



Analyse des réponses cellulaires induites par l'intégration d'un ADN étranger au sein du génome

Virginie Gay

► To cite this version:

Virginie Gay. Analyse des réponses cellulaires induites par l'intégration d'un ADN étranger au sein du génome. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10201 . tel-00543752

HAL Id: tel-00543752

<https://theses.hal.science/tel-00543752>

Submitted on 6 Dec 2010

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

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

N° ordre 201-2010

Année 2010

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON1

Ecole doctorale Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 22 octobre 2010

par

Gay Virginie

*Analyse des Réponses Cellulaires
Induites par l'Intégration d'un ADN Etranger
au Sein du Génome*

Jury de soutenance

Dr JF.Mouscadet	Rapporteur
Pr L.Willems	Rapporteur
Dr S.Emiliani	Rapporteur
Pr D.Le Guellec	Membre
Dr C.Zhang	Membre
Dr C.Ronfort	Directrice de thèse
Dr K.Moreau	Co-Directrice de thèse

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements au Pr.JF.Mornex pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je remercie également les Dr.C.Ronfort et K.Moreau pour leur accueil au sein de leur équipe.

Aux membres des plateaux techniques de l'IFR qui m'ont tellement appris...

Je remercie Bariza Blanquier pour toutes ces discussions scientifiques, merci pour cet apprentissage, merci aussi pour nos bavardages lorsque j'attendais les UV ou la fin du run !! Je remercie également Didier Negre pour m'avoir enseigné l'art de la production virale et Isabelle Grosjean pour ses précieux conseils de culture cellulaire. Merci également à Michel Becchi et les membres du plateau technique d'analyse en spectrométrie de masse pour leur aide. Je remercie également Philippe Gonzalo pour ses bons conseils sur les gels 2D.

Je souhaite également remercier Joël Lachuer, Séverine Croze, Nicolas Nazaret et les autres membres de ProfileXpert pour leur précieuse aide lors des analyses des puces. Nicolas, merci pour ta patience et tes explications sur Ingenuity et les statistiques !!

Mes plus sincères remerciements vont également au Pr.JP.Flandrois pour sa précieuse aide.

Je remercie également les membres du jury pour leur participation et le temps qu'ils ont consacré à cette thèse.

Au Cluster 10...

Mes sincères remerciements vont aux membres du Cluster 10 de la région Rhône-Alpes, pour avoir financé cette thèse et pour m'avoir permis de participer à des événements tels que BioVision, IRIS et la fête de la science. Merci au Pr. Alain Cozzone pour sa précieuse aide. Merci également à Agnès Delebassée-Nabet pour sa présence, son soutien et pour m'avoir permis de faire ma première exposition ! Merci à tous les étudiants du Cluster 10 avec lesquels j'ai partagé tant de bons moments !

Aux membres de l'UMR...

Je remercie chaleureusement Christian Le Jan et Claire Bellaton pour leur immense soutien, leurs encouragements, les longues discussions qui m'ont tant aidée. Mes plus sincères remerciements à Pierre Boulanger et Saw-See Hong pour leur présence, leurs conseils et leurs encouragements. Je souhaite également adresser mes remerciements à Catherine Legras-Lachuer pour son soutien, son aide, ses conseils. A tous, merci d'avoir été là et de m'avoir aidée à tenir bon.

Je remercie Fabienne Archer pour son aide en culture cellulaire et Caroline Leroux pour m'avoir permis d'effectuer les expériences de gels 2D. Merci à Christophe Terzian, François Guiguen, Christine Dolmazon, Sophie Desloire, Geneviève Cordier pour leur soutien et les discussions au hasard d'un couloir. Merci également à Sylvie Farget et Momo pour leur

aide. Merci à Barbara Viginier avec qui j'ai bien profité des USA pendant quelques jours !
Merci à Marie-Pierre Confort avec qui j'ai beaucoup aimé partager ces petits bouts de science.

Aux étudiants avec qui j'ai pu travailler qui m'ont donné la motivation dont j'avais besoin...

Laurianne Jaffre. Tu as été la première des stagiaires et j'ai adoré créer cette mutation E152D avec toi ! Tu es maintenant bien plus qu'une ancienne étudiante et j'en suis ravie !
Merci.

Audrey Berger. Toi et moi savons maintenant que l'art du gel 2D n'est pas chose aisée !!! Je me souviendrai à jamais des délires passés sur ces manip !! On a révolutionné la salle de bioch !!! Parce que toi aussi maintenant tu es bien plus et que c'est toujours un plaisir lorsqu'on arrive à trouver un moment pour se voir et se raconter nos vies... merci.

Claudine Moratal. Ma chère, très chère Claudine....toi, moi, les gels 2D, le shopping....le shopping...la révélation...tu as été la seule à me faire découvrir une boutique à Lyon que je ne connaissais pas encore ...Amazing !!! Tu n'es plus mon étudiante tu es mon amie. Merci

Matthias Schultz. Non Matthias tenter d'assassiner son maître de stage ne fait pas partie d'un master 2...non non j't'assure... !!! Merci pour toutes tes blagues même si j'ai manqué de faire une crise cardiaque à chaque fois ! Merci aussi pour la liste noire !! Toi et moi on ne nous y reprendra plus...promis !!!

Aux étudiants et membres de l'UMR, actuels ou passés avec qui j'ai partagé et continue de partager tant de bons moments...

Céline Vernin. Mon amie, je pourrai écrire deux pages d'anecdotes mais il faut aussi de la place pour les autres !! Merci d'avoir toujours été là dans les moments difficiles, merci pour ton aide lors de la préparation de cet écrit, merci d'avoir pris le temps d'écouter mon oral avant le jour J. Merci pour les balades, les heures de papotage, l'orienté, les soirées,... Merci au destin de nous avoir fait nous rencontrer.

Monika Durand. C'est comme si tu avais toujours été là...et pourtant...tu es arrivée, ma thèse était déjà bien entamée. Nos discussions ont été comme une évidence...le shopping aussi !! Merci pour ton goût pour la mode (!), tous ces moments, ton soutien, ta considération.

Barbara Gineys. Bab, je vois en toi tellement de grandes choses....les séances shopping ont commencé avec le noir pour seul objectif...mais peu à peu...la rouge, le gris se sont immiscés...la délivrance est proche...je sens bientôt le bleu, le vert...le rose ???? non bon ok... !! Merci Bab pour ta folie, ta joie, ton franc parlé, merci d'être toi.

Coralie Cellier. Je t'ai rencontré à l'UMR, tu t'amusais déjà avec notre petite intégrase et moi je débarquais juste, c'était il y a bien longtemps !! On se souviendra de nos rigolades dans le bureau, des séances de shopping, de hammam, les verres et le reste. Merci d'être toi, merci de ton soutien.

Gaëlle Gonzales. Si seulement tu étais arrivée bien plus tôt...nous aurions eu bien plus de temps pour rigoler !!!! Mais on aura quand même bien profité de ces quelques mois, c'est déjà ça !! Merci pour ton soutien, ton grain de folie, ta joie...merci pour toutes les rigolades à venir !!

Melody Peyret. Hey Mélo !!! Alors toi ca c'est sur tu n'es pas restée longtemps à l'UMR...mais juste assez pour faire ta place et bien nous manqué à Gaëlle et moi lors de ton départ !!! Heureusement des soirées sont déjà prévues pour ne pas se perdre de vue !! Merci pour tout ton soutien et les bonnes rigolades !!

Camille Peron. Merci pour tes couleurs...merci d'être aussi sincère, aussi authentique. Merci pour ton soutien, les soirées, les soirées, les soirées et... le papotage !!!

Takouhie Mgrditchian. Ma petite Takouhie...merci d'être venue en France !! Merci d'être toi, aussi marrante !! Merci pour ton soutien et ta présence.

Allison Ballandras. Toi et moi on a commencé ensemble... et on aura fini ensemble puisque tu soutiens dans un mois...Good job ! Merci pour ton soutien, les bavardages scientifiques et les moins scientifiques... !!

Emilie Dufour. Ah ma blonde !! Tant de discussions à refaire le monde...et pourtant...non non rien à changé...même le ficus continue sa vie...tant pis toi et moi nous sommes loin maintenant !! Merci pour ton soutien et toutes les bêtises que tu racontes pour me faire rire !!

Aurélien Riquet. Toi...c'est bien dommage que tu n'ais pas été mon étudiant...j'aurai pris du plaisir à t'embêter !! Cela ne m'a heureusement pas empêché de le faire hors labo... !! Merci pour ta présence, ton soutien, les sms ou les discussions de vive voix et tous les autres bons moments que nous avons partagés...

Alain Abi Risk. Alain, Homme, je te rappelle que fumer tue....je sais je sais fumer tue lentement et tu n'es pas pressé...mais quand même...survit le temps de finir ta thèse !!!! Merci pour les pauses café et tout le reste !

Franck Touret. Si un jour j'atteins ton niveau de zénitude...c'est que j'aurai appris l'essentiel ! Merci pour tes blagues, les discussions et tes encouragements.

Abdou Akkouche. Merci de m'accueillir à la fac à chaque fois que je débarque sur le campus !! Merci pour les soirées, les rigolades, tes blagues, ton soutien.

Juliano Da Cruz. Tu auras pimenté cette dernière année....merci. Merci également à Nacira Abbassi, Florine Guinet, Magalie Mure, Lise-Marie Donniot et Cynthia Torresilla pour les soirées, les hammams, le soutien qu'elles m'ont apporté.

Elsy Al Andary. Toi, moi, il n'y a pas de mots...Cette thèse aura pour immense mérite notre rencontre. J'ai toujours voulu avoir une sœur...maintenant tu es là. Merci.

Aux membres des autres labo avec qui j'ai pu tisser des liens au détour des manip...

Hamide Aslan. Tu auras toujours été d'un soutien inconsidérable et d'une sagesse incontestable...sauf concernant l'utilisation de ta CB lors des journées shopping !!!! Merci.

Johan Druelle. Merci d'avoir corrigé ce manuscrit, merci pour les soirées, les blagues, tes couleurs, ton soutien.

Marie-Eve Cluzel-Valentin et Héloïse Macaire. Merci les miss pour tous ces bons délires !! Merci d'avoir porté mes chapeaux !! Merci pour votre immense soutien...

Merci également à Erwan Ventre et Cyril Matthieu avec qui j'ai partagé de bons moments et plusieurs run de PCR !! Merci également à Hinda Haned et Anne Lambert pour leur immense soutien et leur présence.

A mes amis...

Tous mes remerciements à Delphine, Marie-Clémence, Tonio, Flo, pour ces bons moments. Merci à Benoit Weck d'être comme il est, toujours partant, toujours présent. A mes ami(e)s de la danse et du sabre, Marie Danielle, Marie la brune et Marie la blonde, Charlène, Valentine, Anne-Claire, Laëtitia, Karine, Elisabeth, Véro, Efy, Fanny, Diana, Kevin, Gilles, Nicolas, Franck, Paul et les autres...merci d'avoir été là quand j'avais besoin de penser à autre chose !! Merci à Mimy et Juju pour leur aide, leur patience, leur soutien et ces bons délires. Merci à Jacques pour ces années, nous nous souviendrons à jamais de ces études en biologie...

Les filles, Laura Fournier, Hélène Akpolou, Sandra Lafargue...sans vous tout ceci ne serait pas. Merci d'être là, toujours, merci pour tout.

A ma famille...

Babeth, Christian, Michèle, Robert, Didine, Nono, Emilie, Igor, Aurore, Sandrine, Thomas, Guillaume, Romain, Caroline, Serge, Jordan, Jonathan, Jérémy, Grégory, Dorian, Pépé, Mémé, Papy, Mamy...merci d'avoir toujours été là pour moi.

A mes parents et mes frères...je ne trouve pas les mots...mais heureusement j'ai des chiffres... MERCI $\times 10^{+\infty}$.

A toi, cher lecteur,

*Tu l'auras compris il n'y a pas que la Science
dans la vie...il y a aussi le Shopping !
Merci à toi de faire perdurer mes travaux,
le temps d'une lecture. Enjoy !!*

Résumé

Il existe un certain nombre de situations au cours desquelles l'intégrité du génome cellulaire est mise en danger. Ceci se produit notamment lors de mouvements de gènes (translocation, éléments mobiles), lors d'infections virales parfois intégratives (AAV, HBV, HPV) ou lors d'infections rétrovirales. En effet, le cycle de réplication des rétrovirus nécessite une étape d'intégration du génome viral dans l'ADN génomique de la cellule infectée. Malgré les nombreuses études menées sur les infections par le VIH, les cancers viro-induits ou non et les thérapies géniques basées sur les rétrovirus, aucune donnée n'est actuellement disponible sur les modifications cellulaires induites par de telles perturbations chromosomiques. L'objectif du projet était d'identifier des mécanismes cellulaires induits par des atteintes à l'intégrité du génome, plus précisément par l'insertion de molécules d'ADN non cellulaire dans les chromosomes.

L'intégration de matériel génétique additionnel a été induite par des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1. Les modifications cellulaires uniquement dues à l'intégration ont été isolées par comparaison de vecteurs intégratif et non intégratif. Des cellules primaires du derme humain ont été sélectionnées pour l'étude. Les temps post infection et les doses virales les plus adéquates ont été sélectionnés grâce à des expériences de cinétiques d'intégration couplées à une quantification des ADN viraux intégrés. L'analyse des modifications cellulaires induites par l'intégration de l'ADN étranger a porté sur l'ensemble du transcriptome et sur l'ensemble du protéome cellulaire.

Dans le but d'effectuer une analyse transcriptomique, des puces à ADN, représentant le génome humain complet, ont été utilisées. Cette étude a démontré une forte répression transcriptionnelle induite par l'intégration. De plus, toutes les fonctions cellulaires sont perturbées par le processus. Finalement, une classification par interactions et fonctions biologiques a mis en évidence cinq processus cellulaires majoritairement affectés par l'intégration de l'ADN étranger, qui correspondent au cycle et à la mort cellulaire, au remodelage et à la réparation de la chromatine et à la réponse immunitaire ou au stress. Dans le but de compléter cette analyse transcriptomique, une étude protéomique a été réalisée. Les protéines cellulaires ont été séparées sur des gels bi-dimensionnels. Parmi les neuf protéines identifiées en spectrométrie de masse, certaines appartiennent au cytosquelette et d'autres aux mécanismes de réponse au stress.

L'intégration d'un ADN étranger au sein du génome provoque donc bien des perturbations cellulaires. L'intégration de matériel génétique additionnel ne concernant pas seulement les rétrovirus, les données obtenues lors de cette étude pourront permettre (i) de développer des stratégies de défenses contre les rétrovirus ou contre les autres maladies caractérisées par des atteintes à l'intégrité du génome, (ii) d'évaluer les risques encourus par l'intégration d'un vecteur thérapeutique dans le génome cellulaire lors des thérapies géniques ou des expériences de transfert de gènes.

Abstract

In numerous situations, cell genome integrity could be in danger. This is the case during gene movements (translocations, mobile elements), during viral infections that could be sometimes integrative (AAV, HBV, HPV) or during retroviral infections. Indeed, the replication cycle of retroviruses requires a viral genome integration step. In spite of the studies on HIV infections, viral or non viral cancers and retrovirus-based gene therapy, no data are available concerning the cellular modifications induced by such chromosomal disruptions. The aim of work was to identify cellular mechanisms induced by the insertion of a non cellular DNA into the chromosomes.

The integration of additional DNA was provoked by HIV-1-based lentiviral vectors. Cellular modifications only due to the integration step were isolated by comparison of integrative and non integrative vectors. Primary human dermal fibroblasts cells were selected for the study. Optimal times post infection and viral quantities were defined using kinetic integration experiments and integrated viral DNA quantifications. The study of cellular modifications induced by the integration of the foreign DNA was applied on the cellular global transcriptome and proteome.

In order to perform a transcriptomic analyses, DNA microarray corresponding to the whole human genome, were used. This study revealed a strong transcriptional repression induced by the integration. Moreover, every cellular function are disturbed by the process. Finally, a network based on molecular interactions and biological functions underlined five cellular processes mostly affected by the foreign DNA integration and corresponding to the cell cycle and death, the remodelling and repair of chromatin and the immunity or stress responses. To complete this transcriptomic analyses, a proteomic study was realized. Cellular proteins were separated on 2D gels. Among the nine proteins identified by mass spectrometry, some are linked to the cytoskeleton and other to the cellular stress.

Thus, integration of a foreign DNA into the genome provoked cellular perturbations. As additional DNA integration do not only concern retroviruses, data obtained during this study could allow (i) the development of defensive strategies against retroviruses or other diseases implicating the genome integrity and (ii) the evaluation of risks linked to the integration of a therapeutic vector into the genome during gene therapy and gene transfer experiments.

