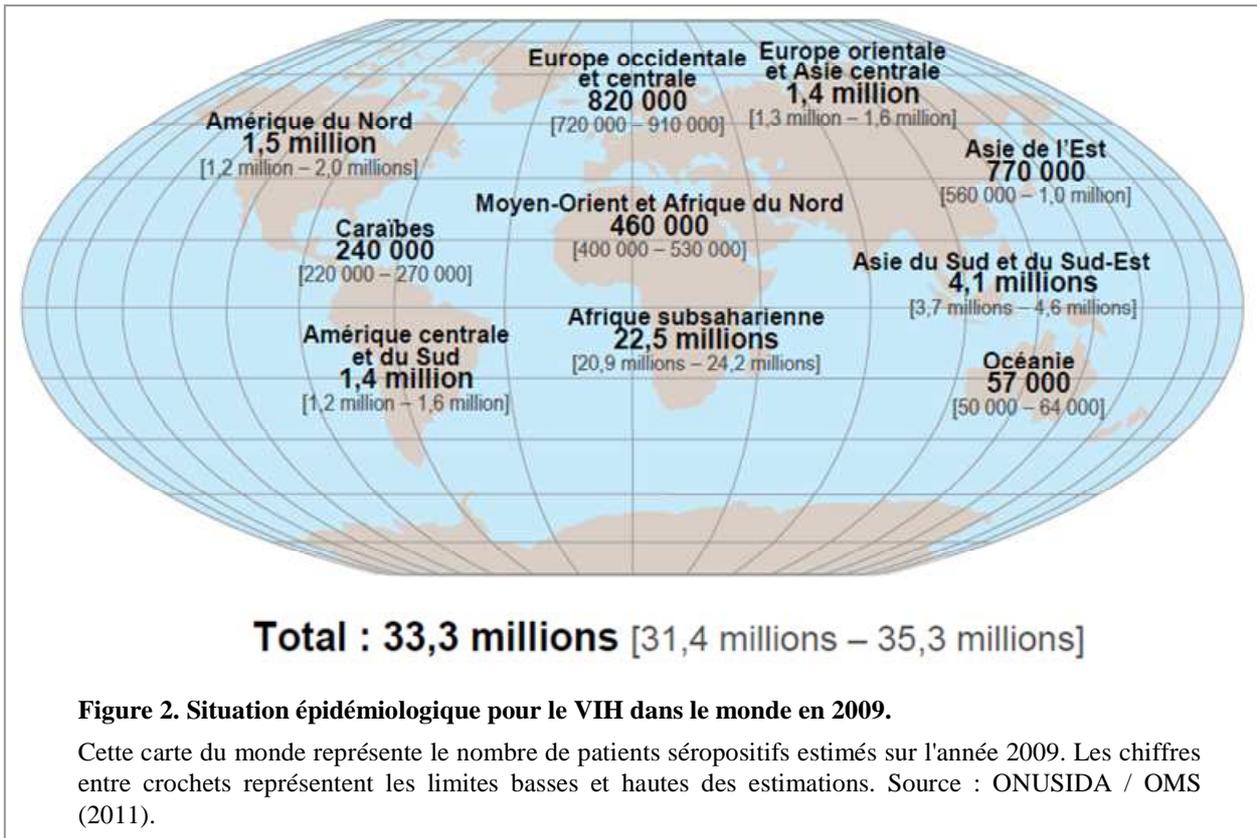


Figure 1. Arbre phylogénétique des différentes souches de VIH et VIS (S pour Simien).

L'arbre est construit à partir de la séquence virales *pol* provenant de souches virales infectant les humains (HIV) ou les singes / simiens (SIV). L'arbre montre que les souches de VIH-1 sont proches des souches VIS infectant le chimpanzée (cpz), alors que le VIH-2 est similaire au VIS spécifique des singes sooty mangabey (sm). Légende : syk, Sykes' monkey ; agm, african green monkey ; col, colobe guéréza. Source : Courgnaud, 2004.

ont été recensés (Source ONUSIDA/OMS). En France, on estime à environ 150 000 personnes le nombre de séropositifs, et le nombre de nouveaux infectés à 6700 pour l'année 2009, chiffre supérieur à celui de 2008, alors qu'une baisse avait été observée depuis 2004 (Source Sida Info Service).



1.4. Transmission du virus à l'homme

Le VIH se transmet à l'homme par le sang, par le lait maternel ou par contact sexuel, et cible principalement les lymphocytes T CD4+. Le premier type de transmission concerne surtout les patients nécessitant des produits du sang, comme les hémophiles par exemple, ou bien des usagers de drogues injectées par voie intraveineuse. L'infection est alors très efficace. Concernant les femmes enceintes, une transmission mère-enfant peut avoir lieu par le sang, bien que le virus ait à passer la barrière placentaire, mais aussi par le lait maternel qui est chargé en virions. Il a été cependant montré que le traitement antirétroviral réduisait grandement le risque de transmission à l'enfant (Siegfried *et al.*, 2011). Dans le cas des transmissions par voie sexuelle, l'efficacité d'infection dépend du virus lui-même, de sa concentration dans la partie exposée et de la susceptibilité à l'infection chez le receveur (Levy, 2009). Dans la plupart des cas, c'est un virion libre, soit non associé à une cellule, qui est responsable de l'infection. Il semble de plus qu'un seul virus soit suffisant dans la majeure partie des cas (Keele *et al.*, 2008). Lorsque celui-ci intègre le génome d'une cellule hôte, de nombreux virions peuvent être rapidement produits au sein de la personne infectée.

A l'heure actuelle, nous savons que beaucoup d'autres facteurs peuvent jouer sur l'efficacité d'infection. Par exemple, les autres maladies sexuellement transmissibles, comme

l'herpès, augmentent la quantité de virus et de cellules infectées dans les fluides génitaux d'une personne séropositive, et donc le risque de transmission (Atkins *et al.*, 1996). La circoncision chez les hommes adultes permet de réduire la transmission du virus car le prépuce est une zone contenant de nombreuses cellules (des cellules dendritiques) susceptibles à l'infection par le VIH (Auvert *et al.*, 2005). Enfin, dans le cas de couples où une seule personne est séropositive, l'administration d'un traitement antirétroviral précoce réduit le risque de transmission (Communiqué de presse ANRS, mai 2011, cohorte HPTN 052).

1.5. Evolution de la pathologie

L'infection par le VIH se divise en trois phases : la primo-infection, la phase de latence et la phase SIDA qui conduit à la mort (fig. 3).

Lors de la première phase, soit durant les quelques semaines qui suivent l'infection, on observe une chute rapide du nombre de lymphocytes CD4+ (courbe bleue), cibles majoritaires

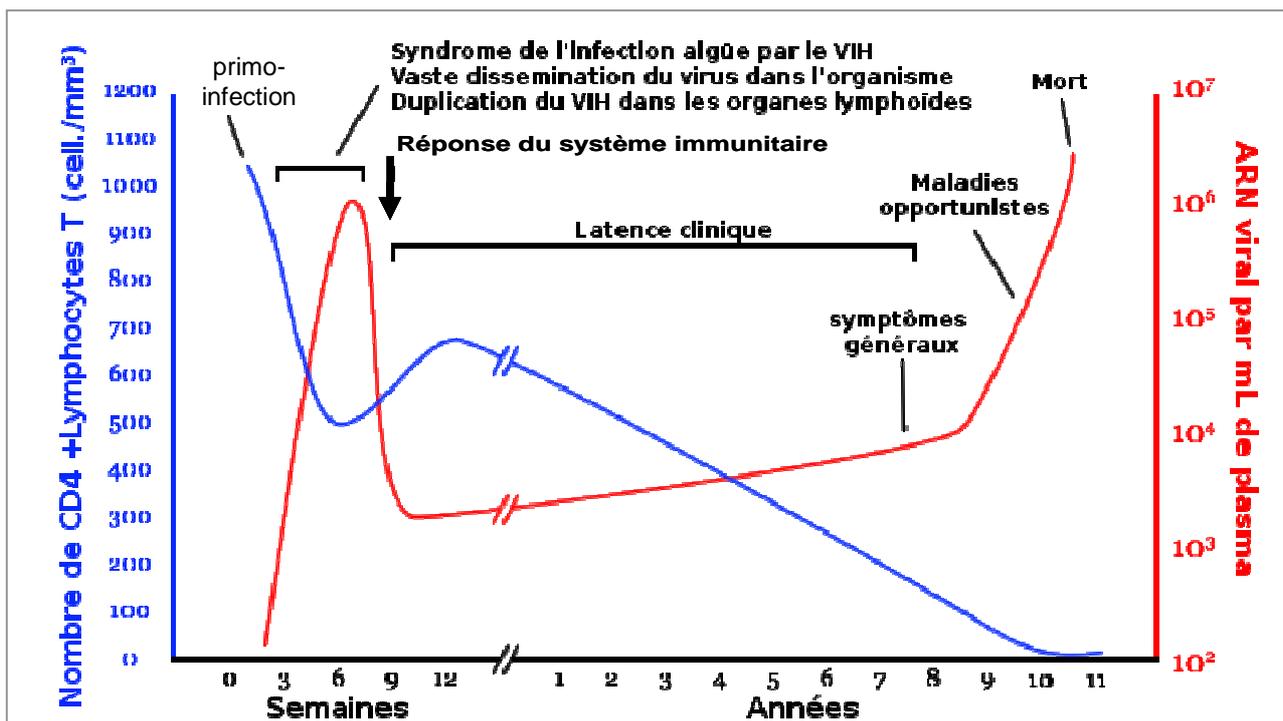


Figure 3. Évolution de la charge virale et du système immunitaire au cours de l'infection par le VIH.

Chez un patient séropositif, l'évolution chronologique du nombre de lymphocytes T CD4+ (courbe bleue) et de la charge virale (courbe rouge) montre qu'il existe plusieurs phases au cours de l'infection. Le virus se multiplie rapidement dans les premières semaines (phase clinique aiguë), puis la réponse du système immunitaire contient l'infection et marque le début d'une phase de latence pouvant durer plusieurs années. Cependant, le nombre de lymphocytes T CD4+ continue à décroître, et en dessous d'un certain seuil, la phase SIDA se déclare. La déplétion du système immunitaire permet à des maladies opportunistes de survenir, celles-ci pouvant conduire au décès du patient. Adapté de Wikimedia Commons.

du virus, corrélée à une augmentation rapide de la charge virale dans le sang du patient (courbe rouge). Cette première phase est associée à des symptômes similaires à la grippe ou à la mononucléose. Le délai qui sépare l'exposition au virus et la présence de nombreux virions dans le sang montre qu'il est important d'attendre environ cinq semaines avant de réaliser un test de dépistage du VIH suite à la prise d'un risque d'infection, ceci pour éviter un diagnostic faux-négatif.

Le système immunitaire réagit et va contenir l'infection au point de rétablir partiellement le nombre de lymphocytes CD4+. La charge virale diminue puis se stabilise, signe d'un équilibre partiel entre réplication virale et destruction par le système immunitaire. On rentre alors dans la phase de latence pendant laquelle les symptômes cliniques sont réduits.

Pendant cette deuxième phase qui dure plusieurs années, le nombre de lymphocytes CD4+ va progressivement décroître, sauf pour les individus appelés « elite controllers » chez qui la charge virale diminue au point de ne plus être détectable (Sáez-Cirión *et al.*, 2007). Plusieurs facteurs semblent expliquer pourquoi le système immunitaire n'arrive pas à éliminer totalement le virus du corps infecté. La principale raison est la constitution de tissus ou cellules « réservoirs ». La réplication du virus une fois intégré est en effet dépendante de la régulation de l'expression génétique (ex : méthylation de l'ADN), des facteurs de restriction intracellulaires (ex : histones déacétylases, HDAC – voir § 3.1.1.1), mais aussi des protéines virales régulatrices (ex : Tat, Rev – Siliciano & Siliciano, 2000 – voir § 2.1.3). D'autre part, des cellules autres que les lymphocytes CD4+ peuvent être infectées ou porteuses du virus, comme par exemple les macrophages dans lesquels le VIH se réplique peu (Ellery *et al.*, 2007).

A partir d'un certain déclin du nombre de lymphocytes CD4+, soit en dessous de 350 cellules/ml, la maladie SIDA se déclare (dernière phase). La charge virale augmente à nouveau rapidement, signe que le système immunitaire n'est plus capable de contenir la réplication active du VIH. Des infections opportunistes peuvent alors survenir (ex : sarcome de Kaposi dû au virus HHV-8, infections pulmonaires comme la tuberculose, etc.) et conduire au décès du patient.

2. Structure du virus et partenaires moléculaires

2.1. Le VIH, un rétrovirus à ARN simple brin

2.1.1. Généralités sur les rétrovirus

Le VIH appartient à la famille des rétrovirus, qui partagent des caractéristiques communes, à savoir une taille d'environ 100 nm de diamètre, une structure et un mode de réplication similaire, et qui infectent principalement les vertébrés. Leur génome est sous forme de deux copies d'ARN simple brin à polarité positive, c'est-à-dire qu'il peut comme les ARNm être traduit directement par la cellule hôte. Tous les virus de cette famille possèdent une transcriptase inverse qui va permettre la conversion de l'ARN simple brin en ADN double brin, permettant à ce dernier d'être inséré dans le génome de l'hôte *via* une intégrase.

Chaque virus protège ses ARN par une nucléocapside de nature protéique (NC), incluse dans une capsidite aussi protéique (CA) de forme sphérique ou conique, entourée d'une matrice protéique (MA) liée de manière sous-jacente à une bicouche lipidique comprenant des protéines membranaires (fig. 4). Ces protéines dites d'enveloppe vont définir le tropisme viral, c'est-à-dire les types cellulaires que le virus va pouvoir infecter. Il est de plus possible que des protéines de l'hôte soient présentes dans la membrane du virus et participent à l'accrochage du virus sur des cellules cibles (ex : CMH-II, qui interagit avec CD4, Esser *et al.*, 2001).

Le génome des rétrovirus contient trois gènes qui codent pour des polyprotéines appelées Gag, Pol et Env. Chacune d'elles sera clivée par une protéase (virale pour Gag et Pol) pour donner naissance aux diverses protéines de structure ou à des enzymes. Gag correspond aux protéines structurales MA, CA et NC. Pol désigne les enzymes : la protéase, l'intégrase et la transcriptase inverse, comprenant un domaine à activité RNase H qui aide à l'élaboration du double brin d'ADN viral. Enfin, Env correspond à deux sous-unités glycoprotéiques, gp41 et gp120 dans le cas du VIH-1 (fig. 4).

2.1.2. Cas du VIH-1 : structure des sous-unités gp120 et gp41 de la protéine d'enveloppe

La polyprotéine Env du VIH-1, autrement appelée gp160 car son poids moléculaire est de 160 kDa, a été caractérisée en 1984, ainsi que les produits de maturation par clivage, gp120 et gp41 (120 et 41 kDa respectivement, Veronese *et al.*, 1985; Robey *et al.*, 1985; Sodroski *et al.*, 1984). Cette maturation est assurée par une protéase cellulaire, la furine (Hallenberger *et al.*, 1992), au moment où la gp160 est adressée à l'appareil de Golgi sous forme trimérique (Wyatt & Sodroski, 1998). La gp41 est ancrée dans la membrane lipidique *via* un domaine

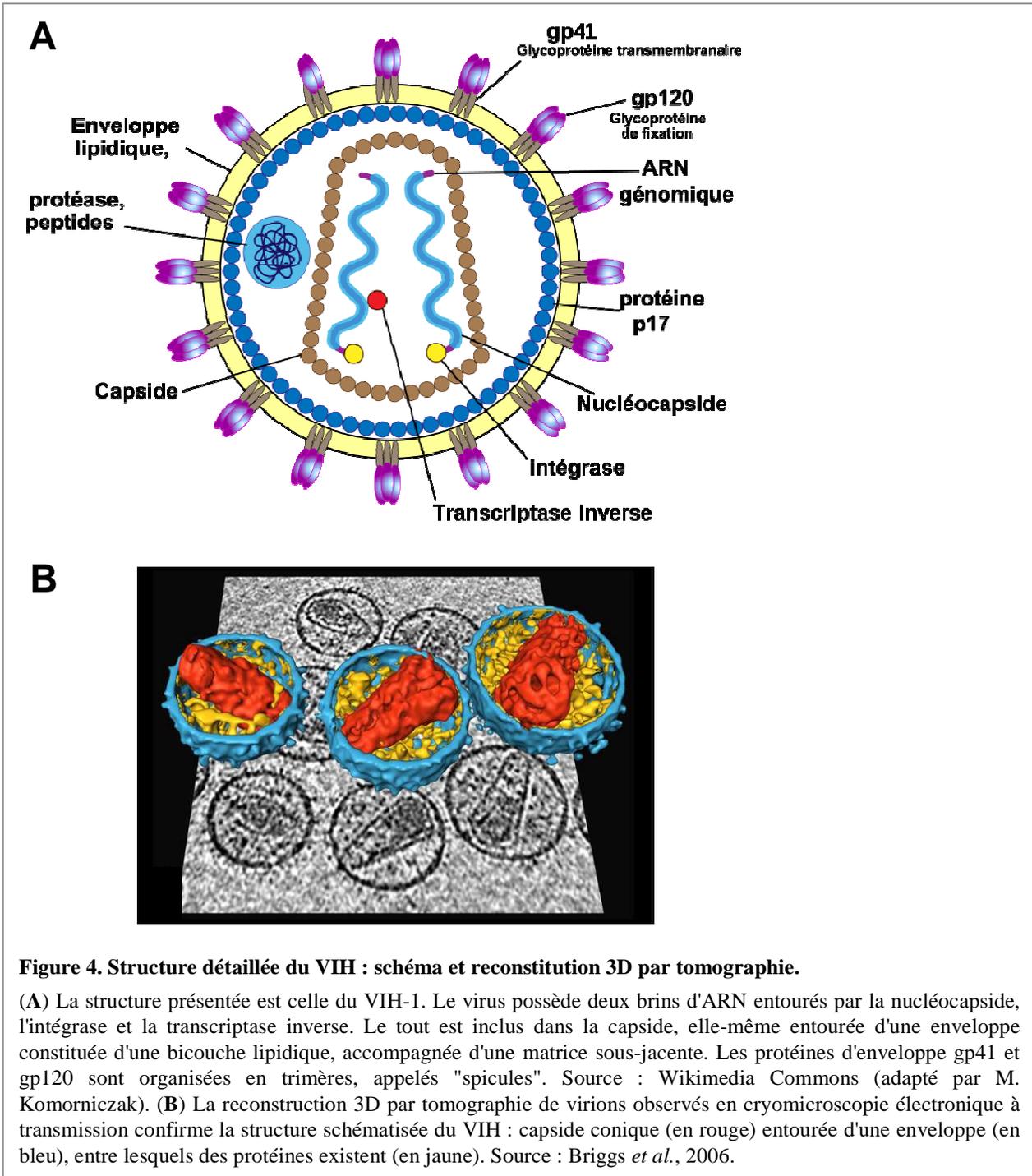


Figure 4. Structure détaillée du VIH : schéma et reconstitution 3D par tomographie.

(A) La structure présentée est celle du VIH-1. Le virus possède deux brins d'ARN entourés par la nucléocapside, l'intégrase et la transcriptase inverse. Le tout est inclus dans la capside, elle-même entourée d'une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique, accompagnée d'une matrice sous-jacente. Les protéines d'enveloppe gp41 et gp120 sont organisées en trimères, appelés "spicules". Source : Wikimedia Commons (adapté par M. Komorniczak). (B) La reconstruction 3D par tomographie de virions observés en cryomicroscopie électronique à transmission confirme la structure schématisée du VIH : capsid conique (en rouge) entourée d'une enveloppe (en bleu), entre lesquels des protéines existent (en jaune). Source : Briggs *et al.*, 2006.

transmembranaire, liée à la gp120 de manière non covalente. L'hétérotrimère retrouvé à la surface des virions néoformés est appelé « spicule » (fig. 5, Zhu *et al.*, 2006).

La structure tridimensionnelle de la gp120 a été résolue par cristallographie à une résolution de 2.5 Å (Kwong *et al.*, 1998). La partie interne est reliée à celle externe *via* quatre feuillets β antiparallèles (fig. 6A, en bas à gauche). Les régions de la protéine importantes dans le processus d'entrée du virus sont situées autour des domaines variables V1/V2 et V3,

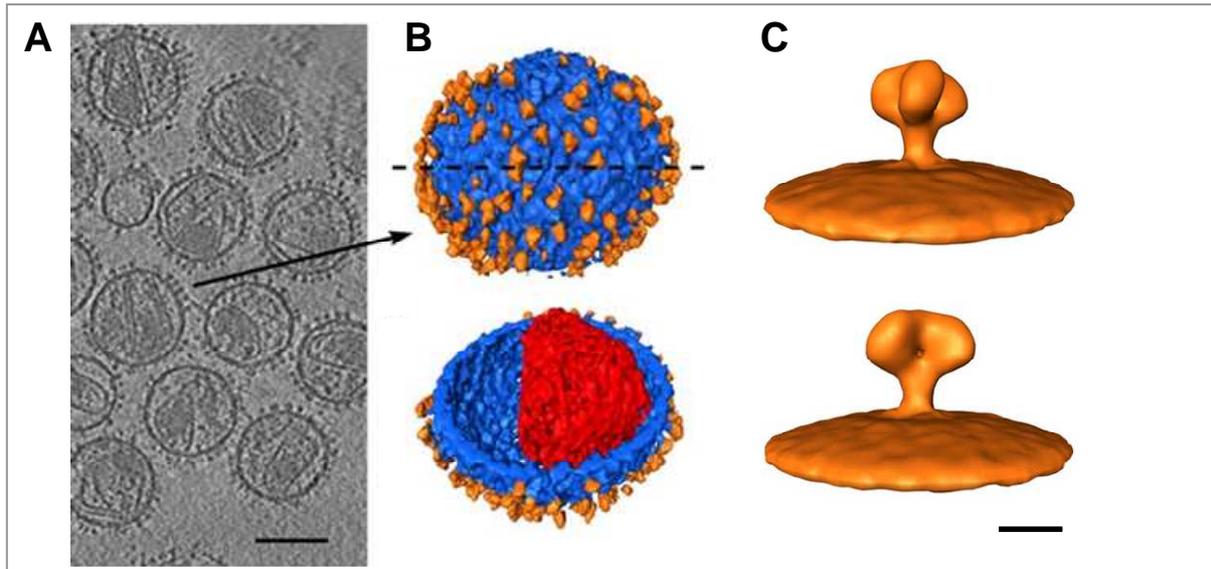


Figure 5. Modélisation 3D des spicules à la surface de virions VIS.

La modélisation est réalisée à partir de clichés de virus VIS en cryomicroscopie électronique à transmission (A, barre d'échelle : 100 nm), permettant une reconstruction 3D des virions par tomographie, ainsi que la visualisation des spicules, colorées ici en orange (B). Deux vues modélisées d'un spicule (rotation de 60° entre les deux) montrent clairement l'association des protéines d'enveloppe sous forme trimérique (C, barre d'échelle : 10 nm).

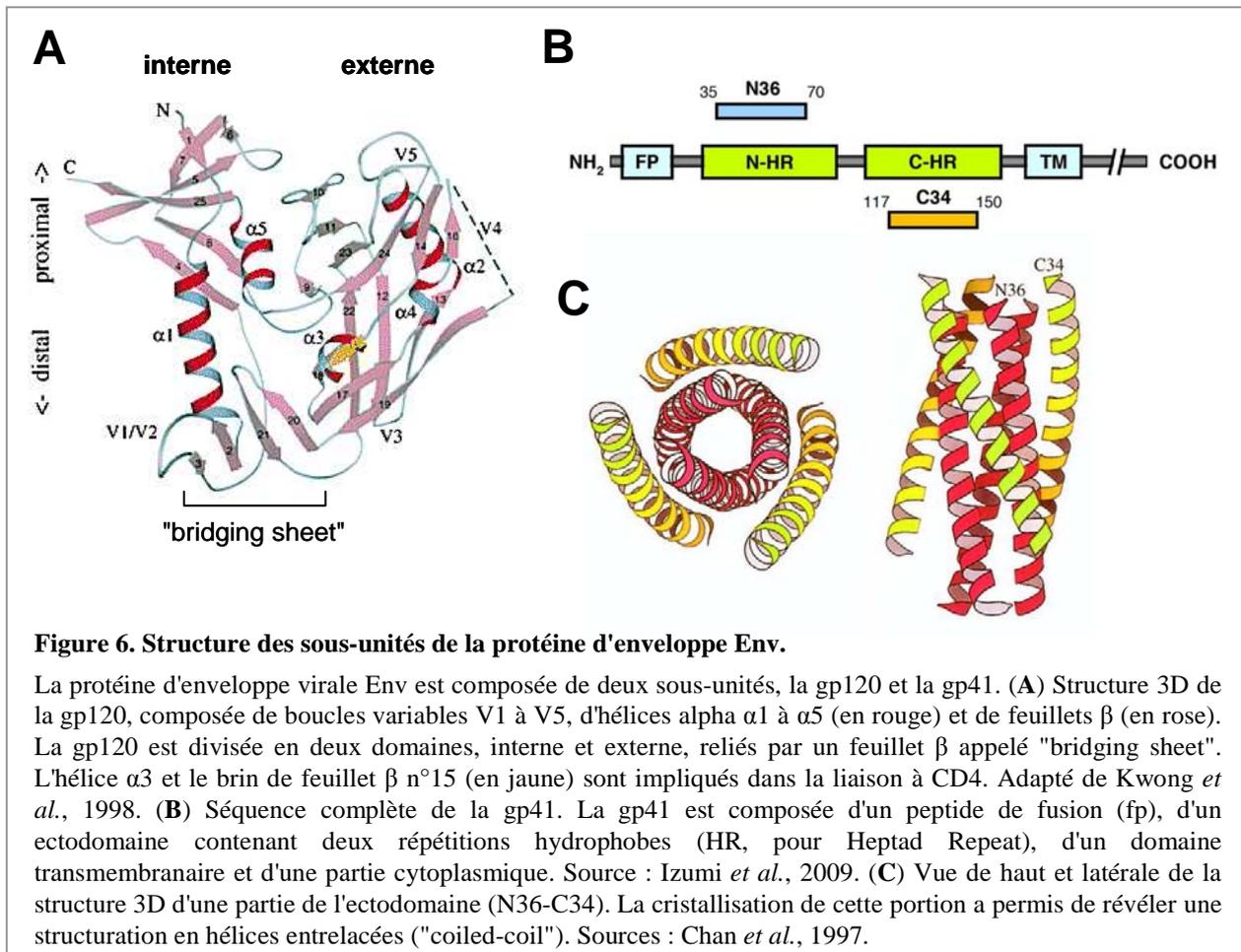


Figure 6. Structure des sous-unités de la protéine d'enveloppe Env.

La protéine d'enveloppe virale Env est composée de deux sous-unités, la gp120 et la gp41. (A) Structure 3D de la gp120, composée de boucles variables V1 à V5, d'hélices alpha $\alpha 1$ à $\alpha 5$ (en rouge) et de feuillets β (en rose). La gp120 est divisée en deux domaines, interne et externe, reliés par un feuillet β appelé "bridging sheet". L'hélice $\alpha 3$ et le brin de feuillet β n°15 (en jaune) sont impliqués dans la liaison à CD4. Adapté de Kwong *et al.*, 1998. (B) Séquence complète de la gp41. La gp41 est composée d'un peptide de fusion (fp), d'un ectodomaine contenant deux répétitions hydrophobes (HR, pour Heptad Repeat), d'un domaine transmembranaire et d'une partie cytoplasmique. Source : Izumi *et al.*, 2009. (C) Vue de haut et latérale de la structure 3D d'une partie de l'ectodomaine (N36-C34). La cristallisation de cette portion a permis de révéler une structuration en hélices entrelacées ("coiled-coil"). Sources : Chan *et al.*, 1997.

ainsi qu'au niveau de l'hélice $\alpha 3$ et du feuillet $\beta 15$ (Briz *et al.*, 2006). En particulier, le domaine V3 détermine le tropisme viral (Speck *et al.*, 1997, voir § 2.3.1).

La protéine gp41 est composée d'un domaine cytoplasmique, d'une partie transmembranaire, d'un ectodomaine composé de deux éléments « Heptad Repeat », HR1 et HR2, et enfin d'un domaine de fusion en partie N-terminale. Seule une partie de l'ectodomaine a été cristallisée (Weissenhorn *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1997), montrant que cette partie de la protéine adopte dans la forme trimérique une structure tertiaire d'hélices antiparallèles entrelacées, ou structure « coiled-coil », correspondant à un recouvrement de HR1 et HR2 (fig. 6B). Les changements conformationnels de l'ectodomaine sont particulièrement étudiés car ils participent au processus de fusion membranaire entre le virus et la cellule hôte, mécanisme qui n'est pas totalement élucidé (voir § 2.2.1., Shi *et al.*, 2010).

2.1.3. Le VIH, un rétrovirus dit « complexe »

Le VIH fait partie d'une sous-famille appelée lentivirus, qui sont des rétrovirus dit « complexes » car leur génome code pour d'autres protéines de régulation, en opposition aux rétrovirus simples où seulement les trois gènes détaillés précédemment sont exprimés. Par exemple, le VIH-1 va coder pour six protéines accessoires et régulatrices que sont Tat (Trans-Activator for viral Transcription), Rev (Regulator of Expression of Viral proteins), Vpr (Viral Protein R), Nef (Negative Factor), Vif (Virion Infectivity Factor) et Vpu (Viral Protein Unknown). Ces gènes sont situés dans différents cadres ouverts de lecture, ou "Open Reading Frames" (ORF) (fig. 7). Seules Nef, Vif et Vpr sont retrouvées dans les virions matures. Le rôle respectif de chacune de ces protéines dans le cycle viral est détaillé ci-après.

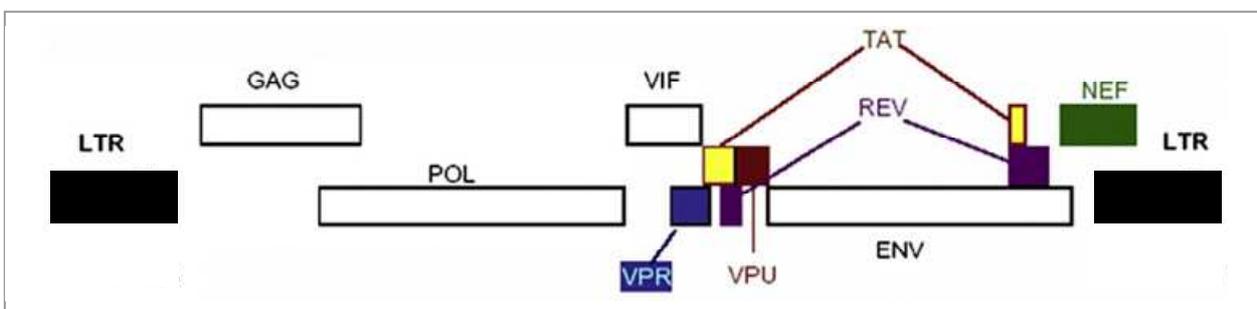


Figure 7. Séquence du génome du virus VIH-1.

Tous les rétrovirus possèdent les gènes de trois polyprotéines : Gag, à l'origine des protéines structurales, Pol, qui correspond aux enzymes, et Env, la protéine d'enveloppe. Les régions LTR (Long Terminal Repeat) qui se trouvent aux extrémités du génome contiennent des séquences régulatrices, comme celles de l'initiation de la transcription ou de la polyadénylation. Le VIH-1 est un rétrovirus dit "complexe", car son génome contient des gènes de protéines régulatrices (Tat et Rev) et de protéines accessoires (Vif, Nef, Vpr, Vpu), qui sont exprimées grâce à différents cadres de lecture (différents rectangles sur la figure). Source : Montagnier, 2010.

2.2. Cycle viral du VIH et rôle des protéines virales

Le cycle viral peut se diviser majoritairement en trois phases : la reconnaissance spécifique et l'entrée dans la cellule cible, la migration du matériel génétique vers le noyau et l'insertion dans le génome de l'hôte, permettant ensuite la production de nouveaux virus en de nombreuses copies (fig. 8). Dans le cas où la dernière phase n'a pas lieu, le "virus" reste au sein de la cellule dans un état latent, à l'abri de toute reconnaissance par les cellules du système immunitaire.

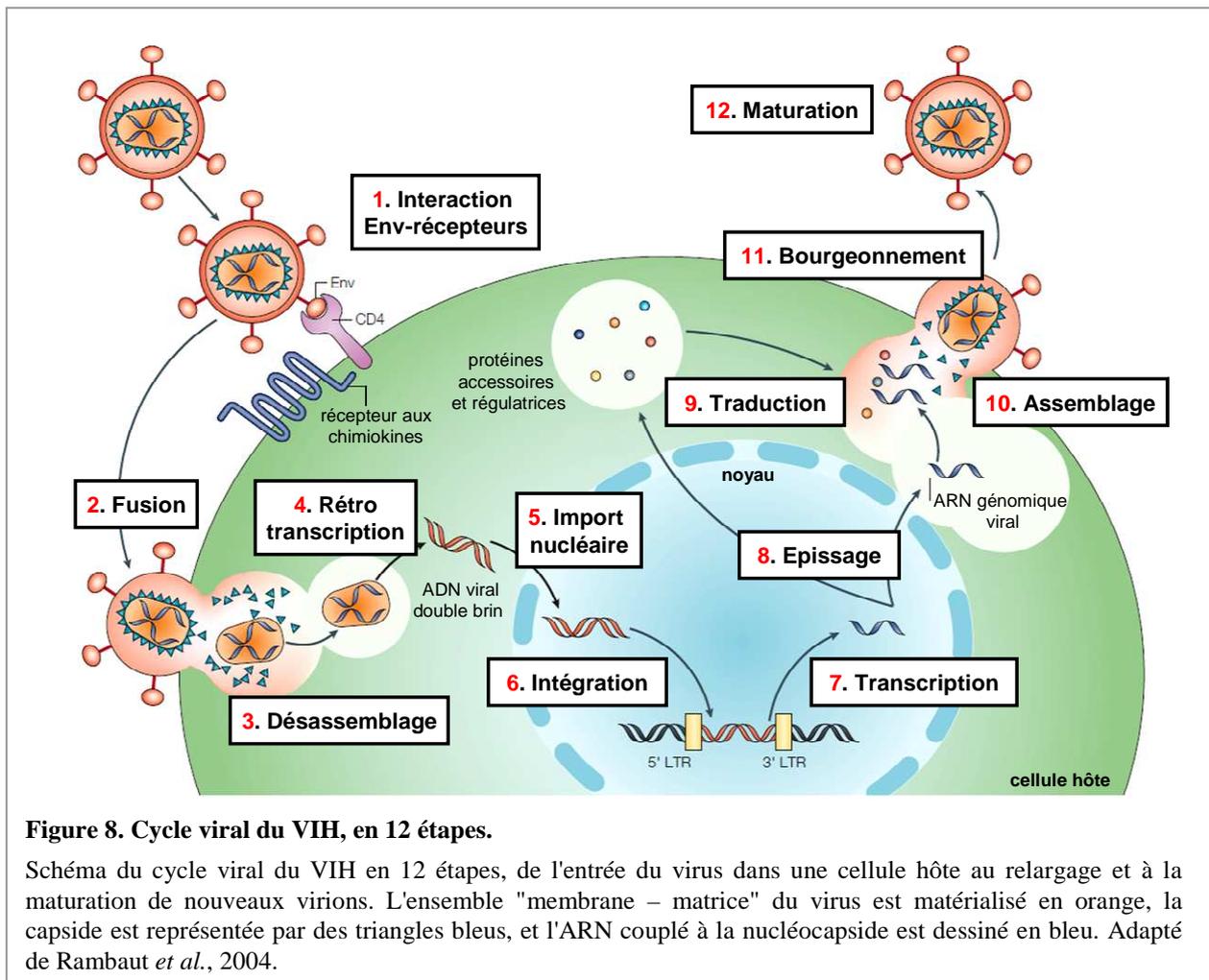


Figure 8. Cycle viral du VIH, en 12 étapes.

Schéma du cycle viral du VIH en 12 étapes, de l'entrée du virus dans une cellule hôte au relargage et à la maturation de nouveaux virions. L'ensemble "membrane – matrice" du virus est matérialisé en orange, la capsid est représentée par des triangles bleus, et l'ARN couplé à la nucléocapsid est dessiné en bleu. Adapté de Rambaut *et al.*, 2004.

2.2.1. Etapes précoces : accrochage et entrée dans la cellule cible

La première étape du cycle viral est l'interaction spécifique de la sous-unité d'enveloppe gp120 du virus avec des récepteurs membranaires à la surface de la cellule cible. Cette étape est séquentielle (fig. 9). En effet, la gp120 se lie tout d'abord au récepteur CD4 (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984; Sattentau & Weiss, 1988). Cette interaction provoque une

modification conformationnelle de la gp120 au niveau des boucles V1/2 et V3, exposant la boucle V3 et un site de liaison au corécepteur (fig. 9, étapes B à C, Rizzuto *et al.*, 1998). Le corécepteur est un récepteur couplé aux protéines G liant des chimiokines, qui est soit CCR5 (Wu *et al.*, 1996; Trkola *et al.*, 1996a), soit CXCR4 (Lapham *et al.*, 1996). En parallèle, la structure de la gp41 est modifiée et une partie de l'ectodomaine est exposée (fig. 9, motifs verts à l'étape C, Finnegan *et al.*, 2002).

La liaison au corécepteur va ensuite provoquer un changement conformationnel important de la gp41 : la structure « coiled-coil » se déploie complètement et permet au peptide de fusion en partie N-terminale de s'insérer dans la membrane de la cellule hôte. La configuration de la gp41 est dite « pre-hairpin ». La sous-unité gp120 se détache de la gp41 à

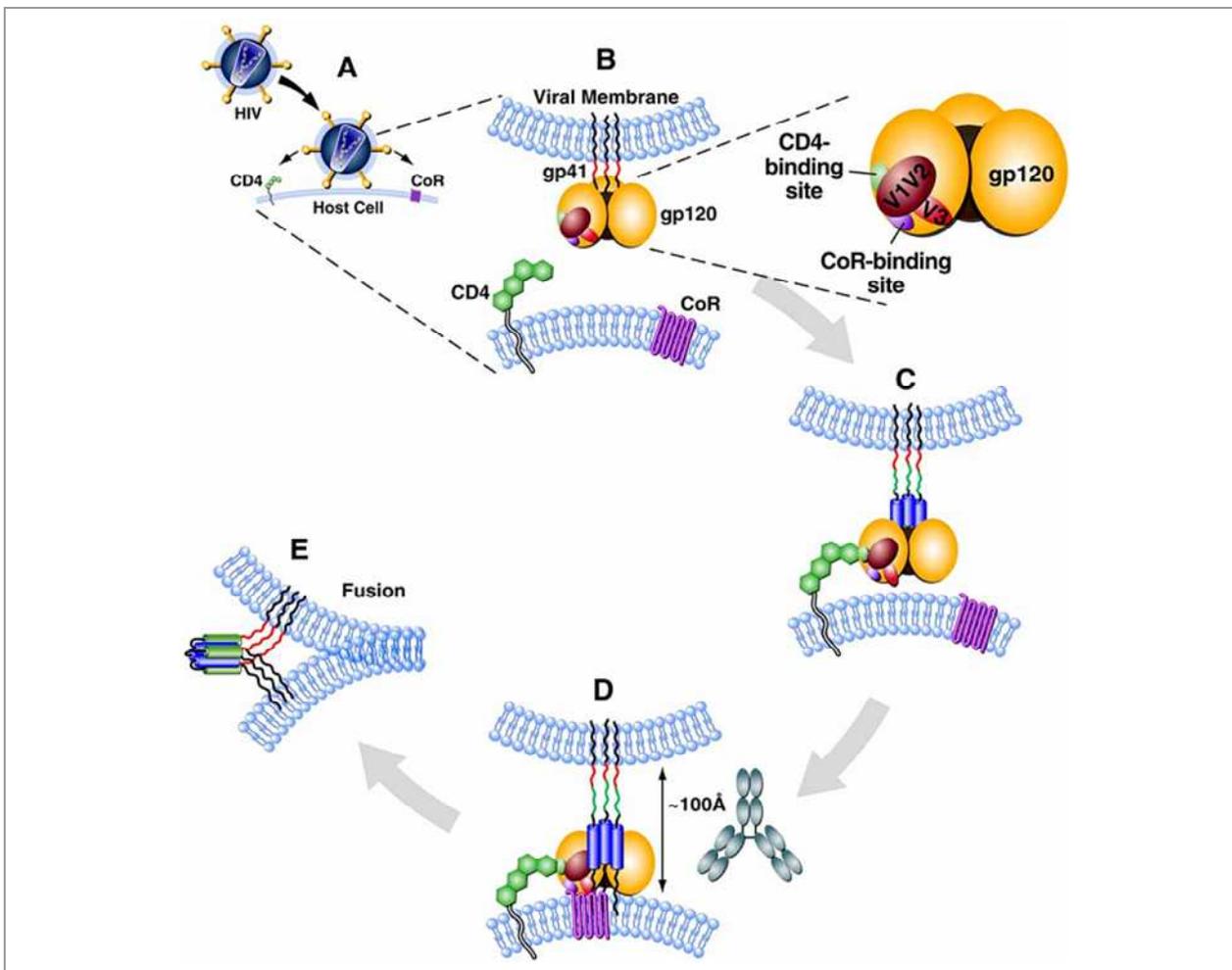


Figure 9. L'entrée du VIH dans la cellule cible est un processus multi-étapes séquentiel.

Lors de la rencontre entre une particule virale et une cellule cible (A), une première interaction a lieu entre la protéine d'enveloppe gp120 et le récepteur primaire CD4 (B). Cette interaction induit des changements conformationnels au sein de la gp120 et dévoile un site de liaison à un corécepteur (C). Lors de l'interaction avec le corécepteur, un nouveau changement de conformation permet l'insertion du peptide de fusion de la gp41 dans la membrane de la cellule hôte (D). Le rapprochement des membranes et le repliement de la gp41 en structure "coiled-coil" initie la fusion des membranes virale et cellulaire (E). Source : Zwick et Burton, 2007.

cette étape, et c'est un nouveau changement de conformation de l'ectodomaine de gp41 qui va enclencher le processus de fusion membranaire (Melikyan *et al.*, 2000). En effet, les domaines HR1 et HR2 se regroupent en une configuration antiparallèle de type épingle à cheveux, ou « hairpin », rapprochant les deux membranes virale et cellulaire (fig. 9, étape E).

La fusion se produit *via* une étape d'hémifusion où seuls les feuilletts externes des membranes sont réunis. Lorsque la fusion est complète, un pore se forme et s'agrandit de manière à laisser entrer le contenu du virus dans le cytoplasme de la cellule hôte (Melikyan & Chernomordik, 1997).

Le VIH est par ailleurs capable de traverser les cellules, comme les cellules épithéliales, en restant enfermé dans un compartiment endosomal (Bomsel, 1997), indiquant que le mécanisme d'entrée par fusion n'est pas exclusif. De plus, il est proposé que l'étape de fusion membranaire se produise seulement après endocytose récepteur-dépendante du virus, permettant à ce dernier de limiter l'exposition d'épitopes conservés de la gp41 et donc de réduire l'efficacité d'inhibiteurs dirigés contre eux (Miyachi *et al.*, 2009).

2.2.2. Etapes intracellulaires vers l'intégration du génome de l'hôte

Juste après la fusion membranaire, le matériel viral, désignant ici le virus dépourvu de sa bicouche lipidique et de ses protéines d'enveloppe, va entrer dans le cytoplasme, se dissocier (fig. 8, étape 3) et former un complexe de transcription inverse, puis un complexe de pré-intégration lorsque l'ARN est converti en ADN double brin. La dissociation suivant la fusion correspond à la partie du cycle viral qui est la moins comprise. En effet, il semblerait que la capsid (CA) se détache, mais que quelques protéines de la matrice (MA) et de la nucléocapsid (NC) restent associées à l'ARN viral accompagné de la transcriptase inverse (RT), de l'intégrase (IN) et de Vpr (Freed, 2001). Il est de plus proposé que la protéine virale Nef aide le virus à migrer à travers le cytosquelette d'actine sous-cortical de la cellule hôte juste après la fusion des membranes (Campbell *et al.*, 2004).

L'étape de rétrotranscription (fig. 8, étape 4) s'effectue grâce à l'activité ADN polymérase et RNase H de la RT. La RT synthétise un brin d'ADN à partir de l'ARN viral simple brin et le dégrade au fur et à mesure, sauf une partie qui est utilisée comme amorce pour la synthèse du deuxième brin d'ADN. L'absence de relecture après polymérisation est à l'origine de la grande diversité génétique entre les différentes souches de VIH (voir § 1.2).

Le complexe de pré-intégration formé autour de l'ADN double brin synthétisé migre ensuite vers le noyau, dirigé par Vpr, MA et IN qui se lient à des importines interagissant ensuite avec les pores nucléaires (Kogan & Rappaport, 2011). Ce mécanisme est crucial

puisque'il assure l'infectivité de cellules qui ne se divisent pas, et pourrait largement favoriser l'établissement de tissus réservoirs (voir § 1.5).

L'ADN une fois dans le noyau est intégré par IN (fig. 8, étape 6), assurant une base durable pour la production de multiples virions et de facteurs viraux comme Nef affectant le fonctionnement du système immunitaire entier (Laguette *et al.*, 2010).

2.2.3. Production de nouveaux virions

La transcription du génome viral nécessite l'action de la protéine virale Tat (Dayton *et al.*, 1986; Fisher *et al.*, 1986), qui interagit directement avec des composants de la machinerie de transcription ainsi qu'avec l'ARN néoformé (Strebel, 2003). Il apparaît de plus que Vpr est capable de trans-activer le promoteur viral et ainsi d'augmenter le taux de transcription (Kogan & Rappaport, 2011). Les produits de la transcription subissent un épissage alternatif ou non (fig. 8, étape 8), conduisant à environ 30 ARNs viraux différents (Purcell & Martin, 1993). L'efficacité de l'épissage étant défavorable à la conservation d'un brin d'ARN viral entier ou partiellement épissé, la protéine Rev intervient au niveau du noyau de manière à protéger l'ARN et l'exporter tel quel dans le cytoplasme en vue de son intégration dans de nouveaux virions. Ce mécanisme n'est pas requis pour la production de protéines Tat, Rev et Nef (Strebel, 2003).

Les différents composants viraux sont ensuite adressés à la membrane en vue de leur assemblage (fig. 8, étape 10). L'acteur majeur de cette étape est le précurseur de Gag, p55 (Freed, 2001). Il est important de noter que si l'interaction d'Env avec les récepteurs CD4 et les corécepteurs est efficace lors de l'entrée du virus, elle est ici délétère. C'est pourquoi la protéine Vpu dégrade spécifiquement CD4 dans le réticulum endoplasmique *via* le protéasome (Strebel, 2007). En parallèle, Nef augmente le taux d'internalisation de CD4 par un processus clathrine-dépendant et en découplant le récepteur de la kinase p56lck (Laguette *et al.*, 2010). Ceci a aussi pour effet d'éviter une-surinfection de la cellule hôte, permettant aux virus circulant de cibler d'autres cellules non-infectées. Le fait que Nef affecte aussi la quantité de corécepteurs CCR5 et CXCR4 à la membrane corrobore cette théorie.

Les dernières étapes du cycle sont le bourgeonnement des virions et leur dissémination (fig. 8, étape 11), favorisée par Nef et Vpu (Laguette *et al.*, 2010; Strebel, 2007), puis la maturation des virions (fig. 8, étape 12). En effet, ces derniers ont incorporé les précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pol lors de l'assemblage viral. La maturation est assurée par la protéase qui clive les polyprotéines, permettant l'organisation des divers éléments au sein des virions néoformés (Freed, 2001).

Une étude récente a permis d'estimer la durée des différentes grandes étapes du cycle viral en regroupant les délais de réponse cliniques de divers inhibiteurs du VIH (diminution de l'ARN viral dans le sang). Il semble ainsi qu'une fois le virus lié aux corécepteurs, la progression vers le début de la transcription inverse est très rapide, car aucune différence n'a été observée entre l'inhibition de liaison à CCR5 et le début de la rétrotranscription. La conversion de l'ARN en ADN est la plus longue étape, estimée à 33 h. L'intégration durerait environ 5 h, et il s'écoulerait environ 8h avant qu'un virion néoformé et relargué s'accroche au récepteur CCR5 d'une nouvelle cellule cible (Murray *et al.*, 2011).

2.3. Devenir des virions néo-synthétisés, tropisme cellulaire et récepteurs

Lorsqu'une cellule infectée produit de nouveaux virions, deux types d'évènements peuvent survenir. Soit les particules virales se détachent de la cellule hôte et circulent aléatoirement dans le milieu extracellulaire sous forme libre, soit elles restent accrochées à la cellule source et « attendent » que celle-ci interagisse avec une autre cellule, non infectée.

2.3.1. Dissémination aléatoire de virions libres

Ce mode de dissémination du virus présente l'avantage d'assurer la présence du virus dans les fluides corporels tels que le sang, les sécrétions d'organes génitaux, le lait maternel, permettant la transmission du virus à un autre individu. Le deuxième intérêt de la forme libre des virus est qu'ils peuvent atteindre rapidement des zones du corps éloignées par rapport à leur zone de production, par exemple par la circulation systémique sanguine. En revanche, ils rencontrent des barrières physiques que sont les tissus épithéliaux, et la rencontre d'une nouvelle cellule cible est un facteur cinétique défavorisant vis-à-vis des défenses de l'organisme. En effet, leur circulation sous forme libre les expose aux différents acteurs du système immunitaire (voir § 3.1.1).

Les virions libres infectent majoritairement les lymphocytes T CD4+, mais aussi les macrophages. Le mécanisme d'infection est alors celui décrit précédemment, et les récepteurs utilisés sont CD4 comme récepteur primaire, et comme corécepteur soit CCR5 (souche virale R5), soit CXCR4 (souche X4). Les souches X4 peuvent induire la formation de syncytium, c'est-à-dire la fusion de plusieurs cellules en une, et sont dites SI (Syncytium Inducing), alors que les souches R5 sont NSI (Non-Syncytium Inducing). Les virus qui peuvent utiliser les deux corécepteurs sont dits R5X4. Il faut noter que les souches virales détectées lors de la primo-infection sont majoritairement R5, et qu'ensuite, l'observation de l'émergence de

souches X4 chez le patient est un pronostic d'évolution rapide vers la phase symptomatique SIDA (Poveda *et al.*, 2006).

Par ailleurs, il a été montré que les virus libres peuvent se lier à des cellules cibles *via* d'autres récepteurs, en particulier au niveau du corécepteur. Beaucoup de données existent à ce sujet, donnant une longue liste de corécepteurs potentiels découverts par des expériences *in vitro* ou *in vivo* sur des modèles animaux, comme les récepteurs CCR3, CCR2b, GPR15/Bob, CXCR6/Bonzo, etc. (Clapham & McKnight, 2002; Levy, 2009). Même si de rares souches montrent de telles capacités (Jiang *et al.*, 2011), ces interactions restent toutefois minoritaires. Il semble aussi que d'autres mécanismes d'entrée existent, comme la liaison du virus à des cellules cibles *via* des récepteurs aux fragments Fc reconnaissant des anticorps anti-VIH (Homsy *et al.*, 1989). Enfin, les virions néoformés peuvent « capturer » des protéines membranaires de la cellule hôte au sein de leur enveloppe lors de leur assemblage. En particulier, LFA-1, ICAM-1, CMH-I et II ont été détectées dans des virus et peuvent représenter des molécules d'accrochage spécifique à de nombreux types cellulaires. Leur présence dans les virions peut ainsi augmenter le taux d'infection (Tremblay, 1998).

2.3.2. Dissémination orientée par association des virions à une cellule

L'avantage de la transmission virale cellule à cellule est que cela permet au virus de franchir plus facilement les barrières de l'organisme ciblé, comme les muqueuses, pour ensuite atteindre les lymphocytes T présents dans les tissus lymphoïdes secondaires associés, ou encore la barrière hémato-encéphalique, afin d'infecter les tissus cérébraux (Clapham & McKnight, 2002). Cela permet aussi un transfert ciblé par l'intermédiaire du réseau complexe d'interactions cellulaires à la base du système immunitaire.

2.3.2.1. Interactions cellulaires à courte et longue distance

Les pathogènes en général montrent des capacités à interférer avec les contacts entre cellules immunitaires, soit dans un but d'échappement aux défenses de l'organisme, soit pour promouvoir leur dissémination de manière ciblée. En particulier, dans le cas du VIH-1, il a été constaté que le virus pouvait se transmettre de cellule à cellule de deux manières, par :

- des interactions à « longue distance » *via* des nanotubes membranaires (longueur moyenne d'environ 25 µm, diamètre moyen compris entre 200 et 400 nm, Davis, 2009). Le VIH semble favoriser l'établissement de telles extensions (Nikolic *et al.*, 2011) et utilise la voie classique d'entrée pour infecter la cellule cible (Sowinski *et al.*, 2008).

- des contacts intercellulaires très proches, basés sur l'établissement d'une synapse virologique, contournement de la synapse immunologique établie en temps normal entre deux cellules immunitaires (fig. 10A, Davis, 2009).

Cette dernière méthode de transmission a été grandement étudiée et semble jouer un rôle important dans la dissémination du virus dans les tissus de l'organisme infecté.

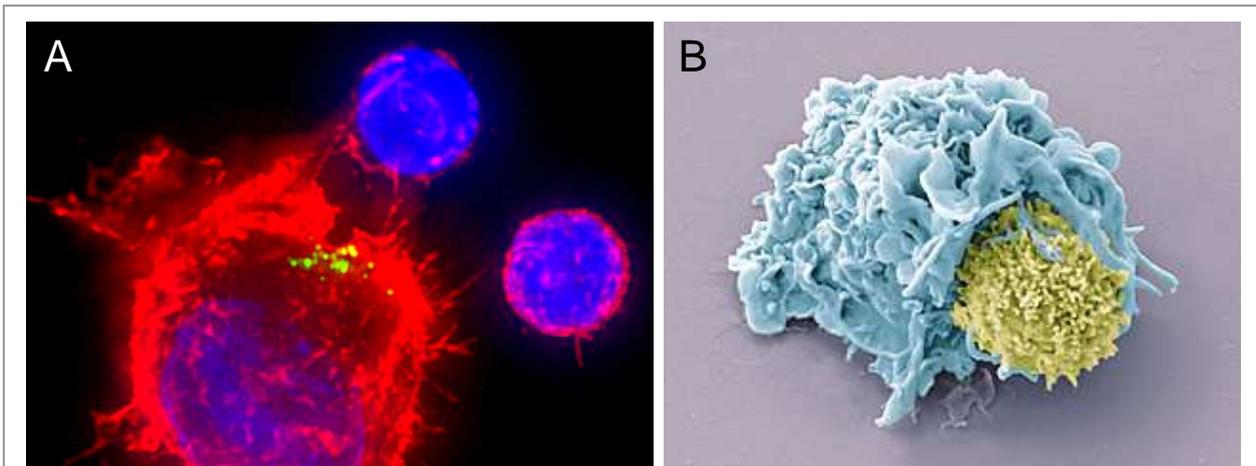


Figure 10. Contact étroit entre une cellule présentatrice d'antigène (CPA) et un lymphocyte T.

Les CPA communiquent avec les lymphocytes T lors de la réponse immunitaire adaptative, sous la forme d'un contact étroit appelé synapse immunologique. Le VIH est capable de détourner ce mécanisme en induisant l'établissement d'une synapse virologique (A). L'assemblage de nouveaux virions (Vpr est marquée avec la GFP, en vert) est orienté vers ce contact entre la CPA, ici une cellule dendritique (en bas à gauche), et le lymphocyte. L'actine est marquée avec la phalloïdine (rouge) et le noyau avec le DAPI (bleu). Crédits : David McDonald & Thomas Hope, Case Western University & Northwestern University, "Cell Picture Show". (B) La visualisation de cette interaction en relief, par microscopie électronique à balayage, permet de se rendre compte du contact étroit établi en temps normal entre les deux cellules (cellule dendritique en bleu, lymphocyte en jaune). Crédits : Olivier Schwartz, Institut Pasteur.

2.3.2.2. Synapse virologique et transmission du virus

Il existe trois types de Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA) : les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Elles ont toutes la capacité de présenter des fragments antigéniques avec les lymphocytes T CD4+ *via* le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II (CMH-II). En temps normal, il se forme entre les deux cellules une synapse immunologique, zone étroite de contact intercellulaire où les différents acteurs de la communication sont regroupés (CMH-II, TCR, CD4, CD3, molécules d'adhésion, etc.). La reconstitution 3D d'images de microscopie électronique de cette interaction montre à quel point la CPA modifie sa morphologie pour optimiser le contact avec le lymphocyte T (fig. 10B). Le VIH détourne cette communication à son profit, et peut en infectant les CPA cibler très spécifiquement des lymphocytes CD4 +. Il semble d'ailleurs que la protéine Nef

joue un rôle important dans l'établissement de la synapse virologique et la modulation de la signalisation immunitaire (Fackler *et al.*, 2007). Le contact entre les deux types cellulaires peut de plus permettre la transmission dans le sens opposé (cellule T vers CPA, fig. 11).

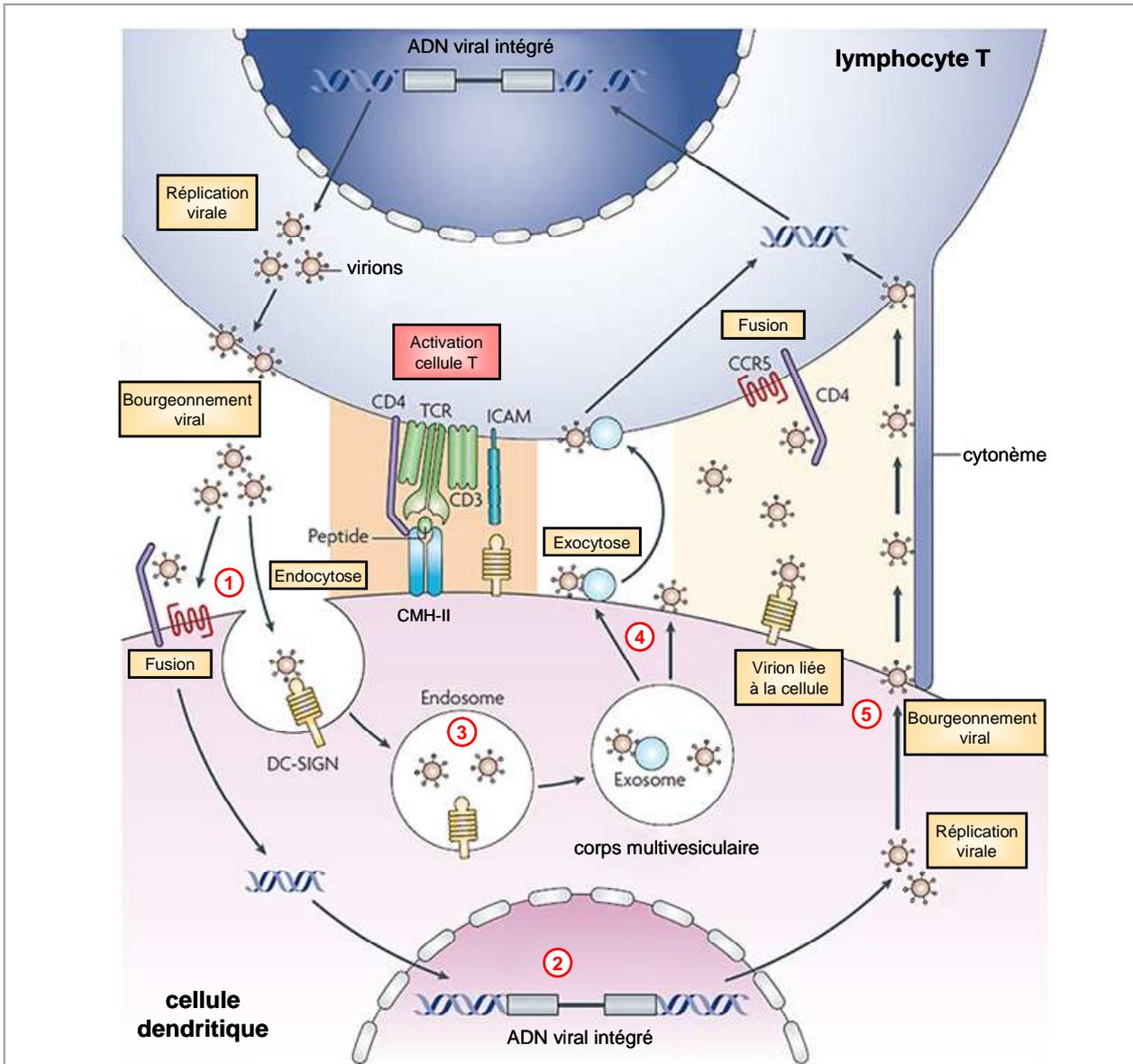


Figure 11. Contact entre une CPA et un lymphocyte, un espace favorable à la transmission du VIH.

Le VIH peut infecter une CPA (1), ici une cellule dendritique, soit par fusion, conduisant à l'intégration du virus dans le génome de la cellule (2), soit par endocytose, le virus restant entier dans un endosome (3). Lors de l'établissement d'un contact avec un lymphocyte T par exemple, une synapse immunologique peut se créer (zone orangée), permettant l'activation de la cellule T. Le VIH peut détourner ce type de contact et induire la création d'une synapse virologique où la protéine d'enveloppe Env peut interagir avec CD4 et CCR5 (non représenté). Le virus peut aussi être transmis à la cellule T par exocytose (4), ou par bourgeoisement (5), et ainsi être relargué dans la zone de contact, ou bien rester lié à la cellule pour être présenté à la cellule cible, ou encore être tracté le long de fines extensions membranaires (cytonèmes). Une fois le lymphocyte T infecté, il peut lui aussi produire de nouveaux virions, qui peuvent être transmis à une CPA lors d'un contact avec celle-ci (1). Adapté de Hladik et McElrath, 2008.

Le mécanisme classique d'entrée du virus *via* CD4 et CCR5 ou CXCR4 est utilisé dans ce type d'échange, mais pas seulement. En effet, les cellules dendritiques, par exemple, peuvent fixer le virus *via* d'autres protéines de surface comme la lectine de type C DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), entraînant un processus d'endocytose sans fusion ou gardant le virus accroché à la surface de la cellule (fig. 11, Sattentau, 2008).

Les synapses virologiques peuvent aussi se former entre deux cellules T. Il a été démontré à ce titre que la protéine d'enveloppe gp120 pouvait se lier à l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, présente à la surface des lymphocytes T, et *via* cette interaction favoriser l'établissement d'une synapse (Cicala *et al.*, 2009). Cette intégrine est spécifique du tissu lymphoïde secondaire associé à la muqueuse gastro-intestinale, indiquant que cette transmission virale est tissu-spécifique.

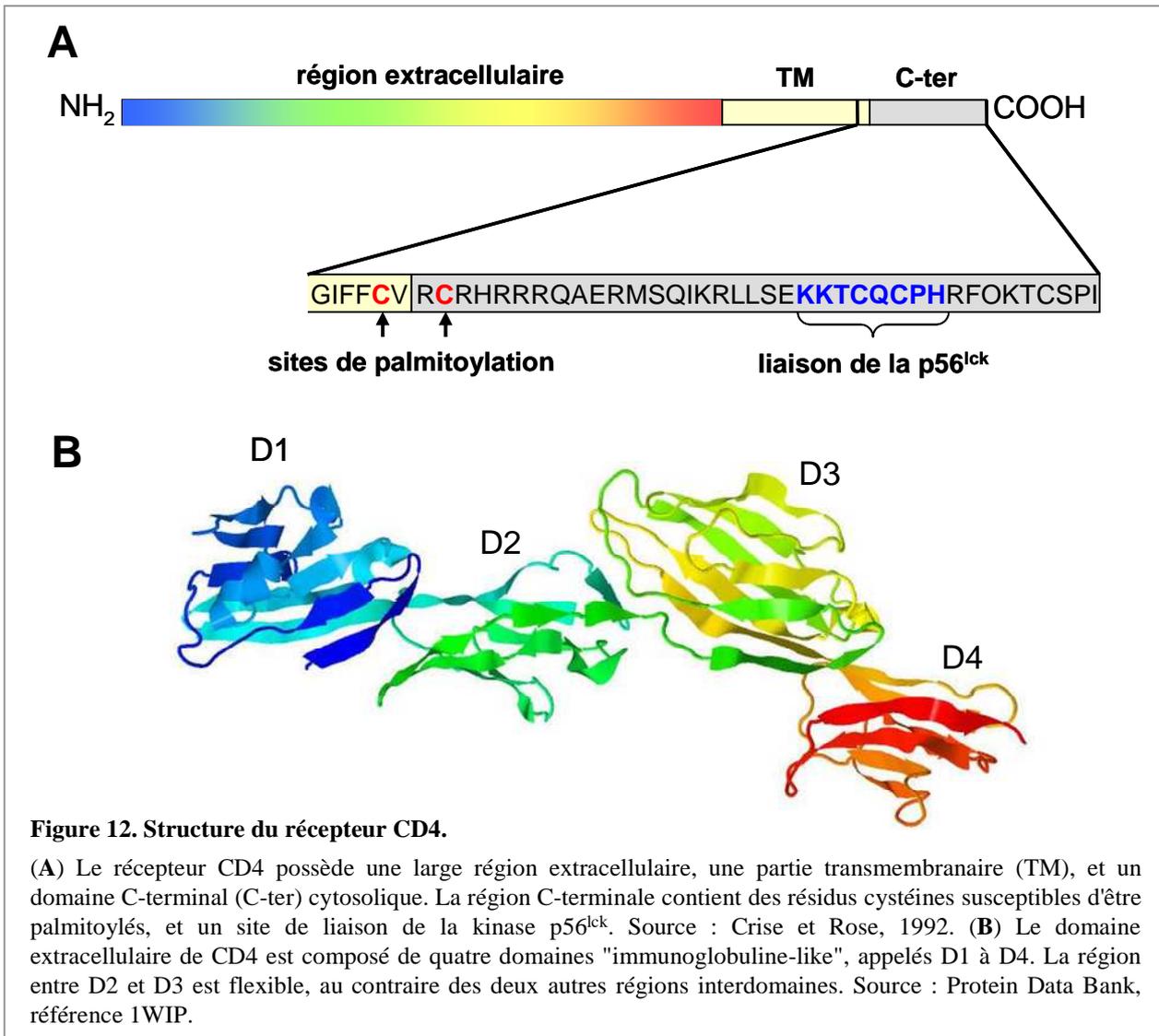
Il apparaît donc que le processus classique d'entrée du virus utilisant les récepteurs CD4 et CCR5 (majoritaire en primo-infection) est commun aux différents mode de dissémination du virus, et joue très certainement un rôle primordial dans la pathogénicité virale. En particulier, ce sont les deux récepteurs majoritairement impliqués dans l'infection des principales cibles cellulaires du VIH que sont les lymphocytes T CD4+.

2.4. Les récepteurs majoritaires utilisés par le VIH-1

2.4.1. Le récepteur primaire CD4

2.4.1.1. Structure

Le récepteur CD4, pour Cluster of Differentiation 4, a été identifié pour la première fois en 1977 et initialement nommé T4 chez l'humain (Bowers *et al.*, 1997). Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de 55 kDa, appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Elle est composée d'une partie intracellulaire de 38 acides aminés, d'une région transmembranaire de 23 acides aminés et d'une partie extracellulaire de 372 acides aminés (fig. 12A, Sekaly & Rooke, 1998). Cette dernière partie de la protéine est sub-divisée en 4 domaines Ig-like appelés D1 à D4 (fig. 12B), D1 étant côté N-terminal. La cristallisation des domaines D1 et D2 humains recombinants a permis d'obtenir leur structure avec une résolution de 2.3 Å (Ryu *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1990). La structure des domaines D3 et D4 a été résolue à 2.8 Å à partir du récepteur provenant du rat (Brady *et al.*, 1993). La confrontation de ces données structurales avec celles de cristaux de CD4 entiers (Kwong *et al.*, 1990) propose finalement que les quatre domaines extracellulaires de CD4 sont groupés



par deux de manière rigide (D1-D2 / D3-D4), liés entre eux par une région plus flexible, et adoptant une longueur maximale de 125 Å. Côté C-terminal, deux résidus cystéines peuvent être palmitoylés, ancrant cette partie du récepteur à la membrane (fig. 12A).

2.4.1.2. Expression

Le récepteur est exprimé à la surface de cellules immunitaires, à savoir les lymphocytes CD4⁺ principalement, mais aussi les monocytes, les macrophages, les cellules NK (Natural Killer) et les cellules de Langerhans, des cellules dendritiques épidermales (Tourvieille *et al.*, 1986). Le gène est présent dans les thymocytes, qui sont les précurseurs des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺, mais le récepteur n'est alors pas exprimé, la transcription étant réprimée par le biais d'une séquence « silencer » dans le premier intron du gène (Sawada *et al.*, 1994; Siu *et al.*, 1994).

2.4.1.3. Interactions et fonctions

Le récepteur CD4 peut interagir avec de nombreux partenaires protéiques, comme cela a été démontré récemment par une approche de protéomique avec des macrophages primaires humains (Raposo *et al.*, 2011). Quelques exemples d'interactions majoritaires sont présentées ici.

CD4 interagit *via* son domaine intracellulaire avec la kinase p56^{lck} (Lck, pour Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase). Cette interaction limite l'endocytose constitutive de CD4 *via* des puits recouverts de clathrine. Comme la kinase est spécifique des lymphocytes, on observe un renouvellement plus intense du récepteur à la surface des lignées monocytaires (Bowers *et al.*, 1997).

Côté extracellulaire, CD4 interagit avec le CMH-II présent sur les CPA (voir § 2.3.2.2) *via* ses domaines D1 et D2 (Brady & Barclay, 1996), et joue le rôle de protéine d'adhésion. Sa fonction est d'assister et potentialiser la signalisation *via* le récepteur TCR (T Cell Receptor) qui permet l'activation du lymphocyte après interaction avec le CMH-II. Dans ce contexte, le détachement de la p56^{lck} de CD4, et donc l'internalisation de ce dernier, pourrait être un mécanisme d'aide au détachement du complexe CD4-TCR du CMH-II, entraînant la rupture du contact étroit entre CPA et lymphocyte (Marsh & Pelchen-Matthews, 1996). Ce processus est de plus important dans la maturation des thymocytes.

Enfin, CD4 est un récepteur pour l'IL-16, une interleukine impliquée dans le chimiotactisme lymphocytaire (Center *et al.*, 1996).

2.4.1.4. Interaction avec la protéine d'enveloppe virale gp120

L'interaction de la gp120 avec CD4 a été caractérisée structuralement après cristallisation de la protéine virale avec un fragment du récepteur, à savoir les domaines D1-D2, stabilisé par le fragment d'un anticorps dirigé contre un site de gp120 dévoilé après liaison de CD4 (Kwong *et al.*, 1998). Ce sont ces mêmes travaux qui sont à l'origine de la résolution de la structure à haute résolution de la gp120 (voir § 2.1.2). Le domaine D1 du récepteur CD4 interagit avec une dépression formée entre les domaines externe et interne de gp120, et les feuillettes β qui les relie (voir structure de gp120, fig. 6). Les changements conformationnels qui en découlent dévoilent un site d'interaction au corécepteur et libèrent la boucle V3.

La constante d'affinité pour la gp120 monomérique est de 1 à 10 nM (Sattentau & Moore, 1993; Doranz *et al.*, 1999). Par contre, celle de la gp120 oligomérique est inférieure (10-1000 nM), particulièrement pour les virus provenant d'isolats cliniques (Ugolini *et al.*,

1999; Fouts *et al.*, 1998). La liaison de gp120 au récepteur provoque une cascade de signalisation, et il semble que le TNF- α (tumeur necrosis factor-alpha) soit impliqué dans l'internalisation gp120-dépendante de CD4 dans les macrophages (Karsten *et al.*, 1996). De plus, cela provoque une translocation de NF- κ B vers le noyau, un facteur de transcription indispensable à la production efficace de nouveaux virus (Briant *et al.*, 1997).

2.4.1.5. Oligomérisation

Le récepteur CD4 peut former des dimères *via* le domaine D4 (Wu *et al.*, 1997), et alors établir des oligomères à partir de ces homodimères *via* les domaines D1 (Briant *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998). Il est cependant proposé que des dimères de CD4 puissent se former *via* la partie cytoplasmique du récepteur (Fournier *et al.*, 2010). La capacité de dimérisation / oligomérisation a été vérifiée pour des récepteurs CD4 natifs dans des lymphocytes et des monocytes (Lynch *et al.*, 1999). Plusieurs travaux proposent que l'état de dimère est important dans la régulation des fonctions du récepteur, comme le renforcement de l'interaction avec le CMH-II (Sakihama *et al.*, 1995), l'activation des lymphocytes T (Moldovan *et al.*, 2002) et l'établissement d'une synapse immunologique avec une CPA (Moldovan *et al.*, 2006). En revanche, la dimérisation de CD4 ne semble pas jouer de rôle dans l'interaction de CD4 avec la protéine d'enveloppe virale gp120 du VIH-1 (Sakihama *et al.*, 1995).

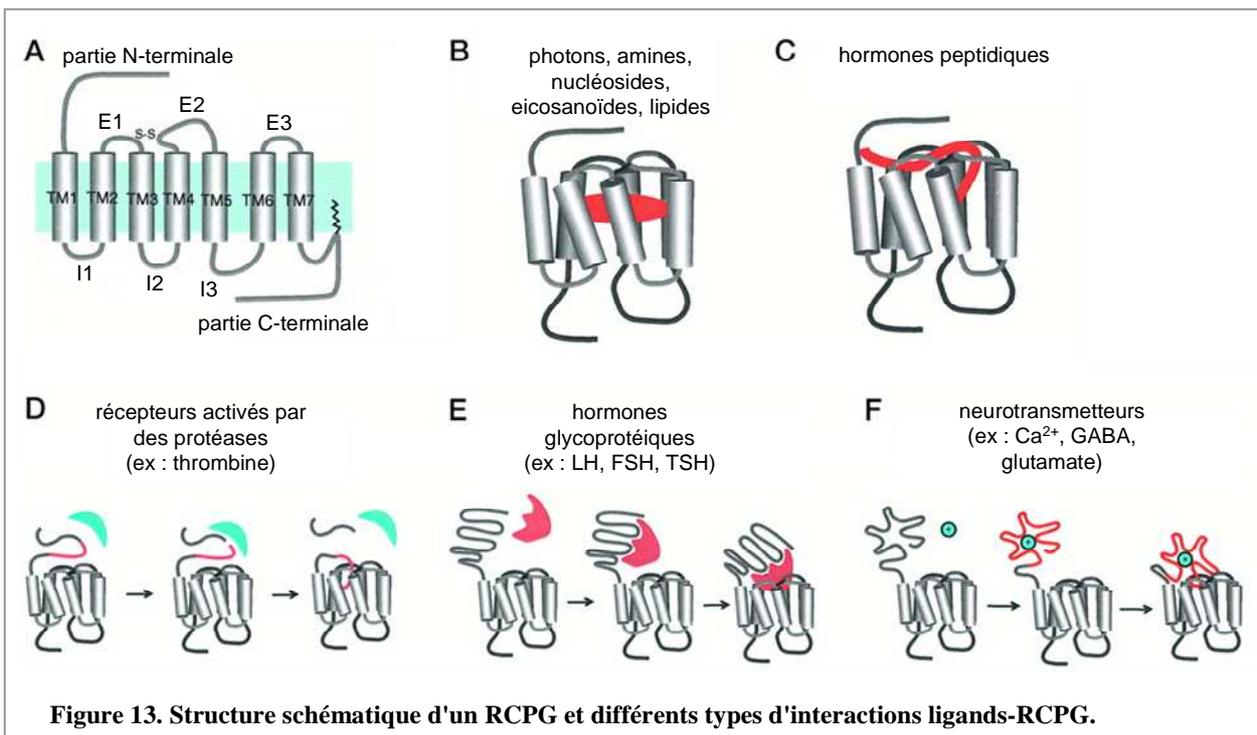
2.4.2. Le corécepteur CCR5

2.4.2.1. CCR5, un récepteur aux chimiokines, couplé aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) correspondent à la plus grande famille de protéines de surface impliquées dans la signalisation. En effet, il existe plus de 900 gènes chez l'homme codant pour des RCPG, dont environ 500 correspondent aux récepteurs olfactifs et gustatifs, et 400 à des récepteurs capables de lier des ligands endogènes (Takeda *et al.*, 2002; Vassilatis *et al.*, 2003). Dans ce dernier groupe, il existe la famille des récepteurs aux chimiokines, qui sont de petites protéines (environ 8 à 14 kDa) régulant le mouvement des cellules immunitaires, phénomène appelé chimiotactisme. Ces protéines sont divisées en plusieurs sous-familles selon les acides aminés cystéines en partie N-terminale : famille C, CC, CXC et CX3C (X désignant un acide aminé différent d'une cystéine). Le récepteur correspondant est désigné en rajoutant la lettre R, alors que le nom de la chimiokine possède la lettre L, le tout terminé par le numéro associé. On a donc le récepteur CCR5, liant la chimiokine CCL5.

2.4.2.2. Structure des RCPG et illustration avec le récepteur CCR5

Les RCPG possèdent de nombreux points communs structuraux, en particulier la présence de sept domaines transmembranaires les ancrant à la membrane. La structure de ces domaines a été décrite dans un premier temps pour la rhodopsine bovine à une résolution de 2.8 Å (Palczewski *et al.*, 2000). Ce n'est que récemment que la structure de RCPG liant des ligands a été déterminée par cristallographie à haute résolution : récepteur β 2-adrénérique (Rasmussen *et al.*, 2007), récepteur β 1-adrénérique (Warne *et al.*, 2008), récepteur A_{2A} de l'adénosine (Jaakola *et al.*, 2008), et dernièrement le récepteur aux chimiokines CXCR4 (Wu *et al.*, 2010). Ces différents travaux montrent que la structure tridimensionnelle à haute résolution est nécessaire pour identifier les résidus impliqués dans la liaison du ligand et les changements de conformation associés. Ces dernières données n'ont pas encore été exploitées pour la modélisation du récepteur CCR5, et les études se réfèrent jusqu'à présent à la structure de la rhodopsine bovine pour l'étude des interactions ligand-récepteur (Shahlaei *et al.*, 2011; Paterlini, 2002; Govaerts *et al.*, 2003).



De manière générale, les RCPG ont chacun une partie N-terminale extracellulaire de longueur variable, jouant parfois un rôle dans la liaison du ligand (fig. 13). Des boucles intra- et extra-cellulaires relient les hélices hydrophobes transmembranaires, notées I1 à I3 et E1 à E3 respectivement. Enfin, la partie C-terminale permet l'interaction et la signalisation *via* plusieurs partenaires cytosoliques ou membranaires.

Le récepteur CCR5 est un RCPG de 40 kDa, possédant 352 acides aminés. Sa partie N-terminale de 32 acides aminés semble s'orienter vers les domaines transmembranaires du récepteur, comme l'indique le pont disulfure qui stabilise cette partie avec la boucle E3 (fig. 14A). Les boucles extracellulaires E1 et E2 sont stabilisées par le même type de liaison covalente. La partie N-terminale du récepteur possède aussi des résidus tyrosine qui peuvent être sulfatés lors de modification post-traductionnelles. L'ensemble de cette structure est importante à la fixation des ligands naturels, et comme le suggère les simulations, beaucoup de résidus sont susceptibles d'être impliqués dans la liaison de ligands naturels ou non (fig. 14B, voir § suivants). Enfin, la partie intracellulaire est liée à la membrane *via* trois palmitoylations sur des résidus cystéines.

2.4.2.3. Expression de CCR5

Le récepteur CCR5 est exprimé à la surface de lymphocytes T, de monocytes et de macrophages présents dans le sang et les tissus lymphoïdes. Il est important de noter que dans le cas des lymphocytes T CD4+, qui constituent les cibles principales du virus, CCR5 est exprimé seulement si les cellules sont activées, c'est-à-dire qu'elles sont dans un état différencié qui leur permet d'assumer leurs fonctions immunitaires (Bleul *et al.*, 1997). Le récepteur est de plus retrouvé au niveau de certaines cellules du système nerveux central, comme les neurones, les astrocytes et la microglie, mais aussi de cellules épithéliales, endothéliales, de cellules de muscle lisse vasculaire et de fibroblastes. Bien que CCR5 soit exprimé dans de multiple tissus, son absence ne semble pas provoquer de déficit, ni chez la souris, ni chez l'homme (Mueller & Strange, 2004).

2.4.2.4. Interactions et fonctions

CCR5 est un récepteur liant principalement les chimiokines MIP-1 α ou CCL3, MIP-1 β ou CCL4 et RANTES ou CCL5 (Zlotnik & Yoshie, 2000). MIP-1 α et RANTES peuvent se lier à d'autres récepteurs de chimiokines de type CC, alors que MIP-1 β est plus spécifique de CCR5. Elles ont une action chimiotactique sur les cellules exprimant CCR5 à leur surface, et interviennent dans des processus d'inflammation et d'hématopoïèse *via* la signalisation par ce

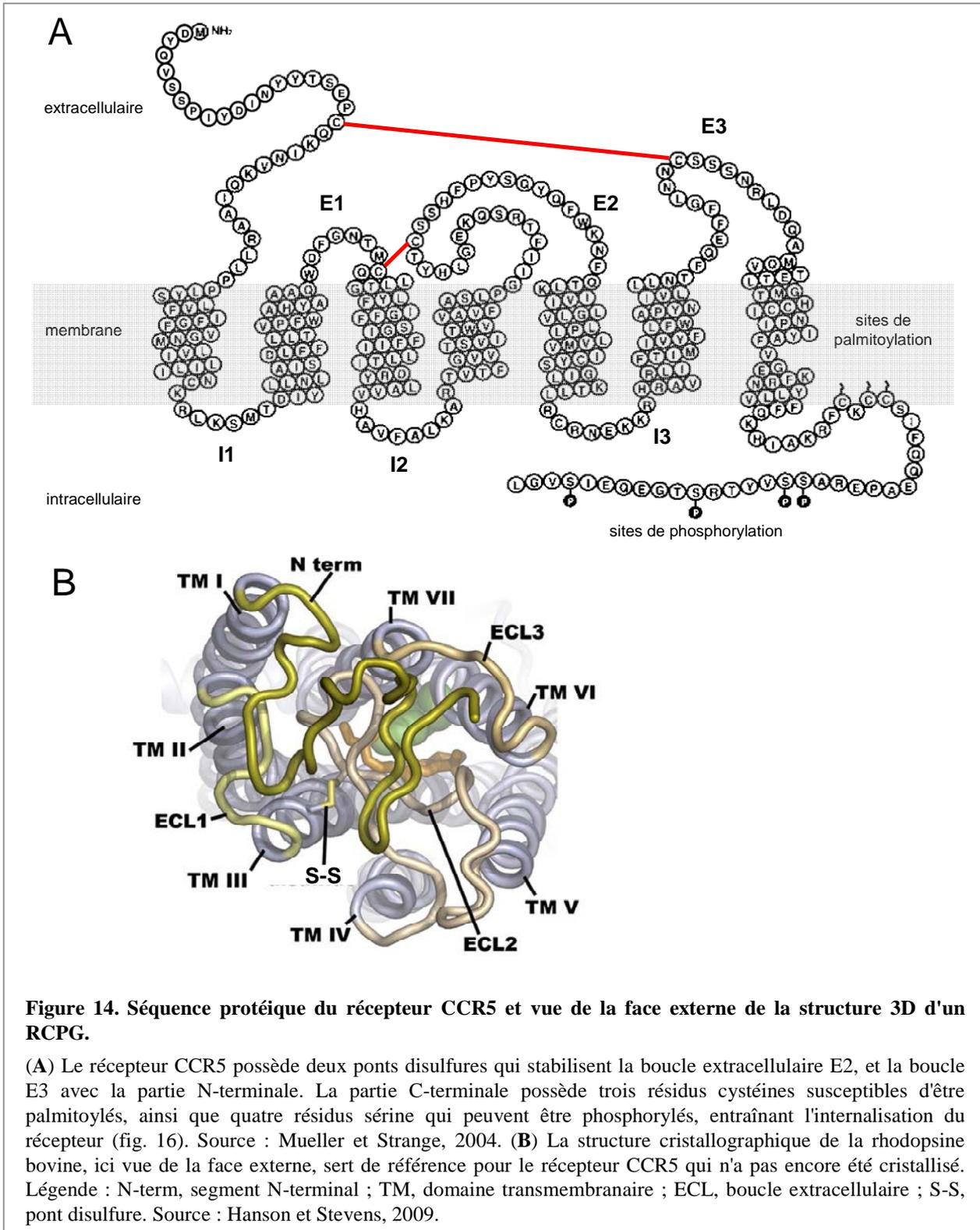


Figure 14. Séquence protéique du récepteur CCR5 et vue de la face externe de la structure 3D d'un RCPG.

(A) Le récepteur CCR5 possède deux ponts disulfures qui stabilisent la boucle extracellulaire E2, et la boucle E3 avec la partie N-terminale. La partie C-terminale possède trois résidus cystéines susceptibles d'être palmitoylés, ainsi que quatre résidus sérine qui peuvent être phosphorylés, entraînant l'internalisation du récepteur (fig. 16). Source : Mueller et Strange, 2004. (B) La structure cristallographique de la rhodopsine bovine, ici vue de la face externe, sert de référence pour le récepteur CCR5 qui n'a pas encore été cristallisé. Légende : N-term, segment N-terminal ; TM, domaine transmembranaire ; ECL, boucle extracellulaire ; S-S, pont disulfure. Source : Hanson et Stevens, 2009.

récepteur (Choi & An, 2011). Elles se lient à CCR5 en interagissant avec la boucle extracellulaire E2 du récepteur (Samson *et al.*, 1997), bien que des résidus de la partie N-terminale soient aussi impliqués (Blanpain *et al.*, 1999).

Comme les autres RCPG, le récepteur CCR5 interagit avec des protéines G hétérotrimériques, qui se dissocient en une sous-unité $G\alpha$ et une autre $G\beta\gamma$ (fig. 15). Cette dissociation, provoquée par l'échange de GDP par du GTP au sein de $G\alpha$, les découple du récepteur et leur permet d'assurer la transduction du signal de manière indépendante par interaction avec différents partenaires. L'hydrolyse du GTP en GDP induit la réassociation des deux sous-unités. Il existe une grande diversité de sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$, avec chacune leurs spécificités de signalisation, permettant un grand nombre d'associations hétérotrimériques et donc de nombreuses possibilités de liaison avec les RCPG. Le récepteur CCR5, comme les autres récepteurs aux chimiokines, interagit majoritairement avec des protéines G de la famille G_i , qui ont pour spécificité d'inhiber la production d'AMPc via l'adénylate cyclase (Aramori *et al.*, 1997). D'autres voies de signalisations ont été identifiées, notamment via des protéines G_s et G_q (Maghazachi & Al-Aoukaty, 1998). En aval, l'activation de kinases, comme les PI3 kinases ou les Rho GTPases, participe à la réorganisation du cytosquelette d'actine permettant la motilité cellulaire et donc le chimiotactisme (Turner *et al.*, 1995; Bacon *et al.*, 1998).

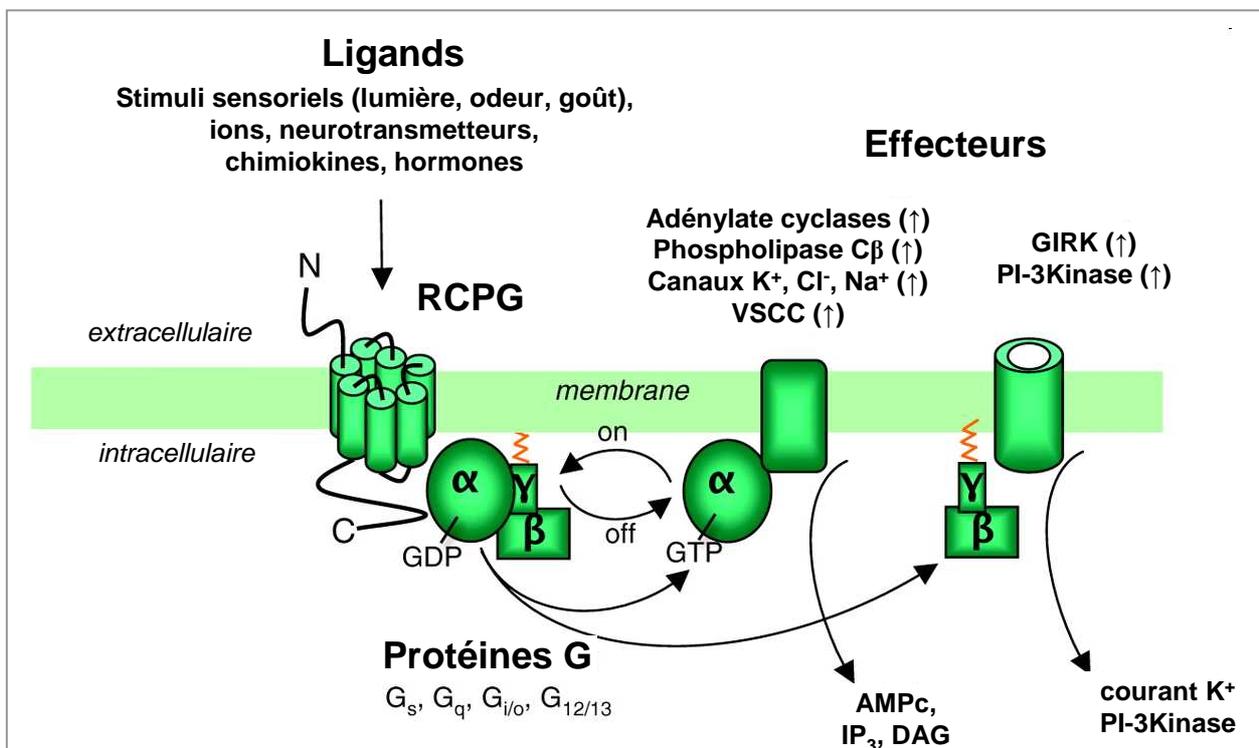


Figure 15. Schéma de la signalisation via les RCPG.