SOMMAIRE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
CHAPITRE 1 : LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE, LES RETROVIRUS ET LEURS DERIVES.....	4
<i>I/ Biologie du Virus de l'Immunodéficience Humaine.....</i>	4
A/ La famille des rétrovirus.....	4
B/ Le VIH, un lentivirus.....	5
1/ Pathologies associées au VIH.....	5
2/ Structure de la particule virale.....	6
a. les protéines de structure.....	6
b. les enzymes virales.....	7
c. l'enveloppe.....	8
d. les protéines régulatrices et les protéines accessoires.....	8
3/ Le génome viral	9
a. les régions codantes.....	9
b. les régions non codantes.....	9
4/ Le cycle de réplication	11
a. la phase précoce	11
b. la phase tardive	12
c. les co-facteurs du cycle du VIH	13
<i>II/ Les vecteurs dérivés du VIH</i>	15
A/ Construction des vecteurs.....	15
B/ Production des vecteurs	17
CHAPITRE 2 : INTEGRASE ET INTEGRATION	19
<i>I/ Le processus d'intégration.....</i>	19
A/ Les étapes du processus d'intégration.....	19
1/ Reconnaissance des LTR et coupure en 3'	19
2/ Transfert de brin.....	20
3/ Ligation.....	20
B/ Les co-facteurs cellulaires de l'intégrase du VIH	21
1/ Lcdg/p75.....	21
2/ HMGA1	22
3/ INI1.....	22
4/ BAF.....	22
<i>II/ Structure de la protéine intégrase du VIH.....</i>	23
A/ Généralités sur la protéine intégrase.....	23
B/ Fonction des différents domaines de l'intégrase	24
1/ le core de la protéine	24
2/ Le domaine N-terminal	25
3/ Le domaine C-terminal.....	26
C/ Structure des domaines et dimérisation.....	26
D/ Modèle d'action sous forme de tétramère.....	27
<i>III/ Méthode de quantification des ADN viraux intégrés.....</i>	28
CHAPITRE 3 : LES REGULATEURS CELLULAIRES	30
<i>I/ Les processus de modifications de la chromatine</i>	30
A/ Modifications des histones	30
1/ Les complexes de remodelage.....	31
2/ Le code histone	31
B/ La méthylation de l'ADN	33
1/ Fonction de la méthylation de l'ADN	33
2/ Les protéines méthyltransférases (DNMT)	33
C/ L'hétérochromatine.....	34
1/ L'hétérochromatine facultative	34
2/ L'hétérochromatine constitutive.....	36
D/ Les instabilités chromosomiques	36
1/ les altérations des chromosomes	36
a. Les changements subtils de la séquence.....	37
b. Les aberrations du nombre de chromosomes	37
c. Les translocations.....	37
d. L'amplification génique.....	38
2/ Les sites fragiles.....	38
<i>II/ Les mécanismes de réparation de l'ADN.....</i>	39

A/ Signalisation des lésions de l'ADN	40
1/ Les senseurs de la lésion	40
a. La protéine mutée dans Ataxia Telangiectasia (ATM).....	40
b. La protéine reliée à ATM et Rad3 (ATR).....	41
c. Le complexe MRN.....	42
d. Le complexe DNA-PK et les PARP.....	42
2/ les transducteurs du signal.....	43
a. Les protéines Chk1 et Chk2.....	43
b. L'histone H2AX.....	44
3/ La voie FANC/BRCA	45
a. Les protéines FANC.....	45
b. BRCA1 et BRCA2.....	46
B/ Les différentes voies de réparation	47
1/ Réparation des mésappariements : MMR.....	48
2/ Réparation par excision de base : BER	48
3/ Réparation par excision de nucléotide : NER.....	49
4/ Réparation des cassures double-brin	49
a. Recombinaison homologue	50
b. Jonction non homologue des extrémités.....	52
III/ Le cycle cellulaire.....	53
A/ Les protéines régulatrices	54
1/ Les CDK et les cyclines	54
2/ Les inhibiteurs des CDK	55
3/ E2F et Rb	56
B / Les points de contrôle.....	57
1/ Contrôle en phase G1	57
2/ Contrôle en phase S.....	58
3/ Contrôle en phase G2.....	58
4/ Contrôle en phase M	59
IV/ La mort cellulaire	60
A/ Les voies apoptotiques.....	60
B/ Les voies non apoptotiques.....	62
C/ Les protéines clés.....	63
1/ La protéine p53	63
2/ La protéine p21	64
3/ La famille Bcl-2	65
CHAPITRE 4 : RELATION HOTE-PATHOGENE : LA CELLULE FACE AU VIH.....	67
I/ Les défenses cellulaires.....	67
A/ L'immunité innée	67
B/ Les facteurs de restriction des infections par le VIH	70
1/ La famille des TRIPartite Motif (TRIM).....	70
2/ La famille APOBEC	71
3/ Bst-2 / Tetherine.....	71
4/ Autres.....	72
II/ Les modifications cellulaires globales provoquées par l'infection au VIH	72
A/ Les analyses transcriptomiques	72
B/ Les analyses protéomiques	75
C/ Les analyses par ARN interférence.....	77
OBJECTIFS	81
RESULTATS.....	84
CHAPITRE 1 : DEFINITION DES CONDITIONS OPTIMALES POUR L'ANALYSE DES MODIFICATIONS CELLULAIRES	85
I/ Objectifs	85
II/ Article 1	87
III/ Données complémentaires.....	97
A/ Evolution des cellules primaires lors du maintien en culture.....	97
B/ Cinétique d'infection à différentes MOI sur les cellules primaires.....	97
1/ Expression de la GFP	98
2/ Quantification des formes intégrées	99
3/ Elimination des formes non intégrées contaminantes.....	100
IV/ Discussion-Conclusion	101
CHAPITRE 2 : ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES.....	103
I/ Objectifs	103
II/ Article 2	105
III/ Données complémentaires.....	127

A/ Réseau d'interactions protéiques	127
B/ Etude préliminaire sur d'autres cellules.....	127
D/ Etude des différences entre les cellules saines et les cellules infectées.....	128
IV/ Discussion-Conclusion	129
CHAPITRE 3 : ANALYSES PROTEOMIQUES	132
I/ Objectifs	132
II/ Article 3	134
III/ Discussion-conclusion.....	145
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE.....	147
ANNEXES	154
ANNEXE 1 : MANIPULATION DES VECTEURS LENTIVIRAUX	155
I/ Production.....	155
II/ Titration	156
A/ Mesure de la GFP	156
B/ Mesure de l'activité réverse transcriptase	157
C/ Quantification des ADN viraux intracellulaires.....	158
III/ Techniques de concentration des suspensions virales	159
IV/ Elimination des plasmides résiduels.....	160
V/ Vérification de la non recombinaison	161
ANNEXE 2 : MISES AU POINT DE LA METHODE D'ANALYSE BIDIMENTIONNELLE DES PROTEINES.....	162
I/ Les techniques de coloration.....	162
II/ Test des zones de pH.....	163
RÉFÉRENCES.....	164

Liste des abbreviations

APC Anaphase Promoting Complex
ATM Ataxia Telangiectasia Mutated protein
ATR ATM and Rad3 Related protein
BASC Brca1 Associated genome Surveillance Complex
BER Base Excision Repair
BRCC BRCA1-BRCA2 Containing Complex
CCD Catalytic Core Domain
CICD Caspase Independent Cell Death
Cip/Kip CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein
CTD C-Terminal Domain
GFP Green Fluorescent Protein
HDAC Histone DesACétylase
HKMT Histone Lysine MethylTransferase
HR Homologous Recombination
ICTV international Committee of Taxonomy of Viruses
IN INtegrase
IRES Internal Ribosome Entry Site
LTR Long Terminal Repeat
MCD Mitotic Cell Death
MMR MisMatch Repair
MPG MethylPurine-DNA Glycosylase
MuLV Murine Leukemia Virus
NER Nucleotide Excision Repair
NHEJ Non Homologous End Joining
NLR Nod-Like Receptor
NLS Nuclear Localization Signal
NTD N-Terminal Domain
PAMP Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS Primer Binding Site
PCNA Proliferating Cell Nuclear Antigen
PIC Pre-Integration Complex
PRR Pattern Recognition Receptor
RLR Rig-like Receptor
RRE Rev Responsive Element
SAC Spindle Assembly Checkpoint

SAXS Small-Angle X-ray Scattering
SCF SKPI-CUL1-F box protein
SIDA Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis
SSA Single Strand annealing
TAR TAt Responsive element
TLR Toll-Like Receptor
TRIM TRIpartite Motif
UDG Uracil DNA Glycosylase
VIH Virus de l'Immunodéficience Humaine
VSV Vesicular Stomatitis Virus
WPRE Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element

Introduction Bibliographique

Tout au long de sa vie, une cellule eucaryote est soumise à de nombreuses atteintes à l'intégrité de son génome (mutations, cassures simple ou double brin, translocations,...). Par exemple, une part non négligeable des cancers sont liés à des mouvements de chromosomes, tels que les translocations (Gasparini et al., 2007; Meaburn et al., 2007). Mais d'autres éléments du génome peuvent également provoquer des instabilités, notamment les éléments mobiles. C'est notamment le cas de l'élément LINE (Dewannieux et al., 2003; Esnault et al., 2000; Kazazian and Goodier, 2002; van den Hurk et al., 2007), des rétrovirus endogènes (Ruprecht et al., 2008) et des rétrotransposons (Gao et al., 2008; Mieczkowski et al., 2006).

Certains virus comme le papillomavirus ou les hépatites sont également parfois intégrés dans le génome de la cellule infectée. Ainsi, les Adeno-Associated Virus (AAV) peuvent dans certains cas s'intégrer au génome cellulaire, notamment en cas d'infection à forte dose virale. L'intégration se ferait préférentiellement sur le chromosome 19, porteur d'une séquence d'ADN permettant la fixation d'une protéine virale, Rep78/68. Cette protéine, possédant des activités de liaison à l'ADN, d'hélicase et d'endonucléase, serait responsable de l'intégration en favorisant les recombinaisons (Smith, 2008).

De même, les papillomavirus (HPV), se répliquant normalement sous formes épisomales, peuvent parfois s'intégrer au génome cellulaire et sont alors liés à de graves lésions cancéreuses. L'intégration virale se ferait de manière aléatoire dans le génome et induirait une expression dérégulée de deux protéines virales, E6 et E7. Ces dernières interagissent avec de nombreux partenaires cellulaires dont p53 et RB et perturberaient donc des processus cellulaires essentiels tels que l'apoptose et le cycle cellulaire. Ce processus favorise la progression vers le cancer et augmente les instabilités chromosomiques (Mammas et al., 2008).

Le virus de l'hépatite B (HBV) est associé au carcinome hépatocellulaire et est également capable de s'intégrer au sein du génome de la cellule infectée. Cette intégration provoque des fortes perturbations chromosomiques telles que la perte ou le gain de chromosomes ou de portions de chromosomes. Souvent, ces mouvements chromosomiques impliquent les gènes de suppresseurs de tumeurs comme p53, Rb et la cycline D1. De plus, l'expression des protéines virales HBx et MHVst, interagissant avec de nombreuses protéines cellulaires, module le cycle cellulaire, l'apoptose, les voies de signalisation et provoque un stress oxydatif et des instabilités chromosomiques (Park et al., 2007).

Il existe également des infections virales qui sont systématiquement intégratives. Ainsi, la famille des rétrovirus est exclusivement composée de membres ayant la propriété d'intégrer leur ADN dans le génome de la cellule hôte. C'est cette propriété fondamentale qui fait de ces virus des outils intéressants pour les thérapies géniques. En effet, cette capacité intégrative permet la complémentation du gène malade par un gène sain, de manière permanente. Au sein de cette famille virale, certains membres sont connus pour provoquer des

cancers systématiques tandis que d'autres tels que le Virus de l'Immunodéficience Humaine VIH n'engendrent aucune lésion de ce type.

Le présent projet avait pour objectif d'identifier les mécanismes cellulaires déclenchés lors de l'intégration d'un ADN étranger au sein du génome. Nous avons choisi de provoquer l'intégration de cet ADN étranger à la cellule par le biais du VIH. Ainsi, dans le but de caractériser notre outil, les deux premiers chapitres de cette introduction bibliographique seront consacrés au VIH et à sa protéine Intégrase, responsable de l'insertion de l'ADN viral dans le génome de la cellule infectée.

Les modifications cellulaires induites par l'intégration ont été analysées à l'aide de deux techniques globales, la première portant sur les ARN, la seconde sur les protéines. Nous avons pu constater que la majorité des fonctions cellulaires étaient perturbées suite à l'intégration, les plus importantes seront détaillées dans le chapitre 3.

Enfin, bien qu'aucune étude portant directement sur les modifications cellulaires induites par l'intégration n'ait été réalisée, des travaux portant sur les modifications cellulaires induites par l'infection au VIH ont été effectués. Puisque de telles études sont basées sur le cycle réplcatif complet du VIH, elles comportent donc l'étape d'intégration qui nous est d'un intérêt particulier et elles seront donc abordées dans le chapitre 4.

Chapitre 1 : le Virus de l'Immunodéficience Humaine, les rétrovirus et leurs dérivés

C'est en 1892 que le premier virus (Tobacco Mosaic Virus) a été découvert et en 1901 qu'a été identifié le premier virus humain, responsable de la fièvre jaune. Encore de nos jours de nouveaux virus sont découverts, c'est notamment le cas du Mimivirus, du Sputnik Virus et du Marseillevirus identifiés en 2003, 2008 et 2009 respectivement (Boyer et al., 2009; La Scola et al., 2003; La Scola et al., 2008). A ce jour, les virus sont définis comme (i) des parasites obligatoires ; en effet, ils sont entièrement dépendants des machineries cellulaires pour assurer leur reproduction et (ii) des entités possédant un génome ARN ou ADN et pouvant être présents à l'état de virion (particule virale permettant la transmission du génome à d'autres cellules ou d'autres organismes). Les virus sont de tailles variables (10 nm à 14 000 nm) mais ne peuvent être observés que par microscopie électronique ou rayons X. Actuellement le comité international de classification des virus (ICTV) a répertorié plus de 50 000 virus de plantes, vertébrés, invertébrés, et bactéries répartis en six ordres et plus de 85 familles.

I/ Biologie du Virus de l'Immunodéficience Humaine

A/ La famille des rétrovirus

Parmi ces familles, on retrouve celle des rétrovirus (*Retroviridae*) qui se définit par des virus composés d'une enveloppe et d'une capside icosaédrique et contenant deux molécules d'ARN monocaténares identiques. Le cycle réplcatif des rétrovirus contient deux particularités : la réverse transcription de l'ARN viral en ADN et l'intégration de ce dernier dans le génome de la cellule infectée.

A ce jour, le comité international de classification des virus a divisé la famille des *Retroviridae* en deux sous familles : les *orthoretroviridae* et les *spumaretroviridae*. Les *spumaviridae* ne contiennent qu'un seul genre, les spumavirus qui se caractérisent par des infections persistantes et asymptomatiques. Ils présentent un cycle réplcatif particulier. En effet, le bourgeonnement des particules virales s'effectue au niveau du réticulum endoplasmique puis l'étape de réverse transcription débute au sein de la cellule productrice tandis que la maturation complète des virions a lieu dans le cytoplasme de la cellule infectée. La sous famille des *orthoviridae* se divise en six genres (Tableau 1). Les cinq genres alpha, bêta, gamme, delta, epsilon correspondent à des virus au pouvoir oncogène tandis que le

genre des lentivirus se caractérise par des infections lentes et mortelles. Les lentivirus présentent la particularité de pouvoir infecter les cellules quiescentes.

Sous famille	Genre	Membres les plus connus
<i>Orthoretroviridae</i>	Alpharétrovirus	Avian Leukosis Virus Avian Sarcoma Virus Rous Sarcoma Virus
	Bétarétrovirus	Jaagsiekte Sheep RetroVirus Mouse Mammary Tumor Virus
	Gammarétrovirus	Murine Leukemia Virus Feline leukemia virus
	Deltarétrovirus	Bovine leukemia virus
	Epsilon-rétrovirus	Walleye dermal sarcoma virus
	Lentivirus	Simian Immunodeficiency Virus Human Immunodeficiency Virus Feline Immunodeficiency Virus Visna Virus
<i>Spumaviridae</i>	Spumavirus	Foamy virus

Tableau 1 : Classification de la famille des *Retroviridae*.

B/ Le VIH, un lentivirus

1/ Pathologies associées au VIH

Au sein des lentivirus, un des membres les plus étudié est le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Isolé en 1983 par l'équipe de L.Montagnier (Barre-Sinoussi et al., 1983) puis par celle de Gallo (Popovic et al., 1984), le VIH, agent causal du SIDA, touche actuellement plus de 33 millions de personnes dans le monde avec plus de 7 000 cas découverts par jour (Chiffres 2010 de l'OMS). Le continent Africain, le plus touché, recense plus de 65% du total mondial de séropositifs (Figure 1). Deux souches de VIH ont été répertoriées, VIH-1 et VIH-2. Elles diffèrent légèrement dans leur organisation génétique. Cependant, c'est la souche VIH-1 qui est responsable de la pandémie mondiale.

L'infection par le VIH, caractérisée par une atteinte du système immunitaire, se divise en trois stades (pour une revue détaillée voir (Levy, 1993)). La primo-infection, constituant le premier stade, est le plus souvent asymptomatique. Elle est suivie par une seconde phase asymptomatique pouvant durer de 10 à 15 ans. Pendant, cette phase, le virus se multiplie en infectant les cellules CD4⁺ du système immunitaire, les lymphocytes et macrophages, et



Figure 1. Prévalence du virus de l'immunodéficience humaine dans le monde au 1^{er} décembre 2008 (OMS).

provoque leur mort via différents mécanismes. Ainsi, des phénomènes de fusion cellulaire ont lieu entre des cellules saines et des cellules infectées présentant la protéine d'enveloppe à leur surface (Denizot et al., 2008). La mort cellulaire peut également survenir par apoptose notamment via l'action de la protéine virale Vpr (Muthumani et al., 2005; Zhao et al., 2005). Enfin, les ADN viraux non intégrés s'accumulent dans le cytoplasme cellulaire, seraient associés à un effet cytopathique (Pauza et al., 1990; Shaw et al., 1984). Le dernier stade dénommé SIDA, Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise, se caractérise par de nombreuses infections opportunistes associées à un taux de lymphocytes CD4⁺ faible (inférieur à 200/mm³). A ce stade la destruction des cellules CD4⁺ ne peut pas être compensée par l'organisme et de nombreuses maladies opportunistes s'installent. Les patients en stade SIDA présentent notamment des infections comme la tuberculose, la toxoplasmose, l'herpès, un sarcome de Kaposi,... Le décès du patient survient à la suite de ces infections, le système immunitaire de l'organisme n'étant plus suffisamment efficace. A ce jour, aucun traitement médical curatif n'est disponible pour lutter contre le VIH. Néanmoins, la maladie peut être retardée par la trithérapie, combinant des antirétroviraux ciblant les étapes de réverse transcription, de fusion ou de maturation.

2/ Structure de la particule virale

Le VIH est un virus de forme sphérique (Figure 2) se composant d'une enveloppe, de diverses protéines structurales et de protéines enzymatiques.

a. les protéines de structure

Parmi les protéines de structure, issues du précurseur protéique Gag, on retrouve la protéine MA, ou matrice, une protéine de 17 kDa. Cette protéine de structure tapisse la face

intérieure de l'enveloppe virale et permet l'ancrage des protéines gp41 et gp120 dans cette dernière. La protéine MA contient également un signal NLS de localisation nucléaire et se retrouve comme composant du complexe de pré-intégration, participant ainsi à l'adressage de l'ADN viral au noyau (Freed, 2001; Haffar et al., 2000; Turner and Summers, 1999).

La protéine de capsid, dite CA, de 24 kDa est également une protéine de structure. Elle est maturée une fois la particule virale bourgeonnée hors de la cellule et prend alors une forme conique (Freed, 2001; Mascarenhas and Musier-Forsyth, 2009; Turner and Summers, 1999).

La dernière protéine de structure, la protéine de nucléocapside ou NC-p7, entoure les brins d'ARN pour les protéger. Responsable de l'encapsidation des ARN viraux par son interaction avec la séquence Psi, elle joue également un rôle de chaperonne et favorise l'initiation et l'élongation de la réverse transcription (Berglund et al., 1997; Freed, 2001; Levin et al., 2005; Sakaguchi et al., 1993; Thomas and Gorelick, 2008; Turner and Summers, 1999).

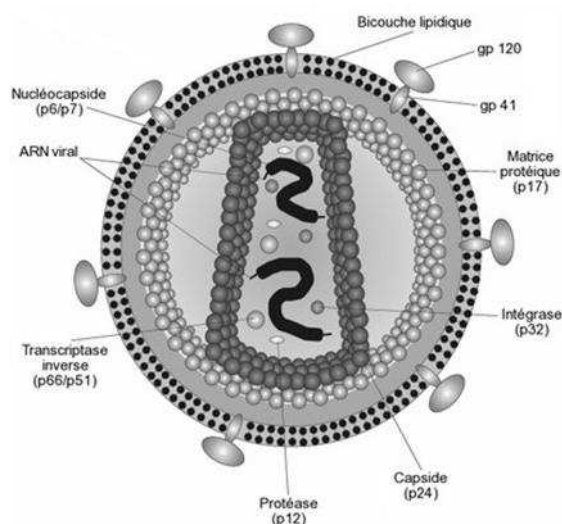


Figure 2. Structure et composition de la particule virale du VIH. Le virion est composé (i) d'une enveloppe, formée par les protéines gp120 et gp41 ancrées dans la bicouche lipidique issue de la cellule productrice, (ii) de protéines de structure (Matrice, Capsid et Nucléocapside), (iii) d'enzymes (Réverse transcriptase, Intégrase et Protéase) et (iv) d'un génome, formé de deux brins identiques d'ARN+.

b. les enzymes virales

Les trois enzymes virales sont issues du précurseur protéique Gag-Pol. La reverse transcriptase, nommée RT (p51/p66), est une enzyme à double fonction. Elle possède deux composantes : une DNA polymérase RNA dépendante qui permet la formation de l'ADN viral en prenant l'ARN comme matrice et une RNaseH qui dégrade l'ARN viral au fur et à mesure du processus de réverse transcription (Freed, 2001; Turner and Summers, 1999).

L'intégrase ou IN, protéine de 32 kDa est responsable de l'insertion de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire. Cette protéine nous intéresse plus particulièrement et sera donc détaillée dans le chapitre II.

La dernière enzyme virale, nommée protéase (PR, 12 kDa) agit pendant et après le bourgeonnement des particules virales (Freed, 2001; Turner and Summers, 1999). Elle clive le précurseur polyprotéique Gag en MA/CA/NC et permet ainsi la structuration de la capside et de la nucléocapside. Cette étape est couramment appelée maturation des particules virales, sans laquelle les virions ne seraient pas infectieux.

c. l'enveloppe

L'enveloppe du VIH est directement issue de la bicouche lipidique de la cellule infectée. Deux glycoprotéines virales s'y ajoutent : la gp120 et la gp41. Toutes deux sont à l'origine issues du même précurseur protéique : gp160 dont le clivage a lieu dans le réticulum endoplasmique. La gp120 ou SU, est responsable de la reconnaissance et de l'attachement du virion sur les récepteurs cellulaires CD4, CCR5 et CXCR4 tandis que la gp41 ou TM est directement responsable de la fusion membranaire (Freed, 2001; Turner and Summers, 1999).

d. les protéines régulatrices et les protéines accessoires

Le VIH est considéré comme un rétrovirus complexe car il code pour de très nombreuses protéines régulatrices et accessoires (Freed, 2001; Li et al., 2005).

Parmi les plus importantes, on retrouve Tat et Rev, deux protéines régulatrices. Tat, protéine de 14 kDa est un trans-activateur transcriptionnel. Elle se lie à la séquence TAR présente sur l'ARN viral pour permettre à la fois l'initiation et l'élongation de la transcription à partir des LTR viraux (Freed, 2001; Pugliese et al., 2005). Les cellules eucaryotes contrôlent de manière précise l'export des ARNm. Ainsi, seuls les ARNm épissés sont exportés du noyau. Néanmoins, dans le cas d'une infection par le VIH, des ARNm non épissés ou partiellement épissés sont produits. La protéine virale Rev (19 kDa) permet de contrer les contrôles cellulaires. Cette protéine se lie à la séquence RRE des ARNm viraux et recrute l'exportine-1 et Ran. Toutes deux impliquées dans le mécanisme d'export des ARNm cellulaires, elles permettent le passage des ARNm viraux, non épissés ou partiellement épissés, à travers les pores nucléaires. Une fois dans le cytoplasme, le complexe d'export se dissocie et Rev est rapatriée dans le noyau grâce à son signal NLS. Rev facilite ainsi l'export de ces ARN non épissés ou simplement épissés (Freed, 2001; Suhasini and Reddy, 2009).

Quatre protéines accessoires ont également été identifiées chez le VIH. Ainsi, la protéine Vif, de 23 kDa, contrecarre les actions inhibitrices de certains facteurs cellulaires

comme APOBEC3G et facilite la stabilisation du complexe de réverse transcription (Freed, 2001; Goila-Gaur et al., 2008; Li et al., 2005; Ohagen and Gabuzda, 2000). Nef, une protéine de 27 kDa, provoque la dégradation des récepteurs CD4. Ce mécanisme permet (i) d'empêcher la séquestration des protéines d'enveloppe au niveau du réticulum endoplasmique, augmentant ainsi la production virale et (ii) de prévenir des surinfections. Nef entraîne également la dégradation des récepteurs CMH-I, empêchant probablement la détection des cellules infectées par les lymphocytes cytotoxiques, mais elle est également capable d'inhiber la réponse cellulaire en interférant avec les voies de signalisation. Nef inhibe également le processus d'apoptose, et augmente l'infectivité des virions (Das and Jameel, 2005; Freed, 2001; Li et al., 2005). La protéine Vpr (14 kDa) agit à différents niveaux. Elle permet l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et provoque l'apoptose mais est également un constituant du Complexe de Pré-Intégration (PIC) (Andersen et al., 2008; Freed, 2001; Le Rouzic and Benichou, 2005; Li et al., 2005; Popov et al., 1998; Zhao et al., 2005). Enfin Vpu favorise la production virale et le bourgeonnement des virions et influence la dégradation des CD4 (Freed, 2001; Guatelli, 2009; Li et al., 2005).

3/ Le génome viral

a. les régions codantes

Le génome du VIH, long de 9,5 kb, contient des séquences codantes et des séquences non codantes. Les régions codantes des rétrovirus se caractérisent par trois grandes séquences : *gag*, *pol* et *env*. Dans le cas du VIH, le gène *gag* code pour les protéines de structure, matrice, capsid et nucléocapsid (Figure 3). Le gène *pol* recouvre partiellement le gène *gag* et contient les séquences des enzymes virales, protéase, réverse transcriptase et intégrase tandis que le gène *env* code les glycoprotéines de l'enveloppe gp120 et gp41. Comme mentionné précédemment, le VIH fait partie des rétrovirus complexes, c'est-à-dire que son génome code pour de nombreuses autres protéines virales en plus des protéines classiques précédemment citées. Les gènes de ces protéines régulatrices et accessoires sont répartis tout au long du génome du VIH, parfois avec des recouvrements de séquence. Les gènes *tat* et *rev* sont également fragmentés en deux parties, de part et d'autre du gène *env*.

b. les régions non codantes

De nombreuses séquences non codantes dites cis-régulatrices sont réparties sur le génome viral (Figure 3).

Les LTR (Long Terminal Repeat) se trouvent aux extrémités 5' et 3' du génome viral. L'ARN viral comporte le LTR 5' composé des séquences R-U5 tandis que le LTR 3' contient

U3-R. L'ADN viral contient des LTR identiques en 3' et en 5', portant les séquences U3-R-U5. En effet, l'étape de réverse transcription provoque la copie des LTR de part et d'autre du génome. La séquence R est responsable de ce phénomène, c'est elle qui est utilisée pour les sauts de brins lors de la réverse transcription. La région U3 du LTR 5' sert de promoteur. En effet, elle contient de nombreux sites de liaison aux facteurs de transcription (Nf-kB, SP1). La transcription débute alors au commencement de la séquence R du LTR 5' et se termine à la fin de la séquence R du LTR 3' expliquant que l'ARN viral ne porte pas des LTR identiques en 3' et 5'. C'est finalement la région U3 du LTR 3' qui contient le site de polyadénylation. Les LTR contiennent également la séquence *att*. Reconnues par l'intégrase, ces séquences lui permettent d'effectuer le processus d'intégration (Brin and Leis, 2002).

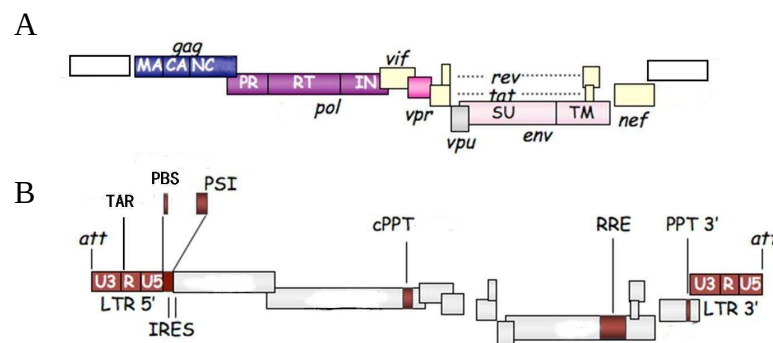


Figure 3. Régions codantes et régulatrices du génome du VIH. A. Les régions codantes. Le génome viral est composé de trois principaux cadres de lecture : (i) gag codant les protéines structurales Matrice (MA), Capside (CA) et Nucléocapside (NC), (ii) pol codant pour les enzymes protéase (PR), Reverse Transcriptase (RT), et Intégrase (IN), (iii) et env codant pour les glycoprotéines d'enveloppe de surface (SU) et transmembranaire (TM). S'y ajoutent les gènes tat et rev codant les protéines régulatrices et les gènes vif, vpr, vpu et nef codants les protéines dits accessoires. B. les régions régulatrices. Le génome du VIH est encadré par les Long Terminal Repeat (LTR) et comprend de nombreuses séquences régulatrices dont (i) les séquences att servant à la reconnaissance par l'intégrase, (ii) le primer binding site (PBS), le polypurine tract (PPT) et le central polypurine tract (cPPT) agissant lors de la réverse transcription, (iii) la séquence Psi responsable de l'encapsidation de l'ARN génomique, (iv) les IRES, sites d'entrée interne des ribosomes, (v) le RRE, rev-responsive element interagissant avec Rev pour l'export des ARNm non épissés et (vi) TAR, tat-responsive element, se liant à Tat pour permettre l'activation transcriptionnelle.

La séquence TAR (Tat Responsive Element) se situe dans la région R et possède une structure secondaire particulière. Cette séquence associée à Tat permet l'élongation de la transcription en liant la protéine Tat. Une fois Tat et TAR liées, la transcription est favorisée jusqu'à 100 fois (Freed, 2001; Pond et al., 2009).

La séquence RRE (Rev Responsive Element) se situe sur les transcrits non épissés du gène *env* (Charnay et al., 2009; Freed, 2001). Il est formé de très nombreuses structures secondaires et possède une forte affinité pour la protéine Rev. Comme mentionné plus haut, cette interaction permet l'export des ARNm viraux non épissés ou partiellement.

Le génome viral contient également de nombreuses autres séquences. Le PBS (Primer Binding Site) correspond à la séquence sur laquelle se fixe l'ARNt^{Lys} lors de l'initiation de la réverse transcription tandis que les séquences PPT / cPPT (central PolyPurine Tract) interviennent dans la synthèse du second brin d'ADN (Freed, 2001).

Le début du gène gag porte une séquence régulatrice fondamentale. La séquence Psi permet en effet la reconnaissance de l'ARN viral par la nucléocapside au moment du bourgeonnement, et est ainsi responsable de l'encapsidation du génome viral (Berglund et al., 1997).

De façon classique, la traduction débute par la reconnaissance du codon initiateur et de la coiffe des ARNm. Cependant, une séquence intervenant dans l'initiation de la traduction a été identifiée : l'IRES (Internal Ribosome Entry Site) se trouve dans la région LTR 5' et possède la capacité de recruter directement les ribosomes et le complexe d'initiation de la traduction (Balvay et al., 2009).

4/ Le cycle de réplication

a. la phase précoce

Le cycle de réplication du VIH (Figure 4) débute par la reconnaissance spécifique des cellules portant le récepteur CD4 à leur surface. L'attachement se produit grâce à l'interaction entre ce récepteur et la glycoprotéine virale gp120. Néanmoins, pour que l'infection ait lieu, la présence d'autres récepteurs est requise. Ainsi, dans le cas du VIH, des récepteurs aux chémokines nommés CCR5 et CXCR4 ont été identifiés comme facteurs essentiels pour permettre l'entrée du virus. L'étape de fusion à la membrane cellulaire est réalisée par la seconde glycoprotéine, gp41.

A la suite de l'entrée du virus dans la cellule, intervient une étape de décapsidation lors de laquelle le complexe de réverse transcription est libéré dans le cytoplasme. La conversion de l'ARN viral simple brin en ADN double brin, initiée dans le cytoplasme, est effectuée par la réverse transcriptase (Figure 5). Une fois synthétisé, l'ADN viral peut se présenter sous différentes formes linéaires et circulaires, qui seraient présentes à la fois dans le cytoplasme et le noyau (Butler et al., 2002; Farnet and Haseltine, 1991; Pierson et al., 2002; Zack et al., 1992). Les formes circulaires dites 1 LTR sont certainement issues de la recombinaison des LTR, tandis que les formes circulaires 2 LTR seraient issues de la ligation des extrémités virales ou de processus d'autointégration. Une transcription précoce a pu être observée à partir de ces formes virales non intégrées, permettant vraisemblablement la production des protéines Tat, Nef et Rev (Stevenson et al., 1990; Wiskerchen and Muesing,

1995; Wu and Marsh, 2001; Wu and Marsh, 2003). Pour être intégré, l'ADN viral est transporté vers le noyau au sein du complexe de pré-intégration (PIC). Ce complexe est formé de différentes protéines virales et cellulaires dont la reverse transcriptase, l'intégrase, la matrice, Vpr, HMGA1 (Farnet and Bushman, 1997; Freed, 2001; Haffar et al., 2000; Khiytani and Dimmock, 2002; Le Rouzic and Benichou, 2005; Popov et al., 1998). Une fois dans le noyau, l'ADN viral est inséré dans le génome de la cellule infectée par la protéine intégrase. Le processus d'intégration particulièrement intéressant pour cette étude sera détaillé dans le chapitre II en même temps que la protéine qui en est responsable.