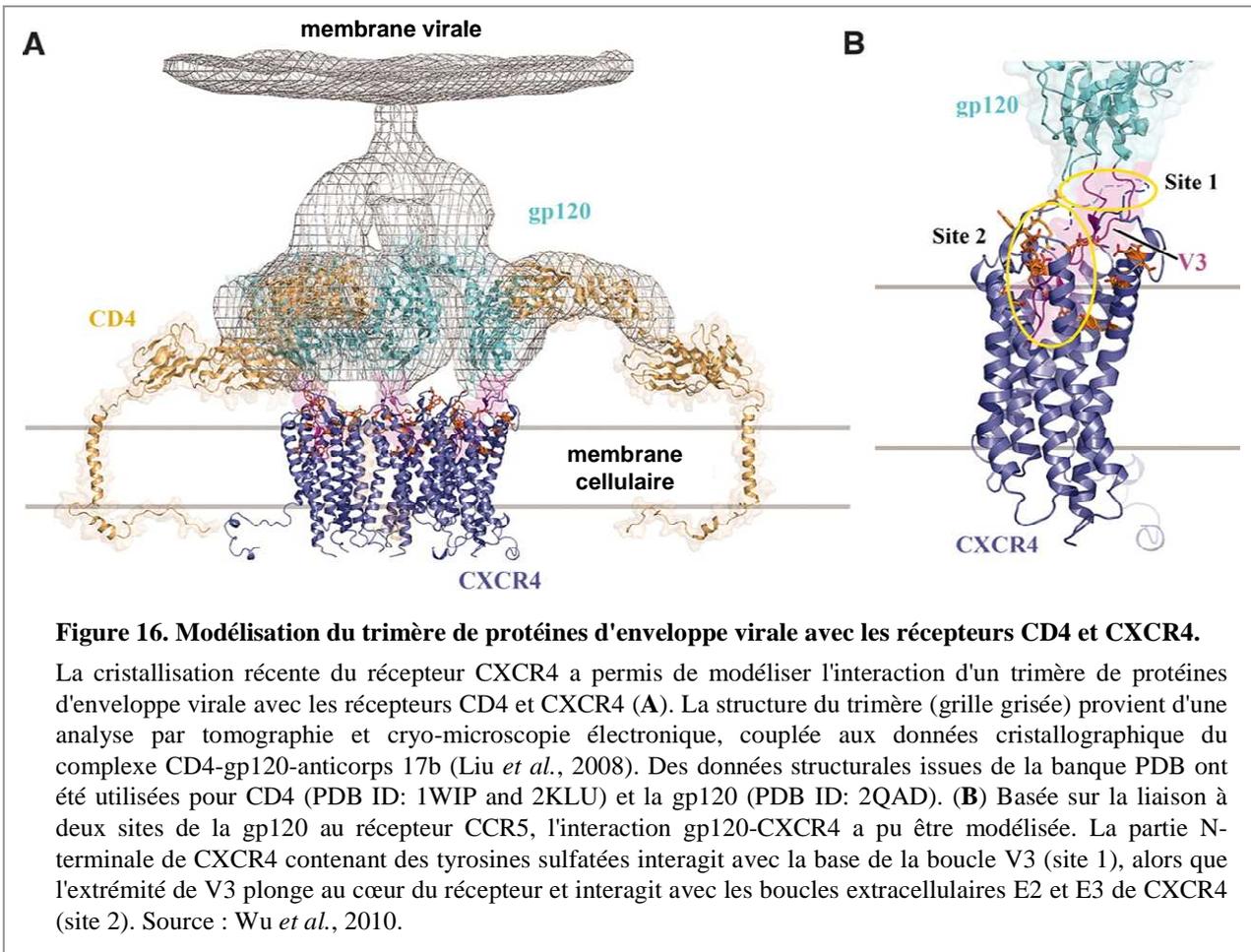
La liaison d'un ligand sur un RCPG entraîne l'activation de la protéine G associée, c'est-à-dire la dissociation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$, provoquée par l'échange du GDP par du GTP au niveau de la $G\alpha$. Chaque sous-unité va à son tour activer différents effecteurs, poursuivant la cascade de signalisation, en particulier via des seconds messagers. Légende : VSCC, Voltage Sensitive Ca²⁺ Channel ; GIRK, G protein-coupled Inwardly-Rectifying K⁺ channel. Source : Vilardaga *et al.*, 2010.

Enfin, la présence du récepteur CCR5 à la membrane est régulée par la phosphorylation de résidus sérine dans la partie C-terminale du récepteur (fig. 14A) par des kinases spécifiques (GRK pour G-protein coupled Receptor Kinase, Oppermann *et al.*, 1999), entraînant l'interaction avec des β -arrestines et l'internalisation du récepteur (Mueller *et al.*, 2002). La présence des palmitoylations dans cette même partie du récepteur semblent importante dans la présence du récepteur à la surface des cellules (Blanpain *et al.*, 2001).

2.4.2.5. Interaction avec la protéine d'enveloppe virale gp120

C'est par l'identification des chimiokines MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES comme inhibiteurs de l'infection par le VIH que le rôle du récepteur CCR5 dans la pathologie a été découvert (Cocchi *et al.*, 1995). L'association de la gp120 à CCR5 est rapidement établie et définie comme dépendante de l'interaction CD4-gp120 (Trkola *et al.*, 1996b; Wu *et al.*, 1996). Aujourd'hui, il est connu que la boucle V3 et une partie du domaine incluant l'hélice α 4 interagissent avec CCR5, et plus précisément avec l'extrémité N-terminale et la boucle extracellulaire E2 du récepteur (Choi & An, 2011). Les résidus cystéine formant des ponts disulfures sont importants pour la liaison de la protéine virale (Zaitseva *et al.*, 2003), ainsi que les sulfatations des tyrosines en partie N-terminale (Farzan *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2007). Depuis la résolution récente de la structure du récepteur CXCR4, il est possible de modéliser le trimère de gp120 en association avec les récepteurs cellulaires (fig. 16). Cette représentation réaliste permet de se rendre bien compte que CXCR4 comme CCR5 sont nettement "recouverts" par la protéine virale et que plusieurs corécepteurs regroupés dans une zone très restreinte de la membrane sont nécessaires pour une liaison complète du trimère de gp120.

L'affinité de la liaison gp120-CCR5 a été évaluée pour la souche de VIH-1 JRFL, donnant une constante de dissociation de 4 nM (Doranz *et al.*, 1999). Une valeur de 2,2 μ M a été mesuré pour un peptide représentant une partie de la séquence N-terminale sulfatée, confirmant que l'interaction s'opère *via* une autre région du récepteur. Enfin, il a été démontré que la liaison de la gp120 à CCR5 induit une cascade de signalisation *via* le récepteur et les protéines G associées qui contribue à contrôler les processus de la cellule hôte et faciliter l'infection (Wu & Yoder, 2009).



2.4.2.6. Homo- et hétéro-oligomérisation

De nombreux travaux montrent depuis quelques années que les RCPG s'associent en homo- ou hétéro-dimères et que cette organisation membranaire a une importance fonctionnelle (Terrillon & Bouvier, 2004; Skrabanek *et al.*, 2007; Lohse, 2010).

Dans le cas de CCR5, les données de la littérature suggèrent l'existence d'homodimères, formés constitutivement et indépendamment de la liaison du ligand (Chelli & Alizon, 2002; Benkirane *et al.*, 1997). Les régions impliquées dans cette association ne sont pas clairement identifiées puisque des résultats contradictoires ont été publiés (Hernanz-Falcón *et al.*, 2004; Lemay *et al.*, 2005), bien qu'il semble que la partie N-terminale soit impliquée (Chelli & Alizon, 2002; Benkirane *et al.*, 1997). D'autres travaux confirment l'oligomérisation du récepteur *via* la technique de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), et indiquent que ce phénomène se produit tôt au sein du réticulum endoplasmique (Blanpain *et al.*, 2002; Issafras *et al.*, 2002). Une étude a de plus montré que la dimérisation de CCR5 pouvait compléter des déficits fonctionnels pour chacun des récepteurs, à savoir

l'incapacité à lier le ligand ou à interagir avec les β -arrestines après phosphorylation par les GRK (fig. 17A, Hüttenrauch *et al.*, 2005).

Les chercheurs ont aussi démontré que ce même phénomène de trans-activation se produisait dans le cas d'une hétérodimérisation de CCR5, ici avec le récepteur à l'anaphylatoxine C5a (fig. 17B). D'autres associations ont été observées, entre CCR5 et des récepteurs aux chimiokines en particulier, comme CCR2 (Rodríguez-Frade *et al.*, 2004). A l'inverse des processus précédemment présentés, il semble dans ce cas que l'hétérodimérisation soit provoquée par la liaison des chimiokines CCL2 et RANTES/CCL5, lorsqu'elles sont mises en présence des récepteurs simultanément. Plus récemment, des

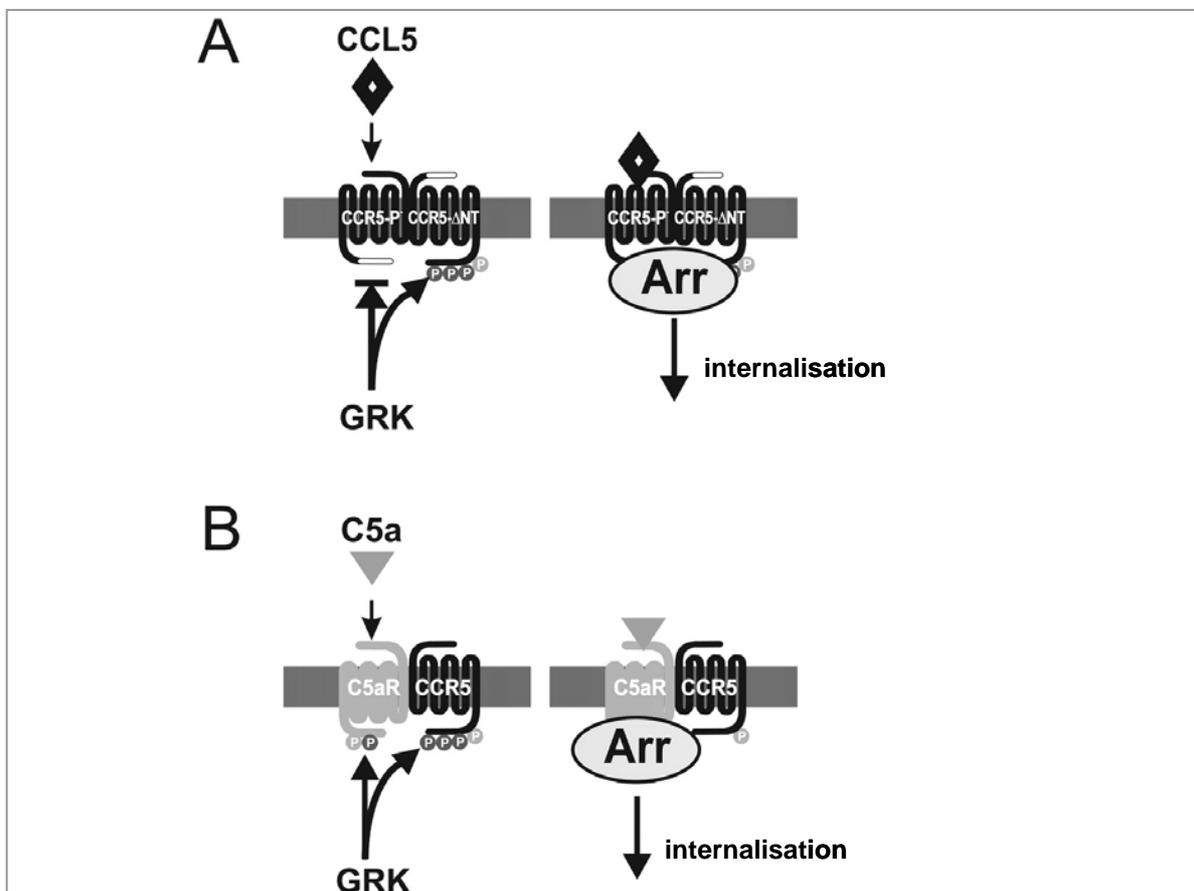


Figure 17. Internalisation du récepteur CCR5 par complémentation via des homo- ou hétérodimères.

La liaison de la chimiokine CCL5 provoque l'internalisation du récepteur CCR5, après phosphorylation de sa partie C-terminale par une GRK (G-protein coupled Receptor Kinase) et interaction avec une β -arrestine (Arr). (A) Si l'on exprime un récepteur CCR5 incapable d'être phosphorylé (CCR5-P⁻) en présence d'un autre mutant incapable de lier la chimiokine (CCR5- Δ NT), la dimérisation des deux formes de CCR5 permet une complémentation qui conduit à l'internalisation de CCR5 en présence de CCL5. (B) Le même processus peut aussi avoir lieu lors de la formation d'hétérodimères, comme ici avec le récepteur à l'anaphylatoxine C5a. Source : Hüttenrauch *et al.*, 2005.

dimères CXCR4-CCR5 ont été observés grâce à la technique de FRET (Förster Resonance Energy Transfer) (Isik *et al.*, 2008). La chimiokine MIP-1 α favoriserait la formation de l'hétérodimère, alors que le ligand SDF-1/CXCL12 de CXCR4 entraînerait sa dissociation, le tout constituant potentiellement un système de régulation complet de l'interaction CCR5-CXCR4.

Toutes ces interactions semblent participer à la régulation des différents récepteurs, ceci de manière complexe puisqu'une compétition peut avoir lieu entre ces différents partenaires membranaires et ainsi moduler les voies de signalisation.

3. Les stratégies de lutte contre le virus

Nous avons vu que le VIH dispose de nombreux mécanismes pour détourner la machinerie de la cellule hôte et se reproduire en un grand nombre de copies. Pourtant, comme pour tout autre pathogène, sa présence est détectée au sein de l'organisme et les différentes défenses immunitaires s'activent. L'infection d'un individu par le virus devient un « champ de bataille » où très souvent, après plusieurs années, l'hôte ressort perdant même avec l'aide de la médecine. Cette partie traite des défenses naturelles contre le VIH, mais aussi des approches thérapeutiques actuelles et à venir.

3.1. Mécanismes de lutte naturels

3.1.1. Réponse immunitaire

Le système immunitaire peut réagir de deux manières différentes lors d'une attaque par un pathogène, que l'on appelle réponse innée et réponse adaptative. La première constitue un moyen de réagir immédiatement face à une intrusion, soit une réponse à l'échelle de la minute ou de l'heure, alors que la seconde se chiffre en jours voire en semaines (Levy, 2009). L'immunité innée va donc limiter l'action du pathogène, laissant le temps aux agents de l'immunité adaptative d'agir de manière beaucoup plus spécifique, permettant de surcroît d'établir une mémoire vis-à-vis de cette attaque. Ces deux réponses font intervenir des cellules ou bien des processus moléculaires qui peuvent être extracellulaires ou intracellulaires.

3.1.1.1. Réponse immunitaire innée

Les cellules de l'immunité innée sont les cellules dendritiques, les monocytes, les cellules NK, les cellules de Langerhans et les lymphocytes T $\gamma\delta$, mais ne le sont pas de

manière exclusive car elles peuvent participer à la réponse adaptative (Lehner *et al.*, 2011). Elles sont majoritairement présentes au niveau des tissus épithéliaux, première ligne de défense que le virus doit franchir dans la majorité des cas (voir § 2.3.2). Leur action est coordonnée par des récepteurs comme les PRR (Pattern Recognition Receptor), dont les TLR (Toll-Like Receptor) font partie. Ils sont spécifiques d'éléments de pathogènes conservés structurellement, appelés PAMPs pour Pathogen-Associated Molecular Patterns. De manière étonnante, le VIH-1 semble utiliser ce mécanisme en activant les TLR pour maintenir certaines cellules de l'immunité innée en constante activation (Chang & Altfeld, 2009), état qui favorise l'immunosuppression (Stoddart *et al.*, 2010).

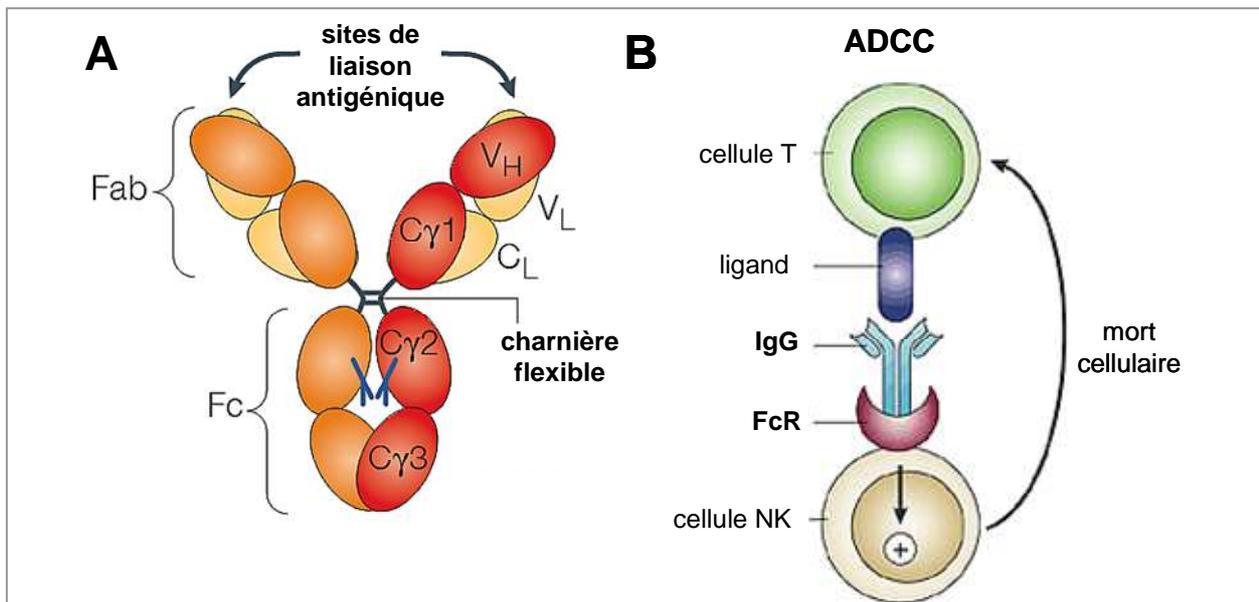
Par ailleurs, l'activation de la réponse innée induit la production de facteurs extracellulaires. Dans le cas du VIH, les interférons α et β sont produits en grande quantité par les macrophages et les cellules dendritiques pendant la phase précoce d'infection (Lehner *et al.*, 2011). Ils agissent en potentialisant la réponse immunitaire et peuvent, en particulier pour l'interféron α , empêcher les cellules T d'entrer en apoptose (Cho *et al.*, 1996). D'autres agents solubles de l'immunité innée agissent directement sur le virus, comme les défensines, qui peuvent entre autres inactiver le VIH par un mécanisme de rupture de la membrane virale (Lama & Planelles, 2007). Les molécules du complément et les MBL (Mannose-Binding Lectin) sont aussi capables d'interagir avec le virus et de l'inactiver (Levy, 2011). Enfin, les cellules de l'immunité innée produisent des chimiokines lors de leur activation. Le VIH ayant besoin de récepteurs aux chimiokines, ces dernières vont donc être des compétiteurs vis-à-vis de la protéine d'enveloppe virale. Par exemple, un taux plasmatique élevé de RANTES a montré un effet protecteur sur la transmission du virus lors d'une étude clinique (Koning *et al.*, 2004).

Les cellules ciblées par le VIH ont de plus des mécanismes de défense intracellulaires. Par exemple, l'enzyme APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like-3G) est une déaminase qui remplace les bases cytosines par des uraciles lors de la rétrotranscription de l'ARN viral, induisant des hypermutations dans l'ADN viral qui devient sensible à la dégradation par des nucléases (Lama & Planelles, 2007). Cependant, la protéine virale Vif inhibe cette enzyme en provoquant sa dégradation, et empêche de plus son incorporation dans les virions néoformés où elle est aussi suspectée d'agir (Strebel, 2007). Les histones déacétylases (HDAC) peuvent réprimer la transcription virale, mais leur action est inhibée par la protéine virale Tat (Lever & Jeang, 2011). Le facteur TRIM5 α se lie à la protéine de la capsid virale (CA) et induirait sa dégradation, directe ou non, *via* un mécanisme inconnu (Lever & Jeang, 2011). Enfin, la protéine tetherin (ou BST) est une

protéine membranaire qui est capable d'empêcher le détachement des virions néoformés en les retenant à la membrane de la cellule hôte. Son action est contrée par Vpu, bien que ce mécanisme de rétention soit profitable dans le cas de transmission virale cellule à cellule, comme le suggère l'observation d'une augmentation de l'expression de tetherin dans des cellules dendritiques immatures infectées (voir § 2.3.2., Coleman *et al.*, 2011).

3.1.1.2. Réponse immunitaire adaptative

La réponse adaptative repose sur la reconnaissance d'antigènes du pathogène, induisant une destruction directe, par exemple des cellules infectées par des lymphocytes T cytotoxiques CD8+, ou indirecte, comme la production d'anticorps (fig. 18A) spécifiques du pathogène par des lymphocytes B. Dans ce dernier cas, l'action immunitaire est effectuée soit par activation du complément, soit par liaison de l'anticorps à une cellule immunitaire *via* des récepteurs aux fragments Fc (FcR, fig. 18B). Il semble d'ailleurs que l'infection par le VIH provoque une diminution des réponses cellulaires dépendantes des anticorps, appelées ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) et ADCP (Antibody-Dependent Cellular



Phagocytosis), par réduction de l'expression membranaire des FcR (Dugast *et al.*, 2011).

Les anticorps dirigés contre le VIH, dits neutralisants, peuvent agir en inhibant la liaison de la protéine d'enveloppe aux récepteurs de la cellule hôte, ou plus tard dans le processus d'entrée du virus, en bloquant l'étape de fusion membranaire (Burton *et al.*, 2004). L'anticorps b12 reconnaît le site de liaison du récepteur CD4 sur la gp120 (fig. 19) et constitue le premier compétiteur de la protéine d'enveloppe virale dans l'ordre des étapes du mécanisme d'entrée du virus (fig. 9). La liaison de CD4 engendrant des modifications conformationnelles de la gp120, de nouvelles régions sont exposées et sont reconnues par des anticorps appelés « CD4-induits », comme l'anticorps 17b qui a aidé à la cristallisation de la gp120 (Kwong *et al.*, 1998). De manière intéressante, plusieurs de ces anticorps possèdent des résidus tyrosine sulfatés qui sont essentiels à leur liaison sur la gp120 (Huang *et al.*, 2007), condition qui est identique à l'interaction de la partie N-terminale de CCR5 à la protéine virale (voir § 2.4.2). Après liaison de CD4, la boucle V3 de la gp120 est accessible et peut être reconnue par d'autres anticorps (ex : 447-52D). Dans le processus d'entrée du virus, une autre région est dévoilée, mais cette fois-ci sur la gp41 (fig. 9). Il s'agit de la région proche de

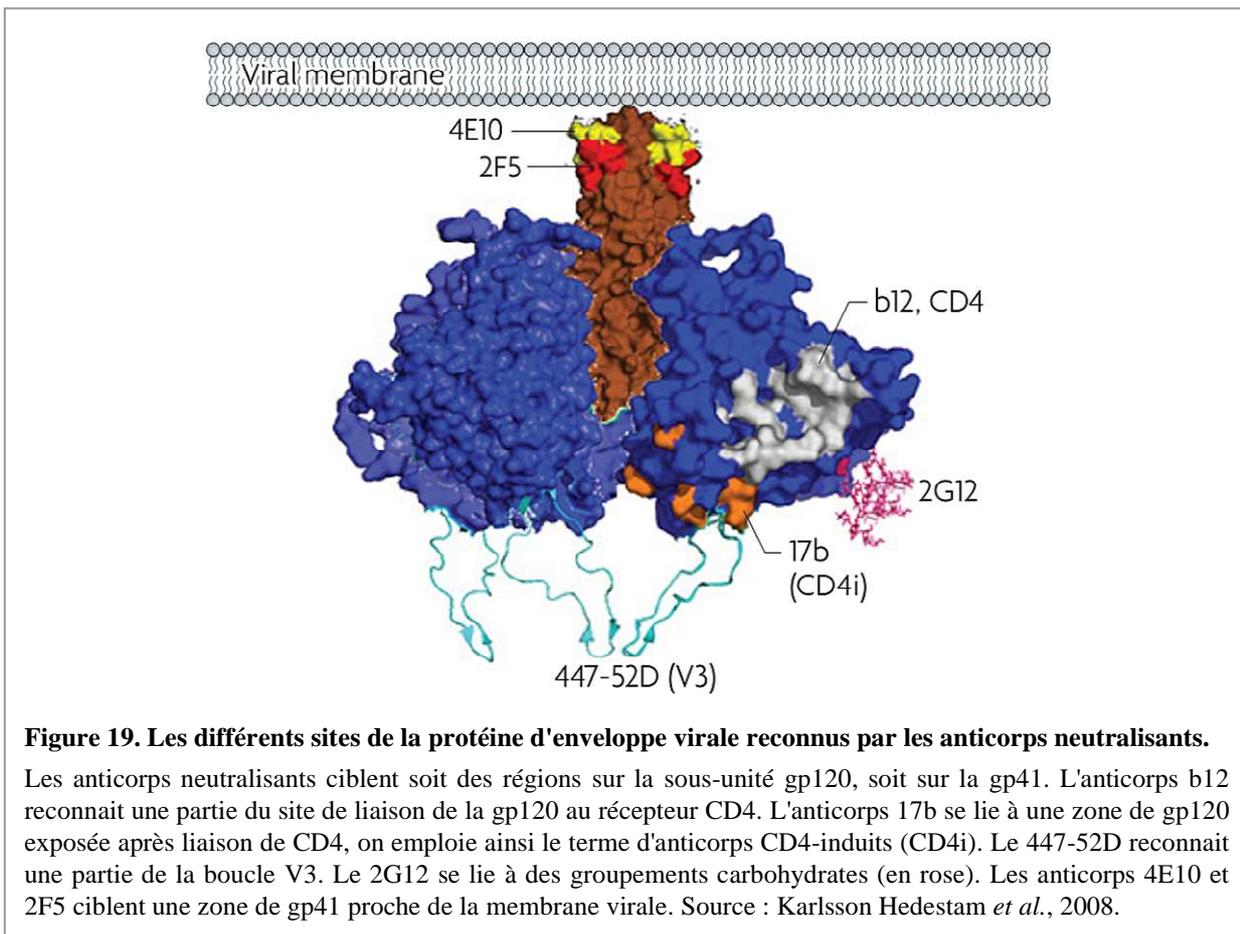


Figure 19. Les différents sites de la protéine d'enveloppe virale reconnus par les anticorps neutralisants.

Les anticorps neutralisants ciblent soit des régions sur la sous-unité gp120, soit sur la gp41. L'anticorps b12 reconnaît une partie du site de liaison de la gp120 au récepteur CD4. L'anticorps 17b se lie à une zone de gp120 exposée après liaison de CD4, on emploie ainsi le terme d'anticorps CD4-induits (CD4i). Le 447-52D reconnaît une partie de la boucle V3. Le 2G12 se lie à des groupements carbohydrateux (en rose). Les anticorps 4E10 et 2F5 ciblent une zone de gp41 proche de la membrane virale. Source : Karlsson Hedestam *et al.*, 2008.

la membrane, et celle-ci est reconnue par les anticorps 2F5 et 4E10 (fig. 19). Par ailleurs, certains anticorps (2909, PG9, PG16) sont capables de se lier sur deux sites présents sur deux sous-unités gp120, et sont seulement spécifiques de la forme trimérique d'Env à la surface des virions (Zolla-Pazner & Cardozo, 2010). Les autres régions de la gp120 sont peu ciblées par les anticorps neutralisants en raison d'une grande densité de glycans peu immunogènes, sauf quelques regroupements d'oligomannoses qui sont reconnus par l'anticorps 2G12 (fig. 19).

Il semble par ailleurs que l'efficacité de ces anticorps neutralisants soit dépendante de plusieurs facteurs, comme par exemple la densité de récepteurs CCR5 à la surface des cellules cibles dans le cas des anticorps CD4-induits ou se liant à la gp41. En effet, ces anticorps ont une activité neutralisante plus importante dans le cas d'une faible quantité de récepteurs CCR5, suggérant que le processus d'entrée du virus est ralenti quand il y a peu de CCR5 disponibles (Choudhry *et al.*, 2006). De plus, les virus qui arrivent à effectuer une transmission mère-enfant ont des gp120 sensibles aux anticorps neutralisants, ce qui indique qu'il existe un mécanisme d'échappement à ce type de défense, qui est d'ailleurs spécifique puisque les séquences d'Env concernées sont conservées (Kishko *et al.*, 2011).

3.1.2. Polymorphismes et infection par le VIH

Certains gènes humains comportent des polymorphismes qui ont un impact sur l'infection par le VIH ou sur l'évolution de la pathologie.

La première découverte concerne l'allèle CCR5 Δ 32, associé à une protection contre l'infection, en particulier pour les individus homozygotes (Liu *et al.*, 1996; Dean *et al.*, 1996). En effet, le gène de CCR5 délété de 32 paires de bases code pour un récepteur tronqué qui n'est pas exprimé à la membrane (Rana *et al.*, 1997). Les individus hétérozygotes survivent plus longtemps (Dean *et al.*, 1996), et il semble qu'un phénomène de dimérisation des deux formes de CCR5 explique que certains récepteurs entiers sont retenus dans les cellules (Benkirane *et al.*, 1997). Cependant, il apparaît que les individus homozygotes ne sont pas totalement protégés du VIH car quelques cas d'infection par des souches virales X4 ont été rapportés, corrélés à une évolution rapide de l'immunodépression (Sheppard *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2008). Une autre mutation, 64I pour le récepteur CCR2, semble aussi impacter sur l'infection par le VIH, mais le mécanisme est inconnu et les données de la littérature suggèrent que les individus portant cette mutation ont seulement des charges virales plus faibles, sans corrélation nette avec un ralentissement de la maladie (Michael *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997).

Par ailleurs, certains individus, appelés « élite contrôleurs » (ou LTNP pour Long Term Non Progressors), possèdent la faculté de contrôler la réplication virale en maintenant un nombre de copies d'ARN viral inférieur à 50/ml pendant plusieurs années sans aucune thérapie. Leur profil a été corrélé aux allèles B27 et B57 de molécules HLA, leur conférant une immunité médiée par les cellules T accrue (Lewin & Rouzioux, 2011). Cependant, cette association polymorphique n'est pas exclusive, suggérant l'existence d'autres mécanismes de contrôle. Par exemple, 24% d'entre-eux développent des anticorps anti-CCR5 qui induisent l'internalisation du récepteur (Lama & Planelles, 2007). D'autres polymorphismes concernent par exemple les chimiokines, comme RANTES (gènes -403A / -28G), mais ces autres cas ne seront pas détaillés ici (voir la revue Levy, 2009).

La fréquence d'apparition de ces polymorphismes varie en fonction des populations, mais reste toujours trop faible pour ne pas avoir à recourir à une thérapie pour la majorité des individus.

3.2. Moyens thérapeutiques

3.2.1. Thérapies actuelles

La première molécule anti-VIH a été approuvée par les autorités sanitaires en 1987 : il s'agit de la zidovudine ou AZT (tab. 1). Depuis, 25 autres molécules se sont rajoutées. Elles sont réparties en six classes (leur nombre est indiqué entre parenthèses) :

- inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (8 NRTIs dont l'AZT, pour Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors),
- inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (5 NNRTIs, pour NonNucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors),
- inhibiteurs de la protéase (10),
- inhibiteurs de l'intégrase (1),
- inhibiteurs de la fusion (1),
- inhibiteurs de l'entrée virale (1).

Les NRTIs sont des analogues nucléosidiques ou nucléotidiques qui inhibent la transcriptase inverse en se liant à son site catalytique, au contraire des NNRTIs qui interagissent avec un site allostérique sur cette même enzyme, situé très proche du site catalytique (De Clercq, 2009). Au contraire des NNRTIs qui peuvent agir sans modification, les NRTIs doivent être phosphorylés dans la cellule pour devenir actifs. Par exemple, le tenofovir (tab. 1, le TDF est la forme orale), qui est le médicament le plus prescrit contre le

Tableau 1. Médicaments anti-VIH approuvés par la fédération américaine des aliments et drogues (FDA).

Liste des 25 médicaments contre le VIH approuvés par la FDA jusqu'à aujourd'hui, triés par date d'approbation.
Adapté de : Karlsson Hedestam *et al.*, 2008.

Nom de la molécule	Nom commercial	Fabricant	Date d'approbation FDA
Zidovudine 	Retrovir	GlaxoSmithKline	mars 1987
Didanosine 	Videx (tablet)	Bristol-Myers Squibb	oct 1991
	Videx EC (capsule)	Bristol-Myers Squibb	oct 2000
Zalcitabine 	Hivid	Hoffmann-La Roche	juin 1992
Stavudine 	Zerit	Bristol-Myers Squibb	juin 1994
Lamivudine 	Epivir	GlaxoSmithKline	nov 1995
Saquinavir 	Invirase (hard gel capsule)	Hoffmann-La Roche	déc 1995
	Fortovase (soft gel capsule)	Hoffmann-La Roche	nov 1997
Ritonavir 	Norvir	Abbott Laboratories	mars 1996
Indinavir 	Crixivan	Merck	mars 1996
Nevirapine 	Viramune	Boehringer Ingelheim	juin 1996
Nelfinavir 	Viracept	Agouron Pharmaceuticals	mars 1997
Delavirdine 	Rescriptor	Pfizer	avr 1997
Efavirenz 	Sustiva (USA)	Bristol-Myers Squibb	sept 1998
	Stocrin (Europe)	Merck	sept 1998
Abacavir 	Ziagen	GlaxoSmithKline	déc 1998
Amprenavir 	Agenerase	GlaxoSmithKline	avr 1999
Lopinavir + ritonavir 	Kaletra	Abbott Laboratories	sept 2000
	Aluvia (developing world)	Abbott Laboratories	sept 2000
Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) 	Viread	Gilead Sciences	oct 2001
Enfuvirtide 	Fuzeon	Hoffmann-La Roche & Trimeris	mars 2003
Atazanavir 	Reyataz	Bristol-Myers Squibb	juin 2003
Emtricitabine 	Emtriva	Gilead Sciences	juil 2003
Fosamprenavir 	Lexiva (USA)	GlaxoSmithKline	oct 2003
	Telzir (Europe)	GlaxoSmithKline	oct 2003
Tipranavir 	Aptivus	Boehringer Ingelheim	juin 2005
Darunavir 	Prezista	Tibotec, Inc.	juin 2006
Maraviroc 	Celsentri (Europe)	Pfizer	sept 2007
	Selzentry (USA)	Pfizer	sept 2007
Raltegravir 	ISENTRESS	Merck & Co., Inc.	oct 2007
Etravirine 	Intelence	Tibotec Therapeutics	janv 2008
Rilpivirine 	Edurant	Tibotec Therapeutics	mai 2011

VIH, est un analogue nucléotidique qui est diphosphorylé et agit comme un terminateur de chaîne d'ADN lorsqu'il est incorporé pendant la rétrotranscription. Parmi les NNRTIs, l'etravirine et la rilpivirine, une molécule récemment approuvée par les autorités sanitaires américaines (FDA, pour Food and Drug Administration), ne sont pas sensibles à certaines mutations (K103N, Y181C) au niveau du site allostérique de la transcriptase inverse, comme le sont les autres membres de cette classe de médicaments.

A l'exception du tipranavir, les inhibiteurs de protéases sont tous des peptidomimétiques car ils contiennent un groupement hydroxyéthylène qui mime la liaison peptidique clivée par la protéase en temps normal. Le tipranavir est lui basé sur la structure de la coumarine pour

bloquer la protéase. L'introduction en 1995 des anti-protéases dans l'arsenal thérapeutique marque un tournant décisif dans le traitement des patients séropositifs, réduisant énormément le taux de mortalité. On parle alors d'une tri-thérapie ou d'un traitement anti-rétroviral hautement actif (HAART, pour Highly Active Antiretroviral Combination Therapy), où deux NRTIs sont associés avec un inhibiteur de protéase (ou parfois un NNRTI).

La survie des patients fait cependant apparaître des complications après plusieurs années de traitement, comme l'inhibition de la polymérase d'ADN mitochondriale par des NRTIs (Patrick, 2006). De nombreux efforts sont réalisés pour créer de nouvelles molécules, en particulier de nouvelles classes de médicaments. Ainsi, il existe à l'heure actuelle des inhibiteurs de l'entrée du VIH approuvés pour une utilisation thérapeutique. L'enfuvirtide, ou T20, est un peptide synthétique dont la séquence est très proche de la région HR2 de la gp41, et qui empêche la fusion membranaire en jouant le rôle de compétiteur pour la région HR1 de la gp41 (voir § 2.2.1, Tilton & Doms, 2010). Le maraviroc est quant à lui un antagoniste allostérique de CCR5, se liant dans une poche hydrophobe du récepteur, modifiant la conformation des boucles extracellulaires, ce qui inhibe la liaison de la gp120 à CCR5. D'autres molécules du même type qui étaient prometteuses, l'aplaviroc et le vicriviroc, n'ont cependant pas abouti en phases d'essais cliniques pour cause d'hépatotoxicité et de trop faible activité par rapport à un traitement de référence (Gathe, 2010), respectivement. Le désavantage de ces inhibiteurs est qu'ils s'avèrent intéressants seulement pour lutter contre des souches virales R5. Des efforts sont effectués pour essayer d'obtenir un inhibiteur du récepteur CXCR4 efficace, non toxique et biodisponible oralement (Tilton & Doms, 2010). Enfin, un inhibiteur de l'intégrase, le raltegravir, est capable d'empêcher la réaction de transfert de brin d'ADN dans le génome de la cellule hôte. Une autre molécule agissant de la même manière, l'elvitegravir, est actuellement en phase clinique de type III, et pourrait remplacer le raltegravir car elle nécessite une prise deux fois moins fréquente.

Bien qu'il existe de nombreux médicaments ciblant différentes étapes du cycle viral du VIH, les souches virales observées chez les populations séropositives montrent des capacités de résistance aux molécules appartenant aux classes décrites ici. De plus, aucune molécule ou combinaison de molécules ne permet d'éradiquer le virus de l'organisme des patients. Il est donc nécessaire de comprendre la raison des échecs précédents et de réfléchir à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

3.2.2. Nouvelles approches

Beaucoup de nouvelles approches sont actuellement explorées, c'est pourquoi cette partie ne traitera que de quelques exemples.

3.2.2.1. Eliminer les réservoirs

Comme il l'a été décrit dans les paragraphes précédents, le virus est capable de s'intégrer au génome de cellules dans de multiples endroits de l'organisme et de rester dans un état latent où la réplication est peu active (tissus réservoirs, § 1.5./2.2./2.3.1), échappant à la reconnaissance par le système immunitaire. L'idée serait donc de forcer la production virale dans toutes les cellules pour rendre le virus « visible » des défenses du patient, mais aussi des molécules anti-VIH. Par exemple, étant donné que les HDAC inhibent la réplication virale, il serait intéressant de tester la combinaison d'un inhibiteur d'HDAC avec une thérapie antirétrovirale existante (Matalon *et al.*, 2011), même si un risque d'activation d'autres virus intégrés est envisagé (Lewin & Rouzioux, 2011).

3.2.2.2. Limiter l'activation immunitaire

Le système immunitaire est maintenu constamment activé chez les patients séropositifs, phénomène qui favorise son dysfonctionnement et sa destruction (Boasso & Shearer, 2008). En particulier, la cyclooxygénase de type 2 (COX-2) joue un rôle dans cette activation chronique, et des résultats cliniques intéressants ont été obtenus avec un inhibiteur de COX-2, le celecoxib (Pettersen *et al.*, 2011).

3.2.2.3. Transplantation autologue de cellules résistantes au VIH

En 2009, un patient séropositif traité sous HAART depuis 10 ans, a été traité pour une leucémie sévère par allogreffe de moelle osseuse, d'un donneur homozygote CCR5 Δ 32, suite à quoi il est devenu « élite contrôleur » vis-à-vis du VIH (Hütter *et al.*, 2009). Cette réussite montre qu'une stratégie similaire est envisageable, comme rendre des cellules immunitaires résistantes au VIH et les transplanter au patient de manière autologue par exemple. Dans ce but, des chercheurs ont réussi à inhiber l'expression de CCR5 (Holt *et al.*, 2010) ou de CXCR4 (Wilen *et al.*, 2011) à la membrane de cellules hématopoïétiques *via* l'expression de nucléases à doigt de zinc, chez des souris humanisées. Dans le cas de CCR5, une étude clinique présentée à la CROI (Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections) en 2011 a montré que ce type de transplantation était bien tolérée (Lalezary, 2011).

3.2.2.4. Stratégie vaccinale

Une autre approche consiste à aider les défenses de l'organisme à développer une réponse spécifique du VIH, par l'intermédiaire d'un immunogène adéquat. Etant donné qu'un grand nombre d'anticorps neutralisants sont dirigés contre la gp120 liée à CD4, il serait possible de réaliser un complexe gp120-CD4. Cependant, l'utilisation de CD4 soluble est proscrite car elle est susceptible de provoquer des réactions auto-immunes. C'est pourquoi une équipe a synthétisé un mimétique de CD4 non immunogène, couplé covalamment à la gp120, qui s'avère efficace pour immuniser des lapins (Martin *et al.*, 2011). Cette stratégie n'a pas encore été testée chez l'homme.

3.2.2.5. Inhibiteurs de la liaison du virus aux récepteurs

Hormis la stratégie vaccinale, il est possible d'inhiber la liaison de la protéine d'enveloppe virale aux différents récepteurs ciblés. Les molécules chimiques se liant au site de liaison de CD4 sur la gp120 sont des candidats intéressants. A titre d'exemple, la molécule BMS-488043 se lie à la gp120 et induit des changements conformationnels différents de ceux induits par CD4, expliquant son pouvoir inhibiteur sur l'infection virale (Da *et al.*, 2011). Les études cliniques sur ce produit montrent de plus qu'il est bien toléré (Hanna *et al.*, 2011). Dans le cas des inhibiteurs du corécepteur CCR5, quelques souches virales ont rapidement montré une résistance à la molécule maraviroc (Westby *et al.*, 2007), seul médicament approuvé à l'heure actuelle, indiquant qu'il est important de connaître le mode d'action des molécules pour prédire leur efficacité à long terme. C'est pourquoi d'autres approches sont testées, comme l'utilisation d'anticorps anti-CCR5. A ce titre, des résultats cliniques prometteurs ont été obtenus pour le candidat PRO 140, un anticorps monoclonal humanisé anti-CCR5 administré par voie sous-cutanée (Tenorio, 2011).

Une meilleure connaissance des processus moléculaires mis en jeu à la membrane de la cellule hôte lors de l'accrochage et de l'entrée du VIH serait bénéfique à la mise au point de nouveaux inhibiteurs de la liaison de la gp120 aux récepteurs. C'est pourquoi il est nécessaire de faire quelques rappels sur la composition d'une membrane plasmique et sur ses fonctions biologiques.

4. La membrane plasmique, lieu d'entrée du virus et début du cycle viral

4.1. La membrane plasmique

4.1.1. Découverte des membranes cellulaires

Les premières notions de membrane cellulaire remontent aux travaux de Robert Hooke, au XVII^e siècle, observant de grosses cellules végétales à l'aide de l'un des tous premiers microscopes. Vient ensuite la « théorie cellulaire » de Theodor Schwann, en 1839, qui explique que tous les végétaux et animaux sont des assemblages d'une même unité, la cellule, qui est alors vue comme un petit sac rempli de structures dont fait partie le noyau. Il s'en suit de nombreux travaux cherchant à caractériser les organites présents au sein de la cellule. Les techniques de microscopie optique finirent par atteindre leur limites, mais la mise au point du contraste de phase en 1940 permit de nouvelles observations. De plus, deux techniques développées à la même période, l'ultracentrifugation différentielle et la microscopie électronique, furent utilisées pour séparer les composants cellulaires et les étudier un à un avec plus de précision.

4.1.2. Composition de la membrane plasmique

Les membranes des différents compartiments cellulaires partagent de nombreux éléments en commun que sont les lipides et les protéines. Nous allons ici nous focaliser en particulier sur les constituants de la membrane plasmique.

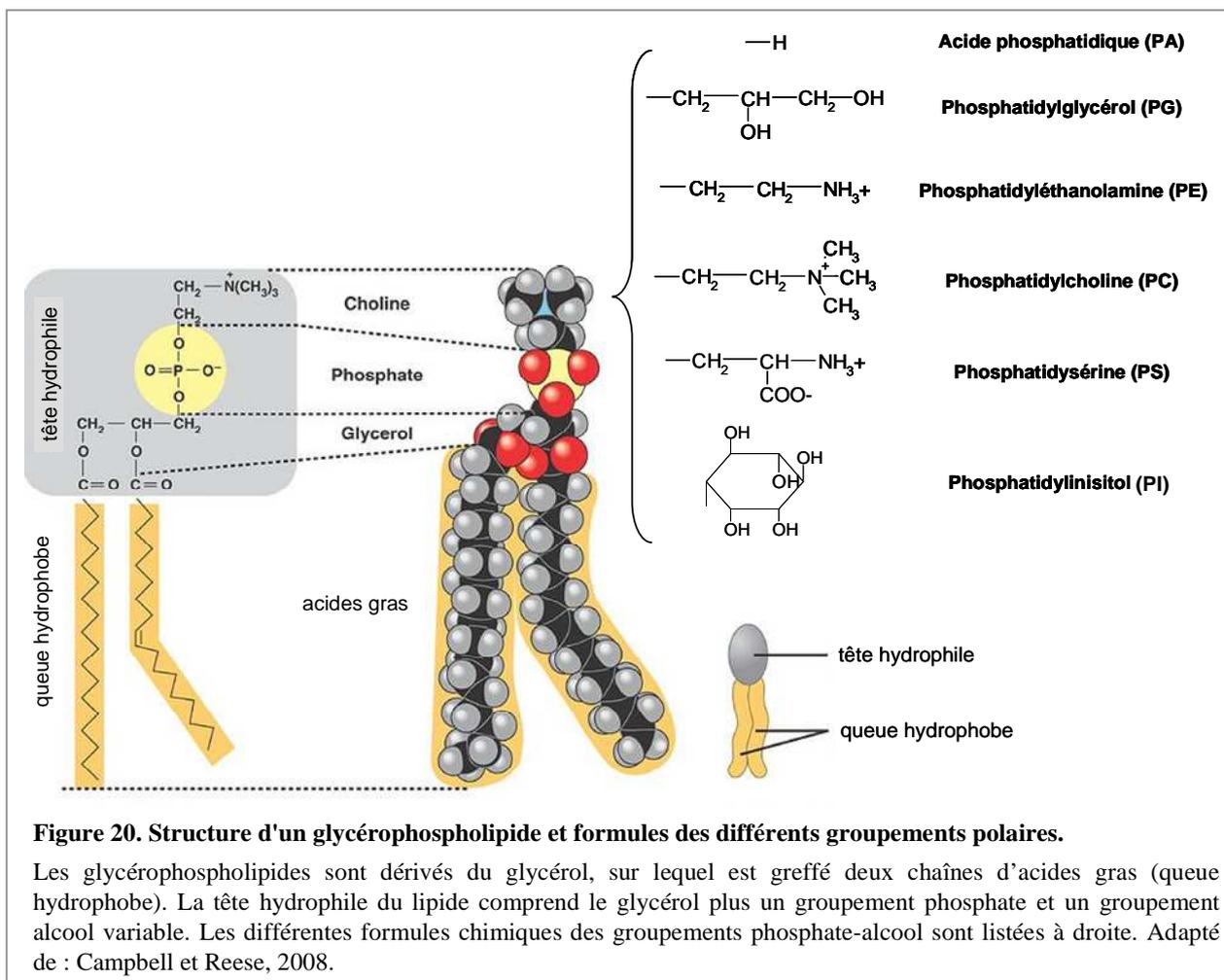
4.1.2.1. Lipides membranaires

Les lipides membranaires sont des molécules amphiphiles, composées d'une partie hydrophobe formée par un groupement aromatique ou aliphatique (acide gras), et d'une tête hydrophile dont le groupement est très variable. La partie hydrophobe constitue le cœur de la bicouche lipidique.

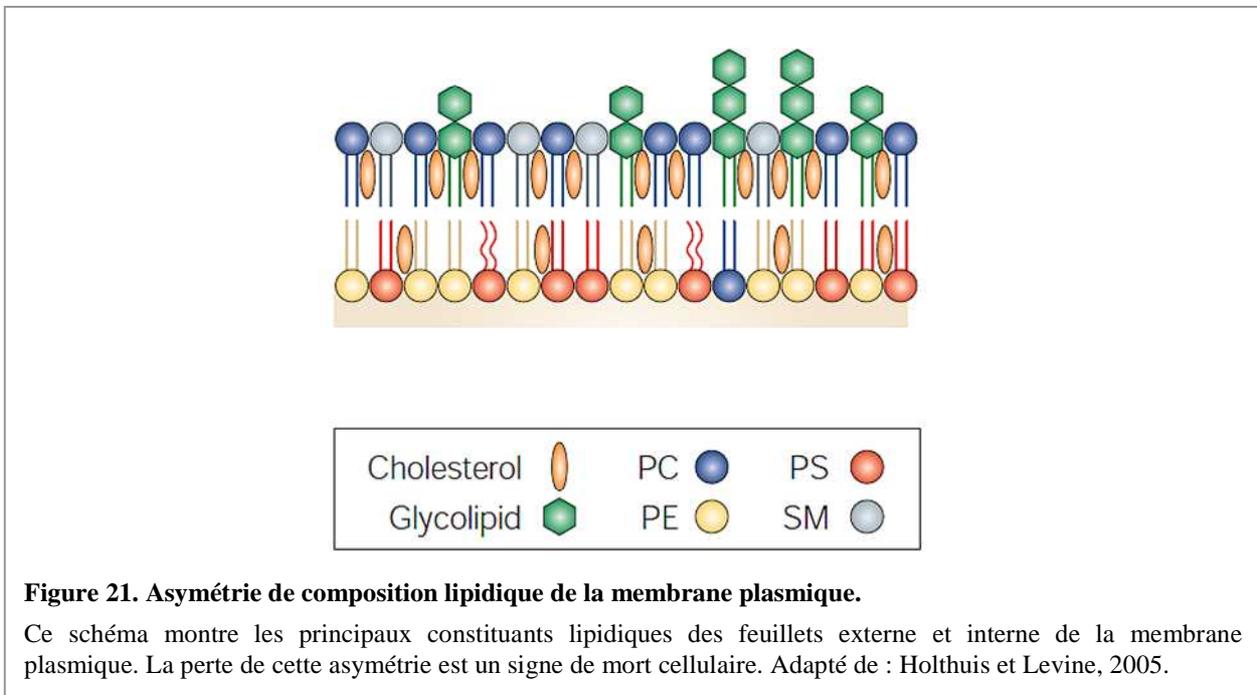
Il existe trois grandes familles de lipides membranaires : les glycérolipides, les sphingolipides et les stérols. Les deux premières familles de lipides sont des dérivés du glycérol et de la sphingosine, respectivement, sur lesquels est greffé soit un sucre, soit un groupement phosphate. On obtient ainsi des glycéroglycolipides ou des glycérophospholipides, et des sphingoglycolipides ou des sphingophospholipides. Il existe par ailleurs un sphingolipide simple, c'est-à-dire sans sucre ou groupement phosphate, très proche de la sphingosine : le céramide.

Parmi les sphingophospholipides, on ne distingue qu'un seul représentant chez les mammifères : la sphingomyéline (SM). A l'opposé, les glycérophospholipides sont majoritairement représentés. Les proportions de ces différents lipides, classés selon leur tête hydrophile (fig. 20), sont cependant bien différentes selon les feuillets de la membrane plasmique (fig. 21).

La phosphatidylsérine (PS), la phosphatidyléthanolamine (PE) et le phosphatidylinositol (PI) sont présents principalement dans le feuillet interne de la membrane, alors que la phosphatidylcholine (PC) est retrouvée dans les deux feuillets, avec une préférence pour le feuillet externe. La SM est quant à elle exclusivement présente dans le feuillet externe (Shechter & Rossignol, 2004). L'acide phosphatidique (PA) est peu représenté dans la membrane plasmique. Cette asymétrie est maintenue grâce à des protéines spécifiques (Pomorski *et al.*, 2001), et la perte de cette distribution est un marqueur d'apoptose cellulaire (Vanags *et al.*, 1996; Brand & Yavin, 2001).



La famille des stérols ne possède qu'un seul représentant dans la membrane des cellules des eucaryotes supérieurs : le cholestérol. Il constitue par contre le lipide le plus abondant, soit environ 30 % en moles de l'ensemble des lipides d'une cellule, et il est présent dans les deux feuillets de la membrane plasmique (fig. 21).



4.1.2.2. Protéines membranaires

Les protéines représentent 50 % en masse des constituants membranaires. Il existe deux catégories de protéines membranaires, définies selon leur mode d'association à la membrane. Les protéines intrinsèques sont ancrées dans la bicouche lipidique grâce à une partie hydrophobe, qui est dite transmembranaire lorsqu'elle traverse complètement les deux feuillets membranaires (fig. 22). Il peut exister au sein d'une même protéine plusieurs domaines de ce type, ayant des structures secondaires en hélices α ou feuillets β . Pour les protéines liées aux lipides *via* un acide gras, leur association membranaire peut être régulée par clivage de cette ancre lipidique, qui pourra ensuite être à nouveau greffée. De manière générale, il faut utiliser un détergent pour les extraire de la membrane. Les protéines extrinsèques sont liées à la membrane *via* des interactions faibles, soit de nature électrostatique, soit par l'intermédiaire de protéines transmembranaires (fig. 22). Ces liaisons peuvent être rompues facilement, en faisant varier la force ionique par exemple.

Ces différentes protéines remplissent des rôles très variés, importants à la fois dans le maintien de la membrane et la signalisation cellulaire : protéines de structure, de transport, enzymes, récepteurs, etc. (Leterrier & Gary-Bobo, 1989) .

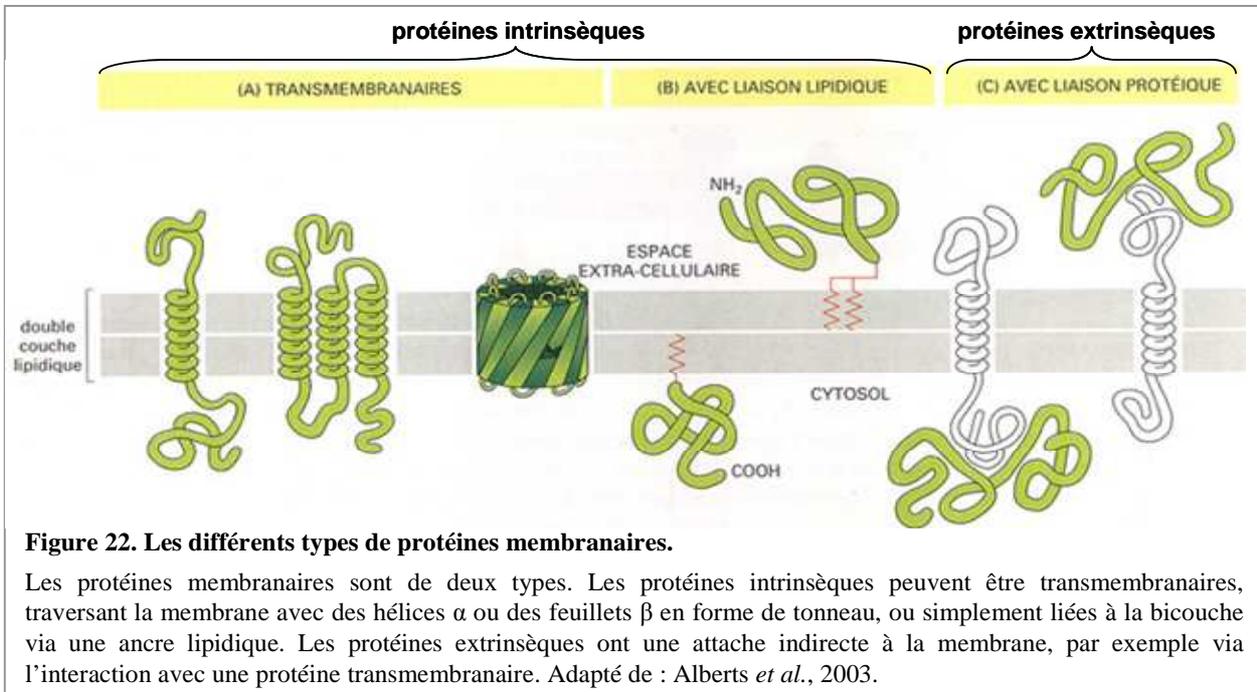


Figure 22. Les différents types de protéines membranaires.

Les protéines membranaires sont de deux types. Les protéines intrinsèques peuvent être transmembranaires, traversant la membrane avec des hélices α ou des feuillets β en forme de tonneau, ou simplement liées à la bicouche via une ancre lipidique. Les protéines extrinsèques ont une attache indirecte à la membrane, par exemple via l'interaction avec une protéine transmembranaire. Adapté de : Alberts *et al.*, 2003.

4.1.2.3. Le glycocalyx

Des polymères de groupements osidiques sont greffés côté extracellulaire à certains lipides et protéines membranaires (fig. 23). Ces chaînes de sucres forment à la surface de la cellule un « tapis » de sucres appelé glycocalyx, visualisable en microscopie électronique lorsqu'il est suffisamment épais (fig. 24). Son épaisseur est régulée par des enzymes sécrétées par la cellule. Il joue un rôle de protection, intervient dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire, mais aussi dans les processus infectieux.

4.1.3. Evolution du modèle de la membrane plasmique

Le premier modèle de membrane plasmique propose que les cellules, en particulier les globules rouges, sont délimités par une simple bicouche de phospholipides (Gorter & Grendel, 1925). Par comparaison de la tension superficielle d'un système modèle lipide-eau avec celle d'une membrane biologique, Davson et Danielli indiquent plus tard que des protéines entourent cette membrane (Danielli & Davson, 1935). La manière dont elles interagissent avec les lipides est ensuite redéfinie par divers modèles membranaires, et ce

n'est qu'en 1970 que la technique de cryofracture apporte la preuve que des protéines sont enchâssées dans la membrane plasmique (Bayer & Remsen, 1970). Au même moment, Frye

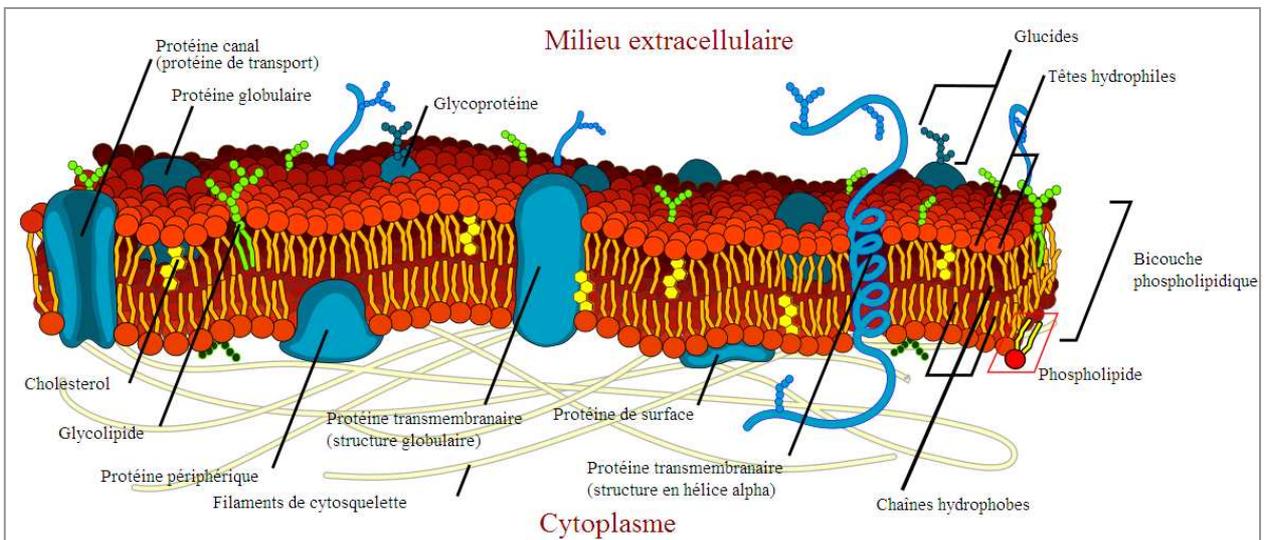


Figure 23. Schéma de la membrane plasmique.

La membrane plasmique est composée de lipides et de protéines. Parmi les lipides, on distingue les phospholipides des glycolipides, mais aussi du cholestérol. Chacun possède une partie hydrophile et une autre hydrophobe, qui compose le cœur de la bicouche lipidique. Les protéines peuvent avoir différentes formes, intégrées partiellement ou transmembranaires, ou bien encore en interaction avec la surface de la membrane. La membrane plasmique expose côté extracellulaire de nombreux groupements osidiques qui composent un "manteau" appelé glycocalyx (voir fig. 24). Enfin, elle est en interaction avec un cytosquelette, d'actine principalement, côté intracellulaire. Source : Wikimedia Commons.

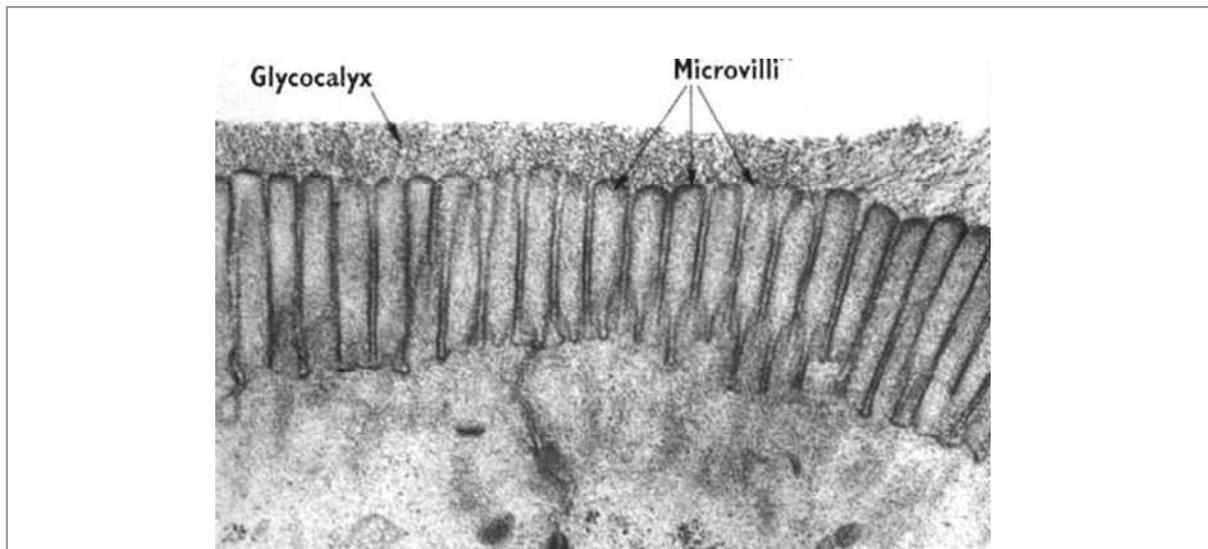


Figure 24. Cliché de microscopie électronique à transmission d'une cellule épithéliale et de son glycocalyx.

Les cellules épithéliales de l'intestin présentent de nombreuses extensions membranaires, les microvilli, sur leur face apicale donnant sur la lumière intestinale. Le glycocalyx, qui est une couche de polyholosides tapissant la surface de ces cellules, est particulièrement épais au niveau de certains tissus épithéliaux, formant une véritable barrière biologique. Source : Bloom et Fawcett, 1994.

et Edidin montrent que les constituants membranaires sont mobiles, faisant évoluer le concept de membrane rigide vers un modèle dynamique (Frye & Edidin, 1970). En 1972, Singer et Nicolson proposent le célèbre modèle de mosaïque fluide, expliquant que les protéines diffusent librement dans une bicouche fluide de lipides (Singer & Nicolson, 1972). Ils opposent deux types de protéines, que sont les protéines extrinsèques aux protéines intrinsèques, sur la base de leur extractibilité (voir § 4.1.2).

Même si ce dernier modèle est la base des schémas modernes de membrane plasmique (fig. 23), l'observation de la diffusion limitée de certains constituants membranaires suggère que la diffusion membranaire peut être contrainte. Par exemple, la technique de retour de fluorescence après photodégradation (ou FRAP pour Fluorescence Recovery After Photobleaching) permet de démontrer que les canaux sodiques voltage-dépendants ont une diffusion contrainte dans certaines zones de la surface de cellules nerveuses (Angelides *et al.*, 1988). Ainsi, de nombreux travaux vont petit à petit apporter la preuve de l'existence de domaines membranaires, faisant évoluer le modèle de la membrane plasmique vers une représentation où la diffusion de chaque constituant, lipidique ou protéique, est finement régulée par association préférentielle avec de multiples partenaires. On peut donc concevoir la membrane d'une cellule comme une « mer » de lipides dense en protéines, présentant des compartimentations de plusieurs nanomètres à plusieurs micromètres, le tout fluctuant rapidement dans le temps (Engelman, 2005; Marguet *et al.*, 2006).

4.2. Les domaines membranaires

4.2.1. Origines moléculaires

Si le modèle de la membrane plasmique a grandement évolué, les origines ainsi que les caractéristiques dynamiques des domaines qui la constituent sont toujours largement débattus de nos jours. Les différentes origines sont détaillées ci-après.

4.2.1.1. Radeaux lipidiques

La découverte de fractions de membrane résistantes aux détergents (DRM, pour Detergent Resistant Membrane) donne l'occasion d'isoler et d'étudier ce qui semble être des domaines membranaires (Simons & Ikonen, 1997). L'isolation de ces DRM a donné naissance au nom « radeaux lipidiques » ou « rafts », car les fractions correspondantes flottent au dessus du reste de la membrane lors d'une séparation par gradient de saccharose. L'analyse de leur composition révèle qu'ils sont enrichis en cholestérol et en sphingolipides, dont la sphingomyéline (fig. 25). Ce mélange est caractéristique de la phase liquide ordonnée, phase

structurée où l'interaction entre les parties hydrophobes des lipides a pour conséquence une

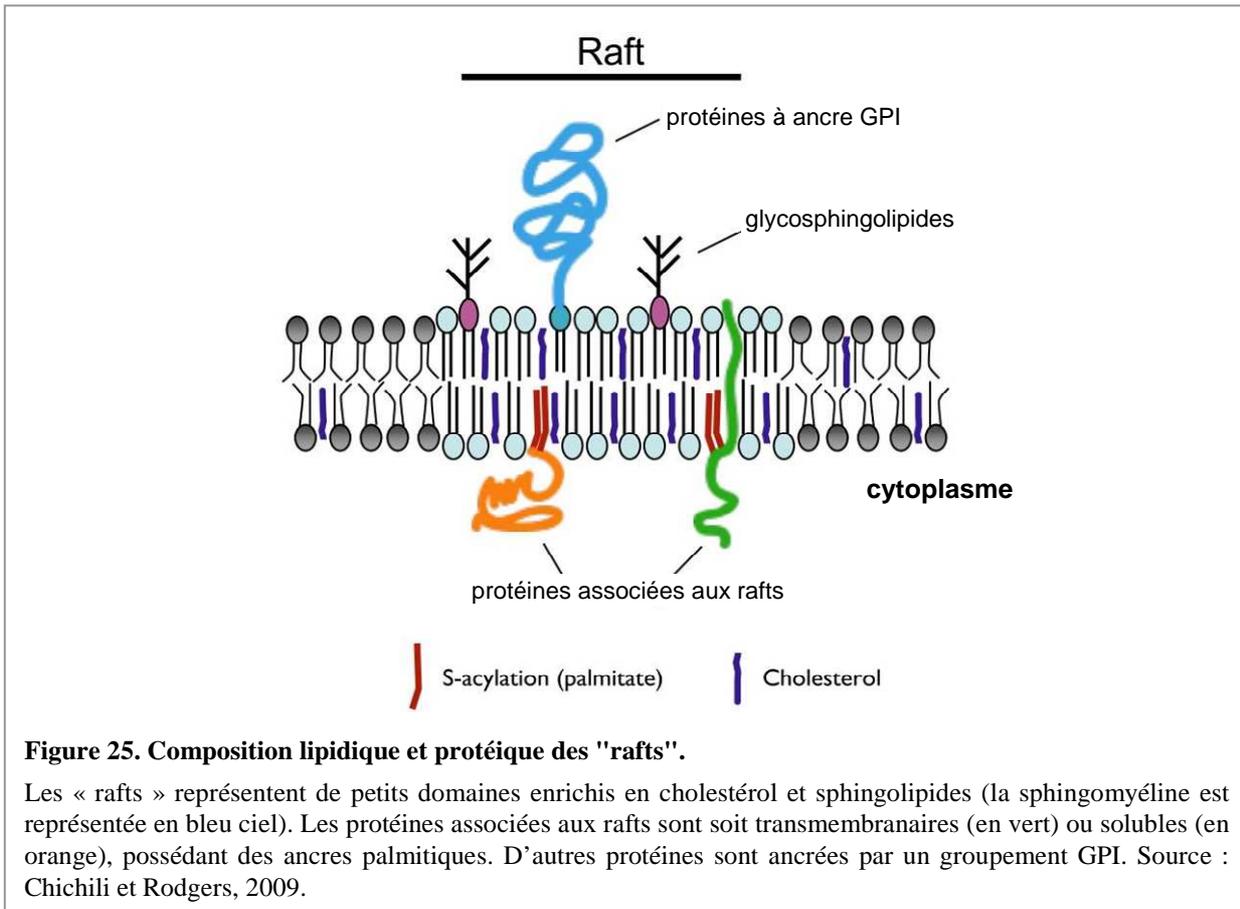


Figure 25. Composition lipidique et protéique des "rafts".

Les « rafts » représentent de petits domaines enrichis en cholestérol et sphingolipides (la sphingomyéline est représentée en bleu ciel). Les protéines associées aux rafts sont soit transmembranaires (en vert) ou solubles (en orange), possédant des ancres palmitiques. D'autres protéines sont ancrées par un groupement GPI. Source : Chichili et Rodgers, 2009.

fluidité membranaire réduite, en opposition avec la phase liquide désordonnée, aussi appelée phase fluide. De plus, le fait que la proportion d'acides gras saturés soit plus grande dans les DRM entraîne une augmentation locale de l'épaisseur membranaire. Ceci a pour conséquence de générer un tri protéique sur le principe de l'appariement hydrophobe (Mouritsen & Bloom, 1984). En effet, les protéines possédant de longues régions hydrophobes seront préférentiellement entourées par des lipides ayant de longues chaînes, et vice versa. Ce phénomène a été étudié en particulier pour le cholestérol (Kaiser *et al.*, 2011). Différents types de protéines sont associées aux DRM (fig. 25) : les protéines à ancre GPI (GlycosylPhosphatidyl Inositol) (Brown & Rose, 1992), les protéines palmitoylées transmembranaires, comme la protéine LAT (Zhang *et al.*, 1998), ou solubles comme les protéines G (Song *et al.*, 1997; Melkonian *et al.*, 1999).

Il faut cependant rappeler que l'extraction des DRM est une méthode invasive qui peut induire des changements non représentatifs de l'état naturel des membranes. Il a été proposé à ce titre que les DRM étaient le résultat de la coalescence de petits domaines membranaires induite par le détergent employé (Giocondi *et al.*, 2000). Il semble de plus que la nature du

détergent ou le type de protocole employé influence la composition des DRM (Simons & Toomre, 2000). Enfin, les études sur cellules vivantes reposent souvent sur l'emploi des Méthyl- β -CycloDextrines (M β CD) qui permettent d'extraire le cholestérol de la membrane plasmique. Sachant que le cholestérol est le lipide majoritaire, que les résultats sont souvent contradictoires et que le cytosquelette semble se réorganiser après un tel traitement (Hering *et al.*, 2003), il convient d'évaluer avec précaution les données obtenues par cette approche.

Cela indique que les fractions de DRM obtenues biochimiquement ne correspondent pas forcément aux domaines enrichis en cholestérol et sphingolipides appelés « rafts », qui existent dans la membrane de cellules. L'utilisation de techniques d'observations non invasives, comme la microscopie optique ou électronique, a apporté la preuve de l'existence d'une telle hétérogénéité membranaire dans divers contextes biologiques (Simons & Toomre, 2000), sans pour autant permettre la visualisation directe de « rafts », en dépit des progrès récents d'imagerie à haute résolution (Mueller *et al.*, 2011). Une définition des « rafts » a toutefois été établie lors du « *Symposium on lipid rafts and cell function* » en 2006 : « *Membrane rafts are small (10-200 nm), heterogeneous, highly dynamic, sterol- and sphingolipid-enriched domains that compartmentalize cellular processes. Small rafts can sometimes be stabilized to form larger platforms through protein-protein or protein-lipid interactions.* » (Pike, 2006). Ces deux phrases reflètent le fait que nous ayons peu d'informations sur ces domaines, et donc que l'interprétation de résultats relatifs à leur étude doit être réalisée avec précaution.

4.2.1.2. Compartimentation impliquant le cytosquelette

Le cytosquelette d'actine cortical est un réseau protéique ramifié, sous-jacent à la membrane plasmique. Son implication dans la régulation dynamique membranaire repose sur trois types d'actions : la stabilisation de domaines pré-existants, la délimitation de compartiments (assimilés à des enclos), et l'interaction directe avec certains constituants pour une diffusion orientée.

Nous avons vu que les radeaux lipidiques se formaient probablement selon les principes de séparation de phase et de l'appariement hydrophobe. Plusieurs travaux suggèrent cependant que les protéines associées aux rafts ont un rôle important dans la formation et la stabilisation des lipides au sein de ces domaines, et ceci par l'intermédiaire du cytosquelette d'actine (Viola & Gupta, 2007; Chichili & Rodgers, 2009). En effet, plusieurs protéines liées à l'actine servent de lien avec les composants membranaires, comme par exemple la taline et la vinculine qui ont la faculté de se lier à des intégrines au sein des rafts. L'implication du

réseau d'actine est aussi révélée par traitement avec la latrunculine B, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, qui induit une diminution du confinement de marqueurs spécifiques des rafts (Mueller *et al.*, 2011).

Le cytosquelette sous-cortical peut intervenir différemment dans la compartimentation de la membrane, en créant des barrières à la diffusion des lipides et protéines membranaires. Ce modèle propose que les filaments d'actine, les barrières, sont ancrés à la membrane *via* une interaction avec des protéines membranaires, formant des piquets, pouvant ainsi contraindre la diffusion de constituants dans les deux feuillettes membranaires (modèle « anchored-protein picket », Suzuki *et al.*, 2005). Cependant, cette modélisation n'exclut pas le franchissement de ces délimitations, et autorise ainsi des diffusions à longue distance *via* des sauts entre compartiments.

Enfin, certains mouvements observés à la surface de la membrane montrent une orientation particulière : on parle alors de diffusion dirigée. Quelques travaux ont montré que ce type de déplacement pouvait être corrélé au cytosquelette d'actine, *via* des mécanismes actifs, en particulier pour une intégrine (Schmidt *et al.*, 1993) et pour un RCPG spécifique d'un neurotransmetteur (Serge *et al.*, 2003). Il faut cependant rester prudent quant à l'analyse de mouvements dirigés et effectuer les expériences contrôles nécessaires pour vérifier le lien avec le cytosquelette.

Il est intéressant de constater que dans certains cas, d'autres protéines que l'actine ou la tubuline peuvent former un réseau ramifié sous-membranaire, comme la gephyrine qui est présente dans la zone postsynaptique de synapses inhibitrices de neurones, et qui est responsable de l'accumulation de récepteurs à la glycine au niveau synaptique (Calamai *et al.*, 2009).

4.2.1.3. Interactions protéines-protéines

Des travaux menés dans notre équipe ont montré que certains mouvements membranaires complexes combinent des mouvements rapides et confinés sur des temps courts, et lents et aléatoires sur des temps longs. Ce type de diffusion ne pouvait pas être expliqué par le modèle de compartimentation avec « des barrières et des piquets » (Daumas *et al.*, 2003). Ces observations ont été modélisées avec succès en considérant des interactions à longue distance entre les protéines (à opposer aux contacts interprotéiques directs). Ainsi, le confinement des protéines est dû à leur attractivité mutuelle, et l'ensemble peut diffuser aléatoirement dans la membrane sur des temps longs. Ce type d'analyse sera présenté de manière concrète dans le prochain chapitre.

Les origines de formation de domaines membranaires impliquent donc les composants membranaires eux-mêmes, ainsi que les protéines sous-membranaires. De plus, la matrice extracellulaire semble pouvoir réguler l'organisation dynamique de la membrane plasmique, sous forme de barrières induisant le confinement de protéines membranaires (Dityatev *et al.*, 2010), ce qui augmente encore la complexité des modèles biologiques.

4.2.2. Rôles dans les fonctions cellulaires

Cette compartimentation complexe de la membrane plasmique est importante pour un bon nombre de fonctions cellulaires. Nous allons l'illustrer ici au travers de quelques exemples.

L'appariement hydrophobe entre lipides et protéines est un phénomène qui peut jouer sur l'activité de protéines membranaires, comme la mélibiose perméase (Dumas *et al.*, 2000), la Na,K-ATPase (Cornelius, 2001), ou encore le récepteur mu aux opioïdes (Gaibelet *et al.*, 2008). Il semble à ce propos que la partie hydrophobe des protéines puisse avoir une structure tertiaire qui s'adapte à son environnement lipidique, ce qui justifierait la modulation de la fonction protéique selon les lipides environnants (Marsh, 2008; Lee, 2011). L'association de ce phénomène avec les radeaux lipidiques n'a cependant pas été démontrée.

Le contrôle de la diffusion des composants membranaires est vital dans le cas de la polarisation ou de la morphologie cellulaire, qui sont étroitement liées au cytosquelette. Cela permet la répartition spatiale des différentes fonctions biologiques liées à la membrane. L'implication directe du cytosquelette d'actine dans la ségrégation de protéines a été démontrée par exemple dans l'exclusion de la podocalyxine des cils de cellules épithéliales, par l'intermédiaire, entre autres, de protéines appartenant à la famille des ERM (Ezrin Radixin Moesin), connues pour établir un lien entre les filaments d'actine et la membrane (Francis *et al.*, 2011). Une autre étude montre, au niveau de cellules musculaires, que la répartition des récepteurs à l'acétylcholine, inclus dans des rafts à l'état basal, est modifiée par un facteur neuronal qui induit un regroupement des rafts *via* un remodelage du cytosquelette d'actine (Cartaud *et al.*, 2011). Ce processus s'effectue lors de la formation de jonctions neuromusculaires, assurant ainsi la présence des récepteurs à l'acétylcholine dans cette nouvelle zone de communication cellulaire.

La présence de certains récepteurs dans la membrane plasmique est régulée par un mécanisme d'endocytose, soit constitutif, soit induit par la liaison d'un ligand, et qui est basé sur la formation de puits de clathrines ou de cavéoles. Dans les deux cas de figure, les

récepteurs apparaissent comme confinés dans ces invaginations membranaires. La différence entre les deux mécanismes est que seules les cavéoles sont dépendantes de domaines membranaires enrichis en cholestérol (fig. 26). Ces derniers semblent cependant pouvoir participer à une endocytose cavéole-indépendante (Lajoie & Nabi, 2010). Les domaines de type rafts pourraient donc avoir une importance dans la régulation de la fonction de signalisation de certains récepteurs.

Enfin, les domaines membranaires peuvent être représentés comme des plateformes de signalisation, où sont regroupés différents partenaires protéiques et lipidiques impliqués dans une même fonction biologique précise. Par exemple, les récepteurs adrénergiques $\beta 1$ et $\beta 2$ sont très proches structuralement, mais ils participent à des voies de signalisation bien distinctes. Cette spécificité d'action a pour origine le confinement de ces deux récepteurs dans des domaines membranaires différents, contenant leurs partenaires respectifs (Valentine & Haggie, 2011). On peut ainsi imaginer que si les différents acteurs d'une même voie de signalisation sont pré-associés dans un même domaine, la réponse au stimulus sera d'autant plus rapide et efficace.

Outre l'intérêt des domaines membranaires au service des cellules elles-mêmes, plusieurs chercheurs émettent l'hypothèse que des pathogènes détournent cette organisation membranaire à leur profit (Chu & Ng, 2002; Hartlova *et al.*, 2010; Farquhar *et al.*, 2011), par

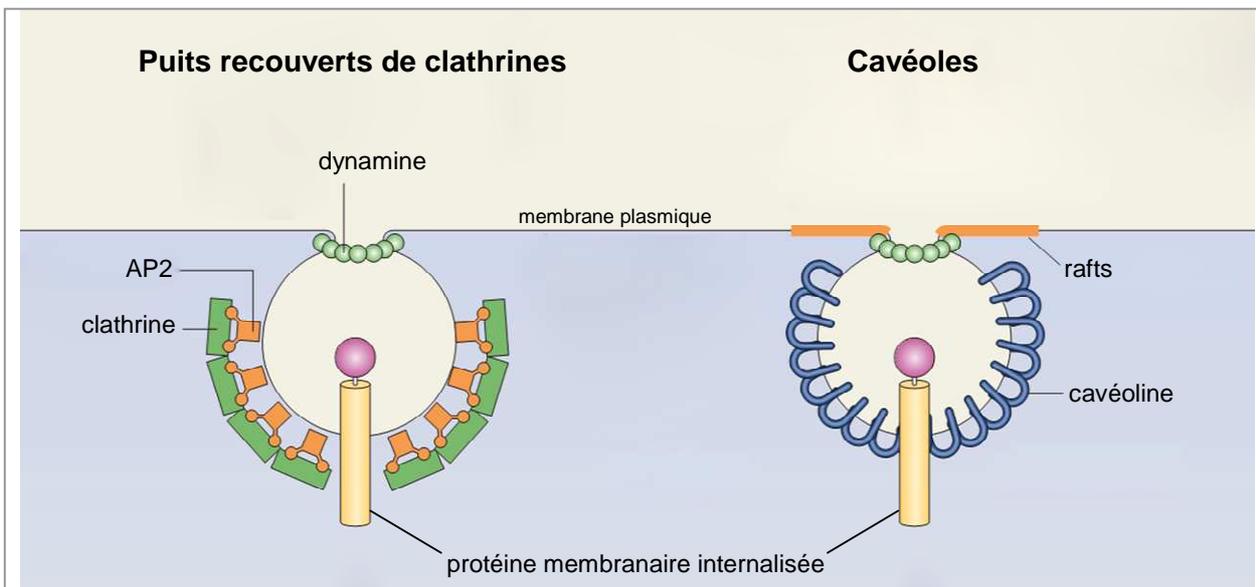


Figure 26. Internalisation de protéines membranaires via deux voies différentes impliquant ou non les rafts.

La voie dépendante des clathrines requiert l'intervention de protéines adaptatrices, comme AP-2. Le puits se forme indépendamment de la présence de rafts, au contraire des cavéoles, formées via la cavéoline. L'endocytose est assurée par l'intervention de la dynamine qui s'agence en anneau et se resserme pour séparer les membranes. Adapté de : Schutze *et al.*, 2008.

exemple pour qu'un virus puisse infecter une cellule plus efficacement. Dans le cas du VIH-1, il serait avantageux que les récepteurs et corécepteurs soient localisés dans la même zone de la membrane des cellules cibles. Nous allons ainsi nous focaliser par la suite sur la distribution des récepteurs majoritaires du VIH-1, soit CD4 et CCR5.

4.3. Distribution hétérogène de CD4 et CCR5 à la surface des cellules cibles du VIH

Une étude en microscopie électronique a permis de visualiser une distribution préférentielle des récepteurs CD4 et CCR5 au sein de microvilli à la surface de cellules modèles et de lymphocytes et macrophages humains primaires (Singer *et al.*, 2001). L'hétérogénéité de répartition des récepteurs a été confirmée peu de temps après par microscopie de fluorescence, dont la résolution a été améliorée par déconvolution des images (Steffens & Hope, 2003). De nos jours, le développement de nouvelles sondes fluorescentes associé à l'amélioration des techniques de microscopie ont conduit à une meilleure visualisation de la répartition des récepteurs membranaires. Cela a été appliqué en particulier à l'observation du récepteur CCR5 à la surface de plusieurs cellules modèles exprimant des quantités croissantes du récepteur. Cette étude démontre que, quelque soit le nombre de CCR5 exprimés, les récepteurs sont toujours organisés sous forme de petits agrégats, répartis sur l'ensemble de la surface de la cellule (Zhang *et al.*, 2011). Cependant, il est important de connaître les origines moléculaires de ces hétérogénéités de distribution membranaire et leur impact sur l'infection par le VIH.

4.3.1. Rôle du cholestérol et des sphingolipides

Les nombreuses études sur l'implication du cholestérol et des sphingolipides dans la compartimentation des récepteurs CD4 et CCR5 donnent parfois des résultats contradictoires, indiquant qu'il faut rester prudent quant à la comparaison des différentes expériences effectuées. Un résultat est toutefois reproductible parmi les travaux réalisés, à savoir la localisation d'une partie des récepteurs CD4 au sein des rafts (Xavier *et al.*, 1998; Manes, 2000; Popik *et al.*, 2002; Kozak *et al.*, 2002; Percherancier *et al.*, 2003). Cette observation a été constatée sur cellules modèles immunitaires ou non, mais aussi sur cellules primaires humaines, par l'intermédiaire des approches biochimiques (analyse de DRM) et de techniques de microscopie de fluorescence. En revanche, la raison de cette distribution préférentielle de CD4 est controversée. En théorie, les protéines palmitoylées, comme l'est CD4 sur sa partie C-terminale (voir § 2.4.1), sont localisées majoritairement au sein des domaines enrichis en cholestérol et sphingolipides (Melkonian *et al.*, 1999). CD4 interagit de plus avec la protéine

kinase p56^{lck} qui peut s'associer aux rafts (Cinek & Horejsi, 1992). Pourtant, deux études indiquent que ces deux caractéristiques de CD4 ne sont pas à l'origine de sa présence dans les rafts (Del Real *et al.*, 2002; Popik & Alce, 2004), ce qui est contredit par deux autres travaux (Percherancier *et al.*, 2003; Fragoso *et al.*, 2003).

Concernant le récepteur CCR5, il semble qu'il puisse être présent dans les rafts, mais dans une proportion limitée puisqu'une étude révèle qu'il est majoritairement exclu de ces domaines lipidiques (Percherancier *et al.*, 2003), alors que deux autres travaux indiquent que CCR5 est présent de manière relativement importante dans les fractions membranaires de type DRM (Mañes *et al.*, 1999; Popik *et al.*, 2002).

En parallèle, il a été confirmé à plusieurs reprises que la déplétion de cholestérol *via* des M β CD inhibait les premières étapes du processus d'infection par le VIH (Manes, 2000; Popik *et al.*, 2002; Viard *et al.*, 2002; Percherancier *et al.*, 2003; Rawat *et al.*, 2004). Une étude récente démontre de plus que l'ajout de toxine cholérique (CTx), qui peut se lier au marqueur des rafts GM1, réduit l'infection au niveau des étapes précoces (Gauthier & Tremblay, 2010), ce qui tend à confirmer les résultats précédemment cités. L'ensemble de ces observations suggère ainsi que les rafts pourraient constituer des plateformes d'entrée pour le VIH. L'hypothèse d'un rôle central de ces domaines lipidiques comme lieu d'entrée a été appuyée par la constatation que l'engagement de plusieurs CD4 dans une liaison, modélisée par des billes recouvertes d'anticorps anti-CD4, induisait un recrutement de CCR5 au sein des rafts (Nguyen *et al.*, 2005).

Pourtant, plusieurs informations ne vont pas dans ce sens. Les résultats de Nguyen *et al.* sont contredits par une étude réalisée auparavant, montrant que la distribution de CCR5 n'est pas affectée par la mobilisation de plusieurs CD4 (Percherancier *et al.*, 2003). Ces mêmes travaux démontrent de plus que l'expression dans des cellules modèles d'une forme mutante du récepteur CD4, qui n'est pas localisée dans les rafts, n'affecte pas l'infection par le VIH de ces cellules. Une autre étude basée sur le même principe confirme cette observation (Popik & Alce, 2004), mais est contredite par une troisième équipe de recherche (Del Real *et al.*, 2002).

Par ailleurs, l'implication du cholestérol dans l'infection par le VIH peut être expliquée différemment. La protéine virale gp41 s'insère dans la membrane de la cellule hôte pour permettre la fusion avec la membrane virale, et il est admis que la composition lipidique locale est déterminante dans ce processus (Doms & Trono, 2000). A ce titre, il est proposé que le cholestérol soit important dans cette étape de fusion membranaire (Liao *et al.*, 2001; Percherancier *et al.*, 2003). Etant donné les courbures membranaires importantes nécessaires à

ce mécanisme, le cholestérol représente un facteur favorisant puisqu'il induit naturellement une courbure négative de la membrane (Chernomordik, 1996).

L'importance des rafts dans le processus d'infection par le VIH a été évaluée en parallèle en modulant les quantités de divers glycosphingolipides (GSL). Des effets opposés ont été constatés puisque dans certains cas, les GSL favorisent l'entrée du virus (Hug *et al.*, 2000), alors que dans d'autres ils l'inhibent (Ramkumar *et al.*, 2009). Ces différences pourraient provenir d'un effet de la quantité de GSL présents dans la membrane, jouant le rôle de molécule d'ancrage du virus, c'est-à-dire représenter une aide lorsque les GSL sont peu concentrés, mais constituer des compétiteurs de la liaison gp120-corécepteur lorsqu'ils sont en grande quantité (Lingwood & Branch, 2011). Une autre hypothèse est que les GSL stabilisent et concentrent les récepteurs du VIH au sein des rafts, permettant une liaison plus efficace des protéines d'enveloppe virale aux récepteurs. En effet, la présence de GSL dans la membrane de la cellule hôte n'est pas nécessaire pour l'infection par le VIH si les taux d'expression de CD4 et CCR5 sont élevés (Rawat *et al.*, 2004).

En résumé, il semble que le cholestérol joue un rôle essentiel dans les premières étapes d'infection par le VIH, sans forcément impliquer son appartenance aux rafts. En effet, les autres composants lipidiques de ces domaines membranaires, les GSL, ont une fonction potentielle dans l'entrée du virus qui n'est pas clairement définie. Il est donc d'autant plus difficile d'établir un lien avec la distribution hétérogène des récepteurs CD4 et CCR5.

4.3.2. Rôle du cytosquelette d'actine

Comme il l'a été discuté auparavant (voir § 4.2), le cytosquelette d'actine est susceptible de participer à la compartimentation de la membrane, que ce soit ou non en interaction avec des composants de rafts. Il existe plusieurs moyens d'étudier son influence dans des processus cellulaires. On peut par exemple citer les cytochalasines B et D, qui sont des toxines qui inhibent la polymérisation d'actine, ce qui engendre le raccourcissement des brins d'actine puisque le mécanisme de dépolymérisation n'est pas stoppé. Une déstructuration globale du cytosquelette d'actine a donc lieu. La latrunculine A provoque le même résultat bien que son mécanisme d'action soit différent des cytochalasines. A l'opposé, la jasplakinolide est une molécule qui stabilise le réseau de filaments d'actine, voire qui stimule la polymérisation d'actine.

L'étude de la distribution de CD4 et CCR5 par microscopie confocale couplée à une analyse par déconvolution a révélé, en plus du regroupement des récepteurs au niveau de microvilli, une colocalisation de chaque récepteur avec des filaments d'actine, mais aussi avec

l'ezrin, un membre de la famille des ERM (Steffens & Hope, 2003). Cela suggère que le cytosquelette sous-membranaire est impliqué dans la répartition de CD4 et CCR5 à la surface des cellules. Cette observation est renforcée par le fait que la cytochalasine B inhibe l'infection par le VIH dépendante de CD4 et CCR5 (Rawat *et al.*, 2004). Pontow *et al.* observent de plus que la cytochalasine D, la latrunculine A et la jasplakinolide empêchent la formation de syncytium induite par Env (voir § 2.3.1, Pontow *et al.*, 2004). Par ailleurs, seule la cytochalasine D a une action limitée à la période précédant la fusion cellulaire, c'est-à-dire au moment de la formation de complexes CD4-gp120-CCR5, car la déstabilisation de l'actine induite par cette toxine n'est pas suffisante pour empêcher l'étape de fusion cellulaire. Nous retiendrons surtout que l'association de gp120 à ses récepteurs semble avoir un lien avec l'intégrité du cytosquelette d'actine.

Les auteurs de ces travaux montrent de plus que l'interaction gp120-CCR5 induit l'activation de Rac1, appartenant à la famille des Rho GTPases qui sont impliquées entre autres dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Une autre étude complète ces données en démontrant que la filamine A, une protéine cytosolique, interagit avec les récepteurs CD4 et CCR5 et les relie aux voies de régulation des filaments d'actine (Jimenez-Baranda *et al.*, 2007). Les chercheurs constatent surtout que la liaison de la gp120 aux récepteurs active ces voies de signalisation. Par ailleurs, des travaux récents montrent que la liaison de la gp120 à CCR5 active la kinase Abl qui entraîne un remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire à la formation et l'extension du pore membranaire lors de l'étape de fusion virale.