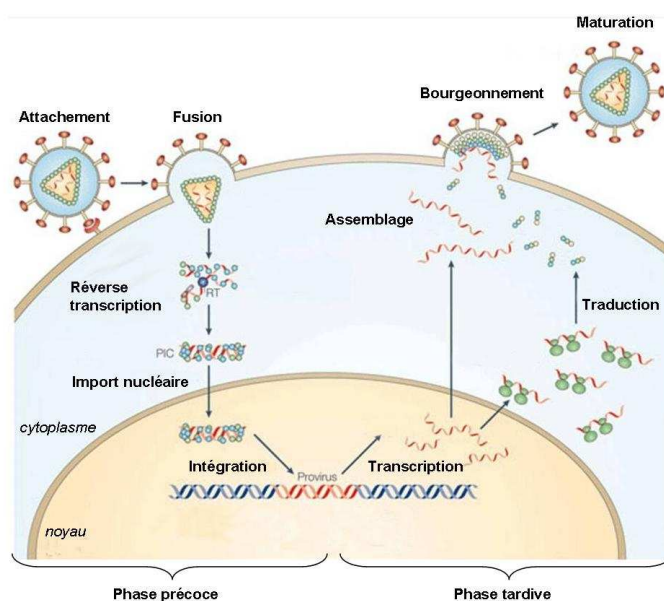


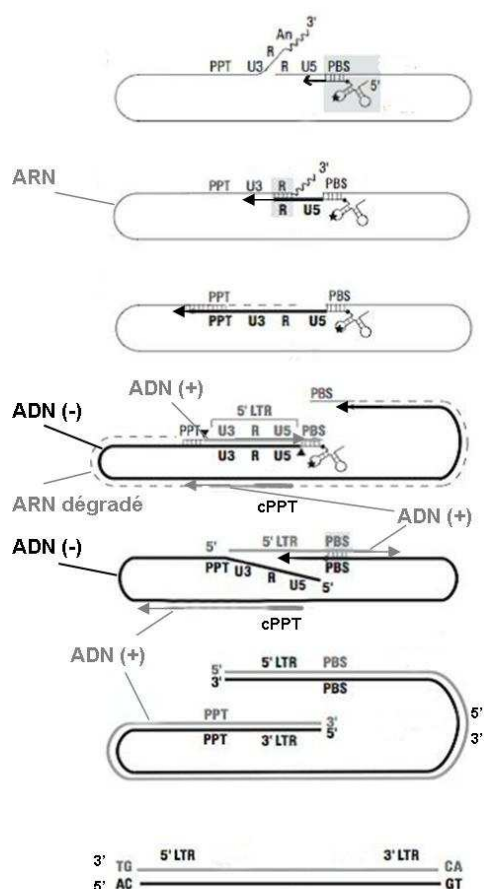
Figure 4. Le cycle de réplication du VIH (Adapté de Nisole et al., 2005). La réplication du VIH se divise en deux phases : (i) la phase précoce se caractérise par l'entrée du virus, la conversion de l'ARN en ADN et l'intégration de ce dernier au sein du génome cellulaire, (ii) la phase tardive correspond aux étapes de transcription et traduction qui aboutiront à la production des protéines virales ; acheminées à la membrane plasmique, elles s'y assemblent pour former de nouvelles particules virales qui subiront ensuite une dernière étape de maturation avant d'être infectieuses.

b. la phase tardive

La seconde phase de l'infection débute par la transcription d'ARNm épissés et non épissés. La protéine d'enveloppe est produite à partir d'un ARNm partiellement épissé. Dans le réticulum endoplasmique, ce dernier donne naissance au précurseur protéique gp160 qui sera ensuite clivé en SU+TM avant que les protéines soient apportées à la membrane cellulaire. Les différentes protéines accessoires sont issues d'ARNm partiellement épissés (Vif, Vpr, Vpu) ou multi-épissés (Tat, Rev, Nef) et sont acheminées vers la membrane plasmique pour être incorporées dans les virions. Le précurseur polyprotéique Gag est issu de

la traduction de l'ARNm non épissé. C'est un décalage du cadre de lecture de ce même ARN qui est responsable de la formation du précurseur protéique Gag-Pol. Une fois les polyprotéines virales produites, elles sont acheminées vers la membrane cellulaire, où elles s'assemblent pour former une nouvelle particule virale. Au moment du bourgeonnement, le virion est immature. Sous l'action de la protéase, les polyprotéines Gag et Gag-Pol sont clivées pour former les protéines virales indépendantes. Le précurseur polyprotéique Gag engendre ainsi les protéines MA, CA et NC tandis que le Gag-Pol forme les enzymes virales. Les protéines structurales, MA, CA et NC se réarrangent ensuite pour donner naissance à une particule virale infectieuse. Pour une revue complète sur le cycle de réplication, voir (Freed, 2001).

Figure 5. Le processus de réverse transcription (Adapté de Bampi et al., 2004). L'initiation de la réverse transcription s'effectue par le recrutement d'un ARNt^{Lys} au niveau de la séquence PBS de l'ARN. La synthèse d'ADN court jusqu'en 5' et forme le brin noté ADN (-). Ce brin d'ADN est ensuite transféré à l'extrémité 3' de l'ARN via l'homologie de séquence entre les régions R. L'élongation se poursuit alors jusqu'à l'extrémité 5', le premier brin d'ADN est en grande partie formé. En parallèle, la fonction RNaseH de la RT permet la dégradation progressive de la matrice ARN. Une seule petite portion demeure intacte, au niveau des séquences PPT et cPPT. Elles permettent l'initiation de la formation du brin d'ADN (+). L'élongation de ce second court jusqu'en 3' puis l'ARNt^{Lys} se dissocie l'ensemble et l'homologie des séquences PBS permet au brin (+) d'être transféré sur le (-) pour finir sa formation. La terminaison de la synthèse des LTR s'effectue finalement en simultanée sur les deux brins d'ADN entraînant une copie de séquence. Chaque LTR est alors composé des séquences U3-R-U5.



c. les co-facteurs du cycle du VIH

Le cycle viral fait intervenir de nombreuses protéines cellulaires pour son déroulement (Freed and Mouland, 2006; Goff, 2007). Ces co-facteurs agissent à diverses étapes de la réplication (Figure 6).

Outre les machineries cellulaires de base permettant le transport vers le noyau, la transcription, l'épissage des ARN, la traduction, on retrouve également quelques facteurs

spécifiques du VIH. Parmi eux, le récepteur CD4, et les co-récepteurs CCR5 et CXCR4 sont essentiels à la reconnaissance des cellules cibles par le VIH (Freed and Mouland, 2006). L'entrée dans la cellule s'effectue également grâce aux rafts lipidiques de la membrane plasmique et l'infection est favorisée par l'association ICAM-1/LFA1 à la surface cellulaire (Freed and Mouland, 2006; Imbeault et al., 2009)

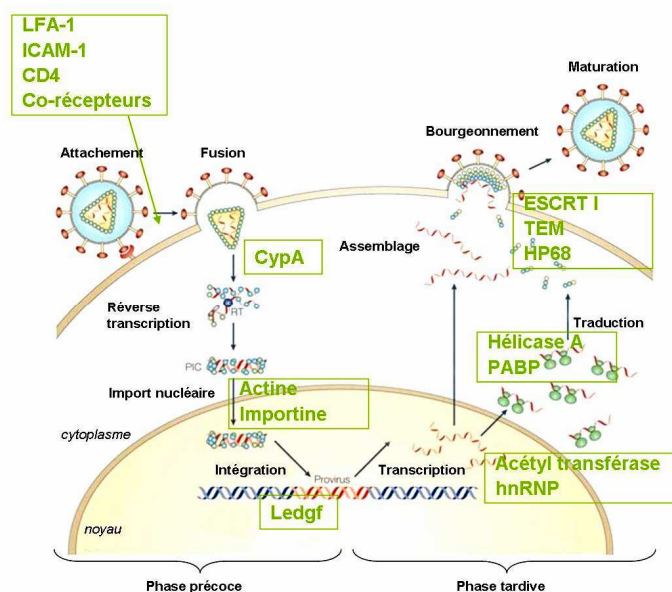


Figure 6. Les principaux facteurs cellulaires nécessaires à la réplication du VIH (Adapté de Nisole et al., 2005)

Lors de l'étape de décapsidation et l'initiation de la réverse transcription, la protéine de capsid s'associe à la cyclophiline A (CypA) (Braaten et al., 1996; Luban et al., 1993; Mascarenhas and Musier-Forsyth, 2009). La CypA, une protéine cellulaire incorporée dans les virions au niveau des cellules productrices, jouerait notamment un rôle dans la structuration des protéines. Néanmoins le rôle exact de l'interaction CypA / CA reste mal compris (Hatzioannou et al., 2005; Sokolskaja et al., 2004).

Par la suite, l'étape de transport du complexe de pré-intégration vers le noyau ainsi que l'entrée dans le noyau s'effectue grâce à l'action des protéines du cytosquelette comme l'actine et celles des pores nucléaires comme les importines (Freed and Mouland, 2006; Greene and Peterlin, 2002).

Une fois dans le noyau, l'intégration de l'ADN viral requiert divers facteurs cellulaires dont nous avons déjà parlé, le plus connu étant Ledgf/p75 (Busschots et al., 2005; Busschots et al., 2007; Pandey et al., 2007). L'intégration est finalisée par l'action des mécanismes de

réparations cellulaires. Les protéines des systèmes de recombinaison homologue (HR) et non homologue (NHEJ) seraient requis (Daniel et al., 2004a; Daniel et al., 2003; Daniel et al., 1999; Daniel et al., 2004b; Desfarges et al., 2006; Li et al., 2001a; Nakai-Murakami et al., 2007; Skalka and Katz, 2005; Taganov et al., 2001). L'expression des gènes viraux nécessite l'action de l'hélicase A (RHA) et hnRNPs qui s'associe aux ARN afin d'en faciliter l'épissage et la traduction (Bolinger et al., ; Freed and Mouland, 2006). L'expression virale est également dépendante de l'acétylation des histones H3 et H4 (Lusic et al., 2003). La PABP, jouant un rôle lors de la traduction, est clivée par la protéase du VIH afin d'en abolir la fonction (Bushell and Sarnow, 2002; Lloyd, 2006; Smith et al., 2008).

Enfin, au moment de l'assemblage et du bourgeonnement, la particule virale utilise la protéine Tsg101, membre du complexe de transport via les endosomes (ESCRT-1) qui présente la propriété de se lier à Gag (Freed and Mouland, 2006; Greene and Peterlin, 2002). Le facteur d'assemblage HP68 est également requis lors des dernières étapes du cycle viral. Enfin, des microdomaines membranaires, riches en protéines du complexe ESCRT-1, en lipides et en tétraspanines (CD9, CD63, ...), nommés TEM servent de plateforme au bourgeonnement viral (Freed and Mouland, 2006; Waheed and Freed, 2009).

II/ Les vecteurs dérivés du VIH

A/ Construction des vecteurs

Depuis maintenant quelques années, les rétrovirus, et particulièrement le VIH, sont des cibles préférentielles pour le développement des thérapies génétiques à base de vecteurs viraux (Baum et al., 2006; Cockrell and Kafri, 2007; D'Costa et al., 2009; Escors and Breckpot). Ils présentent en effet de nombreux avantages dont l'intégration du transgène dans le génome de la cellule, favorisant ainsi son expression à long terme. Les lentivirus possèdent en plus la capacité d'infecter des cellules quiescentes et la propriété de n'engendrer qu'une faible réponse inflammatoire. Les vecteurs dérivés du VIH sont en constante évolution afin d'assurer un maximum de sécurité (Figure 7). Toutes les études sont basées sur des vecteurs non réplicatifs produits par combinaison de 3 cassettes différentes (Pluta and Kacprzak, 2009; Salmon and Trono, 2007).

Une première cassette « vecteur », comprenant les éléments *cis* (LTR, Psi, TAR,...) ainsi que le transgène et son promoteur, est associée à une seconde cassette comprenant les éléments en *trans* (protéines de structure et enzymes virales). La séparation des éléments agissant en *cis* dans une première cassette et des éléments agissant en *trans* dans une seconde permet de minimiser la formation de particules recombinantes répliquatives. Actuellement,

pour plus de sûreté, les gènes des protéines accessoires Vif, Vpr, Vpu et Nef sont éliminés de la seconde cassette et le gène de la protéine accessoire Rev est séparé des autres gènes *gag* et *pol*. De plus, la délétion de la région U3 du LTR 3' (Self INactivated) dans la cassette « vecteur » permet également de limiter la réplication des vecteurs (Yu et al., 1986).

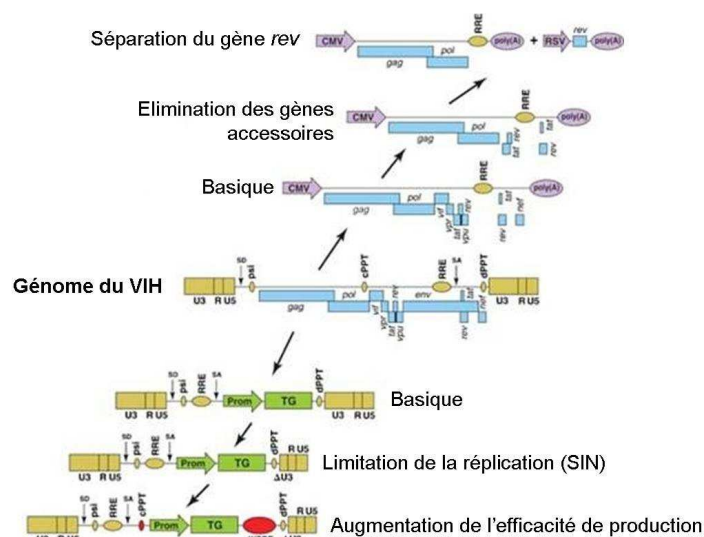


Figure 7. Evolution dans la construction des vecteurs lentiviraux (D'après Salmon and Trono, 2007). A partir du génome du VIH, les éléments viraux sont séparés sur deux cassettes (i) la première portant les éléments cis ainsi que le transgène ; par la suite, une délétion de la région U3 permet de limiter la réplication du vecteur tandis que l'addition des séquences cPPT et WPRE permet d'améliorer la production virale, (ii) la seconde porte les éléments trans, la sécurité biologique est ensuite améliorée par l'élimination des gènes accessoires et la séparation du gène rev sur une autre cassette. Une dernière cassette portant le gène de l'enveloppe virale doit être ajoutée pour aboutir à un vecteur lentiviral.

D'autres modifications génétiques ont également été apportées. Le vecteur contient désormais un flap central (cPPT) en plus du PPT classique et une séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element). Grâce aux PPT et cPPT, l'initiation de la formation du brin « + » prend place au niveau de deux segments d'ARN non dégradés lors de la reverse transcription, augmentant l'efficacité de la production (Van Maele et al., 2003). Le WPRE permet d'augmenter de 5 fois l'expression de transgène (Zufferey et al., 1999). Néanmoins, les efforts doivent se poursuivre concernant cette séquence. En effet, sa séquence nucléique correspond à une partie du gène X de l'hépatite des marmottes (Woodchuck Hepatitis Virus), codant pour une protéine avec un pouvoir oncogène.

L'expression du transgène peut également être contrôlée par un système inducible à la tétracycline via un Tet répresseur et un Tet opérateur (ou Tétracycline Responsive Element) (Gossen and Bujard, 1992; Kafri et al., 2000) ou par l'utilisation de promoteur tissu-spécifique (Gruh et al., 2008)

Finalement la dernière cassette comporte l'enveloppe de la particule virale. A ce jour, l'enveloppe du VIH, fragile et d'un tropisme limité, est remplacée par l'enveloppe du virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV) qui possède de nombreux avantages. Elle élargie considérablement le tropisme cellulaire des vecteurs, le VSV se fixant sur des récepteurs cellulaires ubiquitaires (Cronin et al., 2005). Cette nouvelle enveloppe est également beaucoup plus stable et consolide la particule virale, permettant des étapes de purification et de concentration par ultracentrifugation, augmentant le titre viral de plus de 100 fois par rapport au VIH sauvage.

Malgré les progrès accomplis, de nombreuses avancées restent à effectuer notamment sur l'intégration du vecteur. En effet, les premières études menées sur des enfants SCID (système immunitaire déficient) utilisant des vecteurs MuLV ont donné des résultats encourageants pour 9 patients sur 10 (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Malheureusement, parmi ces enfants, deux ont développé une leucémie suite à l'insertion du transgène au niveau d'un promoteur cellulaire (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Le virus de la leucémie murine (MuLV), un gammaretrovirus, s'intègre en effet préférentiellement au sein des promoteurs tandis que le VIH cible préférentiellement les gènes transcriptionnellement actifs (Brady et al., 2009; De Palma et al., 2005; Lewinski et al., 2006; Schroder et al., 2002). L'utilisation de vecteurs non intégratifs est aussi envisagée (Banasik and McCray, ; Michelini et al., ; Sarkis et al., 2008; Wanisch and Yanez-Munoz, 2009), l'expression du transgène se faisant à partir des formes virales non intégrées. Une seconde stratégie en cours d'étude consisterait à cibler les sites d'intégration. Un doigt de zinc polydactyl fusionné à l'intégrase permettrait de favoriser de 7 à 10 fois l'intégration sur un site spécifique (Giri et al., 2006), de même la surexpression de la protéine fusion du domaine C-terminal de IN (responsable de sa liaison avec ledgf/p75) et du domaine N-terminal de la protéine HPA α modifierait les sites d'intégration des vecteurs HIV (Silvers et al.).

B/ Production des vecteurs

La production virale s'effectue par transfection transitoire des cellules épithéliales de rein humain (293T) avec 3 ou 4 plasmides différents (correspondant aux cassettes) (Pluta and Kacprzak, 2009; Salmon and Trono, 2007). Plusieurs heures après la transfection (24h-60h), les surnageants sont récupérés, ultracentrifugés pour être concentrés puis purifiés sur gradient de sucrose afin d'éliminer tous les composants pouvant induire une réponse immunitaire.

La titration des vecteurs peut se faire de différentes manières. Si le transgène est « visible », par exemple la GFP, la titration se fait par quantification de l'expression du transgène en cytométrie en flux. Dans le cas contraire, une quantification de la p24 (capside) ou un test d'activité de la reverse transcription peuvent être effectués. Enfin, la méthode de

PCR quantitative qui quantifie l'ADN viral constitue à ce jour une nouvelle voie pour détecter les différentes formes virales présentes dans la cellule.

En condition classique de production, un vecteur VIH avec une enveloppe VSV est produit à raison de 10^6 - 10^7 TU/ml (Transducing Unit), la concentration de la suspension virale permet d'aboutir à un titre de l'ordre de 10^9 - 10^{10} TU/ml.

Chapitre 2 : Intégrase et intégration

Le processus d'intégration ainsi que la protéine qui en est responsable, l'intégrase seront présentés lors de ce chapitre. En effet, ils sont d'un intérêt majeur pour notre étude puisque responsables de l'insertion de l'ADN étranger au sein du génome de la cellule. Seule l'intégrase du VIH sera ici détaillée puisque ce virus constitue notre outil-vecteur d'intégration.