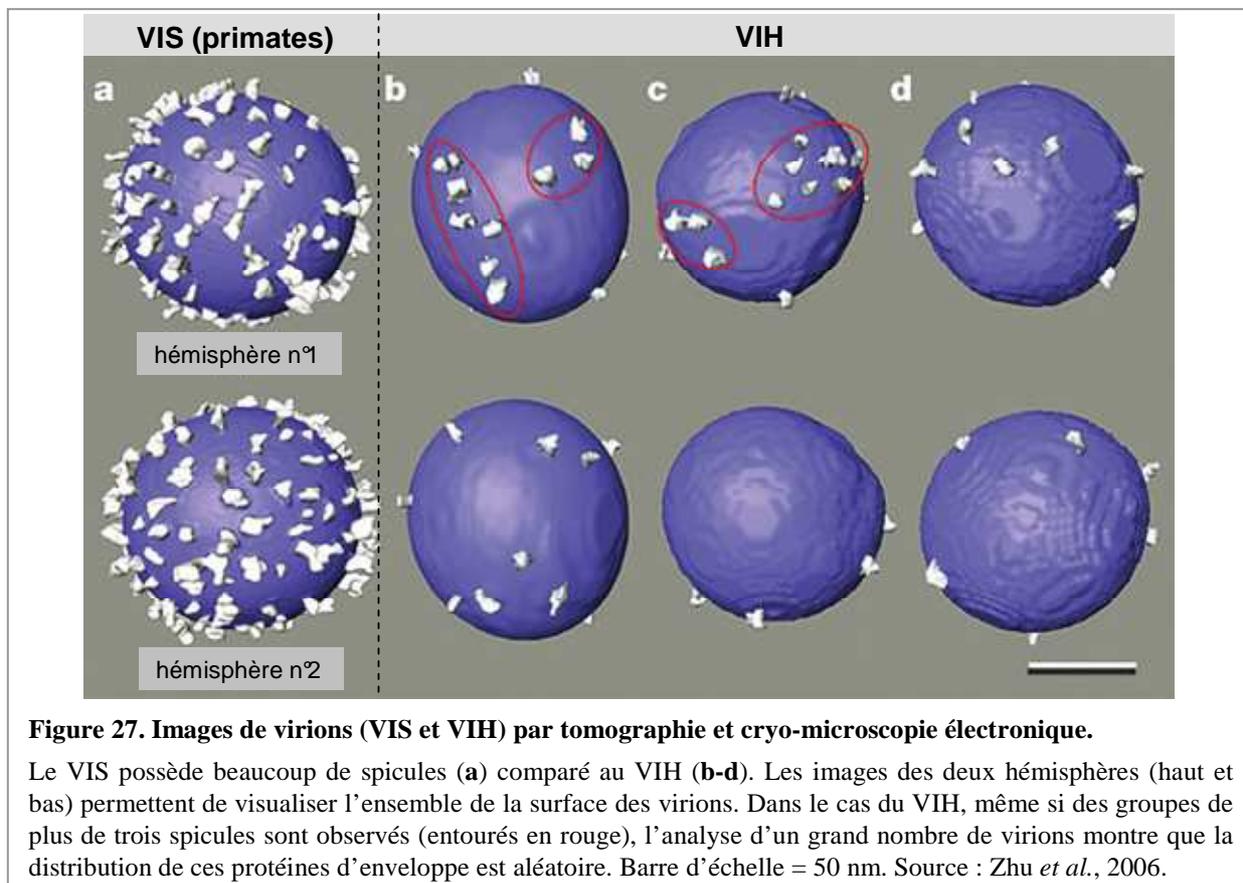
En résumé, les récepteurs CD4 et CCR5 ont la capacité d'interagir avec le cytosquelette d'actine, mais l'origine de la distribution hétérogène des récepteurs n'est pas pour autant corrélée à cette interaction. Le remodelage du réseau d'actine induit par la liaison de la protéine virale gp120 aux récepteurs suggère cependant que la localisation de CD4 et CCR5 peut être affectée lors de l'infection virale, de manière à faciliter la rencontre avec la gp120. Ce schéma d'action reste hypothétique, car nous avons vu que le cytosquelette d'actine est également impliqué dans la fusion membranaire, ce qui pourrait être à l'origine de confusions dans l'interprétation des effets des toxines ciblant l'actine.

4.4. Plusieurs complexes CD4-gp120-CCR5 sont impliqués dans l'entrée du virus

Outre l'organisation membranaire de CD4 et CCR5 en domaines, il est important d'évaluer le nombre de complexes CD4-gp120-CCR5 nécessaires à l'infection. A ce titre, les travaux de Layne *et al.* ont révélé que le processus d'infection par le VIH était un mécanisme coopératif reposant sur plusieurs interactions CD4-gp120 (Layne *et al.*, 1990). Kuhmann *et al.*

ont par la suite démontré que plusieurs récepteurs CCR5 étaient impliqués dans le processus d'infection. Grâce à une analyse mathématique de leurs résultats sur des cellules exprimant différents taux du récepteur, ils ont pu estimer ce nombre à une valeur comprise entre quatre et six CCR5 (Kuhmann *et al.*, 2000). De plus, une étude récente modélisant des résultats d'inhibition de fusion cellule infectée-cellule saine par un antagoniste de CCR5, le vicriviroc, a montré que plusieurs complexes gp120-CCR5 étaient requis, et une valeur d'environ 20 complexes par μm^2 a été proposée (Mulampaka & Dixit, 2011). Ces données indiquent que plusieurs complexes CD4-gp120-CCR5 se forment au cours des premières étapes de l'infection.

Cependant, le VIH possède un faible nombre de trimères de protéines d'enveloppe à sa surface (~ 14 , Zhu *et al.*, 2006), comparé par exemple au virus infectant les primates (fig. 27), ce qui suppose que peu de trimères sont impliqués dans la liaison à la cellule hôte. Des travaux ont révélé qu'un seul trimère pouvait permettre l'infection (Yang *et al.*, 2005). La même équipe de recherche a par ailleurs montré qu'en moyenne, deux sous-unités fonctionnelles au sein des trimères étaient requises pour que l'infection ait lieu, correspondant ainsi à au moins deux complexes CD4-gp120-CCR5 (Yang *et al.*, 2006). Ces interprétations



ont toutefois été obtenues par comparaison de résultats biologiques avec des modèles mathématiques, et pourraient sous-estimer le nombre de trimères naturellement établis entre le virus et la cellule cible. En effet, la visualisation en microscopie électronique à transmission de particules de VIH-1 en contact avec des lymphocytes T révèle que plusieurs trimères sont engagés (fig. 28, Sougrat *et al.*, 2007). D'après ces observations, cinq à sept spicules sont dénombrés entre un virion et une cellule T, ce qui laisse penser qu'au moins autant de complexes CD4-gp120-CCR5 sont établis. Par ailleurs, Dobrowsky *et al.* ont modélisé l'interaction d'une particule virale de type VIH-1 avec la membrane d'une cellule hôte et ont constaté que plusieurs complexes de gp120 et de récepteurs se formaient, et que dans le cas d'un virion parfaitement sphérique, une déformation de la membrane était nécessaire à l'établissement de plusieurs de ces contacts (Dobrowsky *et al.*, 2010).

L'ensemble de ces données montre que plusieurs récepteurs CD4 et CCR5 sont requis dans une zone restreinte de la membrane de la cellule cible pour interagir avec plusieurs gp120 et permettre une infection efficace. Ceci est d'ailleurs renforcé par le fait qu'une infection optimale peut avoir lieu dans le cas d'une faible expression membranaire de CD4 ou CCR5 seulement si l'autre récepteur est fortement exprimé, et donc présent à proximité du récepteur faiblement représenté (Platt *et al.*, 1998).

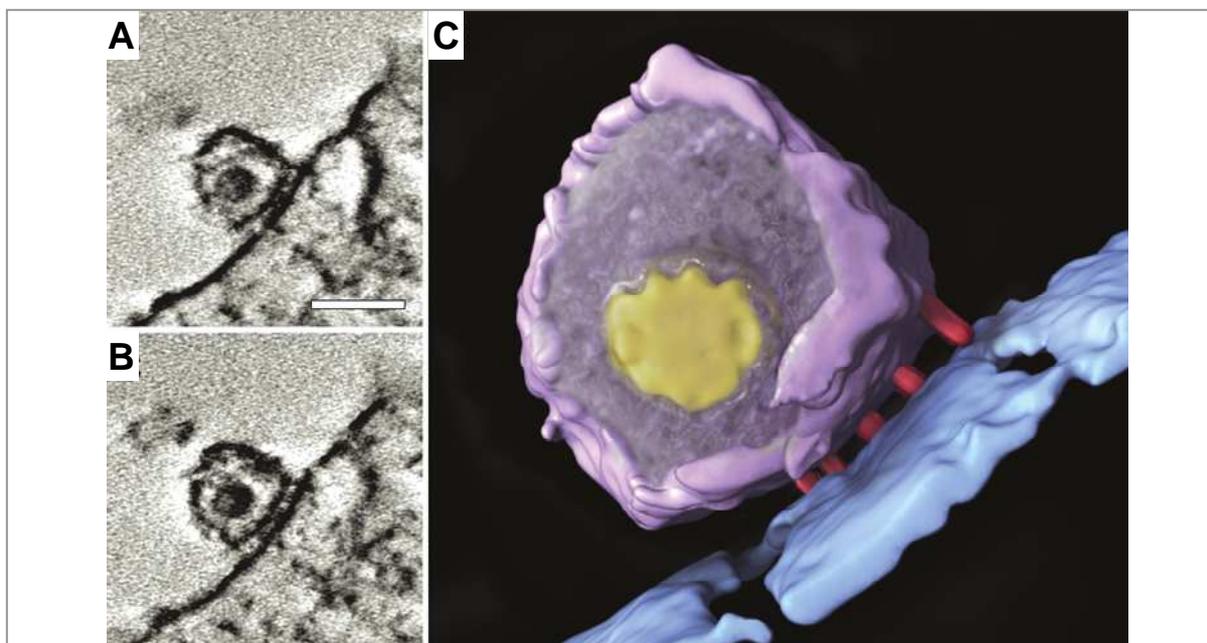


Figure 28. Contacts entre une particule virale (VIH-1) et une cellule T.

Ces images ont été obtenues par cryo-microscopie électronique. L'acquisition de plusieurs images à différentes profondeurs (exemple : A et B) a permis de réaliser une reconstruction 3D par tomographie (C), montrant bien les trimères de protéines d'enveloppe virale, au nombre de cinq, en interaction avec la surface des cellules T. Barre d'échelle = 100 nm. Source : Sougrat *et al.*, 2007.

Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, les informations sur les domaines membranaires dans lesquels CD4 et CCR5 sont inclus n'indiquent pas clairement que ces deux récepteurs sont colocalisés de manière constitutive. Il est donc possible qu'un autre mécanisme soit impliqué dans leur organisation membranaire. Idéalement, une interaction directe entre les deux récepteurs pourrait expliquer leur proximité.

4.5. Interaction constitutive des récepteurs CD4 et CCR5

L'interaction constitutive entre les deux récepteurs a tout d'abord été démontrée par co-immunoprécipitation des récepteurs, dans des cellules modèles et des cellules humaines primaires (lymphocytes T, monocytes, macrophages) (Lapham *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 1999). Une des deux études a de plus révélé que l'interaction impliquait les domaines D1 et D2 de CD4, et la boucle extracellulaire E2 de CCR5 (voir § 2.4) (Xiao *et al.*, 1999). Une autre étude montre de plus que le récepteur CD4 module l'activité de CCR5 par « cross-talk », c'est-à-dire qu'une stimulation de CD4 par l'IL-16 augmente l'activation de protéine G induite par MIP-1 β , un ligand de CCR5 (Staudinger *et al.*, 2003).

La technique de FRET, qui repose sur le transfert d'énergie entre deux fluorophores, a ensuite permis d'étudier de manière non-invasive l'interaction CD4-CCR5 constitutive. En exprimant les deux récepteurs marqués dans des cellules modèles, deux études ont décrit en imagerie une absence de signal de FRET à l'état basal, et ont visualisé une apparition de ce signal en présence de protéine d'enveloppe virale, suggérant donc que le rapprochement de CD4 et CCR5 était dû à la formation du complexe avec la gp120 (Yi *et al.*, 2006; Furuta *et al.*, 2006). Cependant, au sein de notre équipe, des travaux en microspectrofluorimétrie ont montré par une analyse fine des signaux de FRET qu'il existait une interaction constitutive et spécifique entre les deux récepteurs (Gaibelet *et al.*, 2006). En effet, l'ajout de CD4 soluble (domaines D1 à D4), ou l'expression de CD4 non marqué, réduit de moitié le transfert d'énergie mesuré, indiquant que le signal de FRET n'est pas principalement dû à la proximité des récepteurs du fait de leur grande densité à la surface des cellules modèles. De plus, l'ajout de ligands de CCR5, l'agoniste MIP-1 β et l'antagoniste TAK-779, diminue de la même manière le signal de FRET. Ces données couplées aux résultats de l'expression de plusieurs mutants de CD4 tronqués ont finalement permis de suggérer que l'interaction entre CD4 et CCR5 implique les domaines D1 et D2 de CD4 et la boucle extracellulaire E2 de CCR5, comme l'avait proposé Xiao *et al.* Des mesures réalisées avec un mutant de CD4 exclu des rafts a également montré que cette association a lieu préférentiellement hors des rafts. Enfin, l'ajout de protéine d'enveloppe virale à tropisme R5 a provoqué une augmentation dose-

dépendante du signal de FRET, alors qu'une protéine virale à tropisme X4 n'a induit aucun changement, confirmant l'effet spécifique de la gp120 de type R5. Par ailleurs, une étude publiée en 2009 a démontré que les récepteurs CD4 et CCR5 interagissaient au sein du réticulum endoplasmique, et que cette association avait un rôle important dans l'adressage du récepteur CCR5 à la membrane plasmique (Achour *et al.*, 2009). Ces résultats appuient le fait que l'interaction puisse exister à la surface des cellules.

De plus, l'impact des hétérodimères CD4-CCR5 sur l'entrée du virus n'est pas clairement établi. En effet, Xiao *et al.* ont observé une inhibition partielle de l'infection par des anticorps anti-CCR5, et ont donc proposé que cet effet était médié par l'inhibition du complexe CD4-CCR5 (Xiao *et al.*, 1999). Or, l'action des anticorps en tant que compétiteurs direct de la liaison gp120-CCR5 pourrait largement expliquer cette observation.

Nous constatons ainsi que l'organisation membranaire des récepteurs CD4 et CCR5 est complexe, mettant en jeu différents partenaires et mécanismes qui sont susceptibles de moduler l'efficacité d'entrée du VIH dans les cellules cibles. Les modèles membranaires actuels précisent bien que la membrane est un ensemble moléculaire très dynamique, et il est donc primordial de se concentrer sur la caractérisation dynamique de la distribution de CD4 et CCR5 au sein de la membrane plasmique.

4.6. Organisation membranaire dynamique des récepteurs du VIH

De manière à bien comprendre les résultats de mesures de diffusion membranaire obtenus pour les récepteurs CD4 et CCR5, nous allons faire un bref rappel des méthodes employées classiquement.

4.6.1. Outils d'étude de la dynamique de constituants membranaires

L'étude de l'organisation dynamique des composants membranaires repose sur l'emploi de diverses techniques, en particulier de microscopie optique pour quantifier leur diffusion. On distingue les mesures de diffusion d'ensemble de molécules, à savoir le retour de fluorescence après photodégradation (FRAP) et la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), des approches en molécule unique (SPT dans le cas de l'utilisation d'une particule pour le suivi de la molécule d'intérêt, ou SMT lors du suivi d'un fluorophore). Les paragraphes suivants font une description rapide de ces techniques, en mettant l'accent sur la mesure de diffusion de protéines membranaires.

Les mesures d'ensemble permettent de connaître la diffusion moyenne de la protéine étudiée. Les méthodes de FRAP et de FCS nécessitent l'emploi de fluorophores, greffés

directement sur les protéines d'intérêts, ou dans certains cas, couplés à des biomolécules (ex : anticorps) spécifiques de la protéine. Le principe du FRAP est de suivre l'intensité de fluorescence, dans une zone micrométrique dont la dimension est connue, après application d'une forte illumination laser, de très courte durée, sur cette même zone (Axelrod *et al.*, 1976). Cette forte intensité photodégrade les fluorophores présents dans la zone d'observation, et par diffusion des entités non-photodégradées dans cette zone, un retour de fluorescence est observé. A partir de la taille de la zone d'observation, on détermine un coefficient de diffusion D , mais aussi la fraction mobile M , par comparaison des intensités initiales et finales (fig. 29). A titre d'exemple, si des protéines marquées sont immobiles dans la zone de collecte de fluorescence, elles occupent un espace qui ne pourra être comblé par des protéines fluorescentes, et la fraction mobile mesurée sera inférieure à 100 %. Par ailleurs, il faut noter ici qu'une erreur sur les dimensions de la zone d'observation ou d'illumination laser impactera directement sur la valeur de D mesurée (fig. 29). La méthode de FCS repose

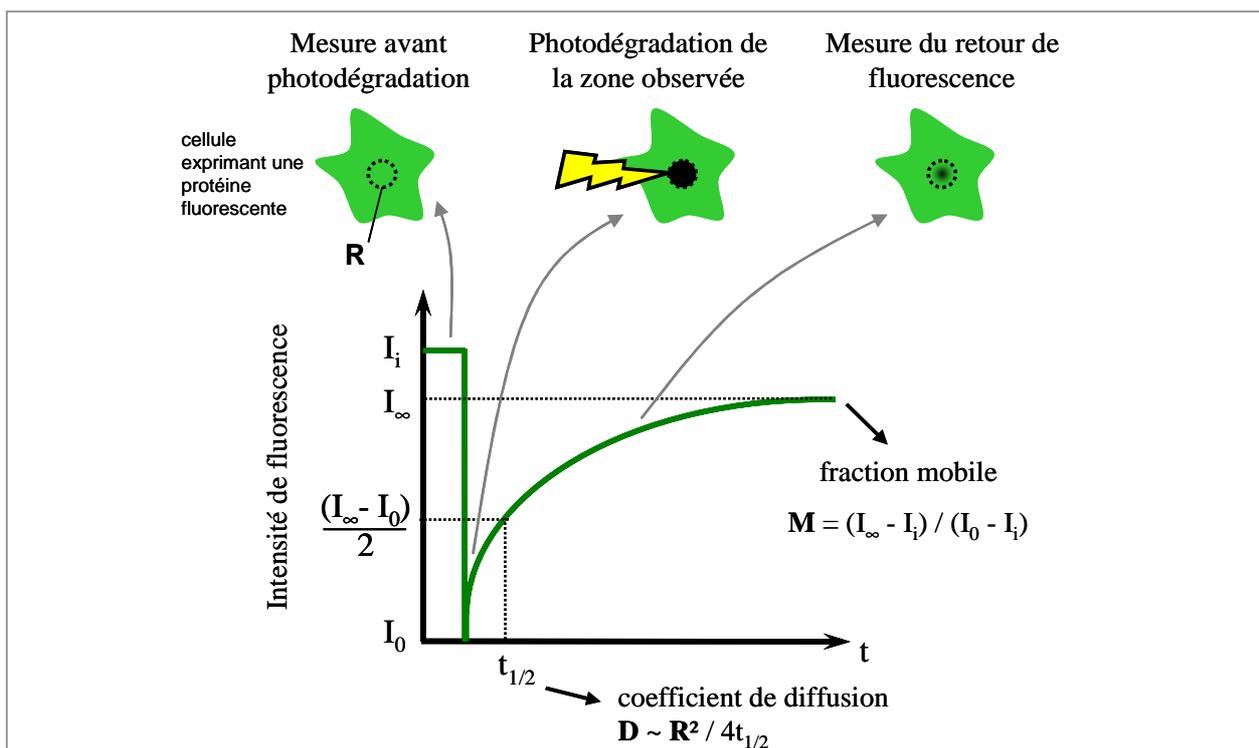


Figure 29. Principe du retour de fluorescence après photodégradation (FRAP).

L'exemple expérimental présenté ici suppose qu'une cellule exprime à un taux élevé une protéine fluorescente (émission dans le vert). La fluorescence (intensité I_1) est mesurée au sein d'une zone d'observation de dimension connue (ici de rayon R), grâce à un laser de faible intensité. Une émission laser intense et de courte durée est appliquée de manière à photodégrader les fluorophores présents dans la zone d'observation. La fluorescence résiduelle a une intensité notée I_0 . On mesure ensuite le retour de signal fluorescent correspondant au mouvement de protéines fluorescentes non photodégradées de l'extérieur de la zone d'observation vers l'intérieur. Après stabilisation de cette intensité (I_∞), on peut donc calculer la fraction mobile M et déterminer le coefficient de diffusion D , qui est directement dépendant du carré du rayon de la zone observée.

quant à elle sur la mesure des fluctuations d'intensité de fluorescence dans un petit volume d'observation, contenant idéalement une faible concentration de protéines marquées (Magde *et al.*, 1972). Les valeurs obtenues sont autocorrélées dans le temps, permettant d'obtenir le coefficient de diffusion et la concentration en fluorophores. Pour ces deux techniques, la variation de la taille de la zone d'observation ou du volume de mesure permet d'accéder à des informations sur la structuration des zones observées, et ainsi déterminer l'existence et les caractéristiques de domaines membranaires (FRAP : Salome *et al.*, 1998; Baker *et al.*, 2007, FCS : Wawrezinieck *et al.*, 2005). Bien que l'analyse fine de ces données puisse révéler plusieurs comportements diffusionnels différents pour une protéine d'intérêt, cela ne permet pas de mettre en évidence les populations minoritaires. Il est donc important de compléter ces expériences par des mesures de diffusion à l'échelle de protéines individuelles.

Les techniques de suivi de protéines individuelles *via* un fluorophore (SMT) ou une particule, fluorescente ou non (SPT), donnent accès à de meilleures résolutions spatiales, mais aussi temporelles que les méthodes précédemment décrites. En effet, dans le cadre du SPT, la détection efficace de certains types de particules permet d'obtenir leur position avec une précision de quelques nanomètres (voir chapitre suivant). En ce qui concerne le SMT, c'est le développement de fluorophores avec une plus grande photostabilité et l'amélioration de la détection de signal fluorescent qui autorise le suivi de molécule unique sur une période de temps satisfaisante. Cependant, de plus faibles rapports signal//bruit sont obtenus en SMT, comparé au SPT, ce qui induit une précision moindre sur le calcul de position des molécules fluorescentes.

De plus, ces deux techniques ont l'avantage de pouvoir détecter des changements de mode de diffusion temporaires pour une seule molécule, comme par exemple l'entrée et la sortie d'une protéine dans un domaine membranaire (voir chapitre suivant).

Pourtant, dans le cadre de l'étude des récepteurs CD4 et CCR5, seule la méthode de FRAP a été utilisée jusqu'à présent, mis à part une étude du déplacement de particules virales par SPT.

4.6.2. CD4 et CCR5 : beaucoup de mesures de diffusion, peu d'études des domaines membranaires

Les différentes études réalisées sont recensées dans les tableaux 2 et 3, pour CD4 et CCR5 respectivement. Il faut noter que ces valeurs obtenues par la technique de FRAP ne sont pas strictement comparables car la grande majorité d'entre-elles sont des valeurs

apparentes, ne tenant pas compte des dimensions de la zone d'observation (sauf pour le FRAP à rayon variable, désigné FRAP_{rv}). Quelques tendances vont toutefois être discutées ci-après.

Les expériences étudiant la diffusion de CD4 ont été réalisées à la fois sur des lignées cellulaires modèles et immunitaires (tab. 2). En se focalisant sur la fraction mobile, il semble que des valeurs plus élevées ont été mesurées sur cellules modèles (environ 60 à 100 %) comparé aux cellules immunitaires (environ 30 à 70 %). Une hypothèse pourrait être que les cellules modèles expriment le récepteur CD4 à des taux plus importants que les cellules immunitaires, défavorisant la présence des CD4 dans des zones restreintes, ou bien que la composition des membranes plasmiques des deux types de cellules est différente. Cependant, le manque d'information sur les conditions expérimentales des différentes études ne nous permet pas d'évaluer correctement ce point. Comme il a été proposé que la kinase p56^{lck} est à l'origine du confinement de CD4, on peut aussi imaginer que la présence de cette protéine ait

Tableau 2. Résultats des différentes études par FRAP du récepteur CD4.

Les études ont été effectuées sur différentes lignées cellulaires, exprimant ou non le corécepteur CCR5. Le point d'interrogation indique que les cellules sont susceptibles de l'exprimer, mais que cela n'a pas été vérifié. Dans la majeure partie des cas, les coefficients de diffusion et les fractions mobiles ne sont pas comparables étant donné que les dimensions de la zone d'observation varient entre les travaux. Légende : FL, fluorescéine ; PE, phycoérythrine ; FITC, fluorescéine isothiocyanate ; GFP/YFP, green/yellow fluorescent protein ; wt, récepteur sauvage ; Smase, sphingomyélinase.

Publication	Lignée cellulaire	CCR5	Marquage	Conditions	D (µm ² /s)	M		
Pal <i>et al.</i> (1991)	lymphocytaire (CEM, p56 ^{lck} +)	+ (?)	gp120-FL	+/- gp120	0,05	60%		
			Fab + II-FL	+/- gp120	0,07	70%		
			IgG-FL	+/- gp120	0,03	40%		
Grebenkämper <i>et al.</i> (1995)	modèle (d'insecte, SF9)	-	IgG-PE	CD4 +/- tronqué C-terΔ32	0,05	85%		
Foti <i>et al.</i> (2002)	lymphocytaire (CEM, p56 ^{lck} +)	+ (?)	IgG-FITC		0,002	40%		
	monocytaire (HL-60)	+ (?)	IgG-FITC		0,008	30%		
Steffens & Hope (2004)	modèle (CHO)	-	CD4-YFP	+/- MβCD	-	80%		
Finnegan <i>et al.</i> (2007)	modèle (HeLa)	-	CD4-GFP	- + Smase	0,02 0,005	95% 100%		
Baker <i>et al.</i> (2007)	modèle (HEK)	-	CD4-GFP	FRAP _{rv}	0,52	60%		
		+			0,45	60%		
Rawat <i>et al.</i> (2008)	modèle (B16)	-	IgG-FITC		0,02	85%		
	modèle (GM95)				0,21	95%		
	modèle (NIH3T3)				0,13	90%		
	modèle (B16)				CD4-GFP	wt	0,01	-
					CD4-GFP	mutant hors rafts	0,03	-
	modèle (GM95)				CD4-GFP	wt	0,03	-
CD4-GFP		mutant hors rafts	0,04	-				

un impact sur la fraction mobile, puisqu'elle n'est pas exprimée dans les lignées modèles. Cependant, les travaux de Foti *et al.* ne vont pas dans ce sens, car ils observent une faible fraction mobile pour CD4 dans la lignée monocyttaire HL-60, qui n'exprime pas non plus la kinase. En revanche, dans leurs conditions expérimentales, soit pour une même taille de zone d'observation, ils mesurent un coefficient de diffusion quatre fois plus faible lorsque la p56^{lck} est présente (0.008 → 0.002 $\mu\text{m}^2/\text{s}$). D'autres études seraient nécessaires sur une même lignée cellulaire pour confirmer cet effet.

La température à laquelle les différentes mesures ont été faites varie mais aucune tendance ne se dégage de cette analyse. De même, la délétion de la partie C-terminale de CD4 ou la déplétion en cholestérol ne semblent pas avoir d'influence sur la diffusion du récepteur (Grebenkämper *et al.*, 1995; Steffens & Hope, 2004), mais ces résultats demandent à être confirmés par la réalisation de mesures à différents rayons d'observation. En effet, l'étude d'un mutant de CD4 qui est localisé hors des rafts montre qu'il diffuse légèrement plus vite que le récepteur sauvage (Rawat *et al.*, 2008). Par ailleurs, le traitement de cellules modèles exprimant CD4 avec la sphingomyélinase, qui dégrade la sphingomyéline en céramides, révèle un ralentissement du récepteur, sans modification majeure de la fraction mobile (Finnegan *et al.*, 2007). Toutefois, les chercheurs ont localisé le récepteur CD4 hors des rafts dans leur étude, ce qui ne coïncide pas avec le fait que les céramides soient connus pour provoquer le regroupement de rafts en large plateformes (Gulbins & Li, 2006).

Nous avons vu que CD4 pouvait s'associer au récepteur CCR5. Les études sur lignées immunitaires ne précisent malheureusement pas si CCR5 est exprimé dans les lignées utilisées (Pal *et al.*, 1991; Foti *et al.*, 2002). Une seule étude menée dans notre laboratoire évaluée par FRAPrv, sur la même lignée, l'impact de la présence de CCR5 sur la diffusion de CD4 (Baker *et al.*, 2007). Aucune différence significative n'est observée, indiquant que si un effet existe, trop peu de récepteurs CD4 sont perturbés pour être détectés par cette méthode. En revanche, ces travaux démontrent que la majorité des CD4 diffuse librement dans de grands domaines joints, dont le rayon est estimé à 1,5 μm .

Enfin, on aurait pu supposer que la protéine d'enveloppe virale gp120 ait un effet sur la diffusion de CD4, mais aucune différence n'a été relevée (Pal *et al.*, 1991).

La diffusion du récepteur CCR5 a été étudiée seulement sur cellules modèles (tab. 3). De manière globale, la fraction mobile est élevée quel que soient les cellules utilisées. Steffens & Hope montrent qu'une déplétion en cholestérol réduit la fraction mobile de 95 à 70 % (Steffens & Hope, 2004). Etant donné que la localisation du récepteur dans les rafts est

controversée, il est difficile de savoir si cette diminution est liée à un effet du cholestérol seul ou à la rupture de domaines enrichis en cholestérol et sphingolipides. Les travaux de Finnegan *et al.* ne vont pas dans le sens de la deuxième hypothèse, car l'action de la sphingomyélinase n'a eu aucun effet sur la diffusion de CCR5 (Finnegan *et al.*, 2007).

Par ailleurs, notre équipe a montré par FRAPrv que la présence de CD4 faisait apparaître une population de récepteurs CCR5 confinés (~ 50 %) dont la diffusion était largement réduite ($0.4 \rightarrow 0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$) (Baker *et al.*, 2007). Ceci suggère que l'association de CD4 et CCR5 en hétérodimères est responsable de confinements des deux récepteurs (rayon des domaines = $0,34 \mu\text{m}$), l'autre population de récepteurs diffusant librement dans de grands domaines joints (rayon = $1,5 \mu\text{m}$). L'implication de l'interaction entre CD4 et CCR5 a été confirmée par l'ajout de CD4 soluble qui reverse cet effet de CD4. Le fait que cette différence n'ait pas été observée lors de l'étude du récepteur CD4 indique qu'un nombre réduit de ces récepteurs est impliqué, soit inférieur à la limite de détection de la méthode employée qui est estimée à 10%. Etant donné que CD4 et CCR5 ont été exprimés dans les cellules modèles avec un rapport 1:1, il a été possible d'estimer qu'au moins cinq récepteurs CCR5 interagissent avec un CD4. De manière intéressante, l'ajout de gp120 dans ce contexte induit une diminution de la taille de ces domaines (rayon = $0,25 \mu\text{m}$), sans toutefois modifier de

Tableau 3. Résultats des différentes études par FRAP du récepteur CCR5.

Les études ont été effectuées sur différentes lignées cellulaires, exprimant ou non le récepteur CD4. Dans la majeure partie des cas, les coefficients de diffusion et les fractions mobiles ne sont pas comparables étant donné que les dimensions de la zone d'observation varient entre les travaux. Dans le cas de l'étude par FRAPrv (Baker *et al.*), les données peuvent conduire à l'obtention de deux coefficients de diffusion, pour deux sous-populations. Légende : GFP, green fluorescent protein ; Smase, sphingomyélinase ; sCD4, CD4 soluble.

Publication	Lignée cellulaire	CD4	Marquage	Conditions	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	M
Steffens & Hope (2004)	modèle (HOS)	-	CCR5-GFP	-	-	95%
				+ M β CD	-	70%
Finnegan <i>et al.</i> (2007)	modèle (HeLa)	-	CCR5-GFP	+/- Smase	0,05	95%
		-		-	0,45	70%
Baker <i>et al.</i> (2007)	modèle (HEK)	+	CCR5-GFP	-	0,07 ¹ (0,4 ²)	90%
		+		+ gp120	0,06 ¹ (0,4 ²)	90%
		+		+ sCD4	0,3	70%
Rawat <i>et al.</i> (2008)	modèle (B16)	+	CCR5-GFP		0,04	90%
	modèle (GM95)	+			0,02	80%
	modèle (NIH3T3)	+			0,05	100%

¹ diffusion confinée

² diffusion libre

manière importante la diffusion ($0.07 \rightarrow 0.06 \mu\text{m}^2/\text{s}$), ce qui peut être dû à la limite de résolution de la technique de FRAP. Les récepteurs CCR5 diffusant librement ne sont pas affectés par l'ajout de la protéine d'enveloppe virale, ce qui est en faveur d'une interaction préférentielle de la gp120 avec les zones membranaires où CD4 et CCR5 sont déjà en interaction.

Il apparaît donc que les récepteurs CD4 et CCR5 diffusent librement dans de grandes zones membranaires, au sein desquelles il existe de plus petits domaines où les deux récepteurs sont en interaction. La composition de ces petits domaines n'est pas connue, et il n'est pas exclu que d'autres composants membranaires, lipidiques et/ou protéiques, soient impliqués dans leur formation. Cela supposerait qu'il existe différentes sous-populations du même récepteur ayant des environnements membranaires différents. Il est donc nécessaire de poursuivre les études de la dynamique des récepteurs *via* des méthodes non-invasives avec une meilleure résolution spatio-temporelle.

5. Projet de thèse

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les conditions dans lesquelles se déroulent les premières étapes de l'infection par le VIH, à savoir l'interaction séquentielle de la protéine d'enveloppe virale gp120 avec le récepteur primaire CD4, puis avec le corécepteur (CCR5 ou CXCR4), tous deux présents à la surface de lymphocytes T CD4+. L'étude s'est focalisée sur le corécepteur CCR5 car il est majoritairement utilisé par le virus lors de la primo-infection.

Différents travaux antérieurs indiquent qu'il est important d'étudier ces étapes précoces du cycle viral par des approches dynamiques, car la formation du complexe CD4-gp120-CCR5 est un mécanisme réversible (Dobrowsky *et al.*, 2008) qui influe sur l'efficacité d'infection (Platt *et al.*, 2005). En particulier, notre équipe de recherche a démontré par FRAPrv que la diffusion des deux récepteurs était contrainte, et que des hétérodimères CD4-CCR5 étaient présents au sein de petits domaines, pouvant constituer des zones préférentielles de liaison du virus à la cellule cible. Le projet de thèse visait donc à compléter ces résultats par une approche plus résolutive spatialement et temporellement : le suivi de particule unique (ou SPT, pour Single Particle Tracking). En effet, cette approche individuelle permet de mieux caractériser les différents comportements des récepteurs, mais peut aussi révéler des changements de type de diffusion dans le temps, ceci pour un même récepteur.

Les travaux présentés ici avaient de plus pour but d'analyser le mouvement des récepteurs CD4 et CCR5 dans des conditions pertinentes vis-à-vis du contexte d'infection par le VIH. En effet, très peu de données de dynamique des deux récepteurs ont été obtenues avec des cellules immunitaires. Les expériences de SPT ont donc été menées à la surface d'une lignée de lymphocytes T humains, exprimant les récepteurs sauvages à des taux d'expression naturels.

La présentation des résultats s'articule en plusieurs chapitres. Le choix des différents matériels, en particulier celui des Quantum dots (QD) comme particules, et les mises au point de la technique de SPT seront traités en premier lieu. Nous aborderons ensuite la validation de l'utilisation des QD pour des expériences de SPT sur un système membranaire modèle. Ensuite, la mise en place du protocole sur cellules immunitaires sera détaillée, et enfin les résultats pour les récepteurs CD4 et CCR5 seront présentés dans les différentes conditions expérimentales utilisées : variation de la température, ajout d'antagonistes de CCR5 ou de protéine d'enveloppe virale gp120.

CHAPITRE I

Mise au point du suivi de particule unique avec des Quantum dots

La technique de suivi de particule unique, ou SPT (pour Single Particle Tracking), repose sur le choix de plusieurs éléments qui vont garantir le bon déroulement de l'expérience, ainsi que sa pertinence vis-à-vis de l'étude réalisée. En effet, il existe des particules de composition et de taille différentes, qui ne sont pas détectées de la même manière (observation en lumière blanche ou en fluorescence). Ainsi, ce chapitre présente les caractéristiques des particules choisies, c'est-à-dire les Quantum dots, et la stratégie sélectionnée pour les accrocher spécifiquement aux constituants membranaires étudiés dans le projet de thèse (un lipide, voir chapitre III, ou des récepteurs, voir chapitre IV et V). Le montage de vidéomicroscopie permettant de détecter les particules et suivre leur mouvement est ensuite détaillé. Les vidéos enregistrées sont traitées grâce à plusieurs programmes informatiques pour obtenir les trajectoires individuelles des particules. Les trajectoires sont triées puis analysées pour déterminer les caractéristiques de diffusion de chaque molécule d'intérêt suivie. Les limites de résolution de la technique sont discutées à la fin de ce chapitre.

1. Suivi de Particule Unique

1.1. Principe et applications

Le suivi de particule unique, appelé SPT par la suite (pour Single Particle Tracking), est une méthode qui consiste à lier de manière spécifique une particule à une molécule d'intérêt pour suivre le mouvement de cette dernière. La même approche peut être réalisée en remplaçant la particule par un fluorophore. On parle alors de suivi de molécule unique, ou SMT (voir fin du chapitre précédent), mais cette méthode ne sera pas traitée ici.

L'observation en vidéomicroscopie de la particule, couplée à l'analyse d'images, permet de déterminer un jeu de coordonnées image par image, et ainsi d'en construire la trajectoire. L'interprétation de ces mouvements est réalisée grâce à plusieurs outils mathématiques, élaborés selon des principes physiques qui dépendent du contexte expérimental. De manière générale, on détermine le type de diffusion qui est observé, en distinguant le mouvement aléatoire (brownien) d'autres mouvements plus complexes (voir § 5.3). Le coefficient de diffusion, qui équivaut à l'aire parcourue par unité de temps, est le paramètre dynamique majeur qui est extrait de l'analyse.

Le SPT a été mis au point pour la première fois sur des cellules en 1986 (De Brabander *et al.*, 1986). Ces travaux ont été la base de nombreuses autres études, à la fois sur cellules mais aussi sur système modèle (ex : bicouche lipidique supportée plane). Le SPT a par exemple été utilisé pour l'étude de la dynamique de lipides membranaires (Lee *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 2002; Murcia *et al.*, 2008). Toutefois, la majorité des applications de la technique de SPT concerne des protéines membranaires. A titre d'exemple, le récepteur à la glycine, présent à la surface de neurones, peut s'accumuler au niveau des synapses. Il a été démontré grâce au SPT que la diffusion de ce récepteur était contrainte par interaction avec un réseau protéique sous-membranaire de géphyrine, formé au niveau des synapses. De plus, cette liaison est régulée *via* la phosphorylation du récepteur par la protéine kinase C, révélant un mécanisme qui contrôle l'accumulation du récepteur au niveau des synapses (Specht *et al.*, 2011). La méthode de SPT a aussi été employée pour l'étude de virus, en particulier en ce qui concerne l'entrée des virus dans des cellules. Dans ce cas, le virus est modifié pour contenir des protéines fluorescentes, et ce sont alors les virions qui constituent les particules suivies en microscopie. De cette manière, un mécanisme d'entrée *via* des cavéoles a été identifié pour le virus de type hépatite B (Hao *et al.*, 2011).

1.2. Différentes particules utilisées

Les premières expériences de SPT étaient basées sur l'utilisation de colloïdes d'or, c'est-à-dire des amas d'atomes d'or à l'échelle nanoscopique. De Brabander *et al.* ont démontré qu'il était possible de visualiser ces particules en microscopie optique, même pour un diamètre de 40 nm, soit une taille inférieure au pouvoir résolutif du microscope (De Brabander *et al.*, 1986). En effet, la résolution optique est limitée par la diffraction de la lumière, ce qui implique qu'un objet punctiforme sera perçu comme une tache (appelée tache d'Airy), donnant une limite d'environ 200-250 nm selon la théorie d'Abbe pour des longueurs d'ondes dans le visible.

La visualisation de ces particules en lumière blanche autorise leur suivi sur des périodes très longues, contrairement aux fluorophores dont le signal décroît au cours de l'illumination (photodégradation). Cependant, le contraste naturel à la surface des cellules, créé par le relief cellulaire et les organites intracellulaires proche de la membrane plasmique, peut perturber la détection précise de ces particules.

D'autres particules ont été utilisées pour des études de SPT : les billes de latex, observées en lumière blanche dans le cas de tailles relativement importantes (0,2 à 4 µm de diamètre, Schmidt *et al.*, 1993; Sako & Kusumi, 1995; Falk *et al.*, 2004), ou en fluorescence, permettant la détection de particules de tailles inférieures (100 nm de diamètre, Zhou *et al.*, 2006; Kolin *et al.*, 2006).

Cependant, les dimensions importantes de ces particules ont encouragé le développement de nouveaux objets ayant des diamètres de quelques nanomètres seulement, et donc plus adaptés pour du SPT à la surface de cellules vivantes. Les Quantum dots (QD) sont un exemple de particules nanométriques aux propriétés optiques intéressantes, qui sont aujourd'hui les plus utilisées en SPT (Alcor *et al.*, 2009). Ils présentent toutefois quelques désavantages (voir paragraphe suivant), c'est pourquoi les recherches se poursuivent pour tenter d'atteindre la particule idéale : quelques nanomètres de diamètre, facile à synthétiser, solubiliser et fonctionnaliser, et détectable avec un fort ratio signal/bruit stable dans le temps.

2. Choix des Quantum dots pour l'étude des récepteurs CD4 et CCR5 en SPT

Notre équipe ayant réalisé plusieurs études de SPT avec des colloïdes d'or (Daumas *et al.*, 2003; Saulière *et al.*, 2006; Saulière, 2007), ce projet a été initié avec ces mêmes particules. Il est apparu rapidement que les coefficients de diffusion mesurés pour les

récepteurs CD4 et CCR5, sur cellules modèles HEK 393T, étaient anormalement faibles (facteur 10 à 100 avec les données de la littérature et de FRAPrv, Baker, 2007). Les nombreuses tentatives d'optimisation du protocole de marquage des récepteurs avec les colloïdes d'or, menées au début du projet de thèse, n'ont pas apporté de changements significatifs dans les résultats, laissant présager qu'il existait un biais important dans la mesure des coefficients de diffusion. C'est pourquoi nous avons choisi de changer de type de particule.

Les autres solutions qui se présentaient à nous étaient les billes de latex et les QD. D'après la description de ces particules dans le paragraphe précédent, il nous paraissait plus approprié de sélectionner les QD comme particules pour nos expériences de SPT, sachant que l'équipe de Didier Marguet et Hai-Tao He (CIML, Marseille) venait tout juste de proposer à la communauté scientifique un outil informatique efficace pour détecter et établir les trajectoires de plusieurs QD simultanément dans une même vidéo (voir § 4).

2.1. Caractéristiques des QD

Les QD sont des cristaux semi-conducteurs de taille nanométrique, composés d'un cœur d'atomes, le plus souvent du cadmium (Cd) mélangé à du sélénium (Se), stabilisé par une enveloppe, ici du sulfure de zinc (ZnS) (fig. 30A). Etant donné que les QD sont synthétisés principalement dans des solvants organiques non polaires, un ligand chimique amphiphile est utilisé pour les rendre solubles, caractéristique nécessaire à une utilisation en biologie (Michalet *et al.*, 2005). Les QD montrent une très bonne stabilité dans l'eau, ainsi que dans de multiples tampons, pouvant contenir jusqu'à 200 mM de NaCl sans provoquer d'agrégation. Par ailleurs, il est intéressant de remplacer la partie hydrophile du ligand par un groupement polyéthylène glycol (PEG) car ceux-ci réduisent les possibilités de liaisons non-spécifiques. Il est de plus possible de greffer de manière covalente diverses biomolécules au ligand, permettant au QD d'interagir spécifiquement avec une cible d'intérêt.

Le cœur est à l'origine de la fluorescence, dont le pic d'émission se déplace vers des longueurs d'ondes plus élevées pour des dimensions croissantes (fig. 30B-C). Il existe ainsi une large gamme de « couleurs » de particules pour des compositions similaires. Il est intéressant de noter que le pic d'émission est étroit, autorisant la visualisation simultanée de plusieurs QD différents avec un jeu de filtres appropriés. Les QD sont excités préférentiellement à des longueurs d'onde proches des ultraviolets car leur coefficient d'extinction y est élevé (fig. 30C). Couplé à un rendement quantique relativement élevé

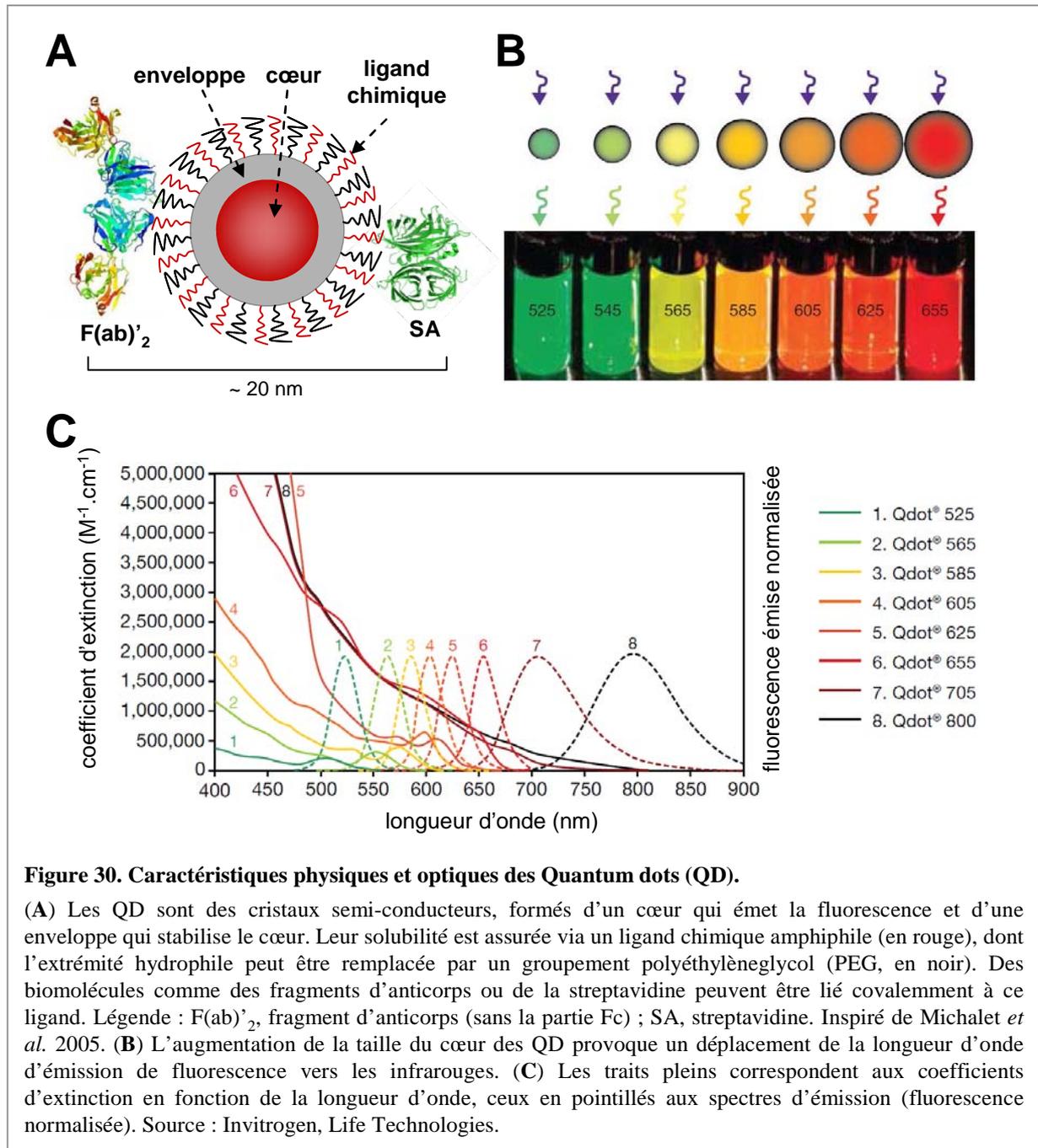


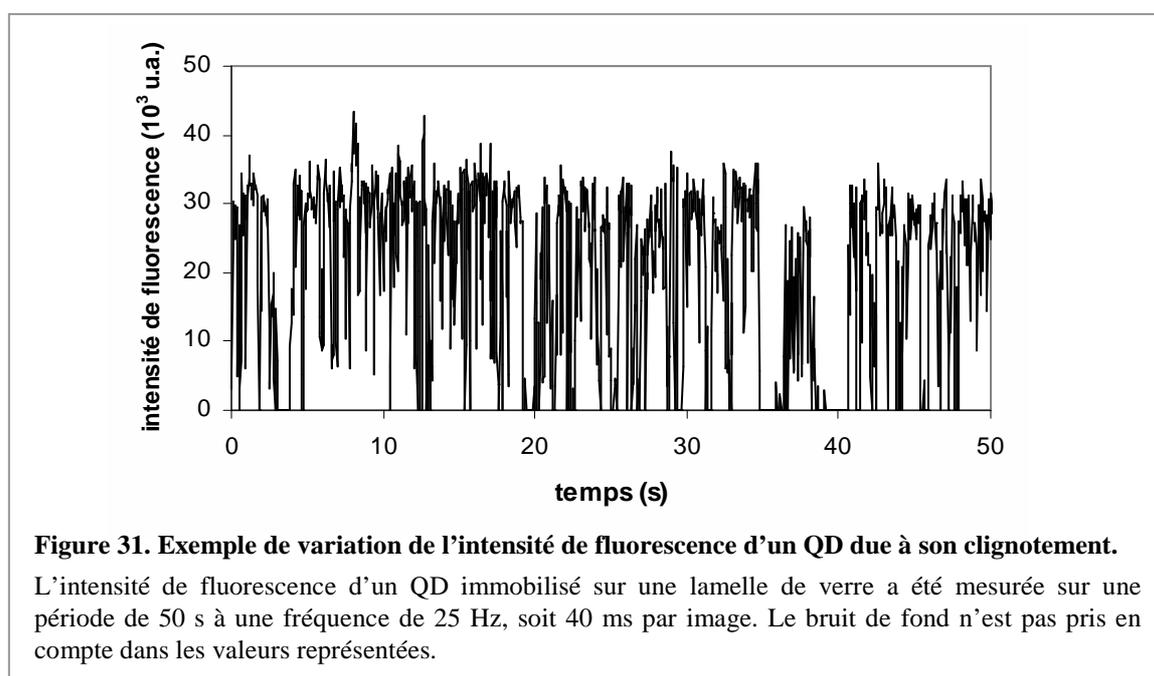
Figure 30. Caractéristiques physiques et optiques des Quantum dots (QD).

(A) Les QD sont des cristaux semi-conducteurs, formés d'un cœur qui émet la fluorescence et d'une enveloppe qui stabilise le cœur. Leur solubilité est assurée via un ligand chimique amphiphile (en rouge), dont l'extrémité hydrophile peut être remplacée par un groupement polyéthylène glycol (PEG, en noir). Des biomolécules comme des fragments d'anticorps ou de la streptavidine peuvent être liés covalamment à ce ligand. Légende : F(ab)₂, fragment d'anticorps (sans la partie Fc) ; SA, streptavidine. Inspiré de Michalet *et al.* 2005. (B) L'augmentation de la taille du cœur des QD provoque un déplacement de la longueur d'émission de fluorescence vers les infrarouges. (C) Les traits pleins correspondent aux coefficients d'extinction en fonction de la longueur d'onde, ceux en pointillés aux spectres d'émission (fluorescence normalisée). Source : Invitrogen, Life Technologies.

(~ 0,6), on obtient donc un signal fluorescent intense, qui va permettre un fort ratio signal/bruit en microscopie de fluorescence. Cette caractéristique est très importante car il en résulte que la position des QD sera déterminée avec une grande précision (Triller & Choquet, 2008).

Les QD possèdent une grande photostabilité, comparés aux molécules fluorescentes, c'est-à-dire que le maximum de leur intensité décroît très peu au cours du temps, et en particulier pendant leur illumination, même forte. En revanche, ils présentent le désavantage

d'osciller entre des états « on » et « off », pendant lesquels le signal fluorescent est émis ou non, respectivement. On parle ainsi de clignotement ou « blinking » (Alcor *et al.*, 2009). Etant donné que ce phénomène se produit à des échelles de temps très variables, soit de la nanoseconde à plusieurs secondes, la mesure de la fluorescence d'un QD dans une image, soit pour une période de quelques dizaines de millisecondes, correspond donc à une moyenne qui va varier entre la valeur de bruit de fond et la valeur d'intensité maximale (fig. 31). Même si cela complique la détection, et surtout la génération des trajectoires (voir § 4.1), le clignotement, spécifique de QD individuels, permet de les reconnaître vis-à-vis de particules agrégées.



Pour nos expériences de SPT sur cellules, nous souhaitons avoir un signal dans les longueurs d'onde « rouges » pour nous affranchir au maximum de l'autofluorescence cellulaire, plus intense dans les « verts », augmentant ainsi le niveau de signal/bruit. Nous avons ainsi choisi les QD commercialisés par Invitrogen (Life Technologies) ayant une émission maximale à 655 nm.

2.2. Fonctionnalisation et stratégies d'accrochage à la molécule d'intérêt

Il existe de nombreuses possibilités pour accrocher spécifiquement la particule à la molécule que l'on souhaite étudier (Michalet *et al.*, 2005; Alcor *et al.*, 2009). Certaines stratégies reposent sur la modification de la protéine étudiée, la plupart du temps en ajoutant

une séquence peptidique en partie N-terminale. Par exemple, ce rajout peut être une séquence polyhistidine, qui sera reconnue par des groupements tris-nitriloacétiques greffés covalamment aux particules. Cela peut aussi être un peptide accepteur qui est spécifiquement reconnu par l'enzyme bactérienne BirA, qui aura pour fonction de greffer une biotine sur le peptide. Il suffira alors d'utiliser des particules recouvertes de streptavidine. En ce qui concerne les lipides, ils peuvent être modifiés chimiquement sur leur tête polaire pour posséder un groupement facile à cibler spécifiquement.

Les autres stratégies d'accrochage des QD sont basées sur la reconnaissance des protéines ou des lipides non modifiés *via* un ligand naturel ou un anticorps. L'utilisation des anticorps permet de nombreuses combinaisons possibles : anticorps primaires et secondaires, entiers ou en fragments, à un (Fab) ou deux sites actifs (F(ab)'₂).

Etant donné que nous souhaitons utiliser des anticorps pour cibler spécifiquement et facilement les récepteurs CD4 et CCR5 natifs, nous avons testé les QD recouverts de streptavidine ou de fragments F(ab)'₂ d'anticorps secondaires (fig. 30A). Des cellules J.CCR5 ont été marquées avec ces différents QD pré-incubés avec l'anticorps biotinylé anti-CD4 OKT4, et le nombre de QD a été déterminé manuellement cellule par cellule (voir *Matériels et Méthodes*). L'accrochage non-spécifique des particules a été évalué en incubant les différents QD sur les cellules sans les pré-incubés avec l'anticorps OKT4. Nous avons observé une nette différence entre les deux stratégies d'accrochage des particules, soit deux fois plus de marquage en faveur du couple streptavidine/anticorps biotinylé (fig. 32). Les QD

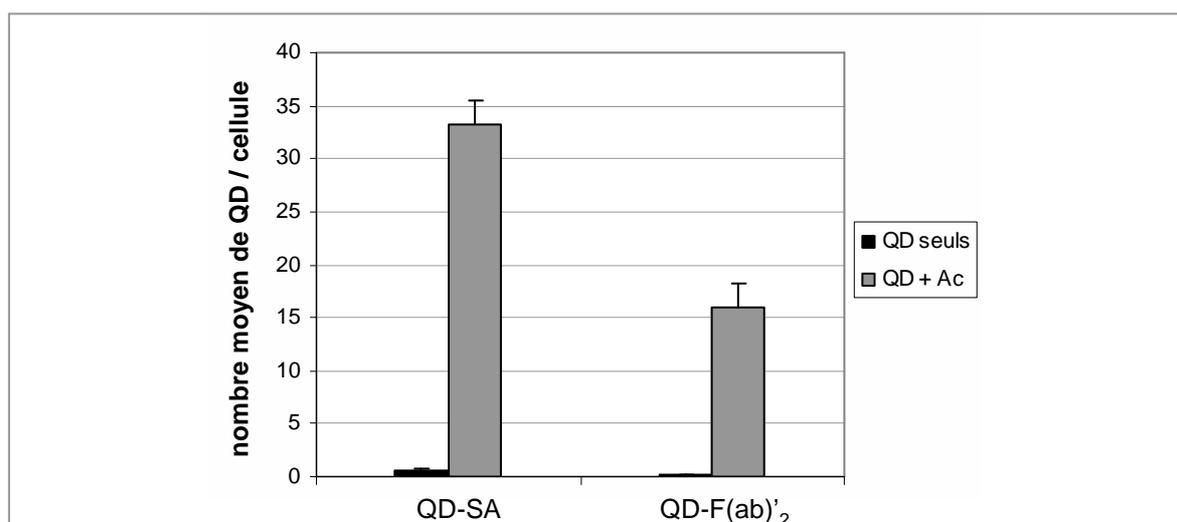


Figure 32. Comparaison des différents types de QD par marquage cellulaire et comptage.

Chaque type de QD a été mélangé (barres grises) ou non (barres noires) à 1 nM final avec un même anticorps anti-CD4 biotinylé à 0,1 nM final. Le mélange a été mis en présence de cellules exprimant CD4 pendant 15 min. Les valeurs représentent la moyenne des QD comptés à la surface de 25 cellules. La barre d'erreur est l'erreur standard à la moyenne (S.E.M.). Légende : Ac, anticorps ; Strep, streptavidine.

recouverts de streptavidine (QD-SA) ont donc été choisis pour la suite des expériences.

3. Montage du microscope pour le SPT avec les QD-655

3.1. Description du dispositif

Pour réaliser les expériences de SPT avec les QD, un microscope de fluorescence classique à champ large a été utilisé, c'est-à-dire que l'échantillon est éclairé de manière homogène (par opposition avec la microscopie confocale). Les cellules sont observées en transmission *via* une lampe halogène (fig. 33) : la lumière traverse l'échantillon et est collectée par une caméra vidéo, pilotée par un ordinateur. L'observation des QD est quant à elle effectuée par réflexion : la lumière d'une lampe à base de mercure et d'halogènes (modèle X-cite 120, Exfo) est filtrée et réfléchiée pour être dirigée vers l'échantillon, puis le signal de fluorescence est à nouveau filtré pour que la caméra ne collecte que la fluorescence spécifique des QD. La lampe X-cite est plus intéressante qu'une lampe à vapeur de mercure classique (HBO) car elle présente l'avantage d'avoir une durée de vie plus longue et une intensité plus stable dans le temps.

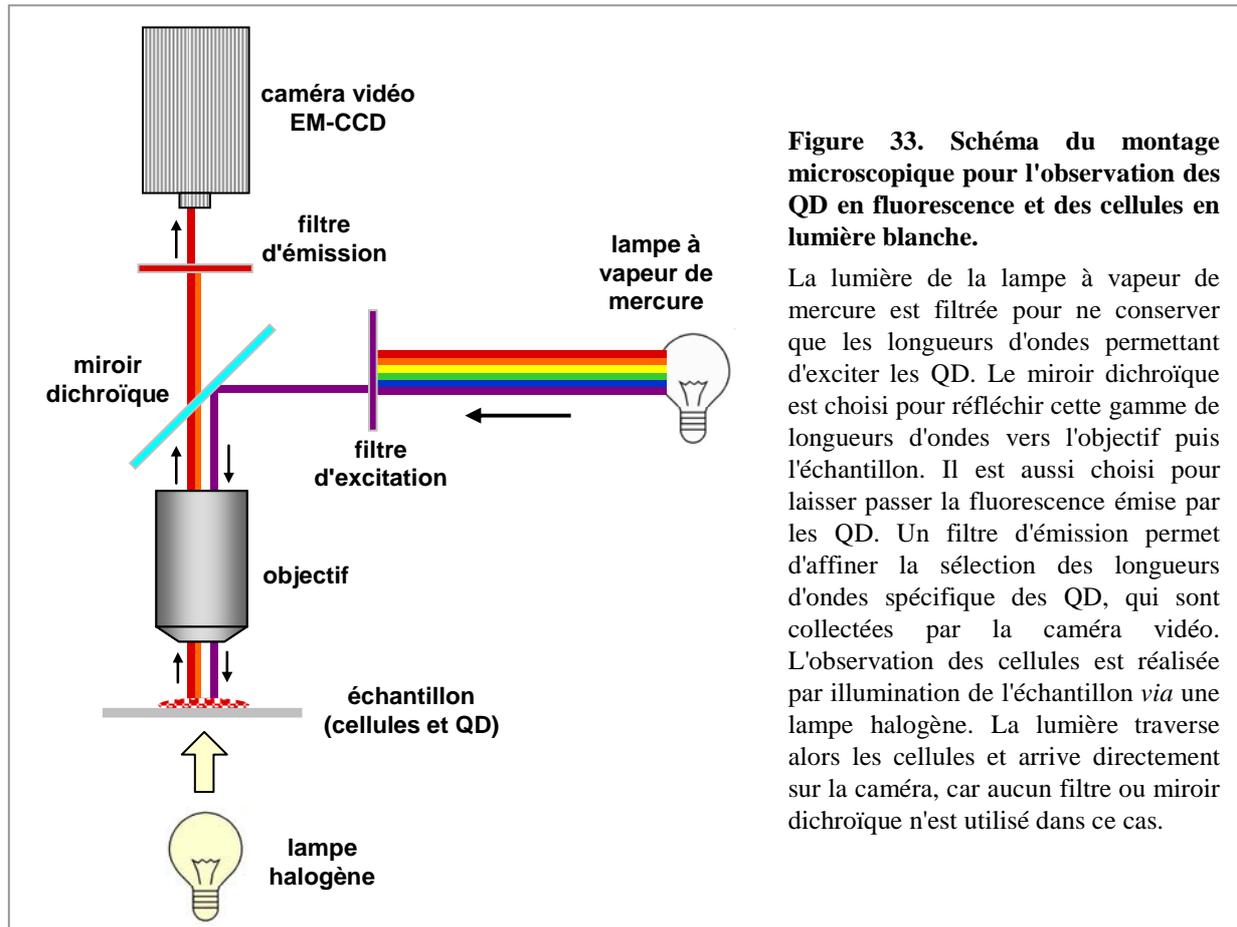
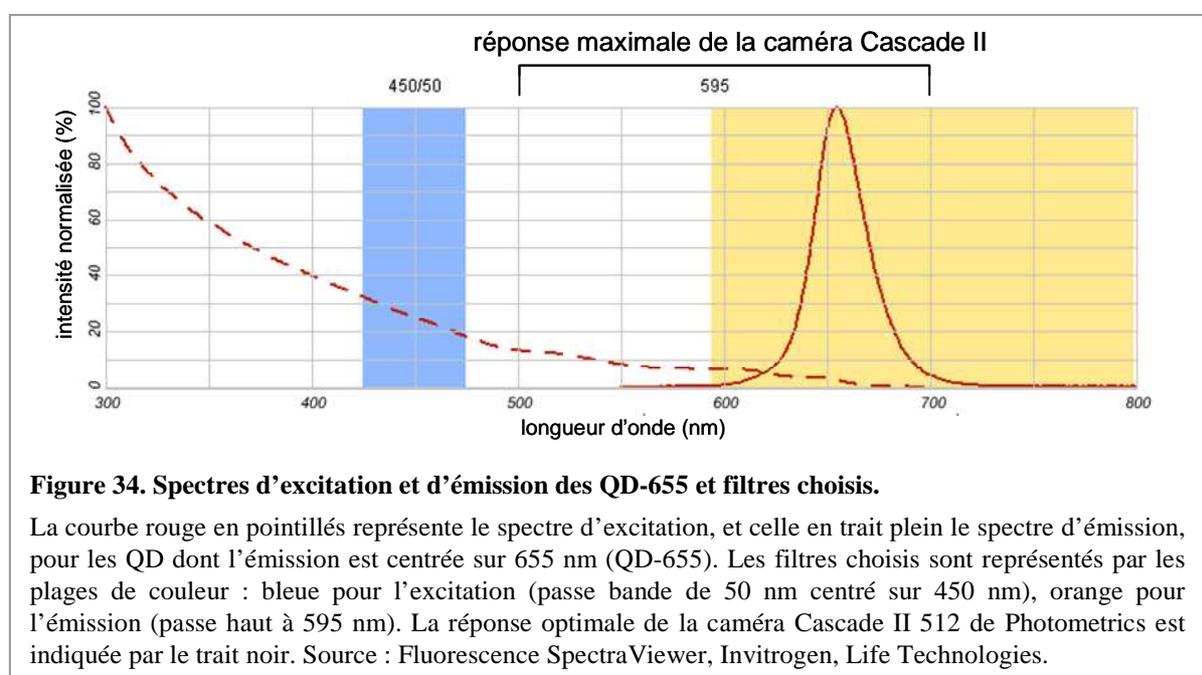


Figure 33. Schéma du montage microscopique pour l'observation des QD en fluorescence et des cellules en lumière blanche.

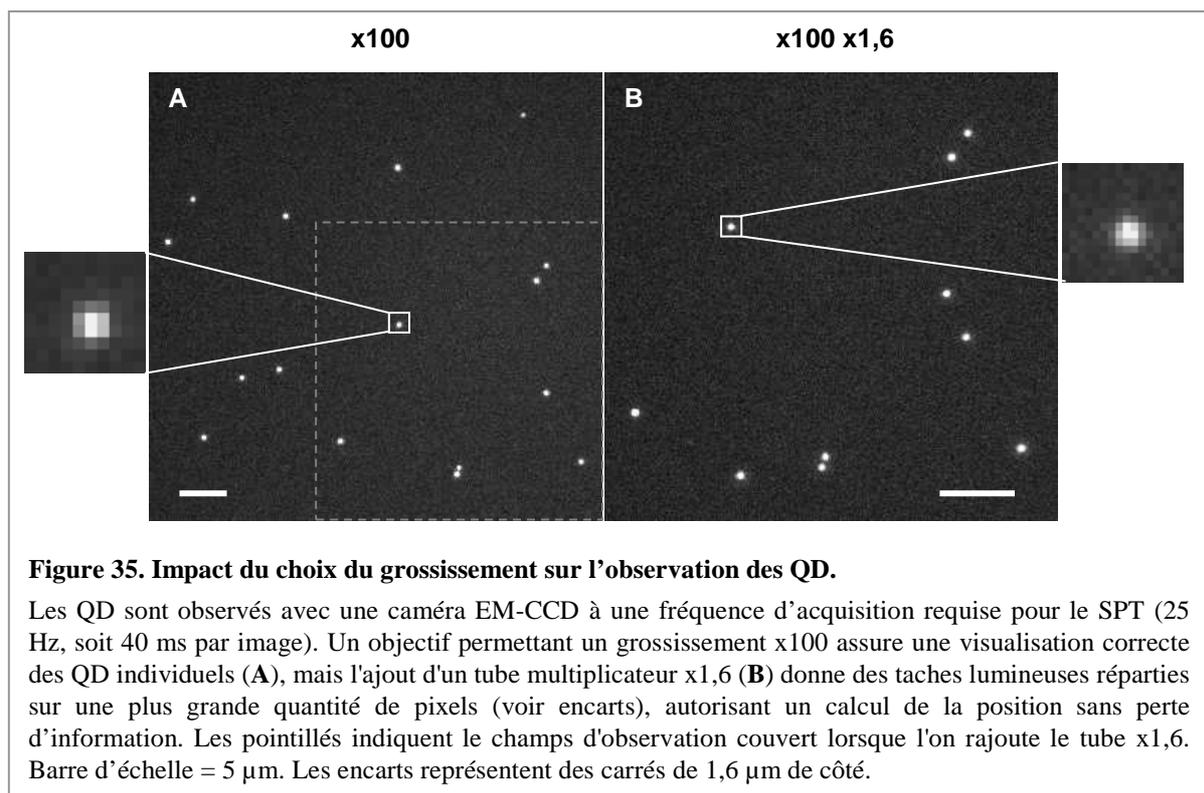
La lumière de la lampe à vapeur de mercure est filtrée pour ne conserver que les longueurs d'ondes permettant d'exciter les QD. Le miroir dichroïque est choisi pour réfléchir cette gamme de longueurs d'ondes vers l'objectif puis l'échantillon. Il est aussi choisi pour laisser passer la fluorescence émise par les QD. Un filtre d'émission permet d'affiner la sélection des longueurs d'ondes spécifiques des QD, qui sont collectées par la caméra vidéo. L'observation des cellules est réalisée par illumination de l'échantillon *via* une lampe halogène. La lumière traverse alors les cellules et arrive directement sur la caméra, car aucun filtre ou miroir dichroïque n'est utilisé dans ce cas.

Le jeu de filtres optiques qui a été choisi pour les QD-655 est composé d'un filtre d'excitation passe-bande d'une largeur de 50 nm centré sur 450 nm (fig. 34). Il s'agit d'un compromis entre une illumination évitant au mieux les ultraviolets (jusqu'à 400 nm) qui sont connus pour induire des dommages cellulaires (cassure de l'ADN par exemple), et une excitation optimale des QD, car elle diminue pour des longueurs d'onde croissante (fig. 34). Concernant le filtre d'émission, un filtre passe-haut a été installé dans le montage, ne laissant passer que les longueurs d'onde supérieures à 595 nm, permettant de collecter pleinement le signal provenant des QD, mais aussi d'éliminer au mieux le signal d'autofluorescence des cellules. Ce même montage a été utilisé pour les expériences sur système modèle, avec des jeux de filtres optiques différents (voir chapitre II).



3.2. Caméra d'acquisition et objectif

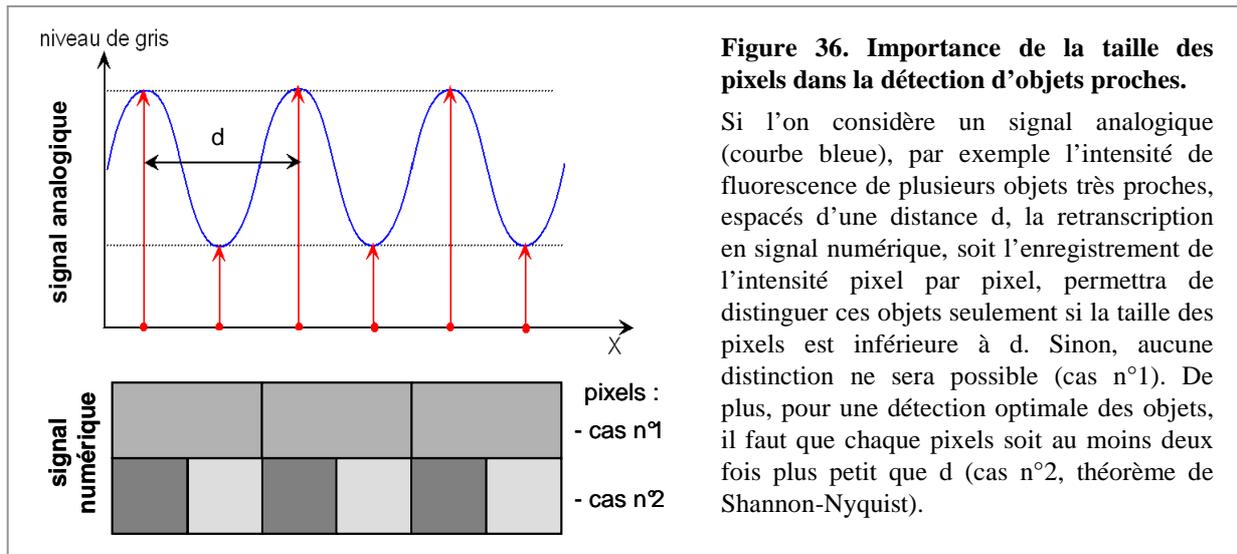
Les expériences de SPT demandent la précision la plus grande possible dans la détection et le calcul de la position des particules, image par image. Dans le cas des QD, il est donc important d'utiliser une caméra suffisamment sensible pour détecter les particules avec un ratio signal/bruit satisfaisant et à une cadence la plus élevée possible. A ce titre, nous avons utilisé une caméra vidéo dont le signal électronique est amplifié (EM-CCD, pour Electron Multiplying - Charge-Coupled Device, modèle Cascade II 512, Photometrics). Elle nous a permis d'observer des QD individuels à une fréquence de 25 Hz, soit 40 ms par image (fig. 35).



Notre objectif n'était pas seulement de détecter les particules, nous voulions aussi déterminer leur position avec précision, qui dépend du ratio signal/bruit des particules et du grossissement apporté par l'objectif du microscope. Pour savoir quel grossissement choisir, il faut se référer au théorème de Shannon-Nyquist. Ce dernier définit que, lors de la conversion d'un signal fluorescent en pixels qui composent l'image, il faut que la taille des pixels soit au moins deux fois inférieure à la taille des taches lumineuses que l'on visualise (fig. 36). Dans le cas inverse, une perte d'information a lieu, conduisant à une baisse de la précision de détermination des positions (cas n°1 de la fig. 36). La taille des pixels indiquée ici correspond aux dimensions réelles de la zone observée au niveau de l'échantillon. On la calcule donc selon la formule :

$$\text{taille d'un pixel} = \frac{\text{taille physique d'un pixel sur le capteur de la caméra}}{\text{facteur de grossissement}} \quad \text{Eq. 1}$$

La caméra Cascade II 512 de Photometrics possède des pixels carrés de 16 μm de côté. Ainsi, pour un objectif x63, on obtient une taille de pixel de **254 nm**, et pour un objectif x100, une taille de **160 nm**. Il est possible de rajouter devant la caméra un tube multiplicateur x1,6, ce qui donne avec l'objectif x100 un grossissement final de x160, et une taille de pixel de **100 nm**.



La dimension d des plus petites taches lumineuses observables correspond à la limite de résolution du microscope, définie par l'équation :

$$d = \frac{0,61 \times \lambda}{NA} \quad \text{Eq. 2}$$

où λ est la longueur d'onde (en nm) et NA l'ouverture numérique de l'objectif. Nous avons à notre disposition un objectif x63 (NA 1,4) et un objectif x100 (NA 1,3). On obtient donc pour les QD émettant autour de 655 nm : $d = 285$ nm pour le x63, et $d = 307$ nm pour le x100. De manière à ne pas perdre d'information lors de notre observation des QD, il faut donc que la taille d'un pixel soit inférieure à $d/2$, soit environ **142 nm** avec le x63, ou **153 nm** avec le x100. Etant donné les données énoncées précédemment pour la caméra Cascade II, on voit que seule la combinaison de l'objectif x100 avec le tube multiplicateur x1,6 respecte cette règle (taille d'un pixel = 100 nm). Les images de QD immobilisés sur une lamelle de verre montrent bien qu'à ce grossissement (x160) les taches lumineuses sont réparties sur un plus grand nombre de pixels qu'avec l'objectif x100 seul (fig. 35).

En résumé, notre montage de vidéomicroscopie de fluorescence, composé d'une lampe excitatrice intense, d'un jeu de filtres optiques adaptés aux QD choisis et d'une caméra sensible, permet d'observer des QD individuels avec un grossissement et un ratio signal/bruit suffisant pour calculer leurs coordonnées avec précision.

4. Traitement des données

Au cours de nos expériences de SPT, chaque vidéo acquise correspond à l'observation de plusieurs QD à la surface d'une ou plusieurs cellules si leur disposition le permet. La détection et la reconnexion des trajectoires des QD dans une même vidéo ont été réalisées par le programme informatique baptisé MTT, pour Multiple Target-Tracing (Sergé *et al.*, 2008), développé sous Matlab (The Mathworks) et généreusement mis à disposition de la communauté scientifique par l'équipe de Didier Marguet et Hai-Tao Hé, au Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML). Ce programme est particulièrement adapté à la reconstitution de trajectoires de QD car il tient compte de leur clignotement.

L'ensemble des résultats obtenus pour une vidéo avec l'algorithme MTT est stocké dans un seul fichier (fig. 37). Les données de chaque trajectoire sont regroupées dans des fichiers individuels, qui sont ensuite formatés pour être triés informatiquement et manuellement. Les fichiers sélectionnés sont alors analysés un par un avec un programme d'analyse des trajectoires, développé au sein de l'équipe avec le logiciel Excel de la suite Microsoft Office. Ce dernier programme donne accès aux différents paramètres de diffusion (coefficient de diffusion, index de confinement, taille des domaines, etc.). L'ensemble de ces étapes est détaillé dans la suite de ce paragraphe.

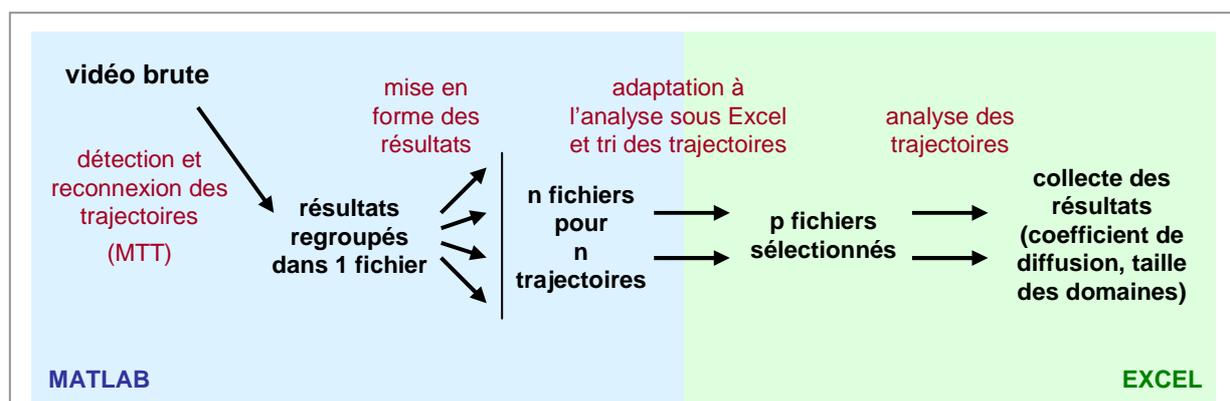


Figure 37. Schéma des étapes de traitement des données de SPT.

Les vidéos brutes sont traitées avec l'algorithme MTT (Sergé *et al.* 2008) qui génère un fichier contenant toutes les informations des trajectoires détectées. Un algorithme a été créé sous Matlab pour convertir chaque trajectoire en fichier individuel, contenant les coordonnées et l'amplitude pour chaque image. Ces fichiers brut sont formatés via un programme créé sous Excel, pour permettre le tri des trajectoires (voir texte). Enfin, les fichiers conservés sont analysés par un programme développé sous Excel par notre équipe de manière à collecter les paramètres de diffusion pour chaque trajectoire.

4.1. Détection des QD et reconnexion des trajectoires

Le programme MTT est capable de générer les trajectoires de plusieurs QD dans une même vidéo. Pour cela, il réalise trois opérations, image par image, qui sont représentées dans la figure 38 : détection des particules, estimation des paramètres par particule, et reconnexion des positions.

Pour détecter les différents QD, un petit carré de côté w_n se déplace dans toute l'image et évalue à chaque fois la présence d'une particule, grâce à un test de rapport de vraisemblance (likelihood-ratio). Il compare les efficacités de correspondance entre le signal et chacune des deux hypothèses suivantes : « il n'existe pas de particule dans le carré » (H_0),

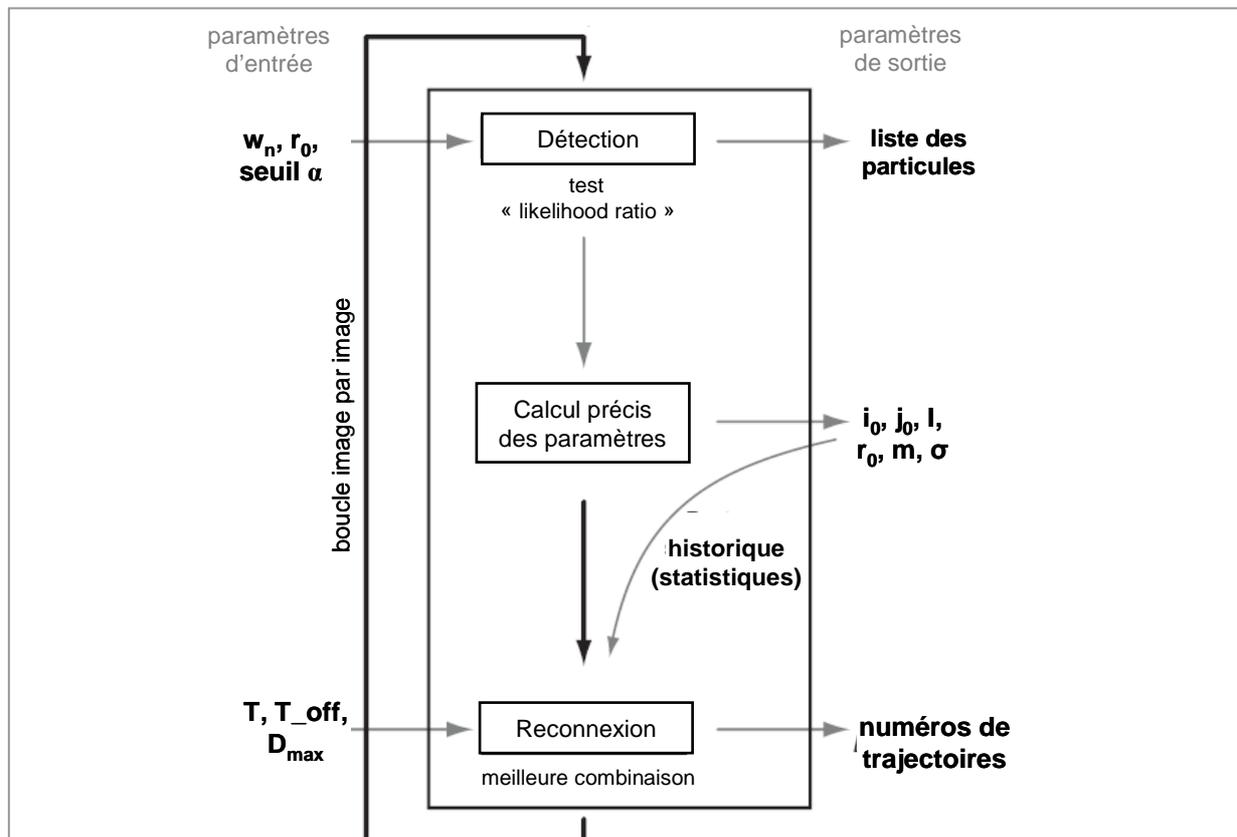


Figure 38. Déroulement des trois étapes principales de l'algorithme MTT.

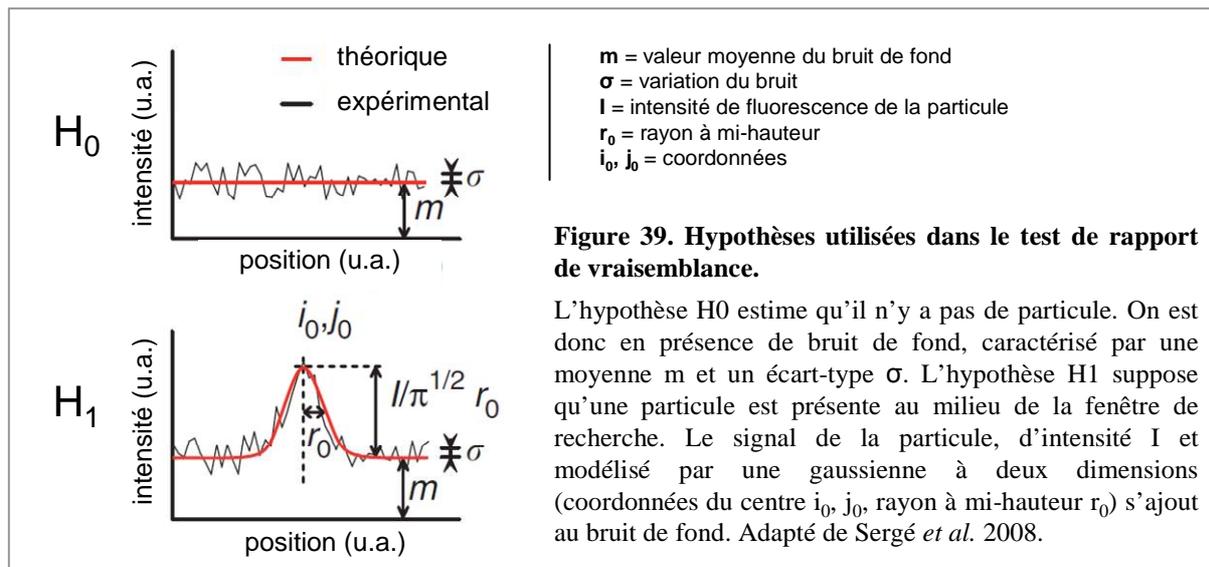
Pour chaque image, les particules sont recensées (« détection ») selon des paramètres d'entrée indiqués préalablement. Les valeurs descriptives de chaque particule sont ensuite calculées avec précision par ajustement avec une gaussienne 2D, et enregistrées dans le fichier de sortie. Enfin, les particules détectées sont associées à un numéro de trajectoire à l'aide des statistiques sur les paramètres enregistrés précédemment, mais aussi de paramètres d'entrée, et au final selon la meilleure combinaison de reconnexion. Légende : w_n , taille de la fenêtre de recherche ; r_0 , rayon de la gaussienne à mi-hauteur ; α , amplitude du signal ; i_0, j_0 , coordonnées en x et y ; I , intensité du signal ; m , moyenne du bruit de fond ; σ , variation du bruit de fond ; T , nombre d'images prises en compte pour l'historique ; T_{off} , nombre d'images pendant lesquelles la disparition de la particule est autorisée avant fermeture de la trajectoire ; D_{max} , coefficient de diffusion maximal définissant la zone de recherche par rapport à la position précédente. Adapté de Sergé *et al.* 2008.

et « il existe une particule dans le carré » (H_1). La première hypothèse correspond au bruit de fond mesuré, qui est caractérisé par une moyenne m et un écart-type σ (fig. 39). Dans la deuxième hypothèse, il existe un objet lumineux au centre du carré, dont le signal peut être approximé par une gaussienne à deux dimensions, qui s'ajoute au bruit de fond. Des paramètres supplémentaires sont pris en compte : les coordonnées du centre de la gaussienne, i_0 et j_0 , son rayon à mi-hauteur r_0 , et son amplitude α , qui peut nous donner l'intensité de la particule I selon la formule :

$$\alpha = \frac{I}{r_0 \sqrt{\pi}} \quad \text{Eq. 3}$$

Il est intéressant de connaître l'intensité car elle permet de calculer le niveau de signal/bruit (S/B) en décibel (dB) *via* l'équation :

$$S/B = 10 \log\left(\frac{I^2}{\sigma^2}\right) \quad \text{Eq. 4}$$



Les paramètres déterminés ici sont peu précis puisque la fenêtre de recherche se déplace seulement de pixel en pixel. Une étape supplémentaire permet de calculer les divers paramètres avec précision, et ceci *via* un ajustement mathématique du signal mesuré à une courbe gaussienne à deux dimensions. Seules ces données précises seront conservées par la suite.

Il faut noter que pour les étapes de détection et de calcul de position, on doit indiquer manuellement au programme MTT les valeurs suivantes :

- w_n et r_0 , qui sont constantes pour des conditions d'observation similaires. Elles ont été préalablement définies en conservant les valeurs donnant la meilleure précision de calcul de position de QD immobiles (voir *Matériels et Méthodes*). Pour le grossissement x160 avec la caméra Cascade II, nous avons obtenu $w_n = 7$ px et $r_0 = 1,4$ px.

- un seuil pour α , qui permet d'éviter la détection de pics de signal faux-positifs. Sergé *et al.* ont déterminé un optimum de fonctionnement pour le programme MTT à partir d'un seuil de signal/bruit (S/B) égal à 21 dB (Sergé *et al.*, 2008). D'après l'équation 4, en connaissant la variation du bruit σ , nous pouvons remonter à une valeur d'intensité minimale, et grâce à l'équation 3, obtenir le seuil d'amplitude requis. Ainsi, pour chaque vidéo, le logiciel ImageJ (NIH) nous permet de déterminer σ en analysant une zone de l'image correspondant à du bruit de fond uniquement. Nous avons remarqué que pour une série de vidéos acquises dans une même chambre d'observation, cette valeur variait peu, et qu'il était donc possible de fixer un seuil d'amplitude unique par série. Par ailleurs nous nous sommes placés dans des conditions plus drastiques ($S/B > 25$ dB) car nous obtenions un trop grand nombre de faux-positifs.

La dernière étape, soit la reconnexion des positions entre les images, est la plus difficile, en particulier à cause du clignotement des QD. Pour l'accomplir au mieux, le programme MTT prend à chaque fois en compte trois paramètres :

- l'intensité de fluorescence (tient compte du clignotement par une loi de probabilité établie à partir de l'observation de plusieurs QD ; (Sergé *et al.*, 2008).

- la possible disparition de la particule (intensité nulle ou sortie du champ d'observation) : à partir d'un certain nombre d'absences consécutives (valeur **T_off**), la reconstruction de la trajectoire de la particule est arrêtée.

- le coefficient de diffusion D instantané (le programme prévoit qu'un changement brutal de la valeur puisse survenir ; ex : sortie d'un confinement).

Ces paramètres sont comparés à ceux déterminés pour les images précédentes, sur une période rétrograde de durée T (en nombre d'images) indiquée préalablement au programme. Cette comparaison est importante en particulier si plusieurs QD se trouvent à proximité. C'est pourquoi on indique de plus à l'algorithme MTT une valeur D_{max} , soit un coefficient de diffusion maximal, qui va définir la zone de recherche sous forme de disque (fig. 40), de chaque particule par rapport à sa position dans l'image précédente. Si deux QD sont détectés

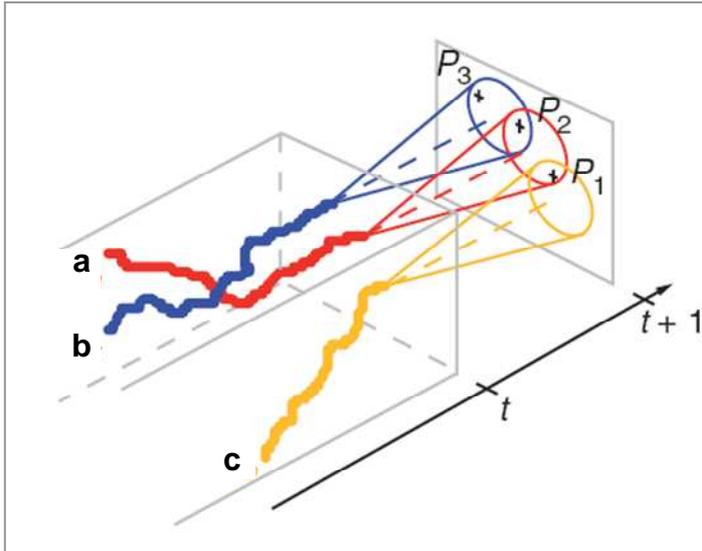


Figure 40. Représentation des zones de recherches lors de la reconnexion des positions des QD.

Si l'on considère trois trajectoires a, b et c, leur dernière position enregistrée à l'image acquise au temps t va définir les zones de recherche circulaires pour l'image suivante, à $t+1$. Dans cette dernière, trois particules sont détectées, P1, P2 et P3, et l'on remarque ici que des conflits de reconnexion peuvent avoir lieu, c'est pourquoi il est important de recourir à l'historique des caractéristiques des différentes particules pour choisir la meilleure combinaison de reconnexion. Source : Sergé *et al.* 2008.

dans une même zone de recherche, alors la décision finale de reconnexion correspond à la meilleure combinaison trouvée pour satisfaire au mieux les paramètres énoncés précédemment, vis-à-vis de chaque QD et de son historique.

Nous avons remarqué que les valeurs de T_{off} et de D_{max} étaient cruciales dans l'efficacité de reconnexion. Concernant le T_{off} , nous avons réalisé une comparaison du nombre de trajectoires détectées correctement, et de la durée de celles-ci, sur une même vidéo de QD en mouvement à la surface d'une cellule (tab. 4). La valeur initialement conseillée correspondait à 5 images, et nous avons finalement conservé la valeur de 11 images, donnant le meilleur résultat. Choisir une valeur trop grande serait à l'origine d'erreurs de reconnexion. En revanche, une valeur de D_{max} a été fixée au départ ($0,3 \mu m^2/s$), mais après une première analyse complète de chaque vidéo, une visualisation manuelle des résultats (le programme

Tableau 4. Choix de la valeur optimale pour le paramètre T_{off} .

Au cours de la reconnexion, lorsque pour une des trajectoires, aucune position ne correspond dans l'image en cours, le programme MTT recherche la particule pendant un certain nombre d'image (T_{off}) avant d'abandonner et couper la trajectoire définitivement. Rechercher la particule trop longtemps augmente le risque de réaliser de mauvaises reconnexions. Nous avons donc évalué l'efficacité du programme pour diverses valeurs T_{off} sur 7 vidéos de cellules contenant au total 24 QD pouvant être suivis sur des temps longs.

T_{off} (nombre d'images)	5	7	9	10	11	12
Nombre de trajectoires détectées correctement	23	24	24	24	24	24
Nombre d'augmentations de durée des trajectoires	-	3	6	7	8	8

MTT génère un double des images brutes avec les numéros de trajectoires associés à chaque QD détecté) peut conduire à modifier ce seuil. Plus simplement, cela revient à diminuer ou augmenter la taille des zones de recherche. Par exemple, si la proximité des QD provoque des erreurs de reconnexion, réduire ces zones peut aider à corriger le problème. De plus, de manière à éviter au maximum ce genre de désagrément, les expériences de SPT ont été réalisées pour des densités en QD réduites (ex : 10 à 15 QD par cellule, voir chapitre III).

4.2. Tri des trajectoires analysables

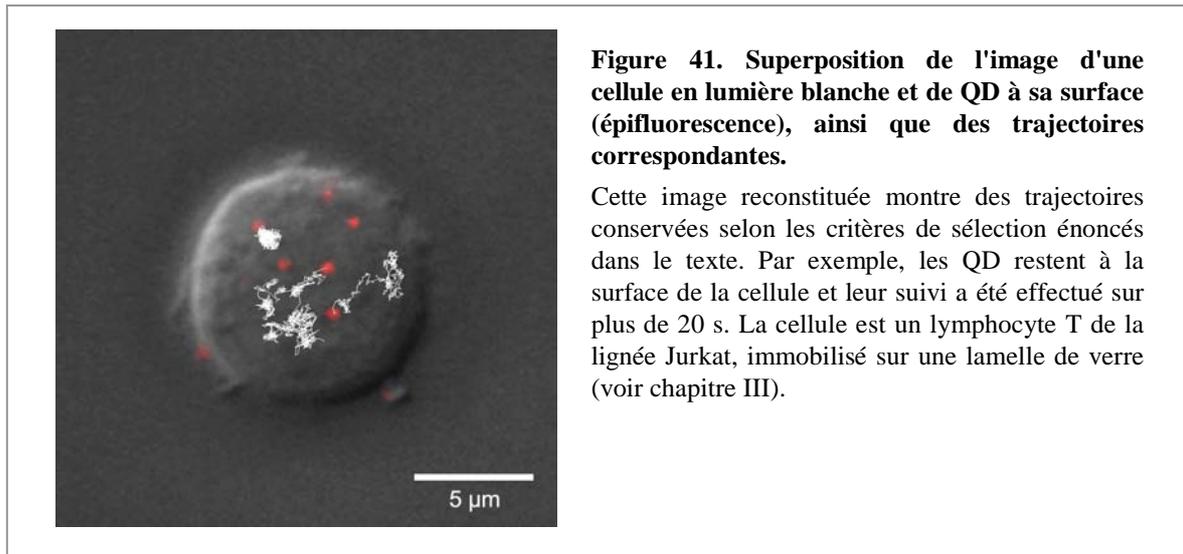
Toutes les trajectoires obtenues avec le programme MTT ne sont pas exploitables dans notre analyse. C'est pourquoi nous avons défini plusieurs critères de sélection pour ne conserver que les trajectoires pertinentes vis-à-vis de notre étude.

Tout d'abord, les acquisitions vidéo étaient réalisées sur des périodes de 80 s, mais la durée des trajectoires collectées variait entre 1 et 80 s. Or, il fallait que la particule soit suivie sur un temps suffisamment long pour ne pas perdre d'information. En particulier, l'analyse de la diffusion non-brownienne (dirigée, confinée, etc.) ne peut être précise que sur des périodes de temps longues (voir § 5). De plus, un suivi sur un temps trop court ne permet pas de détecter les transitions entre les divers modes de diffusion qui peuvent se produire pour un même récepteur. Au fur et à mesure de nos analyses, nous avons observé qu'un seuil de **20 s** représentait un compromis idéal pour éviter d'éliminer un trop grand nombre de trajectoires.

Ensuite, comme nous l'avons décrit, il est possible qu'un QD ne soit plus détecté sur quelques images, par exemple à cause de l'irrégularité de son signal de fluorescence (fig. 31), ce qui entraîne l'existence de vides dans la trajectoire. L'absence de ces coordonnées est une perte d'information qui nuit à l'analyse si elle est trop importante. C'est pourquoi nous n'avons conservé que les trajectoires ayant au plus **10 % de vides**. Afin d'obtenir un maximum de trajectoires, toutes celles ayant entre 10 et 20 % de vides ont été traitées avec un algorithme créé avec le logiciel Excel pour essayer de récupérer des portions de ces trajectoires où le nombre de vides est inférieur ou égal à 10%, et la durée supérieure à 20 s.

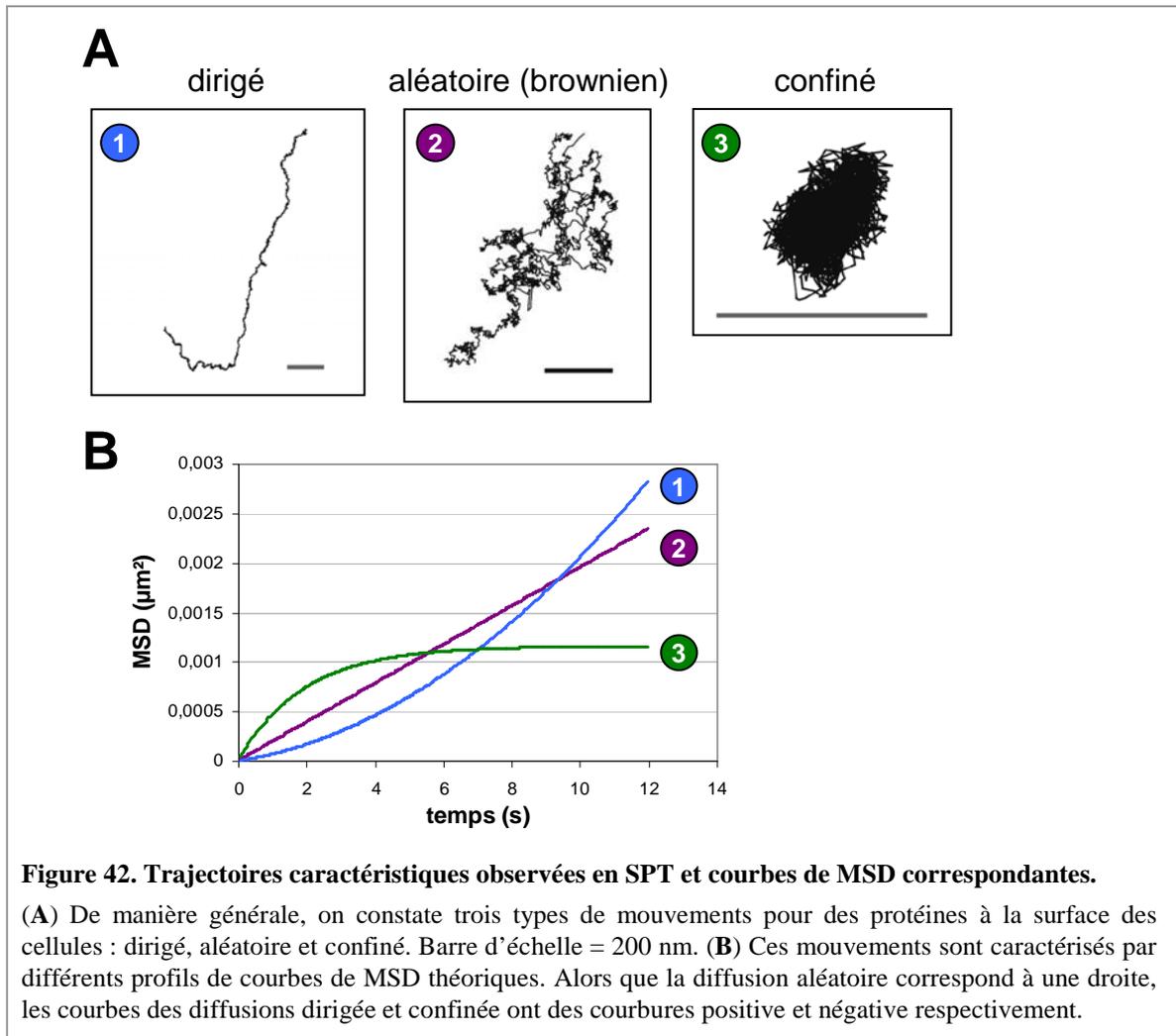
Enfin, il était important de vérifier que chaque QD était représenté par une seule trajectoire. En effet, le programme MTT génère une nouvelle trajectoire lorsqu'une particule n'est plus détectée et que le délai pour tenter de la retrouver, caractérisé par la variable T_{off} , est dépassé. C'est pourquoi nous avons systématiquement vérifié que les QD étaient représentés par une seule trajectoire. Dans le cas contraire, seules les trajectoires les plus longues ou les moins pourvues de vides ont été conservées. Par ailleurs, nous avons parfois

constaté que les trajectoires étaient interrompues parce que la taille de la zone de recherche pour la reconnexion était trop petite. Nous procédions alors à un ajustement de l'analyse en faisant varier le D_{\max} (voir § 4.1) jusqu'à ne plus avoir de coupure. Enfin, l'observation des images nous permettait de savoir quels QD étaient soit sur le bord des cellules, soit hors des cellules (*via* une extension membranaire par exemple, fig. 41). Les trajectoires qui en découlaient étaient alors rejetées.



5. Analyse de la diffusion des récepteurs

Les trois cas les plus simples de diffusion sont les suivants : diffusion aléatoire ou brownienne, dirigée et confinée. Bien que l'allure des trajectoires puisse sembler caractéristique pour ces trois cas (fig. 42A), elle peut parfois porter à confusion, comme par exemple faire croire à un confinement alors qu'il s'agit simplement du tracé qui repasse plusieurs fois dans une même zone à des instants différents. C'est pourquoi l'observation des trajectoires ne suffit pas pour déterminer le mode de diffusion correspondant, et qu'il est nécessaire de recourir à un outil mathématique adapté. Plusieurs méthodes existent aujourd'hui pour analyser la diffusion de constituants membranaires (Michalet, 2010). La plus communément utilisée fait appel au calcul du déplacement quadratique moyen, ou MSD (pour Mean Square Displacement). L'ajustement de la courbe expérimentale avec des modèles théoriques est la base de la détermination du mode de diffusion (voir § 5.3).



5.1. Déplacement quadratique moyen (MSD)

Le MSD correspond à l'aire moyenne parcourue par la particule pendant une période de temps donnée. On le calcule à partir des coordonnées $x(t)$ et $y(t)$ au sein de chaque trajectoire, à partir de la relation :

$$MSD(t, \delta t) = \langle (x(t + \delta t) - x(t))^2 + (y(t + \delta t) - y(t))^2 \rangle \quad \text{Eq. 5}$$

où l'intervalle de temps δt est un multiple de la durée d'acquisition d'une image, soit 40 ms, et qui a pour maximum la durée de la trajectoire. L'unité est le $\mu\text{m}^2/\text{s}$ lorsque les coordonnées sont exprimées en μm et le temps en s. Plus l'intervalle de temps est long, moins il y a de déplacements pris en compte dans le calcul, ce qui est à l'origine d'un bruit expérimental, induisant un écart parfois important avec les modèles mathématiques

théoriques. C'est d'ailleurs pourquoi l'intervalle de temps maximal est fixé par défaut à $1/10^{\circ}$ de la durée de la trajectoire, permettant tout de même d'avoir accès aux informations données par les temps longs (Qian *et al.*, 1991).

5.2. Intérêt du D_{1-2}

Une donnée intéressante peut être obtenue sans tenir compte du mode de diffusion : le coefficient de diffusion D_{1-2} , calculé à partir des deux premiers points de la courbe de MSD, c'est-à-dire pour les déplacements quadratiques moyens calculés pour les intervalles de temps correspondant à une fois et deux fois la durée d'acquisition d'une image, soit 40 et 80 ms dans nos conditions. En effet, pour des intervalles de temps δt très courts, la diffusion est purement aléatoire et respecte donc l'équation d'une diffusion brownienne (Lee *et al.*, 1991) :

$$MSD(\delta t) = 4 D \delta t \quad \text{Eq. 6}$$

L'intérêt du D_{1-2} est qu'il reflète l'environnement immédiat de la molécule d'intérêt suivie. Comme il est de plus peu soumis au bruit expérimental inhérent au calcul du MSD, on peut supposer qu'il représente la valeur la plus précise de coefficient de diffusion que l'on puisse obtenir. Ce point fera d'ailleurs l'objet d'une étude traitée dans le chapitre II.

5.3. MSD et modes de diffusion

La courbe du MSD en fonction des intervalles de temps δt est caractéristique pour les trois modes de diffusion les plus simples (fig. 42B). Les équations qui permettent de modéliser ces courbes sont présentées ci-dessous. Notons que les erreurs sur le calcul des positions dans une trajectoire sont à l'origine d'un bruit sur le MSD qui oblige à ajouter un paramètre supplémentaire ε dans toutes les équations qui sont données ici (ex : l'équation 6 devient $MSD(\delta t) = 4D\delta t + \varepsilon$).

5.3.1. Diffusion aléatoire ou brownienne

Ce mode diffusion correspond à un mouvement libre des molécules dans l'espace membranaire. Nous avons vu que dans ce cas le MSD en fonction du temps était une droite, définie par l'équation 6.

5.3.2. Diffusion dirigée

Le mode de diffusion « dirigé » a été observé sur cellules principalement pour des protéines en interaction avec le cytosquelette (Kusumi *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1993). La molécule suivie est contrainte par un déplacement linéaire, ce qui revient à inclure dans l'équation précédente un terme relatif à une vitesse (Saxton & Jacobson, 1997) :

$$MSD(\delta t) = 4 D \delta t + v^2 \delta t^2 \quad \text{Eq. 7}$$

Etant donné qu'il peut exister une confusion entre une courbe de MSD expérimentale d'un mouvement aléatoire et celle d'un mouvement dirigé, nous attribuerons le mode de diffusion dirigé lorsque la courbe de MSD est mieux ajustée avec l'équation 7 et lorsque la trajectoire suit un chemin dont la direction varie peu. Ceci sera discuté dans le chapitre II.

5.3.3. Diffusion confinée

Dans ce cas, la molécule suivie diffuse aléatoirement dans une zone délimitée par des obstacles difficilement franchissables. Il a été proposé par exemple que le cytosquelette d'actine sous-membranaire puisse jouer le rôle de barrière (voir Introduction - § 4.2.1.2). Si l'on considère un espace clos, le MSD, soit l'aire parcourue, va atteindre la limite de ce confinement et atteindre une valeur maximale aux temps longs (fig. 42B, Destainville & Salomé, 2006). L'équation suivante traduit ce phénomène :

$$MSD(\delta t) = \frac{L^2}{3} \left(1 - \exp\left(\frac{-12D\delta t}{L^2}\right) \right) \quad \text{Eq. 8}$$

où L est la taille caractéristique du confinement. Dans le cas d'une zone circulaire, on obtient le rayon R d'après :

$$R = \sqrt{\frac{L^2}{3}} \quad \text{Eq. 9}$$

Des cas plus complexes de confinements existent, où la molécule diffuse dans un domaine lui-même en mouvement, qui peut être aléatoire ou dirigé. Le déplacement de la molécule est caractérisé pour des intervalles de temps δt courts, alors que celui du domaine sera détecté pour de longs δt .

Dans le cas d'un domaine diffusant aléatoirement aux temps longs, ce qui est le cas d'un confinement dû à des interactions à longue distance entre protéines (voir Introduction -

§ 4.2.1.3), la courbe de MSD n'atteint pas de plateau et croît de manière linéaire pour des temps longs (Destainville & Salomé, 2006). Ce phénomène est modélisé en complétant l'équation 8 avec une composante aléatoire (mode de diffusion qui sera appelé « confiné aléatoire ») :

$$MSD(\delta t) = \frac{L^2}{3} \left(1 - \exp\left(\frac{-12D\delta t}{L^2}\right) \right) + 4D_{MACRO} \delta t \quad \text{Eq. 10}$$

où D_{MACRO} représente le coefficient de diffusion pour des δt longs.

En revanche, si le domaine suit un mouvement dirigé ayant un coefficient de diffusion D_{dir} et une vitesse v (voir équation 7), il est possible d'ajouter une composante de diffusion dirigée (mode de diffusion appelé « confiné dirigé ») à l'équation 8 :

$$MSD(\delta t) = \frac{L^2}{3} \left(1 - \exp\left(\frac{-12D\delta t}{L^2}\right) \right) + 4D_{dir} \delta t + v^2 \delta t^2 \quad \text{Eq. 11}$$

Il est important de noter que chaque image d'une particule conduit au calcul d'une position, qui est en réalité la moyenne des déplacements qui ont eu lieu pendant l'acquisition de l'image. Cette approximation affecte le calcul des paramètres D et L mesurés pour des confinements de petite taille. Notre équipe a défini des conditions où l'on peut corriger les valeurs apparentes D_{app} et L_{app} (Destainville & Salomé, 2006).

Un confinement est caractérisé par un temps de mise à l'équilibre τ calculé *via* l'équation :

$$R^2 = 4D\tau \quad \text{Eq. 12}$$

L'équation 9 nous permet de définir τ selon L et D :

$$\tau = \frac{L^2}{12D} \quad \text{Eq. 13}$$

La correction des valeurs apparentes de D et L peut être effectuée si ces valeurs respectent la relation suivante qui prend en compte la durée d'acquisition d'une image T_{exp} :

$$\tau_{app} = \frac{L_{app}^2}{12D_{app}} \geq \frac{2T_{exp}}{3} \quad \text{Eq. 14}$$

Dans nos expériences, T_{exp} est égal à 17 ms. L'étude menée par notre équipe a établi que, si l'équation 13 est respectée, on peut corriger la valeur τ *via* l'équation :

$$\tau_{réel} = \tau_{app} - \frac{T_{exp}}{3} \quad \text{Eq. 15}$$

On peut alors remonter aux valeurs réelles de L et D, avec les équations respectives :

$$L_{réel} = L_{app} \left(2 \frac{\tau_{réel}}{T_{exp}} - 2 \left(\frac{\tau_{réel}}{T_{exp}} \right)^2 \left(1 - \exp \left(- \frac{\tau_{réel}}{T_{exp}} \right) \right) \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Eq. 16}$$

$$D_{réel} = \frac{L_{réel}^2}{12 \tau_{réel}} \quad \text{Eq. 17}$$

On retiendra surtout la valeur corrigée du rayon R qui découle de ces calculs et de l'équation 9.

5.4. Index de confinement et détection de confinements transitoires

De même que pour la diffusion dirigée, il est nécessaire de pouvoir discriminer la diffusion confinée d'une diffusion aléatoire sur un autre critère que la comparaison des MSD expérimentale et théoriques. C'est pourquoi notre équipe a mis au point le calcul d'un index de confinement (Meilhac *et al.*, 2006), en collaboration avec l'équipe du Pr. Nicolas Destainville (Laboratoire de Physique Théorique, UMR 5152, Université de Toulouse III/CNRS), sur la base de travaux précédents (Saxton, 1993; Simson *et al.*, 1995).

Saxton a tout d'abord établi par des simulations numériques la probabilité qu'une molécule diffuse aléatoirement avec un coefficient de diffusion D, dans une zone de taille R, pendant une période Δt définie. Simson a ensuite repris ce calcul de probabilité et l'a appliqué à l'analyse de trajectoires expérimentales, de manière à dissocier des mouvements aléatoire de ceux confinés. De plus, il a eu l'idée de diviser chaque trajectoire en segments pour détecter des confinements transitoires.

Cependant, son calcul du coefficient de diffusion D prenait en compte l'ensemble de la trajectoire. Or, il est possible que D varie de manière importante au cours du temps, en particulier si des environnements membranaires différents sont explorés. Notre équipe a donc préféré calculer le coefficient $D_{1,2}$ sur chaque segment de trajectoire considéré, de durée Δt .

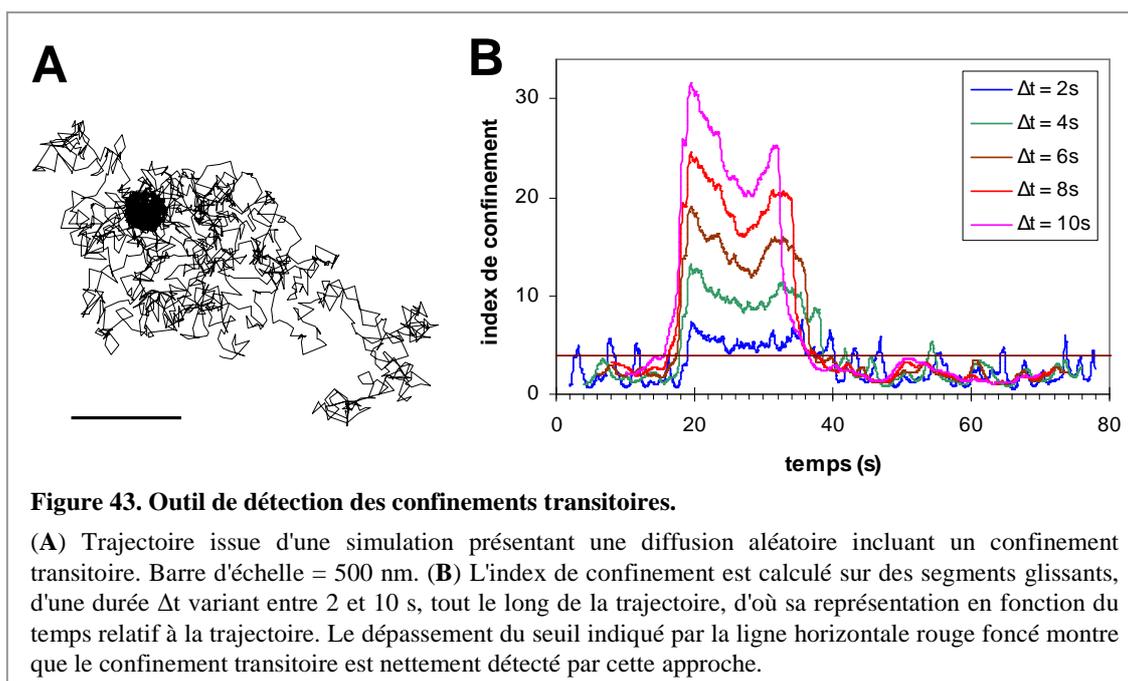
De plus, Simson déterminait la taille R de la zone explorée comme étant la distance entre la première position de la portion de trajectoire considérée, et la position la plus éloignée de celle-ci, toujours au sein de la portion prise en compte. S'il existe des positions aberrantes,

ou très éloignées par rapport à la majorité des autres positions, alors ce calcul surestime la valeur de R , et il est plus judicieux d'utiliser ΔR^2 , égal à la variance des distances entre les points du segment pris en compte. On définit alors un index de confinement Λ selon l'équation (Meilhac *et al.*, 2006) :

$$\Lambda = \frac{D_{1-2} \Delta t}{\Delta R^2} \quad \text{Eq. 18}$$

Un confinement est détecté si Λ est supérieur au seuil égal à **4** sur une période de temps supérieure à la durée Δt des segments considérés (Meilhac *et al.*, 2006). Dans le cas inverse, la diffusion est soit aléatoire, soit dirigée.

La génération par simulation numérique de trajectoires aléatoires incluant un confinement transitoire a démontré que cet index de confinement est un outil efficace pour valider la présence de domaines dans lesquels évoluent les protéines membranaires d'intérêt (fig. 43).

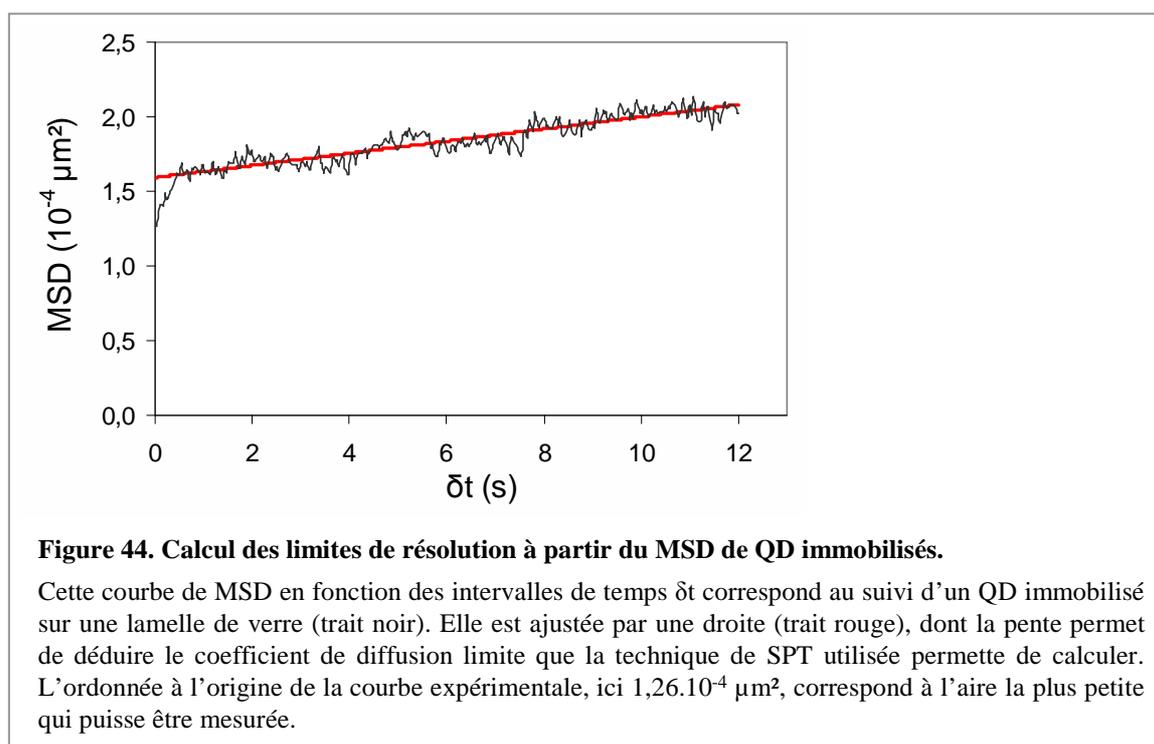


5.5. Limite de résolution de l'analyse et catégorie « immobiles »

Il existe des limites de résolution à chaque étape de notre analyse du mouvement des QD, et il est important de les quantifier à partir de données expérimentales.

Dans notre cas, la première étape est de déterminer la position de chaque particule. Comme nous l'avons précédemment présenté (§ 3), le rapport signal/bruit des QD et le grossissement utilisé influent sur la précision de calcul de position. L'efficacité du programme MTT est aussi mise en jeu puisqu'une erreur peut être commise lors de l'ajustement des valeurs d'intensité des pixels de l'image au modèle théorique du signal des particules. Pour quantifier expérimentalement l'erreur moyenne commise lors de ce calcul de position, appelée aussi « erreur de pointé », nous avons immobilisé des QD sur une lamelle de verre, enregistré des vidéos de 80 s et le programme MTT nous a fourni les positions de chaque particule dans chaque image. Pour une même particule, l'erreur de pointé est définie en x et en y par la moyenne des distances (en x et en y) entre les positions de deux images adjacentes. Nous avons obtenu une valeur de **7 nm**, que ce soit en x ou en y. Or, les pixels des images obtenues avec notre montage de vidéomicroscopie correspondent à des carrés de 100 nm de côté, ce qui montre que nous sommes capables de calculer la position des QD avec précision, bien au-delà de la résolution des images.

Les positions des QD immobilisés permettent aussi de calculer les valeurs limites pour D et R. Il faut tracer le MSD en fonction des intervalles de temps δt et ajuster la courbe par une droite, dont la pente est égale à quatre fois le coefficient de diffusion limite D_{limite} (fig. 44). Le premier point de la courbe correspond à l'aire limite détectable, soit R_{limite}^2 . Par l'analyse de 46 « trajectoires » de QD immobilisés, nous avons obtenu



$D_{\text{limite}} = (4,4 \pm 8,2) 10^{-6} \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $R_{\text{limite}} = 17 \pm 7 \text{ nm}$. Pour nous assurer d'être au dessus des limites de résolution de la technique, nous avons retenu les valeurs égales aux moyennes plus trois fois l'écart-type mesuré, soit pour D et R : **$2,9 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$** et **$38 \text{ nm}$** respectivement.

Ainsi, les trajectoires ayant un D inférieur à D_{limite} ont été classées comme immobiles. Dans le cas de trajectoires confinées où D est supérieur à cette limite, mais R est inférieur à R_{limite} , il existe deux possibilités selon la courbe de MSD :

- soit elle correspond à un modèle de diffusion confinée simple (Eq. 8), et la trajectoire est alors dans la catégorie « immobiles »,

- soit elle est mieux ajustée par un modèle de diffusion confinée complexe (Eq. 10 et 11), et dans ce cas le confinement n'est pas significatif et la courbe de MSD est à nouveau ajustée avec l'équation 6 ou 7, pour pouvoir classer la trajectoire dans les catégories « aléatoires » ou « dirigées », respectivement.

Il existe aussi une limite supérieure pour la détermination du rayon des domaines. En effet, plus le domaine est grand, plus il faudra de temps au récepteur pour le parcourir, et donc pour détecter ce domaine. La durée nécessaire à la détection d'un domaine peut être estimée par la définition du temps d'équilibration donné par l'équation (Daumas *et al.*, 2003) :

$$t_{\text{éq}} = \frac{L^2}{\pi^2 D} \quad \text{Eq. 19}$$

D'après l'équation 9, on obtient :

$$R = \sqrt{\frac{\pi^2 D t_{\text{éq}}}{3}} \quad \text{Eq. 20}$$

Les coefficients de diffusion varient en moyenne entre 10^{-3} et $10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$, et la durée des trajectoires est comprise entre 20 et 80 s. Cela nous permet de donner une plage limite pour la détermination de la taille des rayons :

- Si $D = 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $t = 20 \text{ s}$, l'équation 20 donne **$R = 0,25 \mu\text{m}$** ,
- Si $D = 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $t = 80 \text{ s}$, l'équation 20 donne **$R = 5,1 \mu\text{m}$** , qui correspond au rayon moyen des cellules (fig. 32).

Ainsi, la détection de domaines dont le rayon est supérieur à $0,25 \mu\text{m}$ ne sera possible que si la durée des trajectoires est supérieure à 20 s, ou si le coefficient de diffusion est supérieur à $10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Par ailleurs, nous avons observé que la surface des cellules lymphocytaires immobilisées fluctuait en x et y sur des temps longs (plusieurs dizaines de secondes). Ce phénomène est

inhérent à toute cellule vivante, mais il semble plus important sur ces cellules non-adhérentes, contrairement à ce que nous avons observé pour des cellules adhérentes. Ainsi, afin d'éviter la sur-interprétation des trajectoires confinées aléatoires ou confinées dirigées, nous les avons regroupées en une catégorie unique « confinées » où seuls les coefficients de diffusion D_{1-2} et les rayons R des domaines ont été conservés. En effet, si on imagine un mouvement « confiné dirigé » pour lequel la composante dirigée est uniquement due à un mouvement de la surface entière de la cellule, l'équation 11 permet de nous affranchir de ce biais, car ce dernier n'a pas d'impact sur le calcul de L .

Au final, nous disposons donc d'un système expérimental et analytique complet pour pouvoir étudier la dynamique de récepteurs membranaires à la surface de cellules vivantes. Une question restait cependant peu explorée : quelle est l'influence de la particule sur la mesure de la diffusion dans des expériences de SPT ? Le QD ne peut-il pas perturber la diffusion des récepteurs CD4 ou CCR5, et ainsi nous apporter des informations dynamiques biaisées ?

Pour tenter d'apporter un élément de réponse à cette question majeure, nous avons mené une étude de l'influence de particules de différentes natures sur la diffusion d'un lipide dans un système membranaire modèle, en comparant les résultats de SPT avec une autre technique de mesure de la diffusion : le FRAP. Ces travaux sont présentés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II

Influence de la particule dans des expériences de SPT : étude sur système membranaire modèle

Cette partie du manuscrit est consacrée à l'étude de l'influence de la particule sur la mesure de diffusion latérale, c'est-à-dire en deux dimensions, par la technique de SPT. Trois particules différentes ont été utilisées : les QD, les colloïdes d'or et les billes de latex. Les expériences ont été basées sur le suivi du mouvement d'un lipide *via* un anticorps couplé à une particule, dans un système membranaire modèle, la bicouche lipidique supportée. Nous avons évalué l'effet de la nature, de la taille et du taux de couverture en anticorps des particules sur la valeur de coefficient de diffusion mesurée, en comparaison avec une valeur référence déterminée par FRAP. En parallèle, les travaux ont inclus une comparaison de la précision des méthodes de calcul du coefficient de diffusion sur des trajectoires issues de simulations numériques.

En résumé, cette étude nous a permis de montrer que les QD constituent les meilleurs candidats pour des expériences de SPT sur cellules.

1. Présentation de l'étude réalisée

La mesure de la diffusion de constituants membranaires par SPT repose sur le fait que la particule traduit fidèlement le mouvement de la molécule suivie. A l'échelle de ces expériences, le nombre de Reynolds, c'est-à-dire le rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses qui s'appliquent au complexe particule-molécule d'intérêt, est très faible, indiquant que ce sont les forces visqueuses qui gouvernent majoritairement la diffusion de chaque entité. La viscosité d'une bicouche lipidique est environ 500 fois supérieure à celle du milieu aqueux environnant dans lequel la particule évolue. Cela signifie que la particule n'a pas d'effet sur la diffusion du constituant membranaire si sa taille reste inférieure à environ 100 fois celle de la molécule insérée dans la membrane (Triller & Choquet, 2008). Pour un lipide d'environ 2 nm de longueur, il est donc plus judicieux d'utiliser une particule dont le diamètre est inférieur à 200 nm.

Cependant, ces hypothèses nécessitaient d'être vérifiées expérimentalement. Quelques études se sont attachées à comparer les coefficients de diffusion D obtenus par SPT, avec une particule donnée, aux mêmes valeurs obtenues avec un autre type de marquage (molécules fluorescentes). Il a été montré sur membrane modèle (bicouche lipidique supportée) que l'utilisation de colloïdes d'or ou de billes de latex de 30 nm de diamètre, couplés à des anticorps pour suivre le mouvement d'un lipide, conduisait à des valeurs de D deux à trois fois inférieures à une valeur référence mesurée par la technique de FRAP (Lee *et al.*, 1991; Fein *et al.*, 1993). Selon ces travaux, la taille de la particule n'était pas un critère suffisant pour prévoir ou non une influence de la particule sur la mesure de coefficient de diffusion par SPT. Murcia *et al.* ont ensuite révélé que le greffage covalent d'un QD sur un lipide n'affectait pas sa diffusion ni dans une membrane modèle, ni dans la membrane plasmique de différentes lignées cellulaires (COS-7, HEK-293, 3T3 et NRK, Murcia *et al.*, 2008). Cependant, leur stratégie avait été de coupler la particule à la molécule d'intérêt, c'est-à-dire le lipide, avant insertion dans la membrane, ce qui ne correspond pas aux techniques de marquages utilisées pour suivre la diffusion d'un des constituants membranaires d'une cellule vivante (voir chapitre I - § 2.2). En revanche, Groc *et al.* ont évalué l'effet de l'accrochage d'un complexe QD-anticorps à un récepteur membranaire sur le coefficient de diffusion D mesuré, par comparaison avec le suivi du même récepteur marqué avec une petite molécule fluorescente (cyanine 5) couplée à un anticorps (Groc *et al.*, 2007). Leurs travaux réalisés à la surface de cellules neuronales ont démontré que les deux types de marquage conduisaient aux mêmes valeurs de D .

Ces études proposent que, pour réaliser des expériences de SPT, il vaut mieux choisir les QD (diamètre < 25 nm) aux colloïdes d'or et aux billes de latex, dont le diamètre est légèrement supérieur (30 nm de diamètre). Ces résultats ne permettent pas pour autant de savoir si c'est la nature de la particule ou sa taille, qui est à l'origine des différences de dynamique observées. Cela pourrait être aussi une combinaison des deux paramètres.

C'est pourquoi nous avons réalisé une étude systématique de l'influence de la particule (QD, colloïde d'or ou bille de latex) sur le coefficient de diffusion mesuré par SPT pour un lipide évoluant dans une bicouche lipidique supportée. Nous avons choisi de travailler avec des particules recouvertes d'un dérivé de l'avidine (streptavidine ou neutravidine), de manière à lier avec une grande affinité un anticorps biotinylé dirigé contre notre sonde lipidique, un lipide possédant une carboxyfluorescéine sur sa tête polaire. Ainsi, nous avons évalué la contribution de la nature de la particule, de sa taille, mais aussi de son taux de couverture en anticorps, sur les valeurs de coefficient de diffusion D mesurées, en les comparant à celle obtenue par FRAP dans les mêmes conditions expérimentales.

Par ailleurs, le choix d'une particule adaptée aux expériences de SPT n'a aucun lien avec le choix de la méthode de calcul du coefficient de diffusion. Il est donc nécessaire de connaître la précision des différentes méthodes proposées, sachant que toute imprécision engendre des variations dans les résultats qui peuvent conduire à une mauvaise interprétation. Nous avons pour cela généré des trajectoires par simulation numérique et comparé les coefficients de diffusion obtenus par trois méthodes différentes : ajustement par une droite de la courbe de MSD en fonction d'intervalles de temps ayant pour maximum $1/10^{\circ}$ de la durée des trajectoires (voir chapitre I - § 5.1), calcul du coefficient de diffusion D_{1-2} à partir de la pente formées par les deux premiers points de la courbe de MSD (voir chapitre I - § 5.2), ou calcul de la fonction de distribution cumulée des déplacements quadratiques (voir Michalet, 2010).

Cette dernière partie du travail a été réalisée au sein de l'équipe par le Dr Evert Haanappel, qui a aussi mené les travaux de SPT avec les billes de latex avec l'aide des stagiaires Lauriane Garcia, Charlotte Montacié et Stéphanie Hazan. Le Dr Laurence Salomé, qui dirige l'équipe, et le Dr Kevin Carayon ont effectué les mesures de coefficient de diffusion par FRAP. J'ai effectué les expériences de SPT avec les QD et les colloïdes d'or, avec la participation de deux stagiaires, Wassim Kaaki et Anne-Sophie Lamort. Le Dr Serge Mazères, ingénieur de la plateforme d'imagerie Toulouse RIO Imaging, a participé à la mise en place des montages microscopiques (SPT et FRAP).

L'ensemble de ces travaux ont été décrits dans l'article qui suit, intitulé : « Probing the influence of the particle in single particle tracking measurements of lipid diffusion ». Celui-ci a été soumis au journal « Soft Matter » et accepté pour publication.

2. Article n°1 (Soft Matter, DOI:10.1039/C2SM07018A)

PROBING THE INFLUENCE OF THE PARTICLE IN SINGLE PARTICLE TRACKING MEASUREMENTS OF LIPID DIFFUSION

Patrice MASCALCHI*, Evert HAANAPPEL*, Kévin CARAYON, Serge MAZÈRES and Laurence SALOMÉ

- 1 CNRS; IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale); 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France
- 2 Université de Toulouse; UPS; IPBS; F-31077 Toulouse, France

*These authors contributed equally to this work

Keywords (6): Single Particle Tracking, Supported Lipid Bilayer, Quantum Dot, FRAP, latex particles, membrane diffusion

Abstract

We present a systematic study of the influence of the nanoparticle used as a probe in Single Particle Tracking experiments with a supported lipid bilayer as a model system. Quantum Dots, 40 nm and 200 nm diameter fluorescent latex spheres, and 40 nm diameter gold colloids were attached to headgroup-labeled lipid molecules in the bilayer by means of an antibody. The percentage of the particle's surface covered with antibody was also varied. We made the choice to extract the diffusion coefficient from the first two points of the mean square displacement of the particle after demonstrating that the accuracy of this method is equivalent to a more rigorous but less prevalent analysis based on the cumulated probability function. We show that, under optimal conditions, Quantum Dots and also 40 nm latex beads have negligible influence on the lipid diffusion, whereas the diffusion coefficient of gold colloids and 200 nm diameter latex particles was systematically reduced 2- to 3-fold compared to the reference value obtained by FRAP. Interestingly, the diffusion coefficient of Quantum Dots and 40 nm latex beads depended on the percentage of the surface of the nanoparticle covered with antibody in an unexpected manner: at very low percentage the perturbation to the lipid diffusion due to the particle increased. We speculate that in this regime subtle details of antibody binding to the nanoparticle become important.

Abbreviations:

POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; acyl C12 NBD-PC: 1-acyl-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl}-*sn*-glycero-3-phosphocholine; DOPE-CF: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(carboxyfluorescein); MOPS: 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid; SPT: Single Particle Tracking; FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching; MSD: Mean Square Displacement; QD: Quantum Dot; latex40, latex200: 40 nm and 200 nm diameter latex particles; Au: gold colloids

Introduction

Since two decades, single-molecule imaging techniques have emerged as powerful methods to unveil the intimate organization and dynamics of molecular machineries in cellular or model systems. Soon after the advent of these techniques, which used colloidal particles as tracers, progress in CCD camera technology enabled the imaging of single fluorescent molecules with a high positional accuracy around 40 nm. Single-dye detection minimizes probe size and multivalency as well as possible and was thus involved in numerous and various studies of biological processes¹. However, its interest is limited for the analysis of the diffusion of membrane lipids and proteins because of the poor photostability of the fluorophores, which limits the duration of the trajectories². This drawback spawned a renewed interest in Single Particle Tracking (SPT), promoted in particular by the advent of Quantum Dots (QDs), small, brilliant and highly photostable particles, ideal alternatives to single fluorophores³.

Meanwhile, the question of the influence of the particle in Single Particle Tracking experiments was not explored in a systematic manner and still remains open. Only a few studies compared the diffusion coefficients measured by SPT and by single-dye tracking or FRAP. Regarding QDs, Groc et al. found similar mobilities for GFP tagged neurotransmitter receptors at the surface of neurons as deduced from the tracking of QD and Cy5 coupled to GFP-antibodies⁴. Cell plasma membranes, however, are highly complex. Analyzing the diffusion of lipids in simple model systems like supported lipid bilayers is probably the most suitable approach to allow conclusions to be drawn. In such model systems, QDs covalently grafted to lipids reported diffusion coefficients in excellent agreement with those measured by monitoring single dye-labeled lipids⁵, whereas 30 nm gold colloids⁶ and 30 nm latex beads⁷ led to values of the diffusion coefficients smaller by a factor of about 3 than those determined by FRAP using fluorescent dye labeling of the lipids. From this overview of the scarce literature on the topic, the need shows up of an overall comparison of the SPT results for the various existing candidate-particles obtained on the same model system with an identical experimental setup and method of analysis. This last point is another important aspect because the mathematical treatments of particle trajectories adopted by different labs are different and do not necessarily provide similar results (see reference⁸ and references therein).

In this study, we analyzed the influence of the size, material and conjugation rate of the particle on the diffusion of a lipid molecule in a supported lipid bilayer chosen as a model membrane system. We used a labeling strategy common to most of the approaches used for SPT studies on cell membranes. Neutraavidin- or streptavidin-coated Quantum Dots, colloidal gold and latex spheres of various sizes were conjugated to a biotinylated antibody directed against a lipid analog within the lipid bilayer. We verified the random nature of the lipid movements by a thorough statistical analysis of the trajectories. We determined the accuracy of several methods used to estimate diffusion coefficients using trajectories produced by numerical simulation. We evaluated the degree of perturbation introduced by

the particle by comparing the diffusion coefficients of the fluorescent lipid probe measured by SPT with that measured by FRAP.

Experimental

1. Materials

1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-acyl-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]lauroyl}-sn-glycero-3-phosphocholine (acyl-C12 NBD-PC) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(carboxyfluorescein) (DOPE-CF) were obtained from Avanti Polar Lipids (USA). Anti-fluorescein biotinylated monoclonal antibody (FIT-22 clone, cat. n° 408304) was obtained from Biolegend (USA). Streptavidin-coated quantum dots (655 nm, Q10121MP) were purchased from Molecular Probes, Invitrogen (Life Technologies, France). Neutravidin-coated 40 nm-latex fluospheres (F-8770), 200 nm-latex fluospheres (F-8774) and Neutravidin (A2666) were also purchased from Invitrogen (Life Technologies, France). Uncoated 40 nm-diameter gold colloids (EMGC40) were purchased from British Biocell International (UK). Throughout the text we will use the following names for the various particles: QD, latex40, latex200 and Au40.

All reagents were analytical grade and ultra-pure water (Milli-Q Gradient, Millipore, USA) was used for the preparation of the buffer solutions.

2. Preparation of Small Unilamellar Vesicles (SUV)

For SPT experiments, stock solutions of the lipids POPC, acyl-C12 NBD-PC and DOPE-CF in chloroform were mixed in a glass tube in a 100 : 1 : 0.5 molar ratio. For FRAP measurements, a mixture of POPC and acyl-C12 NBD-PC was prepared in a 100 : 2 molar ratio. In both cases, the mass of POPC per tube was 1 mg. The mixture was dried under a gentle stream of nitrogen gas and placed under vacuum (< 1 mbar) for 1 h to remove any trace of solvent. The dry residue was rehydrated in 1 mL of MOPS buffer (10 mM MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), 100 mM NaCl, 10 μ M EDTA and 0.02 % w/w NaN₃, pH 7) and the lipids resuspended by vortexing until no traces of lipid could be observed on the wall of the tube. The size of the multilamellar vesicles (MLV) obtained was reduced by sonication using a VibraCell sonicator (Bioblock Scientific, USA) equipped with a 3 mm tip and set to 12.5 W (3 cycles of 30 s). SUVs were prepared by extruding (Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids, USA) a sonicated MLV suspension, diluted to a concentration of 100 μ g/mL of POPC, through a 30-nm Nuclepore Track-Etch polycarbonate membrane (Whatman, USA). A minimum of 15 passes through the membrane ensured a homogeneous size of the SUVs.

3. Formation of supported planar lipid bilayers by vesicle fusion

The planar lipid bilayers were formed on clean hydrophilic glass coverslips mounted on glass slides using 0.5 mm-thick flexible silicon strips (Grace Bio-Labs, USA) as spacers. All glass elements were cleaned by ultrasonic cleaning (Branson, USA) in a bath of absolute EtOH for 5 min, oven dried at 110°C, followed by a 15 min exposure to a plasma of

0.05 mbar argon and 0.05 mbar oxygen (Pico plasma cleaner, Diener Electronic, Germany). The SUV suspension was injected in the experimental chamber formed between glass slide and coverslip, and incubated for 10 min. Rinsing was done with MOPS buffer (4 times the chamber volume) to remove the excess of SUV. The quality of the lipid bilayer was insured by inspection of the homogeneous fluorescence emitted by both probes NBD and CF, and also by uniform recovery after photobleaching.

4. FRAP measurements and analysis

Using a dedicated homemade device⁹, variable spot radius FRAP experiments were performed on a POPC/acyl-C12 NBD-PC (molar ratio 50:1) supported planar lipid bilayer prepared as described above. The bleaching time was set between 10 and 40 ms, and the fluorescence recovery was recorded for 20 s with a sampling time of 2 ms. Over 30 fluorescence recovery traces were recorded for each radius. The diffusion coefficient and the mobile fraction were obtained by fitting the data to the Soumpasis equation¹⁰.

5. Functionalization of the particles

Neutravidin coating of gold colloids

Of the particles we examined, only the gold colloids were purchased without a neutravidin coating. To functionalize them, 100 μ L of stock suspension of the gold colloids was centrifuged at 9300 g for 10 min at 4°C. The supernatant was removed and the gold colloids were resuspended in 100 μ L of 20 mM 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (pH 6.3) containing 30 μ g/mL of neutravidin, a concentration shown to prevent aggregation of the gold particles in 100 mM NaCl (data not shown). After incubation for 1 h at 4°C, the suspension was centrifuged at 5000 g for 30 min at 4°C. The supernatant was replaced by MOPS buffer without NaCl (rinsing step to remove free neutravidin). Finally, the gold colloids were centrifuged at 5000 g for 30 min at 4°C and resuspended in MOPS buffer. The functionalized gold colloids were used for SPT experiments the same day.

Preincubation of biotinylated anti-fluorescein antibodies with various avidin particles

Particles coated either with streptavidin or neutravidin were mixed with biotinylated anti-fluorescein antibody (anti-FI) in the MOPS buffer. Several mixtures were prepared to obtain various coverage percentages of antibodies for each particle. To estimate the percentage of coverage, we assumed that one antibody occupies a 6 nm-diameter disk on the particle. We give in the following the final concentrations in the incubation mixtures of particles and antibodies. For QDs: 1 nM QD and 0.5 nM anti-FI for 1% surface coverage, 0.5 nM QD and 2.2 nM anti-FI for 10%, and 0.3 nM QD and 4 nM anti-FI for 30%. For latex40: 0.4 nM latex40 and 0.72 nM anti-FI for 1%, 0.08 nM latex40 and 1.4 nM anti-FI for 10%, and 0.08 nM latex40 and 4.3 nM anti-FI for 30%. For latex200: 33 pM latex200 and 15 nM anti-FI for 10%, 33 pM latex200 and 45 nM anti-FI for 30%. For Au: 0.15 nM Au and 2.7 nM anti-FI for 10%. After a 5 min incubation of antibodies with particles, the mixture was dispensed in the chamber

containing the supported lipid bilayer. A rinse step was further done to remove excess of unbound particles if necessary.

6. Transmission electron microscopy

Specimens were prepared for electron microscopy using conventional negative staining. A drop of avidin-nanoparticle suspension (5-10 μL) was deposited onto a glow-discharged Formvar carbon-coated grid for 5 min. The drop was wicked from the edge of the grid with filter paper and immediately negatively stained with uranylacetate (1% for latex200, 2% otherwise). Grids were examined with a transmission electron microscope (Jeol 1200 EX) at 80 kV. Images were acquired using a digital camera (AMT-USA) at $\times 200,000$ – $\times 300,000$ magnification.

7. Single particle tracking experiments

Observation of particles was performed on an Axioplan 2 microscope (Zeiss, Germany) equipped with a Cascade II 512 EM-CCD camera (Roper Scientific, USA) operated at an acquisition frequency of 25Hz. Fluorescent particles, i.e. quantum dots and latex fluospheres, were illuminated with an X-CITE 120 light source containing a mercury vapor short arc lamp (Exfo, USA). Quantum Dots were observed through a Fluar 100 \times /1.30 Oil UV objective (Zeiss) and latex fluospheres through a Plan Aplanachromat 63 \times /1.40 Oil objective (Zeiss), both associated with a $\times 1.6$ multiplier tube in front of the camera. Fluorescent particles were observed using the following optical filters combinations [excitation, dichroic and emission]: [D450/50x, 560DCLP, HQ595lp] for QDs, [HQ546/12x, 560DCLP, D610/65m] for latex40 and [D470/40x, T510LPXRXT, D535/40m] for latex200. Gold colloids were observed using transmitted light from a 100 W halogen lamp through a Plan Aplanachromat 63 \times /1.40 Oil objective (Zeiss) associated with a $\times 4$ multiplier tube in front of the camera.

Detection and reconnection of the trajectories was carried out using the Multiple-Target Tracing (MTT) program developed with Matlab by Sergé et al.¹¹. Even though the MTT program was able to work at high-density labeling, we always chose low- or medium-density labeling conditions to facilitate long-lasting trajectories reconnection. Reconnected trajectories were further analyzed with a homemade program written in Visual Basic (VBA Excel, Microsoft). The mean square displacement was calculated for the experimental data with maximum time lag equivalent to 1/10th of the trajectory duration. The obtained MSD plot was fit with a linear equation corresponding to Brownian movement. The first two points of the MSD were used to evaluate D_{1-2} . In addition, the program calculates the index of confinement¹² of the trajectory to detect possible transient confinement.

8. Numerical simulations

Trajectories corresponding to a particle undergoing pure Brownian diffusion were simulated using the data graphing and analysis program Igor Pro 6 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA). The simulations used the Mersenne Twister pseudorandom number

generator to generate uniformly distributed random numbers and the Box-Muller transformation for random numbers with a Gaussian distribution. The trajectories had a length of $N = 3000$ points and a sampling interval Δt of 40 ms, to mimic our experimental conditions. Two approaches were used to generate Brownian trajectories. In the first approach, the sampling interval was subdivided into typically 1000 smaller intervals of length τ . In each interval of τ , a small step of fixed size, $l = (4D\tau)^{1/2}$, and a random direction was taken. All steps were added to obtain a random step for the interval Δt . In the second approach, single random steps in the x- and y-directions were taken for each interval Δt , where the steps were Gaussian distributed with standard deviation $\sigma = (2D\Delta t)^{1/2}$. Both methods were compared and shown to yield identical results.

For each trajectory, the MSD(t) was estimated by the formula:

$$MSD(t) = MSD(n\Delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} \left[(x_{n+i} - x_i)^2 + (y_{n+i} - y_i)^2 \right], n > 0$$

Here $t = n\Delta t$ is the time lag between two points on the trajectory. Three estimates of the diffusion coefficient were calculated: 1) D_{MSD} , from the slope of a straight line fit to a portion of the MSD(t) plot corresponding to 10% of the duration of the trajectory, 2) D_{1-2} , obtained from only the first two MSD(t) points: $D_{1-2} = [MSD(2\Delta t) - MSD(\Delta t)] / (4\Delta t)$, and 3) D_{CDF} , by fitting the cumulative distribution function $P(r^2, t)$ of the squared displacement to the expression:

$$P(r^2, t) = 1 - \exp\left(-\frac{r^2}{4D_{CDF}t}\right)$$

Results and discussion

1. Measurement of the diffusion coefficient by FRAP

We performed FRAP measurements to obtain a reference value of the diffusion coefficient of the lipids in the supported bilayer. The supported bilayers were formed on clean hydrophilic glass surfaces by vesicle fusion of POPC SUVs containing 2 mol % of acyl-C12 NBD-PC. This probe was chosen because NBD is more photostable than fluorescein and therefore allowed us to work in ideal experimental conditions (bleaching time less than 5 % of the characteristic diffusion time and negligible photobleaching during the fluorescence recovery phase). We first checked the completion of the bilayer formation and its quality, by wide-field fluorescence imaging of the bilayer and observation of fluorescence recovery after photobleaching using a regular fluorescence microscope. On our dedicated FRAP setup, we accumulated a series of about 30 recovery curves at different locations on the lipid bilayer with a bleach spot radius of 2.95 μm . Each curve was fitted individually to the Soumpasis¹⁰ equation, yielding an average lateral diffusion coefficient $D = (1.05 \pm 0.27) \mu\text{m}^2/\text{s}$ and an average mobile fraction $M = (94 \pm 5) \%$ (Figure 1), close to the value expected for free diffusion. Similar values for D and M were obtained with different spot radii, 1.95 μm and 3.45 μm , (data not shown), excluding micrometer-sized heterogeneities of the supported membranes. The values of D reported in the literature vary over a large range but

our measured diffusion coefficient D is in good agreement with those reported previously for supported phosphatidylcholine bilayers prepared in similar conditions^{6,13,14,15,16}. Note in this respect that a careful examination of all reported data suggests that the use of detergent in the protocol of support cleaning systematically leads to high values of D comprised between 1.4 and 8 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ^{17,18,19,20,21,22}. On the contrary, the influence of the nature of the substrate (glass, quartz or silicon) seems negligible^{13,14}.

2. Tracking of lipids in the supported lipid bilayer

For the SPT experiments, we prepared supported POPC bilayers containing 1 mol% of acyl-C12 NBD-PC and 0.5 mol% of DOPE-CF. NBD-PC serves merely for the visual inspection of the integrity of the bilayer by fluorescence microscopy. By means of a biotinylated anti-fluorescein antibody, various streptavidin- or neutravidin-coated nanoparticles (referred to as avidin-nanoparticles in the following) could be bound to DOPE-CF (Figure 2). The diameters of the different avidin-nanoparticles, determined by electron microscopy (Figure 3) and the image analysis software ImageJ, range between about 20 to 200 nm: $d(\text{QD}) = (18.5 \pm 0.4) \text{ nm}$, $d(\text{Au}) = (40.9 \pm 0.5) \text{ nm}$, $d(\text{latex40}) = (37.4 \pm 1.0) \text{ nm}$ and $d(\text{latex200}) = (189 \pm 2) \text{ nm}$ (mean \pm s.d.). They are in good agreement with the specifications of the manufacturers.

The biotinylated fluorescein antibodies were conjugated to the avidin-nanoparticles during a 5 min preincubation. Assuming full binding of the antibodies in the mixture and a diameter of their equivalent sphere of 6 nm, we adjusted the fraction of the particle's surface coated by the antibodies to 1, 10 and 30%. For the Au nanoparticles we only prepared a 10 % antibody coverage. After preincubation, the conjugated nanoparticles were brought into contact with the bilayer and allowed to bind to the DOPE-CF for 5 min. If an excess of unbound particles remained that could perturb the observations, the experimental chamber was rinsed with buffer. Particles attached to the bilayer and diffusing while remaining in focus could be observed for 20 to 30 minutes, although some particles appeared stuck to the supported membrane, presumably due to non-specific interactions with the glass. During control experiments in the absence of DOPE-CF or with non-conjugated avidin-nanoparticles, only immobile particles could be observed on the bilayer. This proves that mobile particles are specifically tethered to the lipid probe DOPE-CF through the antibody. Several attempts to limit the non-specific binding by adding blocking agents such as BSA (even at concentrations as low as 0.002% (w/w)) led to visible defects of the bilayer. Nevertheless, the presence of a small fraction of immobile particles did not prove to perturb the diffusion of the mobile particles or the subsequent analysis of the image sequences. Therefore, we did not pursue our efforts to avoid non-specific binding. Image sequences of 40 s to 2 min length were accumulated from at least two independent samples for each conjugated nanoparticle. Trajectories were determined from these image sequences using the program MTT¹¹. We evaluated the overall localization uncertainty in the x- and y-direction, σ_x and σ_y , as the standard deviation of the positions determined on image

sequences of nanoparticles immobilized on glass slides. For the latex40 particles we found $\sigma_x = 13$ nm and $\sigma_y = 19$ nm for an image sequence of 2 min, which includes contributions from the localization uncertainty for each image and from the mechanical drift of the microscope.

For the latex200 at 1% antibody coverage no mobile particle could ever be observed despite prolonged incubation. This probably occurred because the probability of an encounter between a grafted antibody with the DOPE-CF in the bilayer dramatically decreased due to the large size of the particle and low density of the antibody at its surface.

3. Trajectory analysis, diffusion mode and estimation of the diffusion coefficient

Trajectories of single particles are traditionally analyzed using either the Mean Square Displacement (MSD) or the Cumulative Distribution Function of the square displacement. Theoretical expressions for the MSD can be found in the literature for different diffusion modes^{23,24}. The corresponding plots of MSD versus time have a characteristic shape: linear for Brownian diffusion, positive curvature for directed diffusion, negative curvature and saturation at large times for confined diffusion.

Accordingly, the shape of experimental MSD plots is often used to identify the diffusion mode. However, experimental MSD plots like those shown in Figure 4 can deviate significantly from the theoretical formula. The numerical simulations we have done illustrate this point. In Figure 5a we show the MSD plots of ten simulated trajectories for time intervals up to 10% of the trajectory length. All trajectories correspond to purely Brownian diffusion with an identical diffusion coefficient of $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Details of the simulations are given in the Experimental section. None of the curves has the predicted strictly linear behavior. Several display the upward turn characteristic of directed diffusion, whereas others have a shape reminiscent of confined diffusion. Fitting theoretical functions to these MSD's would lead to incorrect values of the diffusion coefficient and classification of the diffusion mode according to their shapes would give erroneous conclusions.

The proper identification of the diffusion mode is delicate and has been the subject of several papers^{25,26}. In the absence of an active process, which is the case in our experiments, the directed diffusion mode can be ruled out without further analysis. The corresponding trajectories can be treated as random walks. Detecting confined diffusion is more subtle. Although our supported lipid bilayers appeared homogeneous as observed by fluorescence microscopy, they could nevertheless present defects²⁷ or heterogeneities on the subwavelength scale. These defects could lead to transitory immobilization or confinement of the lipids that would not be detectable in simple MSD plots. We therefore supplemented our analysis with a calculation of the index of confinement¹², a powerful tool previously developed by us, to check for the randomness of the trajectories. The index of confinement, $\Lambda(t)$, is the instantaneous ratio of the variance of a pure random walk (equal to $D\delta t$) to the variance of the considered trajectory computed on time intervals of length δt centered around t . We estimated the instantaneous D from the first two points of the local $\text{MSD}(t)$. For all trajectories with $\text{MSD}(t)$ plots showing a saturation at large times, typical of a

confined diffusion mode, as for those having linear MSD(t) plots, the index of confinement calculated on sliding intervals of various durations never exceeded 4, the limit value to classify as a random walk, for periods longer than the sliding interval (Figure 4). The tracks of the lipids labeled with diverse nanoparticles in the supported membranes are thus pure random walks.

The extraction of reliable numerical values of the physical parameters, such as the diffusion coefficient, from single molecule trajectories is still a question under progress. Much effort has been devoted towards the development of improved tools for the analysis of behaviors more complex than pure random diffusion which are not accurately addressed by a sole MSD analysis.

The large deviations of the MSD from the theoretically expected curve originate from the fact that the MSD calculation involves overlapping intervals. Except at very small time lags, the number of independent intervals is much smaller than the number of points in the trajectory. As a consequence, neighboring points of the MSD are correlated. The statistical properties of the MSD have been derived by Qian *et al.*²⁸. This work has recently been extended by Michalet⁸ to take into account localization uncertainty. This author derived a theoretical expression to determine the optimal number of MSD points to use in the fit to obtain the most accurate estimate of D. We prolonged this study by the comparison of the performance of the MSD analysis with the cumulative distribution function of square displacements, $P(r^2, t)$, which is a widely used alternative method to analyze particle trajectories^{2,23,24}. For this purpose, we generated 1000 simulated single-particle trajectories of 3000 steps with $D = 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ and frame duration $\Delta t = 40 \text{ ms}$, and compared the values of the parameters extracted by both methods. Whereas the individual MSD curves generally deviate from straight lines at large time lags, the cumulative distribution functions of the square displacements (Figure 5b) calculated for the same set of trajectories collapse on a single master curve, suggesting that this should be the preferred method to evaluate D. We computed the diffusion coefficients from the MSD, either by a fit using all MSD(t) points, D_{MSD} , or from only the first two points of MSD(t), D_{1-2} , and by the fit of the calculated $P(r^2, t)$ curves, D_{CDF} . As represented by the histograms shown in Figure 5c, D_{MSD} gives a rather poor estimate of D, its average value $\langle D_{\text{MSD}} \rangle = (0.995 \pm 0.287) \mu\text{m}^2/\text{s}$ approaches the real D value but with a large error bar. D_{1-2} and D_{CDF} provide instead very good estimations of D with comparable precision, $\langle D_{1-2} \rangle = (1.000 \pm 0.031) \mu\text{m}^2/\text{s}$ and $\langle D_{\text{CDF}} \rangle = (0.999 \pm 0.021) \mu\text{m}^2/\text{s}$ (see Figure 5c), and can thus be used indifferently in experimental conditions similar to ours.

In view of the generally predominant use of the MSD for the calculation of D, we have chosen to use this approach for the analysis of our experimental results. Given the small localization uncertainty in our experiment and the expected value of D, Michalet's results⁸ predict that the most precise value of D is obtained using only the first two MSD points. This also follows from our simulations. Accordingly, we have estimated all diffusion coefficients from D_{1-2} .

4. Influence of the particle on the measured diffusion coefficient

In Figure 6, we show histograms of the distribution of the logarithm of the diffusion coefficients measured for all combinations of particle size, material and percentage of surface covered by antibody. The solid line is a Gaussian fit to the histograms; these curves will be used in the following sections to compare the effect of size, percentage of antibody coverage and particle material. Table 1 lists the average values of the diffusion coefficient for each experimental condition.

Our experimental results show that measurements by SPT of the diffusion coefficient of a lipid using probe particles of various sizes and percentages of surface coverage yield significant differences in the obtained values. In the following paragraphs, we examine the dependence of the diffusion coefficient on the different physical parameters of the tracers.

Dependence of the diffusion coefficient on the particle's size

To analyze the effect of the particle's size independently of the other parameters, we consider the two sets of data obtained for the latex microspheres of diameter 40 nm and 200 nm, at 10% and 30% of surface covered by the antibody (see Figure 7). For both percentages, the latex200 have a measured diffusion coefficient lower by a factor of about 2 to 3 than the latex40. The latter have estimates of D close to the value measured by FRAP. This result contradicts the generally accepted view that, in the absence of obstacles or impediments to the diffusion in the space outside the membrane, the size of sub-micrometer-sized tags has a negligible influence on the diffusion of molecules in the membrane, dominated by Brownian and viscous forces, because the viscosity of the membrane is about 500 times larger than that of the surrounding fluid²⁹. On the contrary, it suggests that hydrodynamic forces could affect the motion of the membrane probes in Single Particle Tracking experiments. The above observations seem to indicate that the level of impediment to the diffusion of the lipid probe also depends on the percentage of antibody coverage of the particles. Indeed, on increasing the particle size from 40 nm to 200 nm, the diffusion coefficient decreases by about 50% for a 10% coverage, but by about 70% for a 30% coverage. The following section is dedicated to this question.

Dependence of the diffusion coefficient on the particle's area covered with antibody

We have tracked lipid molecules with QDs and latex particles having increasing surface fractions covered with antibody. The corresponding D_{1-2} histograms are presented in Figure 8. We found that the measured D_{1-2} depends on the percentage of coverage. For the latex200 particles, D_{1-2} decreases with increasing percentage of coverage. A similar result was obtained in the pioneering work of Lee et al.⁶ who observed that the diffusion coefficient of lipids tagged with multivalent 30 nm gold colloidal particles (percentage of surface coverage unspecified) was lower than that of those labeled with paucivalent colloids. This may be explained by the fact that multivalent particles can bind to multiple lipid molecules, creating lipid disks within the bilayer with slower diffusion than a single lipid

molecule, and that the probability of multiple binding increases with increasing percentage of coverage of the particle's surface with antibody.

Surprisingly, we obtained a markedly opposite result with the latex40 and, to a lesser extent, the QDs. Thus, QDs and latex particles with diameters less than or equal to 40 nm diffuse faster upon increasing the fraction of surface covered with antibody. We propose a hypothesis to explain this counterintuitive observation. The non-site-specifically biotinylated antibodies used in this study, which are commonly used in SPT experiments, typically carry between 3 and 6 biotin groups per antibody (Biolegend, personal communication). As a result, they can bind to the avidin on the particle's surface in several distinct orientations, depending on which biotin group on the antibody is involved in binding. Not all antibody orientations are optimal for subsequent binding to a membrane lipid. With increasing percentage of antibody coverage, the number of optimally oriented antibodies increases and thus the probability to bind to a lipid probe with the largest particle-membrane distance and minimal perturbation of particle motion. Increasing the percentage of surface coverage also increases the probability of binding to multiple lipid molecules, as is indeed seen for latex200 particles, but in the case of small-diameter particles such as QDs and latex40, the high curvature prevents additional antibody binding once the initial binding has taken place, as long as the percentage of antibody coverage is not too large.

Dependence of the diffusion coefficient on the particle's material

Our data allow us to evaluate the influence of the particle's material for a 10% percentage of antibody coverage (Figure 9). The QDs do not seem to influence particle diffusion since D_{1-2} is close to the reference value obtained by FRAP. The diffusion coefficient obtained with latex40 is similar; the small difference with the value obtained for QDs could be accounted for by the difference in size. However, 40 nm gold colloidal particles have a significantly lower diffusion constant than our reference value. A similar difference was reported by Lee et al.⁶. Gold colloids are known to establish various interactions with biomolecules³⁰ or with the substrate, which may be responsible for a reduction in particle diffusion. This comparison between different probe materials suggests that QDs and latex40 particles are faithful probes of the diffusion of membrane constituents, whereas gold colloids influence the diffusion properties by inducing non-specific interactions.

Conclusions

Our Single Particle Tracking experiments on supported lipid membranes have shown that QDs are faithful reporters of the diffusion of membrane lipids, introducing minimal perturbation. Indeed, the diffusion coefficients obtained by FRAP and by SPT using QDs are very similar. However, an important drawback associated with QD is the blinking of the probe, making it difficult to continuously track the particle. We have demonstrated that good alternatives to QDs are fluorescent 40 nm diameter latex particles, which suffer neither from blinking nor from photobleaching.

In addition, our experiments reveal that the details of the binding of the antibodies to the nanoparticle are important and can lead to subtle and counterintuitive effects. This observation goes against the common goal to minimize the number of antibodies per particle and rather suggests that an optimal percentage of coverage exists.

Acknowledgements

We would like to acknowledge W. Kaki, L. Garcia, C. Montacié and S. Hazan for their help during the experiments. This work was supported by grants from ANRS. P. M. is a recipient of ANRS and Sidaction financial supports. This work also benefited from the assistance of the electron microscopy facility of the FRBT (Fédération de Recherche en Biologie de Toulouse). Our group belongs to the CNRS consortium CellTiss.

References

1. Sako, Y. Imaging single molecules in living cells for systems biology. *Mol Syst Biol* **2**, (2006).
2. Wieser, S. & Schütz, G.J. Tracking single molecules in the live cell plasma membrane-Do's and Don't's. *Methods* **46**, 131-140 (2008).
3. Pinaud, F., Clarke, S., Sittner, A. & Dahan, M. Probing cellular events, one quantum dot at a time. *Nat Meth* **7**, 275-285 (2010).
4. Groc, L. *et al.* Surface Trafficking of Neurotransmitter Receptor: Comparison between Single-Molecule/Quantum Dot Strategies. *The Journal of Neuroscience* **27**, 12433 -12437 (2007).
5. Murcia, M.J., Minner, D.E., Mustata, G.-M., Ritchie, K. & Naumann, C.A. Design of Quantum Dot-Conjugated Lipids for Long-Term, High-Speed Tracking Experiments on Cell Surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 15054-15062 (2008).
6. Lee, G.M., Ishihara, A. & Jacobson, K.A. Direct observation of brownian motion of lipids in a membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 6274 -6278 (1991).
7. Fein, M. *et al.* Lateral mobility of lipid analogues and GPI-anchored proteins in supported bilayers determined by fluorescent bead tracking. *J. Membran Biol.* **135**, (1993).
8. Michalet, X. Mean Square Displacement Analysis of Single-Particle Trajectories with Localization Error: Brownian Motion in Isotropic Medium. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **82**, 041914-041914 (2010).
9. Lopez, A., Dupou, L., Altibelli, A., Trotard, J. & Tocanne, J.F. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments under conditions of uniform disk illumination. Critical comparison of analytical solutions, and a new mathematical method for calculation of diffusion coefficient D. *Biophys J* **53**, 963-970 (1988).
10. Soumpasis, D.M. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys J* **41**, 95-97 (1983).
11. Sergé, A., Bertaux, N., Rigneault, H. & Marguet, D. Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nat. Methods* **5**, 687-694 (2008).
12. Meilhac, N., Le Guyader, L., Salomé, L. & Destainville, N. Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. *Phys. Rev. E* **73**, 011915 (2006).
13. Yoshina-Ishii, C. *et al.* Diffusive dynamics of vesicles tethered to a fluid supported bilayer by single-particle tracking. *Langmuir* **22**, 5682-5689 (2006).
14. Murray, D.H., Tamm, L.K. & Kiessling, V. Supported double membranes. *J. Struct. Biol.* **168**, 183-189 (2009).
15. Min, Y., Pesika, N., Zasadzinski, J. & Israelachvili, J. Studies of bilayers and vesicle adsorption to solid substrates: development of a miniature streaming potential apparatus (SPA). *Langmuir* **26**, 8684-8689 (2010).
16. Salomé, L., Cazeils, J.L., Lopez, A. & Tocanne, J.F. Characterization of membrane domains by FRAP experiments at variable observation areas. *Eur. Biophys. J.* **27**, 391-402 (1998).
17. Tamm, L.K. & McConnell, H.M. Supported phospholipid bilayers. *Biophys. J.* **47**, 105-113 (1985).
18. Wagner, M.L. & Tamm, L.K. Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins: silane-polyethyleneglycol-lipid as a cushion and covalent linker. *Biophys. J.* **79**, 1400-1414 (2000).

19. Seu, K.J., Cambrea, L.R., Everly, R.M. & Hovis, J.S. Influence of lipid chemistry on membrane fluidity: tail and headgroup interactions. *Biophys. J.* **91**, 3727-3735 (2006).
20. Seu, K.J. *et al.* Effect of Surface Treatment on Diffusion and Domain Formation in Supported Lipid Bilayers. *Biophys J* **92**, 2445-2450 (2007).
21. Guo, L. *et al.* Molecular diffusion measurement in lipid bilayers over wide concentration ranges: a comparative study. *Chemphyschem* **9**, 721-728 (2008).
22. Scomparin, C., Lecuyer, S., Ferreira, M., Charitat, T. & Tinland, B. Diffusion in supported lipid bilayers: influence of substrate and preparation technique on the internal dynamics. *Eur Phys J E Soft Matter* **28**, 211-220 (2009).
23. Saxton, M.J. & Jacobson, K. SINGLE-PARTICLE TRACKING: Applications to Membrane Dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 373-399 (1997).
24. Pinaud, F. *et al.* Dynamic Partitioning of a Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Protein in Glycosphingolipid-Rich Microdomains Imaged by Single-Quantum Dot Tracking. *Traffic* **10**, 691-712 (2009).
25. Huet, S. *et al.* Analysis of Transient Behavior in Complex Trajectories: Application to Secretory Vesicle Dynamics. *Biophysical Journal* **91**, 3542-3559 (2006).
26. Bouzigues, C. & Dahan, M. Transient Directed Motions of GABAA Receptors in Growth Cones Detected by a Speed Correlation Index. *Biophysical Journal* **92**, 654-660 (2007).
27. Sonnleitner, A., Schutz, G. & Schmidt, T. Free brownian motion of individual lipid molecules in biomembranes. *Biophys J* **77**, 2638-2642 (1999).
28. Qian, H., Sheetz, M.P. & Elson, E.L. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys J* **60**, 910-921 (1991).
29. Triller, A. & Choquet, D. New Concepts in Synaptic Biology Derived from Single-Molecule Imaging. *Neuron* **59**, 359-374 (2008).
30. Goodman, S.L., Hodges, G.M., Trejdosiewicz, L.K. & Livingston, D.C. Colloidal gold markers and probes for routine application in microscopy. *J Microsc* **123**, 201-213 (1981).

Figure captions

Figure 1. Representative fluorescence recovery curve after photobleaching. Fluorescence intensity, normalized to its prebleach average value, as a function of time is collected with a spot radius of 3.45 μm . The solid line is the fit to the Soumpasis equation¹⁰.

Figure 2. Scale drawing of the Single Particle Tracking experiment of a headgroup-labeled lipid molecule in a supported planar lipid bilayer. The lipid bilayer of POPC/DOPE-CF/Acyl-C12 NBD-PC (molar ratio 100:0.5:1) is formed on a glass coverslip (see Experimental section). Biotinylated anti-fluorescein antibodies conjugated to various streptavidin- or neutravidin-coated particles, whose relative sizes are indicated, are used to specifically track DOPE-CF lipid probes. Acyl-C12 NBD-PC serves to verify bilayer integrity.

Figure 3. Transmission electron micrographs of tested nanoparticles. Nanoparticles, coated with either streptavidin or neutravidin (see Experimental section), were imaged with a Jeol 1200EX transmission electron microscope after adsorption on ionized carbon grids and negative staining with 2% uranyl acetate (except for d : 1%). (a) Quantum Dot (b) Gold colloid (c) 40 nm-diameter and (d) 200 nm-diameter latex beads.

Figure 4. Typical experimental trajectories for 40 nm diameter latex nanoparticles with 1% surface coverage (duration 2 min) with corresponding MSD and confinement index plots for various values of the sliding time interval δt . The MSD curves are found to be reminiscent of (A) random diffusion, (B) confined diffusion and (C) directed diffusion. Plots of the confinement index in cases (A) and (B) show absence of confinement. Directed diffusion can be ruled out in supported lipid bilayers, therefore analysis using the index of confinement is not relevant for (C). The deviations from straight line behaviour of the MSD plots in (B) and (C) are attributed to statistical fluctuations. The scale bar is 5 μm .

Figure 5. (a) MSD plots of 10 simulated trajectories of Brownian diffusion with $D = 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. The red line is the MSD plot predicted by theory. (b) Cumulative distribution functions of the same 10 trajectories are indistinguishable. The red curve is the theoretical prediction. (c) Histograms of the diffusion coefficients evaluated from 1000 simulated trajectories, calculated for each trajectory from a fit to the MSD plot (D_{MSD}), from the first two points of the MSD plot (D_{1-2}) or from a fit to the cumulative distribution function (D_{CDF}).

Figure 6. Histograms of $\log D_{1-2}$ for all studied avidin-nanoparticles and for all examined percentages of surface coverage. The Gaussian fits are obtained by fitting the cumulative distribution function of a Gaussian distribution to the cumulative distribution of the measured values of $\log D_{1-2}$.

Figure 7. Distribution of $\log D_{1-2}$ as a function of particle size, for 10% and 30% of surface coverage.

Figure 8. Distribution of $\log D_{1-2}$ as a function of percentage of the particle's surface covered by antibody, for QDs, latex40 and latex200 nanoparticles.

Figure 9. Comparison of the distribution of $\log D_{1-2}$ between the different nanoparticle materials examined, for 10% of surface coverage.

Table 1. Size and diffusion coefficient values determined for each type of nanoparticle. The size of the nanoparticles was determined on transmission electron micrographs, using the image analysis software ImageJ ($n = 30$). Diffusion coefficients D_{1-2} correspond to the mean value of about 100 trajectories and are reported as a function of surface coverage of the nanoparticles.

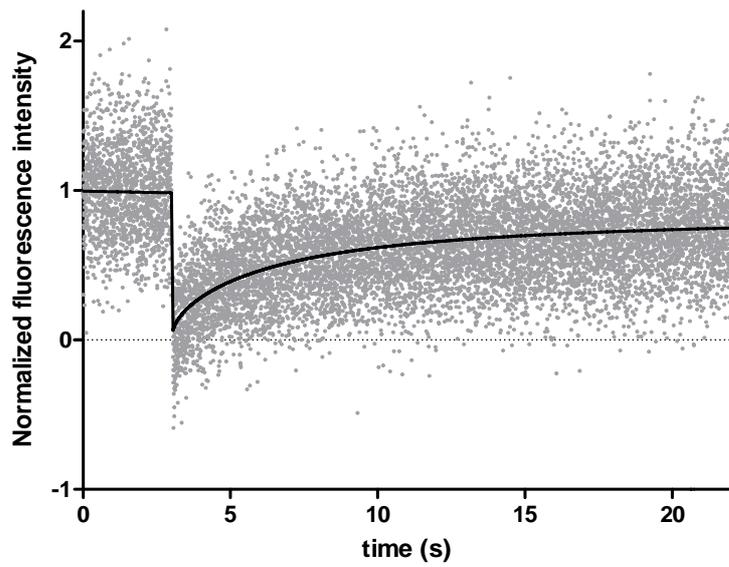


Figure 1.

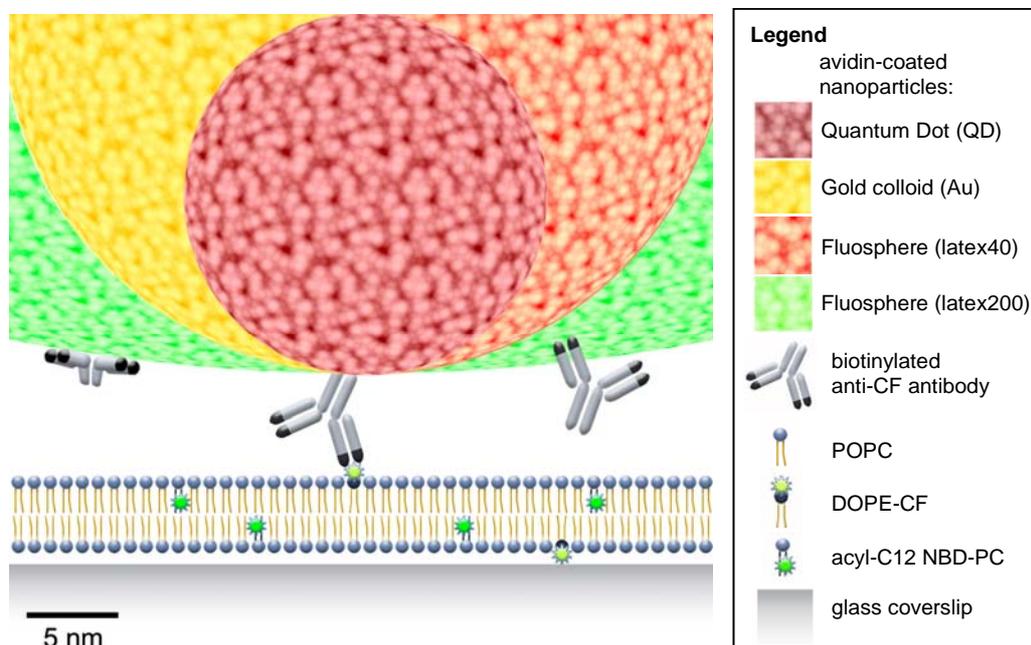


Figure 2.

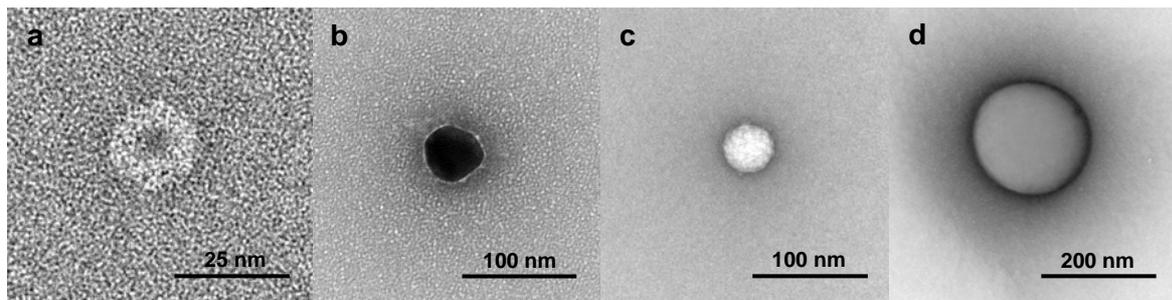


Figure 3.

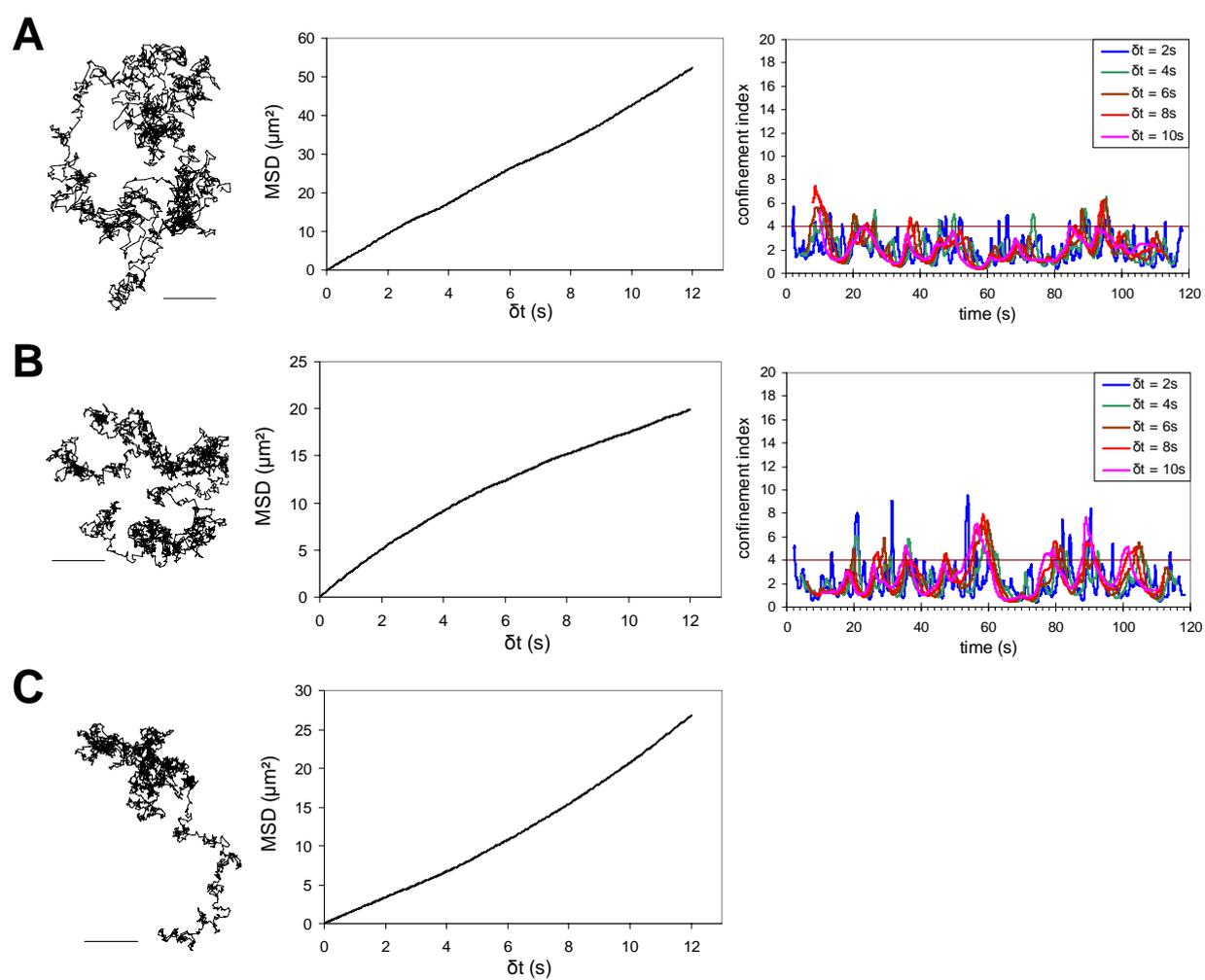


Figure 4.

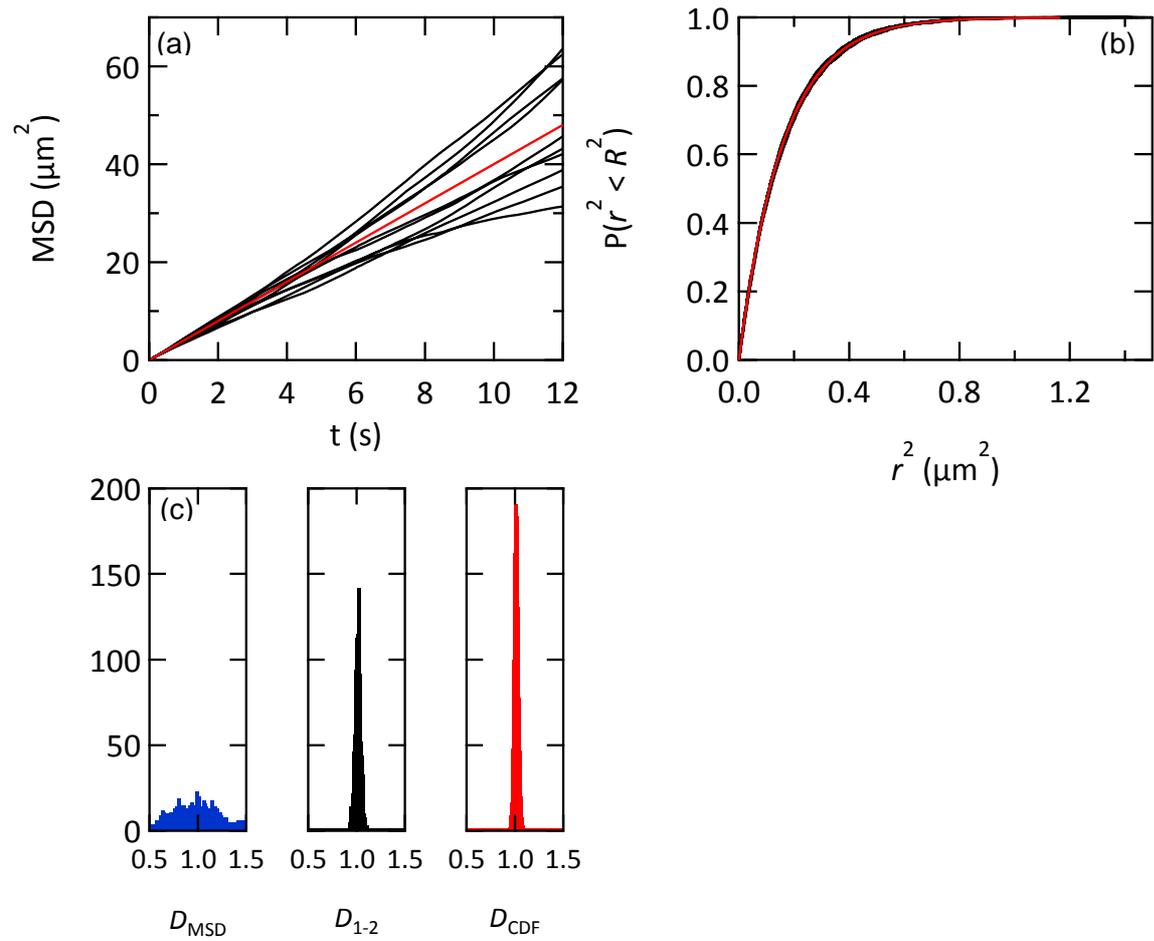


Figure 5.