I/ Le processus d'intégration

A/ Les étapes du processus d'intégration

Des études biochimiques ont élucidé le mécanisme d'intégration des rétrovirus bien que la structure exacte et l'organisation du complexe actif restent encore mal connues. Les sites préférentiels d'intégration sont différents selon les virus étudiés. Ainsi, l'intégration du VIH a préférentiellement lieu dans les gènes transcriptionnellement actifs tandis que le MuLV s'intègre plutôt dans les promoteurs des gènes (Brady et al., 2009; De Palma et al., 2005; Lewinski et al., 2006; Schroder et al., 2002). Le processus d'intégration se divise en deux phases essentielles : la coupure en 3' et le transfert de brin. Il se termine par une réparation des lésions chromosomiques engendrées (Figure 8) (Delelis et al., 2008; Lewinski and Bushman, 2005).

1/ Reconnaissance des LTR et coupure en 3'

Cette première étape a lieu dans le cytoplasme au sein du complexe de pré-intégration. Deux nucléotides positionnés à chaque extrémité de l'ADN viral sont coupés. Le clivage prend place du côté 3' d'un dinucléotide extrêmement conservé, CA, dans les séquences *att* en région U3 du LTR 5' et U5 du LTR 3'. Cette réaction de coupure en 3' permet l'exposition des groupes 3'-hydroxyle qui pourront alors être liés à l'ADN cellulaire.

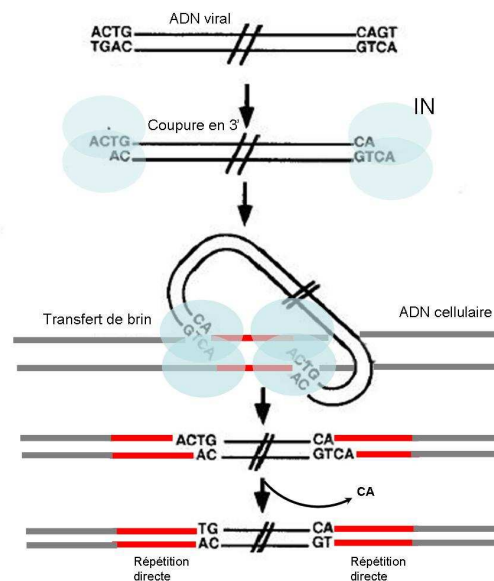


Figure 8. Le processus d'intégration (Adapté de Freed, 2001). Le processus débute par la reconnaissance des extrémités des LTR par un dimère d'intégrases virales. Les deux nucléotides terminaux CA sont alors clivés, ce qui constitue l'étape de coupure en 3'. Les dimères d'intégrases se rapprochent pour former un tétramère et catalyser la réaction de transfert de brin. Cette dernière correspond à la liaison entre les extrémités 3' de l'ADN viral et 5' de l'ADN cellulaire. Les brins d'ADN cellulaires sont clivés à 5pb de distance dans le cas du VIH et l'insertion de l'ADN viral provoque une cassure double brin. Par la suite, les deux nucléotides aux extrémités virales 5' sortantes sont clivés et les machineries de réparations cellulaires terminent le processus en comblant les brèches, ce qui provoque l'apparition de répétitions directes de part et d'autre du provirus.

2/ Transfert de brin

Cette seconde étape constitue l'intégration à proprement dite et se produit dans le noyau. Chaque extrémité coupée de l'ADN viral est insérée dans l'ADN cellulaire par un mécanisme de trans-estérification. Cette action nécessite la coordination d'un atome Mg^{2+} . Dans le cas du VIH, les sites d'intégration des deux extrémités de l'ADN viral sont séparés de 5 pb.

3/ Ligation

L'insertion de l'ADN viral crée une cassure double-brin dans l'ADN cellulaire. La dernière étape du processus correspond à la réparation de cette cassure par les machineries cellulaires (Daniel et al., 2004a; Daniel et al., 2001; Li et al., 2001a; Skalka and Katz, 2005). Les extrémités sortantes de l'ADN viral (les dinucléotides non ligués) sont coupées et la réparation des sites d'intégration, distants de 5 pb, engendre la formation de répétitions directes de part et d'autre du provirus.

B/ Les co-facteurs cellulaires de l'intégrase du VIH

Bien qu'*in vitro*, une intégrase purifiée soit suffisante pour réaliser les étapes de coupure en 3' et de transfert de brin, *in vivo*, la protéine nécessite le soutien de diverses protéines cellulaires. Ces co-facteurs ont été découverts par différentes techniques telles que la co-immunoprécipitation ou système double-hydrise.

1/ Ledgf/p75

La protéine Ledgf/p75, le plus connu et le plus étudié des co-facteurs de l'intégrase du VIH, a été identifiée en co-immunoprécipitation d'une part et double hydrise d'autre part (Cherepanov et al., 2003; Emiliani et al., 2005).

La protéine Ledgf/p75 (Lens epithelium derived growth factor) est membre de la famille des HRP (Hpadoma-derived growth factor Related Protein). Ledgf est une protéine nucléaire qui possède une forte affinité pour la chromatine (Turlure et al., 2006). Encodée par le gène *PSIP1*, Ledgf possède un rôle dans la transcription notamment via son interaction avec le facteur de transcription PC4 (Ge et al., 1998). Ledgf, facteur pro-survie, possède une forte affinité pour les éléments liés au choc thermique et au stress. Elle est notamment responsable de l'activation transcriptionnelle de nombreuses protéines anti-apoptotique ou liées au stress, comme HSP27 et HSP90 (Sharma et al., 2000; Shinohara et al., 2002; Singh et al., 2001). De plus, son lien avec les processus apoptotiques a été souligné par le fait que la protéine est clivée par les principales caspases effectrices, les caspases 3 et 7, ce qui a pour effet d'abolir le rôle pro-survie de Ledgf (Wu et al., 2002).

L'intégrase et Ledgf interagissent en multimères. Ainsi, deux tétramères de l'IN seraient associés à deux monomères de Ledgf lors du processus d'intégration (Cherepanov et al., 2003). Des expériences d'ARNi ont montré que Ledgf était nécessaire pour la localisation nucléaire de l'intégrase du VIH et son association avec la chromatine (Llano et al., 2004b; Llano et al., 2006; Maertens et al., 2003). Cette observation a été confirmée par d'autres études utilisant la surexpression de mutants de Ledgf défectueux pour la localisation nucléaire (Maertens et al., 2004), une protéine IN Q168A défectueuse pour sa liaison avec Ledgf (Emiliani et al., 2005) ou des tests de liaison (Busschots et al., 2005). De plus, Ledgf protégerait l'intégrase d'une dégradation par le protéasome (Llano et al., 2004a) et serait membre du complexe de pré-intégration (Llano et al., 2004b). Il est donc proposé que Ledgf ait pour rôle de cibler le PIC vers les régions transcriptionnellement actives de la chromatine (Bushman, 2003; Engelman, 2005).

La liaison entre les deux protéines a été principalement attribuée au domaine CCD de l'intégrase (Maertens et al., 2003), particulièrement aux résidus 165-173 (Cherepanov et al., 2005; Emiliani et al., 2005). Le domaine de liaison à l'IN, noté IBD (integrase binding

domain), a été localisé dans le domaine C-terminal de Ldgf (Cherepanov et al., 2004; Vanegas et al., 2005)

2/ HMGA1

Cette protéine de liaison à l'ADN module la transcription et structure la chromatine. Elle possède à la fois une capacité de liaison à l'ADN et aux protéines. Cette protéine pourrait jouer un rôle lors du processus d'intégration en rapprochant les LTR et en facilitant la fixation de l'intégrase à l'ADN, en déroulant l'ADN viral (Hindmarsh et al., 1999). HMGA interagirait également avec le PIC (Farnet and Bushman, 1997) et pourrait moduler la liaison des facteurs de transcription sur les LTR du VIH (Henderson et al., 2000). HMGA pourrait également inhiber la transcription à partir du facteur de transcription Jun mais activerait celle avec AP1 et ATF3. De plus, ATF3 serait responsable du recrutement du complexe SWI/SNF sur le promoteur du HIV (Henderson et al., 2004).

3/ INI1

En système double-hybride, la protéine INI1 a été isolée comme interagant de l'intégrase, elle faciliterait la capacité de liaison de l'ADN de l'intégrase (Kalpana et al., 1994). Facteur de transcription, membre du complexe SWI/SNF, sa présence serait requise pour la production virale et elle serait incorporée dans les virions HIV (Yung et al., 2001).

En conditions normales, INI1 et PML sont retrouvés dans les corps PML au sein du noyau. L'infection par le VIH provoque une relocalisation cytoplasmique de ces protéines. De plus, ces deux protéines co-localisent avec le PIC et agiraient sur son transport vers le noyau (Turelli et al., 2001).

4/ BAF

Le PIC contiendrait la protéine BAF ayant pour rôle principal d'empêcher le suicide par autointégration. Découvert comme interagant de l'intégrase par co-immunoprécipitation (Chen and Engelman, 1998), BAF possède la propriété de ponter l'ADN. BAF via son association avec LAP2, protéine de la lamina nucléaire, serait impliquée dans l'organisation structurelle du noyau et serait un composant du PIC (Lin and Engelman, 2003)

De nombreuses autres protéines sont des interactants potentiels de l'intégrase. Ainsi Imp7, une importine qui se lie aux protéines ribosomales et facilite leur import dans le noyau, se lierait à l'intégrase (Ao et al., 2007). La p300 a également été identifiée comme agissant

sur et avec l'IN, via trois résidus lysines spécifiques du C-term de IN (Cereseto et al., 2005). La HSP60, chaperonne ubiquitaire, stimulerait l'action de jonction des ADN via l'intégrase (Parissi et al., 2001). La protéine TTRAP, qui fait partie des corps PML, a elle aussi été identifiée en système double hybride. De par son interaction avec l'intégrase, elle faciliterait le processus d'intégration (Zhang et al., 2001). La protéine DAXX, qui module la mort cellulaire via FAS, interagirait avec les intégrases ALSV et HIV et inhibe l'expression des gènes (Huang et al., 2008). Enfin, la protéine EED, de la famille des PcG, d'abord identifiée comme interactant de la protéine de matrice MA, interagirait avec l'intégrase du VIH en système double hybride et co-localiserait avec l'intégrase en cellules humaines (Violot et al., 2003).

II/ Structure de la protéine intégrase du VIH

L'intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule infectée est une étape clé dans le processus de réplication des rétrovirus. L'ADN viral, une fois produit par le processus de RT, reste associé à de nombreuses protéines virales et cellulaires dans le complexe de pré-intégration. Ce complexe comprend en particulier la protéine intégrase (IN) que nous allons détailler.

A/ Généralités sur la protéine intégrase

L'intégrase des rétrovirus et des rétrotransposons catalyse de manière spécifique l'insertion de l'ADN produit par la RT dans le génome de la cellule hôte. L'intégrase du VIH est une protéine de 32 kDa, longue de 288 acides aminés et composée de trois domaines bien distincts : le core ou domaine central (CCD) possédant l'activité catalytique de l'enzyme, le domaine N-terminal (NTD) ayant la propriété de fixer les ions Zn^{2+} et le domaine C-terminal (CTD) dont la fonction principale est de lier la protéine à l'ADN (Figure 9A) (Delelis et al., 2008). Les tests d'activité *in vitro* sont basés (i) sur l'étude des phénomènes de coupures en 3' et de transfert de brin ayant lieu *in vivo* et *in vitro* et (ii) sur l'activité de désintégration de la protéine n'ayant lieu qu'*in vitro* (Figure 9B).

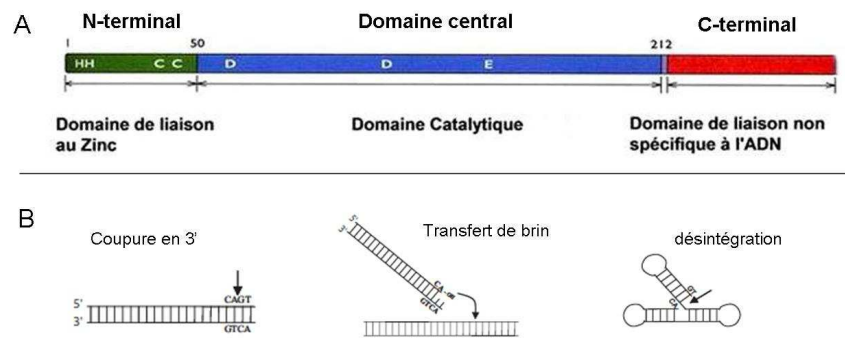


Figure 9. A. Les différents domaines de l'intégrase. La protéine se divise en trois domaines : (i) le domaine N-terminal se caractérise par sa capacité à lier les ions zinc notamment via les résidus conservés HHCC, (ii) le domaine central ou core contenant le site catalytique défini par les résidus D,D,E et reconnaissant l'ADN viral (iii) le domaine C-terminal, responsable de la fixation non spécifique de l'ADN. Les trois domaines sont également impliqués dans la multimérisation de la protéine. **B. Les activités catalytiques *in vitro* de la protéine intégrase (D'après Delelis et al., 2008).** *In vivo* la protéine intégrase catalyse les réactions de coupure en 3' (clivage de deux nucléotides CA), et de transfert de brin (intégration d'un ADN déjà clivé au sein d'un second AND). Une troisième activité catalytique, la réaction de désintégration, est également réalisable *in vitro*. Elle correspond à la réaction inverse du transfert de brin. Ces tests d'activités sont basés sur un marquage radioactif des extrémités d'oligonucléotides mimant les séquences virales. Les produits sont par la suite analysés sur gel de séquence dénaturant.

B/ Fonction des différents domaines de l'intégrase

1/ le core de la protéine

Le domaine catalytique ou core de l'intégrase appartient à la superfamille des DNA/RNA strand transferases/nucleases qui inclut également les transposases bactériennes, la protéine RuvC et la RNaseH (Dyda et al., 1994; Rice and Baker, 2001).

Le core de la protéine s'étend des positions 50 à 212. Il est caractérisé par les trois résidus du site catalytique : DD-35-E, correspondant aux résidus Asp64, Asp116 et Glu152 pour l'intégrase du VIH. Ces trois résidus ont notamment été identifiés chez le VIH par mutagenèse dirigée et tests d'activités. Les intégrases mutées ont ainsi été testées *in vitro* pour leurs différentes activités. Il a été démontré que les intégrases mutées pour les résidus Asp64, Asp116 et Glu152 ne peuvent effectuer qu'entre 0 et 5% des activités de la protéine sauvage (Engelman and Craigie, 1992). Des mutations dans ces résidus entraînent donc l'abolition ou la diminution drastique de toutes les activités catalytiques de la protéine. Mais l'activité catalytique de l'intégrase dépend également de la présence de cations bivalents de type magnésium (Goldgur et al., 1998).

En plus du site catalytique, le domaine central est également impliqué dans la liaison spécifique de l'ADN viral, notamment via les lysines 156 et 159 identifiées par expériences de cross-link (Jenkins et al., 1997) et de la glutamine 148 (Johnson et al., 2006). De nombreux résidus du domaine central seraient également essentiels pour le processus d'intégration concertée ainsi que l'oligomérisation de la protéine (Moreau et al., 2004)

La lysine 186 a également été identifiée, en système double hybride, comme essentielle pour la localisation nucléaire de la protéine. La perte de localisation nucléaire provoquée par la mutation de ce résidu pourrait néanmoins être complétée par l'addition d'une protéine sauvage mettant ainsi en avant une multimérisation possible de la protéine (Berthoux et al., 2007).

La protéine intégrase étant nécessaire pour d'autres processus du cycle viral, tels que la réverse transcription et/ou l'assemblage des virions, les mutants du core de la protéine ont été classés en deux groupes : le groupe I comprend des mutations qui n'affectent que le processus d'intégration tandis que le groupe II comprend des mutations qui empêchent le processus d'intégration mais également la réverse transcription et l'assemblage (Engelman, 1999; Lu et al., 2005). Par exemple, la mutation E152D du site catalytique, de classe II, abolit de plus de 98% le processus d'intégration lors du cycle viral (Engelman and Craigie, 1992) mais n'empêche pas l'étape de réverse transcription (Lu et al., 2005).

2/ Le domaine N-terminal

Ce domaine s'étend des acides aminés 1 à 49. Il contient des résidus His/Cys en paires, extrêmement conservés et essentiels pour l'activité de la protéine. Chez L'intégrase du VIH, les résidus H12-H16-C40-C43 constituent une région similaire à un doigt de zinc et possèdent effectivement la propriété de lier les ions Zn^{2+} (Zheng et al., 1996). Des mutations de ces résidus diminuent de plus de 95% l'activité globale de la protéine sans pour autant que l'activité de désintégration ne soit touchée (Engelman and Craigie, 1992).

Le domaine N-terminal joue également un rôle prédominant dans la multimérisation et la stimulation de l'activité catalytique de la protéine notamment via la fixation des ions zinc (Zheng et al., 1996). Il semblerait également jouer un rôle indirect dans la liaison de l'ADN viral (Carayon et al.).

3/ Le domaine C-terminal

Le domaine C-terminal, contrairement aux autres domaines de la protéine, ne présente pas de résidus hautement conservés. Il s'étend des résidus 213 à 288. Des études de délétions le désignent comme le domaine responsable de la fixation non spécifique de l'ADN (Engelman et al., 1994; Heuer and Brown, 1997; Katzman and Sudol, 1995). Des expériences de pontage chimique ont permis la mise en évidence de trois résidus R262, L234 et K264 importants pour la fixation non spécifique de l'ADN (Lutzke and Plasterk, 1998; Lutzke et al., 1994). Par exemple, une mutation de la lysine 264 en glutamine abolit totalement la propriété de liaison à l'ADN de la protéine intégrase. Enfin, ce domaine serait fortement impliqué dans la mutimérisation de la protéine (Andrake and Skalka, 1995; Jenkins et al., 1996) ainsi que dans la réalisation de l'intégration concertée (Moreau et al., 2003). Deux mutations, L241A et L242A confortent cette hypothèse puisqu'elles provoquent la perte de l'oligomérisation de la protéine (Lutzke and Plasterk, 1998).