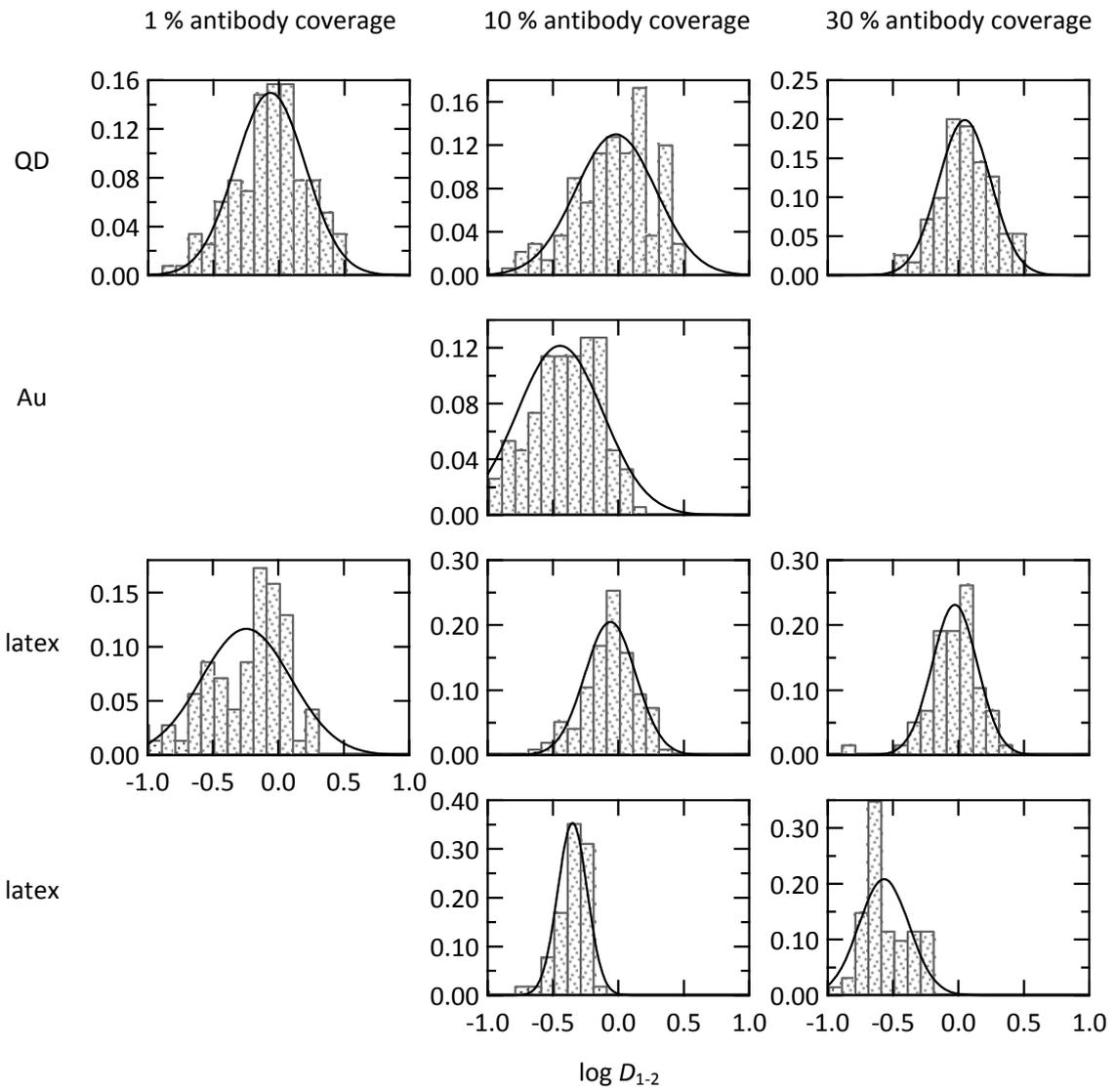


Figure 6.

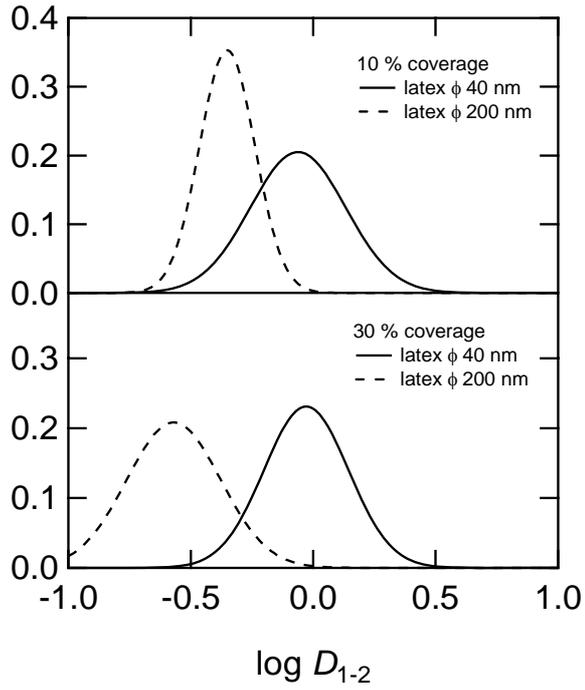


Figure 7.

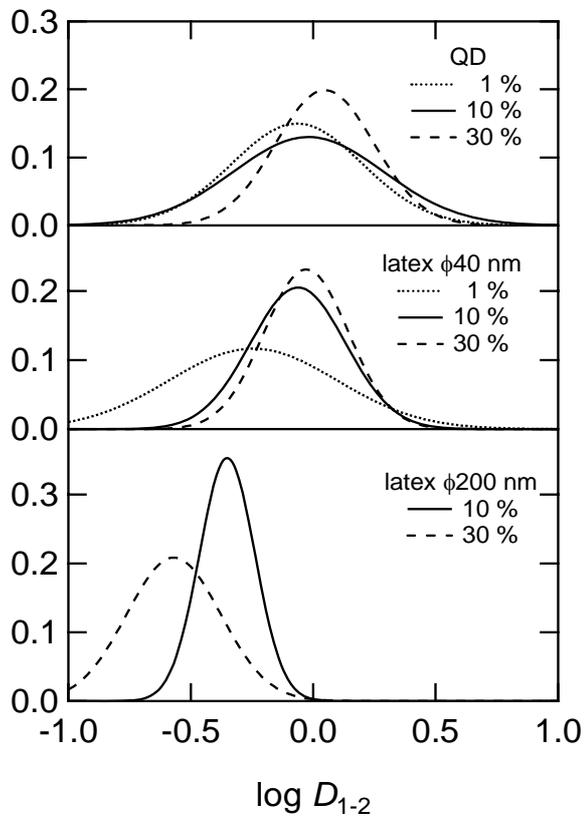


Figure 8.

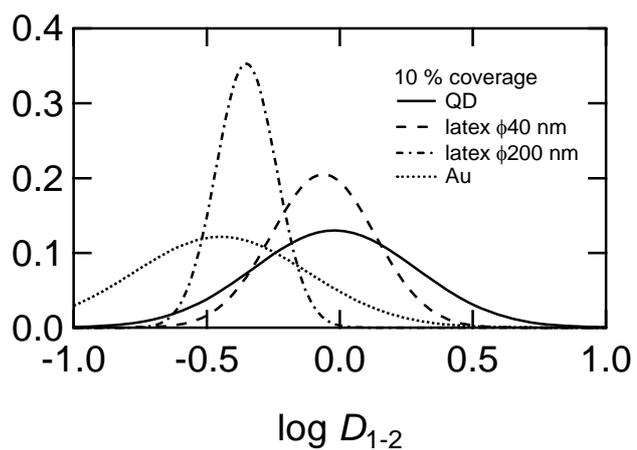


Figure 9.

Table 1.

	particle diameter mean \pm s.d. (nm)	D_{1-2} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)		
		surface coverage		
		1%	10%	30%
QD	18.5 ± 0.4	0.859	0.956	1.115
Au	40.9 ± 0.5		0.358	
Latex 40 nm	37.4 ± 1.0	0.568	0.866	0.936
Latex 200 nm	188.7 ± 1.8		0.445	0.269

3. Discussion

Ces travaux apportent une contribution importante à la connaissance des deux outils principaux utilisés lors de la mesure du coefficient de diffusion D d'un constituant membranaire par SPT : la méthode de calcul de D et la particule.

Parmi les différentes méthodes de calcul du coefficient de diffusion utilisées dans la littérature, le calcul du déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction d'intervalles de temps δt croissants est celle qui est le plus souvent employée. Dans le cas d'une diffusion aléatoire, la courbe obtenue, $MSD = f(\delta t)$, est ajustée par une droite (voir chapitre I), dont la pente est proportionnelle au coefficient de diffusion D . Or, une étude avait déjà attiré l'attention sur le fait que plus les intervalles de temps sont grands, plus les variations inhérentes au calcul du MSD peuvent être importantes et donc fausser la valeur D déduite, préconisant alors de ne prendre en compte que la partie linéaire au début de la courbe pour l'ajustement (Lee *et al.*, 1991).

Notre étude a en effet montré que le calcul de D *via* la pente issue des deux premiers points du calcul de MSD (calcul du D_{1-2}) était plus précis que le calcul sur l'ensemble de la courbe de MSD. Récemment, Michalet *et al.* ont présenté une méthode mathématique permettant de prévoir, à partir des conditions expérimentales, combien de points de la courbe de MSD pouvaient être utilisés dans le calcul de D sans biaiser la mesure (Michalet, 2010). L'application de cette méthode aux conditions de notre étude préconisait justement l'utilisation des deux premiers points de la courbe de MSD.

De plus, nous avons révélé qu'une autre méthode de calcul, basée sur la fonction de distribution cumulée des déplacements quadratiques, était légèrement plus précise que le calcul du D_{1-2} . Cette méthode n'étant pas sujette à des fluctuations statistiques, l'ajustement de la courbe théorique et de celles correspondant aux trajectoires simulées s'effectue avec précision. En conséquence, il serait intéressant de mieux connaître les capacités de cette méthode d'analyse vis-à-vis de la détermination du mode de diffusion, en particulier pour des cas non-browniens comme nous l'observons fréquemment à la surface de cellules vivantes. En effet, les comportements au sein d'une membrane cellulaire peuvent être très complexes, et il est important que la méthode d'analyse utilisée puisse distinguer avec précision les différents types de diffusion observés. Par exemple, dans notre cas, l'outil de calcul de l'index de confinement a permis de révéler les mouvements confinés, transitoirement ou non, à la surface des cellules, ce qui n'est pas possible avec la seule analyse de la courbe de MSD.

Ensuite, nous avons montré que le choix de la particule était très important pour des expériences de SPT, car selon les caractéristiques de celle-ci, une sous-estimation du coefficient de diffusion D mesuré peut en résulter. Une taille trop importante de la particule, 200 nm de diamètre dans le cas des billes de latex, ou l'emploi d'un matériau particulier, de l'or dans notre cas, ont conduit à des valeurs de D inférieures à la valeur de référence obtenue par FRAP. Nos résultats indiquent aussi que le taux de couverture de la surface de la particule en anticorps peut avoir une influence sur les valeurs de D mesurées. Pour les billes de latex de 200 nm, nous avons relevé le D le plus faible pour un taux de couverture élevé. Pour les billes de latex de 40 nm de diamètre et pour les QD, le phénomène inverse a été constaté : les valeurs de D les plus faibles correspondent aux taux de couverture les plus bas. Nous avons donc émis les hypothèses suivantes :

- Plus le nombre d'anticorps présents à la surface de la particule est grand, plus une même particule pourra lier de multiples sondes lipidiques, freinant la diffusion du complexe. Cela n'est valable que si la courbure de la surface de la particule est faible et permet l'établissement de plusieurs liens anticorps - sonde lipidique, ce qui expliquerait que ce phénomène ait été constaté uniquement pour les billes de 200 nm de diamètre.
- Plus le nombre d'anticorps accrochés à la surface de la particule est faible, moins les anticorps ont de chances d'être orientés de manière optimale pour pouvoir reconnaître la sonde lipidique, c'est-à-dire vers l'extérieur de la particule. En effet, les anticorps que nous avons utilisés sont biotinylés sur des sites répartis aléatoirement dans leur séquence peptidique. Un anticorps peut par exemple être en interaction avec une avidine *via* sa partie Fab, impliquant que le site actif de celui-ci sera très proche de la surface de la particule. Si toutefois cet anticorps reconnaît une sonde lipidique, il est possible que la friction entre la particule et la surface membranaire soit plus importante que dans le cas d'un anticorps orienté de manière optimale, et ainsi entraîne une réduction de la diffusion de la particule.

Cette dernière hypothèse suggère que l'idée couramment admise de minimiser le nombre d'anticorps à la surface des particules, pour se placer dans des conditions optimales (Alcor *et al.*, 2009), peut conduire à des mesures de coefficients de diffusion réduites. En effet, l'orientation des anticorps accrochés à la particule est peu fréquemment considérée comme un facteur pouvant influencer les résultats des expériences de SPT. Notons qu'il a été montré dans d'autres circonstances que cette orientation est importante pour la fonction de reconnaissance antigénique des anticorps. En effet, un test de type ELISA (pour Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), utilisant des anticorps biotinylés spécifiquement sur

la région charnière flexible, a révélé une meilleure capacité de détection comparée à un même test utilisant des anticorps biotinylés aléatoirement (Cho *et al.*, 2007).

Il faut toutefois rester vigilant sur les différences qui existent entre une membrane modèle et la membrane plasmique d'une cellule. C'est pourquoi nos hypothèses demandent à être confirmées par une étude plus approfondie, pour savoir si l'orientation des anticorps est bien responsable du ralentissement des particules à faible taux de couverture que nous avons constaté. De plus, les valeurs de taux de couverture en anticorps présentées dans notre étude correspondent à un calcul théorique, qui surestime le nombre réel d'anticorps accroché par particule car nous avons supposé que tous les anticorps en solution se liaient aux particules. Il serait intéressant de déterminer de manière empirique la quantité d'anticorps nécessaire à la saturation des particules, par exemple en incubant les particules avec différents jeux de concentrations en anticorps spécifique et non-spécifique, puis calculer le taux d'accrochage des particules (principe similaire à l'évaluation de la saturation des molécules de streptavidines par de la biotine libre – chapitre III - § 3).

En résumé, nos travaux ont confirmé que les QD sont les meilleurs candidats pour réaliser des expériences de SPT, mais ont aussi révélé que les billes de latex de 40 nm de diamètre représentent une alternative intéressante, car leur signal fluorescent n'est pas soumis à un phénomène de clignotement comme les QD. Cependant, nous n'avons pas vérifié si ces billes de latex sont ralenties ou non à la surface d'une cellule, et donc si elles permettent une mesure fidèle du coefficient de diffusion de constituants membranaires cellulaires. Si une étude systématique sur cellules devait être menée, il serait intéressant d'inclure ces particules, au même titre que d'autres stratégies de couplage que celle que nous avons utilisée, à savoir l'avidine associée à des anticorps biotinylés. Les travaux de Groc *et al.* apportent un élément de réponse à la problématique du couplage car ils ont constaté, pour des expériences de suivi de molécules uniques, que le remplacement de l'anticorps (~170 kDa sous forme glycosylée) par une autre molécule de 8 kDa (bungarotoxine) permettait d'accéder à des coefficients de diffusion plus élevés (Groc *et al.*, 2007). Toutefois, il est possible que cette différence ne soit pas due à l'écart de taille entre l'anticorps et la toxine, mais plutôt à l'influence de l'orientation de l'anticorps.

Notre choix des complexes QD-anticorps pour suivre les récepteurs CD4 et CCR5 à la surface de cellules immunitaires a été validé par l'étude de SPT sur membrane modèle présentée dans ce chapitre. Cependant, l'analyse de l'effet du taux de couverture des particules en anticorps a été réalisée postérieurement aux expériences sur cellules. Cela

explique pourquoi nous avons cherché à avoir le moins d'anticorps possible à la surface des QD dans le chapitre suivant. A l'avenir, il sera intéressant d'ajuster notre protocole de préparation des QD et des anticorps, et prendre en compte les données obtenues sur système membranaire modèle.

CHAPITRE III

Mise au point du SPT sur des cellules pertinentes vis-à-vis du VIH

Ce chapitre décrit les choix et les tests de mise au point qui ont permis de réaliser l'étude de SPT sur des cellules naturellement infectées par le VIH, et donc pertinentes vis-à-vis de la thématique de nos travaux. Nous avons tout d'abord choisi une lignée cellulaire immunitaire exprimant les récepteurs CD4 et CCR5 sauvages. Ces cellules étant naturellement en suspension, nous avons mis au point un protocole permettant de les immobiliser sur lamelle de verre, et ainsi de les observer avec notre montage de vidéomicroscopie. Enfin, des anticorps monoclonaux spécifiques de CD4 et CCR5 ont été sélectionnés, selon leur aptitude à se lier aux récepteurs sans être déplacés par les ligands dont nous souhaitons étudier l'effet dans nos expériences de SPT : le CD4 soluble, le maraviroc et la protéine d'enveloppe virale gp120.

1. Choix de la lignée cellulaire

1.1. Expression des récepteurs CD4 et CCR5

Le principal critère pour le choix de la lignée était le taux d'expression des récepteurs étudiés, à savoir CD4 et CCR5. Il faut savoir que plus la densité surfacique des récepteurs est faible, plus il est difficile de marquer spécifiquement ceux-ci avec des anticorps, car le marquage non-spécifique est susceptible d'être aussi important que celui spécifique. Dans notre cas, il fallait donc que les cellules expriment suffisamment les deux récepteurs à leur surface pour pouvoir effectuer les expériences de SPT.

Nous avons mesuré les taux d'expression de CD4 et CCR5 par cytométrie en flux (voir *Matériels & Méthodes*) sur trois lignées immunitaires : la lignée lymphocytaire Jurkat et deux lignées monocytaires, THP1 et HL-60 (fig. 45A-C-D). Comme attendu, les lymphocytes n'expriment pas CCR5 s'ils ne sont pas activés (voir Introduction - § 2.4.2.3). En revanche,

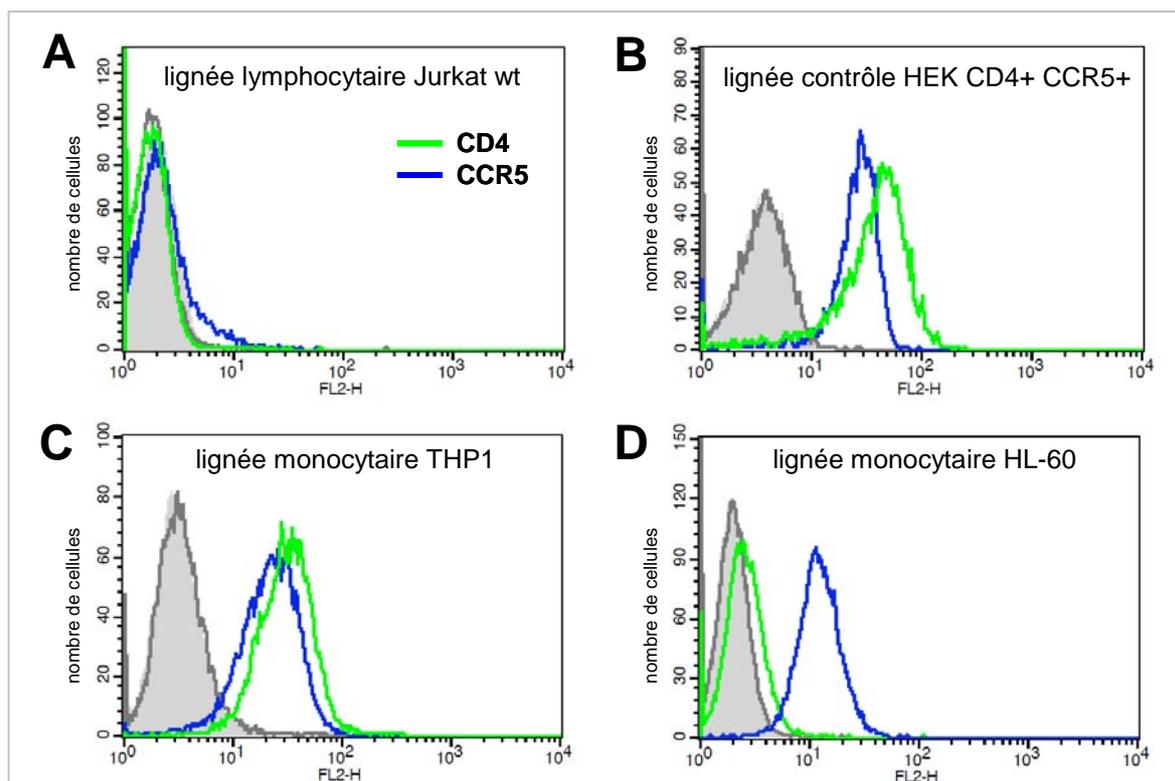


Figure 45. Niveaux d'expression des récepteurs CD4 et CCR5 de plusieurs lignées cellulaires.

Le taux d'expression des récepteurs CD4 (trait bleu) et CCR5 (trait vert) a été évalué par cytométrie en flux sur plusieurs lignées cellulaires : une lignée immunitaire, Jurkat sauvage (wt) (A) et deux lignées monocytaires, THP1 (C) et HL-60 (D). La lignée HEK 293T exprimant les deux récepteurs a été utilisée comme contrôle positif pour prouver la fonctionnalité des anticorps biotinylés anti-CD4 (OKT4) et anti-CCR5 (T21/8) (A). Les anticorps ont été utilisés à 5 µg/ml et l'agent secondaire de marquage, la streptavidine couplée à la phycoérythrine (SA-PhycoE), a été utilisée à 0,02 µg/ml. Pour chaque graphe, le niveau basal de fluorescence des cellules est représenté par l'aire gris clair. La courbe gris foncé correspond au témoin négatif (SA-PhycoE seule).

ils devraient exprimer le récepteur CD4. Or l'histogramme montre que le signal avec l'anticorps anti-CD4 est proche de celui du témoin négatif (épaulement en bleu, fig. 45A). La reproduction de la mesure a confirmé une absence quasi-totale de marquage. La fonctionnalité des anticorps a été vérifiée en marquant une lignée HEK exprimant les deux récepteurs pour écarter un problème venant de leur part (fig. 45B). Il est possible que la très faible expression de CD4 par les Jurkat soit due à une dérive de la lignée au cours du temps.

La lignée monocyttaire THP1 semblait intéressante car la mesure de cytométrie prouve qu'elle exprime CCR5 de manière significative (une unité log d'écart avec le témoin négatif, fig. 45C), contrairement à la lignée HL-60 (fig. 45D). Cependant, ces cellules sont des monocytes et le modèle pertinent vis-à-vis de l'infection par le VIH est le macrophage, ce qui nécessite de les différencier, avec des esters de phorbol par exemple. Le résultat de l'activation de lymphocytes ou de la différenciation de monocytes en macrophages est souvent sujet à une grande variabilité, ce qui pourrait avoir un impact sur la diffusion des récepteurs et perturber nos expériences de SPT.

C'est pourquoi nous avons préféré tester une autre lignée lymphocytaire, toujours de type Jurkat, mais infectée par un lentivirus pour exprimer de manière stable le récepteur CCR5 et ainsi mimer des lymphocytes activés, les cibles principales du VIH. Cette lignée a été conçue par le Dr Ali Amara, et nous a été gracieusement donnée par le Dr Françoise Bachelier, anciennement dans l'unité de Pathogénie virale à l'Institut Pasteur (Inserm U819). Leur équipe de recherche avait montré que cette lignée, qui sera appelée J.CCR5 par la suite, est compétente vis-à-vis de l'infection par des souches virales à tropisme R5. Notre analyse par cytométrie en flux confirme que les deux récepteurs sont bien exprimés à la surface de ces cellules lymphocytaires (fig. 46). Cependant, les intensités mesurées par cytométrie en flux peuvent correspondre à des récepteurs qui ont été internalisés. Nous avons donc vérifié en microscopie de fluorescence que le marquage était membranaire.

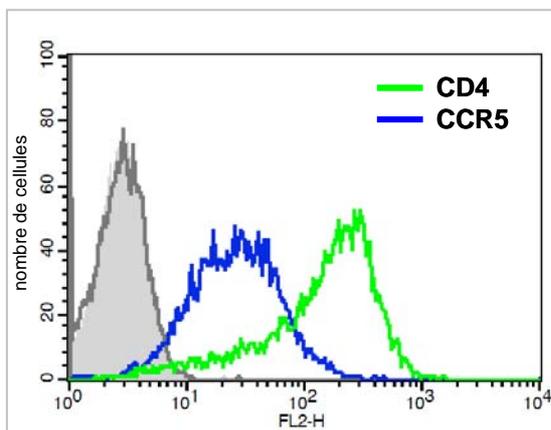


Figure 46. Niveaux d'expression des récepteurs CD4 et CCR5 de la lignée lymphocytaire J.CCR5.

Le taux d'expression des récepteurs CD4 (trait bleu) et CCR5 (trait vert) a été mesuré par cytométrie en flux. Pour cela, des anticorps biotinylés dirigés contre les récepteurs CD4 et CCR5 ont été utilisés à 0,2 µg/ml. L'agent secondaire du marquage était la streptavidine couplée à la phycoérythrine (SA-PhycoE), utilisée à 0,02 µg/ml. Pour chaque graphe, le niveau basal de fluorescence des cellules est représenté par l'aire gris clair. La courbe gris foncé correspond au témoin négatif (SA-PhycoE seule).

En résumé, cette lignée représentait le candidat idéal pour étudier l'implication de l'organisation dynamique des récepteurs CD4 et CCR5 dans les premières étapes de l'infection par le VIH, c'est pourquoi nous l'avons choisie pour nos travaux de SPT.

1.2. Stratégie d'immobilisation sur lamelle de verre

Pour pouvoir mener des expériences de SPT sur des cellules naturellement en suspension, il nous fallait choisir une méthode pour les immobiliser sur des lamelles de verre permettant leur observation en microscopie de fluorescence, et ceci sans provoquer leur mort.

D'après la littérature, la méthode la plus couramment utilisée est de recouvrir les lamelles de verre avec une protéine qui servira « d'adhésif ». Trois possibilités ont été décrites :

- la fibronectine, une grande glycoprotéine (460 kDa) de la matrice extracellulaire, qui peut lier les intégrines à la surface des cellules par deux séquences RGD (arginine - glycine - acide aspartique). Elle a été utilisée par exemple pour immobiliser des cellules T et les observer en microscopie (Lin *et al.*, 2010; Affentranger *et al.*, 2011).

- la poly-L-lysine, désignée polylysine par la suite, qui est un homopolymère de résidus L-lysine (~25-30), possédant de nombreuses charges positives. Cette molécule est la plus utilisée pour immobiliser des cellules non-adhérentes, et a servi par exemple pour des expériences de SPT sur des lymphocytes B (Kucik *et al.*, 1996) ou des cellules érythroleucémique K562 (Peters *et al.*, 1999), ou encore des observations au microscope à force atomique (AFM) de cellules B (Li *et al.*, 2011).

- le Cell-Tak, un produit commercial (BD Biosciences) composé d'un ensemble de protéines de la matrice extracellulaire que la moule (*Mytilus edulis*) utilise pour s'accrocher aux rochers dans la mer (Waite & Tanzer, 1981). Ce produit a été employé pour des études de SPT (Cairo *et al.*, 2006) ou d'AFM (Hoffmann *et al.*, 2011) sur cellules Jurkat.

Un test d'immobilisation des cellules avec ces trois solutions a été réalisé, en parallèle des mesures par cytométrie en flux, ce qui signifie que les quatre lignées précédemment citées ont été incluses dans ce test. Pour cela, nous avons déposé une goutte de chaque solution de protéines sur des lamelles de verre, puis après un délai de 5 ou 15 min, deux rinçages avec du tampon DPBS ont été effectués pour éliminer les protéines non adsorbées sur le verre (voir *Matériels & Méthodes*). Les cellules ont ensuite été ajoutées sur la lamelle de verre, puis les cellules non immobilisés ont été retirées par rinçage, après une attente de 30 min. Les conditions de traitement des lamelles de verres étaient : la fibronectine à 0,01 mg/ml, la

polylysine à 0,02 ou 0,1 mg/ml, et le Cell-Tak à 2, 8 ou 30 µg/ml. Le meilleur agent d'adhésion cellulaire sélectionné a été la polylysine, toutes lignées confondues, à la concentration de 0,1 mg/ml, avec une incubation sur les lamelles de 5 minutes. Cet effet « adhésif » est tout à fait spécifique puisqu'on observe une démarcation nette de la répartition des cellules dans la zone où la goutte de polylysine a été déposée (fig. 47). Il est à noter que les cellules HL-60 ont montré une faible adhérence, même en présence de polylysine à 0,1 mg/ml, indiquant que tous les types cellulaires ne peuvent pas forcément être immobilisés par cette méthode.

Par ailleurs, une étude a révélé que la fibronectine induit une signalisation calcique intracellulaire dans des cellules Jurkat, alors que la polylysine n'en provoque pas (Weissman *et al.*, 1997). Cela conforte donc notre choix de retenir la polylysine dans notre protocole d'immobilisation des cellules J.CCR5.

De manière à accélérer l'adhésion des cellules sur la lamelle de verre, nous avons essayé de « plaquer » les cellules sur le support *via* une centrifugation douce. L'équipe de Cairo *et al.* a précédemment employé cette stratégie pour des cellules Jurkat (Cairo *et al.*, 2006). Nous avons repris leurs conditions de centrifugation : 50 g, soit 500 rpm avec une centrifugeuse Eppendorf 5804R, pendant 7 min. De manière intéressante, cette étape de centrifugation a conduit à une meilleure homogénéité de répartition des cellules sur le support. Nous avons pu valider la tenue des cellules sur les lamelles 4 h après centrifugation, et vérifier la viabilité cellulaire (coloration au Bleu Trypan, voir *Matériels & Méthodes*) sur le même intervalle de temps.

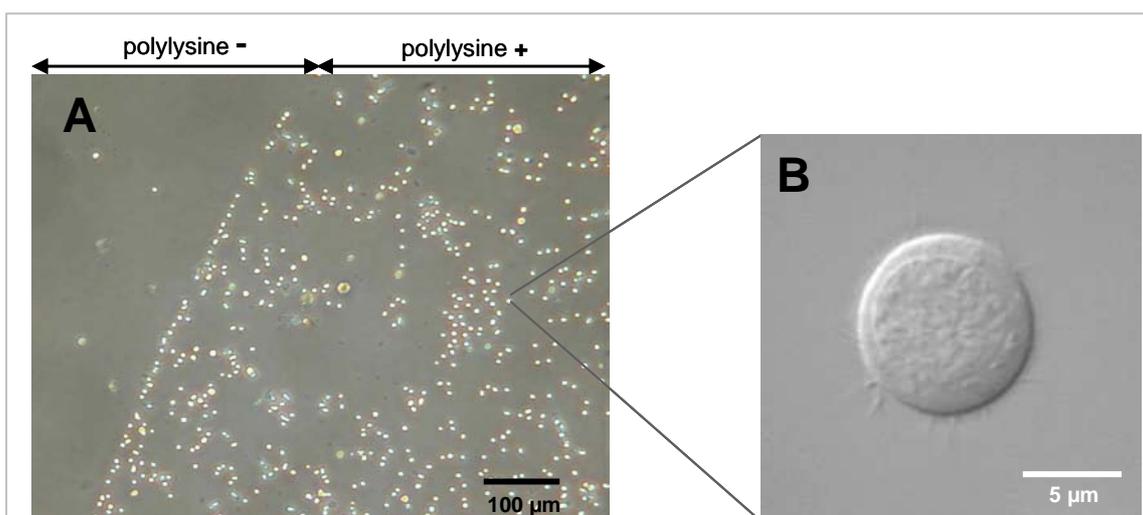


Figure 47. Immobilisation des cellules sur des lamelles recouvertes de polylysine.

(A) Les cellules s'immobilisent préférentiellement dans la zone où la goutte de polylysine a été préalablement déposée sur la lamelle de verre (polylysine +). (B) Les cellules immobilisées conservent leur morphologie d'aspect sphérique et restent viables. Ces images représentent des cellules Jurkat.

2. Choix des anticorps anti-CD4 et anti-CCR5

Un de nos objectifs était d'évaluer l'influence de l'interaction CD4-CCR5 sur la diffusion des récepteurs CD4 et CCR5. Pour cela, nous avons choisi deux ligands compétiteurs de cette interaction : le CD4 soluble (CD4s) et le maraviroc, un antagoniste de CCR5 (voir Introduction - § 3.2.1), qui interagit avec le même site de liaison que la molécule TAK-779 (Tsibris & Kuritzkes, 2007). En effet, les expériences de FRET réalisées précédemment au laboratoire avaient démontré que le CD4s et le TAK-779 inhibent l'interaction CD4-CCR5 (Introduction - § 4.5., Gaibelet *et al.*, 2006). Nous voulions aussi analyser l'effet de la présence de la protéine d'enveloppe virale gp120 sur la dynamique des récepteurs. Sachant que notre stratégie d'accrochage des QD aux récepteurs était basée sur l'utilisation d'anticorps biotinylés dirigés contre CD4 ou CCR5, il nous fallait choisir des clones d'anticorps entrant le moins possible en compétition avec le CD4s, le maraviroc et la gp120.

2.1. Anticorps anti-CD4

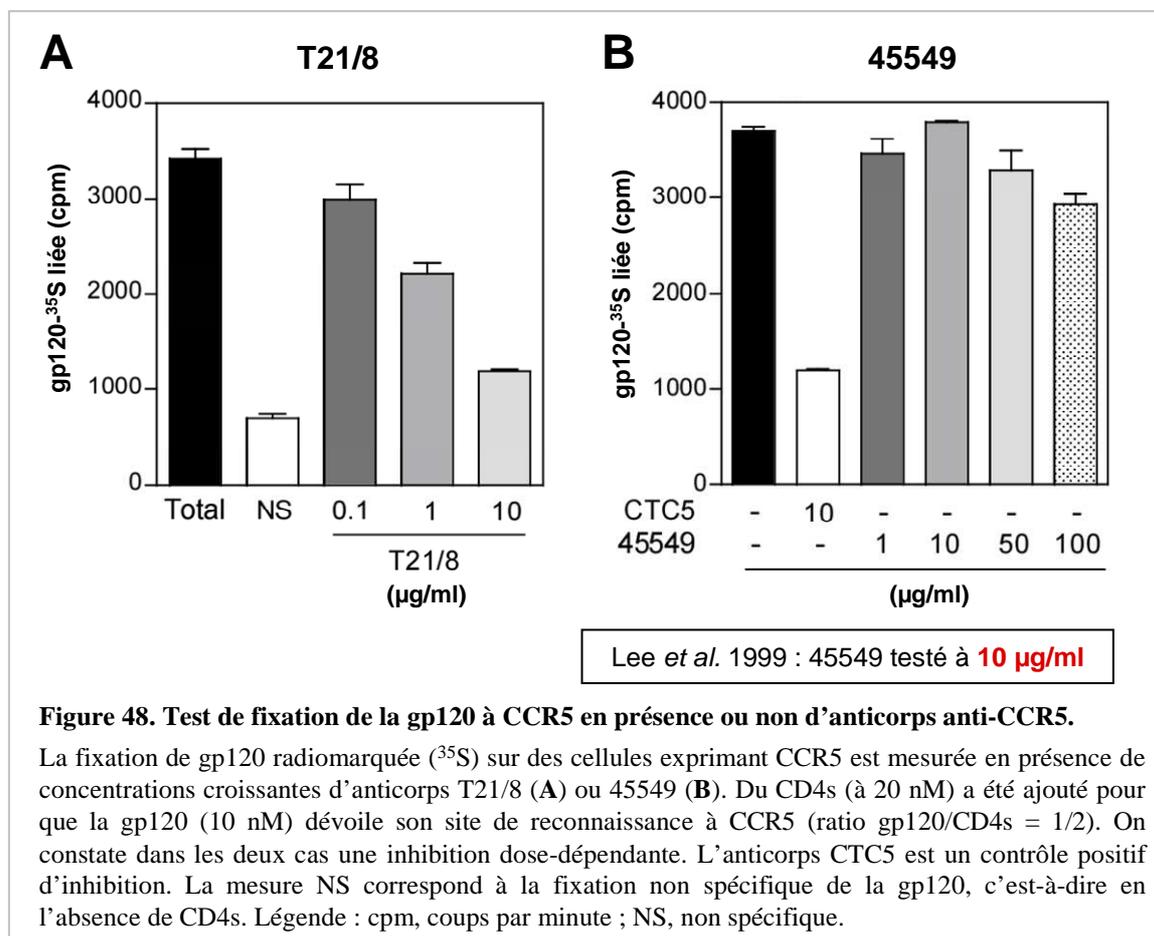
La majorité des anticorps anti-CD4 reconnaissent les domaines D1 et/ou D2 de CD4, c'est-à-dire les domaines impliqués dans la liaison avec la protéine d'enveloppe virale gp120, mais aussi dans l'interaction CD4-CCR5 constitutive (voir Introduction - § 2.4.1). Ils représentaient donc de mauvais candidats pour nos expériences de SPT. Cependant, il a été démontré que le clone d'anticorps OKT4, ciblant les domaines D3-D4 du récepteur (Mizukami *et al.*, 1988), ne dissociait pas l'interaction de CD4 avec CCR5 (Staudinger *et al.*, 2003), ni la liaison CD4-gp120 (Bour *et al.*, 1991). De plus, sa forme biotinylée était disponible commercialement (Biolegend). Nous avons donc sélectionné cet anticorps pour le suivi du récepteur CD4.

2.2. Anticorps anti-CCR5

Il existe de nombreux clones d'anticorps anti-CCR5 dirigés contre une grande variété d'épitopes sur le récepteur. Malheureusement, la protéine d'enveloppe virale gp120 se lie à CCR5 au niveau de sa partie N-terminale et de sa boucle extracellulaire N°2 (voir Introduction - § 2.4.2), qui constituent les principales régions ciblées par les anticorps. De plus, compte tenu de la gêne stérique engendrée par la gp120 lors de sa liaison au corécepteur (fig. 16 – Introduction), il semble difficile pour un anticorps de pouvoir interagir avec le récepteur dans cette configuration. Des travaux ont en effet montré que les anticorps anti-

CCR5 sont compétiteurs vis-à-vis de la gp120, sauf un clone, le 45549, pour lequel l'inhibition est très faible (Lee *et al.*, 1999). Cet anticorps se lie à CCR5 *via* plusieurs sites (liaison dite multi-domaines). En revanche, cette même étude rapporte une faible affinité de l'anticorps pour le récepteur. Nous avons donc voulu vérifier si la faible compétition avec la gp120 était due à une faible liaison de l'anticorps sur le récepteur ou non.

Pour cela, nous avons demandé au Dr Bernard Lagane (Unité de Pathogénie Virale Moléculaire, Institut Pasteur, Inserm U819) de réaliser un test de fixation de protéine gp120 recombinante radiomarquée sur des cellules exprimant CCR5, en présence croissante d'anticorps 45549 (R&D Systems). Nous avons inclus dans le test un contrôle : l'anticorps CTC5 (R&D Systems), qui se lie à la partie N-terminale du récepteur et qui est connu pour inhiber la liaison de la gp120. L'expérience a été réalisée en parallèle avec l'anticorps T21/8 (Biologend) à des concentrations croissantes, liant lui aussi la partie N-terminale de CCR5, mais pour lequel il n'existait pas de données bibliographiques concernant son effet sur l'interaction gp120-CCR5. La figure 48 montre que ces trois anticorps inhibent la liaison de la gp120, à des concentrations différentes. Concernant l'anticorps 45549, il apparaît clairement que sa faible affinité pour CCR5 explique pourquoi Lee *et al.* n'ont pas observé de



compétition pour une concentration de 10 µg/ml en anticorps, en le pré-incubant 1 h sur des cellules HEK 293T exprimant CCR5 (gp120 correspondant à la souche de VIH JRFL, Lee *et al.*, 1999).

Ces résultats ont confirmé le fait qu'il n'est pas possible de fixer un anticorps au récepteur CCR5 si celui-ci est lié à la gp120. Par ailleurs, nous avons aussi comme objectif de suivre le mouvement du récepteur en présence du CD4s ou du maraviroc, de manière à découpler CCR5 de CD4. Sachant qu'il est décrit dans la littérature que ces deux molécules interagissent majoritairement avec la boucle extracellulaire n°2 de CCR5, il nous fallait choisir un anticorps reconnaissant plutôt la partie N-terminale du récepteur. L'anticorps T21/8 répondait à ce critère, et il existait de plus une forme biotinylée disponible commercialement (Biolegend). En revanche, nous disposions de très peu d'informations bibliographiques concernant ce clone d'anticorps, c'est pourquoi il était important de vérifier qu'il était capable de se lier à CCR5 en présence d'un excès de CD4s ou de maraviroc.

Ces tests de vérification devaient être réalisés avec une concentration d'anticorps T21/8 inférieure à sa constante d'affinité, pour pouvoir observer une compétition avec le CD4s ou le maraviroc si elle avait lieu. Ainsi, nous avons dans un premier temps évalué sa constante d'affinité par des mesures de cytométrie en flux, en utilisant des concentrations croissantes d'anticorps, et nous avons obtenu un K_D d'environ 42 nM (fig. 49A, voir *Matériels & Méthodes* pour le calcul du K_D).

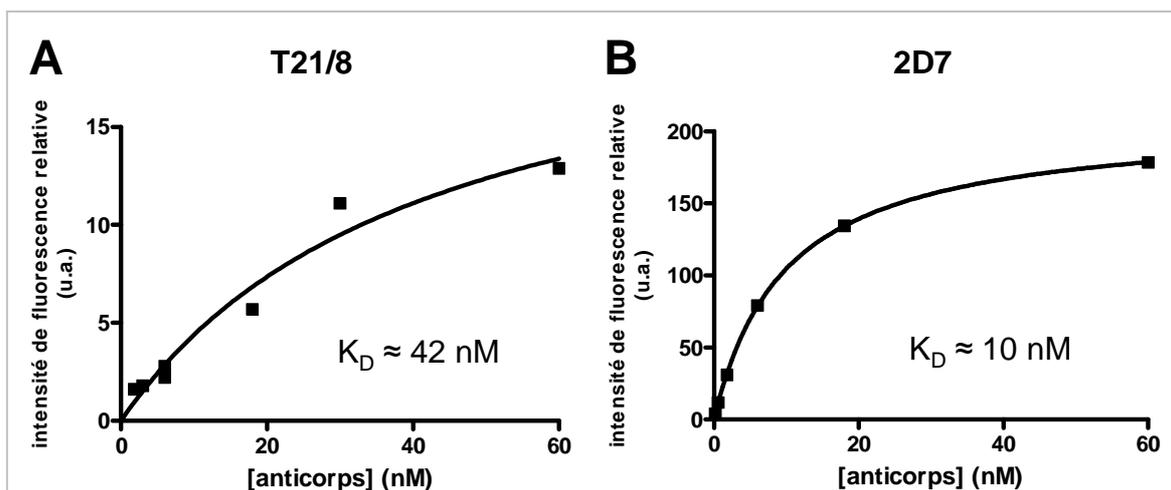
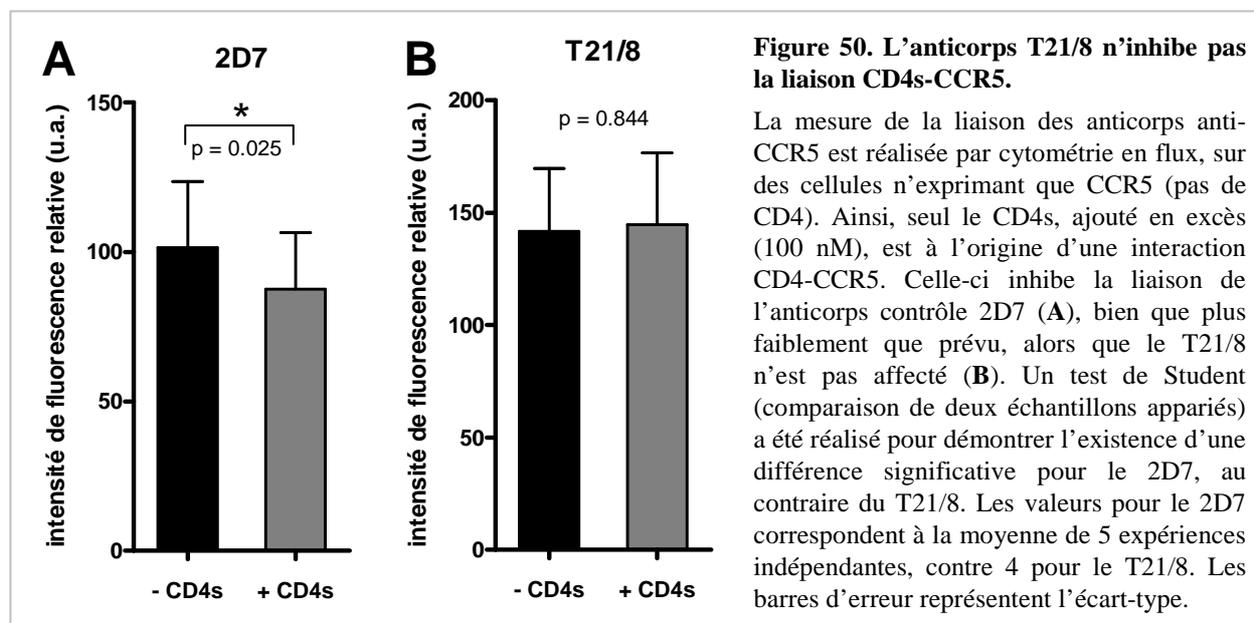


Figure 49. Evaluation de la constante d'affinité (K_D) des anticorps par cytométrie en flux.

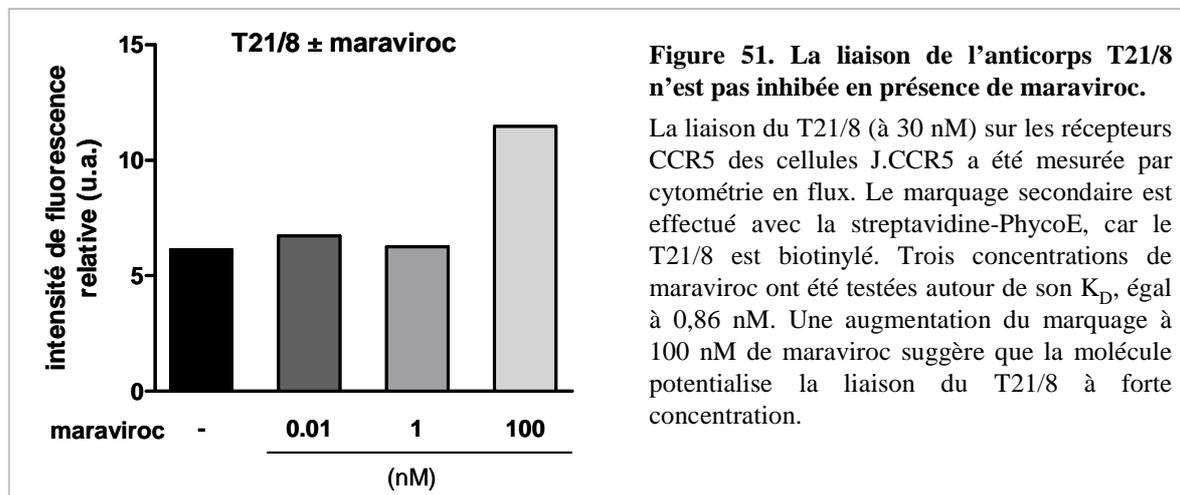
La constante d'affinité, ou constante de dissociation à l'équilibre (K_D), des anticorps T21/8 (A) et 2D7 (B) a été évaluée par cytométrie en flux sur des cellules HEK exprimant le récepteur CCR5. L'agent de marquage secondaire est la streptavidine-PhycoE pour le T21/8, et l'anticorps anti-souris couplé à l'Alexa647 pour le 2D7. Les intensités de fluorescence relative (les valeurs non spécifiques ont été soustraites) exprimées en fonction de la concentration en anticorps sont ajustées par une hyperbole (modèle à un site de fixation). Un K_D légèrement inférieur a été mesuré de la même manière pour le T21/8 sur les cellules J.CCR5. Les analyses ont été réalisées avec GraphPad Prism.

Pour savoir si le CD4s avait un impact sur la liaison du T21/8, notre stratégie a été d'utiliser des cellules exprimant seulement CCR5 (pas de CD4), et de mesurer par cytométrie en flux la liaison de l'anticorps en présence ou non d'un excès de CD4s. La constante d'affinité du CD4s pour CCR5 étant inconnue, nous avons choisi la concentration de 100 nM qui avait déjà été utilisée auparavant pour se placer en excès (Gaibelet *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2007). Nous avons de plus utilisé l'anticorps anti-CCR5 2D7 comme contrôle positif de l'expérience, car il se lie à la boucle n°2 du récepteur, c'est-à-dire la même région à laquelle le CD4s se lie. La constante d'affinité de l'anticorps 2D7 pour CCR5 a été mesurée à 10 nM (fig 49B). Les résultats du test en présence de CD4s montrent qu'une inhibition n'est observée que pour l'anticorps 2D7, mais avec une faible amplitude (écart de 13,6 % entre les deux moyennes, fig. 50). Il est possible que la concentration en CD4s ait été insuffisante pour mieux déplacer l'anticorps 2D7, ou bien que le CD4s et l'anticorps se lient sur des sites du récepteur CCR5 légèrement trop éloignés pour qu'il y ait eu une compétition plus nette. En effet, l'épitope reconnu par le 2D7 ne constitue qu'une partie de la boucle n°2 du récepteur (Lee *et al.*, 1999). Par ailleurs, les valeurs présentées correspondent à plusieurs expériences indépendantes, et leur analyse statistique par un test de Student apparié a démontré que la différence observée pour le 2D7 est significative, alors que ce n'est pas le cas pour le T21/8 (fig. 50), ce qui nous a confortés dans notre choix.



Enfin, nous avons mesuré le marquage des cellules J.CCR5 avec le T21/8 en présence ou non de maraviroc à des concentrations couvrant une gamme centrée sur sa constante d'affinité (fig. 51), qui est de 0,86 nM (Napier *et al.*, 2005). Aucune inhibition n'a été révélée,

et de manière surprenante, le maraviroc à 100 nM, soit environ 100 fois son K_D , augmente la liaison de l'anticorps au récepteur. Nous pouvons imaginer que le maraviroc induit un changement de conformation de CCR5 qui favorise la reconnaissance de la partie N-terminale par l'anticorps.

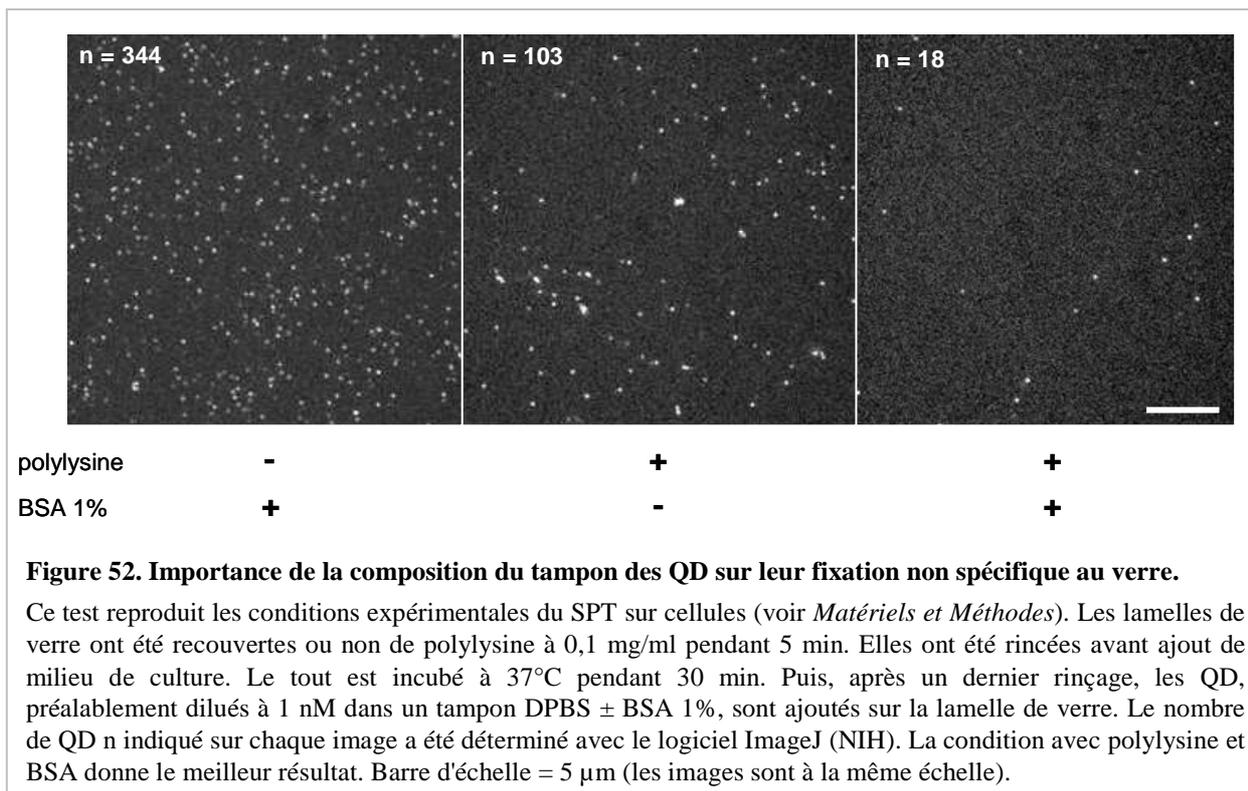


Suite à l'ensemble de ces tests, l'anticorps T21/8 a été choisi pour les expériences de SPT sur le récepteur CCR5.

3. Optimisation du protocole de marquage des cellules avec les QD

Le protocole utilisé pour réaliser les expériences de SPT, décrit dans la section *Matériels & Méthodes*, repose sur la pré-incubation des anticorps biotinylés avec les QD recouverts de streptavidine, puis l'ajout du mélange sur la lamelle où les cellules ont été immobilisées. Quelques points importants de ce protocole ont été optimisés.

Tout d'abord, les QD peuvent facilement se lier au support, la lamelle de verre, de manière non-spécifique. Il est crucial de limiter ce phénomène car plus il y a de QD attachés au support à proximité des cellules, plus leur fluorescence augmente le bruit de fond lors des mesures de SPT, et donc moins le rapport signal/bruit sera grand, affectant la précision des mesures. C'est pourquoi nous avons comparé cette fixation non-spécifique aux lamelles de verre dans différentes conditions : présence ou non de polylysine sur le verre, et/ou addition de BSA à 1% dans le tampon de dilution des QD. Les différences observées entre les images de la figure 52 montrent qu'il est important d'utiliser de la polylysine et de la BSA pour limiter la fixation non-spécifique de QD sur les lamelles de verre.



Il est de plus envisagé que la composition du tampon de dilution des QD puisse favoriser ou défavoriser le clignotement des particules, dont le taux influe directement sur le nombre de trajectoires recueillies en SPT (voir chapitre I - § 4.2). Par exemple, des travaux ont montré que l'ajout de molécules anti-oxidantes (des thiols) dans le milieu environnant réduisait considérablement le taux de clignotement des QD (Hohng & Ha, 2004; Jeong *et al.*, 2005). Comme nous travaillons avec des cellules qui sont elles aussi sensibles à la composition du tampon, nous nous sommes restreints à l'évaluation de l'influence de la BSA et du D-glucose, un composant important des milieux de culture cellulaire. Pour cela, la fluorescence de QD immobilisés sur une lamelle de verre a été mesurée après dilution dans deux tampons différents : du DPBS seul ou du DPBS additionné de BSA à 1% et de D-glucose à 2g/l. La figure 53 montre que le taux de clignotement est bien plus faible avec le deuxième tampon. Par chance, ces résultats concordent avec le test précédent qui montrait une réduction de la fixation non-spécifique des QD sur les lamelles de verre en présence de BSA à 1 %. Ainsi, les QD ont été dilués dans du tampon DPBS, BSA 1%, D-glucose à 2 g/l pour les expériences de SPT.

Enfin, l'intérêt du SPT est d'analyser le mouvement de récepteurs uniques. Il fallait donc éviter la liaison d'un même QD à plusieurs récepteurs à la surface des cellules. Dans notre cas, les anticorps que nous utilisons possèdent deux sites de reconnaissance, pouvant lier

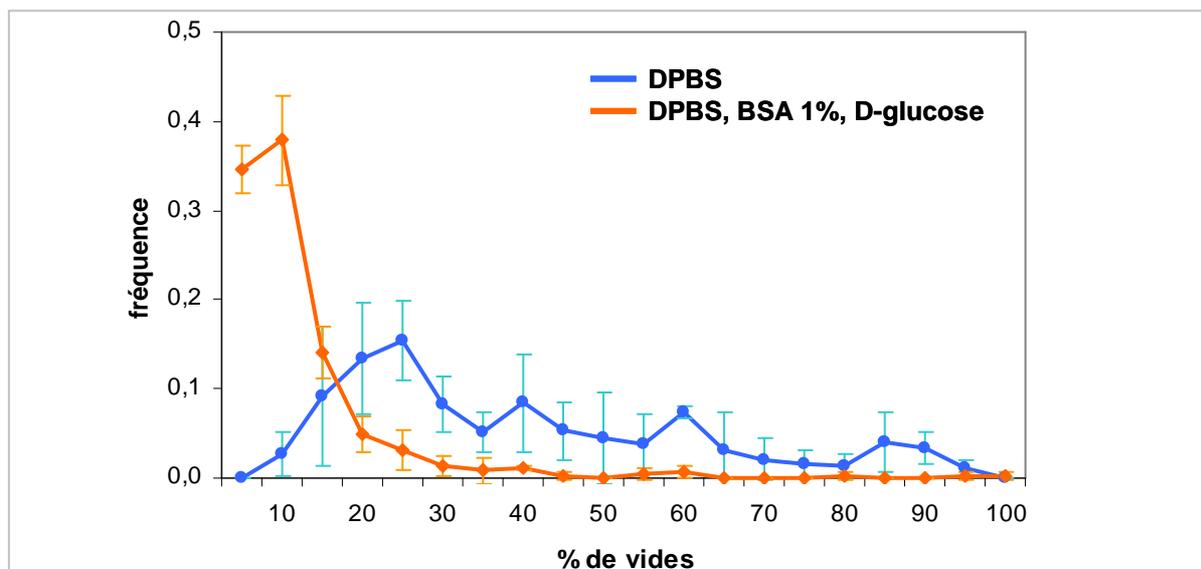


Figure 53. Influence de la composition du tampon de dilution des QD sur leur clignotement.

Les QD ont été dilués à 10 pM dans deux tampons différents (DPBS et DPBS, BSA 1%, D-glucose à 2 g/l), puis ont été immobilisés sur lamelle de verre (voir *Matériels et Méthodes*) et observés pendant 80 s. Le pourcentage de vides est calculé à l'aide du logiciel Excel (Microsoft Office) pour chaque trajectoire. La distribution des pourcentages de vides relevés montre que les QD clignotent plus en l'absence de BSA et D-glucose. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des valeurs obtenues lors de trois mesures différentes, représentant au total 163 et 328 mesures de QD individuels pour les deux tampons, respectivement.

deux récepteurs. De plus, si plusieurs anticorps sont accrochés sur un même QD, cela multiplie les chances de lier plus d'un récepteur par QD. Une solution est de remplacer les anticorps entiers par des fragments Fab à un seul site de reconnaissance, mais ces derniers ont une affinité inférieure aux immunoglobulines entières. C'est pourquoi nous avons préféré deux autres solutions : utiliser une concentration d'anticorps inférieure à celle des QD et ajouter de la biotine libre lors de la pré-incubation pour saturer les sites de liaison des molécules de streptavidine à la surface des QD.

Concernant le rapport des concentrations [anticorps]/[QD], nous nous sommes basés sur une estimation calculée à partir de la loi de Poisson. Cette loi décrit des événements aléatoires, indépendants et survenant rarement, pendant une période donnée. Même si elle ne correspond pas exactement à notre situation, elle reste la meilleure approximation mathématique pour ce que nous cherchons. Nous avons émis l'hypothèse que dans le mélange de pré-incubation, les anticorps rencontrent les QD aléatoirement, avec une moyenne de rencontre, ou espérance λ , qui est égale au rapport des concentrations molaires [anticorps]/[QD]. Si une rencontre se produit, nous supposons qu'elle aboutit systématiquement à une liaison.

La loi de Poisson peut décrire dans ce cas la probabilité de survenue de l'événement « un nombre k d'anticorps rencontre un QD », via la formule :

$$p(k) = e^{-\lambda} \times \frac{\lambda^k}{k!} \quad \text{Eq. 21}$$

Les valeurs indiquées dans le tableau 5 ont été obtenues pour différents rapports de concentrations [anticorps]/[QD]. De manière à minimiser la proportion de QD ayant plusieurs anticorps à leur surface, il était préférable pour nous d'incuber l'équivalent d'1 anticorps pour 10 QD (première colonne du tableau).

Tableau 5. Proportions des QD ayant 0, 1, 2 anticorps ou plus selon la loi de Poisson.

L'espérance de la loi de Poisson est dans notre cas le ratio des concentrations anticorps / QD, que l'on fixe lors du mélange. Si l'on fixe aussi le nombre d'événements, soit le nombre d'accrochages d'un anticorps à un QD, on peut calculer la proportion (en %) des QD concernés. Au final, on estime le rapport entre les QD ayant un anticorps et ceux en ayant deux ou plus, sachant que le plus grand de ces rapports est le plus avantageux dans notre cas. Légende : Ac, anticorps.

nombre d'Ac par QD	ratio des concentrations Ac / QD			
	0,1	0,2	0,5	1
0	90,5%	81,9%	60,7%	36,8%
1	9,0%	16,4%	30,3%	36,8%
2 ou +	0,5%	1,8%	9,0%	26,4%
rapport des QD à 1 Ac sur les QD à 2 Ac ou +	19	9	3	1

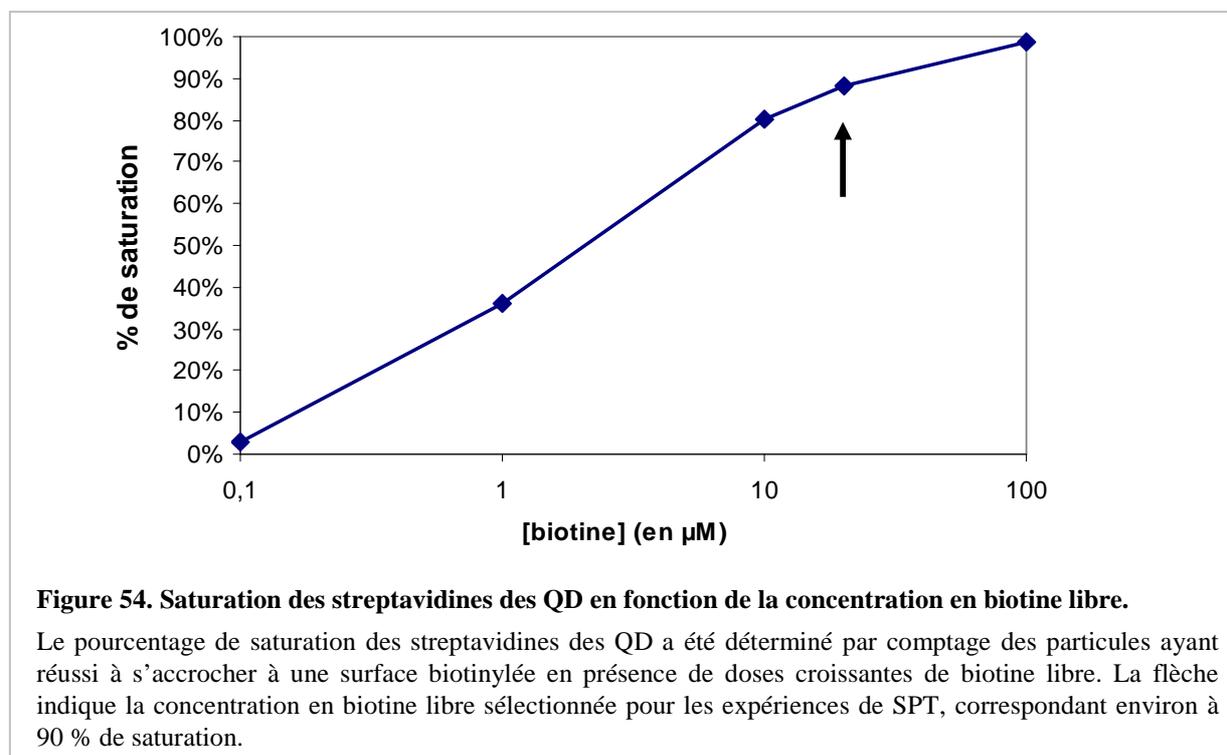
Ensuite, pour déterminer la concentration de biotine libre permettant de saturer les molécules de streptavidine à la surface des QD, nous avons utilisé un test d'accrochage des QD à des anticorps biotinylés immobilisés sur des lamelles de verre (voir *Matériels & Méthodes*). Avant ajout des QD dans la chambre, de la BSA à 1% a été ajoutée pour couvrir les sites de la lamelle non occupés par l'anticorps et éviter que les QD s'accrochent au verre de manière non-spécifique. Ensuite, après pré-incubation des QD avec la biotine libre, les QD ont été ajoutés, et au bout de 10 min, ceux non liés ont été éliminés par rinçages. Nous avons finalement compté le nombre de QD accrochés avec le logiciel ImageJ. Le pourcentage de saturation a été calculé via la formule :

$$saturation = 1 - \frac{n_{QD \text{ avec biotine}} - n_{non-spécifique}}{n_{QD \text{ sans biotine}} - n_{non-spécifique}} \quad \text{Eq. 22}$$

où le non-spécifique correspond au nombre de QD accrochés sur la lamelle alors qu'elle n'est recouverte que de BSA (absence de l'anticorps biotinylé). Il nous fallait choisir une concentration en biotine libre autorisant la liaison d'un seul anticorps. Pour cela, nous avons

estimé que la surface occupée par un anticorps à la surface d'un QD correspondait à un disque d'un rayon r de 5 nm, donnant l'aire $A_{\text{anticorps}} = \pi r^2 = 79 \text{ nm}^2$. La surface d'un QD, assimilé à une sphère de 10 nm de rayon, nous donne $A_{\text{surface QD}} = 4 \pi r^2 = 1257 \text{ nm}^2$. D'après ce calcul, l'aire occupée par un anticorps équivaudrait à $79 / 1257 \approx 6 \%$.

La courbe que nous avons obtenue nous indique que 20 μM de biotine libre incubée avec 0,4 nM de QD permettent une saturation des molécules de streptavidines à environ 90 % (fig. 54), laissant donc la place pour la fixation d'un anticorps. Etant donné que nous ne souhaitons pas défavoriser l'accrochage des anticorps biotinylés sur les QD, nous avons choisi de mélanger les trois composants extemporanément en respectant l'ordre : QD, anticorps puis biotine libre. Nous avons de plus constaté qu'une incubation QD-biotine libre de 10 min était suffisante, car les mêmes valeurs de saturation ont été obtenues pour une incubation de 5 h.

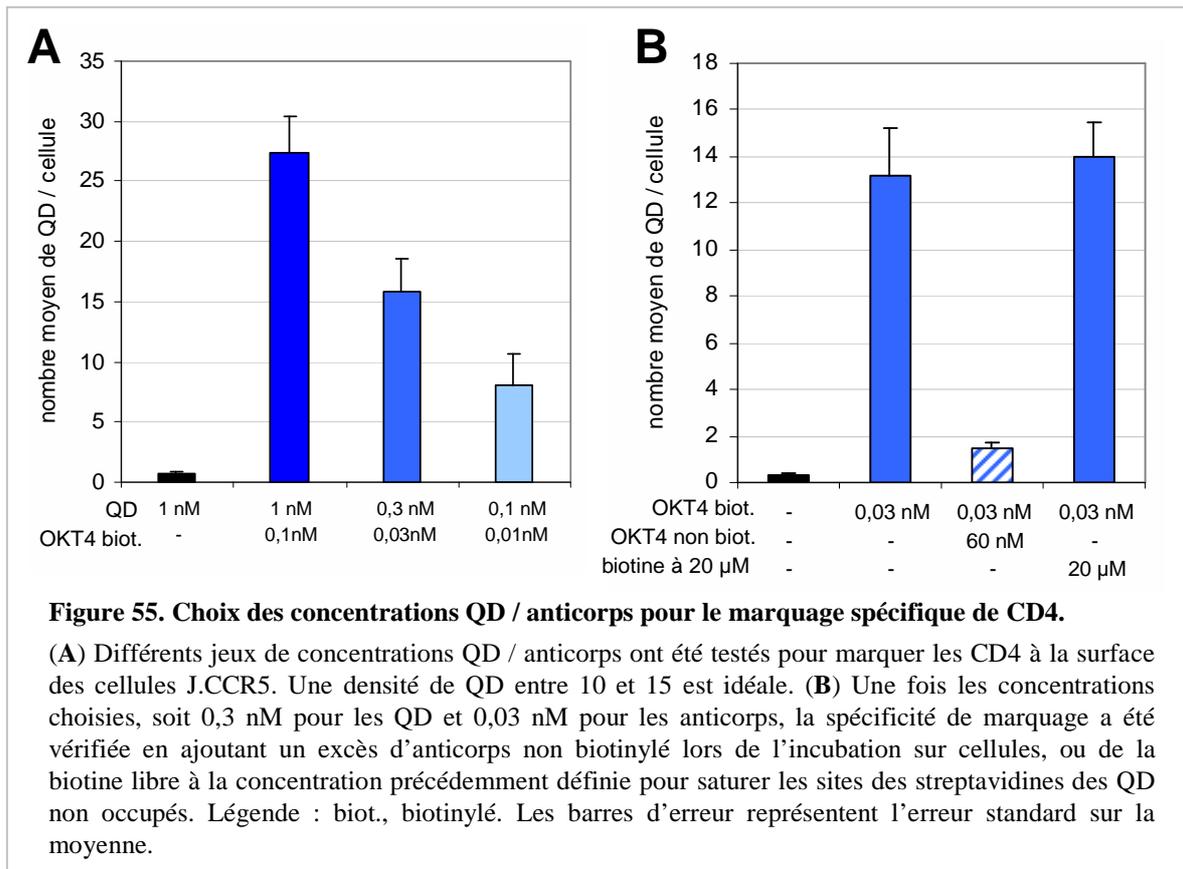


4. Marquage des récepteurs CD4 et CCR5 avec les QD

Le marquage des récepteurs avec les QD a été contrôlé par comptage des particules liées à la surface des cellules, en suivant le protocole expérimental du SPT (voir *Matériels & Méthodes*).

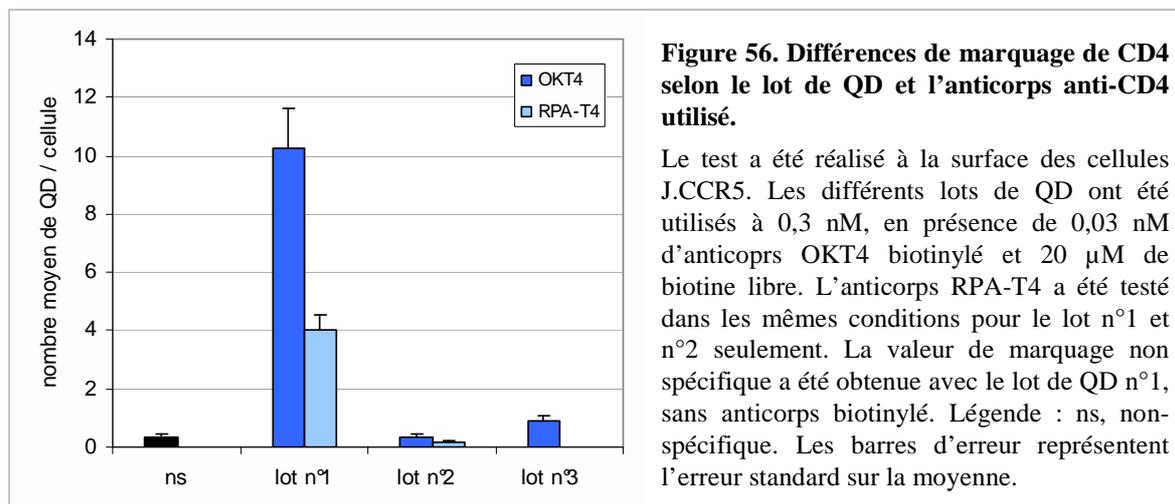
4.1. Spécificité de marquage de CD4

Nous avons dans un premier temps testé différentes concentrations de complexes QD/anticorps anti-CD4 (OKT4) en respectant un rapport 10:1, respectivement, comme discuté précédemment. De plus, nous avons abordé dans le chapitre I (§ 4.1) l'intérêt d'obtenir une densité de QD peu élevée à la surface des cellules, de manière à permettre une détection et reconnexion efficace des trajectoires *via* le programme MTT. C'est pourquoi nous avons sélectionné les concentrations de 0,3 nM pour les QD et 0,03 nM pour l'anticorps, conduisant à une moyenne d'environ 15 QD par cellules (fig. 55A). La spécificité du marquage a été vérifiée en ajoutant un excès d'anticorps OKT4 non biotinylé (fig. 55B). Le nombre de QD liés aux cellules de manière non-spécifique ne représente qu'environ 10 % du marquage total. Nous avons finalement vérifié qu'une concentration en biotine libre de 20 μ M ne modifiait pas ce marquage (fig. 55B).



4.2. Influence du lot de QD sur les résultats

Au cours de nos expériences de SPT, la consommation de notre stock de QD (lot n°1) nous a amenés à commander un autre échantillon de QD chez notre fournisseur (lot n°2). Malheureusement, nous avons immédiatement constaté que les conditions précédemment choisies pour marquer le récepteur CD4, soit QD à 0,3 nM / anticorps anti-CD4 à 0,03 nM / biotine libre à 20 μ M, conduisait à une absence totale de marquage significatif, c'est-à-dire peu différent de celui obtenu pour les QD seuls (fig. 56). Pensant à un problème de fabrication au niveau du lot de QD en question, nous avons commandé un troisième tube (lot n°3), mais le même résultat a été observé. Pour savoir si ce problème était dû à l'anticorps OKT4, les tests ont été réalisés avec un clone d'anticorps anti-CD4 différent (RPA-T4, BD Biosciences), mais aucun marquage significatif n'a été constaté (fig. 56).



Des observations en diffusion dynamique de la lumière (DLS, pour Dynamic Light Scattering) ou en microscopie électronique à transmission n'ont pas révélé de différences majeures entre les différents lots. Par ailleurs, une mesure de saturation, avec de la biotine libre, des molécules de streptavidines recouvrant les QD du lot n°2 et 3 a conduit à des valeurs très différentes de celles obtenues pour le lot n°1 (fig. 57). En effet, pour les QD des lots n°2 et 3, le taux de saturation est d'environ 50 % pour une concentration en biotine libre de 0,1 pM, alors qu'il faut environ 2 μ M de biotine libre pour atteindre le même taux de saturation pour les QD du lot n°1. Finalement, c'est en retirant l'étape d'ajout de biotine libre avec les QD des lots n°2 et 3 que nous avons pu retrouver le nombre moyen de QD par cellule précédemment observé pour le lot n°1. La cause de cette différence reste aujourd'hui indéterminée.

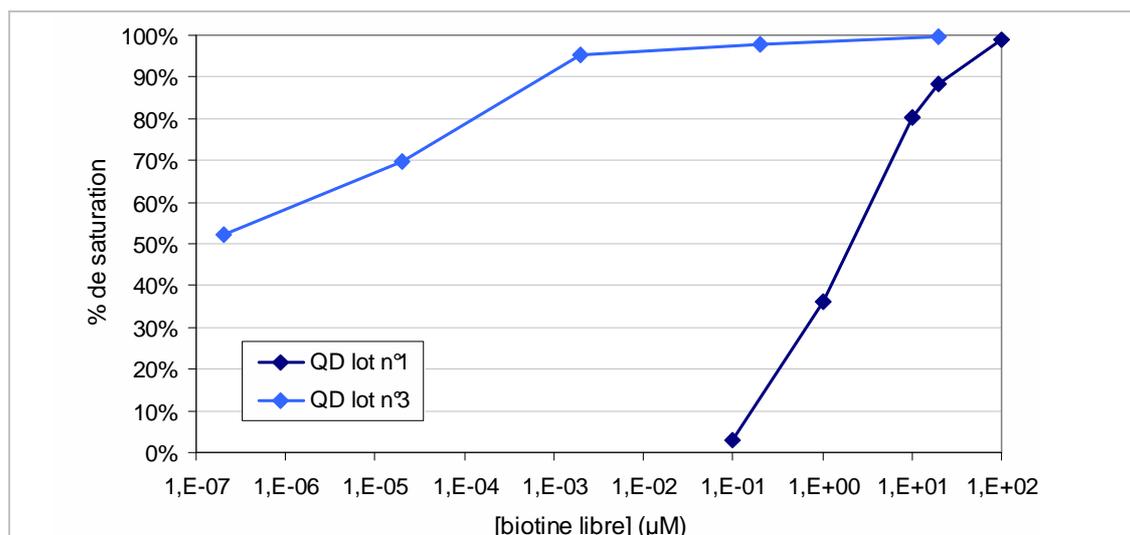


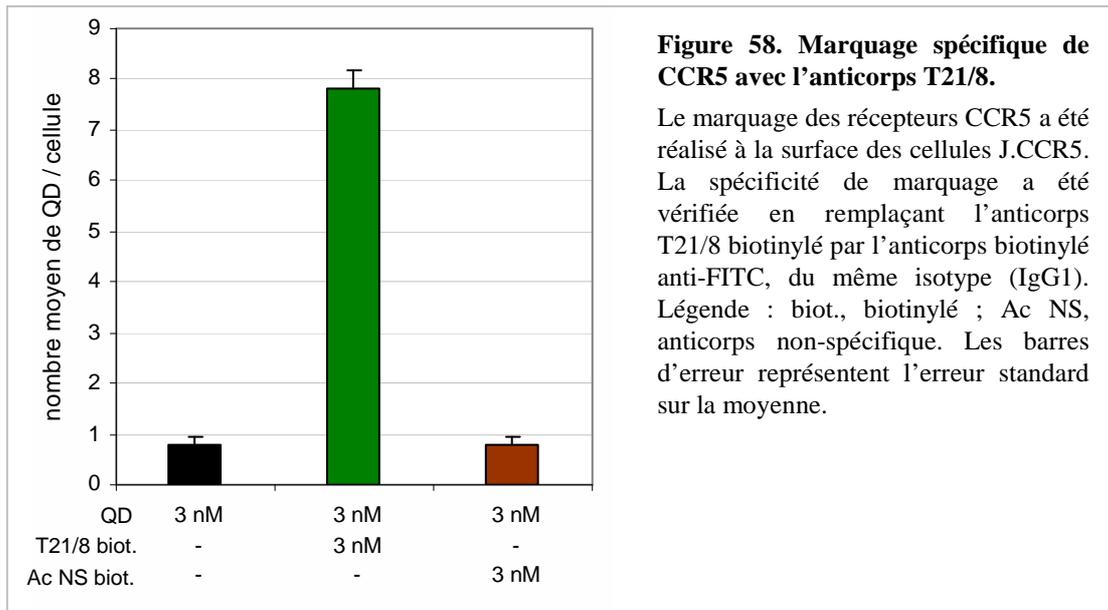
Figure 57. Saturation des streptavidines des QD en fonction de la quantité de biotine libre.

Le pourcentage de saturation des streptavidines des QD a été déterminé par comptage des particules ayant réussi à s'accrocher à une surface biotinylée en présence de doses croissantes de biotine libre. Chaque courbe correspond aux valeurs obtenues pour deux lots de QD différents.

En conséquence, les résultats présentés par la suite ont été obtenus soit avec le lot de QD n°1, soit avec le n°3.

4.3. Spécificité de marquage de CCR5

Concernant le récepteur CCR5, il n'a pas été possible de respecter un rapport de concentrations [QD] / [anticorps] égal à 10:1. En effet, l'anticorps T21/8 a une affinité insuffisante pour le récepteur pour pouvoir le diluer de manière importante et conserver un marquage satisfaisant. Une densité d'environ 8 QD par cellule a été obtenue en utilisant les QD (lot n°3) et l'anticorps à une concentration de 3 nM (fig. 58). La spécificité de ce marquage a été vérifiée en remplaçant l'anticorps T21/8 par un anticorps biotinylé du même isotype car nous ne disposons pas de la forme non biotinylée du T21/8. Dans ces conditions, le marquage non-spécifique correspond à environ 10 % du marquage total (fig. 58). A court terme, ce test sera refait en présence d'un excès d'anticorps anti-CCR5 non biotinylé pour démontrer plus rigoureusement la spécificité de marquage, comme nous l'avons fait pour l'anticorps OKT4.



CHAPITRE IV

Suivi de CD4 et CCR5, récepteurs du VIH, à la surface d'une lignée lymphocytaire humaine

Les travaux précédents menés au sein de notre équipe ont montré par FRET l'existence d'une interaction constitutive entre le récepteur primaire CD4 et le corécepteur CCR5, sur des cellules modèles HEK 293T surexprimant ces récepteurs fusionnés avec une protéine fluorescente (Gaibelet *et al.*, 2006). Une étude par FRAP à rayon variable (FRAPrv) sur ces mêmes cellules a révélé qu'environ la moitié des récepteurs se déplacent aléatoirement dans de grands domaines joints ($R \approx 1,5 \mu\text{m}$), et que l'autre moitié diffuse de manière restreinte dans de petits domaines ($R \approx 0,34 \mu\text{m}$), où l'interaction CD4-CCR5 a lieu avec un rapport estimé à au moins 5 récepteurs CCR5 pour 1 CD4 (voir chapitre I, Baker *et al.*, 2007). Mon projet de thèse avait pour but d'analyser la diffusion de ces deux récepteurs avec une grande résolution spatio-temporelle, par la technique de SPT, à la surface de cellules immunitaires exprimant CD4 et CCR5 sous forme sauvage, et pouvant être infectées par le VIH.

Nous avons initié l'étude de la diffusion des récepteurs à l'état basal, à la surface des lymphocytes J.CCR5 sélectionnés. Les expériences de FRAPrv ayant été conduites à température ambiante (20°C), nous nous sommes placés dans un premier temps dans les mêmes conditions. Par la suite, la diffusion du récepteur CD4 a été étudiée à température physiologique (37°C). L'ensemble de ces travaux ont fait l'objet d'une publication insérée dans la suite.

Partant de l'hypothèse d'une interaction constitutive entre CD4 et CCR5, nous avons cherché à la déstabiliser par l'ajout de CD4 soluble ou de maraviroc, un antagoniste de CCR5, de manière à déterminer la contribution de cette liaison dans la dynamique respective des deux récepteurs.

Enfin, nous avons évalué l'influence de la protéine d'enveloppe virale gp120 sur la diffusion du récepteur CD4, pour tenter de relier les comportements observés aux différentes étapes du processus d'entrée du VIH dans les cellules cibles et ainsi mieux les comprendre.

Comme nous l'avons annoncé à la fin du chapitre précédent, les données de SPT présentées ici ont été obtenues avec deux lots différents de QD (n°1 et n°3). Du fait des différences constatées entre ces deux lots, la comparaison des résultats est effectuée en priorité pour un même lot. Le numéro de lot concerné est précisé dans chaque partie de ce chapitre. Par ailleurs, les valeurs de coefficients de diffusion D présentées correspondent par défaut au D_{1-2} , calculé à partir des deux premiers points de la courbe de MSD, car cette valeur est la plus précise que l'on puisse obtenir *via* le calcul du MSD (voir chapitre II). De plus, la distribution de ces valeurs sera systématiquement présentée sous forme d'histogramme en barres, en fonction du logarithme des D , pour une meilleure appréciation de leur variation.

Les expériences décrites ici ont été réalisées par moi-même, avec l'aide d'Anne-Sophie Lamort, stagiaire en Master 2 Recherche, et sous la supervision de Laurence Salomé et Fabrice Dumas.

1. Etude du récepteur CD4

1.1. A l'état basal : 20°C / 37°C

L'étude du comportement du récepteur CD4 à la surface des cellules J.CCR5 a été menée dans un premier temps à température ambiante (20°C), température à laquelle les résultats de FRAP_{rv} ont été obtenus sur cellules modèles HEK 293T. Cependant, au sein de l'organisme humain, les processus biologiques s'opèrent à 37°C. C'est pourquoi nous avons complété le suivi de CD4 à cette température.

Nous avons vu dans l'introduction que plusieurs études suggéraient une répartition hétérogène de CD4 au sein de la membrane de lignées lymphocytaires. Pourtant, celle-ci n'a jamais été observée à une échelle nanométrique, sur des cellules vivantes et de manière dynamique. En effet, les récepteurs CD4 sont-ils confinés dans des domaines de manière permanente, ou bien peuvent-ils en sortir ?

Ainsi, nous attendons de nos travaux la confirmation ou non du confinement du récepteur à la surface des lymphocytes Jurkat exprimant le récepteur CCR5, mais aussi l'identification d'éventuelles transitions entre des mouvements aléatoires et confinés. La technique de SPT analysant la diffusion de récepteurs individuels, elle autorisait la détection de sous-populations, ainsi que le calcul de leurs paramètres diffusionnels respectifs (coefficient de diffusion, taille des domaines explorés).

Ces expériences ont été réalisées avec les QD du lot n°3, et les résultats ont été communiqués dans l'article qui suit (publié dans le journal « *Biochemical and Biophysical Research Communications* »).

1.1.1. Article n°2 (BBRC, DOI:10.1016/j.bbrc.2011.11.129)



Single Particle Tracking reveals two distinct environments for CD4 receptors at the surface of living T lymphocytes

Patrice Mascalchi^{a,b}, Anne Sophie Lamort^{a,b}, Laurence Salomé^{a,b}, Fabrice Dumas^{a,b,*}

^a CNRS, IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), 205 route de Narbonne, BP 64182, F-31077 Toulouse, France

^b Université de Toulouse, UPS, IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), F-31077 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2011

Available online 7 December 2011

Keywords:

HIV

CD4

Single Particle Tracking

Membrane organization

ABSTRACT

We investigated the lateral diffusion of the HIV receptor CD4 at the surface of T lymphocytes at 20 °C and 37 °C by Single Particle Tracking using Quantum Dots. We found that the receptors presented two major distinct behaviors that were not equally affected by temperature changes. About half of the receptors showed a random diffusion with a diffusion coefficient increasing upon raising the temperature. The other half of the receptors was permanently or transiently confined with unchanged dynamics on raising the temperature. These observations suggest that two distinct subpopulations of CD4 receptors with different environments are present at the surface of living T lymphocytes.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The process of HIV infection requires the sequential interaction of multiple receptors at the plasma membrane. Firstly, the gp120 viral envelope protein interacts with a CD4 receptor present at the surface of the target cell. Secondly, the same gp120 viral protein interacts with co-receptors (either CCR5 or CXCR4 for R5- and X4-virus, respectively) also expressed on the target cell. These successive interactions lead to protein conformational changes and, eventually, to the initiation of the fusion of viral and cellular membranes by the viral gp41 protein. This whole process finally leads to the release of the viral content into the cytoplasm of the cell (for review, see [1]).

It is now well known that the plasma membrane displays a dynamical organization with domains scaling from the nanometer to the micrometer range [2] and that this compartmentalization is essential for the regulation of many cellular functions [3,4]. Several authors have proposed that the existence of a compartmentalization of the HIV receptor and co-receptors in the plasma membrane of target cells might facilitate HIV infection [5–8]. Indeed, the virus may take advantage of such a clustering to quickly establish the numerous interactions required for membrane fusion and the release of its content into the host cell. Indications supporting this hypothesis have been reported by different groups. For example, it has been shown that the efficiency of HIV infection was dependent on receptor surface density [9]. Additionally, Singer and collaborators revealed by electron microscopy that CCR5, CD4

and CXCR4 form micro-clusters at the surface of primary macrophages and T cells [10] and our group demonstrated that a constitutive interaction of CD4 and CCR5 occurs in micrometer sized domains at the surface of stably transfected HEK cells [5,11].

A thorough analysis of the dynamical behavior of the HIV receptors within the membrane is needed for a better understanding of the early steps of the infection process. So far, however, only a few studies have focused on the dynamics of HIV receptors [5,12] and data on the dynamical membrane organization of receptors at the surface of natural targets of HIV (i.e. lymphocytes or macrophages) are still incomplete. In this study, we have used Single Particle Tracking (SPT) to study the dynamical organization of the CD4 receptor on CD4⁺ T lymphocytes with a high spatial and temporal resolution.

2. Material and methods

2.1. Cell culture

The J.CCR5 cell line (a generous gift from F. Bachelierie) is a Jurkat cell line stably expressing CCR5 after transduction by a lentiviral vector. J.CCR5 cells were cultured at 37 °C and in a 5% CO₂ atmosphere in RPMI 1640 without L-glutamine (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Lonza), and every 2 weeks with 2 mM L-glutamine (Gibco, Invitrogen).

2.2. Flow cytometry analysis

Cell surface expression of the receptors was determined as described previously [11] using a BD Biosciences FACS-Calibur.

* Corresponding author at: CNRS, IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), 205 route de Narbonne, BP 64182, F-31077 Toulouse, France.

E-mail address: fabrice.dumas@ipbs.fr (F. Dumas).

Labeling of the receptors was performed using biotinylated OKT4 anti-CD4 and T21/8 anti-CCR5 antibodies (BioLegend) coupled to streptavidin conjugated to phycoerythrin (BD).

2.3. Single Particle Tracking experiments

Cells were plated on coverslips previously incubated with 0.1 mg/ml poly-L-lysine for 5 min. For a homogenous attachment of the cells, a gentle centrifugation (50g, 7 min) was performed.

The CD4 receptors were labeled for 15 min with 0.03 nM biotinylated OKT4 antibodies (BioLegend) coupled to 0.3 nM fluorescent (655 nm) streptavidin-coated Quantum Dots (QD) (Molecular Probes, Life Technologies).

Tracking and observations were performed on an Axioplan 2 microscope (Zeiss) equipped with a Cascade II 512 EM-CCD camera (Roper Scientific) operating at a 25 Hz acquisition frequency. The fluorescent nanoparticles were illuminated with an X CITE 120 light source containing a metal halide vapor short arc lamp (Exfo), and observed through a fluar 100×/1.30 oil UV objective associated to a 1.6× multiplier tube lens in front of the camera.

2.4. Trajectories analysis

In a first step, the positions of the multiple QD present in each image have been calculated by a Gaussian fit using the Multiple Target Tracing program developed by Sergé et al. [13]. After obtaining the trajectory of each particle, the Mean Square Displacement (MSD) (Fig. 2B right) was calculated according to Eq. (1) [14,15]:

$$\text{MSD}(n\delta t) = \frac{1}{N-1-n} \sum_{j=0}^{N-1-n} \left\{ [x(j\delta t + n\delta t) - x(j\delta t)]^2 + [y(j\delta t + n\delta t) - y(j\delta t)]^2 \right\} \quad (1)$$

where δt is the time interval between two successive frames (40 ms), n is the number of time intervals, $x(t)$ and $y(t)$ are the QD coordinates at time t and N is the total number of frames.

The short term diffusion coefficient of a given trajectory segment, D_{1-2} , was determined from the slope of the first two points of the corresponding MSD [16].

To detect transient or continuous confinement events, a confinement index $\Lambda(t)$, as established by Meilhac et al. [17] was calculated on sliding intervals using Eq. (2) (Fig. 2B, center):

$$\Lambda(t) = \frac{D_{1-2}\Delta t}{\Delta r^2} \quad (2)$$

where Δr^2 is the variance of the trajectory segment of duration Δt under study. A value of $\Lambda(t) > 4$ for a period longer than Δt is characteristic of confined diffusion. The size of the domains and the diffusion coefficient inside the confined trajectory segments were determined by fitting $\text{MSD}(t)$ with its theoretical expression for confined diffusion [17]. The unconfined trajectories, partial or total, were analyzed using standard procedures [18] and classified as having either random or directed diffusion.

This analysis allowed classifying CD4 dynamics into different categories, namely random, confined, transiently confined or directed diffusion (see [19] for review).

3. Results and discussion

3.1. Choice and characterization of the lymphocyte cell line

It has been shown that HIV replicates most efficiently in activated CD4⁺ T cells [20–22]. The activation process of these cells is accompanied by the expression of surface molecules such as HLA-DR and CD25 but also the HIV co-receptor CCR5 [23]. Additionally, it has been shown that the presence of CCR5 at the cell

surface is required for the fusion of viral and cellular membranes and thus for the entry of the R5-virus into the cells [24–26]. As a consequence, HIV infection predominantly involves activated lymphocytes (i.e. that express CCR5) like those present at the gastrointestinal mucosa [21,27].