C/ Structure des domaines et dimérisation

Les analyses structurales de l'intégrase sont compliquées, en effet, la protéine est très peu soluble et présente une forte flexibilité. Le domaine central CCD de l'intégrase du VIH a été le premier à être résolu par cristallographie aux rayons X (Dyda et al., 1994). Cette structure a permis de mettre en évidence que le core se présente sous forme de dimère et que les résidus du site catalytique, à proximité les uns des autres, forment une poche qui coordonnerait la fixation d'ions bivalents de type Mg^{2+} nécessaires au fonctionnement de l'enzyme. Par la suite ce domaine a été cristallisé en complexe avec des ions Mg^{2+} , confortant ainsi l'hypothèse précédente (Goldgur et al., 1998).

Les domaines NTD et CTD ont également été résolus (Cai et al., 1997; Eijkelenboom et al., 1997). Tout deux se présentent sous forme de dimère. Le domaine NTD, composé de 3 hélices α combiné au motif HHCC type doigt de zinc n'arbore pas une vraie structure en doigt de zinc mais serait nécessaire à la stabilisation de la protéine. La structure du CTD, résolue par RMN, contient des motifs SH3 et est formée de cinq brins β .

Bien qu'à ce jour la structure entière de l'intégrase n'ait pas été résolue, une structure dimérique du CCD + CTD a été obtenue, le core présentant la même conformation que celle obtenue précédemment (Chen et al., 2000). La conformation des domaines NTD + CCD a également été résolue, la structure générale se présentant toujours sous forme de dimère, le core ayant toujours la même conformation (Wang et al., 2001).

D/ Modèle d'action sous forme de tétramère

Différentes expériences montrent que les intégrases existent dans un équilibre de formes monomères, dimères, tétramères et parfois plus (Baranova et al., 2007; Coleman et al., 1999; Deprez et al., 2001; Faure et al., 2005; Guiot et al., 2006; Jones et al., 1992; Petit et al., 1999). De nombreuses indications laissent à penser que, bien que chaque domaine soit cristallisé sous forme de dimère, une organisation supérieure, de type tétramère, soit nécessaire à la protéine pour effectuer le processus d'intégration.

Tout d'abord, la surface de l'interface entre les dimères de core laisse penser que cette forme correspond bien à une configuration biologique de la protéine. Néanmoins, l'espace entre les deux sites actifs, 30 Å, n'est pas compatible avec l'espace entre les sites d'intégration égal lui à 15 Å. En conservant le dimère comme matrice, il faut donc au moins une oligomérisation de l'ordre du tétramère pour permettre la réalisation totale du processus d'intégration (Wielens et al., 2005)

De plus, des études de trans-complémentation tendent à conforter cette hypothèse. Ainsi, des intégrases mutées dans les différents domaines ont été testées pour leurs activités *in vitro* et *in vivo*. Les protéines mutées peuvent être trans-complémentées par d'autres protéines mutées sur des sites différents (Engelman et al., 1993; Fletcher et al., 1997; Gao et al., 2001). Il en ressort que, associé à chaque LTR, un CCD agirait avec le domaine CTD d'une autre molécule, impliquant donc un dimère à chaque extrémité virale et la nécessité d'un tétramère d'intégrase pour réaliser le processus d'intégration dans sa totalité.

La notion de tétramère est également engagée dans l'étude de Guiot. Cette étude par fluorescence anisotropique démontre qu'un dimère d'intégrase est nécessaire sur chaque brin d'ADN viral lors de l'étape de coupure en 3', tandis qu'un tétramère est requis pour l'activité de transfert de brin (Guiot et al., 2006).

Enfin, des études par SAXS ont montré que l'intégrase se trouvait sous différentes formes, monomère, dimère et tétramère et que l'oligomérisation de la protéine serait provoquée par la liaison à l'ADN (Baranova et al., 2007). De même, des expériences de pontage chimique et d'immunoprécipitation ont montré que la liaison de l'intégrase à son co-facteur principal, Ldgf/p75, serait responsable de l'oligomérisation de la protéine sous forme d'octamère lors du processus de transfert de brin (Cherepanov et al., 2003).

Depuis maintenant de nombreuses années, les scientifiques s'attachent à modéliser l'oligomère de l'intégrase responsable du processus d'intégration. Ainsi, de nombreux modèles de tétramères ont été proposés sur la base des données structurales déjà connues (des expériences de pontage chimique et trans-complémentation, des contraintes spatiales, de l'homologie de structure avec les nucléases telles que la transposase Tn5 (Podtelezchnikov et al., 2003; Ren et al., 2007; Wielens et al., 2005)) mais aucune modélisation ne semblent concluante.

Très récemment, la structure de l'intégrase entière du Foamy Virus (*Spumaviridae*) associée à l'ADN viral a été résolue par cristallographie aux rayons X, apportant ainsi de nouvelles données structurales sur le fonctionnement et l'oligomérisation de la protéine (Figure 10) (Hare et al.).

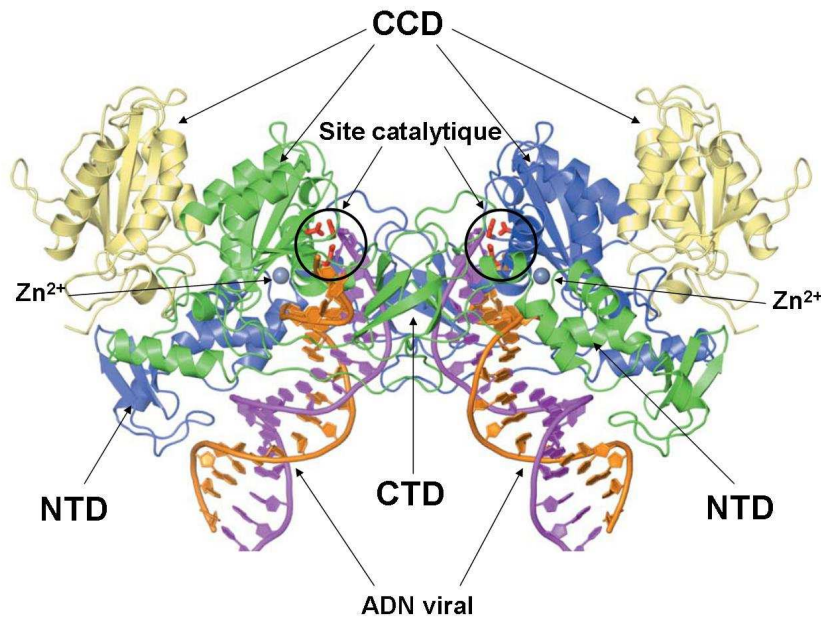


Figure 10. Structure du tétramère de l'intégrase du Foamy Virus en association avec l'ADN viral (Hare et al., 2010). Cette structure se nomme intasome. Les monomères d'intégrases en bleu et vert sont à l'intérieur du complexe et directement impliqués dans la liaison de l'ADN viral (orange et violet) tandis que les monomères en jaunes se trouvent à l'extérieur du complexe. Les sites catalytiques impliqués dans la liaison de l'ADN viral ainsi que les ions zinc sont indiqués. CCD : central core domain, CTD : C-terminal domain, NTD : N-terminal domain.

III/ Méthode de quantification des ADN viraux intégrés

De nombreuses études ont été menées afin de définir le moment auquel se faisaient les toutes premières intégrations. Une méthode de quantification spécifique des formes virales intégrées, basée sur les séquences *Alu* hautement répétées du génome humain, a ainsi été développée (Butler et al., 2001). Une première PCR ciblant à la fois ces séquences *Alu* et une séquence virale permet la sélection des formes virales intégrées tandis qu'une seconde PCR permet la quantification des provirus. Par la suite, cette méthode a été reprise et améliorée. Ainsi, le nombre de cycle de pré-amplification a été abaissé afin d'éviter une saturation de la première PCR (Brussel and Sonigo, 2003; Iordanskiy et al., 2006; O'Doherty et al., 2002; Vandegraaff et al., 2001; Yamamoto et al., 2006). De plus, un référent de quantification plus

adapté a été utilisé. Ainsi les quantifications des provirus se font à partir de lignées cellulaires ayant un nombre connu de provirus dans leur génome (cellules Ach-2, 8E5 ou U1) (Iordanskiy et al., 2006; O'Doherty et al., 2002). D'une manière générale, quel que soit le système cellulaire utilisé, les premières intégrations sont détectées entre 3h et 4h post infection (Brussel and Sonigo, 2003; Iordanskiy et al., 2006; O'Doherty et al., 2002; Vandegraaff et al., 2001; Yamamoto et al., 2006). Par la suite, une dernière amélioration a été effectuée par l'équipe d'Agosto. En effet, la multiplication des essais (jusqu'à 40 répétitions) a permis d'augmenter la sensibilité de la méthode de détection. Malheureusement cette étude n'a pas été couplée à une cinétique d'intégration, le temps des premières intégrations restant à redéfinir (Agosto et al., 2007).

Finalement, la détection des premières intégrations vers 3h post infection est fortement corrélée aux résultats obtenus par d'autres études. Dans une première étude, des particules virales du VIH ont été doublement marquées : par liaison de Vpr avec une protéine fusion GFP et par un marquage à la rhodamine des ADN viraux suite à une étape de reverse transcription endogène (Turelli et al., 2001). Le trajet intracellulaire du complexe de pré-intégration a ainsi pu être suivi. Une agrégation périnucléaire est observable à 2h30 post infection. De la même manière, en utilisant des particules virales contenant une protéine fusion Vpr-GFP, 75% des complexes de pré-intégration atteignent la noyau vers 1h15 et certains sont même détectés dès 40 min post infection (McDonald et al., 2002).

Chapitre 3 : Les régulateurs cellulaires

Le cycle de réplication des rétrovirus est entièrement dépendant des machineries de la cellule infectée. De ce fait, des interactions étroites entre les fonctions cellulaires et les infections virales, notamment celles par le VIH ont été rapportées (Brass et al., 2008; Konig et al., 2008; Ringrose et al., 2008). Parmi les nombreuses familles de processus cellulaires modulés lors de l'infection virale, nous allons nous intéresser à quatre d'entre elles dont nous reparlerons également lors des résultats. Dans un premier temps, les facteurs et les processus cellulaires liés aux modifications de la chromatine (remodelage, formation de hétérochromatine) et sa réparation seront abordés. Par la suite, les acteurs du cycle cellulaire, processus engagé lors de la prolifération cellulaire et finement régulé en cas de stress tels que les dommages à l'ADN, seront développés. Enfin, une dernière partie sera consacrée à la mort cellulaire, notamment celle par apoptose. Ce processus étroitement lié au cycle cellulaire est engagé lorsque les dommages cellulaires sont trop importants pour que la cellule survive.

I/ Les processus de modifications de la chromatine

A/ Modifications des histones

Les organismes eucaryotes ont élaboré différentes manières d'empaqueter la fibre d'ADN, le niveau le plus fondamental de compaction étant réalisé par les nucléosomes. L'unité de base de la chromatine est ainsi constituée de 146 pb d'ADN enroulées autour d'un nucléosome, correspondant à un octamère d'histones. Bien que les nucléosomes soient spécialisés à la fois dans leur composition et dans leurs modifications covalentes ; de façon classique, ils consistent en l'association de deux copies de quatre histones (H2A, H2B, H3 et H4). Certains variants d'histones sont parfois utilisés dans la formation d'un nucléosome, ils ont alors pour fonction principale la régulation de l'expression, des gènes et des régions chromosomiques telles que les télomères et les centromères. De la même façon, les modifications post-traductionnelles extrêmement variées et dynamiques jouent un rôle majeur dans la régulation de la transcription dépendante des histones. Enfin, leur positionnement le long de la fibre d'ADN est un facteur clé de la répression génique, les nucléosomes occupant souvent des régions de liaison aux facteurs de transcription. Il est maintenant établi que ces

mécanismes cellulaires, impliqués dans la modification des histones, jouent un rôle fondamental lors des infections rétrovirales, en outre lors du ciblage de l'ADN viral sur l'ADN cellulaire et au moment de la transcription (Ciuffi, 2008; Mok and Lever, 2007; Pumfery et al., 2003; Quivy et al., 2007).

1/ Les complexes de remodelage

Les nucléosomes, désormais considérés comme des participants actifs dans la régulation de la transcription, sont organisés, mobilisés et remodelés par des complexes de remodelage de la chromatine. Quatre groupes existent au sein d'une cellule, définis selon leur composition protéique et leur fonction (Cairns, 2005; Kundu and Peterson, 2009).

Les complexes SWI/SNF sont principalement impliqués dans la régulation de la transcription. Des nucléosomes sont éliminés ou ajoutés afin de laisser libre d'accès, ou non, les régions de liaison aux facteurs de transcription. Ces complexes jouent également un rôle dans l'élongation de la transcription. Ils sont composés d'une sous unité catalytique Brg1 ou Brm et de plusieurs sous unités associées, souvent spécifiques du tissu cellulaire. Ce Le complexe SWI/SNF est également directement impliqué dans la réplication des rétrovirus. En effet, ce complexe et notamment la protéine Brg1 se lierait au promoteur du VIH après l'intégration de ce dernier (Henderson et al., 2004; Mok and Lever, 2007).

La famille INO80 contrôle l'échange de variants d'histone dans certaines régions chromosomiques comme les centromères et lors de certaines phases cellulaires telles que la réplication. Ce complexe régule également la propagation de la chromatine inactive et jouerait un rôle dans la réparation des cassures double brin.

Le complexe ISWI prédomine dans la cohésion des chromatides sœurs lors de la réplication. Il est également impliqué dans l'initiation et l'élongation de la transcription. Son rôle dans l'inhibition transcriptionnelle a également été démontré par son interaction avec des répresseurs de l'ADN.

Le complexe Mi-2/CHD sert également de répresseur transcriptionnel et contrôle l'élongation de la transcription. Parmi les protéines les plus étudiées, on retrouve Chd3 et Chd4. Elles font partie d'un complexe composé de multiples sous unités et possédant des activités de déacétylation mais également de remodelage des nucléosomes (Murawska et al., 2008).

2/ Le code histone

Les queues N-terminales des histones, dont la séquence est extrêmement conservée, sont soumises à différentes modifications covalentes, allant de l'acétylation, la méthylation, la

phosphorylation, la sumoylation à l'ubiquitination. Ces modifications sont catalysées par différentes enzymes cellulaires : les histones acétylases HAC, les méthyltransférases, les kinases... et peuvent être inversées par des enzymes telles que les déacétylases HDAC, les phosphatases ou déméthylases. Elles sont responsables de modifications (i) de la structure de la fibre de chromatine et (ii) des interactions entre la chromatine et les protéines régulatrices autres que les histones.

Bien que le rôle attribué à la plupart de ces modifications reste mal compris, on sait maintenant que chaque modification possède une fonction bien particulière (Munshi et al., 2009; Ruthenburg et al., 2007) (Figure 11). Ainsi, tandis que les acétylations des lysines sont le plus souvent corrélées à l'activation transcriptionnelle et à l'accessibilité de la chromatine, leur méthylation peut être soit corrélée à l'activation transcriptionnelle soit à la répression selon le résidu impliqué. En effet, les méthylations de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4) et H3K36 sont associées à la chromatine transcriptionnellement active tandis que les modifications H3K9, H3K27 et H4K20 sont généralement corrélées à la répression transcriptionnelle (Bernstein et al., 2007; Kundu and Peterson, 2009). De plus, un lien entre la phosphorylation de différentes histones (H2AS122, H2BS14, γ H2AX, HAS1) et la réparation de l'ADN a été clairement établi (Altaf et al., 2007). Récemment la sumoylation des différentes histones a été associée à l'inhibition transcriptionnelle notamment via le recrutement de protéines répressives (Garcia-Dominguez and Reyes, 2009).

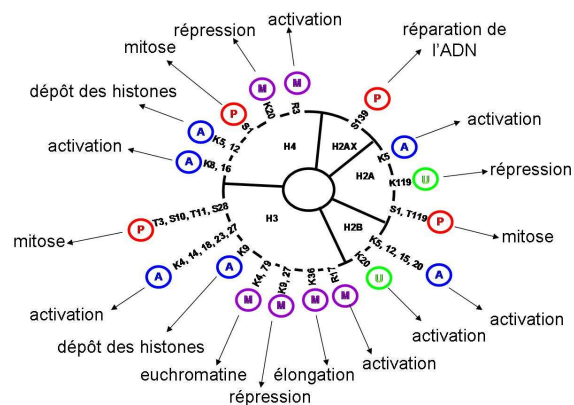


Figure 11. Modification post-traductionnelles des histones et rôles associés. U = ubiquitination, P = phosphorylation, M = méthylation, A = acétylation

B/ La méthylation de l'ADN

1/ Fonction de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN chez les eucaryotes supérieurs a exclusivement lieu sur les cytosines présentes dans un contexte de dinucléotide CpG. Ces derniers ont tendance à se regrouper en région, nommées les îlots CpG, qui se caractérisent par un fort pourcentage en GC et une prévalence de dinucléotides CpG. Ces îlots CpG représentent une grande part des séquences de régulation en cis. En effet, environ 60% des promoteurs leur sont associés (Bernstein et al., 2007; Kundu and Peterson, 2009; Mohn and Schubeler, 2009) et ceux qui ne correspondent pas à des promoteurs serviraient de régulateurs distaux tels que des insulateurs et des enhancers (Mohn and Schubeler, 2009).