Unfortunately, upon activation of T cells, CD4 and CCR5 expression rates vary drastically, not only over time but also from cell to cell, making the interpretation of experiments very difficult. To overcome this problem, we have chosen to work on a Jurkat cell line (T lymphocytes) stably transfected by a lentiviral vector containing the CCR5 gene (referred to as “J.CCR5” cell line). As shown in Fig. 1, this cell line expresses both CD4 and CCR5 and was shown to be competent for HIV infection (data not shown). Owing to the stable expression levels of both CD4 and CCR5 over time and from cell to cell, this cell line was suitable to perform SPT experiments.

3.2. Imaging and tracking of CD4 in living cells

To investigate the movements of CD4 at the surface of J.CCR5 living cells, we observed, as a function of time, CD4 receptors labeled by a streptavidin-coated quantum dot (QD) coupled to a biotinylated-OKT4 antibody. The OKT4 antibody has been chosen since it does not inhibit CD4-CCR5 nor CD4-gp120 interactions [28,29]. QD are very stable fluorescent nanoparticles that can easily be detected by video microscopy. These particles have been shown not to affect the dynamics of the molecules they are attached to, as revealed on model membranes (Mascalchi et al., in preparation), unlike colloidal gold which led to abnormally small diffusion coefficients in previous experiments we carried out on HEK cells (data not shown).

As shown in Fig. 2A, in the conditions used, up to 10 fluorescent spots could be observed simultaneously, each corresponding to individual receptors. The coordinates of each labeled receptor were accumulated over time and compiled as described in the Material and methods section to reconstruct their trajectory (Fig. 2B left). In order to have a complete description of the dynamics of CD4, we only took into account for our analyses the trajectories comprising at least 500 $(x(t), y(t))$ coordinates (i.e. 20 s of duration) with a percentage of the time where QD could not be observed due to blinking inferior to 10%.

3.3. Mobility analysis of CD4 at 20 °C

In order to compare the present results with previous FRAP measurements [5], we first performed SPT experiments at 20 °C. Our results revealed two major distinct behaviors of CD4 on living J.CCR5 cells (Table 1). On the one hand, less than half of the receptors (43%) were free to diffuse and exhibited a random Brownian diffusion with an average diffusion coefficient, D_{1-2} , of about $6 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$. On the other hand, the remaining receptors were either transiently (45%) or permanently (12%) confined into ≈ 220 nm domains. The D_{1-2} of these confined receptors was nearly the same as that of unconfined receptors ($\approx 5 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$). Worthy of note, when transiently confined diffusion was observed, the segments with random diffusion had similar diffusion coefficients to those measured for the confined ones ($\approx 7 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$). Such a compartmentalization of the diffusion within the membrane has already been observed for many membrane proteins [30–32] and is in agreement with those found for CD4 on transfected HEK cells [5]. Several phenomena could explain this compartmentalization, such as interactions with other membrane proteins [33], lipids [34,35] or the actin cytoskeleton [36] (for review, see [2]). In future work, it will be interesting to explore which factors are responsible for the confinement of the receptor by performing SPT experiments after cholesterol depletion or after perturbation of the organization of the cytoskeleton.

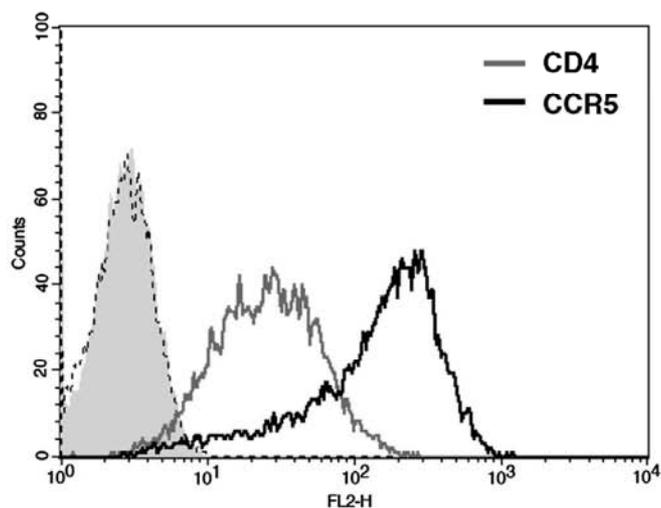


Fig. 1. Cell surface expression of CD4 and CCR5 of the HIV-susceptible J.CCR5 cells. Cell surface expression of wild-type CCR5 (black line) and CD4 (grey line) were determined by flow cytometry using the anti-CCR5 T21/8 and anti-CD4 OKT4 antibodies. As controls, the signal for J.CCR5 cells alone or incubated with streptavidin conjugated to phycoerythrin were acquired (filled peak and dashed line, respectively).

3.4. Mobility analysis of CD4 at 37 °C

Raising the temperature to 37 °C did not drastically modify the overall dynamics of the receptors: the two diffusional behaviors identified at 20 °C were still observed (Table 1). However, increasing the temperature induced a slight increase of the proportion of random diffusion (from 43% to 47%) at the expense of the permanently confined diffusion fraction that dropped from 12% to 5%. The proportion of transient confinement was nearly unchanged (48%). Fig. 3 presents the histograms of the distribution of the measured D_{1-2} for each diffusion mode. An expected consequence of raising the temperature from 20 to 37 °C is the increase of the diffusion coefficient. This appeared to be the case for the CD4 receptors with a random diffusion since most of these receptors presented a D_{1-2} two times higher at 37 than at 20 °C (Fig. 3A). This augmentation, due to the thermal Brownian motion, is in good agreement with data obtained on model systems [37,38] and on biological membranes [38,39].

Surprisingly, increasing the temperature did not modify the dynamics of the confined CD4 receptors. Both the mean values of the diffusion coefficient and the sizes of the domains of confinement remained unchanged (Table 1). It has to be noted that similar observations have been made for the transferrin receptor [40,41] and the mu-opioid receptor [14]. Fig. 3B focuses on the dynamics of transiently confined receptors. It details the distribution of the

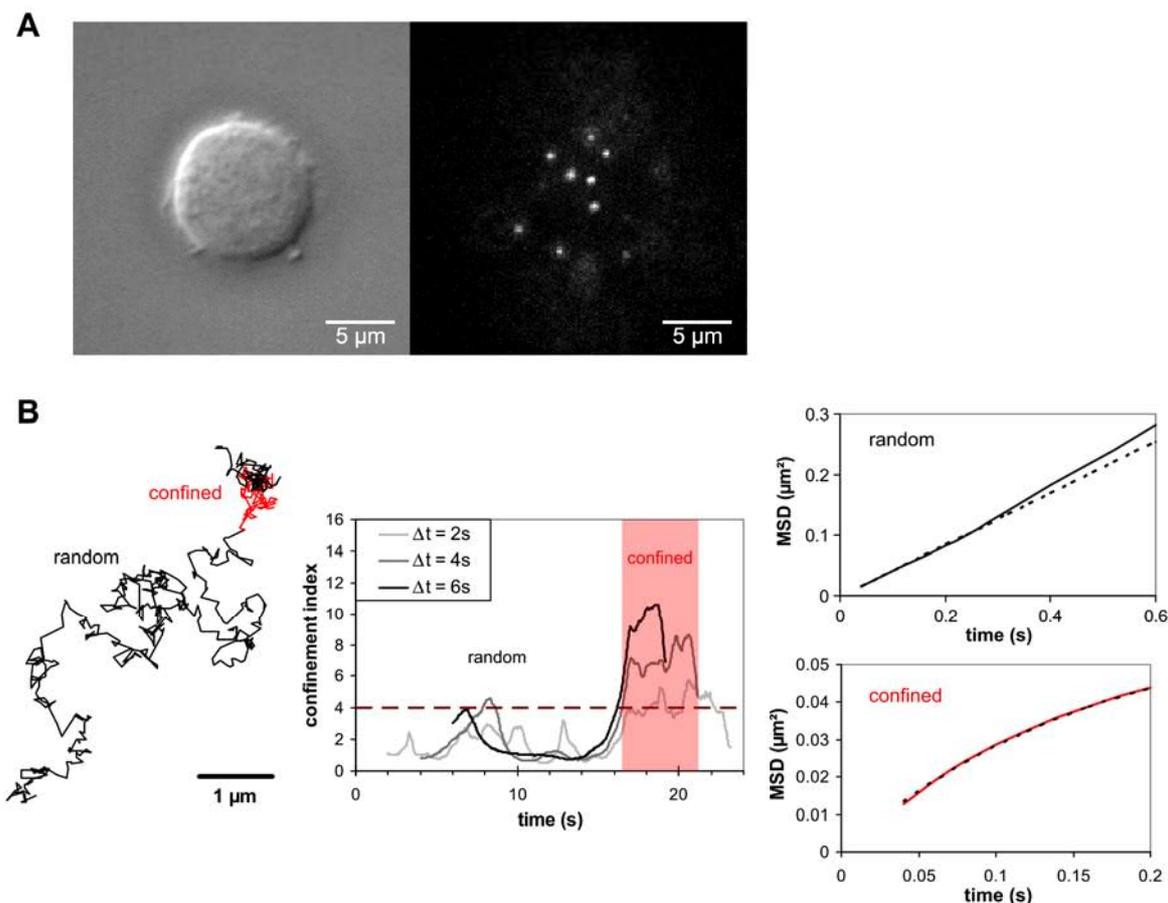


Fig. 2. Recording and analysis of receptors trajectories. (A) Bright-field imaging of a J.CCR5 cell and fluorescence imaging of CD4-antibody-QD complexes. (B, left) Example of a trajectory of a CD4 receptor with random (black) and confined (red) periods. (B, center) The confinement index calculated according to [17] allows to discriminate random from confined diffusion within a given trajectory. (B, right) The D_{1-2} and the size of the domains of the various segments of the trajectories were determined by fitting the corresponding $MSD(t)$ plots (continuous curves) with the theoretical equations (dashed curves) for random or confined diffusion (see text).

Table 1

Distribution of CD4 receptors among the different diffusion modes with their associated parameters measured at different temperatures.

	Temperature (°C)	Diffusion mode			
		Random	Confined	Transiently confined	
				Random	Confined
% of trajectories	20	43	12	45	
	37	47	5	48	
Diffusion coefficient D_{1-2} ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$)	20	6.2 ± 2.7 ($n = 29$)	5.2 ± 1.5 ($n = 8$)	7.0 ± 7.3 ($n = 54$)	
	37	11 ± 6.3 ($n = 38$)	6.5 ± 7.5 ($n = 4$)	7.4 ± 6.0 ($n = 64$)	
Domain size R (nm)	20	–	226 ± 52 ($n = 6$)	–	
	37	–	180 ± 86 ($n = 4$)	–	

The percentage of receptors with random, confined and transiently confined diffusion has been determined at 20 °C and 37 °C. For each type of diffusion, the mean value and the standard deviation of the diffusion coefficient D_{1-2} and of the radius size of confinement domains R have been evaluated (see the Section 2).

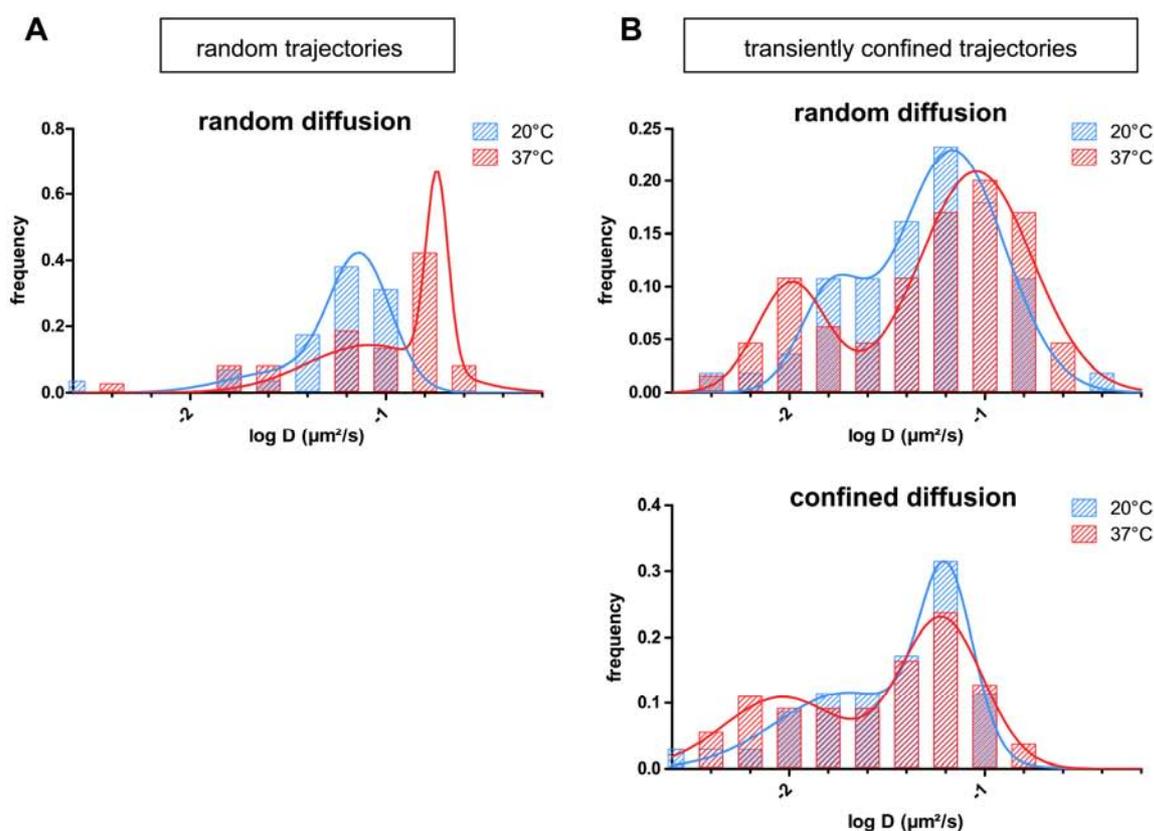


Fig. 3. Diffusion coefficients of CD4 for random or transiently confined trajectories obtained at 20 °C (blue) and 37 °C (red). Histogram of the diffusion coefficients D_{1-2} of random trajectories. Increasing the temperature resulted in an overall increase of the diffusion coefficients of freely diffusing CD4 receptors. (A) Histogram of the diffusion coefficients D_{1-2} of transiently confined trajectories. Random and confined sections have been analyzed separately. Changing the temperature did not significantly modify the dynamics of transiently confined CD4 receptors. (B) Histogram of the diffusion coefficients D_{1-2} of transiently confined trajectories. Random and confined sections have been analyzed separately. Changing the temperature did not significantly modify the dynamics of transiently confined CD4 receptors. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

diffusion coefficient of the random part and the confined part of the trajectories. Interestingly, both were insensitive to temperature changes. This indicates that the temperature dependence of the diffusion of the CD4 receptors is more likely influenced by their local environment than related to their diffusion mode (random or confined).

Whatever the reasons are for the observed differences in the dynamical behavior of CD4, these results demonstrate that different populations of CD4 with different environments are present at the surface of lymphocyte cells. As a consequence, depending on their location within the membrane, CD4 receptors might have a different propensity to interact with the HIV Envelope protein. To

go further in the understanding of the importance of this dichotomy for the infection process, it will be necessary to study the dynamics of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 on living J.CCR5 cells in order to evaluate whether it can be correlated to that of CD4. This should give us new insights in the early stages of the HIV infection process.

Acknowledgments

We thank F. Bachelier and A. Amara for providing the J.CCR5 cell line, and E. Haanappel and E. Joly for language editing. This project was supported by grants from the Agence Nationale de Recher-

che sur le Sida et les hépatites (ANRS) and the Association de lutte contre le sida (SIDACTION). P. Mascalchi benefited from ANRS and SIDACTION PhD fellowships. Flow cytometry experiments have been carried out at the Toulouse Réseau Imagerie (TRI) platform. Our research group belongs to the CNRS consortium CellTiss.

References

- [1] R.W. Doms, Beyond receptor expression: The influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection, *Virology* 276 (2000) 229–237.
- [2] D.M. Engelman, Membranes are more mosaic than fluid, *Nature* 438 (2005) 578–580.
- [3] D. Marguet, P.F. Lenne, H. Rigneault, H.T. He, Dynamics in the plasma membrane: How to combine fluidity and order? *EMBO J.* 25 (2006) 3446–3457.
- [4] P.F. Lenne, L. Wawrezynieck, F. Conchonaud, O. Wurtz, A. Boned, X.J. Guo, H. Rigneault, H.T. He, D. Marguet, Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork, *EMBO J.* 25 (2006) 3245–3256.
- [5] A.M. Baker, A. Sauliere, G. Gaibelet, B. Lagane, S. Mazeret, M. Fourage, F. Bachelier, L. Salome, A. Lopez, F. Dumas, CD4 interacts constitutively with multiple CCR5 at the plasma membrane of living cells. A fluorescence recovery after photobleaching at variable radii approach, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 35163–35168.
- [6] M.I. Chang, P. Panorchan, T.M. Dobrowsky, Y. Tseng, D. Wirtz, Single-molecule analysis of human immunodeficiency virus type 1 gp120-receptor interactions in living cells, *J. Virol.* 79 (2005) 14748–14755.
- [7] Y. Percherancier, B. Lagane, T. Planchenault, I. Staropoli, R. Altmeyer, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, D.C. Hoessli, F. Bachelier, HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 3153–3161.
- [8] X. Xiao, L. Wu, T.S. Stantchev, Y.R. Feng, S. Ugolini, H. Chen, Z. Shen, J.L. Riley, C.C. Broder, Q.J. Sattentau, D.S. Dimitrov, Constitutive cell surface association between CD4 and CCR5, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 7496–7501.
- [9] M. Viard, I. Parolini, M. Sargiacomo, K. Fecchi, C. Ramoni, S. Ablan, F.W. Ruscelli, J.M. Wang, R. Blumenthal, Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells, *J. Virol.* 76 (2002) 11584–11595.
- [10] I.I. Singer, S. Scott, D.W. Kawka, J. Chin, B.L. Daugherty, J.A. DeMartino, J. DiSalvo, S.L. Gould, J.E. Lineberger, L. Malkowitz, M.D. Miller, L. Mitnaul, S.J. Siciliano, M.J. Staruch, H.R. Williams, H.J. Zweerink, M.S. Springer, CCR5, CXCR4, and CD4 are clustered and closely apposed on microvilli of human macrophages and T cells, *J. Virol.* 75 (2001) 3779–3790.
- [11] G. Gaibelet, T. Planchenault, S. Mazeret, F. Dumas, F. Arenzana-Seisdedos, A. Lopez, B. Lagane, F. Bachelier, CD4 and CCR5 constitutively interact at the plasma membrane of living cells: A confocal fluorescence resonance energy transfer-based approach, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 37921–37929.
- [12] C.M. Steffens, T.J. Hope, Mobility of the human immunodeficiency virus (HIV) receptor CD4 and coreceptor CCR5 in living cells: Implications for HIV fusion and entry events, *J. Virol.* 78 (2004) 9573–9578.
- [13] A. Serge, N. Bertaux, H. Rigneault, D. Marguet, Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes, *Nat. Methods* 5 (2008) 687–694.
- [14] F. Daumas, N. Destainville, C. Millot, A. Lopez, D. Dean, L. Salome, Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking, *Biophys. J.* 84 (2003) 356–366.
- [15] H. Qian, M.P. Sheetz, E.L. Elson, Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems, *Biophys. J.* 60 (1991) 910–921.
- [16] X. Michalet, Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error: Brownian motion in an isotropic medium, *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 82 (2010) 041914.
- [17] N. Meilhac, L. Le Guyader, L. Salome, N. Destainville, Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories, *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 73 (2006) 011915.
- [18] M.J. Saxton, K. Jacobson, Single-particle tracking: Applications to membrane dynamics, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26 (1997) 373–399.
- [19] A. Baker, A. Sauliere, F. Dumas, C. Millot, S. Mazeret, A. Lopez, L. Salome, Functional membrane diffusion of G-protein coupled receptors, *Eur. Biophys. J.* 36 (2007) 849–860.
- [20] Z.F. Rosenberg, A.S. Fauci, Immunopathogenesis of HIV infection, *FASEB J.* 5 (1991) 2382–2390.
- [21] R.S. Veazey, M. DeMaria, L.V. Chalifoux, D.E. Shvetz, D.R. Pauley, H.L. Knight, M. Rosenzweig, R.P. Johnson, R.C. Desrosiers, A.A. Lackner, Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection, *Science* 280 (1998) 427–431.
- [22] S.C. Bangs, A.J. McMichael, X.N. Xu, Bystander T cell activation—implications for HIV infection and other diseases, *Trends Immunol.* 27 (2006) 518–524.
- [23] C.C. Bleul, L. Wu, J.A. Hoxie, T.A. Springer, C.R. Mackay, The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 1925–1930.
- [24] A.M. de Roda Husman, H. Blaak, M. Brouwer, H. Schuitemaker, CC chemokine receptor 5 cell-surface expression in relation to CC chemokine receptor 5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection, *J. Immunol.* 163 (1999) 4597–4603.
- [25] Y.L. Lin, C. Mettling, P. Portales, J. Reynes, J. Clot, P. Corbeau, Cell surface CCR5 density determines the postentry efficiency of R5 HIV-1 infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 15590–15595.
- [26] M. Paiardini, B. Cervasi, E. Reyes-Aviles, L. Micci, A.M. Ortiz, A. Chahroudi, C. Vinton, S.N. Gordon, S.E. Bosinger, N. Francella, P.L. Hallberg, E. Cramer, T. Schlub, M.L. Chan, N.E. Riddick, R.G. Collman, C. Apetrei, I. Pandrea, J. Else, J. Munch, F. Kirchhoff, M.P. Davenport, J.M. Brechley, G. Silvestri, Low levels of SIV infection in sooty mangabey central memory CD T cells are associated with limited CCR5 expression, *Nat. Med.* 17 (2011) 830–836.
- [27] M.A. Poles, J. Elliott, P. Taing, P.A. Anton, I.S. Chen, A preponderance of CCR5(+) CXCR4(+) mononuclear cells enhances gastrointestinal mucosal susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection, *J. Virol.* 75 (2001) 8390–8399.
- [28] S. Bour, F. Boulterice, M.A. Wainberg, Inhibition of gp160 and CD4 maturation in U937 cells after both defective and productive infections by human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* 65 (1991) 6387–6396.
- [29] R. Staudinger, S.K. Phogat, X. Xiao, X. Wang, D.S. Dimitrov, S. Zolla-Pazner, Evidence for CD4-enhanced signaling through the chemokine receptor CCR5, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 10389–10392.
- [30] J. Mukherjee, K. Kretschmannova, G. Gouzer, H.M. Maric, S. Ramsden, V. Tretter, K. Harvey, P.A. Davies, A. Triller, H. Schindelin, S.J. Moss, The Residence time of GABAARs at inhibitory synapses is determined by direct binding of the receptor α 1 subunit to gephyrin, *J. Neurosci.* 31 (2011) 14677–14687.
- [31] C.D. Valentine, P.M. Haggie, Confinement of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors in the plasma membrane of cardiomyocyte-like H9c2 cells is mediated by selective interactions with PDZ domain and A-kinase anchoring proteins but not caveolae, *Mol. Biol. Cell* 22 (2011) 2970–2982.
- [32] A.L. Wolf-Ringwall, P.W. Winter, J. Liu, A.K. Van Orden, D.A. Roess, B.G. Barisas, Restricted lateral diffusion of luteinizing hormone receptors in membrane microdomains, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 29818–29827.
- [33] F. Daumas, N. Destainville, C. Millot, A. Lopez, D. Dean, L. Salome, Interprotein interactions are responsible for the confined diffusion of a G-protein-coupled receptor at the cell surface, *Biochem. Soc. Trans.* 31 (2003) 1001–1005.
- [34] H.T. McMahon, J.L. Gallop, Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling, *Nature* 438 (2005) 590–596.
- [35] P. Sharma, R. Varma, R.C. Sarasij, I. Ira, K. Gousset, G. Krishnamoorthy, M. Rao, S. Mayor, Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes, *Cell* 116 (2004) 577–589.
- [36] A. Kusumi, Y. Sako, Cell surface organization by the membrane skeleton, *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 (1996) 566–574.
- [37] H.C. Berg (Ed.), *Random Walks in Biology*, Princeton University, 1983.
- [38] E.A. Reits, J.J. Neeffjes, From fixed to FRAP: Measuring protein mobility and activity in living cells, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) E145–147.
- [39] D.A. Jans, R. Peters, F. Fahrenholz, Lateral mobility of the phospholipase C-activating vasopressin V1-type receptor in A7r5 smooth muscle cells: A comparison with the adenylate cyclase-coupled V2-receptor, *EMBO J.* 9 (1990) 2693–2699.
- [40] Y. Sako, A. Kusumi, Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: Fence versus tether, *J. Cell Biol.* 129 (1995) 1559–1574.
- [41] Y. Sako, A. Kusumi, Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis, *J. Cell Biol.* 125 (1994) 1251–1264.

1.1.2. Discussion

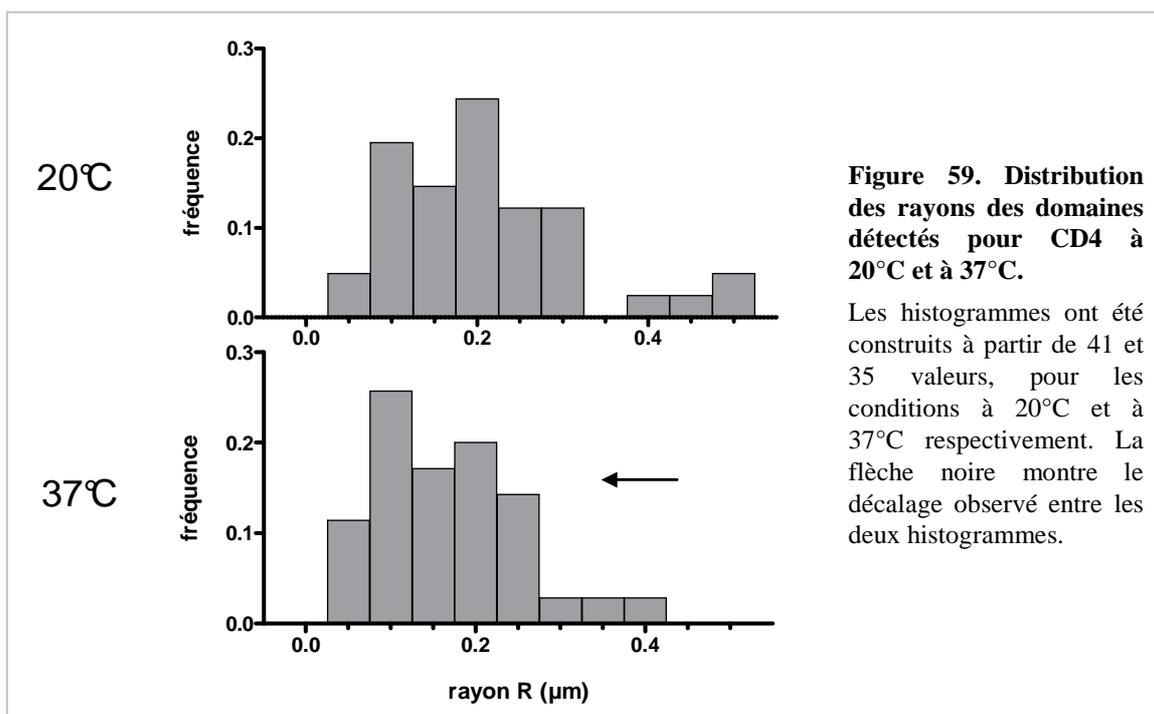
Cette publication constitue les premiers résultats d'expériences de SPT pour le récepteur CD4, et de plus sur cellules immunitaires. En effet, les précédentes études de dynamique du récepteur, utilisant la technique de FRAP, suggéraient l'existence de domaines par la mesure d'une fraction mobile relativement faible, mais il était impossible de savoir si les CD4 immobiles correspondaient à des récepteurs mobiles mais confinés ou réellement immobilisés (Pal *et al.*, 1991; Foti *et al.*, 2002). Notre étude par FRAPrv sur cellules modèles HEK 293T avait permis l'observation de domaines à l'échelle de quelques centaines de nanomètres incluant CD4 ($R \approx 340$ nm, Baker *et al.*, 2007), et nos travaux en SPT ont révélé des tailles de domaine du même ordre de grandeur ($R \approx 200$ nm). En revanche, les grands domaines détectés en FRAPrv ($R \approx 1,5$ μ m) n'ont pas d'équivalent parmi ceux observés en SPT, et cela peut très bien être dû aux différences morphologiques existant entre les deux types cellulaires. Nous avons surtout mis en évidence le caractère transitoire du confinement de CD4, indiquant que le récepteur peut diffuser au travers des limites de ces domaines. De plus, les expériences de FRAPrv ont été réalisées à température ambiante et nous ne connaissions pas le comportement du récepteur à 37°C. Ici, l'adaptation d'une chambre thermostatée autour du microscope (voir *Matériels & Méthodes*) nous a permis de réaliser des acquisitions vidéo à la surface des cellules J.CCR5 à 37°C, en plus de celles obtenues à température ambiante.

En résumé, nous avons observé que la sous-population de CD4 diffusant aléatoirement, sans confinement transitoire, voyait son coefficient de diffusion nettement augmenté lors des mesures à 37°C. Le mouvement des molécules est en effet naturellement soumis à l'agitation thermique, directement liée à la température. On peut donc s'attendre à une augmentation du coefficient de diffusion pour une molécule membranaire qui n'est pas contrainte (Berg, 1993), ce qui a été confirmé sur système lipidique modèle (Reits & Neefjes, 2001). Or, les coefficients de diffusion, mesurés lors des périodes de diffusion aléatoire des récepteurs CD4 confinés transitoirement, sont restés inchangés lors de l'augmentation de température. Il semble donc que cette diffusion aléatoire transitoire corresponde à un déplacement dans un environnement membranaire différent de celui des récepteurs CD4 diffusant aléatoirement sans transitions. En particulier, si l'augmentation d'agitation thermique n'accroît pas la diffusion aléatoire d'une molécule, on peut supposer que son mouvement est contraint par une interaction avec un ou plusieurs partenaires. Une hypothèse serait ainsi que les CD4 confinés transitoirement interagissent avec un partenaire non identifié, qui peut être d'origine lipidique ou protéique, membranaire ou cytosolique. Il est difficile d'en dire plus car de nombreuses

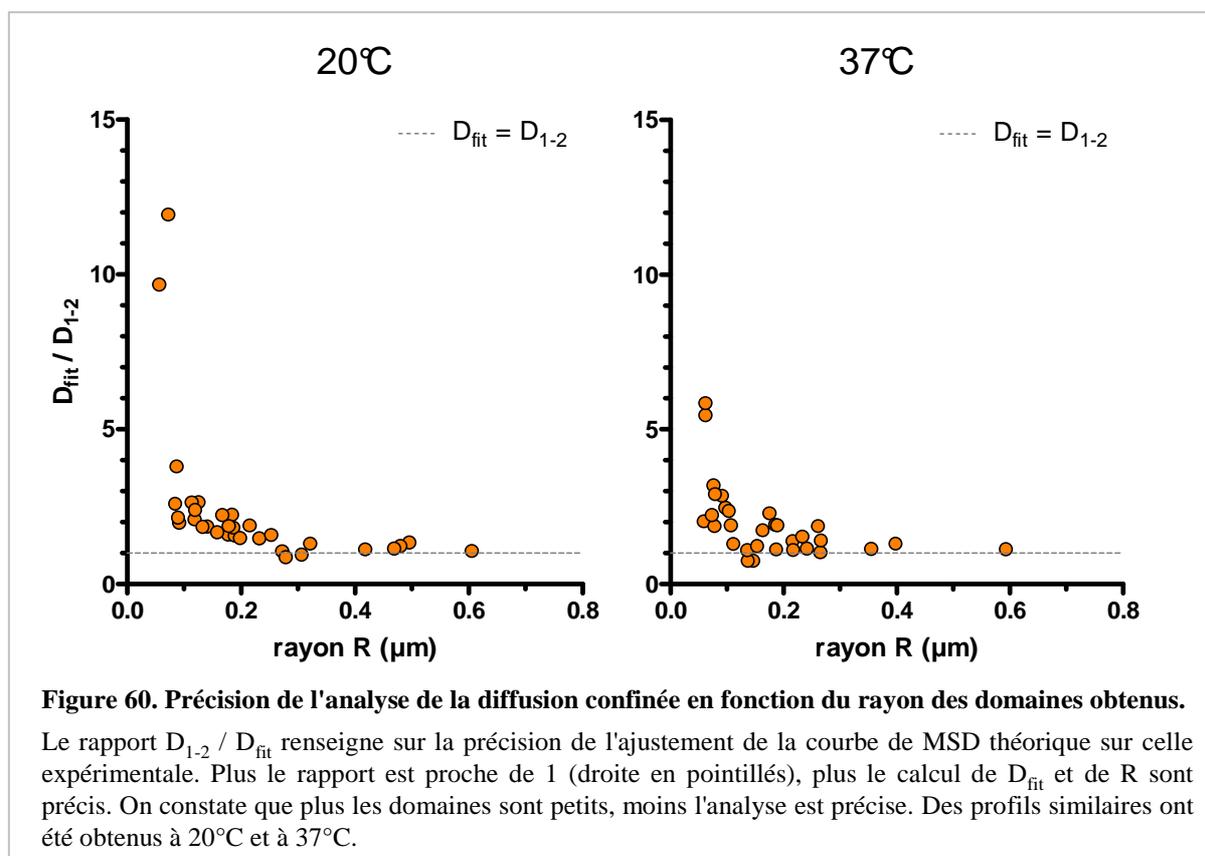
modifications s'opèrent entre 20°C et 37°C au sein d'une cellule. Par exemple, l'activité des enzymes est sensible à la température, et il est possible que des cascades de signalisation entières soient seulement actives à 37°C.

Par ailleurs, une remarque peut être faite à propos des histogrammes de distribution des coefficients de diffusion, en particulier pour les confinements transitoires, à 37°C. Les valeurs semblent se diviser en deux sous-groupes, séparés par un facteur 10 environ, et visualisables *via* les traits pleins sur la figure (voir article n°2). Deux hypothèses peuvent expliquer cet écart. Il peut être le résultat d'un artefact relatif à nos conditions expérimentales, comme par exemple l'emploi d'anticorps entiers pouvant se lier à soit un, soit deux CD4 simultanément, ou bien l'écart constaté reflète l'existence de deux sous-populations de récepteurs ayant le même mode de diffusion. Dans ce dernier cas, des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour comprendre l'origine de cette différence.

Ensuite, cette étude de la diffusion de CD4 par SPT a révélé qu'environ la moitié des récepteurs étaient confinés dans des domaines d'environ 200 nm de rayon, et ce de manière transitoire, majoritairement. Nous avons toutefois constaté une légère diminution de la taille des domaines suite à l'augmentation de température ($R \sim 220 \text{ nm} \rightarrow 180 \text{ nm}$). La visualisation de la distribution des rayons mesurés (fig. 59) indique que la réduction touche surtout les plus grands domaines ($R > 400 \text{ nm}$).



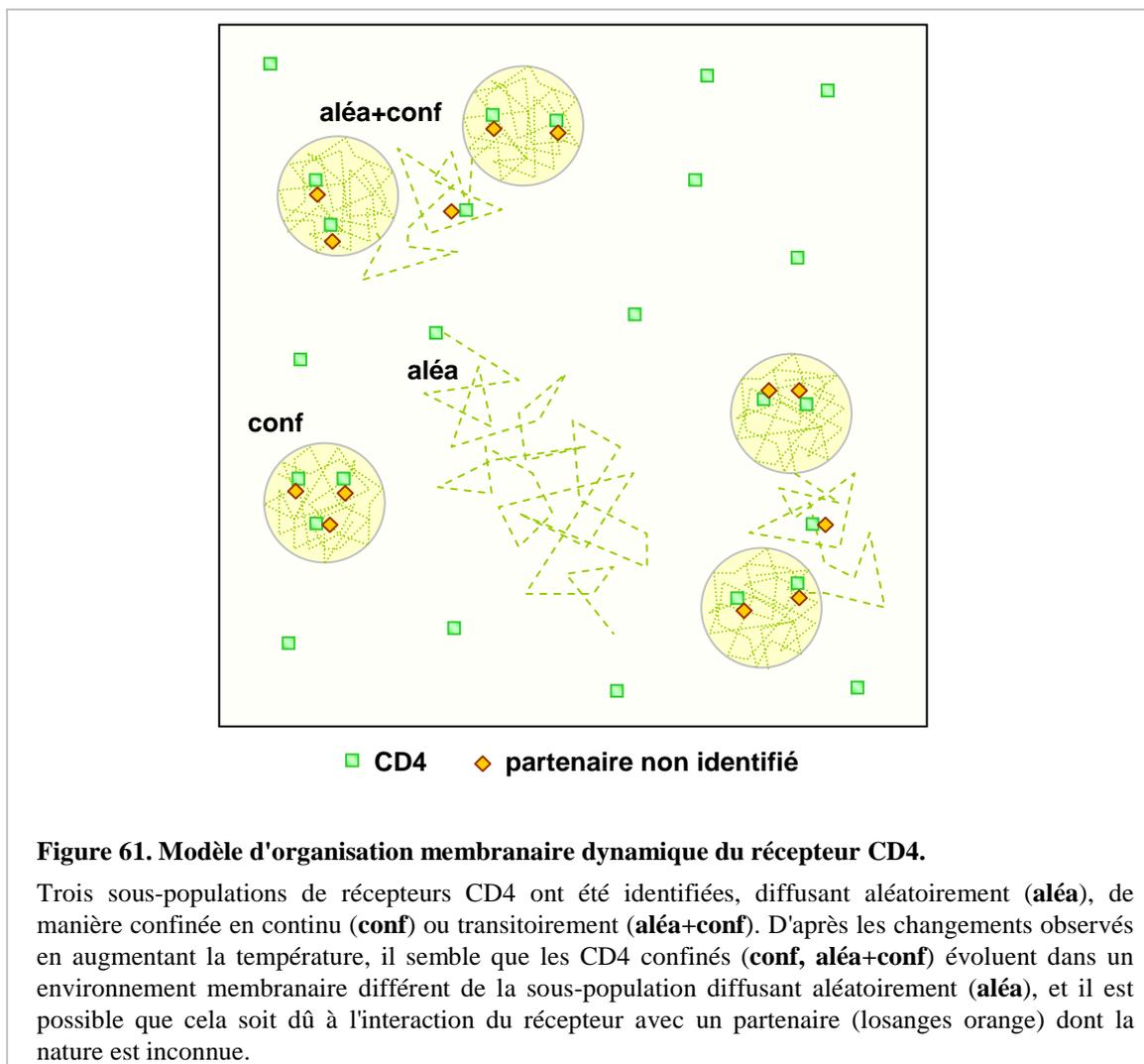
Cependant, il est possible que notre mesure de la dimension des confinements ait été biaisée dans une condition plus que dans une autre. Pour le savoir, nous avons comparé les coefficients de diffusion aux temps très courts (D_{1-2}) à ceux obtenus par l'ajustement de la courbe de MSD au modèle de diffusion confinée (D_{fit}) qui intervient dans le calcul de R. Globalement, plus ces coefficients sont proches, plus la taille du domaine a été déterminée avec précision. Ainsi, pour chaque trajectoire, l'expression du rapport D_{fit} / D_{1-2} en fonction de R montre que l'analyse est moins précise pour les petits domaines (fig. 60), surtout lorsque l'on se rapproche de la limite de résolution de la technique (~ 30 nm), ce qui était attendu. Pour les domaines les plus grands, la précision est maximale. Etant donné que les graphiques sont similaires pour les deux températures, les imprécisions sur la mesure de R ne peuvent expliquer la légère diminution de taille des domaines constatée lors de l'augmentation de température. Il semble que cette différence soit bien un effet du changement de température. Notons que des profils identiques de rapport D_{fit} / D_{1-2} en fonction de R ont été obtenus pour toutes les expériences du projet, prouvant l'homogénéité de notre analyse.



La diminution de la taille des domaines sous l'augmentation de la température a déjà été observée pour d'autres protéines, comme par exemple le récepteur mu aux opioïdes (Daumas *et al.*, 2003) et le récepteur à la transferrine (Sako & Kusumi, 1994, 1995). Cependant, ce phénomène n'a pas été corrélé à une origine de confinement précise, c'est pourquoi il est difficile d'interpréter cette variation pour le récepteur CD4. Notons de plus que les études citées constatent aussi une diminution des coefficients de diffusion associés à ces confinements, alors que dans notre cas, ils sont inchangés entre 20 et 37 °C.

→ **Modèle d'organisation membranaire dynamique**

Nous pouvons à partir de ces données proposer un premier modèle d'organisation membranaire dynamique de CD4 (fig. 61). Le récepteur diffuse soit aléatoirement (« aléa »), soit de manière confinée dans des domaines d'environ 200 nm de rayon (« conf »). Des transitions peuvent avoir lieu entre ces deux modes de diffusion (« aléa+conf »), mais les



récepteurs restent dans un environnement membranaire insensible au changement de température, différent de celui des récepteurs diffusant aléatoirement et sans comportement transitoire. Nous avons émis l'hypothèse que ces récepteurs sont en contact avec un partenaire non identifié, représenté par des losanges orange. L'origine du confinement de CD4 est indépendante de ce partenaire, et a été représentée par un fond jaune dans les cercles correspondant aux domaines.

Notre équipe a précédemment montré qu'une interaction constitutive a lieu entre CD4 et CCR5 (Gaibelet *et al.*, 2006) et qu'elle est responsable de la formation des petits domaines ($R \sim 340$ nm) observés en FRAPrv (Baker *et al.*, 2007). De plus, la stœchiométrie de cette interaction a été estimée à au moins 5 CCR5 pour 1 CD4. Nous avons voulu savoir si les domaines observés dans la membrane des lymphocytes J.CCR5 avaient la même origine. Dans les expériences de FRAPrv, le CD4 soluble a été utilisé à 100 nM pour inhiber la liaison CD4-CCR5. Nous avons donc repris ces conditions pour nos mesures de SPT.

1.2. Diffusion de CD4 en présence de CD4 soluble (CD4s)

Comme le montre le schéma de la figure 62, nous nous attendions à ce que le CD4s se lie à la boucle extracellulaire n°2 du récepteur CCR5 et entre en compétition avec les CD4 membranaires liés aux CCR5. Il faut noter que nous ne connaissons pas la proportion de récepteurs CD4 qui sont impliqués dans ce type d'interaction à la surface des cellules J.CCR5.

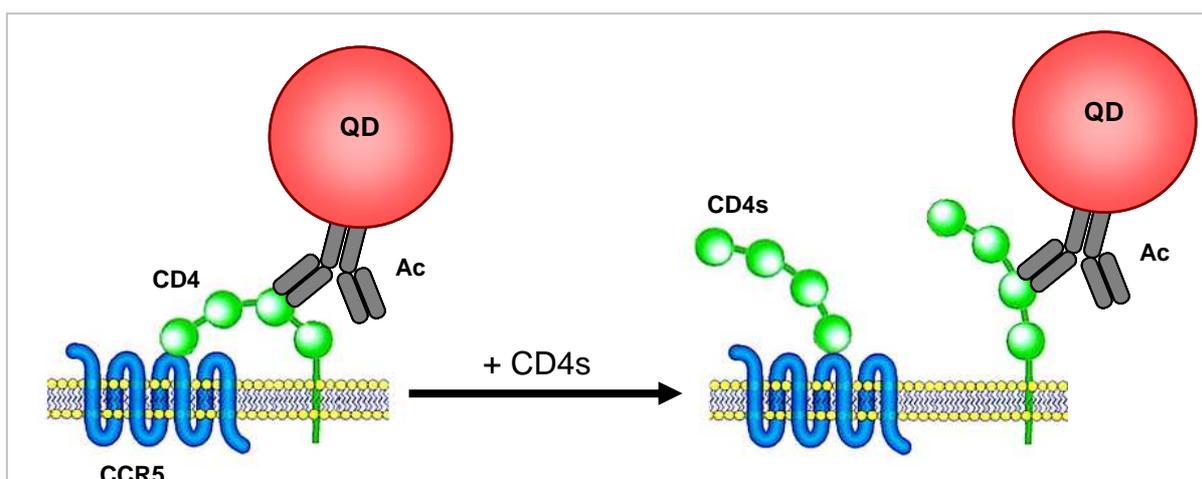


Figure 62. Schéma de la stratégie de suivi de CD4 en présence de CD4s.

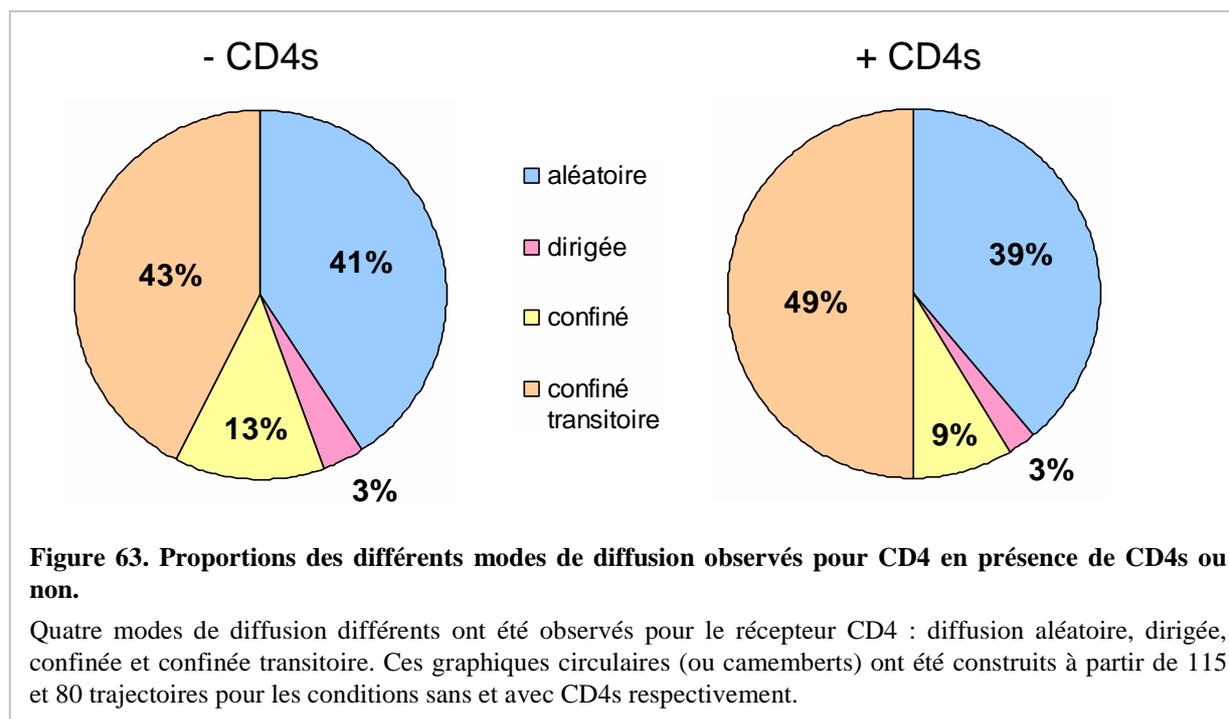
A l'état basal, les récepteurs CD4 et CCR5 peuvent former des hétérodimères (à gauche). L'ajout de CD4s établit une compétition avec le CD4 membranaire vis-à-vis de CCR5 (à droite). Nous pouvons ainsi suivre le récepteur CD4 découplé de CD4 avec les complexes QD-Ac. Légende : Ac, anticorps. Note : Ce schéma n'est pas dessiné à l'échelle. Adapté de : Pierson & Doms, 2003.

Ces expériences ont été effectuées avec le lot de QD n°1. Cela signifie que pour la condition sans CD4s, nous étudions le récepteur CD4 à l'état basal à 20°C, comme dans le paragraphe précédent, mais avec un lot de QD différent.

→ **Résultats**

Les proportions des divers modes de diffusion obtenus avec ou sans CD4s sont peu différentes (fig. 63). On note toutefois une légère augmentation des récepteurs confinés de manière transitoire (43 → 49 %) au détriment surtout de ceux confinés de manière permanente (13 → 9 %). La variation de la sous-population de CD4 diffusant aléatoirement est peu importante (2 % d'écart). Une proportion peu significative de mouvements dirigés (3 %, correspondant à 4 trajectoires) a été détectée dans les deux cas. On peut noter que pour la condition sans CD4s, c'est-à-dire basale, les valeurs sont très proches de celles obtenues précédemment avec le lot de QD n°3.

La comparaison des coefficients de diffusion de CD4 moyens mesurés en présence ou non de CD4s ne révèle pas de différences significatives (tab. 6). L'écart qui existe pour la diffusion confinée permanente peut s'expliquer par le faible nombre de valeurs correspondantes. De plus, si l'on observe les coefficients de diffusion pour les périodes de diffusion confinée des trajectoires transitoires, où un plus grand nombre de valeurs a été collecté, on ne distingue pas de différence. La même remarque peut être faite vis-à-vis des rayons des domaines détectés. Toutefois, rappelons que la comparaison de moyennes pour des valeurs dispersées et ne suivant pas forcément une distribution gaussienne n'est pas suffisante.

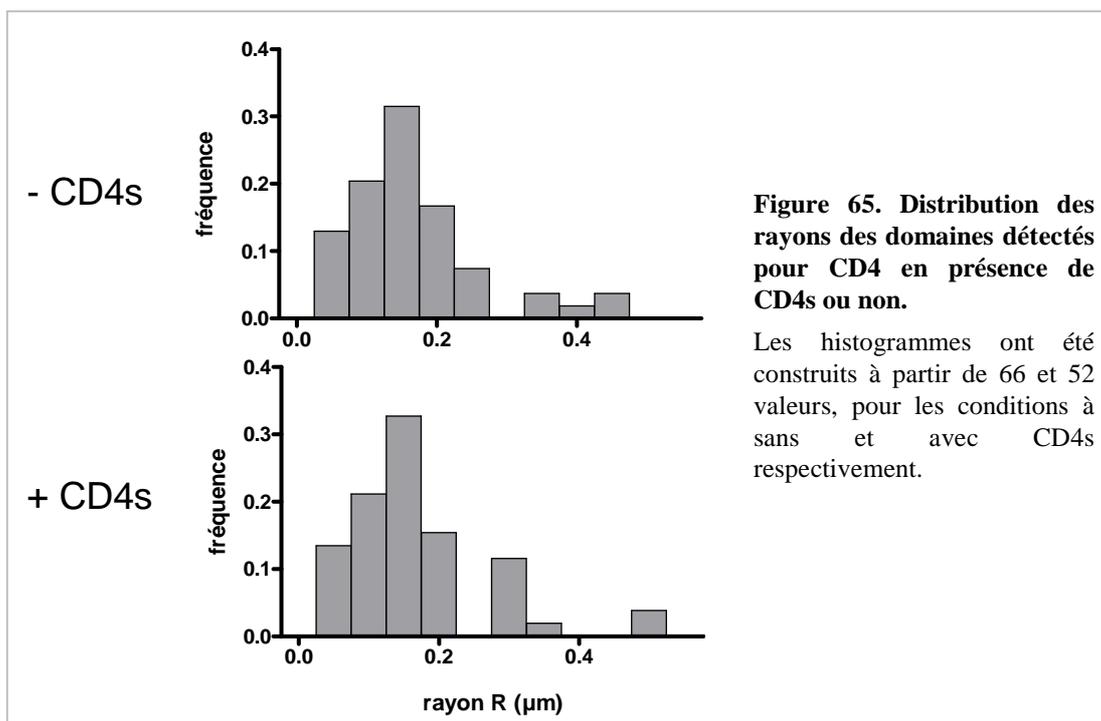


Il faut impérativement comparer la forme des histogrammes de distribution des valeurs, sous réserve d'avoir suffisamment de données. Dans le cas présent, les distributions des valeurs de D et de R sont identiques en présence ou non de CD4s, et ce pour chaque type de diffusion (fig. 64 et 65).

Tableau 6. Moyennes des coefficients de diffusion et des tailles de domaines mesurés pour CD4 ± CD4s en fonction du type de diffusion.

Les moyennes sont présentées avec les écarts-type correspondants et le nombre n de valeurs prises en compte dans leur calcul.

diffusion		aléatoire	confinée	confinée transitoire	
				aléatoire	confinée
D_{1-2} ($10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$)	- CD4s	$4,1 \pm 1,6$ (n = 46)	$1,7 \pm 1,1$ (n = 13)	$2,6 \pm 1,7$ (n = 82)	$2,4 \pm 1,7$ (n = 63)
	+ CD4s	$4,3 \pm 2,9$ (n = 31)	$2,6 \pm 1,5$ (n = 7)	$2,5 \pm 2,1$ (n = 62)	$2,6 \pm 1,9$ (n = 54)
R (nm)	- CD4s	-	123 ± 61 (n = 12)	-	175 ± 122 (n = 54)
	+ CD4s	-	149 ± 58 (n = 7)	-	169 ± 104 (n = 45)



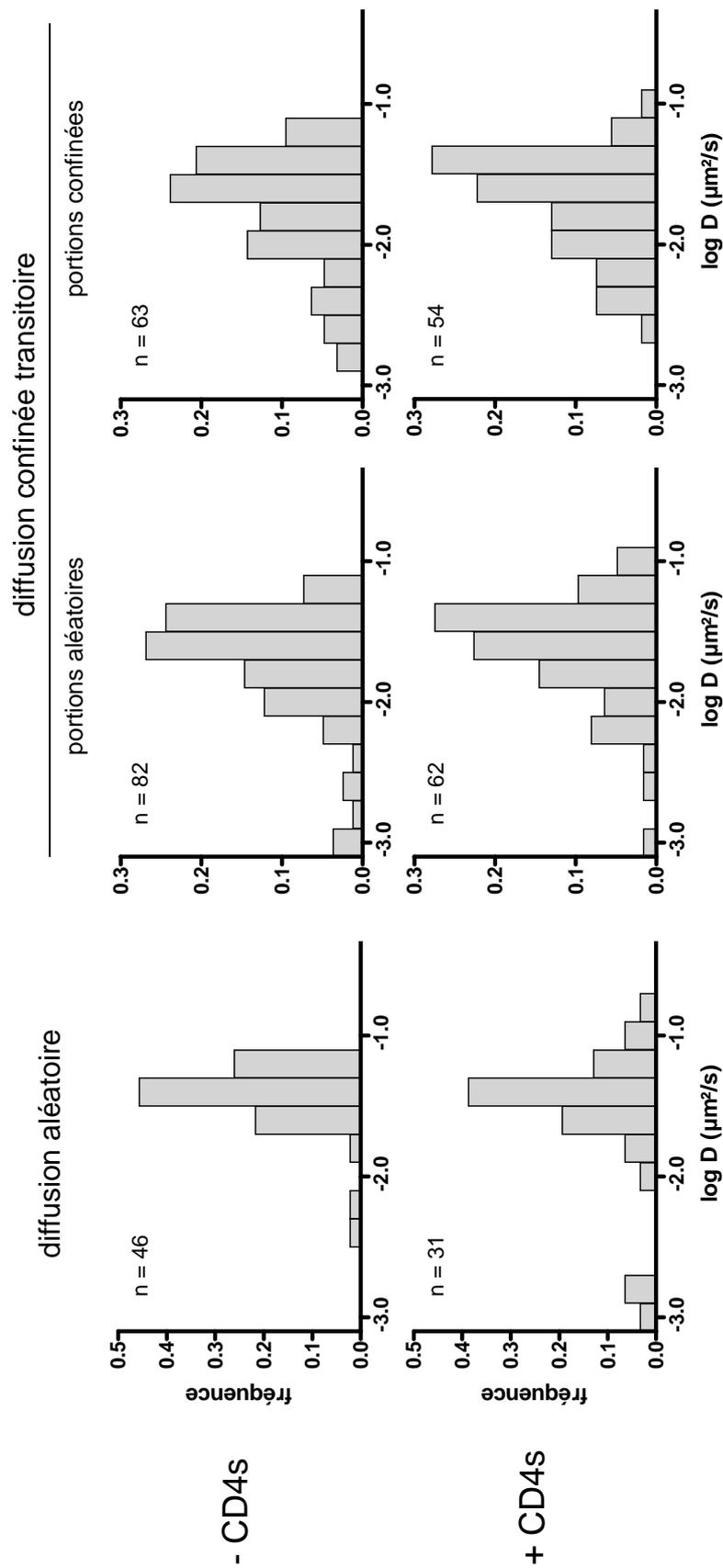


Figure 64. Distribution des coefficients de diffusion des récepteurs CD4 selon le mode de diffusion, et selon la présence de CD4s ou non.

Les histogrammes représentent les distributions des valeurs logarithmiques des coefficients de diffusion. Les valeurs n indiquées pour chaque histogramme correspondent aux nombres de D qui ont été pris en compte dans le calcul des distributions.

Nous pouvons par ailleurs émettre un commentaire par rapport aux valeurs de D et R obtenues pour le récepteur CD4 avec les deux lots de QD. En effet, les données présentées dans l'article précédent (lot de QD n°3) sont plus élevées. Par exemple, nous avons pour les trajectoires aléatoires $D_{(QD\ n^{\circ}1)} = (4,1 \pm 1,6).10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $D_{(QD\ n^{\circ}3)} = (6,2 \pm 2,7).10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$. Les plus grosses différences sont constatées pour les rayons des domaines de confinements non transitoires, bien que le faible nombre de valeurs puisse être mis en cause. Quoiqu'il en soit, ces écarts reflètent l'importance de comparer les données pour un même lot de QD.

→ ***Bilan de l'effet du CD4s***

Nous n'avons pas observé d'effet majeur du CD4s sur la diffusion du récepteur CD4. Seule une légère augmentation de la proportion de mouvements confinés transitoires a été détectée, au détriment des mouvements confinés permanents, principalement. Il faut noter que les confinements permanents le sont sur le temps d'observation qui est au maximum de 80 s. Il est tout à fait possible que pour des temps d'observation plus longs, un comportement transitoire ait été observé pour ces mêmes récepteurs. Dans ce cas, cela voudrait dire que le CD4s réduit le temps pendant lequel les récepteurs sont confinés, d'où la détection de plus d'évènements transitoires. Quoiqu'il en soit, les récepteurs ayant une diffusion aléatoire ne sont pas affectés par la présence du CD4s.

L'effet constaté sur les récepteurs confinés est faible, ce qui peut être expliqué de différentes manières. Soit l'interaction CD4-CCR5 est quasi-inexistante à la surface des cellules J.CCR5, soit elle existe mais elle est peu impliquée dans le confinement de CD4. Une autre possibilité est que la concentration de CD4s utilisée n'ait pas été suffisante pour voir des variations plus grandes. Pourtant, lors de nos précédentes études par FRET et FRAPrv, cette même concentration de CD4s (100 nM) avait permis d'observer des changements importants, mais les conditions expérimentales étaient bien différentes : expression des récepteurs CD4 et CCR5 fusionnés avec une protéine fluorescente, dans une lignée modèle HEK 293T. De plus, il ne faut pas oublier que l'anticorps OKT4 utilisé pour suivre CD4 est tout à fait capable de lier le CD4s, et ainsi diminuer la quantité de CD4s disponibles pour déstabiliser l'interaction CD4-CCR5. Lors de nos expériences de SPT, nous avons tenté de limiter ce phénomène en ajoutant dans un premier temps les complexes QD-anticorps sur les cellules, puis après élimination des complexes non liés aux récepteurs par rinçage, le CD4s a été ajouté. Nous avons aussi vérifié que, dans ces conditions, le marquage avec les complexes QD-OKT4 ne variait pas en présence de 100 nM de CD4s, indiquant que ce dernier n'entraîne pas en compétition avec les complexes liés aux récepteurs.

Pour déterminer si l'interaction CD4-CCR5 avait lieu à la surface des cellules J.CCR5, nous avons choisi un autre compétiteur de cette interaction : le maraviroc, un antagoniste allostérique de CCR5. Il était important de ne pas choisir un ligand naturel de CCR5, comme le MIP-1 β , car ces molécules induisent l'internalisation du récepteur et il n'aurait pas été possible de suivre le récepteur en SPT. Au contraire, les molécules agissant comme des antagonistes allostériques (TAK-779, maraviroc) inhibent cette internalisation induite par les ligands (Muniz-Medina *et al.*, 2009).

1.3 Diffusion de CD4 en présence de maraviroc

Nous avons choisi d'utiliser le maraviroc à 100 nM, soit plus de 100 fois sa constante de dissociation ($K_D = 0,86$ nM, Napier *et al.*, 2005). Etant donné que nous suivions le mouvement de CD4 et que le maraviroc cible spécifiquement CCR5 (fig. 66), nous avons pu incuber cette molécule en même temps que les complexes QD-anticorps sur les cellules. Les expériences ont été réalisées avec le lot de QD n°3, à température ambiante.

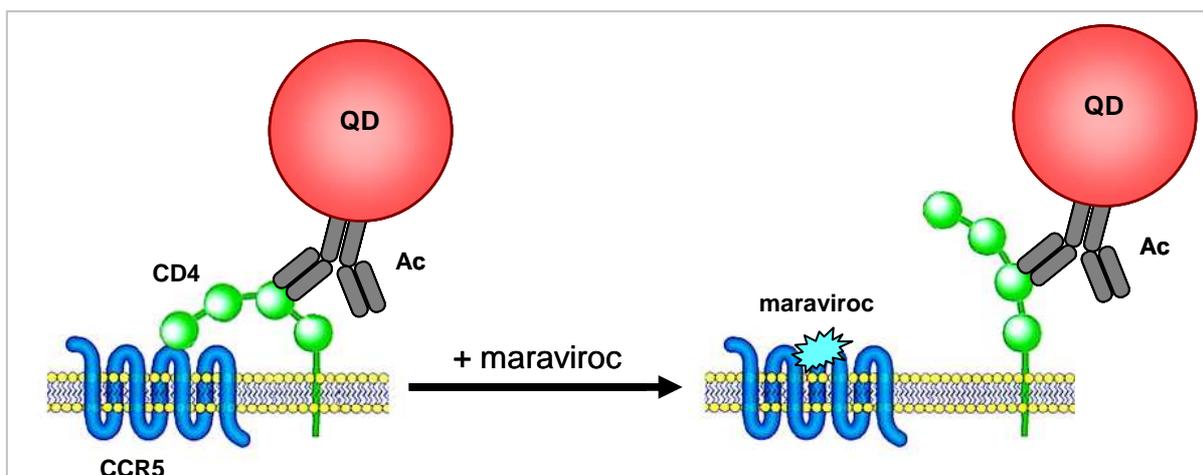


Figure 66. Schéma de la stratégie de suivi de CD4 en présence de maraviroc.

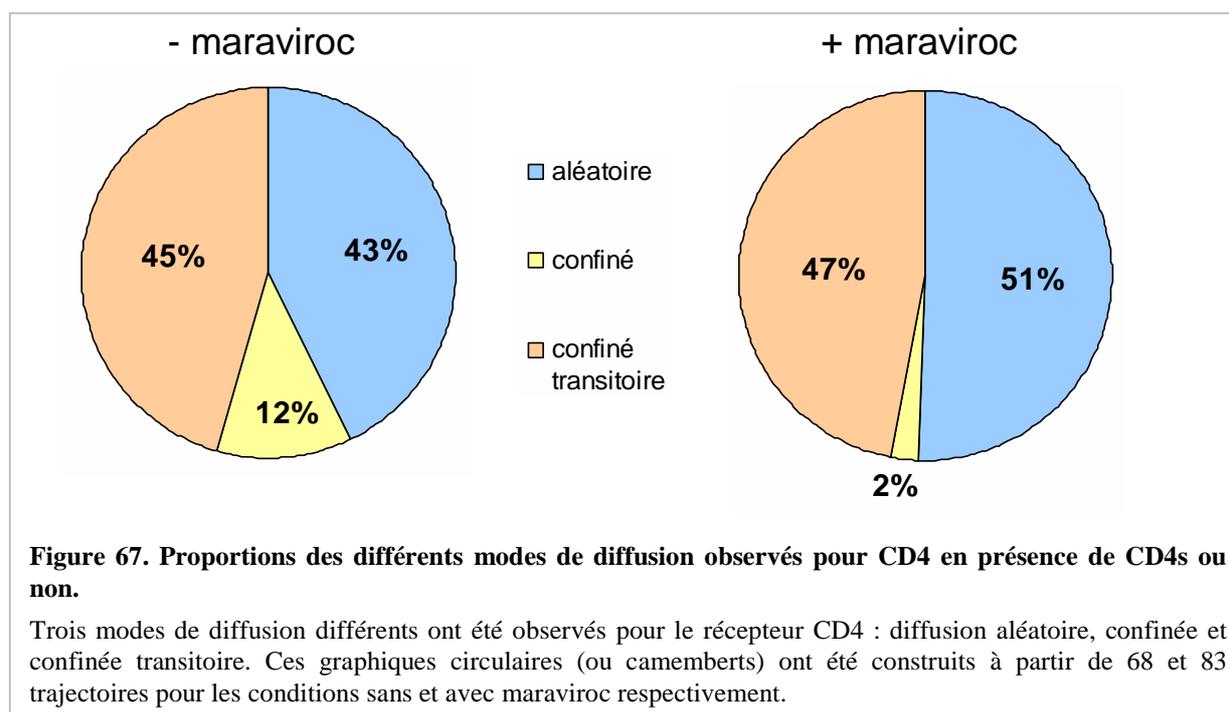
A l'état basal, les récepteurs CD4 et CCR5 peuvent former des hétérodimères (à gauche). L'ajout de maraviroc établit une compétition avec le CD4 membranaire vis-à-vis de CCR5 (à droite). Nous pouvons ainsi suivre le récepteur CD4 découplé de CCR5 avec les complexes QD-Ac. Légende : Ac, anticorps. Note : Ce schéma n'est pas dessiné à l'échelle. Adapté de : Pierson & Doms, 2003.

→ Résultats

La figure 67 montre que l'ajout de maraviroc induit la disparition quasi-complète de la sous-population de récepteurs confinés de manière permanente (12 \rightarrow 2 %). En compensation, on observe une augmentation de la proportion de récepteurs CD4 diffusant

aléatoirement (43 → 51 %). Une variation peu significative est observée pour les CD4 confinés de manière transitoire (2 % d'écart). Notons que l'effet est bien plus prononcé que précédemment lors de l'ajout de CD4s, et diminue le nombre de récepteurs confinés.

Les coefficients de diffusion pour le mode aléatoire sont légèrement plus élevés en présence de maraviroc ($6,2 \cdot 10^{-2} \rightarrow 8,8 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$; tab. 7). Cette augmentation est confirmée par le décalage léger de l'histogramme de distribution de ces coefficients vers les valeurs les plus élevées (fig. 68).



A l'inverse, les coefficients de diffusion des autres sous-populations de CD4, c'est-à-dire celles confinées au moins de manière transitoire, sont légèrement plus faibles en présence de maraviroc (tab. 7). Les histogrammes de distribution des D pour les portions aléatoires et confinées des comportements transitoires montrent un petit décalage et un étalement plus important vers les valeurs basses (fig. 68). A ce propos, il semble exister deux sous-groupes de valeurs au sein de chaque distribution, et l'effet est constaté pour chacun d'eux. La résolution de ces histogrammes (largeur des intervalles de distribution) est cependant trop faible pour pouvoir déterminer les limites de ces sous-groupes et quantifier leur variation en présence de maraviroc. Il faudrait augmenter le nombre de trajectoires pour affiner cette résolution.

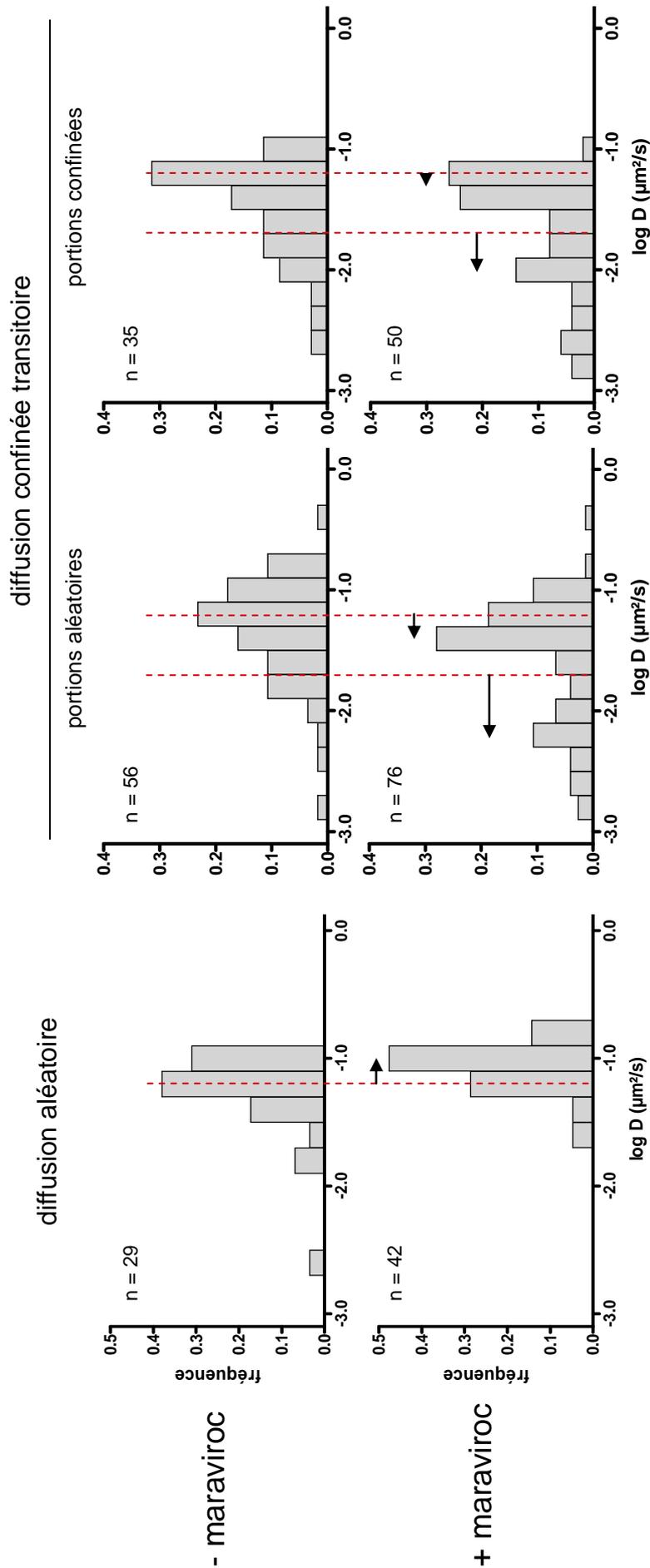


Figure 68. Distribution des coefficients de diffusion des récepteurs CD4 selon le mode de diffusion, et selon la présence de maraviroc ou non.

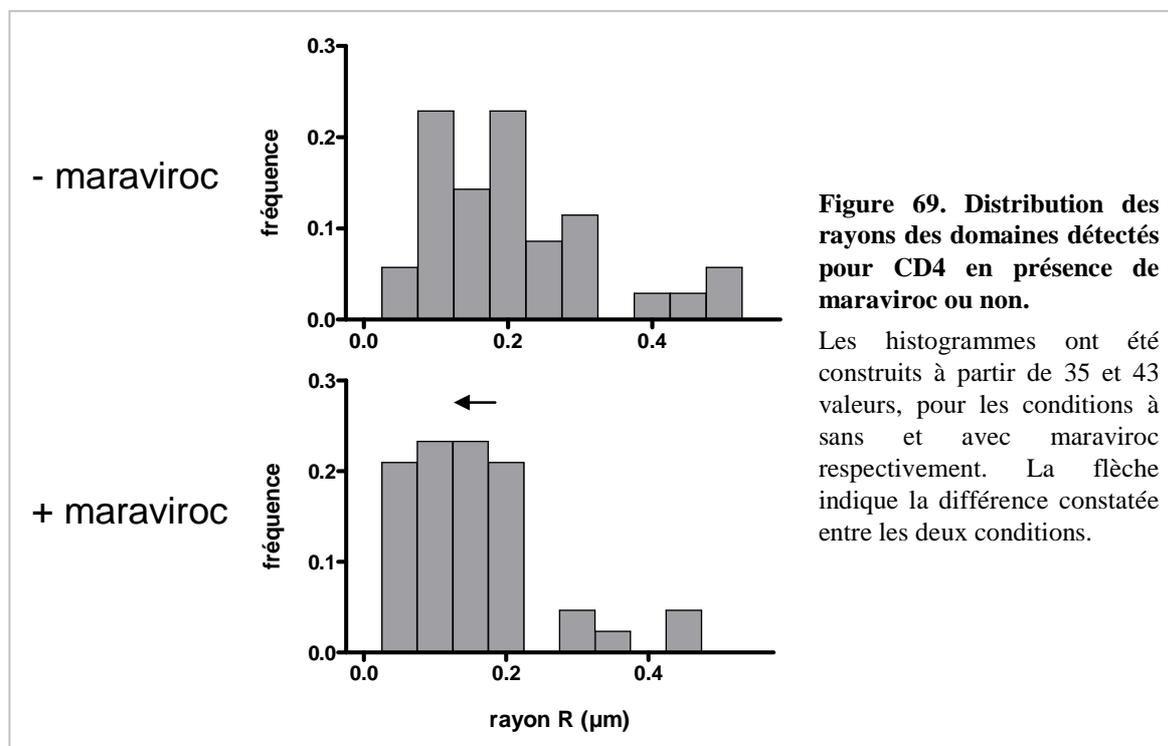
Les histogrammes représentent les distributions des valeurs logarithmiques des coefficients de diffusion. Les valeurs n indiquées pour chaque histogramme correspondent aux nombres de D qui ont été pris en compte dans le calcul des distributions. Les traits rouges en pointillés représentent des indicateurs des maximums présumés pour la condition sans maraviroc. Les flèches noires indiquent les changements provoqués par la présence de maraviroc.

Les tailles de domaines sont aussi modifiées lors de l'ajout de maraviroc (tab. 7). Les confinements permanents sont quasi inexistantes en présence du ligand, c'est pourquoi nous ne pouvons pas comparer les valeurs des tailles de domaines R pour ce type de diffusion. En revanche, nous constatons une diminution des rayons des domaines explorés transitoirement ($217 \rightarrow 155$ nm). Cette baisse semble concerner l'ensemble des domaines observés, comme l'indiquent les histogrammes de distribution des rayons (fig. 69).

Tableau 7. Moyennes des coefficients de diffusion et des tailles de domaines mesurés pour CD4 ± MVC en fonction du type de diffusion.

Les moyennes sont présentées avec les écarts-type correspondants et le nombre n de valeurs prises en compte dans leur calcul.

diffusion		aléatoire	confinée	confinée transitoire	
				aléatoire	confinée
D_{1-2} ($10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$)	- MVC	$6,2 \pm 2,7$ (n = 29)	$5,2 \pm 1,5$ (n = 8)	$6,8 \pm 7,2$ (n = 56)	$4,5 \pm 3$ (n = 35)
	+ MVC	$8,8 \pm 3$ (n = 42)	$4,7 \pm 4,4$ (n = 2)	$4,3 \pm 4,6$ (n = 76)	$3,4 \pm 2,7$ (n = 50)
R (nm)	- MVC	-	226 ± 52 (n = 6)	-	217 ± 135 (n = 35)
	+ MVC	-	119 (n = 1)	-	155 ± 99 (n = 43)



→ ***Bilan de l'effet du maraviroc et modèle d'organisation membranaire dynamique***

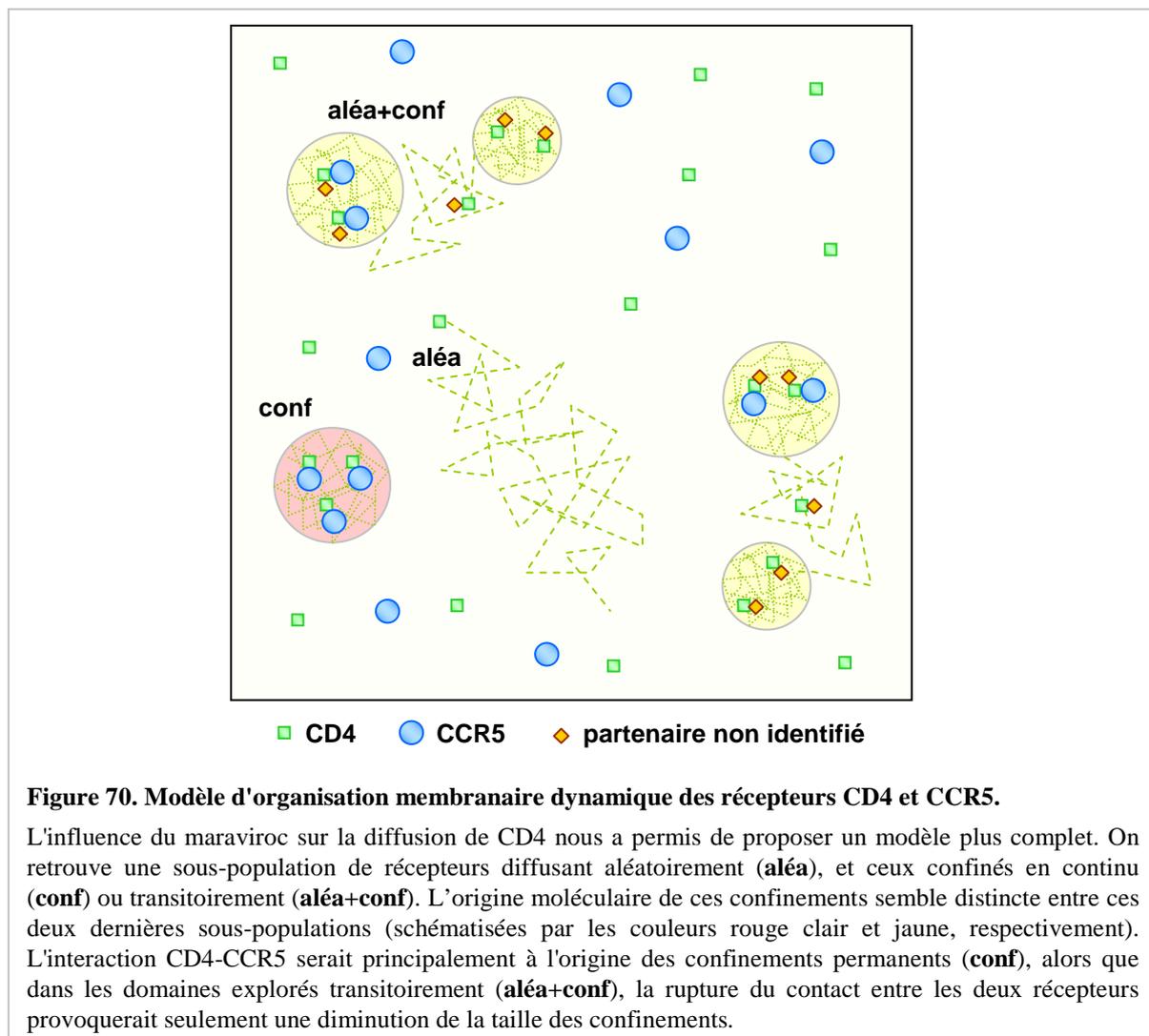
En présence de maraviroc, on n'observe quasiment plus de confinements permanents, et une augmentation conjointe des mouvements aléatoires. Sachant que dans ces conditions l'interaction CD4-CCR5 est déstabilisée, elle semble donc être responsable du confinement de CD4 de manière permanente. De plus, les coefficients de diffusion D pour le mode aléatoire sont légèrement plus élevés que celle mesurée à l'état basal. Il faudrait pouvoir confirmer cet effet, par exemple en collectant un plus grand nombre de trajectoires, ou bien en observant l'effet du maraviroc à 37°C, car nous avons vu que l'augmentation de température induisait une distribution plus étalée des valeurs de coefficient de diffusion.

Un autre effet inattendu du maraviroc a été remarqué : il s'agit d'une diminution des coefficients de diffusion et des tailles de domaines pour les récepteurs confinés de manière transitoire. Comme le maraviroc dissocie les récepteurs CD4 et CCR5, nous nous attendions à une plus grande liberté des CD4, et ainsi une diffusion plus rapide. Or, pour cette sous-population de récepteurs, l'effet est inverse. Nous pouvons imaginer dans ce cas que l'inhibition de l'interaction CD4-CCR5 autorise le récepteur CD4 à interagir avec un autre partenaire (protéique ou lipidique), entraînant une légère diminution des coefficients de diffusion, pour les diffusions aléatoire et confinée, ainsi qu'une réduction de la taille des domaines explorés. Si l'on reprend le premier modèle proposé, cette sous-population est justement supposée avoir un environnement membranaire différent des récepteurs diffusant aléatoirement sans confinement. Nous avons émis l'hypothèse de l'implication d'un partenaire de CD4 dans cette différence (représenté par les losanges orange).

Quoi qu'il en soit, le confinement transitoire de cette proportion de récepteurs CD4 semble indépendant de l'interaction avec CCR5, au contraire de la sous-population de CD4 confinés de manière permanente. En d'autres termes, l'origine de confinement de ces deux catégories de récepteurs serait différente. On peut donc compléter le premier modèle d'organisation dynamique de CD4, en particulier en proposant que les CD4 confinés de manière permanente (« conf », fig. 70) soient majoritairement dépendant de l'interaction CD4-CCR5 (fond de couleur rouge clair). A l'inverse, le confinement transitoire de CD4 implique faiblement sa liaison avec CCR5 (« aléa+conf ») et aurait une autre origine non identifiée (fond de couleur jaune). Cependant, la déstabilisation de la liaison CD4-CCR5 induit une réduction de la taille des domaines explorés par CD4.

Notons que l'ajout de CD4s n'a pas permis d'observer les mêmes effets que le maraviroc. Il est fort probable qu'il y ait une grande différence d'affinité pour CCR5 entre les deux molécules, en faveur du maraviroc. Ainsi, il est possible que le CD4s n'ait pas été

capable de dissocier complètement les CCR5 des CD4 au niveau des confinements permanents (« conf », fig. 70), provoquant un comportement transitoire pour cette sous-population de CD4, c'est-à-dire le seul effet du CD4s constaté.



Pour pouvoir compléter le modèle d'organisation membranaire dynamique des récepteurs CD4 et CCR5, il nous fallait en priorité avoir des informations directes sur le comportement du récepteur CCR5.

2. Etude du récepteur CCR5

Les expériences de suivi du récepteur CCR5 ont été réalisées à la surface des cellules J.CCR5 avec l'anticorps T21/8 et le lot de QD n°3, à température ambiante. Le comportement

du récepteur a été étudié dans un premier temps à l'état basal, puis en présence de maraviroc, comme précédemment, pour analyser sa diffusion une fois dissocié de CD4.

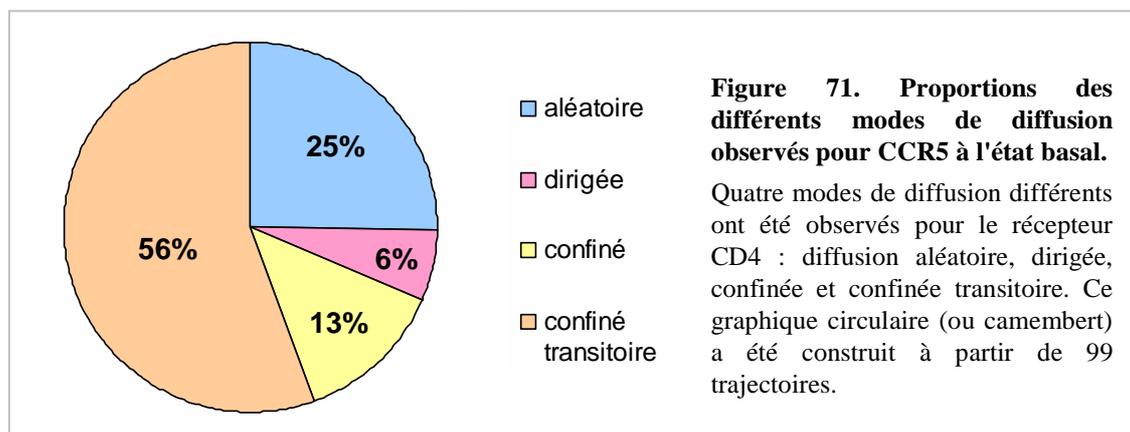
2.1. Diffusion à l'état basal

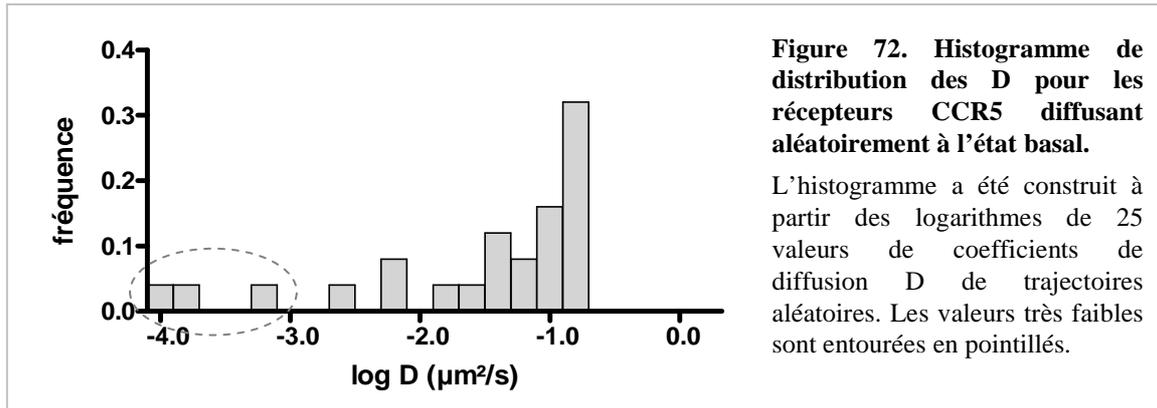
L'affinité de l'anticorps T21/8 étant modérée, nous avons été contraints de l'incuber avec les QD avec un rapport de concentration 1:1, au lieu de 1:10 pour l'anticorps anti-CD4 OKT4. Ainsi, dans les expériences suivantes, les QD avaient peut-être plusieurs anticorps anti-CCR5 à leur surface, pouvant établir de multiples liaisons avec les récepteurs et vraisemblablement conduire à des coefficients de diffusion faibles.

→ Résultats

Le suivi et l'analyse du mouvement de CCR5 a révélé que de nombreux récepteurs étaient confinés (fig. 71). Ceux détectés de manière transitoire représentent la majorité des comportements observés (56 %), et l'on retrouve 13 % des récepteurs confinés de manière « permanente », c'est-à-dire sur de longues périodes. Un quart des récepteurs diffuse aléatoirement et une petite proportion de mouvements dirigés a été détectée (6 %).

Les coefficients de diffusion obtenus pour ces différentes sous-populations de CCR5 sont équivalents à ceux de CD4 : $D_{\text{aléatoire}} \approx 7,8 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_{\text{dirigée}} \approx 1 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $D_{\text{confinée}} \approx 2,1 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$, puis pour les confinements transitoires $D_{\text{aléatoire}} \approx 4,7 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $D_{\text{confinée}} \approx 3,9 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$. On note cependant un étalement plus important des valeurs de D dû à quelques valeurs faibles. Par exemple, pour la diffusion aléatoire (non transitoire), trois valeurs sont comprises entre 10^{-4} et $10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (fig. 72). Il est envisageable que ces valeurs correspondent à des QD liés à plusieurs récepteurs. Quoi qu'il en soit, elles sont peu représentées.





Les domaines de confinements permanents sont en moyenne plus petits ($R \approx 128$ nm) que ceux transitoires ($R \approx 175$ nm). La comparaison des distributions de ces valeurs suggère que quelques domaines explorés transitoirement, dont la taille dépasse les 250 nm de rayon, expliquent la différence de moyenne observée (fig. 73).

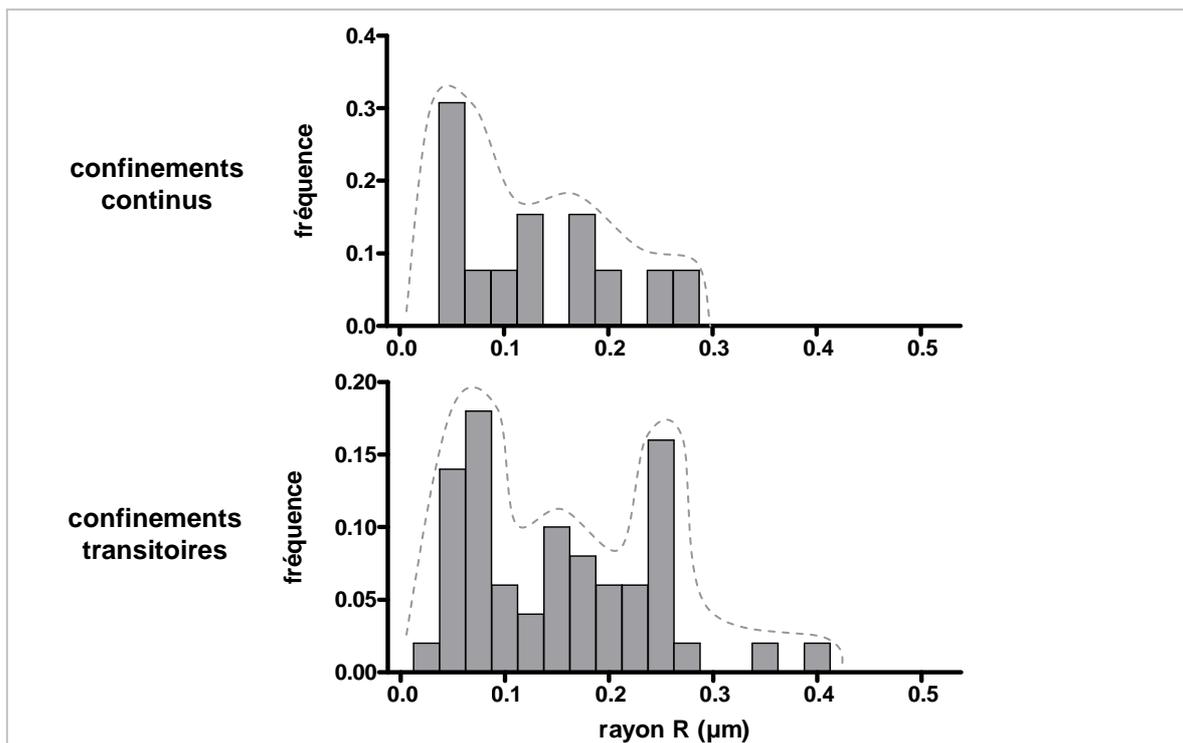


Figure 73. Distributions des rayons des confinements continus et transitoires détectés pour CCR5.

Les histogrammes ont été construits à partir de 13 et 50 valeurs, pour les confinements continus et transitoires respectivement. La différence constatée entre les deux histogrammes se situe au niveau des plus grandes valeurs de R mesurées. Les traits en pointillés aident à visualiser cette variation.

→ **Bilan du comportement de CCR5 à l'état basal**

Comme pour CD4, nous avons révélé l'existence de confinements pour le récepteur CCR5 à la surface de la lignée lymphocytaire humaine J.CCR5. Par contre, nos données montrent pour CCR5 qu'une plus grande proportion de récepteurs est confinée, au moins de manière transitoire (~70 %, contre 50 % pour CD4). Les domaines membranaires explorés ont un rayon moyen d'environ 150 nm, inférieur à celui déterminé pour CD4 ($R \approx 200$ nm). Ces tailles de domaines sont toutefois du même ordre de grandeur que les plus petits domaines déterminés par FRAPrv sur cellules HEK 293T ($R \sim 340$ nm) où CD4 et CCR5 interagissent. Notons en particulier qu'en SPT, les plus grands domaines ($250 \text{ nm} < R < 400 \text{ nm}$) ont été observés de manière transitoire, suggérant que le récepteur CCR5 est moins stablement confiné dans les plus grands domaines.

De manière à compléter le modèle d'organisation membranaire dynamique de CD4 et CCR5, il nous fallait comparer ces données de diffusion de CCR5 à l'état basal avec le suivi du récepteur en présence de maraviroc.

2.2. Diffusion de CCR5 en présence de maraviroc

Le maraviroc se lie à CCR5 au niveau à la deuxième boucle extracellulaire, au contraire du T21/8 qui reconnaît la partie N-terminale du récepteur. Il ne devait donc pas se produire de compétition entre le maraviroc et l'anticorps (fig. 74). Nous avons toutefois vérifié cette

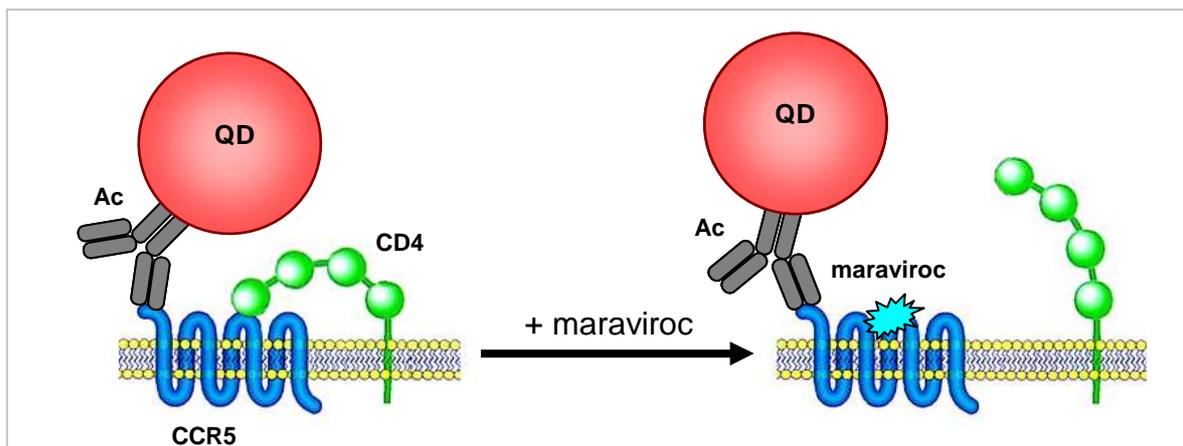


Figure 74. Schéma de la stratégie de suivi de CCR5 en présence de maraviroc.

A l'état basal, les récepteurs CD4 et CCR5 peuvent former des hétérodimères (à gauche). L'ajout de maraviroc établit une compétition avec le CD4 membranaire vis-à-vis de CCR5 (à droite). Nous pouvons suivre le récepteur CCR5 découplé de CD4 avec les complexes QD-Ac s'accrochant à la partie N-terminale du récepteur. Légende : Ac, anticorps. Note : Ce schéma n'est pas dessiné à l'échelle. Adapté de : Pierson & Doms, 2003.

théorie (voir chapitre précédent), et de manière surprenante, nous avons au contraire observé une augmentation de la liaison de l'anticorps en présence d'un excès (100 nM) de maraviroc. Ce point est pris en compte dans notre analyse des résultats.

→ **Résultats**

L'ajout de maraviroc modifie très peu les proportions des différents modes de diffusion observés pour CCR5 (fig. 75). Les variations les plus grandes sont une augmentation peu importante des récepteurs confinés en continu (13 → 17 %) au détriment de la diffusion aléatoire (25 → 22 %), elle aussi continue sur le temps d'observation.

Les coefficients de diffusion et les rayons des domaines détectés restent globalement inchangés en présence de maraviroc, au point que pour la diffusion confinée de manière transitoire, les mêmes valeurs moyennes et les mêmes écarts-type ont été relevés (tab. 8). On note toutefois une légère augmentation des coefficients pour la diffusion confinée continue (~ 2,1 → ~ 3,5 $\mu\text{m}^2/\text{s}$), mais cet écart est peu significatifs compte tenu du faible nombre de valeurs prises en compte. La comparaison des distributions des valeurs de D montre seulement une dispersion légèrement plus importante en présence de maraviroc pour la diffusion confinée transitoire (fig. 76). Aucune différence n'est constatée au niveau de la distribution des rayons des domaines (fig. 77).

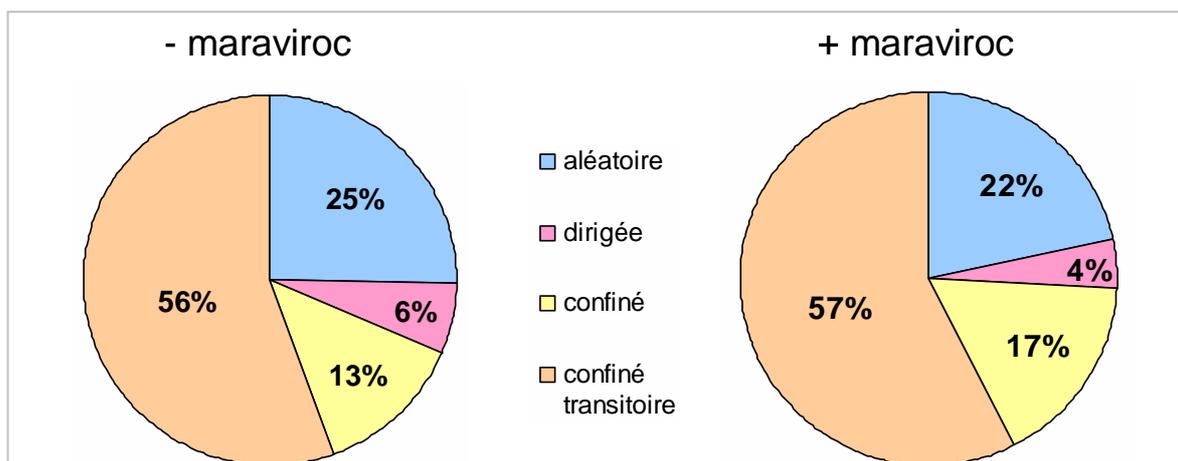


Figure 75. Proportions des différents modes de diffusion observés pour CCR5 en présence de maraviroc ou non.

Quatre modes de diffusion différents ont été observés pour le récepteur CD4 : diffusion aléatoire, dirigée, confinée et confinée transitoire. Ces graphiques circulaires (ou camemberts) ont été construits à partir de 99 et 120 trajectoires pour les conditions sans et avec maraviroc respectivement.

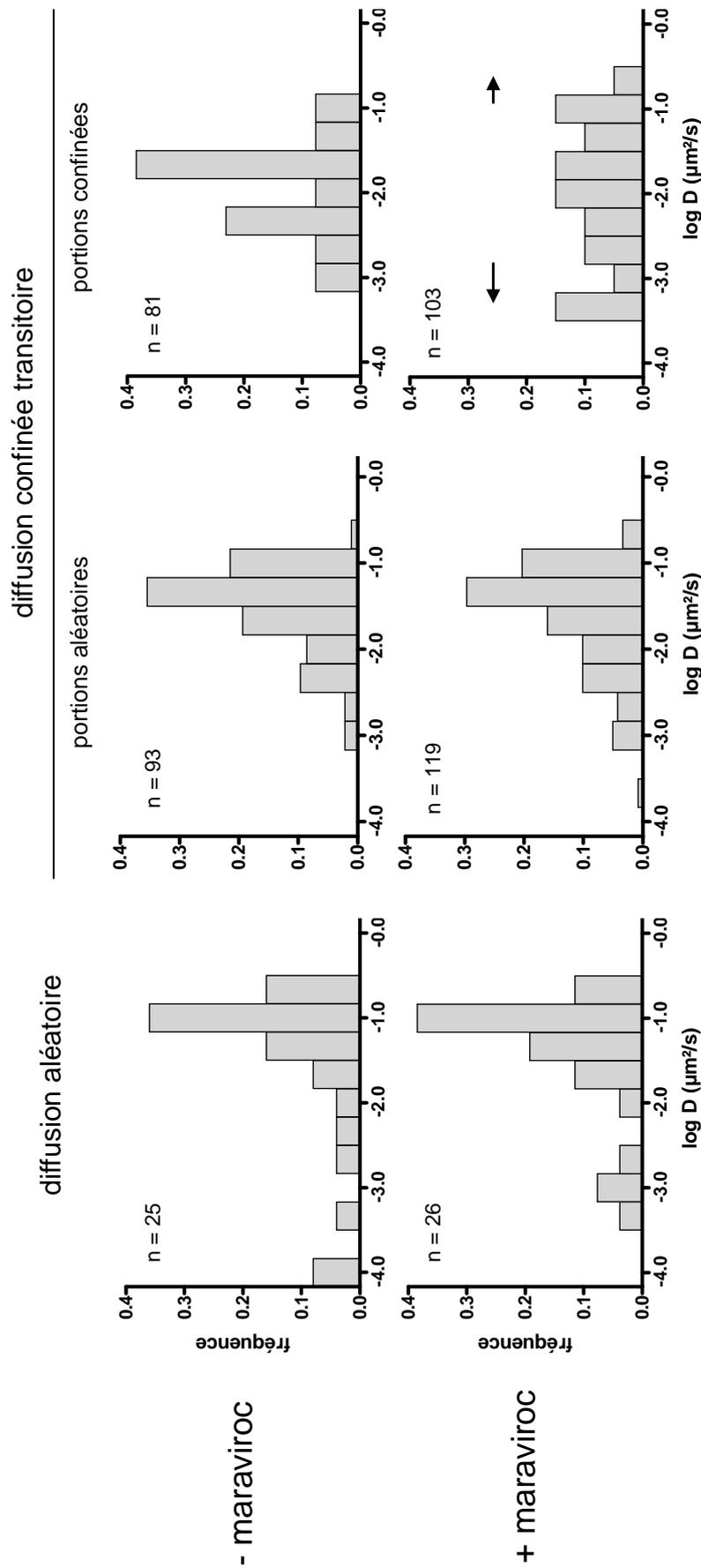


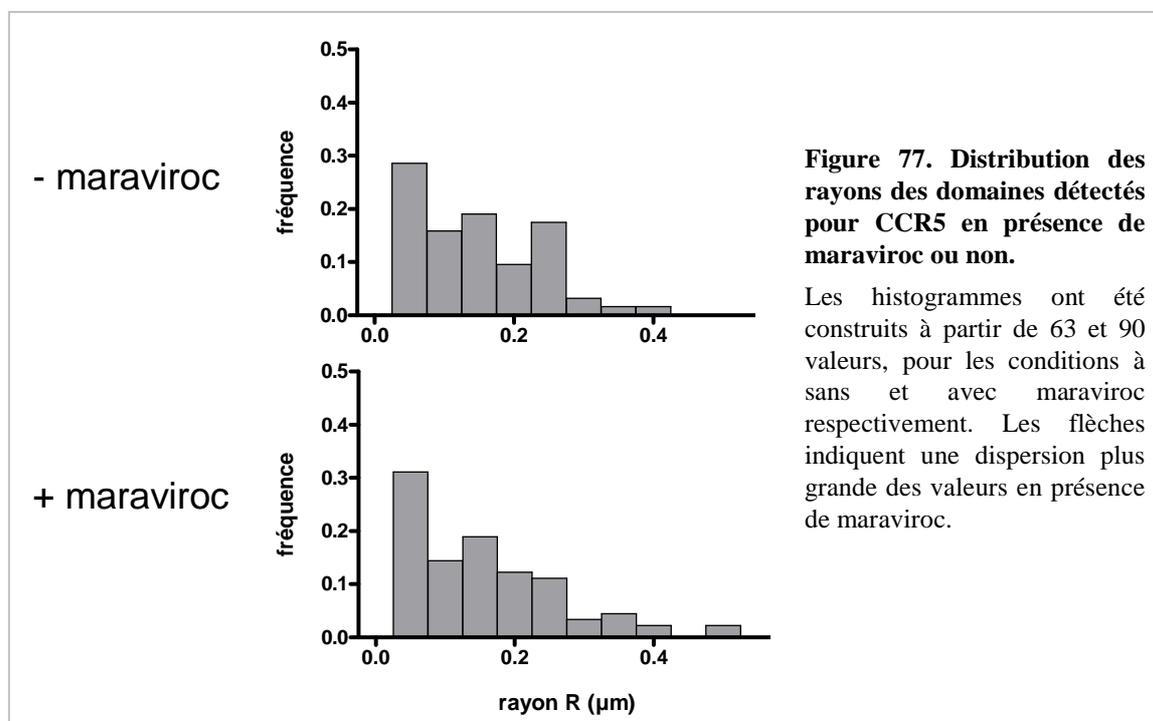
Figure 76. Distribution des coefficients de diffusion des récepteurs CCR5 selon le mode de diffusion, et selon la présence de maraviroc ou non.

Les histogrammes représentent les distributions des valeurs logarithmiques des coefficients de diffusion. Les valeurs n indiquées pour chaque histogramme correspondent aux nombres de D qui ont été pris en compte dans le calcul des distributions.

Tableau 8. Moyennes des coefficients de diffusion et des tailles de domaines mesurés pour CCR5 ± MVC en fonction du type de diffusion.

Les moyennes sont présentées avec les écarts-type correspondants et le nombre n de valeurs prises en compte dans leur calcul.

diffusion		aléatoire	confinée	confinée transitoire	
				aléatoire	confinée
D_{1-2} ($10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$)	- MVC	$7,8 \pm 6,2$ (n = 25)	$2,1 \pm 2,3$ (n = 13)	$4,7 \pm 3,9$ (n = 93)	$3,9 \pm 3,7$ (n = 81)
	+ MVC	$7,7 \pm 6$ (n = 26)	$3,5 \pm 5,5$ (n = 20)	$4,6 \pm 4,7$ (n = 119)	$3,9 \pm 3,7$ (n = 103)
R (nm)	- MVC	-	128 ± 77 (n = 13)	-	175 ± 139 (n = 50)
	+ MVC	-	134 ± 107 (n = 20)	-	164 ± 107 (n = 70)



→ **Bilan de l'effet du maraviroc et modèle d'organisation membranaire dynamique**

Le maraviroc a eu un effet moins prononcé sur la diffusion du récepteur CCR5 que sur CD4. De manière inattendue, une légère augmentation de la proportion de confinements permanents est observée, au détriment de la diffusion aléatoire. Ce résultat est difficilement interprétable puisque cela signifierait que la diffusion de certains CCR5 n'est plus aléatoire mais confinée si l'on désengage le récepteur d'une interaction avec CD4. Or, nous avons montré que le maraviroc n'a aucun effet sur la diffusion aléatoire de CD4. Cela nous amène à émettre l'hypothèse qu'il existe un biais dans les expériences réalisées pour CCR5 en

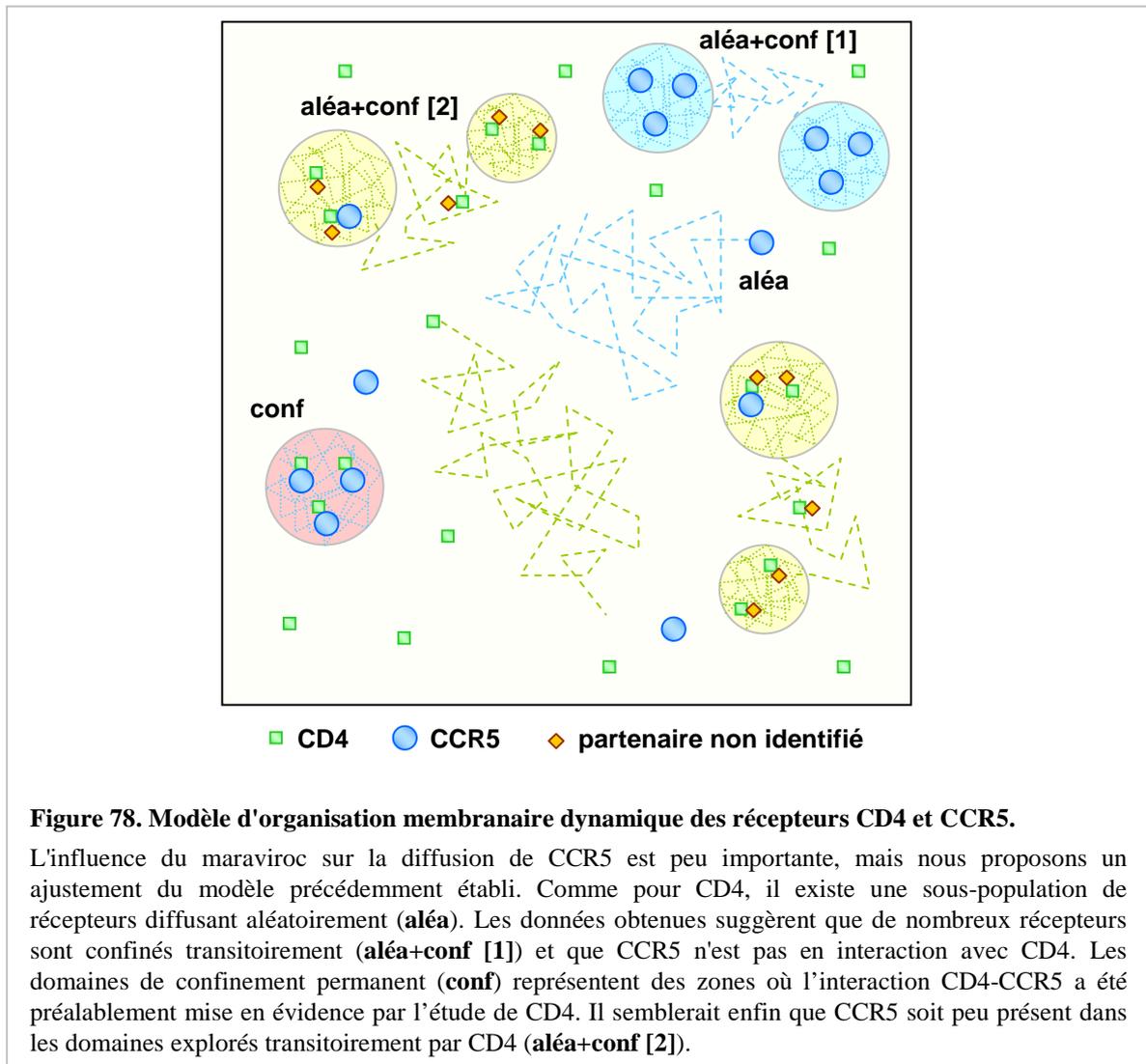
présence de maraviroc. Nous savons que le récepteur CCR5 peut adopter différentes conformations, et une étude récente a montré que le maraviroc stabilise préférentiellement l'une d'elles (Garcia-Perez *et al.*, 2011). De plus, nous avons vu que l'ajout de maraviroc augmente la capacité de liaison de l'anticorps T21/8 sur CCR5 (fig. 51 – chapitre III), bien que cette expérience doive être refaite pour confirmer cet effet, si possible avec une gamme de concentration en maraviroc ayant des intervalles moins grands. Nous pouvons alors supposer que, lors de nos expériences de SPT, l'anticorps T21/8 s'est préférentiellement lié à une sous-population de récepteurs CCR5 dont la conformation était stabilisée par le maraviroc, mais dont le confinement n'est pas dépendant de l'interaction CD4-CCR5. Cela pourrait expliquer la différence d'effet du maraviroc constatée par rapport aux résultats du suivi de CD4.

Cependant, nous ne possédons pas assez d'informations pour valider cette hypothèse. L'étude précédemment citée (Garcia-Perez *et al.*, 2011) propose par ailleurs que le TAK-779 stabilise une conformation de CCR5 différente de celle stabilisée par le maraviroc. En conséquence, il serait intéressant d'analyser la diffusion de CCR5 en présence de TAK-779, puis en présence de maraviroc et de TAK-779, pour pouvoir évaluer la contribution de chacune des deux molécules dans les modifications de diffusion observées.

Enfin, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que le confinement permanent de CCR5 ait une origine autre que l'interaction CD4-CCR5. Nous pourrions alors supposer que certains récepteurs CD4 sont confinés de manière permanente dans ces mêmes domaines parce qu'ils interagissent avec les récepteurs CCR5. Ainsi, l'ajout de maraviroc supprimerait le confinement permanent de CD4, sans affecter celui de CCR5. Il est donc important de savoir quels mécanismes moléculaires interviennent dans le confinement permanent de CCR5.

Le modèle d'organisation membranaire dynamique des récepteurs CD4 et CCR5, ajusté avec les données de CCR5 (fig. 78), constitue donc une ébauche pour les travaux à venir. Nos données suggèrent que peu de récepteurs CCR5 diffusent aléatoirement (« aléa »), et que les confinements observés de manière transitoire ne sont pas dépendant de l'interaction CD4-CCR5 (« aléa+conf [1] »). Les données précédentes indiquaient que les confinements permanents sont régis par l'interaction CD4-CCR5 (« conf »), et qu'il existe quelques récepteurs CCR5 en interaction avec les CD4 confinés de manière transitoire (« aléa+conf [2] »). Comme précédemment, les différentes couleurs à l'intérieur des domaines indiquent des origines de confinement distinctes.

En résumé, notre modèle propose à ce jour qu'il existe des domaines où les récepteurs CD4 et CCR5 interagissent sur de longues périodes (confinements observés de manière



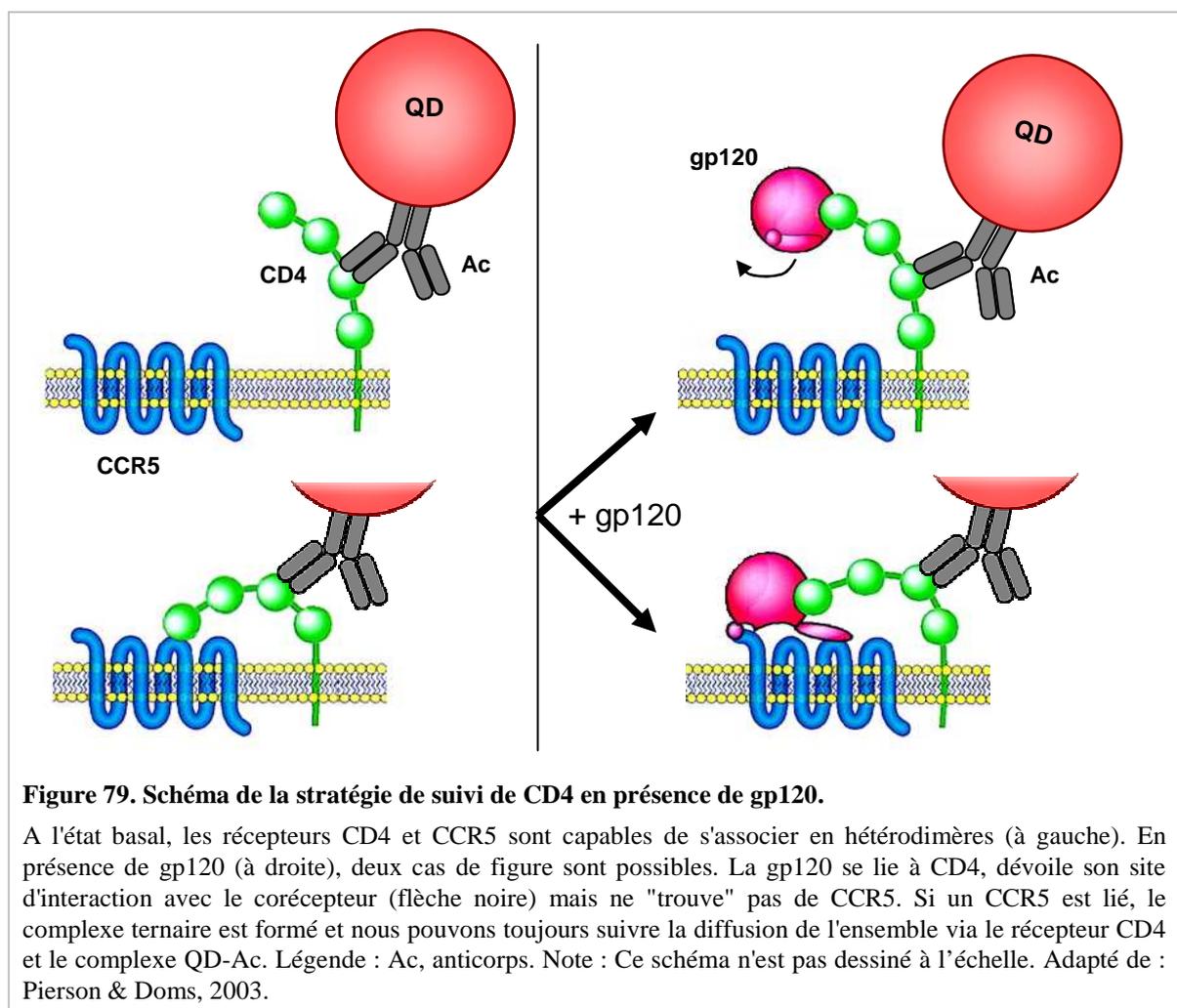
continue). Si l'existence de ces plateformes membranaires réunissant les deux récepteurs en interaction est confirmée, nous pourrions nous demander si elles constituent des voies d'entrée privilégiées pour le VIH à la surface de lymphocytes activés.

Dans ce souci de mieux comprendre les premières étapes du processus d'entrée du virus dans les cellules cibles, nous avons souhaité évaluer l'effet de la liaison de la protéine d'enveloppe virale gp120 sur la diffusion du récepteur CD4 (le suivi du récepteur CCR5 lié à la gp120 n'est pas possible avec un anticorps, voir chapitre précédent).

3. Diffusion de CD4 en présence de la protéine d'enveloppe virale gp120

3.1. Etude à température ambiante

Nous avons réalisé le suivi du récepteur CD4 en présence d'un excès de gp120, soit 100 nM, à température ambiante, avec le lot de QD n°1. L'anticorps utilisé (OKT4) ne perturbe pas les liaisons CD4-gp120 et CD4-gp120-CCR5, comme il est indiqué sur la figure 79.



→ Résultats

L'ajout de gp120 a pour effet d'augmenter la proportion de trajectoires aléatoires (41 → 48 %), et de diminuer celles confinées en continu (13 → 8 %, fig. 80). La variation de la part de confinements transitoires est négligeable (43 → 41 %). La différence observée pour l'ensemble des récepteurs confinés, sous l'influence de la gp120, correspond donc à un

pourcentage de $(43 + 13 - 49) / (43 + 13) = 12,5 \%$. Quelques mouvements dirigés ont été détectés, mais leur faible proportion (3%) est restée inchangée avec la gp120.

Une légère baisse des coefficients de diffusion pour la sous-population de CD4 aléatoires a été constatée (tab. 9). Si l'on compare les histogrammes de distribution des D (fig. 81), on remarque des valeurs plus dispersées, en particulier vers des valeurs plus faibles ($\sim 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$). Les récepteurs confinés de manière transitoire ont aussi une diffusion un peu ralentie, à la fois pour les périodes confinées et aléatoires, avec un décalage des histogrammes de distribution des D vers les valeurs basses. Seuls les confinements continus voient leur coefficient de diffusion augmenter en présence de gp120, mais le faible nombre de données ne nous permet pas de savoir si cela touche l'ensemble des D ou seulement une petite partie.

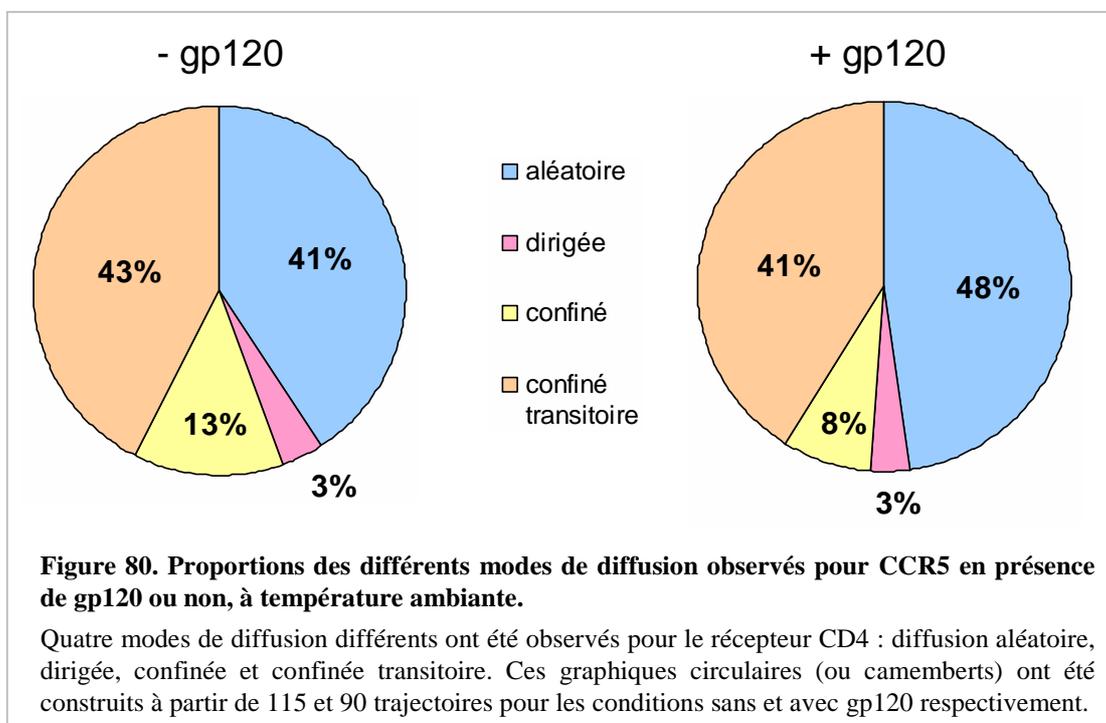


Tableau 9. Moyennes des coefficients de diffusion et des tailles de domaines mesurés pour CD4 \pm gp120 à 20°C, en fonction du type de diffusion.

Les moyennes sont présentées avec les écarts-type correspondants et le nombre n de valeurs prises en compte dans leur calcul.

diffusion		aléatoire	confinée	confinée transitoire	
				aléatoire	confinée
$D_{1,2}$ ($10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$)	- gp120	$4,1 \pm 1,6$ (n = 46)	$1,7 \pm 1,1$ (n = 13)	$2,6 \pm 1,7$ (n = 82)	$2,4 \pm 1,7$ (n = 63)
	+ gp120	$3,5 \pm 2,2$ (n = 43)	$2,5 \pm 2,1$ (n = 7)	$2 \pm 1,4$ (n = 73)	$1,9 \pm 1,2$ (n = 51)
R (nm)	- gp120	-	123 ± 61 (n = 12)	-	175 ± 122 (n = 54)
	+ gp120	-	139 ± 51 (n = 7)	-	155 ± 83 (n = 37)

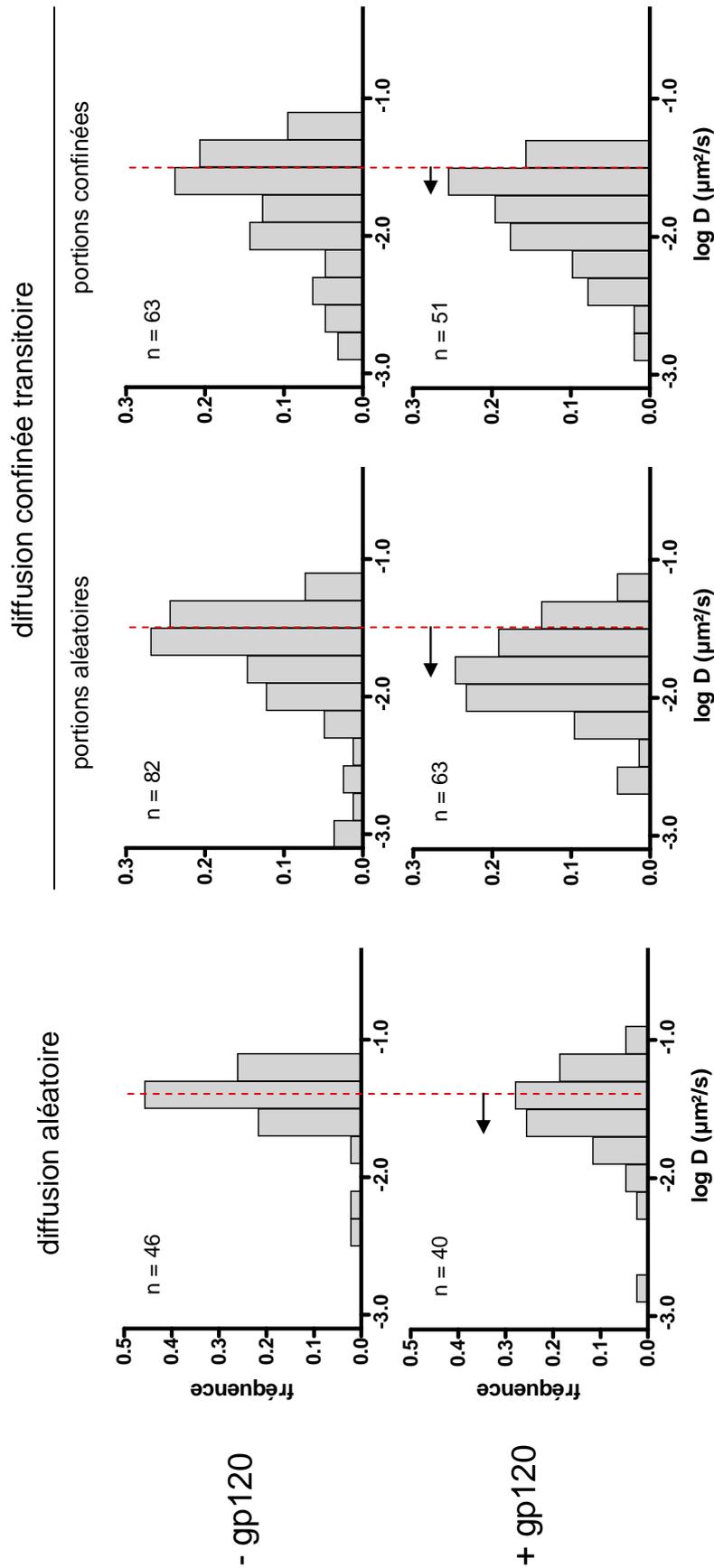
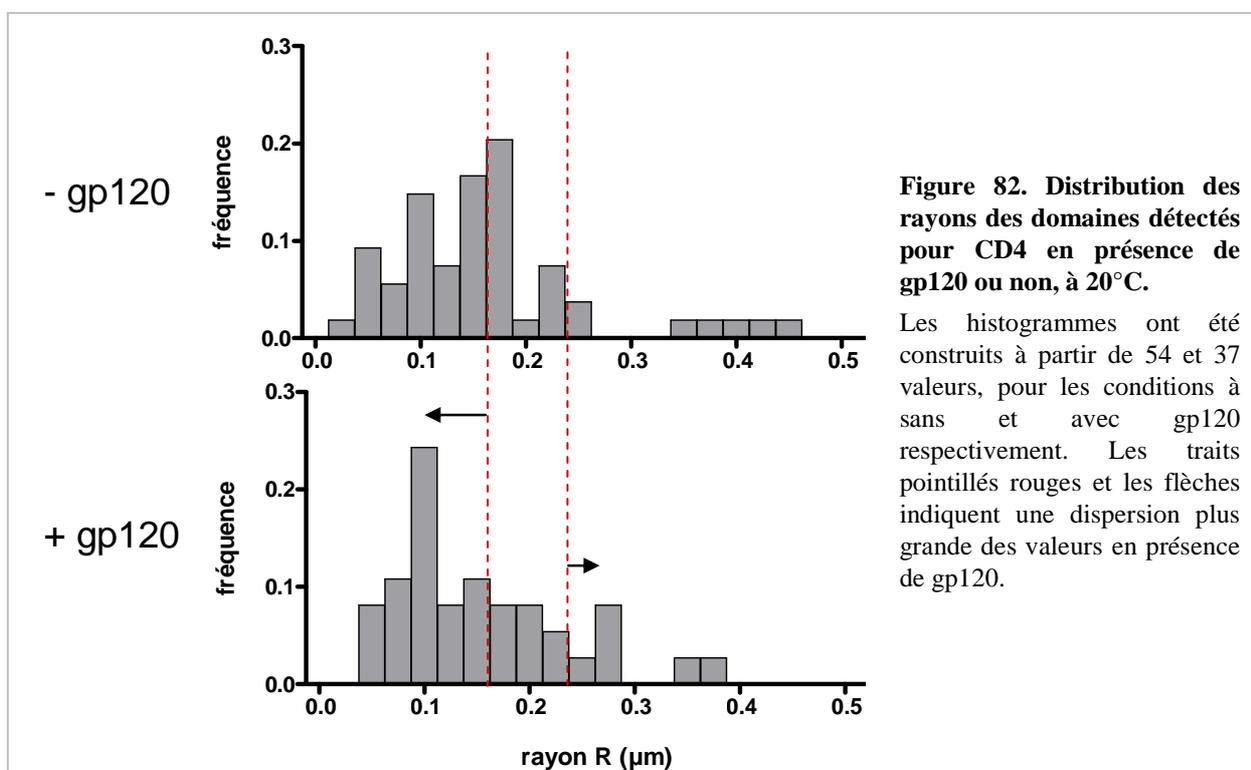


Figure 81. Distribution des coefficients de diffusion des récepteurs CD4 selon le mode de diffusion, et selon la présence de gp120 ou non.

Les histogrammes représentent les distributions des valeurs logarithmiques des coefficients de diffusion. Les valeurs n indiquées pour chaque histogramme correspondent aux nombres de D qui ont été pris en compte dans le calcul des distributions. Les traits rouges en pointillés représentent des indicateurs des maximums présumés pour la condition sans gp120. Les flèches noires indiquent les changements provoqués par la présence de la gp120.

Les rayons des domaines explorés transitoirement par CD4 sont légèrement inférieurs après ajout de gp120, mais les distributions des valeurs R indiquent que certains domaines ont leur taille diminuée, alors que d'autres, moins nombreux, ont une taille qui augmente (fig. 82). Il est en revanche difficile de se prononcer pour les confinements continus, toujours en raison du faible nombre de valeurs correspondantes, mais il semble que la présence de gp120 ne modifie pas la taille de ces domaines. Par ailleurs, il faut noter que plus un récepteur parcourt un domaine sur un temps long, ce qui correspond aux trajectoires confinées en continu, plus nous avons de chances de détecter de grands domaines. Or ici les domaines sont plus petits pour les confinements continus que pour ceux transitoires ($R \sim 130 \text{ nm} / \sim 175 \text{ nm}$ ou 155 nm).



→ *Bilan de l'effet de la gp120 à 20°C*

Nous constatons deux effets opposés de la liaison de la gp120 au récepteur CD4. Premièrement, une proportion des récepteurs confinés (12,5 %) adoptent une diffusion aléatoire sous l'influence de la gp120, suggérant qu'elle déstabilise le confinement de certains récepteurs. Une partie des récepteurs qui restent confinés en présence de gp120 explorent des domaines de taille plus grande, ce qui pourrait concorder avec une déstabilisation partielle du confinement de CD4. Deuxièmement, l'ajout de protéine d'enveloppe virale induit aussi une

diminution de la taille de certains domaines, ce qui laisse supposer cette fois que certains récepteurs CD4 confinés sont encore plus contraints dans leur diffusion. Ce phénomène était tout à fait attendu puisqu'il a déjà été observé par FRAP_{Prv} à la surface des cellules HEK 293T exprimant CD4 et CCR5, après ajout de la gp120. Il était d'ailleurs proposé que la diminution de taille des domaines était la conséquence de la formation de complexes CD4-gp120-CCR5. La même hypothèse peut donc être formulée dans notre cas. Etant donné que ce sont les confinements transitoires qui sont uniquement concernés, il semble que la gp120 forme préférentiellement des complexes hétérotrimériques avec CD4 et CCR5 dans ces domaines.

Le premier effet constaté de la gp120, à savoir la rupture du confinement d'une sous-population de CD4, ne peut être assimilé à la formation de tels complexes. Cela amène à supposer qu'il s'agit de dimères CD4-gp120 qui ne sont pas liés au corécepteur.

En parallèle, une légère baisse des valeurs de coefficients de diffusion pour les trajectoires aléatoires et confinées transitoires a été constatée en présence de gp120. Il est possible que cet effet de la protéine d'enveloppe virale soit la conséquence d'une gêne stérique côté extracellulaire. Une autre hypothèse serait que la conformation de CD4 est modifiée lorsqu'il est lié à une molécule de gp120, induisant une réduction de son coefficient de diffusion (ex : modification de la nature des interactions lipidiques locales ?).

D'après le modèle d'organisation membranaire dynamique de CD4 et CCR5 précédemment établi (fig. 78), il semblerait que les complexes CD4-gp120 et CD4-gp120-CCR5 se forment avec la sous-population de récepteurs confinés transitoirement (« aléa+conf [2] »). Les hétérodimères adopteraient un mode de diffusion aléatoire, alors que les hétérotrimères conserveraient une diffusion confinée dans de plus petits domaines, bien que le caractère transitoire de ces confinements suggère une instabilité de ces complexes. Notons que mesures de SPT pour le récepteur CCR5 nous ont peut-être conduits à une sous-estimation de la quantité de ce récepteur dans ces domaines, ou bien à une mauvaise identification des domaines désignés « aléa+conf [1] » et « aléa+conf [2] », qui pourraient être en réalité les mêmes domaines. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que la gp120 n'interagit pas avec les récepteurs CD4 et CCR5 qui sont confinés sur de longues périodes (« conf »). Or l'interaction CD4-CCR5 a été majoritairement observée dans ces domaines. Il semblerait donc que la gp120 ne tire pas profit de cette forme de colocalisation des deux récepteurs.

Nous avons vu précédemment pour le récepteur CD4 qu'une augmentation de la température pouvait apporter des informations sur les caractéristiques diffusionnelles des différentes sous-populations de récepteurs. Ainsi, nous avons donc répété l'expérience de SPT

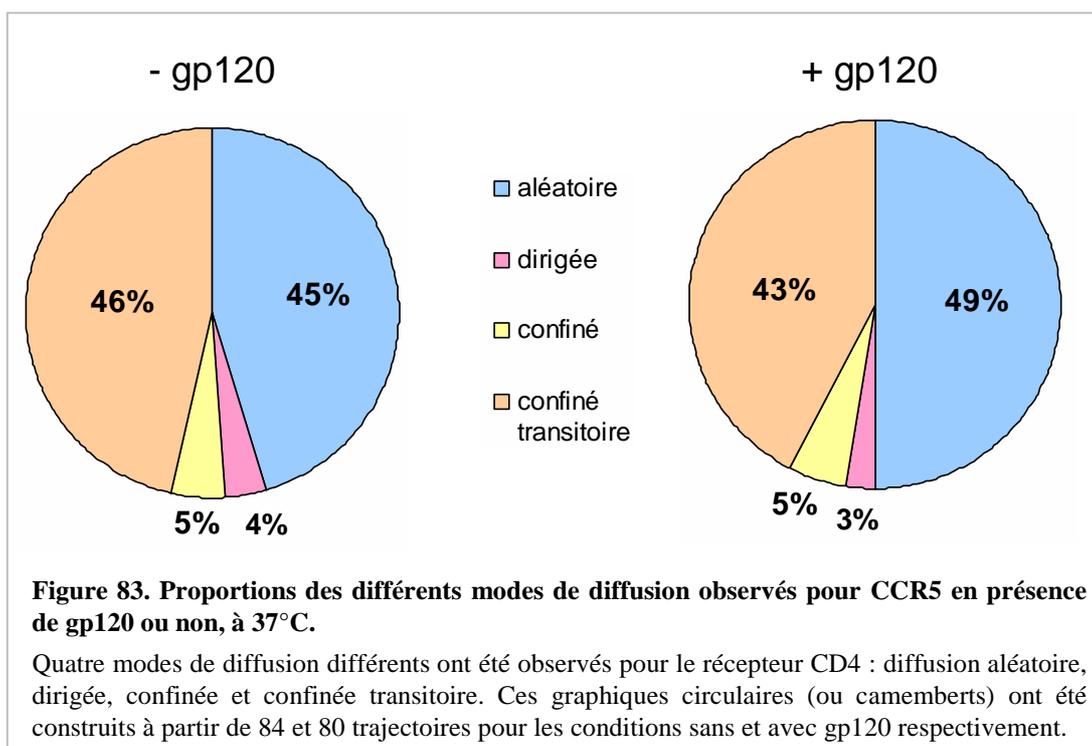
en présence de gp120 à 37°C. Nous espérons ainsi mieux déterminer quelle sous-population de CD4 était préférentiellement ciblée par la gp120, en vue de former des complexes CD4-gp120-CCR5.

3.2. Etude à 37°C

La même concentration de gp120 a été utilisée que précédemment (100 nM), mais les expériences ont été conduites avec les QD du lot n°3. Nous allons donc comparer les résultats de l'ajout de protéine d'enveloppe virale à 37°C avec les données de CD4 obtenus à l'état basal, à la même température et avec le même lot de QD.

→ Résultats

La figure 83 nous montre que la présence de gp120 augmente la proportion de trajectoires aléatoires (45 → 49 %), au détriment de trajectoires confinées transitoirement (46 → 43 %). Le pourcentage des récepteurs confinés dont la diffusion devient aléatoire sous l'influence de la gp120 est donc $(46 - 43) / 46 \approx 6,5 \%$. Les confinements continus et les mouvements dirigés sont faiblement représentés dans les deux cas ($\leq 5 \%$). Globalement, la gp120 induit peu de changements sur la diffusion de CD4.



Le même constat est réalisé au niveau des coefficients de diffusion (tab. 10). Les valeurs pour la diffusion aléatoire sont inchangées, et une légère baisse des autres coefficients est observée, bien que la variation pour les confinements continus soit évaluée sur trop peu de valeurs pour être significative (4 trajectoires). Les histogrammes de distribution des D pour les confinements transitoires semblent montrer systématiquement deux groupes de valeurs, sauf pour les portions de trajectoires confinées en présence de gp120, où la distribution semble plus complexe (fig. 84). Néanmoins, une diminution du coefficient de diffusion pour les périodes confinées est observée quand la gp120 est ajoutée.

Les rayons des domaines explorés par CD4 sont très légèrement plus élevés lorsque la gp120 est présente (tab. 10). La distribution des R est plus étendue comme le montre la figure 85, ce qui prouve que certains confinements sont plus petits en présence de gp120, et d'autres plus grands, ce que la comparaison des valeurs moyennes ne nous montrait pas.

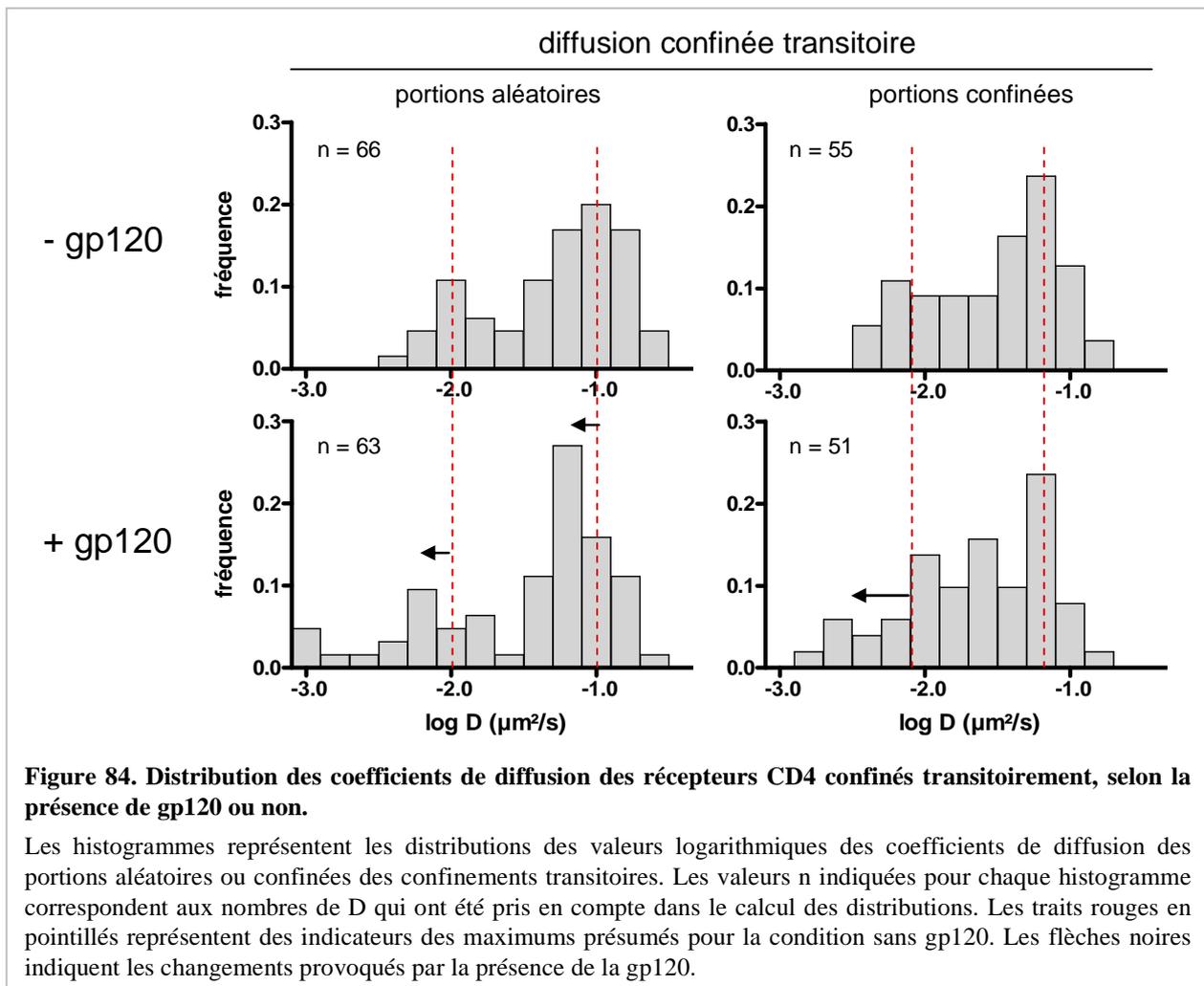


Tableau 10. Moyennes des coefficients de diffusion et des tailles de domaines mesurés pour CD4 ± gp120 à 37°C, en fonction du type de diffusion.

Les moyennes sont présentées avec les écarts-type correspondants et le nombre n de valeurs prises en compte dans leur calcul.

diffusion		aléatoire	confinée	confinée transitoire	
				aléatoire	confinée
D_{1-2} ($10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$)	- gp120	$11 \pm 6,3$ (n = 38)	$6,5 \pm 7,5$ (n = 4)	$7,4 \pm 6$ (n = 66)	$4,6 \pm 3,9$ (n = 55)
	+ gp120	$11,3 \pm 5,1$ (n = 40)	$4,4 \pm 4,2$ (n = 4)	$6,2 \pm 5,3$ (n = 63)	$3,6 \pm 3,2$ (n = 51)
R (nm)	- gp120	-	180 ± 86 (n = 4)	-	178 ± 116 (n = 31)
	+ gp120	-	199 ± 113 (n = 3)	-	190 ± 151 (n = 31)

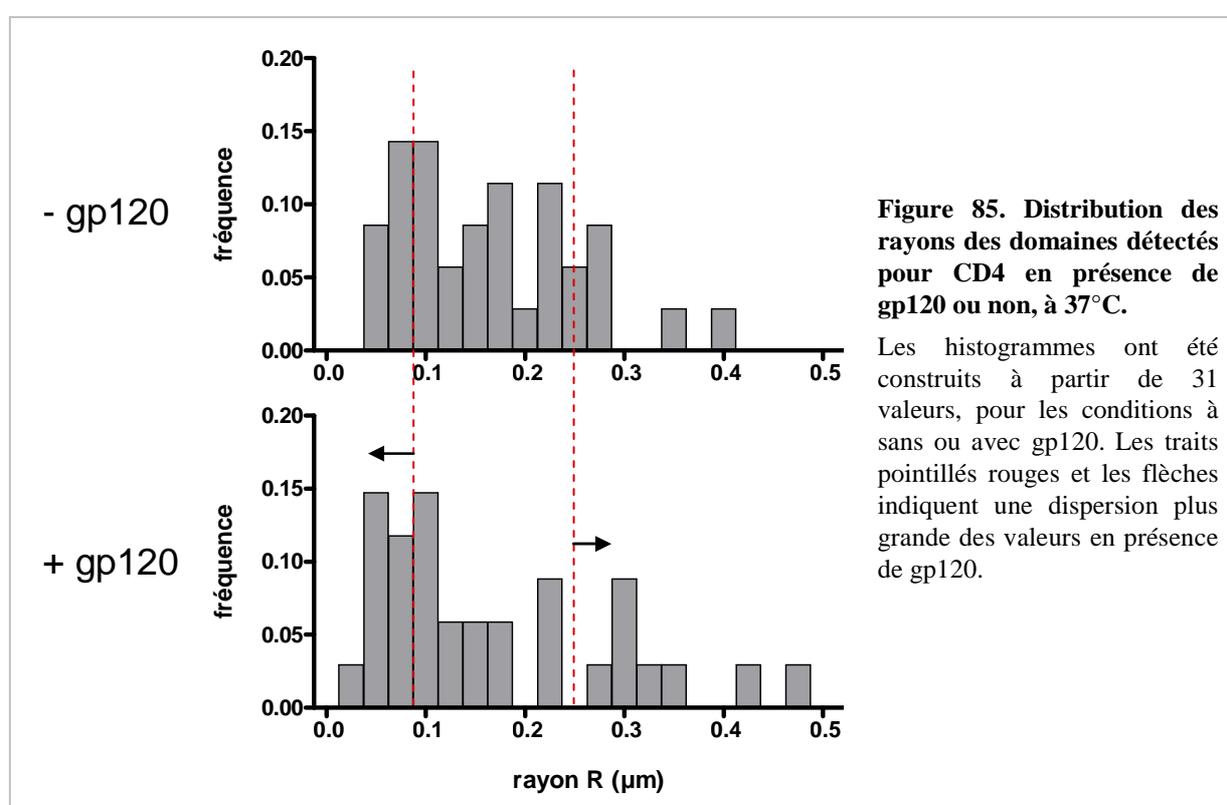


Figure 85. Distribution des rayons des domaines détectés pour CD4 en présence de gp120 ou non, à 37°C.

Les histogrammes ont été construits à partir de 31 valeurs, pour les conditions à sans ou avec gp120. Les traits pointillés rouges et les flèches indiquent une dispersion plus grande des valeurs en présence de gp120.

→ *Bilan de l'effet de la gp120 à 37°C*

De manière générale, les mêmes effets opposés ont été observés à 37°C que précédemment à température ambiante. Certains récepteurs confinés adoptent une diffusion aléatoire, et d'autres récepteurs voient la taille de leur confinement augmenter, suggérant que la gp120 induit un désengagement de CD4 avec un ou plusieurs partenaires. A l'inverse, plusieurs récepteurs confinés semblent davantage contraints puisque la taille de leur confinement diminue. Dans l'ensemble, l'amplitude de ces variations est faible, mais le fait que nous confirmions ces observations à 20°C et à 37°C suggère qu'elles sont bien corrélées à la présence de la protéine d'enveloppe virale.

Toutefois, la gp120 induit la suppression du confinement de seulement 6,5 % des récepteurs CD4 initialement confinés, soit deux fois moins que la proportion affectée à 20°C. Le confinement du récepteur est donc moins perturbé par la gp120 à 37°C. Nous pouvons par exemple supposer que si la gp120 découple le CD4 d'un partenaire responsable de son confinement, alors l'interaction de CD4 avec ce partenaire semble plus stable à 37°C.

Vis-à-vis du modèle d'organisation membranaire dynamique de CD4 et CCR5, nous pouvons formuler les mêmes hypothèses que celles données juste auparavant d'après les expériences de SPT à 20°C, en présence de gp120. Il faut cependant rester conscient que le modèle est certainement inachevé, en particulier concernant CCR5 et son interaction avec le récepteur CD4. En effet, nous pensons que le maraviroc n'a pas permis de révéler le comportement de tous les récepteurs CCR5. Or, si nous voulons savoir quelle sous-population de récepteurs est majoritairement ciblée par la gp120, il est primordial de bien connaître la proportion des deux récepteurs CD4 et CCR5 en interaction et l'implication sur leur confinement. Il est de plus important d'avoir une indication sur la durée et de la taille de ces confinements. Cette recherche fait partie des perspectives de ce travail, qui sont discutées plus amplement dans le chapitre suivant.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce projet de thèse a fait appel à la technique de SPT pour pouvoir analyser finement le mouvement des récepteurs CD4 et CCR5 à la surface de lymphocytes vivants. La précision de cette approche de microscopie optique est dépendante du choix des divers outils employés : particule et stratégie d'accrochage à la molécule d'intérêt, méthodes de détection de la particule, de calcul de la position et d'analyse de la diffusion. C'est la raison pour laquelle nous avons voulu contribuer à améliorer les connaissances relatives à ces aspects « techniques », parallèlement à notre exploration de l'organisation membranaire dynamique des récepteurs du VIH.

Influence du choix des outils pour le SPT sur la mesure de coefficient de diffusion

Une partie de notre travail s'est attachée à apporter des éléments de réponse aux questions suivantes. Quelle est l'influence de la particule sur la mesure de coefficient de diffusion ? Quelles sont les différences de précision des méthodes de calcul du coefficient de diffusion les plus couramment utilisées ?

Dans un premier temps, l'analyse de marches aléatoires générées par simulation numérique a révélé que le calcul de la fonction de distribution cumulée des écarts quadratiques est la meilleure méthode pour déterminer le coefficient de diffusion. Par ailleurs, nos travaux ont démontré qu'une autre méthode permet d'atteindre une précision équivalente. Il s'agit du calcul du coefficient de diffusion à partir de la pente formée par les deux premiers points de la courbe $MSD = f(\delta t)$, c'est-à-dire la courbe du déplacement quadratique moyen calculé en fonction d'intervalles de temps δt croissants.

Toutefois, les comportements diffusionnels à la surface de cellules vivantes sont souvent plus complexes qu'un simple mouvement brownien. La membrane plasmique a en effet une composition membranaire très variée, où de multiples interactions moléculaires ont lieu. C'est pourquoi il sera utile de vérifier dans quelle mesure la précision des deux méthodes reste vraie dans le cas de modes de diffusion plus complexe que celui aléatoire (ex : diffusion dirigée, confinée).

Dans un second temps, la diffusion d'une sonde lipidique au sein d'une membrane modèle, une bicouche lipidique supportée, a été analysée par SPT pour différentes particules recouvertes de streptavidines, couplées à des anticorps biotinylés dirigés contre la sonde. Le coefficient de diffusion a été déterminé pour différentes conditions faisant varier la nature (QD, or, latex), la taille et/ou le taux de couverture en anticorps des particules, et a été comparé à la valeur obtenue par FRAP, prise comme référence. Les particules qui ont conduit

aux valeurs de coefficient de diffusion les plus faibles par rapport à la référence sont les colloïdes d'or de taille moyenne (40 nm de diamètre), et les billes de latex de grande taille (200 nm de diamètre). Ces observations vont à l'encontre de l'idée que l'emploi de particules de cette taille ne ralentit pas la diffusion de la molécule d'intérêt (Triller & Choquet, 2008).

Cette étude révèle principalement que les QD constituent les meilleurs candidats pour des expériences de SPT. Cette information devrait susciter l'intérêt des équipes de recherche qui utilise la technique de SPT, puisque les QD sont depuis quelques années les particules les plus utilisées pour ce type d'expériences. Dans notre cas, cela nous a indiqué que l'emploi des QD était tout à fait judicieux pour nos mesures de diffusion en SPT à la surface de lymphocytes vivants. Par ailleurs, les billes de latex de 40 nm de diamètre se sont avérées être une alternative intéressante, sachant qu'elles ont l'avantage d'émettre un signal fluorescent qui ne clignote pas, ce qui facilite la reconstitution des trajectoires. Groc *et al.* ont montré sur cellules vivantes que les QD ne modifiait pas le coefficient de diffusion de la molécule d'intérêt. La réalisation d'expériences similaires avec les particules de latex de 40 nm de diamètre seraient donc très intéressantes pour savoir si le comportement observé sur membrane modèle est reproduit sur cellules.

Deux autres constatations ont été faites au cours de notre étude sur membrane modèle, concernant la quantité d'anticorps à la surface des particules. Premièrement, si ces anticorps sont trop nombreux sur une particule ayant une faible courbure, donc un grand diamètre, une diminution du coefficient de diffusion est observée, pouvant s'expliquer par la multiplicité de liaison avec les molécules ciblées. Deuxièmement, et de manière surprenante, un faible nombre d'anticorps par particule conduit aussi à une réduction du coefficient de diffusion mesuré. Nous avons alors formulé l'hypothèse suivante : l'orientation des anticorps à la surface des particules peut influencer la mobilité de la molécule ciblée. Autrement dit, si le site de reconnaissance des anticorps n'est pas dirigé vers l'extérieur par rapport à la surface de la particule, la distance membrane-particule est diminuée, entraînant une augmentation de la friction entre la bicouche lipidique et la surface de la particule, et donc une diminution de la diffusion de l'ensemble. Dans notre cas, comme les biotines sont liées covalamment aux anticorps à des positions aléatoires, il n'y a pas de contrôle de l'orientation des anticorps une fois liés aux particules. Si peu d'anticorps sont présents à la surface des particules, la probabilité d'avoir un anticorps avec une orientation optimale est réduite. Cela nous amène à suggérer qu'il ne faut pas forcément chercher à avoir le moins d'anticorps possible par particule, comme il est couramment préconisé (Alcor *et al.*, 2009). Nous pouvons ainsi proposer un complément à la définition de la particule « idéale » qui est donnée pour des

expériences de SPT : « une particule ayant un seul site d'interaction avec la molécule cible, dont l'orientation est contrôlée et optimale (vers l'extérieur) ».

De manière étonnante, certaines bactéries ont réussi à « adopter » une stratégie de contrôle de l'orientation des anticorps, en exprimant à leur surface une protéine (A ou G selon les bactéries) qui se lie spécifiquement à la partie Fc des immunoglobulines (Taatjes *et al.*, 1987). Ainsi, lorsque des anticorps du système immunitaire détectent ces bactéries, ils se fixent à leur surface dans la mauvaise orientation (sites antigéniques vers l'extérieur) et ne peuvent pas jouer leur rôle dans l'immunité humorale ou cellulaire. Il serait intéressant d'utiliser des particules recouvertes avec l'une de ces protéines, et analyser l'influence du taux de couverture en anticorps sur le coefficient de diffusion mesuré.

Notons que notre étude systématique n'inclut pas les particules dernièrement développées. Par exemple, une équipe a mis au point des QD couplés à une seule streptavidine ayant un seul site de liaison, donc des particules monovalentes, ayant une taille réduite (environ 12 nm de diamètre, Howarth *et al.*, 2008).

Enfin, il est possible de s'affranchir de l'utilisation des particules, et donc de leur possible influence sur la diffusion de la molécule d'intérêt, en les remplaçant par de petites molécules fluorescentes (suivi de molécule unique, SMT). A l'heure actuelle, la photostabilité de certaines molécules fluorescentes a été améliorée au point de permettre leur observation sur de longues périodes, c'est-à-dire plusieurs dizaines de secondes (ex : ATTO 647N, Espenel *et al.*, 2008). Cependant, le rapport signal/bruit obtenu avec ces molécules reste faible comparé aux QD par exemple, ce qui conduit à une précision de pointé moindre pour le SMT (50 nm, Espenel *et al.*, 2008) vis-à-vis du SPT (7 nm dans notre cas).

Etude de l'organisation dynamique de CD4 et CCR5 à la surface de lymphocytes

La deuxième partie du travail de thèse a consisté à utiliser la technique de SPT avec des complexes QD-anticorps pour étudier l'organisation membranaire dynamique de deux récepteurs du VIH, CD4 et CCR5, ce dernier étant particulièrement impliqué lors de la primo-infection. Jusqu'à présent, aucune analyse en molécule unique de ces récepteurs n'avait été effectuée, que ce soit à la surface de cellules modèles ou non. Cette étude a été rendue possible par la mise au point d'un protocole de marquage des deux récepteurs, à la surface de cellules lymphocytaires infectibles par des souches virales à tropisme R5, et d'une méthode d'analyse des données adaptée à l'utilisation des QD.

Confinement des récepteurs CD4 et CCR5 à la surface des lymphocytes étudiés

L'analyse du mouvement de chacun des deux récepteurs a révélé trois comportements à la surface de la lignée Jurkat exprimant CCR5 : diffusion aléatoire, diffusion confinée de manière permanente ou de manière transitoire. Pour plus de clarté dans la suite du texte, ces trois modes de diffusion seront nommés respectivement : « aléatoire », « confiné permanent » et « confiné transitoire ». Notons que les confinements identifiés comme permanents le sont sur la durée des trajectoires correspondantes (plusieurs dizaines de secondes), et que l'on ne peut exclure qu'une transition vers une diffusion aléatoire puisse être détectée pour des périodes de temps plus longues.

Récepteur CD4

L'étude du récepteur CD4 à 20°C a permis l'identification de confinements pour environ la moitié des récepteurs, avec une majorité de domaines explorés transitoirement. Une augmentation de la température (37°C) a révélé que les récepteurs ayant une diffusion aléatoire possédaient un environnement membranaire différent de ceux ayant une diffusion confinée transitoire. Etant donné que les coefficients de diffusion de cette dernière sous-population de récepteurs ne varient pas entre 20 et 37°C, ni pour les périodes aléatoires, ni pour les périodes confinées, nous avons supposé qu'il existe un partenaire de CD4, de nature inconnue, qui limite la diffusion du récepteur. Cette limitation serait effective à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des domaines explorés par celui-ci. Cette hypothèse va dans le sens d'une régulation complexe de la diffusion de CD4, présumée du fait des nombreux partenaires du récepteur identifiés (TCR, CMH-II, p56^{lck}, CCR5, etc.), ainsi que de sa capacité à former des oligomères (Wu *et al.*, 1997; Briant *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Fournier *et al.*, 2010 ; voir Introduction - § 2.4.1).

Par ailleurs, l'observation de la distribution des coefficients de diffusion à 37°C, pour le mode confiné transitoire, a permis de visualiser clairement l'existence de deux sous-groupes de valeurs, différentes d'un facteur 10 environ. Cela suggère l'existence de deux sous-populations de récepteurs CD4, peut-être du fait de l'interaction du récepteur avec deux partenaires différents. On peut toutefois se demander si des expériences de SPT réalisées avec des fragments Fab au lieu d'anticorps entier donneraient les mêmes variations dans les résultats. En effet, nous ne connaissons pas l'impact de la liaison d'un anticorps à deux récepteurs sur la mesure de coefficient de diffusion, ni sur le mode de diffusion. Ces

expériences complémentaires sont envisageables sous réserve d'obtenir des fragments Fab ayant conservé une grande affinité pour CD4.

Enfin, l'augmentation de température a conduit de manière peu intuitive à une diminution de la taille des domaines dans lesquels CD4 évolue (rayon moyen de 180 nm à 37°C), sans affecter les valeurs de coefficient de diffusion. Un phénomène similaire a déjà été décrit pour le récepteur mu aux opioïdes (Daumas *et al.*, 2003) et le récepteur à la transferrine (Sako & Kusumi, 1994, 1995), bien que ces études rapportent une diminution conjointe des coefficients de diffusion avec celle des tailles de domaines. De plus, aucune corrélation de cette diminution n'a été établie avec un mécanisme moléculaire précis. Il est donc difficile d'interpréter ce résultat en termes d'origine de confinement.

Récepteur CCR5

L'analyse du comportement de CCR5 à 20°C a révélé que la proportion de récepteurs confinés au moins de manière transitoire est d'environ 70 %, soit 20 % de plus environ que pour CD4. Les domaines ont un rayon moyen de 150 nm de diamètre, inférieur à celui observé pour CD4 (rayon moyen de 220 nm).

Des informations complémentaires sont nécessaires pour mieux connaître les caractéristiques dynamiques des différentes sous-populations de récepteurs CCR5. C'est pourquoi il est prévu de reproduire l'expérience à 37°C, comme nous l'avons fait pour CD4. Cependant, lors du suivi de CCR5 à température ambiante, nous avons constaté que les complexes QD-anticorps (clone T21/8) se détachaient de la cellule pendant les acquisitions vidéo. Cela doit être la conséquence d'une affinité modérée de l'anticorps pour le récepteur. Sachant que ce phénomène sera probablement plus important à 37°C, il faudrait pouvoir disposer d'un autre anticorps anti-CCR5, ayant une meilleure affinité que le T21/8. Il est tout autant indiqué de choisir un anticorps qui reconnaît la partie N-terminale du récepteur, toujours dans le but de pouvoir se lier simultanément à des ligands de CCR5 comme le maraviroc, le TAK-779, etc.

Influence de l'interaction CD4-CCR5 sur la diffusion des deux récepteurs

Lors de nos mesures de la diffusion de CD4 par SPT, l'ajout de CD4s, afin de déstabiliser l'interaction CD4-CCR5, n'a pas eu d'effet majeur sur le confinement du récepteur. Seule une augmentation légère de la proportion de récepteurs suivant une diffusion

confinée transitoire a été remarquée, au détriment de celle associée à des confinements permanents, suggérant une déstabilisation partielle de l'interaction CD4-CCR5.

En revanche, la diffusion de CD4 a été plus amplement affectée en présence de maraviroc, une autre molécule compétitrice de l'interaction entre les deux récepteurs, ce qui va dans le sens d'une confirmation de l'existence d'hétérodimères CD4-CCR5 à la surface des lymphocytes étudiés. Deux effets distincts sur la diffusion du récepteur ont été observés. Premièrement, la disparition de la sous-population de récepteurs confinés permanents, au profit de celle ayant un mouvement aléatoire, indique que l'interaction CD4-CCR5 est entièrement responsable du confinement de CD4 dans ces domaines permanents. Deuxièmement, la diminution des coefficients de diffusion et des tailles de domaines correspondant aux trajectoires confinées transitoires suggère que, lorsque CD4 est désengagé de CCR5, il peut interagir avec un autre partenaire qui contraint sa diffusion de manière plus importante. Le fait que cette sous-population de récepteurs reste confinée en l'absence d'interaction avec CCR5 démontre que cette dernière n'est pas à l'origine de ce type de confinement. Il existerait donc diverses origines de confinement pour le récepteur CD4.

En revanche, le maraviroc a eu un effet moins prononcé et inverse sur la diffusion du récepteur CCR5. L'absence de concordance avec les résultats obtenus pour CD4 et la difficulté à interpréter les données nous a amenés à émettre l'hypothèse qu'il existe un biais dans les expériences réalisées pour CCR5 en présence de maraviroc. Ce dernier pourrait par exemple stabiliser la conformation d'une sous-population de récepteurs pour lesquels l'anticorps T21/8 aurait une affinité accrue. Ainsi, lors des expériences de SPT, nous aurions suivi préférentiellement des récepteurs dont le confinement n'est pas dépendant de l'interaction CD4-CCR5, expliquant les différences de résultats de SPT avec CD4. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse en réalisant le suivi de CCR5 en présence d'un autre ligand du récepteur, comme le TAK-779, car d'après une étude récente, celui-ci semble stabiliser une conformation du récepteur différente de celle stabilisée par le maraviroc (Garcia-Perez *et al.*, 2011). De plus, nous avons précédemment indiqué que changer d'anticorps anti-CCR5 pourrait apporter des informations complémentaires à la compréhension de la diffusion du récepteur, et il est possible que dans ce cas, des effets différents soient constatés pour le maraviroc et/ou le TAK-779.

L'ensemble de nos observations a permis de proposer un modèle d'organisation dynamique de CD4 et CCR5 à la surface de la lignée lymphocytaire Jurkat étudiée. Nous avons révélé que des environnements membranaires distincts existent pour les récepteurs, en

particulier pour CD4. De nouvelles données sur la diffusion de CCR5 sont requises pour compléter ce modèle.

Comparaison avec les données de FRAPrv obtenues avec les cellules HEK 293T

Un modèle d'organisation dynamique des récepteurs a été précédemment proposé à partir des données obtenues en FRAPrv sur cellules modèles HEK 293T surexprimant CD4 et CCR5 (Baker *et al.*, 2007; Baker, 2007). Ces expériences avaient démontré que l'interaction constitutive CD4-CCR5 était à l'origine du confinement des deux récepteurs dans de petits domaines ($R \approx 340$ nm), impliquant l'équivalent d'au moins cinq CCR5 pour un CD4. Ce modèle prévoit que les récepteurs n'étant pas en interaction diffusent librement dans de grands domaines joints ($R \approx 1,5$ μ m).

Les domaines détectés par SPT sur la lignée Jurkat sont à peu près du même ordre de grandeur (R moyens : 150 à 220 nm) que les petits domaines révélés par FRAPrv, mais aucun domaine équivalent des grands domaines observés sur les cellules modèles n'a été détecté. Le point commun entre les deux études est que l'interaction CD4-CCR5 est à l'origine du confinement des récepteurs dans ces "petits" domaines. Par ailleurs, la technique de SPT permet l'accès à une caractérisation plus fine des confinements et à la mise en évidence du caractère transitoire de certains d'entre eux, ce qui s'avère être nécessaire à la compréhension de l'organisation membranaire dynamique des récepteurs.

Les différences constatées entre ces deux types cellulaires mettent en avant le fait que cette organisation est susceptible de varier entre les lymphocytes T CD4+ et d'autres cellules immunitaires, comme les macrophages par exemple. Le raisonnement peut être poussé en suggérant que des variations sont possibles entre les cellules T primaires de différents patients. En effet, certains patients contrôlent la réplication virale par des mécanismes plus ou moins bien identifiés, et il serait intéressant de savoir si cela peut être expliqué par une différence dans l'organisation membranaire dynamique de CD4 et CCR5 par rapport aux patients dits "normaux". La même remarque peut être faite vis-à-vis des différences de réponse aux traitements, par exemple ceux basés sur le maraviroc. C'est pourquoi des expériences de SPT pour les récepteurs CD4 et CCR5 pourraient être réalisées sur d'autres types cellulaires naturellement infectés par le VIH. Il sera important d'évaluer toutefois la faisabilité d'une telle étude sur cellules primaires, car il est nécessaire d'obtenir suffisamment de données pour garantir la validité de l'étude en termes statistiques.

Augmenter le rendement d'acquisition des trajectoires

Il existe plusieurs solutions pour augmenter le nombre de trajectoires obtenues, et ainsi améliorer la qualité des statistiques relatives aux expériences de SPT, en particulier en ce qui concerne les populations minoritaires (proportion inférieure à 10 %). En effet, nous avons acquis environ 100 trajectoires par condition, et il serait souhaitable de doubler ou tripler ce nombre, pour que des sous-populations correspondant à 5-10 % du nombre total de trajectoires soient analysées sur 15 à 30 valeurs.

A ce titre, nous avons remarqué que le clignotement des QD nous obligeait à éliminer de nombreuses trajectoires dans chaque analyse. Une des solutions qui permettrait de facilement augmenter le nombre final de trajectoires serait donc d'utiliser des QD qui ont un taux de clignotement réduit par rapport à ceux que nous avons utilisés, ou bien des billes de latex de 40 nm de diamètre qui ne clignent pas. Concernant la première solution, des travaux ont par exemple montré qu'en augmentant l'épaisseur de l'enveloppe (de CdS) de QD ayant un cœur de CdSe, le clignotement était considérablement réduit (Mahler *et al.*, 2008).

Expériences complémentaires pour l'étude de l'organisation dynamique de CD4 et CCR5

Comme nous l'avons discuté ici, il est important de compléter les expériences de SPT pour les récepteurs CD4 et CCR5, de manière à affiner le modèle d'organisation dynamique de ceux-ci.

Etant donné que l'interaction CD4-CCR5 semble intervenir de manière complexe dans le confinement des récepteurs, il serait intéressant d'observer de manière simultanée le mouvement des deux récepteurs, en suivi de particule ou de molécule unique à deux couleurs. Cela a été récemment effectué en utilisant deux lots de QD émettant à deux longueurs d'onde différentes (QD-585 et QD-655), pour visualiser l'homodimérisation en temps réel du récepteur ErbB1, bien que la taille des QD puisse être une limitation pour ce type d'étude (Low-Nam *et al.*, 2011). Une autre étude, utilisant les molécules fluorescentes Alexa488 et Cy3B en suivi de molécule unique, a permis l'étude de la formation et de la dissociation d'homodimères du récepteur muscarinique M1 (Hern *et al.*, 2010).

Pour étudier l'influence de la présence de CD4 dans la membrane sur la diffusion de CCR5, ou vice-versa, il est possible d'inhiber l'expression d'un des deux récepteurs. Cela peut être accompli par l'intermédiaire d'ARN interférents spécifiques des séquences codant pour le

récepteur ciblé. De plus, il serait envisageable de réprimer l'expression d'autres protéines, comme par exemple des partenaires de CD4 (TCR, CMH-II, p56^{lck}), pour connaître la contribution de chacun dans la régulation de la diffusion du récepteur. Notons toutefois que ce type d'expérience nécessite de nombreuses mises au point : sélectionner une séquence d'ARN appropriée, définir des conditions de perméabilisation qui permettent une entrée efficace de l'ARN interférent, sans provoquer de mort cellulaire trop importante, et conduisant à l'inhibition efficace de l'expression membranaire du récepteur ciblé.

Une autre stratégie correspond au développement de lignées cellulaires exprimant de manière inducible CD4, CCR5 ou les autres protéines citées. Il existe en effet des promoteurs génétiques activés, ou déréprimés, spécifiquement en présence de molécules régulatrices. La meilleure approche est de pouvoir contrôler le taux d'expression des récepteurs, et c'est ce qui a été réalisé avec des cellules HEK 293T : expression de CD4 induite par la minocycline, et de CCR5 induite par la ponastérone A (Johnston *et al.*, 2009). Comme la stratégie utilisant les ARN interférents, l'avantage est de pouvoir réaliser les expériences sur le même lot de cellule, et ainsi minimiser les variations inter-cellulaires.

Enfin, le confinement des récepteurs CD4 et CCR5 peut être la conséquence d'une interaction avec le cytosquelette d'actine, avec des domaines riches en cholestérol et en sphingolipides, ou bien dans le cas de CCR5 spécifiquement, avec des protéines G hétérotrimériques. Il sera donc important d'évaluer la contribution de ces différentes interactions moléculaires dans l'organisation dynamique des récepteurs, par exemple en utilisant la cytochalasine D, la cholestérol-oxydase et la toxine pertussique, respectivement.

Origine de l'utilisation majoritaire de CCR5 lors de la primo-infection

Les travaux présentés ici se sont focalisés sur le corécepteur CCR5. Il est en effet majoritairement utilisé lors de la primo-infection par des souches virales à tropisme R5, et au cours de la maladie, l'émergence de virus à tropisme X4, utilisant le corécepteur CXCR4, conduit à une évolution rapide du déclin du système immunitaire et de l'augmentation de la charge virale. Les raisons de ce basculement, ainsi que l'origine de la prépondérance des souches R5 au début de l'infection, sont aujourd'hui méconnues.

Une extension de notre projet serait d'identifier les différences d'organisation membranaire dynamique des deux corécepteurs, et ceci vis-à-vis du récepteur primaire CD4, commun au processus d'entrée des souches virales R5 et X4. Il est possible par exemple que l'association préférentielle de CCR5 avec CD4 puisse être une cause de la prépondérance des

virus R5, ce qui a été proposé par des expériences de biochimie (co-immunoprécipitation, Xiao *et al.*, 1999).

Influence de la protéine d'enveloppe virale sur la diffusion de CD4

En plus de caractériser l'organisation membranaire dynamique de CD4 et CCR5, mon projet de thèse avait pour objectif d'identifier l'impact de la liaison de la protéine d'enveloppe virale gp120 sur la diffusion des récepteurs.

Le suivi du mouvement de CD4 a pu être effectué avec l'anticorps OKT4 en présence de gp120 et a révélé deux effets opposés sur la diffusion du récepteur, observés à 20°C et à 37°C. Premièrement, la gp120 a induit une diminution du nombre de récepteurs confinés au profit de ceux diffusant aléatoirement, suggérant une déstabilisation du confinement de certains récepteurs. Deuxièmement, une réduction de la taille des confinements restants, ainsi que des coefficients de diffusion des récepteurs explorant ces domaines, a été constatée en présence de gp120. Ces observations nous ont amenés à formuler l'hypothèse que ces comportements opposés correspondent respectivement au mouvement des complexes CD4-gp120 et CD4-gp120-CCR5. Il est nécessaire de compléter ces données en se plaçant dans des conditions où la formation de complexes CD4-gp120-CCR5 est inhibée, de manière à révéler uniquement la diffusion de dimères CD4-gp120 et la comparer à nos résultats. Par exemple, nous savons que la gp120 de la souche virale Bx08, qui a été utilisée dans nos expériences de SPT, est efficacement déplacée par la molécule TAK-779 (Garcia-Perez *et al.*, 2011).

Il est possible d'effectuer d'autres expériences de SPT, où la particule (QD) serait accrochée directement à la gp120. Idéalement, il faudrait pouvoir lier la particule à une des extrémités de la gp120 (N-terminale ou C-terminale), de manière covalente ou non. Une solution d'accrochage non covalent serait de produire une gp120 recombinante possédant un peptide accepteur à l'une de ses extrémités, et une fois liée aux récepteurs à la surface des cellules, d'ajouter l'enzyme bactérienne BirA qui viendra spécifiquement greffer une biotine sur la gp120, pour enfin ajouter des QD recouverts de streptavidine.

Par ailleurs, il serait intéressant de réaliser ces expériences en présence de maraviroc, car il s'agit d'une molécule utilisée pour traiter les patients dont les souches de VIH sont résistantes aux traitements de première ligne, et pour laquelle des résistances ont aussi été constatées. L'origine de cette résistance n'est pas clairement définie, mais semble impliquer des protéines d'enveloppe virale qui se fixent à CCR5 même si le maraviroc y est lié. Rappelons que le maraviroc déplace moins bien la gp120 du récepteur CCR5 que le

TAK-779, alors que le maraviroc inhibe bien mieux (d'un facteur 100) l'infection par le VIH que le TAK-779 (Garcia-Perez *et al.*, 2011). C'est pourquoi l'analyse du mouvement de la gp120 à la surface de lymphocytes T CD4+ exprimant CCR5, en présence de maraviroc, pourrait apporter des éléments de réponse complémentaires sur le mécanisme qui permet à cette molécule thérapeutique d'inhiber l'infection virale. Il faut rappeler enfin que toutes les souches de VIH n'ont pas les mêmes capacités à exprimer cette résistance vis-à-vis du maraviroc. Il serait donc important de tester deux protéines d'enveloppe différentes : l'une résistante au maraviroc, l'autre non.

Etudier l'influence de la gp120 dans des conditions proches de celles de l'infection

Nous avons présenté dans l'introduction que la gp120 est sous forme trimérique à la surface des virions, et que les particules virales infectant l'homme (VIH) en possèdent peu (~14 trimères, fig. 27). Nous pouvons nous demander quelle serait la diffusion d'un trimère de gp120 à la surface de cellules cibles. Est-il possible d'identifier les différents états d'interaction de ce complexe avec les récepteurs CD4 et CCR5, sachant qu'un total de 6 liaisons sont possibles par trimère viral ? Est-ce qu'un mécanisme coopératif peut être observé ?

La production et la stabilisation de trimères solubles de protéines d'enveloppe virale a été rendu possible par l'introduction de résidus cystéines dans les ectodomains de gp41, formant des ponts disulfures, et par l'ajout de motifs à structure hélicale toujours au niveau de la partie gp41 (Yang *et al.*, 2000). Ainsi, le mouvement de tels trimères pourrait être observé à la surface de cellules vivantes par la technique de SPT, par exemple en greffant une biotine comme décrit précédemment et en utilisant des QD recouverts de streptavidine, ou bien de manière indirecte en ciblant CD4 avec un anticorps comme nous l'avons fait dans nos expériences.

Enfin, pour étudier l'influence de l'accrochage d'une particule virale entière sur une cellule ciblée par le VIH, il serait envisageable de greffer des trimères de protéines d'enveloppe virale, par leur extrémité "gp41", sur des billes de latex fluorescentes de la taille d'un virion ($\Phi \sim 100$ nm). Il serait alors possible de suivre et analyser le mouvement de la bille, et tenter de déterminer les différents comportements selon les conditions expérimentales choisies : ajout de maraviroc, de TAK-779, etc.