La méthylation de l'ADN est impliquée dans diverses fonctions cellulaires et pathologies allant de l'expression génique spécifique dans certains tissus à la différenciation cellulaire, inactivation du chromosome X, le vieillissement, le maintien de l'empreinte génétique, la répression des transposons, la régulation de la structure de la chromatine,... Elle constitue une voie efficace de répression des gènes (Bernstein et al., 2007). Au sein des cellules somatiques différenciées le patron de méthylation est stable et transmissible (Kundu and Peterson, 2009; Mohn and Schubeler, 2009). A l'inverse, le patron de méthylation est extrêmement dynamique au cours du développement et de la progression de la tumeur. En particulier, les promoteurs de certains gènes suppresseurs de tumeurs sont les cibles d'hyper méthylation ce qui provoque leur répression (Bernstein et al., 2007).

2/ Les protéines méthyltransférases (DNMT)

La méthylation de l'ADN est effectuée par des méthyltransférases DNMT qui peuvent être divisées en deux groupes. Celles qui sont capables de lier un groupement méthyle sur l'ADN initialement non méthylé, sont appelées les « Dmnt *de novo* ». On y retrouve Dnmt3a et Dnmt3b qui agissent en général après la réplication. A l'inverse, les autres Dnmt (Dnmt1, Dnmt3L) ne sont capables de méthyliser que l'ADN déjà demi-méthylé, elles agissent donc pendant la réplication. On les appelle les « Dnmt de maintenance » (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005).

Dnmt3a ne possède qu'une faible activité méthyltransférase, elle semble de ce fait nécessiter la présence de nombreux co-facteurs pour optimiser son efficacité. Cette enzyme cible préférentiellement les CpG couplé à des pyrimidines. Dnmt3b est plutôt spécialisée dans la méthylation des CpG associés aux séquences répétées des régions satellites péricentromériques (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005).

Dnmt1 est la principale enzyme responsable du maintien du patron de méthylation pendant la réplication. Durant cette phase, environ 40 millions de CpG sont demi-méthylés, conservés sur le brin matrice. Ces sites doivent être très précisément méthylés afin de conservé le patron initial de méthylation de l'ADN. Ainsi, Dnmt1, placée sur la fourche de réplication, méthyle immédiatement les CpG sur le brin d'ADN nouvellement synthétisé en reconnaissant la présence de dinucléotide CpG méthylé sur le brin matrice. Par ce biais, le patron de méthylation est stable et transmissible au sein des cellules somatiques différenciées. (Kundu and Peterson, 2009; Mohn and Schubeler, 2009; Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005).

Dnmt3L ne possède à elle seule aucune activité méthyltransférase, elle requiert la présence d'autres « Dmmt *de novo* ». Elle peut également se lier à Dnmt3a et Dnmt3b afin d'en accroître le niveau d'activité. De plus, elle interagit avec et active la protéine HDAC1, la reliant ainsi aux mécanismes de remodelage de la chromatine et de répression de la transcription (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005).

Enfin, Dnmt2, la plus petite des méthyltransférases, ne présente en réalité aucune activité *de novo* ou de maintenance. Elle semblerait plutôt impliquée dans la reconnaissance des dommages à l'ADN et dans les mécanismes de recombinaison (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005).

C/ L'hétérochromatine

De larges parties du génome consistent en une chromatine hautement condensée nommée hétérochromatine. Cette dernière se caractérise par une transcription réprimée et est essentielle pour le maintien de l'intégrité du génome. Il a été démontré que la répression transcriptionnelle provoquée par la formation d'hétérochromatine agirait lors des infections par le VIH afin de réduire l'expression virale et serait impliquée dans l'état de latence (Mok and Lever, 2007). L'hétérochromatine se divise en deux composantes : l'hétérochromatine facultative et l'hétérochromatine constitutive (Dimitri et al., 2009).

1/ L'hétérochromatine facultative

Possédant une forte densité en gènes, l'hétérochromatine facultative correspond à des régions d'euchromatine dont la structure et l'activité sont finement contrôlées de sorte qu'elles puissent être actives ou réprimées selon les phases spécifiques du développement.

Elle possède donc toujours la capacité de s'interconvertir entre hétérochromatine et euchromatine dans un contexte particulier qui se doit d'être à la fois temporel, spatial et héritable (Figure 12). Différents processus sont requis pour sa formation, notamment : (i) l'incorporation de composants spécifiques tels que les histones H1 et macroH2A, (ii) le remodelage de la chromatine via les complexes cités précédemment ainsi que l'action des HDAC, HKMT et Dnmt, (iii) l'activité en *trans* de facteurs spécifiques tels que les protéines du groupe polycomb PcG, les insulateurs, PARP-1, γ HP1 et KMT1C (ayant pour rôle de méthylter H3K9) et enfin (iv) la localisation nucléaire (Trojer and Reinberg, 2007).

Par le jeu combiné de ces différentes enzymes, des marques moléculaires caractéristiques composent l'hétérochromatine facultative : une hypoacétylation des histones, un fort taux de H3K27me, H3K9me2/3 et H4K20me1/2/3 et un ADN fortement méthylé (Dimitri et al., 2009; Dinant and Luijsterburg, 2009; Garcia-Dominguez and Reyes, 2009; Rusche and Lynch, 2009; Trojer and Reinberg, 2007).

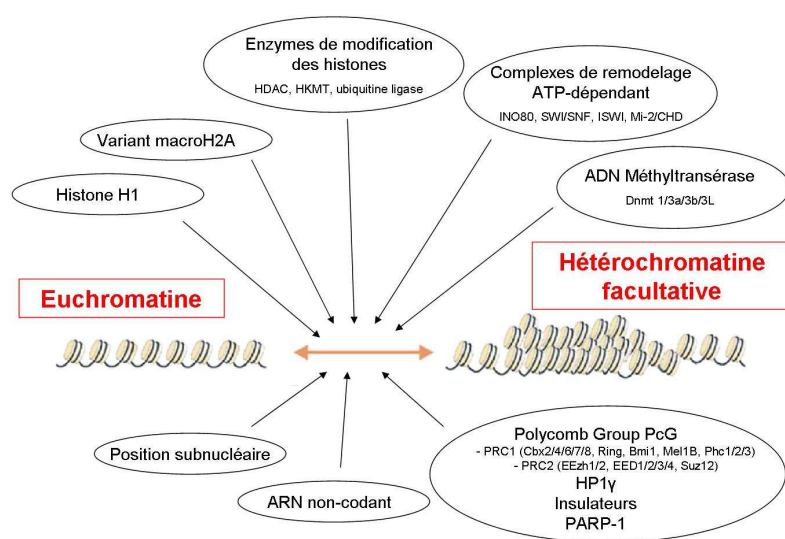


Figure 12. Facteurs influençant la conversion entre euchromatine et hétérochromatine facultative. Parmi les facteurs liés à la modulation de l'hétérochromatine facultative, certains facteurs agissent en *trans* tels que les protéines du PcG, les insulateurs et les ARN non codants, d'autres modulent directement la chromatine, c'est notamment le cas des complexes de remodelage.

2/ L'hétérochromatine constitutive

L'hétérochromatine constitutive, composant de base des génomes eucaryotes (30% du génome humain), se retrouve en général en large portion près des centromères et des télomères. Elle se caractérise le plus souvent par de nombreuses séquences répétées, ADN satellites et éléments transposables et son organisation est maintenue sur les deux chromosomes homologues. Possédant une faible densité en gènes, et une réplication tardive en phase S, elle ne présente pas d'activité transcriptionnelle. L'hétérochromatine constitutive engendre la réduction du taux de recombinaisons à la méiose et l'inactivation de gènes euchromatiniens quand elle s'en rapproche (effet de variégation) (Buhler, 2009; Dimitri et al., 2009).

Cette hétérochromatine est caractérisée par la présence des protéines HP1/ KMT1A/B. La protéine KMT1A/B (ou Suv3-9H1/2) a pour fonction de méthyliser l'histone H3 sur la lysine 9. L'histone ainsi modifiée présente une forte affinité pour la protéine HP1, qui vient alors s'y fixer (Dinant and Luijsterburg, 2009; Rusche and Lynch, 2009).

L'hétérochromatine des centromères est caractérisée par des modifications particulières de certaines histones notamment H3K9me2 (Dimitri et al., 2009) ainsi que l'alternance de régions de 10-20 kb de H3/H2A.Z et CENP-A (variant de H3)/H2A dans le but d'orienter la fibre centromérique et de la rendre accessible lors de la division cellulaire (Dalal, 2009; Mellone, 2009).

L'hétérochromatine des télomères est caractérisée par H3K9me2/3. Les télomères ont pour fonction principale de protéger les extrémités des chromosomes contre des dégradations ou des fusions inopinées permettant ainsi de maintenir la stabilité des chromosomes (Deng and Chang, 2007; Dimitri et al., 2009; Schoeftner and Blasco, 2009).

D/ Les instabilités chromosomiques

1/ les altérations des chromosomes

Dans de nombreux cas, les chromosomes cellulaires sont soumis à des stress menant à des instabilités chromosomiques. Ces dernières peuvent être liées à différents processus tels que des mutations dans des protéines clés comme les protéines FANC, la télomérase et ses protéines associées, les protéines de contrôle de la réplication de l'ADN et celles de réparation des lésions. Plusieurs types d'altérations des chromosomes ont été répertoriés et classés en quatre groupes.

a. Les changements subtils de la séquence

Les changements de séquence n'impliquent que quelques nucléotides et des mécanismes de substitutions, délétions, insertions ou mutations pouvant mener à des mutations non sens. Ces changements, regroupés sous les termes d'instabilités nucléotidiques NIN et d'instabilités des microsatellites MIN (Lengauer et al., 1998), sont en général causés par des erreurs de la polymérase non réparées par les mécanismes de réparation des mésappariements ou d'excision des nucléotides (voir paragraphe « Les mécanismes de réparation de l'ADN »).

b. Les aberrations du nombre de chromosomes

Les aberrations du nombre de chromosomes impliquent la perte ou le gain de chromosomes entiers provoquant parfois la perte de l'hétérozygotie. Ces instabilités chromosomiques CIN pourraient simplement être dues à une structure anormale et des propriétés de croissance aberrante de certaines cellules. Les points de contrôle du cycle cellulaire (voir paragraphe « Le cycle cellulaire ») semblent être impliqués dans les CIN : un échec au point de contrôle du fuseau mitotique ou à celui de la réparation de l'ADN peut provoquer la ségrégation inégale de chromosomes plus ou moins endommagés. Le centrosome peut également être impliqué dans les CIN : des fuseaux multipolaires et un nombre anormal de centrosomes ont la possibilité de perturber les microtubules et donc la ségrégation des chromosomes (Duensing and Munger, 2001).

Tous ces mécanismes de contrôle sont basés sur l'action de diverses protéines, et on peut finalement conclure que les CIN peuvent être causés par des défauts dans de très nombreux gènes.

c. Les translocations

Les translocations se caractérisent par des réarrangements distincts de segments chromosomiques. Ces réarrangements sont « reproductibles » et observés dans de nombreux cancers. Ils impliquent en général le même segment d'ADN et entraînent (i) l'activation d'un oncogène via sa relocalisation près d'une séquence promotrice ou régulatrice fortement active ou (ii) la fusion de protéines (Lengauer et al., 1998). Dans les lymphocytes, ces translocations résultent parfois d'un défaut dans le système de recombinaison VDJ, impliquant alors les protéines RAG1 et 2 (Kuppers and Dalla-Favera, 2001; Marculescu et al., 2006).

d. L'amplification génique

Des segments d'ADN plus ou moins longs sont amplifiés au sein du génome. Cela peut concerner des pseudo-gènes ou des séquences répétées, sans conséquences pour la cellule. Parfois cela peut mener à l'amplification d'oncogène aux conséquences plus graves pour la cellule. Généralement, l'amplification génique provoque un signal cellulaire de dommage à l'ADN et entraîne la mort cellulaire via p53 (Lengauer et al., 1998).

2/ Les sites fragiles

Ce sont des séquences qui présentent des brèches ou des cassures après une réplication incomplète. Ils sont souvent associés à des zones de translocations, amplification de gène, intégration d'ADN exogène, et autres réarrangements. Ils sont riches en répétition de bases ; ces dernières provoquant des structures secondaires ou des triplex d'ADN et donc des perturbations dans la boucle de réplication. Les sites fragiles sont classés en deux groupes : les sites rares et les sites communs.

Caractérisés par des extensions de répétitions type CCG, CAG ou AAG, les sites fragiles dits « rares » sont spécifiques à chaque individu et gouvernés par les lois de la génétique Mendélienne, donc héréditaires. Les variations du nombre de répétitions en tandem peuvent s'étendre de 10 pb à plus de 100 pb (Aguilera and Gomez-Gonzalez, 2008; Glover et al., 2005). De nombreux sites fragiles rares ont été isolés suite à leur association avec des désordres génétiques chez l'homme, tels que le syndrome du X fragile, l'Ataxia de Friedrich, la maladie de Huntington, ... (Glover et al., 2005; Handt et al., 2000)

A l'inverse, les sites communs sont présents chez tous les individus et sont une composante normale de la structure de nos chromosomes. 90 sites fragiles communs sont répertoriés dans la base de données du génome (GDB) (Sutherland and Richards, 1995). Ils sont extrêmement sensibles aux stress réplicatifs et souvent réarrangés dans les cellules cancéreuses. A peine 20 des sites fragiles communs sont responsables de plus de 80% des lésions observées dans les lymphocytes (Smith et al., 2007). D'un point de vue moléculaire, ces sites sont riches en AT et en minisatellites et semblent conservés au cours de l'évolution (Glover et al., 2005). Les sites fragiles communs présentent certaines caractéristiques : (i) présence de cassures observées en métaphase et résultant d'un ADN non répliqué, (ii) zones d'échange de chromatine sœur, (iii) fort taux de translocations et délétions, (iv) sites préférentiels de recombinaisons et d'intégrations virales. Ils sont ainsi la cause de nombreuses instabilités chromosomiques telles que la perte de l'hétérozygotie, une aberration dans le nombre de chromosomes et un dosage de gène déséquilibré, des amplifications de gène (Glover et al., 2005; Handt et al., 2000; Richards, 2001). Plusieurs études ont montré l'implication des protéines ATR, SMC et FANC/BRCA dans la stabilité des sites fragiles au

cours des divisions cellulaires (Bilbao et al., ; Glover et al., 2005; Jardim et al., 2009; Kalb et al., 2006; Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009; Kumari et al., 2009; Losada and Hirano, 2005; Naim and Rosselli, 2009; Schoder et al., ; Schubert et al., 2009).

La chromatine, d'une importance capitale puisque base de l'information génétique de la cellule, est donc finement modulée par divers acteurs. Ainsi, les complexes de remodelage des nucléosomes s'associent aux enzymes de modification des histones pour permettre la transcription ou la répression des gènes et contrôler les différents processus cellulaires. Néanmoins, et comme nous venons de le voir, la chromatine peut parfois être le siège d'instabilités qui doivent être évitées pour permettre la survie de la cellule. De ce fait, des mécanismes cellulaires de réparation de la chromatine ont été développés afin d'assurer l'intégrité du génome.

II/ Les mécanismes de réparation de l'ADN

Une cellule est constamment sujette à des atteintes à son génome, par des agents exogènes (radiations, agents chimiques, ...) ou des agents endogènes (radicaux libres). L'accumulation de lésions sur l'ADN peut induire des changements permanents menant à des cancers ou provoquer l'empêchement de certains processus cellulaires vitaux pouvant alors entraîner la mort par apoptose ou par arrêt irréversible de la croissance. Ainsi, pour contrer ces lésions génomiques dangereuses, toute cellule possède des mécanismes de réparation. Chez l'homme plus de 130 gènes codent pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. L'intégrité de l'information génétique dépend donc bien sûr de la fidélité de la réplication de l'ADN mais aussi de l'efficacité des différents processus de réparation de l'ADN. Comme nous le verrons plus en détails à la fin du chapitre 4, une relation étroite existe entre l'intégration des rétrovirus et les mécanismes de réparations de l'ADN (pour revue voir (Skalka and Katz, 2005)).

A/ Signalisation des lésions de l'ADN

Le processus qui signale les dommages de l'ADN peut être vu comme une cascade de transduction dans laquelle la lésion serait le signal. Cette signalisation implique des protéines hautement conservées de la famille de PIKK (ATM et ATR). Lors des lésions, ces kinases sont activées, elles amplifient et transmettent alors le signal à d'autres kinases telles que Chk1 et Chk2. En retour, celles-ci (i) phosphorylent diverses cibles cellulaires comme p53 ou les Cdc25 afin d'arrêter le cycle cellulaire et (ii) modulent les processus de réparation de l'ADN ainsi que l'engagement en apoptose.

1/ Les senseurs de la lésion

a. La protéine mutée dans Ataxia Telangiectasia (ATM)

ATM se retrouve mutée dans un syndrome humain appelé Ataxia Telangiectasia. Cette maladie se caractérise par une radiosensibilité, un défaut de contrôle du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN et une forte instabilité génomique. Ces caractéristiques correspondent à une dégénération cérébelleuse progressive, une immunodéficiency, un raccourcissement des télomères et une forte incidence de cancers (Durocher and Jackson, 2001; Shiloh, 2001; van Gent et al., 2001).

La protéine ATM joue un rôle dans la réparation des lésions à l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire et dans l'engagement de l'apoptose. Cette protéine est notamment impliquée dans les points de contrôle G2/M et G1/S du cycle cellulaire et est recrutée au niveau des lésions par le complexe MRN (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009). Bien que le sujet reste controversé, un lien entre la protéine ATM et la finalisation de l'intégration rétrovirale existerait (Daniel et al., 2001; Daniel et al., 2005; Sakurai et al., 2009).