Les résultats de notre étude constituent ainsi une base pour établir un modèle de l'organisation dynamique des récepteurs CD4 et CCR5, à la surface de cellules lymphocytaires, cibles du VIH. Les perspectives de ce travail vont permettre de compléter ce modèle dynamique, et dans la mesure du possible déterminer quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus d'entrée du virus. A long terme, nous espérons que ces informations conduiront à la proposition de nouvelles stratégies thérapeutiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Achour L, Scott MGH, Shirvani H, Thuret A, Bismuth G, Labbé-Jullié C & Marullo S (2009) CD4-CCR5 interaction in intracellular compartments contributes to receptor expression at the cell surface. *Blood* **113**: 1938-1947
- Affentranger S, Martinelli S, Hahn J, Rossy J & Niggli V (2011) Dynamic reorganization of flotillins in chemokine-stimulated human T-lymphocytes. *BMC Cell Biol* **12**: 28-28
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P (2003) Essential Cell Biology, Second Edition 2^e éd. Garland Science/Taylor & Francis Group
- Alcor D, Gouzer G & Triller A (2009) Single-particle tracking methods for the study of membrane receptors dynamics. *European Journal of Neuroscience* **30**: 987-997
- Andrews C (1995) « The Duesberg phenomenon »: what does it mean? *Science* **267**: 157
- Angelides KJ, Elmer LW, Loftus D & Elson E (1988) Distribution and lateral mobility of voltage-dependent sodium channels in neurons. *J. Cell Biol.* **106**: 1911-1925
- Aramori I, Ferguson SS, Bieniasz PD, Zhang J, Cullen B & Cullen MG (1997) Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor. *EMBO J.* **16**: 4606-4616
- Atkins MC, Carlin EM, Emery VC, Griffiths PD & Boag F (1996) Fluctuations of HIV load in semen of HIV positive patients with newly acquired sexually transmitted diseases. *BMJ* **313**: 341-342
- Auvert B, Taljaard D, Lagarde E, Sobngwi-Tambekou J, Sitta R & Puren A (2005) Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk: the ANRS 1265 Trial. *PLoS Med.* **2**: e298
- Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson E & Webb WW (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* **16**: 1055-1069

B

- Bacon KB, Schall TJ & Dairaghi DJ (1998) RANTES activation of phospholipase D in Jurkat T cells: requirement of GTP-binding proteins ARF and RhoA. *J. Immunol.* **160**: 1894-1900
- Baker A-M (2007) Etude, à la surface de cellules vivantes, des changements de compartimentation latérale et de co-localisation dynamique du récepteur CD4 et du co-récepteur CCR5 au VIH.
- Baker AM, Sauliere A, Gaibelet G, Lagane B, Mazeres S, Fourage M, Bachelerie F, Salome L, Lopez A & Dumas F (2007) CD4 interacts constitutively with multiple CCR5 at the plasma membrane of living cells. A fluorescence recovery after photobleaching at variable radii approach. *J Biol Chem* **282**: 35163-8
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W & Montagnier L (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-871
- Bayer ME & Remsen CC (1970) Structure of Escherichia coli after freeze-etching. *J. Bacteriol.* **101**: 304-313

- Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA & Jeang KT (1997) Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J. Biol. Chem.* **272**: 30603-30606
- Berg HC (1993) Random walks in biology Princeton University Press
- Blanpain C, Doranz BJ, Vakili J, Rucker J, Govaerts C, Baik SS, Lorthioir O, Migeotte I, Libert F, Baleux F, Vassart G, Doms RW & Parmentier M (1999) Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein. *J. Biol. Chem.* **274**: 34719-34727
- Blanpain C, Vanderwinden J-M, Cihak J, Wittamer V, Le Poul E, Issafras H, Stangassinger M, Vassart G, Marullo S, Schlindorff D, Parmentier M & Mack M (2002) Multiple active states and oligomerization of CCR5 revealed by functional properties of monoclonal antibodies. *Mol. Biol. Cell* **13**: 723-737
- Blanpain C, Wittamer V, Vanderwinden JM, Boom A, Renneboog B, Lee B, Le Poul E, El Asmar L, Govaerts C, Vassart G, Doms RW & Parmentier M (2001) Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **276**: 23795-23804
- Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA & Mackay CR (1997) The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 1925-1930
- Bloom & Fawcett (1994) A Textbook of Histology 12^e éd. NY: Chapman and Hall
- Boasso A & Shearer GM (2008) Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin. Immunol.* **126**: 235-242
- Bomsel M (1997) Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat. Med.* **3**: 42-47
- Bour S, Boulterice F & Wainberg MA (1991) Inhibition of gp160 and CD4 maturation in U937 cells after both defective and productive infections by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **65**: 6387-96
- Bowers K, Pitcher C & Marsh M (1997) CD4: a co-receptor in the immune response and HIV infection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**: 871-875
- De Brabander M, Nuydens R, Geuens G, Moeremans M & De Mey J (1986) The use of submicroscopic gold particles combined with video contrast enhancement as a simple molecular probe for the living cell. *Cell Motil. Cytoskeleton* **6**: 105-113
- Brady RL & Barclay AN (1996) The structure of CD4. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **205**: 1-18
- Brady RL, Dodson EJ, Dodson GG, Lange G, Davis SJ, Williams AF & Barclay AN (1993) Crystal structure of domains 3 and 4 of rat CD4: relation to the NH2-terminal domains. *Science* **260**: 979-983
- Brand A & Yavin E (2001) Early ethanolamine phospholipid translocation marks stress-induced apoptotic cell death in oligodendroglial cells. *J. Neurochem.* **78**: 1208-1218
- Briant L, Signoret N, Gaubin M, Robert-Hebmann V, Zhang X, Murali R, Greene MI, Piatier-Tonneau D & Devaux C (1997) Transduction of activation signal that follows HIV-1 binding to CD4 and CD4 dimerization involves the immunoglobulin CDR3-like region in domain 1 of CD4. *J. Biol. Chem.* **272**: 19441-19450
- Briggs JAG, Grünewald K, Glass B, Förster F, Kräusslich H-G & Fuller SD (2006) The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions. *Structure* **14**: 15-20
- Briz V, Poveda E & Soriano V (2006) HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57**: 619 -627
- Brown DA & Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**: 533-544

Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, Nabel GJ, Sodroski J, Wilson IA & Wyatt RT (2004) HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* **5**: 233-236

C

Cairo CW, Mirchev R & Golan DE (2006) Cytoskeletal regulation couples LFA-1 conformational changes to receptor lateral mobility and clustering. *Immunity* **25**: 297-308

Calamai M, Specht CG, Heller J, Alcor D, Machado P, Vannier C & Triller A (2009) Gephyrin oligomerization controls GlyR mobility and synaptic clustering. *J. Neurosci.* **29**: 7639-7648

Campbell & Reese (2008) *Biology* 8^e éd. San Francisco, CA: Benjamin Cummings

Campbell EM, Nunez R & Hope TJ (2004) Disruption of the Actin Cytoskeleton Can Complement the Ability of Nef To Enhance Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity. *J. Virol.* **78**: 5745-5755

Cartaud A, Stetzkowski-Marden F, Maoui A & Cartaud J (2011) Agrin triggers the clustering of raft-associated acetylcholine receptors through actin cytoskeleton reorganization. *Biol. Cell* **103**: 287-301

Center DM, Kornfeld H & Cruikshank WW (1996) Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol. Today* **17**: 476-481

Chan DC, Fass D, Berger JM & Kim PS (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**: 263-273

Chang JJ & Altfeld M (2009) TLR-mediated immune activation in HIV. *Blood* **113**: 269-270

Chelli M & Alizon M (2002) Rescue of HIV-1 receptor function through cooperation between different forms of the CCR5 chemokine receptor. *J. Biol. Chem.* **277**: 39388-39396

Chernomordik L (1996) Non-bilayer lipids and biological fusion intermediates. *Chem. Phys. Lipids* **81**: 203-213

Chichili GR & Rodgers W (2009) Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 2319-2328

Cho I-H, Paek E-H, Lee H, Kang JY, Tae Song Kim & Paek S-H (2007) Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces. *Analytical Biochemistry* **365**: 14-23

Cho SS, Bacon CM, Sudarshan C, Rees RC, Finbloom D, Pine R & O'Shea JJ (1996) Activation of STAT4 by IL-12 and IFN-alpha: evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation. *J. Immunol.* **157**: 4781-4789

Choi W-T & An J (2011) Biology and clinical relevance of chemokines and chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in human diseases. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **236**: 637-647

Choudhry V, Zhang M-Y, Harris I, Sidorov IA, Vu B, Dimitrov AS, Fouts T & Dimitrov DS (2006) Increased efficacy of HIV-1 neutralization by antibodies at low CCR5 surface concentration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**: 1107-1115

Chu JJH & Ng ML (2002) Infection of polarized epithelial cells with flavivirus West Nile: polarized entry and egress of virus occur through the apical surface. *J. Gen. Virol.* **83**: 2427-2435

- Cicala C, Martinelli E, McNally JP, Goode DJ, Gopaul R, Hiatt J, Jelacic K, Kottlilil S, Macleod K, O'Shea A, Patel N, Van Ryk D, Wei D, Pascuccio M, Yi L, McKinnon L, Izulla P, Kimani J, Kaul R, Fauci AS, *et al.* (2009) The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1 10.1073/pnas.0911796106. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: -
- Cinek T & Horejsi V (1992) The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases. *The Journal of Immunology* **149**: 2262 -2270
- Clapham PR & McKnight Á (2002) Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *Journal of General Virology* **83**: 1809 -1829
- Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C & Rouzioux C (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**: 343-346
- De Clercq E (2009) Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *International Journal of Antimicrobial Agents* **33**: 307-320
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC & Lusso P (1995) Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**: 1811-1815
- Cohen J (1994) The Duesberg phenomenon. *Science* **266**: 1642-1644
- Coleman CM, Spearman P & Wu L (2011) Tetherin does not significantly restrict dendritic cell-mediated HIV-1 transmission and its expression is upregulated by newly synthesized HIV-1 Nef. *Retrovirology* **8**: 26
- Cornelius F (2001) Modulation of Na,K-ATPase and Na-ATPase activity by phospholipids and cholesterol. I. Steady-state kinetics. *Biochemistry* **40**: 8842-8851
- Cournaud V (2004) Évolution et virulence des lentivirus de primates. *M/S□: médecine sciences* **20**: 448-452
- Crise B & Rose JK (1992) Identification of palmitoylation sites on CD4, the human immunodeficiency virus receptor. *J. Biol. Chem.* **267**: 13593-13597

D

- Da L-T, Quan J-M & Wu Y-D (2011) Understanding the binding mode and function of BMS-488043 against HIV-1 viral entry. *Proteins* **79**: 1810-1819
- Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF & Weiss RA (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**: 763-767
- Danielli JF & Davson H (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **5**: 495-508
- Daumas F, Destainville N, Millot C, Lopez A, Dean D & Salome L (2003a) Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking. *Biophys J* **84**: 356-66
- Daumas F, Destainville N, Millot C, Lopez A, Dean D & Salomé L (2003b) Interprotein interactions are responsible for the confined diffusion of a G-protein-coupled receptor at the cell surface. *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 1001-1005
- Davis DM (2009) Mechanisms and functions for the duration of intercellular contacts made by lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **9**: 543-555
- Dayton AI, Sodroski JG, Rosen CA, Goh WC & Haseltine WA (1986) The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **44**: 941-947

- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R & O'Brien SJ (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* **273**: 1856-1862
- Destainville N & Salomé L (2006) Quantification and correction of systematic errors due to detector time-averaging in single-molecule tracking experiments. *Biophys. J.* **90**: L17-19
- Dityatev A, Seidenbecher CI & Schachner M (2010) Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends Neurosci* **33**: 503-512
- Dobrowsky TM, Daniels BR, Siliciano RF, Sun SX & Wirtz D (2010) Organization of cellular receptors into a nanoscale junction during HIV-1 adhesion. *PLoS Comput. Biol.* **6**: e1000855
- Dobrowsky TM, Zhou Y, Sun SX, Siliciano RF & Wirtz D (2008) Monitoring early fusion dynamics of human immunodeficiency virus type 1 at single-molecule resolution. *J. Virol.* **82**: 7022-7033
- Doms RW & Trono D (2000) The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev.* **14**: 2677-2688
- Doranz BJ, Baik SS & Doms RW (1999) Use of a gp120 binding assay to dissect the requirements and kinetics of human immunodeficiency virus fusion events. *J. Virol.* **73**: 10346-10358
- Duesberg P (1988) HIV is not the cause of AIDS. *Science* **241**: 514
- Duesberg PH (1995) « The Duesberg phenomenon »: Duesberg and other voices. *Science* **267**: 313-314; author reply 316
- Dugast A-S, Tonelli A, Berger CT, Ackerman ME, Sciaranghella G, Liu Q, Sips M, Toth I, Piechocka-Trocha A, Ghebremichael M & Alter G (2011) Decreased Fc receptor expression on innate immune cells is associated with impaired antibody-mediated cellular phagocytic activity in chronically HIV-1 infected individuals. *Virology* **415**: 160-167
- Dumas F, Tocanne JF, Leblanc G & Lebrun MC (2000) Consequences of hydrophobic mismatch between lipids and melibiose permease on melibiose transport. *Biochemistry* **39**: 4846-4854

E

- Ellery PJ, Tippett E, Chiu Y-L, Paukovics G, Cameron PU, Solomon A, Lewin SR, Gorry PR, Jaworowski A, Greene WC, Sonza S & Crowe SM (2007) The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J. Immunol.* **178**: 6581-6589
- Engelman DM (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**: 578-80
- Espenel C, Margeat E, Dosset P, Arduise C, Le Grimellec C, Royer CA, Boucheix C, Rubinstein E & Milhiet P-E (2008) Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *J. Cell Biol.* **182**: 765-776

Esser MT, Graham DR, Coren LV, Trubey CM, Bess JW Jr, Arthur LO, Ott DE & Lifson JD (2001) Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type 1 virions and microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation. *J. Virol.* **75**: 6173-6182

F

- Fackler OT, Alcover A & Schwartz O (2007) Modulation of the immunological synapse: a key to HIV-1 pathogenesis? *Nat Rev Immunol* **7**: 310-317
- Falk J, Thoumine O, Dequidt C, Choquet D & Faivre-Sarrailh C (2004) NrCAM coupling to the cytoskeleton depends on multiple protein domains and partitioning into lipid rafts. *Mol. Biol. Cell* **15**: 4695-4709
- Farquhar MJ, Harris HJ & McKeating JA (2011) Hepatitis C virus entry and the tetraspanin CD81. *Biochem. Soc. Trans* **39**: 532-536
- Farzan M, Vasilieva N, Schnitzler CE, Chung S, Robinson J, Gerard NP, Gerard C, Choe H & Sodroski J (2000) A tyrosine-sulfated peptide based on the N terminus of CCR5 interacts with a CD4-enhanced epitope of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein and inhibits HIV-1 entry. *J. Biol. Chem.* **275**: 33516-33521
- Fein M, Unkeless J, Chuang FS, Sassaroli M, Costa R, Väänänen H & Eisinger J (1993) Lateral mobility of lipid analogues and GPI-anchored proteins in supported bilayers determined by fluorescent bead tracking. *J. Membrane Biol.* **135**: 82-93
- Finnegan CM, Berg W, Lewis GK & DeVico AL (2002) Antigenic properties of the human immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein during cell-cell fusion. *J. Virol.* **76**: 12123-12134
- Finnegan CM, Rawat SS, Cho EH, Guiffre DL, Lockett S, Merrill AH & Blumenthal R (2007) Sphingomyelinase restricts the lateral diffusion of CD4 and inhibits human immunodeficiency virus fusion. *J Virol* **81**: 5294-304
- Fisher AG, Feinberg MB, Josephs SF, Harper ME, Marselle LM, Reyes G, Gonda MA, Aldovini A, Debouk C, Gallo RC & Wong-Staal F (1986) The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* **320**: 367-371
- Foti M, Phelouzat M-A, Holm A, Rasmusson BJ & Carpentier J-L (2002) p56Lck anchors CD4 to distinct microdomains on microvilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 2008-2013
- Fournier M, Peyrou M, Bourgoïn L, Maeder C, Tchou I & Foti M (2010) CD4 dimerization requires two cysteines in the cytoplasmic domain of the molecule and occurs in microdomains distinct from lipid rafts. *Mol. Immunol.* **47**: 2594-2603
- Fouts TR, Trkola A, Fung MS & Moore JP (1998) Interactions of polyclonal and monoclonal anti-glycoprotein 120 antibodies with oligomeric glycoprotein 120-glycoprotein 41 complexes of a primary HIV type 1 isolate: relationship to neutralization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**: 591-597
- Fragoso R, Ren D, Zhang X, Su MW, Burakoff SJ & Jin YJ (2003) Lipid raft distribution of CD4 depends on its palmitoylation and association with Lck, and evidence for CD4-induced lipid raft aggregation as an additional mechanism to enhance CD3 signaling. *J Immunol* **170**: 913-21
- Francis SS, Sfakianos J, Lo B & Mellman I (2011) A hierarchy of signals regulates entry of membrane proteins into the ciliary membrane domain in epithelial cells. *J. Cell Biol* **193**: 219-233
- Freed EO (2001) HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet* **26**: 13-33

- Frye LD & Edidin M (1970) The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J. Cell. Sci.* **7**: 319-335
- Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K & Kusumi A (2002) Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J. Cell Biol.* **157**: 1071-1081
- Furuta RA, Nishikawa M & Fujisawa J-ichi (2006) Real-time analysis of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by fluorescence resonance energy transfer. *Microbes Infect.* **8**: 520-532

G

- Gaibelet G, Millot C, Lebrun C, Ravault S, Sauliere A, Andre A, Lagane B & Lopez A (2008) Cholesterol content drives distinct pharmacological behaviours of micro-opioid receptor in different microdomains of the CHO plasma membrane. *Mol. Membr. Biol.* **25**: 423-435
- Gaibelet G, Planchenault T, Mazeres S, Dumas F, Arenzana-Seisdedos F, Lopez A, Lagane B & Bachelier F (2006) CD4 and CCR5 constitutively interact at the plasma membrane of living cells: a confocal fluorescence resonance energy transfer-based approach. *J Biol Chem* **281**: 37921-9
- Garcia-Perez J, Rueda P, Staropoli I, Kellenberger E, Alcamí J, Arenzana-Seisdedos F & Lagane B (2011) New insights into the mechanisms whereby low molecular weight CCR5 ligands inhibit HIV-1 infection. *J. Biol. Chem.* **286**: 4978-4990
- Gathe (2010) CROI (Paper # 54LB).
- Gauthier S & Tremblay MJ (2010) Cholera toxin inhibits HIV-1 replication in human colorectal epithelial HT-29 cells through adenylate cyclase activation. *Antiviral Res.* **88**: 207-216
- Giocondi MC, Vié V, Lesniewska E, Goudonnet JP & Le Grimellec C (2000) In situ imaging of detergent-resistant membranes by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* **131**: 38-43
- Gorter E & Grendel F (1925) ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD. *J. Exp. Med.* **41**: 439-443
- Govaerts C, Bondue A, Springael J-Y, Olivella M, Deupi X, Le Poul E, Wodak SJ, Parmentier M, Pardo L & Blanpain C (2003) Activation of CCR5 by Chemokines Involves an Aromatic Cluster between Transmembrane Helices 2 and 3. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 1892 -1903
- Grebenkämper K, Tosi PF, Lazarte JE, Sneed L, Brüggemann U, Kubitscheck U, Nicolau C & Peters R (1995) Modulation of CD4 lateral mobility in intact cells by an intracellularly applied antibody. *Biochem. J.* **312** (Pt 1): 251-259
- Groc L, Lafourcade M, Heine M, Renner M, Racine V, Sibarita J-B, Lounis B, Choquet D & Cognet L (2007) Surface Trafficking of Neurotransmitter Receptor: Comparison between Single-Molecule/Quantum Dot Strategies. *The Journal of Neuroscience* **27**: 12433 -12437
- Gulbins E & Li PL (2006) Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**: R11-26

H

- Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk HD & Garten W (1992) Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**: 358-361

- Hanna GJ, Lalezari J, Hellinger JA, Wohl DA, Nettles R, Persson A, Krystal M, Lin P, Colonna R & Grasela DM (2011) Antiviral activity, pharmacokinetics, and safety of BMS-488043, a novel oral small-molecule HIV-1 attachment inhibitor, in HIV-1-infected subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 722-728
- Hanson MA & Stevens RC (2009) Discovery of new GPCR biology: one receptor structure at a time. *Structure* **17**: 8-14
- Hao X, Shang X, Wu J, Shan Y, Cai M, Jiang J, Huang Z, Tang Z & Wang H (2011) Single-Particle Tracking of Hepatitis B Virus-like Vesicle Entry into Cells. *Small* **7**: 1212-1218
- Hartlova A, Cerveny L, Hubalek M, Krocova Z & Stulik J (2010) Membrane rafts: a potential gateway for bacterial entry into host cells. *Microbiol. Immunol.* **54**: 237-245
- Hering H, Lin C-C & Sheng M (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J. Neurosci.* **23**: 3262-3271
- Hern JA, Baig AH, Mashanov GI, Birdsall B, Corrie JET, Lazareno S, Molloy JE & Birdsall NJM (2010) Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 2693-2698
- Hernanz-Falcón P, Rodríguez-Frade JM, Serrano A, Juan D, del Sol A, Soriano SF, Roncal F, Gómez L, Valencia A, Martínez-A C & Mellado M (2004) Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. *Nat. Immunol.* **5**: 216-223
- Hladik F & McElrath MJ (2008) Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* **8**: 447-457
- Hoffmann SC, Wabnitz GH, Samstag Y, Moldenhauer G & Ludwig T (2011) Functional analysis of bispecific antibody (EpCAMxCD3)-mediated T-lymphocyte and cancer cell interaction by single-cell force spectroscopy. *Int. J. Cancer* **128**: 2096-2104
- Hohng S & Ha T (2004) Near-complete suppression of quantum dot blinking in ambient conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 1324-1325
- Holt N, Wang J, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V, Crooks GM, Kohn DB, Gregory PD, Holmes MC & Cannon PM (2010) Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nat. Biotechnol.* **28**: 839-847
- Holthuis JCM & Levine TP (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 209-220
- Homsy J, Meyer M, Tateno M, Clarkson S & Levy JA (1989) The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells. *Science* **244**: 1357-1360
- Howarth M, Liu W, Puthenveetil S, Zheng Y, Marshall LF, Schmidt MM, Wittrup KD, Bawendi MG & Ting AY (2008) Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells. *Nat. Methods* **5**: 397-399
- Huang C-C, Lam SN, Acharya P, Tang M, Xiang S-H, Hussan SS-U, Stanfield RL, Robinson J, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Bewley CA & Kwong PD (2007) Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science* **317**: 1930-1934
- Hug P, Lin HM, Korte T, Xiao X, Dimitrov DS, Wang JM, Puri A & Blumenthal R (2000) Glycosphingolipids promote entry of a broad range of human immunodeficiency virus type 1 isolates into cell lines expressing CD4, CXCR4, and/or CCR5. *J. Virol.* **74**: 6377-6385
- Hüttenrauch F, Pollok-Kopp B & Oppermann M (2005) G protein-coupled receptor kinases promote phosphorylation and beta-arrestin-mediated internalization of CCR5 homo- and hetero-oligomers. *J. Biol. Chem.* **280**: 37503-37515

Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK & Thiel E (2009) Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* **360**: 692-698

I

Isik N, Hereld D & Jin T (2008) Fluorescence resonance energy transfer imaging reveals that chemokine-binding modulates heterodimers of CXCR4 and CCR5 receptors. *PLoS ONE* **3**: e3424

Issafras H, Angers S, Bulenger S, Blanpain C, Parmentier M, Labbé-Jullié C, Bouvier M & Marullo S (2002) Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J. Biol. Chem.* **277**: 34666-34673

Izumi K, Kodama E, Shimura K, Sakagami Y, Watanabe K, Ito S, Watabe T, Terakawa Y, Nishikawa H, Sarafianos SG, Kitaura K, Oishi S, Fujii N & Matsuoka M (2009) Design of Peptide-based Inhibitors for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains Resistant to T-20. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 4914 -4920

J

Jaakola V-P, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EYT, Lane JR, IJzerman AP & Stevens RC (2008) The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A2A Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science* **322**: 1211 -1217

Jeong S, Achermann M, Nanda J, Ivanov S, Klimov VI & Hollingsworth JA (2005) Effect of the thiol-thiolate equilibrium on the photophysical properties of aqueous CdSe/ZnS nanocrystal quantum dots. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 10126-10127

Ji TH, Grossmann M & Ji I (1998) G Protein-coupled Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 17299 -17302

Jiang C, Parrish NF, Wilen CB, Li H, Chen Y, Pavlicek JW, Berg A, Lu X, Song H, Tilton JC, Pfaff JM, Henning EA, Decker JM, Moody MA, Drinker MS, Schutte R, Freel S, Tomaras GD, Nedellec R, Mosier DE, *et al.* (2011) Primary Infection by a Human Immunodeficiency Virus with Atypical Coreceptor Tropism. *J. Virol.* **85**: 10669-81

Jimenez-Baranda S, Gomez-Mouton C, Rojas A, Martinez-Prats L, Mira E, Ana Lacalle R, Valencia A, Dimitrov DS, Viola A, Delgado R, Martinez AC & Manes S (2007) Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. *Nat Cell Biol* **9**: 838-46

Johnston SH, Lobritz MA, Nguyen S, Lassen K, Delair S, Posta F, Bryson YJ, Arts EJ, Chou T & Lee B (2009) A quantitative affinity-profiling system that reveals distinct CD4/CCR5 usage patterns among human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus strains. *J. Virol.* **83**: 11016-11026

K

Kaiser H-J, Orlowski A, Róg T, Nyholm TKM, Chai W, Feizi T, Lingwood D, Vattulainen I & Simons K (2011) Lateral sorting in model membranes by cholesterol-mediated hydrophobic matching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**: 16628-16633

- Karlsson Hedestam GB, Fouchier RAM, Phogat S, Burton DR, Sodroski J & Wyatt RT (2008) The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Micro* **6**: 143-155
- Karsten V, Gordon S, Kirn A & Herbein G (1996) HIV-1 envelope glycoprotein gp120 down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* **88**: 55-60
- Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, Sun C, Grayson T, Wang S, Li H, Wei X, Jiang C, Kirchherr JL, Gao F, Anderson JA, Ping L-H, Swanstrom R, Tomaras GD, Blattner WA, Goepfert PA, *et al.* (2008) Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**: 7552-7557
- Kishko M, Somasundaran M, Brewster F, Sullivan JL, Clapham PR & Luzuriaga K (2011) Genotypic and functional properties of early infant HIV-1 envelopes. *Retrovirology* **8**: 67
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC & Montagnier L (1984) T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**: 767-768
- Kogan M & Rappaport J (2011) HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology* **8**: 25
- Kolin DL, Ronis D & Wiseman PW (2006) k-Space image correlation spectroscopy: a method for accurate transport measurements independent of fluorophore photophysics. *Biophys. J.* **91**: 3061-3075
- Koning FA, Jansen CA, Dekker J, Kaslow RA, Dukers N, van Baarle D, Prins M & Schuitemaker H (2004) Correlates of resistance to HIV-1 infection in homosexual men with high-risk sexual behaviour. *AIDS* **18**: 1117-1126
- Kozak SL, Heard JM & Kabat D (2002) Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *J Virol* **76**: 1802-15
- Kucik DF, Dustin ML, Miller JM & Brown EJ (1996) Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **97**: 2139-2144
- Kuhmann SE, Platt EJ, Kozak SL & Kabat D (2000) Cooperation of Multiple CCR5 Coreceptors Is Required for Infections by Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* **74**: 7005-7015
- Kusumi A, Sako Y & Yamamoto M (1993) Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.* **65**: 2021-2040
- Kwong PD, Ryu SE, Hendrickson WA, Axel R, Sweet RM, Folena-Wasserman G, Hensley P & Sweet RW (1990) Molecular characteristics of recombinant human CD4 as deduced from polymorphic crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 6423-6427
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J & Hendrickson WA (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**: 648-659

L

- Laguette N, Brégnard C, Benichou S & Basmaciogullari S (2010) Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Molecular Aspects of Medicine* **31**: 418-433

- Lajoie P & Nabi IR (2010) Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. *Int Rev Cell Mol Biol* **282**: 135-163
- Lalezary (2011) CROI (Paper # 46).
- Lama J & Planelles V (2007) Host factors influencing susceptibility to HIV infection and AIDS progression. *Retrovirology* **4**: 52
- Lapham CK, Ouyang J, Chandrasekhar B, Nguyen NY, Dimitrov DS & Golding H (1996) Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* **274**: 602-605
- Lapham CK, Zaitseva MB, Lee S, Romanstseva T & Golding H (1999) Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5. *Nat. Med.* **5**: 303-308
- Layne SP, Merges MJ, Dembo M, Spouge JL & Nara PL (1990) HIV requires multiple gp120 molecules for CD4-mediated infection. *Nature* **346**: 277-279
- Lee AG (2011) Lipid-protein interactions. *Biochem. Soc. Trans.* **39**: 761-766
- Lee B, Sharron M, Blanpain C, Doranz BJ, Vakili J, Setoh P, Berg E, Liu G, Guy HR, Durell SR, Parmentier M, Chang CN, Price K, Tsang M & Doms RW (1999) Epitope mapping of CCR5 reveals multiple conformational states and distinct but overlapping structures involved in chemokine and coreceptor function. *J. Biol. Chem.* **274**: 9617-9626
- Lee GM, Ishihara A & Jacobson KA (1991) Direct observation of brownian motion of lipids in a membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 6274 -6278
- Lehner T, Wang Y, Whittall T & Seidl T (2011) Innate immunity and HIV-1 infection. *Adv. Dent. Res* **23**: 19-22
- Lemay J, Marullo S, Jockers R, Alizon M & Brelot A (2005) On the dimerization of CCR5. *Nat. Immunol.* **6**: 535; author reply 535-536
- Leterrier F & Gary-Bobo C (1989) Biologie membranaire - structure et dynamique des membranes biologiques Hermann
- Lever AML & Jeang K-T (2011) Insights into Cellular Factors That Regulate HIV-1 Replication in Human Cells. *Biochemistry* **50**: 920-931
- Levy JA (2009) HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS* **23**: 147-160
- Levy JA (2011) Virus-host interactions in HIV pathogenesis: directions for therapy. *Adv. Dent. Res* **23**: 13-18
- Lewin SR & Rouzioux C (2011) HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials? *AIDS* **25**: 885-897
- Li M, Liu L, Xi N, Wang Y, Dong Z, Tabata O, Xiao X & Zhang W (2011) Imaging and measuring the rituximab-induced changes of mechanical properties in B-lymphoma cells using atomic force microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **404**: 689-694
- Li S, Satoh T, Korngold R & Huang Z (1998) CD4 dimerization and oligomerization: implications for T-cell function and structure-based drug design. *Immunol. Today* **19**: 455-462
- Liao Z, Cimasky LM, Hampton R, Nguyen DH & Hildreth JE (2001) Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **17**: 1009-1019
- Lin Y-P, Cheng Y-J, Huang J-Y, Lin H-C & Yang B-C (2010) Zap70 controls the interaction of talin with integrin to regulate the chemotactic directionality of T-cell migration. *Molecular Immunology* **47**: 2022-2029
- Lingwood CA & Branch DR (2011) The role of glycosphingolipids in HIV/AIDS. *Discov Med* **11**: 303-313

- Liu J, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G & Subramaniam S (2008) Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* **455**: 109-113
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA & Landau NR (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**: 367-377
- Lohse MJ (2010) Dimerization in GPCR mobility and signaling. *Curr Opin Pharmacol* **10**: 53-58
- Low-Nam ST, Lidke KA, Cutler PJ, Roovers RC, van Bergen en Henegouwen PMP, Wilson BS & Lidke DS (2011) ErbB1 dimerization is promoted by domain co-confinement and stabilized by ligand binding. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 1244-1249
- Lynch GW, Sloane AJ, Raso V, Lai A & Cunningham AL (1999) Direct evidence for native CD4 oligomers in lymphoid and monocytoid cells. *Eur. J. Immunol.* **29**: 2590-2602

M

- Magde D, Elson E & Webb WW (1972) Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **29**: 705-708
- Maghazachi AA & Al-Aoukaty A (1998) Chemokines activate natural killer cells through heterotrimeric G-proteins: implications for the treatment of AIDS and cancer. *FASEB J.* **12**: 913-924
- Mahler B, Spinicelli P, Buil S, Quelin X, Hermier J-P & Dubertret B (2008) Towards non-blinking colloidal quantum dots. *Nat Mater* **7**: 659-664
- Manes S (2000) Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Reports* **1**: 190-196
- Marguet D, Lenne PF, Rigneault H & He HT (2006) Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *Embo J* **25**: 3446-57
- Marsh D (2008) Protein modulation of lipids, and vice-versa, in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**: 1545-1575
- Marsh M & Pelchen-Matthews A (1996) Endocytic and exocytic regulation of CD4 expression and function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **205**: 107-135
- Martin G, Burke B, Thai R, Dey AK, Combes O, Heyd B, Geonnotti AR, Montefiori DC, Kan E, Lian Y, Sun Y, Abache T, Ulmer JB, Madaoui H, Guérois R, Barnett SW, Srivastava IK, Kessler P & Martin L (2011) Stabilization of HIV-1 envelope in the CD4-bound conformation through specific cross-linking of a CD4 mimetic. *J. Biol. Chem* **286**: 21706-21716
- Matalon S, Rasmussen TA & Dinarello CA (2011) Histone deacetylase inhibitors for purging HIV-1 from the latent reservoir. *Mol. Med* **17**: 466-472
- Mañes S, Mira E, Gómez-Moutón C, Lacalle RA, Keller P, Labrador JP & Martínez-A C (1999) Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *EMBO J.* **18**: 6211-6220
- Meilhac N, Le Guyader L, Salome L & Destainville N (2006) Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **73**: 011915
- Melikyan GB & Chernomordik LV (1997) Membrane rearrangements in fusion mediated by viral proteins. *Trends Microbiol.* **5**: 349-355
- Melikyan GB, Markosyan RM, Hemmati H, Delmedico MK, Lambert DM & Cohen FS (2000) Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J. Cell Biol.* **151**: 413-423

- Melkonian KA, Ostermeyer AG, Chen JZ, Roth MG & Brown DA (1999) Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J. Biol. Chem.* **274**: 3910-3917
- Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, Schultz KA, Dayhoff DE, Wang CE & Sheppard HW (1997) The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* **3**: 1160-1162
- Michalet X (2010) Mean Square Displacement Analysis of Single-Particle Trajectories with Localization Error: Brownian Motion in Isotropic Medium. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **82**: 041914-041914
- Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS & Weiss S (2005) Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **307**: 538-44
- Miyauchi K, Kozlov MM & Melikyan GB (2009) Early Steps of HIV-1 Fusion Define the Sensitivity to Inhibitory Peptides That Block 6-Helix Bundle Formation. *PLoS Pathog* **5**: e1000585
- Mizukami T, Fuerst TR, Berger EA & Moss B (1988) Binding region for human immunodeficiency virus (HIV) and epitopes for HIV-blocking monoclonal antibodies of the CD4 molecule defined by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 9273-9277
- Moldovan M-C, Sabbagh L, Breton G, Sékaly R-P & Krummel MF (2006) Triggering of T cell activation via CD4 dimers. *J. Immunol.* **176**: 5438-5445
- Moldovan M-C, Yachou A, Lévesque K, Wu H, Hendrickson WA, Cohen EA & Sékaly R-P (2002) CD4 dimers constitute the functional component required for T cell activation. *J. Immunol.* **169**: 6261-6268
- Montagnier L (1999) Human immunodeficiency viruses. Dans *Encyclopedia of immunology* Academic Press
- Montagnier L (2010) 25 years after HIV discovery: prospects for cure and vaccine. *Virology* **397**: 248-254
- Mouritsen OG & Bloom M (1984) Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophys. J.* **46**: 141-153
- Mueller A & Strange PG (2004) The chemokine receptor, CCR5. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**: 35-38
- Mueller A, Kelly E & Strange PG (2002) Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5. *Blood* **99**: 785-791
- Mueller V, Ringemann C, Honigmann A, Schwarzmann G, Medda R, Leutenegger M, Polyakova S, Belov VN, Hell SW & Eggeling C (2011) STED Nanoscopy Reveals Molecular Details of Cholesterol- and Cytoskeleton-Modulated Lipid Interactions in Living Cells. *Biophys. J.* **101**: 1651-1660
- Mulampaka SN & Dixit NM (2011) Estimating the threshold surface density of Gp120-CCR5 complexes necessary for HIV-1 envelope-mediated cell-cell fusion. *PLoS ONE* **6**: e19941
- Muniz-Medina VM, Jones S, Maglich JM, Galardi C, Hollingsworth RE, Kazmierski WM, Ferris RG, Edelstein MP, Chiswell KE & Kenakin TP (2009) The Relative Activity of « Function Sparing » HIV-1 Entry Inhibitors on Viral Entry and CCR5 Internalization: Is Allosteric Functional Selectivity a Valuable Therapeutic Property? *Molecular Pharmacology* **75**: 490 -501
- Murcia MJ, Minner DE, Mustata G-M, Ritchie K & Naumann CA (2008) Design of Quantum Dot-Conjugated Lipids for Long-Term, High-Speed Tracking Experiments on Cell Surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **130**: 15054-15062

Murray JM, Kelleher AD & Cooper DA (2011) Timing of the Components of the HIV Life Cycle in Productively Infected CD4+ T Cells in Populations of HIV Infected Individuals. *J. Virol.* **85**: 10798-805

N

Napier C, Sale H, Mosley M, Rickett G, Dorr P, Mansfield R & Holbrook M (2005) Molecular cloning and radioligand binding characterization of the chemokine receptor CCR5 from rhesus macaque and human. *Biochemical Pharmacology* **71**: 163-172

Nguyen DH, Giri B, Collins G & Taub DD (2005) Dynamic reorganization of chemokine receptors, cholesterol, lipid rafts, and adhesion molecules to sites of CD4 engagement. *Exp. Cell Res.* **304**: 559-569

Nikolic DS, Lehmann M, Felts R, Garcia E, Blanchet FP, Subramaniam S & Piguet V (2011) HIV-1 activates Cdc42 and induces membrane extensions in immature dendritic cells to facilitate cell-to-cell virus propagation. *Blood* **118**: 4841-52

O

Oh D-Y, Jessen H, Kücherer C, Neumann K, Oh N, Poggensee G, Bartmeyer B, Jessen A, Pruss A, Schumann RR & Hamouda O (2008) CCR5Delta32 genotypes in a German HIV-1 seroconverter cohort and report of HIV-1 infection in a CCR5Delta32 homozygous individual. *PLoS ONE* **3**: e2747

Oppermann M, Mack M, Proudfoot AE & Olbrich H (1999) Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* **274**: 8875-8885

P

Pal R, Nair BC, Hoke GM, Sarngadharan MG & Edidin M (1991) Lateral diffusion of CD4 on the surface of a human neoplastic T-cell line probed with a fluorescent derivative of the envelope glycoprotein (gp120) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *J. Cell. Physiol.* **147**: 326-332

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Trong IL, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M & Miyano M (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **289**: 739-745

Paterlini G (2002) Structure Modeling of the Chemokine Receptor CCR5: Implications for Ligand Binding and Selectivity. *Biophysical Journal* **83**: 3012-3031

Patrick Y (2006) Update on HAART in HIV. *Journal of Hepatology* **44**, Supplement 1: S100-S103

Percherancier Y, Lagane B, Planchenault T, Staropoli I, Altmeyer R, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Hoessli DC & Bachelier F (2003) HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains. *J Biol Chem* **278**: 3153-61

Peters IM, van Kooyk Y, van Vliet SJ, de Grooth BG, Figdor CG & Greve J (1999) 3D single-particle tracking and optical trap measurements on adhesion proteins. *Cytometry* **36**: 189-194

- Pettersen FO, Torheim EA, Dahm AEA, Aaberge IS, Lind A, Holm M, Aandahl EM, Sandset PM, Taskén K & Kvale D (2011) An exploratory trial of cyclooxygenase type 2 inhibitor in HIV-1 infection: downregulated immune activation and improved T cell-dependent vaccine responses. *J. Virol* **85**: 6557-6566
- Pierson TC & Doms RW (2003) HIV-1 entry and its inhibition. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **281**: 1-27
- Pike LJ (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* **47**: 1597-1598
- Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, Damond F, Robertson DL & Simon F (2009) A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* **15**: 871-872
- Platt EJ, Durnin JP & Kabat D (2005) Kinetic factors control efficiencies of cell entry, efficacies of entry inhibitors, and mechanisms of adaptation of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **79**: 4347-4356
- Platt EJ, Wehrly K, Kuhmann SE, Chesebro B & Kabat D (1998) Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**: 2855-64
- Pomorski T, Hrafnisdóttir S, Devaux PF & van Meer G (2001) Lipid distribution and transport across cellular membranes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**: 139-148
- Pontow SE, Heyden NV, Wei S & Ratner L (2004) Actin cytoskeletal reorganizations and coreceptor-mediated activation of rac during human immunodeficiency virus-induced cell fusion. *J. Virol.* **78**: 7138-7147
- Popik W & Alce TM (2004) CD4 receptor localized to non-raft membrane microdomains supports HIV-1 entry. Identification of a novel raft localization marker in CD4. *J. Biol. Chem.* **279**: 704-712
- Popik W, Alce TM & Au WC (2002) Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol* **76**: 4709-22
- Poveda E, Briz V, Quiñones-Mateu M & Soriano V (2006) HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors. *AIDS* **20**: 1359-1367
- Preston BD, Poiesz BJ & Loeb LA (1988) Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**: 1168-1171
- Purcell DF & Martin MA (1993) Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* **67**: 6365-6378

Q

- Qian H, Sheetz MP & Elson EL (1991) Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys J* **60**: 910-921

R

- Rambaut A, Posada D, Crandall KA & Holmes EC (2004) The causes and consequences of HIV evolution. *Nat. Rev. Genet.* **5**: 52-61
- Ramkumar S, Sakac D, Binnington B, Branch DR & Lingwood CA (2009) Induction of HIV-1 resistance: cell susceptibility to infection is an inverse function of globotriaosyl ceramide levels. *Glycobiology* **19**: 76-82

- Rana S, Besson G, Cook DG, Rucker J, Smyth RJ, Yi Y, Turner JD, Guo HH, Du JG, Peiper SC, Lavi E, Samson M, Libert F, Liesnard C, Vassart G, Doms RW, Parmentier M & Collman RG (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. *J. Virol.* **71**: 3219-3227
- Raposo RAS, Thomas B, Ridlova G & James W (2011) Proteomic-based identification of CD4-interacting proteins in human primary macrophages. *PLoS ONE* **6**: e18690
- Rasmussen SGF, Choi H-J, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VRP, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GFX, Weis WI & Kobilka BK (2007) Crystal structure of the human [bgr]2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**: 383-387
- Rawat SS, Eaton J, Gallo SA, Martin TD, Ablan S, Ratnayake S, Viard M, KewalRamani VN, Wang JM, Blumenthal R & Puri A (2004) Functional expression of CD4, CXCR4, and CCR5 in glycosphingolipid-deficient mouse melanoma GM95 cells and susceptibility to HIV-1 envelope glycoprotein-triggered membrane fusion. *Virology* **318**: 55-65
- Rawat SS, Zimmerman C, Johnson BT, Cho E, Lockett SJ, Blumenthal R & Puri A (2008) Restricted lateral mobility of plasma membrane CD4 impairs HIV-1 envelope glycoprotein mediated fusion. *Mol. Membr. Biol.* **25**: 83-94
- Del Real G, Jimenez-Baranda S, Lacalle RA, Mira E, Lucas P, Gomez-Mouton C, Carrera AC, Martinez AC & Manes S (2002) Blocking of HIV-1 infection by targeting CD4 to nonraft membrane domains. *J Exp Med* **196**: 293-301
- Reits EA & Neefjes JJ (2001) From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat. Cell Biol.* **3**: E145-147
- Rizzuto CD, Wyatt R, Hernández-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA & Sodroski J (1998) A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**: 1949-1953
- Roberts JD, Bebenek K & Kunkel TA (1988) The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**: 1171-1173
- Robey WG, Safai B, Oroszlan S, Arthur LO, Gonda MA, Gallo RC & Fischinger PJ (1985) Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Science* **228**: 593-595
- Rodríguez-Frade JM, del Real G, Serrano A, Hernanz-Falcón P, Soriano SF, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Lucas P, Prieto I, Martínez-A C & Mellado M (2004) Blocking HIV-1 infection via CCR5 and CXCR4 receptors by acting in trans on the CCR2 chemokine receptor. *EMBO J.* **23**: 66-76
- Ryu SE, Kwong PD, Truneh A, Porter TG, Arthos J, Rosenberg M, Dai XP, Xuong NH, Axel R & Sweet RW (1990) Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature* **348**: 419-426

S

- Sakihama T, Smolyar A & Reinherz EL (1995) Oligomerization of CD4 is required for stable binding to class II major histocompatibility complex proteins but not for interaction with human immunodeficiency virus gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 6444-6448

- Sako Y & Kusumi A (1994) Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *J. Cell Biol.* **125**: 1251-1264
- Sako Y & Kusumi A (1995) Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: fence versus tether. *J. Cell Biol.* **129**: 1559-1574
- Salome L, Cazeils JL, Lopez A & Tocanne JF (1998) Characterization of membrane domains by FRAP experiments at variable observation areas. *Eur Biophys J* **27**: 391-402
- Samson M, LaRosa G, Libert F, Paindavoine P, Detheux M, Vassart G & Parmentier M (1997) The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *J. Biol. Chem.* **272**: 24934-24941
- Sattentau Q (2008) Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat. Rev. Microbiol* **6**: 815-826
- Sattentau QJ & Moore JP (1993) The role of CD4 in HIV binding and entry. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **342**: 59-66
- Sattentau QJ & Weiss RA (1988) The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* **52**: 631-633
- Saulière A (2007) Etapes membranaires de la transduction du signal par les récepteurs couplés aux protéines G α : organisation dynamique du récepteur mu aux opioïdes humain à la surface de neuroblastomes.
- Saulière A, Gaibelet G, Millot C, Mazères S, Lopez A & Salomé L (2006) Diffusion of the mu opioid receptor at the surface of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is restricted to permeable domains. *FEBS Lett.* **580**: 5227-5231
- Sawada S, Scarborough JD, Killeen N & Littman DR (1994) A lineage-specific transcriptional silencer regulates CD4 gene expression during T lymphocyte development. *Cell* **77**: 917-929
- Saxton MJ (1993) Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion. *Biophys. J.* **64**: 1766-1780
- Saxton MJ & Jacobson K (1997) SINGLE-PARTICLE TRACKING: Applications to Membrane Dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**: 373-399
- Schmidt CE, Horwitz AF, Lauffenburger DA & Sheetz MP (1993) Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated. *J. Cell Biol.* **123**: 977-991
- Schmidt T, Schütz GJ, Baumgartner W, Gruber HJ & Schindler H (1996) Imaging of single molecule diffusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 2926-2929
- Schutze S, Tchikov V & Schneider-Brachert W (2008) Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 655-662
- Sekaly R-P & Rooke R (1998) CD4. Dans *Encyclopedia of immunology* Academic Press
- Serge A, Fourgeaud L, Hemar A & Choquet D (2003) Active surface transport of metabotropic glutamate receptors through binding to microtubules and actin flow. *J. Cell. Sci.* **116**: 5015-5022
- Sergé A, Bertaux N, Rigneault H & Marguet D (2008) Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nat. Methods* **5**: 687-694
- Shahlaei M, Madadkar-Sobhani A, Mahnam K, Fassihi A, Saghale L & Mansourian M (2011) Homology modeling of human CCR5 and analysis of its binding properties through molecular docking and molecular dynamics simulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1808**: 802-817
- Shechter E & Rossignol B (2004) Biochimie et Biophysique des membranes - aspects structuraux et fonctionnels 2^e éd. Dunod

- Sheppard HW, Celum C, Michael NL, O'Brien S, Dean M, Carrington M, Dondero D & Buchbinder SP (2002) HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta32/Delta32 genotype: acquisition of syncytium-inducing virus at seroconversion. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **29**: 307-313
- Shi W, Bohon J, Han DP, Habte H, Qin Y, Cho MW & Chance MR (2010) Structural Characterization of HIV gp41 with the Membrane-proximal External Region. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 24290 -24298
- Siegfried N, van der Merwe L, Brocklehurst P & Sint TT (2011) Antiretrovirals for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection. *Cochrane Database Syst Rev*: CD003510
- Siliciano JD & Siliciano RF (2000) Latency and viral persistence in HIV-1 infection. *J. Clin. Invest.* **106**: 823-825
- Simons K & Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-72
- Simons K & Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-9
- Simson R, Sheets ED & Jacobson K (1995) Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophys. J.* **69**: 989-993
- Singer I, Scott S, Kawka DW, Chin J, Daugherty BL, DeMartino JA, DiSalvo J, Gould SL, Lineberger JE, Malkowitz L, Miller MD, Mitnaul L, Siciliano SJ, Staruch MJ, Williams HR, Zweerink HJ & Springer MS (2001) CCR5, CXCR4, and CD4 are clustered and closely apposed on microvilli of human macrophages and T cells. *J Virol* **75**: 3779-90
- Singer SJ & Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731
- Siu G, Wurster AL, Duncan DD, Soliman TM & Hedrick SM (1994) A transcriptional silencer controls the developmental expression of the CD4 gene. *EMBO J.* **13**: 3570-3579
- Skrabanek L, Murcia M, Bouvier M, Devi L, George SR, Lohse MJ, Milligan G, Neubig R, Palczewski K, Parmentier M, Pin J-P, Vriend G, Javitch JA, Campagne F & Filizola M (2007) Requirements and ontology for a G protein-coupled receptor oligomerization knowledge base. *BMC Bioinformatics* **8**: 177
- Smith MW, Carrington M, Winkler C, Lomb D, Dean M, Huttley G & O'Brien SJ (1997) CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. *Nat. Med.* **3**: 1052-1053
- Sodroski J, Patarca R, Perkins D, Briggs D, Lee TH, Essex M, Coligan J, Wong-Staal F, Gallo RC & Haseltine WA (1984) Sequence of the envelope glycoprotein gene of type II human T lymphotropic virus. *Science* **225**: 421-424
- Song KS, Sargiacomo M, Galbiati F, Parenti M & Lisanti MP (1997) Targeting of a G alpha subunit (Gi1 alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **43**: 293-303
- Sougrat R, Bartesaghi A, Lifson JD, Bennett AE, Bess JW, Zabransky DJ & Subramaniam S (2007) Electron tomography of the contact between T cells and SIV/HIV-1: implications for viral entry. *PLoS Pathog.* **3**: e63
- Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo MA, Chauveau A, Kohler K, Oddos S, Eissmann P, Brodsky FM, Hopkins C, Onfelt B, Sattentau Q & Davis DM (2008) Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* **10**: 211-219
- Specht CG, Grünwald N, Pascual O, Rostgaard N, Schwarz G & Triller A (2011) Regulation of glycine receptor diffusion properties and gephyrin interactions by protein kinase C. *EMBO J* **30**: 3842-53

- Speck RF, Wehrly K, Platt EJ, Atchison RE, Charo IF, Kabat D, Chesebro B & Goldsmith MA (1997) Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J. Virol.* **71**: 7136-7139
- Staudinger R, Phogat SK, Xiao X, Wang X, Dimitrov DS & Zolla-Pazner S (2003) Evidence for CD4-enhanced signaling through the chemokine receptor CCR5. *J Biol Chem* **278**: 10389-92
- Steffens CM & Hope TJ (2003) Localization of CD4 and CCR5 in living cells. *J Virol* **77**: 4985-91
- Steffens CM & Hope TJ (2004) Mobility of the human immunodeficiency virus (HIV) receptor CD4 and coreceptor CCR5 in living cells: implications for HIV fusion and entry events. *J Virol* **78**: 9573-8
- Stoddart CA, Keir ME & McCune JM (2010) IFN-alpha-induced upregulation of CCR5 leads to expanded HIV tropism in vivo. *PLoS Pathog* **6**: e1000766
- Strebel K (2003) Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *AIDS* **17 Suppl 4**: S25-34
- Strebel K (2007) HIV Accessory Genes Vif and Vpu. Dans *HIV-1: Molecular Biology and Pathogenesis Viral Mechanisms, Second Edition*. Academic Press **55**: 199-232
- Suzuki K, Ritchie K, Kajikawa E, Fujiwara T & Kusumi A (2005) Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques. *Biophys J* **88**: 3659-80
- Sáez-Cirión A, Pancino G, Sinet M, Venet A & Lambotte O (2007) HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends Immunol.* **28**: 532-540

T

- Taatjes DJ, Chen TH, Ackerström B, Björck L, Carlemalm E & Roth J (1987) Streptococcal protein G-gold complex: comparison with staphylococcal protein A-gold complex for spot blotting and immunolabeling. *Eur. J. Cell Biol.* **45**: 151-159
- Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H & Mitaku S (2002) Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett.* **520**: 97-101
- Tenorio AR (2011) The monoclonal CCR5 antibody PRO-140: the promise of once-weekly HIV therapy. *Curr HIV/AIDS Rep* **8**: 1-3
- Terrillon S & Bouvier M (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* **5**: 30-34
- Tilton JC & Doms RW (2010) Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Research* **85**: 91-100
- Tourvieille B, Gorman SD, Field EH, Hunkapiller T & Parnes JR (1986) Isolation and sequence of L3T4 complementary DNA clones: expression in T cells and brain. *Science* **234**: 610-614
- Tremblay M (1998) The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunology Today* **19**: 346-351
- Triller A & Choquet D (2008) New Concepts in Synaptic Biology Derived from Single-Molecule Imaging. *Neuron* **59**: 359-374
- Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ & Moore JP (1996a) CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* **384**: 184-187
- Tsibris AMN & Kuritzkes DR (2007) Chemokine Antagonists as Therapeutics: Focus on HIV-1. *Annual Review of Medicine* **58**: 445-459

Turner L, Ward SG & Westwick J (1995) RANTES-activated human T lymphocytes. A role for phosphoinositide 3-kinase. *J. Immunol.* **155**: 2437-2444

U

Ugolini S, Mondor I & Sattentau QJ (1999) HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol.* **7**: 144-149

V

Valentine CD & Haggie PM (2011) Confinement of β 1- and β 2-adrenergic receptors in the plasma membrane of cardiomyocyte-like H9c2 cells is mediated by selective interactions with PDZ domain and A-kinase anchoring proteins but not caveolae. *Mol. Biol. Cell* **22**: 2970-2982

Vanags DM, Pörn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH & Orrenius S (1996) Protease Involvement in Fodrin Cleavage and Phosphatidylserine Exposure in Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 31075 -31085

Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE & Gaitanaris GA (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 4903-4908

Veronese FD, DeVico AL, Copeland TD, Oroszlan S, Gallo RC & Sarngadharan MG (1985) Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* **229**: 1402-1405

Viard M, Parolini I, Sargiacomo M, Fecchi K, Ramoni C, Ablan S, Ruscetti FW, Wang JM & Blumenthal R (2002) Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells. *J Virol* **76**: 11584-95

Vilardaga J-P, Agnati LF, Fuxe K & Ciruela F (2010) G-protein-coupled receptor heteromer dynamics. *Journal of Cell Science* **123**: 4215 -4220

Viola A & Gupta N (2007) Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nat Rev Immunol* **7**: 889-896

W

Waite JH & Tanzer ML (1981) Polyphenolic Substance of *Mytilus edulis*: Novel Adhesive Containing L-Dopa and Hydroxyproline. *Science* **212**: 1038-1040

Wang JH, Yan YW, Garrett TP, Liu JH, Rodgers DW, Garlick RL, Tarr GE, Husain Y, Reinherz EL & Harrison SC (1990) Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature* **348**: 411-418

Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AGW, Tate CG & Schertler GFX (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**: 486-491

Wawrezynieck L, Rigneault H, Marguet D & Lenne P-F (2005) Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophys. J.* **89**: 4029-4042

Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ & Wiley DC (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**: 426-430

- Weissman D, Rabin RL, Arthos J, Rubbert A, Dybul M, Swofford R, Venkatesan S, Farber JM & Fauci AS (1997) Macrophage-tropic HIV and SIV envelope proteins induce a signal through the CCR5 chemokine receptor. *Nature* **389**: 981-5
- Westby M, Smith-Burchnell C, Mori J, Lewis M, Mosley M, Stockdale M, Dorr P, Ciaramella G & Perros M (2007) Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor-bound receptor for entry. *J. Virol.* **81**: 2359-2371
- Wilen CB, Wang J, Tilton JC, Miller JC, Kim KA, Rebar EJ, Sherrill-Mix SA, Patro SC, Secreto AJ, Jordan APO, Lee G, Kahn J, Aye PP, Bunnell BA, Lackner AA, Hoxie JA, Danet-Desnoyers GA, Bushman FD, Riley JL, Gregory PD, *et al.* (2011) Engineering HIV-resistant human CD4+ T cells with CXCR4-specific zinc-finger nucleases. *PLoS Pathog* **7**: e1002020
- Wu B, Chien EYT, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V & Stevens RC (2010) Structures of the CXCR4 Chemokine GPCR with Small-Molecule and Cyclic Peptide Antagonists. *Science* **330**: 1066 -1071
- Wu H, Kwong PD & Hendrickson WA (1997) Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* **387**: 527-530
- Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C & Sodroski J (1996c) CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**: 179-183
- Wu Y & Yoder A (2009) Chemokine coreceptor signaling in HIV-1 infection and pathogenesis. *PLoS Pathog.* **5**: e1000520
- Wyatt R & Sodroski J (1998) The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens. *Science* **280**: 1884 -1888

X

- Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C & Seed B (1998) Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* **8**: 723-732
- Xiao X, Wu L, Stantchev TS, Feng Y-R, Ugolini S, Chen H, Shen Z, Riley JL, Broder CC, Sattentau QJ & Dimitrov DS (1999) Constitutive cell surface association between CD4 and CCR5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 7496 -7501

Y

- Yang X, Farzan M, Wyatt R & Sodroski J (2000) Characterization of stable, soluble trimers containing complete ectodomains of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* **74**: 5716-5725
- Yang X, Kurteva S, Lee S & Sodroski J (2005) Stoichiometry of antibody neutralization of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **79**: 3500-3508
- Yang X, Kurteva S, Ren X, Lee S & Sodroski J (2006) Subunit stoichiometry of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers during virus entry into host cells. *J Virol* **80**: 4388-95
- Yi L, Fang J, Isik N, Chim J & Jin T (2006) HIV gp120-induced interaction between CD4 and CCR5 requires cholesterol-rich microenvironments revealed by live cell fluorescence resonance energy transfer imaging. *J. Biol. Chem.* **281**: 35446-35453

Yokoyama WM & Plougastel BFM (2003) Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 304-316

Z

Zagury D, Bernard J, Leibowitch J, Safai B, Groopman JE, Feldman M, Sarngadharan MG & Gallo RC (1984) HTLV-III in cells cultured from semen of two patients with AIDS. *Science* **226**: 449-451

Zaitseva M, Peden K & Golding H (2003) HIV coreceptors: role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**: 51-61

Zhang J, Fu Y, Li G, Zhao RY & Lakowicz JR (2011) Direct observation of chemokine receptors 5 on T-lymphocyte cell surfaces using fluorescent metal nanoprobe 2: Approximation of CCR5 populations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **407**: 63-67

Zhang W, Tribble RP & Samelson LE (1998) LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* **9**: 239-246

Zhou X, Perez F, Han K & Jurivich DA (2006) Clonal senescence alters endothelial ICAM-1 function. *Mechanisms of Ageing and Development* **127**: 779-785

Zhu P, Liu J, Bess J Jr, Chertova E, Lifson JD, Grisé H, Ofek GA, Taylor KA & Roux KH (2006) Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **441**: 847-852

Zlotnik A & Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**: 121-127

Zolla-Pazner S & Cardozo T (2010) Structure-function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nat Rev Immunol* **10**: 527-535

Zwick MB & Burton DR (2007) HIV-1 Neutralization: Mechanisms and Relevance to Vaccine Design. *Current HIV Research* **5**: 608-624

ANNEXE : Matériels et Méthodes

SOMMAIRE

1. Tampons et milieux de culture utilisés	212
2. Matériels	212
2.1. Particules	212
2.2. Anticorps	213
2.3. Autres molécules	213
2.4. Lignées cellulaires	214
3. Manipulation des cellules	214
3.1. Culture cellulaire	214
3.2. Congélation / décongélation	215
3.3. Test d'immobilisation sur lamelle de verre et évaluation de la survie cellulaire	215
4. Observation de QD immobilisés	216
4.1. Choix des paramètres d'entrée pour le programme MTT	217
4.2. Calcul de la concentration en biotine libre saturante des QD recouverts de streptavidine	217
5. Bicouches lipidiques supportées (complément)	218
6. Cytométrie en flux	219
6.1. Taux d'expression des récepteurs	220
6.2. Détermination de la constante d'affinité des anticorps	220
6.3. Test de compétition anticorps / CD4s	220
6.4. Test de liaison de l'anticorps T21/8 en présence de maraviroc	221
7. SPT avec des complexes QD-anticorps	221
7.1. Protocole de marquage	221
7.2. Ajout des ligands	222
8. Analyse des données de SPT	223
8.1. Programme MTT	223
8.2. Procédure d'analyse des trajectoires (avec le programme appelé AnalyzSPT)	223

1. Tampons et milieux de culture utilisés

- Tampon **DPBS** (réf. 14190, Gibco, Life Technologies) : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 2,16 g/l, NaCl à 8 g/l, KH_2PO_4 à 200 mg/l, KCl à 200 mg/l, pH 7-7,2.
- Tampon **DPBS+** (réf. 14040, Gibco, Life Technologies) : tampon DPBS additionné de Ca^{2+} (CaCl_2 anhydre à 100 mg/l) et de Mg^{2+} ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 100 mg/l).
- Tampon **DPBS/BSA** : tampon DPBS, BSA à 1% w/v (réf. A0281, Sigma-Aldrich).
- Tampon **DPBS+/BSA/D-gluc** : tampon DPBS+/BSA, D-glucose à 2 g/l (réf. 49140, Fluka).
- Milieu **DMEM** : DMEM-Glutamax High Glucose (réf. 31966, Gibco, Life Technologies.), SVF à 10 % v/v (volume/volume) (Gibco Life Technologies) décomplémenté (chauffé à 56°C pendant 1 h), Pénicilline G (50 U/ml) / Streptomycine (0,05 mg/ml) (réf. 3932, Gibco, Life Technologies).
-
- Milieu **DMEM-G418** : milieu DMEM, G418 (généticine) à 0,5 mg/ml (réf. 10131, Gibco, Life Technologies).
- Milieu **DMEM-G418-Hygro** : milieu DMEM-G418, hygromycine B à 0,5 mg/ml (réf. 10687, Gibco, Life Technologies).
- Milieu **RPMI** : RPMI 1640 sans L-Glutamine (réf. 21870, Gibco, Life Technologies), SVF à 10 % v/v (Lonza) décomplémenté, L-glutamine à 2 mM (réf. 25030, Gibco, Life Technologies) ajoutée toutes les deux semaines du fait de sa dégradation rapide.

2. Matériels

2.1. Particules

Les Quantum Dots (QD) recouverts de streptavidine et émettant un signal fluorescence maximal à 655 nm (réf. Q10121MP, Molecular Probes, Life Technologies) ont été utilisés pour la mise au point du montage de vidéomicroscopie (chapitre II), pour l'étude sur membrane modèle (chapitre III – publication n°1) et sur cellules (chapitre IV et V). Des

QD-655 recouverts de fragments F(ab)₂ d'anticorps anti-IgG (H+L) de souris ont aussi été testés dans ce projet (réf. Q11022MP, Molecular Probes, Life Technologies). Les colloïdes d'or de 40 nm de diamètre (réf. EMGC40, British Biocell International) et les billes de latex (Fluosphères) recouvertes de neutravidine, de 40 nm de diamètre (réf. F-8770, Molecular Probes, Life Technologies) ou de 200 nm de diamètre (réf. F-8774, Molecular Probes, Life Technologies), ont servi dans l'étude sur membrane modèle (voir publication n°1).

2.2. Anticorps

Les différents anticorps monoclonaux (primaires) utilisés dans ce projet (chapitres II, IV et V) proviennent tous de la souris. Les différents clones d'anticorps anti-CD4 humain sont : l'OKT4, non fonctionnalisé (réf. 317402, BioLegend) ou biotinylé (réf. 317406, BioLegend), et le RPA-T4 (réf. 555345, BioLegend). Parmi les anticorps anti-CCR5 humain, nous avons utilisé les clones : 2D7 non fonctionnalisé (réf. 555990, BD Biosciences), T21/8 biotinylé (réf. 321404, BioLegend) et 45549 biotinylé (réf. FAB183B, R&D System). L'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG (H+L) de souris, couplé à l'Alexa647 (réf. A21244, Molecular Probes, Life Technologies), a été utilisé lors des expériences de cytométrie en flux. L'anticorps anti-FITC FIT-22 biotinylé (réf. 408304, BioLegend) a permis de lier spécifiquement la carboxy-fluorescéine, dans le cadre des expériences sur membrane modèle (voir publication n°1), mais a aussi servi d'anticorps non-spécifique lors de marquage cellulaire avec les QD (chapitre IV).

Il est important de noter que le calcul des concentrations molaires de ces anticorps a été effectué à partir de l'équation, où le poids moléculaire PM des anticorps a été fixé à la valeur de 170 kDa, correspondant au PM moyen d'un anticorps glycosylé :

$$C_{\text{molaire}} = \frac{C_{\text{massique}}}{PM} \quad \text{Eq. 23}$$

où C_{molaire} est la concentration molaire exprimée en mol/l, C_{massique} la concentration massique (donnée par le fournisseur) en g/l, et PM le poids moléculaire en g/mol (ou Da).

2.3. Autres molécules

Lors des expériences de cytométrie, les anticorps primaires biotinylés ont été marqués avec de la streptavidine couplée à la phycoérythrine (réf. SA-PhycoE, réf. 349023, BD Biosciences). Lors des expériences de SPT, plusieurs molécules ont été utilisées : le CD4 soluble (réf. 3002, Protein Sciences corp.), le maraviroc et la protéine d'enveloppe

virale gp120 (souche Bx08). Ces deux dernières molécules nous ont été données à titre gracieux par le Dr Bernard Lagane (Institut Pasteur, Inserm U819).

2.4. Lignées cellulaires

Les lignées HEK 293T exprimant de manière stable CCR5 (dénommée HEK.CCR5), ou CD4 et CCR5 (dénommée HEK.CD4.CCR5) ont été établies précédemment dans l'équipe par transfection avec des plasmides contenant les séquences des récepteurs et celles de gènes de résistance, permettant une pression de sélection (voir § 3.1) pour le maintien des lignées stables (Baker, 2007). Notons que, pour les deux lignées, les récepteurs CCR5 sont fusionnés avec un peptide T7 en partie N-terminale, et avec la protéine fluorescente eGFP en partie C-terminale. La lignée HEK 293T d'origine (réf. CRL-11268, ATCC) est appelée HEK wt par la suite.

La lignée promyéloblastique HL-60 et la lignée monocyttaire THP-1 proviennent de l'ATCC (réf. CCL-240 et TIB-202, respectivement). La lignée de lymphocytes T humains Jurkat E6-1 (réf. TIB-152, ATCC) est dénommée Jurkat wt, en opposition avec le sigle J.CCR5 désignant une lignée Jurkat transfectée de manière stable avec un vecteur lentiviral pour exprimer le récepteur CCR5 (établie par le Dr Ali Amara, et généreusement donnée par le Dr Françoise Bachelerie, anciennement à l'Institut Pasteur, Inserm U819).

3. Manipulation des cellules

3.1. Culture cellulaire

Les cellules adhérentes (HEK 293T) sont cultivées dans le milieu DMEM, dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre (Nunclon, Nunc) maintenues à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂. La pression de sélection est effectuée par la généticine pour la lignée HEK.CCR5 (milieu DMEM-G418), et par la généticine et l'hygromycine B pour la lignée HEK.CD4.CCR5 (milieu DMEM-G418-Hygro). Les passages sont réalisés tous les deux à trois jours lorsque les cellules sont à confluence. Le décollement des cellules est effectué par aspiration du milieu, rinçage avec du tampon DPBS, puis traitement avec un mélange de trypsine / EDTA à 0,05 % (réf. 15400, Gibco, Life Technologies) pendant 3 min à 37°C. Les cellules sont ensuite reprises dans leur milieu de culture pour être diluées.

Les cellules non adhérentes (HL-60, THP-1, Jurkat wt, J.CCR5) sont cultivées dans le milieu RPMI, dans des flacons (Flask) de 25 cm² (surface du fond, Nunclon, Nunc) maintenues à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂. A chaque passage, les cellules sont diluées après numération avec une cellule de Neubauer à une densité comprise entre

1.10^5 et 2.10^5 cellules/ml. Les passages sont effectués à deux ou trois jours d'intervalle, lorsque la densité cellulaire atteint environ 8.10^5 cellules/ml.

3.2. Congélation / décongélation

Les lignées cellulaires sont conservées à long terme dans des ampoules plongées dans l'azote liquide (-196°C), avec du DMSO comme cryoprotecteur. Seules des cellules pour lesquelles peu de passages ont été effectués sont utilisées pour la congélation, afin de limiter la dérive des lignées cellulaires. Les cellules sont concentrées à une densité d' 1.10^6 cellules/ml par centrifugation (400 g, 5 min) et resuspension dans un volume adéquat de milieu DMEM ou RPMI contenant 10 % de DMSO (réf. D2650, Sigma-Aldrich). Les ampoules sont déposées dans une boîte contenant de l'isopropanol, afin de permettant une congélation progressive (décroissance d'environ $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), et stockées à -80°C sur la nuit. La descente en température de -80°C à -196°C peut se faire plus rapidement, c'est pourquoi les ampoules sont ensuite rangées dans de petites boîtes et directement plongées dans un container rempli d'azote liquide.

La décongélation d'une ampoule est réalisée rapidement en agitant manuellement l'ampoule dans un bain-marie à 37°C . Les cellules sont ensuite centrifugées (400 g, 5 min), de manière à éliminer le milieu contenant le DMSO. Puis elles sont resuspendues dans un volume de milieu RPMI préchauffé à 37°C adéquat (environ 7 ml pour 8.10^5 cellules).

3.3. Test d'immobilisation sur lamelle de verre et évaluation de la survie cellulaire

Le test est réalisé sur les lamelles de verre carrées de 22 mm de côté (ESCO) qui sont utilisées pour les expériences de SPT. Celles-ci sont conservés dans de l'éthanol absolu. Pour leur utilisation, elles sont sorties et laissées quelques minutes sous la hotte de culture à flux laminaire, le temps de laisser l'éthanol s'évaporer. Elles sont ensuite placées au fond des puits d'une plaque 6 puits (BD Falcon). Une goutte de 400 μl de chaque agent d'adhésion cellulaire est alors déposée sur chaque lamelle : fibronectine diluée dans l'eau à 0,01 mg/ml (réf. F2006, Sigma), poly-L-lysine diluée dans l'eau à 0,02 ou 0,1 mg/ml (réf. P8920, Sigma-Aldrich), et Cell-Tak dilué dans un tampon de bicarbonate de sodium (Na_2CO_3 à 0,1 M) à 2, 8 ou 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (réf. 354240, BD Biosciences). Après une durée de 5 ou 15 min, les gouttes sont aspirées à l'aide d'une pipette pasteur, et les lamelles sont rincées deux fois avec 1 ml de tampon DPBS+. Après ajout de 2 ml de milieu RPMI par puits, 4.10^5 cellules sont déposées sur chaque lamelle. Selon les tests, une centrifugation (50 g, 7 min) a été effectuée ou non à cet instant, de manière à plaquer les cellules contre les lamelles. Puis, après une période de

30 min ou 4h, à 37°C dans l'incubateur, le milieu est aspiré, et un rinçage avec 1 ml de tampon DPBS+ est effectué pour éliminer les cellules non fixées aux lamelles. Des images sont prises avec un appareil photo numérique (Nikon) monté sur un microscope inversé (Zeiss) doté d'un objectif x10. L'évaluation de la réussite de l'immobilisation des cellules est réalisée qualitativement, d'après la densité cellulaire et l'homogénéité de répartition.

La viabilité cellulaire a été évaluée lors de ce test pour les différentes conditions de traitement des lamelles, pour les périodes d'incubation sur lamelle de 4 h. A la fin du test d'immobilisation, 500 µl de Bleu Trypan (réf. T-8154, Sigma-Aldrich) dilué à 0,4 % w/v dans du tampon DPBS ont été distribués sur les cellules. Après 10 min, les cellules sont observées sous le même microscope que précédemment. La coloration bleue des cellules est signe de mort cellulaire.

4. Observation de QD immobilisés

L'immobilisation de QD sur des lamelles de verre a permis de multiples tests (ex : calcul de l'erreur de pointé, calcul des limites de résolution du coefficient de diffusion, du rayon des domaines, etc. - voir chapitre II et IV). Pour cela, des lamelles 24 x 36 mm (ESCO) sont nettoyées par ultrasons (Branson) dans de l'éthanol absolu, pendant 5 min, puis par un traitement avec un plasma d'argon et d'oxygène tous deux à 0,05 mbar (pico plasma cleaner, Diener Electronic), pendant 15 min. Les lamelles sont ensuite montées sur une lame porte-objet en utilisant des bandelettes de silicone de 0,5 mm d'épaisseur (réf. FP-M21481, Grace Bio-Labs) (fig. 85. Un espacement en largeur de 4 mm entre les bandelettes conduit à une chambre dont le volume est environ de 100 µl. Une solution de 10 pM de QD préparée avec du tampon DPBS+ est injectée dans ces chambres d'observation, et après une période de 5 min, la chambre est rincée avec un volume équivalent à dix fois celui de la chambre, donc

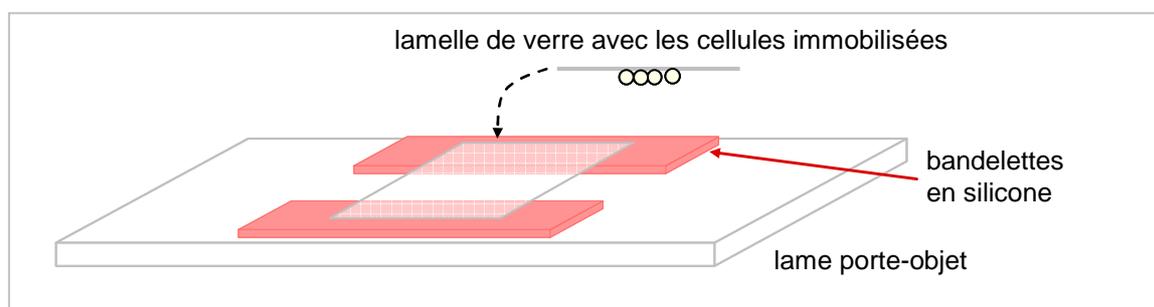


Figure 86. Composition de la chambre d'observation pour les expériences de SPT.

Les bandelettes de silicone sont préalablement déposées sur la lame porte-objet, et une légère pression avec les gants permet d'assurer leur adhésion et de chasser les bulles d'air. Les lamelles 22 x 22 mm où sont immobilisées les cellules sont essuyées avec du papier absorbant sur la face ne possédant pas de cellules, et sur les bords de l'autre face. Le contact du verre avec le silicone est en effet optimal si le verre est sec. Une nouvelle pression permet de chasser les bulles d'air pour ce dernier contact.

environ 1 ml. Les QD immobilisés *via* ce protocole sont individualisés, facilitant leur observation. Les paragraphes 3 et 4 du chapitre II décrivent le montage de vidéomicroscopie qui permet la détection de ces QD, et le cas échéant, le calcul de leur position. Notons que pour limiter la coupure des trajectoires à cause du clignotement et des vibrations du montage de vidéomicroscopie, les valeurs $T_{\text{off}} = -60$ (20 images) et $\text{sig_free} = 0,2$ ont été utilisées pour l'analyse *via* le programme MTT (voir le § 8.1 pour l'explication des paramètres T_{off} et sig_free renseignés dans l'algorithme MTT).

4.1. Choix des paramètres d'entrée pour le programme MTT

Pour le programme MTT, les paramètres d'entrée w_n et r_0 (chapitre II - § 4.1) optimaux ont été déterminés par l'observation de QD immobilisés sur 40 s. Pour une même vidéo, nous avons fait varier un des deux paramètres en conservant l'autre fixe lors des analyses, puis nous avons calculé l'écart-type des positions des QD obtenues en x et en y, pour chaque jeu de paramètres. Plus l'écart-type était réduit, plus la méthode était précise. Ainsi, les plus petits écart-types déterminés en x et en y nous ont indiqué quelles valeurs choisir pour w_n et r_0 .

4.2. Calcul de la concentration en biotine libre saturante des QD recouverts de streptavidine

Ce test repose sur le taux d'accrochage de QD recouverts de streptavidine, pré-incubés avec différentes concentrations de biotine libre, sur une lamelle recouverte d'anticorps biotinylé. Pour cela, des lamelles 24 x 36 mm (ESCO) ont été nettoyées brièvement avec des lingettes Kimwipes (Kimberly-Clark) imprégnées d'éthanol, puis montées sur une lame porte-objet avec des bandelettes de silicone (fig. 85). De l'anticorps biotinylé anti-CCR5 (clone 45549), dilué dans du tampon DPBS à 2 $\mu\text{g/ml}$, a été injecté dans la chambre d'observation formée. Après une incubation de 10 min, un rinçage est effectué avec un volume de chambre de tampon DPBS. Notons que la chambre ne doit pas être vidée, donc l'aspiration (avec un papier absorbant) est réalisée simultanément à l'injection de tampon. Du tampon DPBS/BSA est ensuite ajouté pour une incubation de 10 min, de manière à saturer les zones de la lamelle de verre non recouvertes d'anticorps. En parallèle, les QD sont pré-incubés à 0,4 nM avec des concentrations croissantes de biotine libre dans du tampon DPBS, pendant 10 min. Le mélange QD-biotine est ajouté dans la chambre d'observation, puis après une période de 10 min, quatre rinçages d'un volume de chambre chacun sont effectués pour éliminer les QD non accrochés. Des images sont prises pour les différentes conditions, et le

nombre de QD est déterminé avec le logiciel ImageJ. Le calcul du pourcentage de saturation recherché est détaillé dans le chapitre IV - § 3.

5. Bicouches lipidiques supportées (complément)

Les étapes de préparation des chambres d'observation, de fabrication des bicouches, de préparation des particules, de leur détection et de l'analyse de leur mouvement, sont détaillées dans la publication n°1. Toutefois, il est utile d'insister sur la vérification de l'homogénéité des bicouches (*via* la fluorescence des molécules de NBD) car celle-ci détermine grandement la réussite des expériences de SPT. La visualisation oculaire d'un retour de fluorescence homogène, après photodégradation d'une zone restreinte au niveau de la bicouche, indique que la qualité de celle-ci est satisfaisante.

Pourtant, de petits défauts peuvent exister dans la bicouche et ne pas être visualisés au travers des oculaires du microscope. De plus, la fluorescence du NBD décroît rapidement, ce qui défavorise l'identification d'hétérogénéités. C'est pourquoi il est nécessaire de capturer, à différents endroits de la bicouche, des images en fluorescence à l'aide de la caméra EM-CCD, de manière à avoir suffisamment de temps pour rechercher la présence d'artefacts. La figure 86A montre un exemple de détection d'hétérogénéités dans une bicouche, sous forme de petites zones non fluorescentes, artefacts qui ne peuvent pas être remarqués aux travers des oculaires. L'image adjacente donne un exemple où aucune irrégularité n'est décelée (fig. 86B), ce qui n'exclut pas l'existence de défauts plus petits que la limite de résolution des

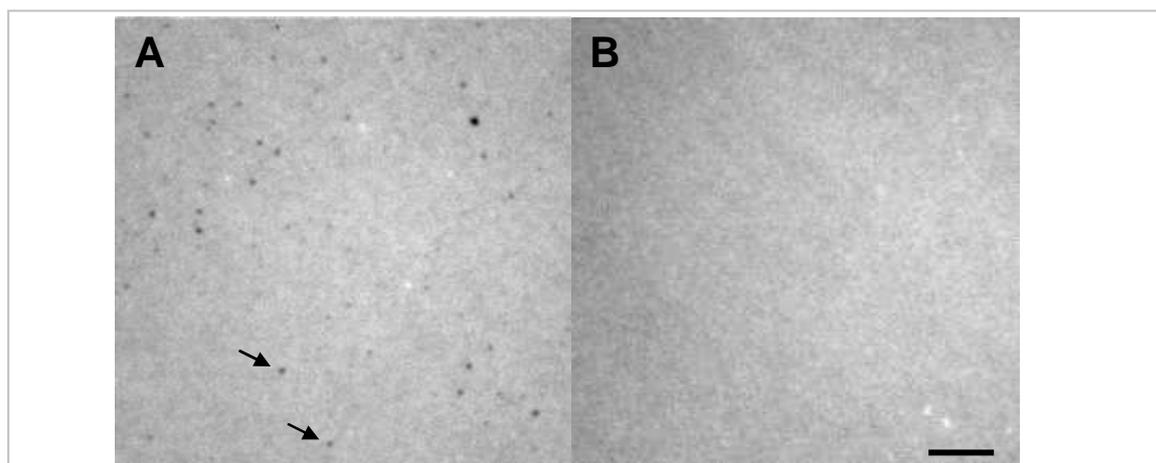


Figure 87. Images de bicouches en fluorescence permettant de détecter d'éventuels défauts.

La fluorescence émise par le NBD au sein de la bicouche permet l'acquisition d'images, qui pourront être examinées pendant suffisamment de temps pour déceler d'éventuels défauts (A, voir flèches). Un exemple de bicouche homogène montre que l'on s'attend à une fluctuation des intensités pixels par pixels (B), mais pas à des zones où le signal est proche de zéro (A). Barre d'échelle = 5 μ m.

images de la caméra. Nos tests ont démontré l'importance de ne pas observer ce type d'artefacts, car dans le premier cas de bicouche (fig. 86A), le taux de fixation non-spécifique des particules (QD, latex, or) est bien plus élevé que dans le deuxième cas (fig. 86B).

6. Cytométrie en flux

Des mesures de cytométrie en flux ont été réalisées dans divers buts, détaillés ci-après. Néanmoins, le protocole de préparation des cellules est similaire pour les différents tests. Les échantillons sont constamment conservés dans la glace (4°C) au cours de ces expériences, et chaque centrifugation dure 3 min à 400 g. Pour les cellules en suspension, $4 \cdot 10^5$ cellules sont prélevées pour chaque condition, et pour les cellules HEK 293T adhérentes, $2,5 \cdot 10^5$ cellules sont prélevées.

Les cellules en suspension dans leur milieu de culture sont centrifugées, le milieu est aspiré à l'aide d'une pipette pasteur, puis les cellules sont resuspendues dans 300 µl de tampon DPBS/BSA, pour une durée de 5 min. Dans le cas des cellules adhérentes, cette étape est réalisée après décollement avec la solution de trypsine/EDTA et dilution dans du DPBS. Lors de cette étape, la BSA sature les sites de liaison non-spécifique à la surface des cellules, où l'anticorps primaire est susceptible de se fixer. Ensuite, les cellules sont centrifugées de manière à retirer le tampon et ajouter l'anticorps primaire (mêlé ou non avec une autre molécule), dilué dans 100 µl de tampon DPBS/BSA. Après une incubation de 15 min, un lavage est effectué : centrifugation des cellules, aspiration du tampon, ajout de 300 µl de tampon DPBS, nouvelle centrifugation, aspiration du tampon. L'agent de marquage secondaire est alors ajouté, dilué dans 100 µl de tampon DPBS/BSA. Après une incubation de 15 min, un lavage est effectué, et les cellules sont resuspendues dans 400 µl de tampon DPBS. Les mesures sont ensuite réalisées avec le cytomètre FACSCalibur (Beckman Coulter) et les données sont analysées avec le logiciel CellQuestPro (Beckman Coulter).

Le niveau basal de fluorescence des cellules, utilisé pour régler les paramètres du cytomètre, est obtenu en préparant les cellules avec ce même protocole, mais dans lequel l'anticorps primaire et l'agent de marquage secondaire n'ont pas été ajoutés. Les témoins négatifs, correspondant à la liaison non-spécifique de l'agent de marquage secondaire, a été déterminé en l'absence d'anticorps primaire, et la valeur obtenue a été soustraite à toutes les valeurs correspondant aux marquages avec l'anticorps primaire, le résultat étant une intensité de fluorescence relative (u. a.).

6.1. Taux d'expression des récepteurs

La quantification de l'expression des récepteurs des différentes lignées cellulaires a été réalisée avec les anticorps biotinylés OKT4 et T21/8, dilués à 5 µg/ml. L'agent de marquage secondaire est la SA-PhycoE, dont le signal est mesuré dans le canal FL2-H du cytomètre. La lignée HEK.CD4.CCR5 a servi de contrôle positif, validant la fonctionnalité des anticorps.

6.2. Détermination de la constante d'affinité des anticorps

La constante d'affinité des anticorps 2D7 et T21/8 biotinylé a été évaluée par cytométrie en flux sur les cellules HEK.CCR5, en utilisant des concentrations croissantes de chaque anticorps. Les agents de marquage secondaire étaient l'anticorps anti-Souris couplé à l'Alexa647 à 20 µg/ml (signal mesuré dans le canal FL4-H) pour le clone 2D7, et la SA-PhycoE à 0,02 µg/ml (canal FL2-H) pour le clone T21/8. Le calcul de la constante d'affinité a été réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism, ajustant les données selon l'équation :

$$Y = B_{\max} \times \frac{X}{K_D + X} + NS \times X \quad \text{Eq. 24}$$

où Y est l'intensité de fluorescence relative (u. a.), X est la concentration de l'anticorps primaire (nM), B_{\max} est une constante, ici une intensité de fluorescence relative, correspondant au maximum de liaison spécifique de l'anticorps (u. a.), K_D est la constante d'affinité de l'anticorps exprimée en nM, et NS est une constante qui représente la liaison non-spécifique de l'anticorps (dimension en u. a./nM).

6.3. Test de compétition anticorps / CD4s

Le test a été réalisé sur les cellules HEK.CCR5, en diluant l'anticorps primaire dans le tampon DPBS/BSA à une concentration inférieure à sa constante d'affinité (2D7 à 6 nM, T21/8 à 30 nM) en présence ou non de CD4s à 100 nM. Les agents de marquage secondaire étaient l'anticorps anti-Souris couplé à l'Alexa647 à 20 µg/ml (signal mesuré dans le canal FL4-H) pour le clone 2D7, et la SA-PhycoE à 0,02 µg/ml (canal FL2-H) pour le clone T21/8. Le test statistique de Student apparié a été effectué à l'aide de GraphPad Prism (test bilatéral, intervalle de confiance de 95 %).

6.4. Test de liaison de l'anticorps T21/8 en présence de maraviroc

Les mesures ont été effectuées sur les cellules J.CCR5. L'anticorps T21/8 a été dilué à 30 nM dans du tampon DPBS/BSA, en présence ou non de différentes concentrations de maraviroc. L'agent de marquage secondaire était la SA-PhycoE à 0,02 µg/ml (canal FL2-H).

7. SPT avec des complexes QD-anticorps

Le protocole décrit ici est celui utilisé pour les expériences de SPT et pour les tests de spécificité de marquage avec les complexes QD-anticorps (chapitre IV - fig. 54 et 59). En particulier pour ces tests, les QD ont été comptés manuellement sur les hémisphères supérieurs de 25 cellules.

7.1. Protocole de marquage

La figure 87 schématise les différentes étapes de ce protocole de marquage. Tout d'abord, des lamelles 22 x 22 mm stockées dans de l'éthanol absolu, sont prélevées et disposées sous la hotte de culture à flux laminaire. Une fois l'éthanol évaporé, les lamelles sont placées au fond des puits d'une plaque 6 puits (voir § 3.3). Une goutte de 400 µl de polylysine à 0,1 mg/ml est déposée sur chaque lamelle. Après une incubation de 5 min, la solution de polylysine est aspirée à l'aide d'une pipette pasteur, et les puits sont rincés deux fois avec 2 ml de tampon DPBS+. Du milieu RPMI (2 ml) est ajouté dans chaque puits, et $4 \cdot 10^5$ cellules (dans environ 500 µl) y sont ensuite distribuées. Les cellules sont réparties également dans le puits en effectuant un mouvement horizontal en huit avec la plaque. Puis, cette dernière est centrifugée (50 g, 7 min) et entreposée dans l'incubateur de culture cellulaire pendant au moins 30 min. Lors de l'utilisation d'une lamelle, celle-ci est prélevée

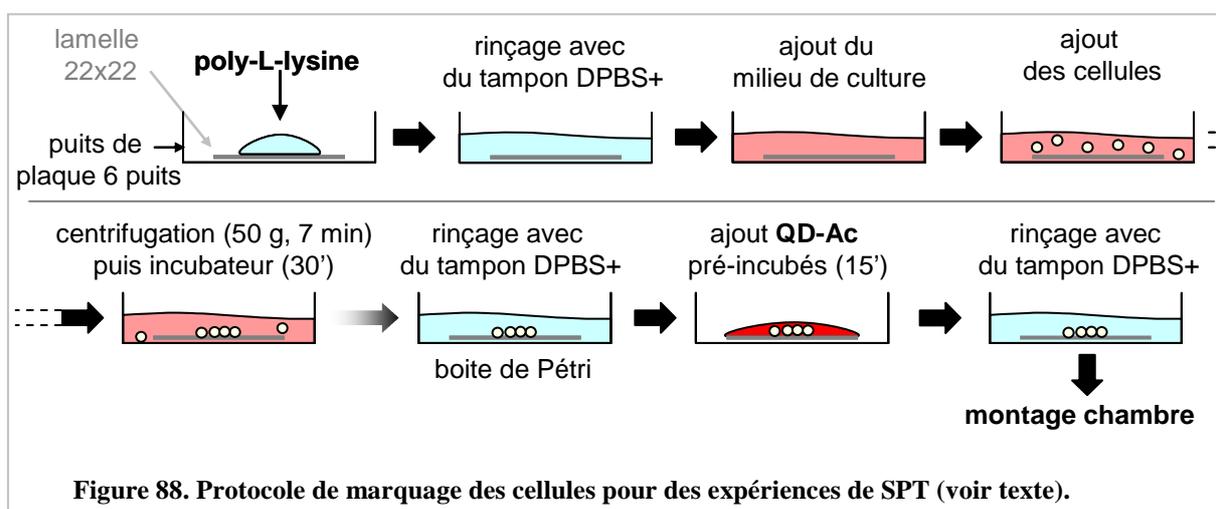


Figure 88. Protocole de marquage des cellules pour des expériences de SPT (voir texte).

du puits et placée dans une boîte de Pétri neuve (35 mm de diamètre). Un rinçage avec 1 ml de tampon DPBS+ permet alors d'éliminer les cellules qui ne sont pas immobilisées. En parallèle, les QD sont pré-incubés dans un tube eppendorf avec les anticorps dans un volume final de 50 μ l de tampon DPBS+/BSA/D-gluc (voir concentration dans le chapitre IV et V), pour une durée de 15 min. Notons ici que seuls les QD du lot n°1 ont été pré-incubés avec l'anticorps et 20 μ M de biotine libre. Passé le temps de pré-incubation, les 50 μ l contenant les complexes QD-anticorps sont déposés sur la lamelle, pour un nouveau temps d'incubation de 15 min. Enfin, quatre rinçages avec des volumes de 1 ml de tampon DPBS+ permettent d'éliminer les complexes non liés aux cellules, et la lamelle est prélevée pour être montée sur la lame porte-objet via des bandelettes de silicone (voir § 4, fig. 85). Il est important à cette étape de soigneusement essuyer les bords de la lamelle qui font face au silicone, pour que l'étanchéité de la chambre d'observation soit garantie. Une pression avec un objet rigide (ex : dos d'une pince) permet de chasser les bulles d'air entre ces deux parties. Du tampon DPBS+/BSA/D-gluc est injectée dans la chambre pour garantir la survie cellulaire.

Dans ces conditions, les cellules d'une même chambre sont observées pendant une durée maximale de 30 min, afin d'éviter par exemple que l'illumination prolongée ne perturbe l'état de « santé » des cellules. Le montage de vidéomicroscopie est détaillé dans le chapitre II. Il est toutefois important de noter que la caméra EM-CCD a été réglée selon les paramètres suivants, garantissant une fréquence d'acquisition stable à 25 Hz : temps d'exposition = 17 ms, gain G2, EM gain = 3604, région d'intérêt = 261x261 px.

Les expériences de SPT à 37°C ont été réalisées en adaptant sur le microscope une chambre fabriquée avec des plaques de polystyrène (épaisseur ~ 1-2 cm), dans laquelle est introduit de l'air chaud régulé à 37°C à l'aide d'un appareil Air Therm (World Precision Instruments). Une plaque de plexiglas assure l'étanchéité de la chambre entre l'échantillon et la source de lumière blanche, de manière à pouvoir éclairer l'échantillon.

7.2. Ajout des ligands

Lors des expériences de SPT en présence de CD4s ou de gp120, les complexes QD-anticorps ont été ajoutés sur les cellules pour une durée de 15 min, quatre rinçages avec du DPBS+ ont été effectués (comme décrit précédemment), puis le CD4s ou la gp120, dilués à 100 nM dans 50 μ l de DPBS+/BSA/D-gluc, ont été déposés sur les cellules. Après une incubation de 30 min, un rinçage avec 1 ml de DPBS+ est effectué avant montage sur lame.

Dans le cas des expériences de SPT en présence de maraviroc, ce dernier a été mélangé avec les QD et les anticorps, lors de l'étape de pré-incubation. Le protocole est dans ce cas identique à celui décrit dans le § 7.1.

8. Analyse des données de SPT

8.1. Programme MTT

Le principe et l'utilisation du programme MTT sont détaillés dans le chapitre II. Toutefois, deux paramètres d'entrée introduits dans l'algorithme, T_{off} et sig_free , nécessitent une conversion par rapport aux explications données. La valeur de T_{off} que l'on renseigne au programme se calcule *via* l'équation :

$$T_{off} = -\frac{n}{3} \quad \text{Eq. 25}$$

où n est le nombre d'images correspondant à la période pendant laquelle MTT recherche la position d'une particule qui a été « perdue » dans les images précédentes. La zone de recherche maximale est définie à partir du coefficient de diffusion maximal (D_{max}) que l'on a indiqué au programme, sous la forme du paramètre intitulé sig_free , qui est déterminé par l'équation :

$$sig_free = \sqrt{4 D_{max}} \quad \text{Eq. 26}$$

8.2. Procédure d'analyse des trajectoires (avec le programme appelé AnalyzSPT)

Le programme AnalyzSPT, créé avec le logiciel Excel (suite Microsoft Office), calcule automatiquement le MSD en fonction d'intervalles de temps δt croissants (maximum = $1/10^6$ de la durée de la trajectoire), l'index de confinement pour des segments de temps de 2 à 10 s (de 2 en 2), ainsi que le coefficient de diffusion D_{1-2} (voir chapitre II). Ensuite, nous intervenons manuellement en observant le résultat de ces calculs, et nous commandons de nouveaux calculs selon les cas de figure suivants :

- L'index de confinement n'est pas supérieur à 4 pendant une période de temps supérieure au segment de temps considéré : la courbe de MSD est ajustée avec un modèle de diffusion aléatoire ou dirigée.
- L'index de confinement est supérieur à 4 pendant une période de temps supérieure au segment de temps considéré, mais inférieure à la durée de la trajectoire : il s'agit d'un confinement transitoire. La trajectoire est découpée en portions « confiné » et « non

confiné », et une courbe de MSD est calculée et ajustée avec un modèle adéquat pour chaque portion.

- L'index de confinement est supérieur à 4 sur l'ensemble de la trajectoire : la courbe de MSD est ajustée avec un modèle de diffusion confinée (ou confinée aléatoire / confinée dirigée).

L'analyse des cas de particules « immobiles » est détaillée dans le chapitre II - § 5.5. Les caractéristiques diffusionnelles de l'ensemble des trajectoires sont recueillies dans un fichier Excel pour établir des statistiques. Les histogrammes de distribution présentés dans le chapitre V ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism.

Auteur : Patrice Mascalchi

Titre : Analyse par suivi de particule unique à la surface de lymphocytes vivants de l'organisation dynamique des récepteurs CD4 et CCR5 impliqués dans l'infection par le VIH.

Directeur de thèse : Laurence Salomé / André Lopez

Résumé :

L'infection de lymphocytes T CD4+ par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) débute par l'interaction séquentielle de la protéine d'enveloppe du virus gp120 avec le récepteur primaire CD4 puis avec un corécepteur, CCR5 dans la majorité des cas de primo-infection. La nécessité de cette double interaction suggère que l'efficacité du mécanisme d'entrée du VIH pourrait dépendre de l'organisation membranaire dynamique de ces deux récepteurs.

Pour étudier cette organisation à la surface de lymphocytes vivants, nous avons utilisé une technique de microscopie non invasive : le suivi de particule unique (SPT). Cette approche permet d'analyser la diffusion de constituants membranaires avec une grande résolution spatio-temporelle. En particulier, elle autorise la détection de transitions dans les modes de diffusion observés.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude systématique pour évaluer l'influence de la particule et de la méthode de calcul du coefficient de diffusion sur le résultat d'expériences de SPT. L'outil de calcul du coefficient de diffusion a été affiné par l'analyse de trajectoires générées par simulation numérique. L'étude s'est ensuite focalisée sur le cas d'une sonde lipidique diffusant dans une membrane modèle, suivie par l'intermédiaire de particules couplées à des anticorps. Nous avons montré que la précision de la technique de SPT était dépendante de la nature (quantum dots, or, latex), de la taille et du taux de couverture en anticorps des particules. Les quantum dots (QD) se sont avérés être les meilleurs candidats pour des expériences de SPT.

La deuxième partie de notre travail a consisté à suivre et analyser le mouvement des récepteurs CD4 et CCR5 marqués avec des QD, à la surface de lymphocytes immobilisés sur une lamelle de verre. Ces expériences ont montré qu'il existe pour chaque récepteur des sous-populations ayant des modes de diffusion distincts : aléatoire, confiné de manière permanente ou de manière transitoire. L'ajout de molécules déstabilisant l'interaction CD4-CCR5 (CD4 soluble, maraviroc) a ensuite révélé que celle-ci est à l'origine de leur confinement, mais seulement de manière partielle. De plus, le suivi du récepteur CD4 a été effectué en présence de la protéine d'enveloppe virale gp120. Les résultats obtenus indiquent que la gp120 a des effets opposés sur le comportement du récepteur, qui résulteraient d'une différence de comportement diffusionnel des complexes CD4-gp120 et CD4-gp120-CCR5.

L'ensemble de nos observations nous permet de poser les bases d'un modèle d'organisation membranaire dynamique de CD4 et CCR5 à la surface de lymphocytes vivants. Ces données constituent un point de départ vers la compréhension du lien présumé entre l'organisation dynamique des récepteurs et les premières étapes du processus d'infection par le VIH.

Mots-clés : CD4, CCR5, VIH, suivi de particule unique, quantum dot, organisation membranaire dynamique, gp120, maraviroc.

Discipline : Biophysique cellulaire

Laboratoire : Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), UPS/CNRS UMR 5089, 205 route de Narbonne, BP 64182, F-31077 Toulouse.