ATM phosphoryle de nombreuses protéines (Figure 13) parmi lesquelles on retrouve p53 et H2AX. La phosphorylation de p53 a notamment pour effet de stabiliser la protéine, donc de favoriser l'expression de p21 qui lui-même est un inhibiteur des Cdk, et empêche donc la progression du cycle cellulaire (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009). ATM semblerait impliquée dans la reconnaissance des cassures double-brin induites par les radiations ionisantes (IR) et les drogues radiomimétiques et phosphorylerait Chk2 plutôt que Chk1 (Durocher and Jackson, 2001; Valerie and Povirk, 2003).

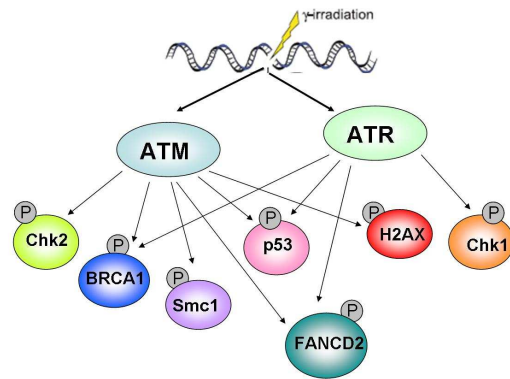


Figure 13. Cibles principales des kinases ATM et ATR. Les protéines ATM et ATR font partie de la famille de PIKK. Elles sont activées en cas de dommage à l'ADN et ont pour fonction d'amplifier et de transmettre le signal à d'autres protéines afin de réguler différentes voies cellulaires comme le cycle et l'apoptose.

b. La protéine reliée à ATM et Rad3 (ATR)

Le syndrome de Seckel peut se caractériser par une déficience en protéine ATR. Une seule mutation, létale si homozygote, a été identifiée (A2101G). Elle provoque un épissage aberrant de l'ARNm ayant ainsi un impact majoritaire sur les mécanismes de réparation de l'ADN (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009; Shiloh, 2001). Cette mutation entraîne une hypersensibilité aux arrêts des fourches de réplication, des centrosomes en surnombre, des défauts de l'arrêt en G2/M après des irradiations UV. La maladie se caractérise par un retard de croissance intra-utérine, une profonde microencéphalie des retards mentaux et des anomalies du squelette (ossification retardée, dislocation, ...)

ATR phosphoryle en grande majorité les mêmes cibles qu'ATM (Figure 12). La protéine ATR, tout comme ATM, serait elle aussi impliquée dans la finalisation du processus d'intégration rétrovirale (Daniel et al., 2003; Daniel et al., 2001). ATR cible également le complexe MRN, qui facilite la phosphorylation de ses substrats (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009). ATR semblerait impliquée dans la reconnaissance des lésions double ou simple-brin induites par les UV ou les inhibitions de la réplication et phosphorylerait plutôt Chk1 que Chk2 (Durocher and Jackson, 2001; Valerie and Povirk, 2003). ATR et ses substrats (Brca1, SMC1, Chk1, et les protéines FANC) jouent un rôle primordial dans la stabilité des sites fragiles du génome humain (Glover et al., 2005; Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009).

Au contraire d'ATM, ATR est une protéine vitale, suggérant que la redondance de fonction entre ces deux protéines n'est pas totale (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009)

c. Le complexe MRN

Ce complexe, composé de trois protéines Rad50, Mre11 et Nbs1, joue un rôle primordial dans différents processus cellulaires. Il est ainsi impliqué dans la reconnaissance des cassures double-brin de l'ADN, les processus de recombinaison, le contrôle du cycle cellulaire, la régulation des télomères (Shiloh, 2001; Williams and Tainer, 2007). Le complexe MRN reconnaît les cassures double-brin et s'y fixe. Il possède notamment la particularité de ponter les molécules d'ADN pour éviter que les extrémités lésées ne s'éloignent le temps que la réparation soit effectuée. Senseur primaire des cassures double-brin, il est le point commun entre les voies de réparation par recombinaison homologue et jonction non homologue.

Les trois protéines du complexe possèdent au total 5 super classes de motifs protéiques impliqués dans la réparation de l'ADN : (i) domaine de reconnaissance des lésions, (ii) domaine d'interaction protéine/protéine, (iii) motif de nucléase, (iv) motif d'association à l'ATP pour induire des changements de conformations, et enfin (v) un motif d'ouverture de l'ADN pour permettre la réparation (Williams and Tainer, 2007). Dans ce complexe, c'est Mre11, une exonucléase très abondante, qui lie Nbs1, l'ADN lésé, et Rad50 (Vidakovic et al., 2005; Williams and Tainer, 2007). Mre11 serait également impliquée lors du processus de ligation permettant la terminaison de l'intégration rétrovirale (Daniel et al., 2004a). La protéine Rad50, du même type que les protéines de maintien de la structure des chromosomes (SMC), peut lier l'ATP. C'est Nbs1 qui sert d'adaptateurs entre le complexe MRN et la protéine ATM. ATM est à la fois phosphorylée par le complexe MRN mais phosphoryle également ce dernier (Shiloh, 2001). D'autres protéines comme Mdc1 et 53bp1 ont été identifiées comme des modulateurs de ce complexe (Lisby and Rothstein, 2005). Toute mutation de la protéine Nbs1 induit le syndrome de cassure de Nijmegen (NBS) tandis que le désordre associé à ATM (ATLD) est dû à une mutation de Mre11. Là encore, une mutation homozygote d'un des composants du complexe est létale (Williams and Tainer, 2007).

d. Le complexe DNA-PK et les PARP

Le complexe DNA-PK est composé de trois sous unités : Ku70, Ku80 et DNA-PKc. L'hétérodimère Ku70/80 constitue une protéine de liaison à l'ADN, avec des activités d'ATPase et d'hélicase. La DNA-PKc est une enzyme ubiquitaire qui se lie aux ADN double-brin et phosphoryle différents substrats, dont les protéines Ku. Le complexe DNA-PK, majoritairement impliqué dans les cassures double-brin, accélère considérablement le processus de réparation après des lésions induites par irradiations (Vidakovic et al., 2005). La DNA-PK semblerait également impliquée dans le processus d'intégration rétrovirale mais son

implication reste encore controversée et sera détaillée dans le chapitre 4 (Daniel et al., 2004a; Daniel et al., 1999; Sakurai et al., 2009).

Les protéines PARP, au nombre de deux, PARP-1 et PARP-2, sont responsables de la poly(ADP-ribosyl)ation, modification qui facilite notamment la dégradation des histones par le protéasome (Burkle, 2006). PARP-1 et 2 sont principalement activées par les cassures simple-brin de l'ADN. Elles sembleraient réguler l'accessibilité du site lésé aux autres facteurs de réparation, en permettant la relaxation locale de la chromatine (Burkle, 2006; Malanga and Althaus, 2005). Hormis les histones, leurs cibles sont diverses : les protéines de réparation, les topoisomérases, la Dnmt1 et les protéines de contrôle du cycle (p21, XRCC1,...) (Malanga and Althaus, 2005; Vidakovic et al., 2005).

PARP-1 se lie avec forte affinité au brin d'ADN cassé, ce qui a pour effet de stimuler son activité de plus de 500 fois. Une fois activée, PARP-1 finit par se séparer de l'ADN mais reste dans les environs de la lésion et transmet le signal en recrutant des protéines spécifiques et en reprogrammant leurs fonctions (Malanga and Althaus, 2005). Concernant l'apoptose, il est à noter que p53 possède une forte affinité pour PARP-1 et cette dernière est également une des premières cibles des caspases (Burkle, 2006).

Bien que les PARP seraient principalement liées aux cassures simple-brin et le complexe DNA-PK aux cassures double-brin, les choses ne sont finalement pas si simples. Il a été démontré que PARP et DNA-PK se complexent même en absence d'ADN. PARP-1 interagirait avec chaque sous unité du complexe DNA-PK pour permettre leur poly(ADPribose)ylation et la DNA-PKc pourrait phosphoryler PARP-1 (Burkle, 2006; Vidakovic et al., 2005). De plus, PARP diminuerait l'affinité du complexe Ku/DNA-PK au niveau des lésions, favorisant ainsi la recombinaison homologue (Sonoda et al., 2006).

2/ les transducteurs du signal

a. Les protéines Chk1 et Chk2

Chk2 est une kinase effectrice de réparation des lésions, elle est phosphorylée et donc activée principalement par ATM. Elle contrôle l'activité des Cdc25 phosphatases et donc le cycle cellulaire (Figure 14) (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009).

Chk1, kinase effectrice principalement activée par ATR, possède un rôle extrêmement redondant avec celui de Chk2. Seule une déficience simultanée en ces deux protéines empêche les points de contrôle du cycle cellulaire (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009).

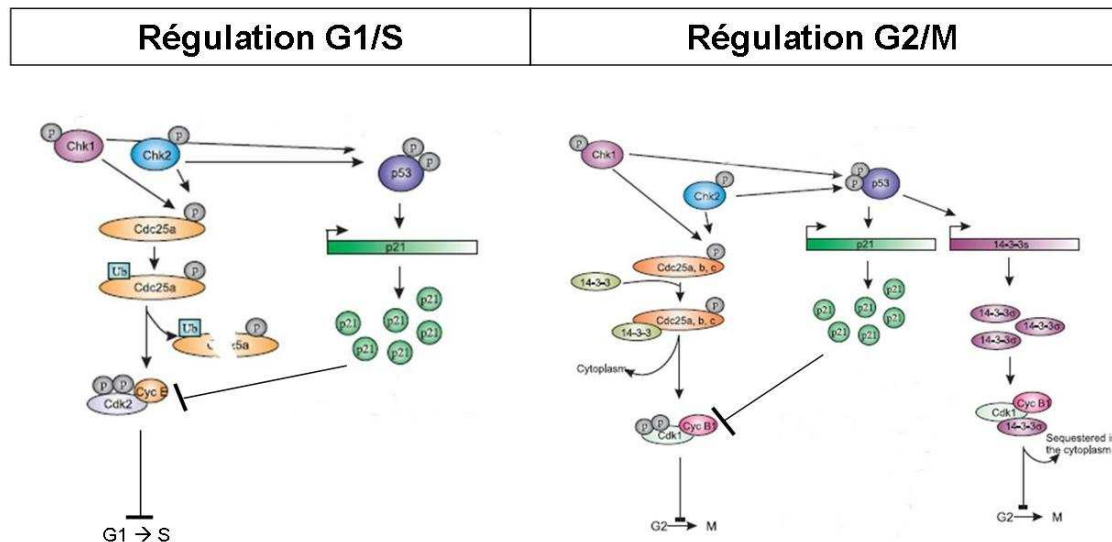


Figure 14. Action de Chk1 et Chk2 sur le cycle cellulaire (d'après Cann et al., 2007). Après phosphorylation par Chk2 et Chk1, la protéine Cdc25A est dégradée et ne peut donc enlever le phosphate inhibiteur du complexe Cdk2/cycline E, restant alors inactifs et provoquant l'arrêt du cycle cellulaire lors de la transition G1/S. L'arrêt en phase G2/M se caractérise par la phosphorylation de Cdc25 A, B et C par Chk1 et Chk2. Ces modifications entraînent la séquestration des Cdc25 par la protéine 14-3-3. Le complexe Cdk1/cycline B reste inactif et empêche le passage en mitose. L'action de Chk1 et Chk2 est également renforcée par celle d'autres acteurs. En effet Chk1 et Chk2 phosphorylent également p53 qui active alors la transcription de p21, inhibiteur des CDK, qui inactive donc les complexes Cdk/Cycline. L'induction de la protéine 14-3-3 permet en plus la séquestration du complexe Cdk1/cycline B.

b. L'histone H2AX

La marque la plus précoce identifiée dans les cassures double-brin est la phosphorylation rapide et étendue de H2AX (variant de l'histone H2A) pour créer H2AX γ (Fillingham et al., 2006). Un rôle de l'histone H2AX lors du processus d'intégration rétrovirale a également été établi (Daniel et al., 2004b). La modification de cette histone prend place au niveau des lésions et s'étend également au delà de cette dernière, parfois sur 1Mb autour d'elle (Durocher and Jackson, 2001). Par la suite, H2AX γ disparaît sur les séquences d'ADN directement liées aux protéines de réparation (Fillingham et al., 2006). Finalement, la déphosphorylation de H2AX est essentielle pour atténuer le point de contrôle du cycle cellulaire et lui permettre une reprise progressive (Shrivastav et al., 2008).

Ce sont les protéines ATM et DNA-PKc qui sont responsables de la phosphorylation de l'histone H2AX (Fillingham et al., 2006; van Gent et al., 2001). Cette modification a lieu

et FANCD2. Ces dernières sont ubiquitylées par le « core ». FANCD2 est activé par (i) sa phosphorylation par ATM, ATR et (ii) son ubiquitylation par FANCL. Le dernier groupe est composé de diverses protéines reliées au FANC : FANCD1 (BRCA2), FANCN (PALB2), FANCI (BRIP1). Ces protéines agissent sur la prévention des cassures doubles brins associées à la réplication.

b. BRCA1 et BRCA2

Notamment responsables de cancers du sein, BRCA1 et BRCA2 sont parmi les protéines les plus étudiées la voie de signalisation FANC/BRCA.

Une double mutation de BRCA1 provoque des instabilités chromosomiques et une létalité embryonnaire précoce due à un empêchement sévère de la prolifération cellulaire (Gudmundsdottir and Ashworth, 2006). En cas de lésion, BRCA1 est hyper-phosphorylée par ATM, ATR et Chk2. Cette dernière répond alors en participant à de nombreuses voies cellulaires dont la réparation de l'ADN et le cycle cellulaire (Gudmundsdottir and Ashworth, 2006; Zhang et al., 2004b). La phosphorylation de BRCA1 par ATM est essentielle pour la réponse aux cassures double-brin et joue un rôle primordial dans les points de contrôle G2/M et G1/S du cycle cellulaire tandis que l'association de BRCA1 et ATR s'effectue plutôt pour répondre aux dommages liés à la fourche de réplication. En cas de dommage à l'ADN, le processus de recombinaison homologue serait favorisé par rapport à la voie de jonction non homologue ou inversement selon le site de phosphorylation de BRCA1 par Chk2 (Gudmundsdottir and Ashworth, 2006; Zhang et al., 2004b). Enfin, en réduisant ainsi le potentiel mutagénique de la voie de réparation par jonction non homologue, BRCA1 contribuerait à la stabilité du génome (Gudmundsdottir and Ashworth, 2006; Huen et al., ; Shrivastav et al., 2008).

BRCA1 est associée à de nombreuses protéines. On la retrouve ainsi liée avec Rad51, BRCA2, BARD1 et l'histone H2AX γ au sein du complexe BRCC (BRCA1 BRCA2 containing complex). Mais BRCA1 se retrouve également dans un second complexe : le BASC (Brca1 Associated genome Surveillance Complex). Ce dernier comprend entre autre des suppresseurs de tumeurs, des senseurs des lésions de l'ADN et des transducteurs de signaux. On y retrouve notamment le complexe de remodelage MRN, les protéines du processus de réparation des mésappariements mais aussi ATM, et PCNA (Gudmundsdottir and Ashworth, 2006; Huen et al., ; Shrivastav et al., 2008).

La protéine BRCA2 (ou FANCD1) est directement impliquée dans la réparation par recombinaison homologue, affectant le choix entre la recombinaison homologue directe ou l'hybridation simple brin (Huen et al., ; Zhang et al., 2004b). Son rôle dans la voie de

recombinaison homologue vient de son interaction avec Rad51. BRCA2 s'associe également à DSS1, une protéine qui permettrait la formation des foyers où s'accumulent Rad51 et BRCA2. DSS1 permettrait également le maintien de la conformation de BRCA2, cette dernière n'étant pas soluble en absence de DSS1 (Gudmundsdottir and Ashworth, 2006).

Une perte totale de BRCA2 résulte en la réparation des lésions par une voie autre que la recombinaison homologue, provoquant ainsi plus d'erreurs et expliquant certainement l'instabilité chromosomique observable en cas de double mutation BRCA2 (Gudmundsdottir and Ashworth, 2006).

La voie de signalisation FANC/BRCA est donc directement régulée par le point de contrôle de la réplication et par les senseurs des dommages à l'ADN. Bien qu'encore mal connue, cette voie semblerait plutôt linéaire. En effet, les caractéristiques cellulaires observées dans ces cas d'Anémie de Fanconi sont homologues bien qu'en réalité de nombreux gènes peuvent à l'origine du syndrome (Branzei and Foiani, 2008; Mace et al., 2007)

B/ Les différentes voies de réparation

Les atteintes à l'ADN peuvent être provoquées par de multiples agents tels que les rayons X, les rayonnements UV, les erreurs de la fourche de réplication,... Chaque agent provoque une lésion spécifique qui sera réparée par un processus particulier (Figure 16). Ainsi, la cellule dispose de cinq différents mécanismes de réparation permettant la résolution de toutes les lésions à l'ADN pouvant avoir lieu.

	CAUSE	LESION	CORRECTION
	Rayons X Recombinaison V(D)J Fourche de réplication	Cassures double brin	Jonction non homologue NHEJ Recombinaison homologue directe HR Hybridation simple brin SSA
	Rayonnement UV Hydrocarbures aromatiques polycycliques	Cassure simple brin, site abasique, uracile	Excision de base BER
	Rayons X Radicaux oxygénés Agents alkylant	Dimer de pyrimidines, photo-produits, adduits encombrant	Excision de nucléotide NER
	Erreurs de réplication	mésappariements	Réparation des mésappariements MMR

Figure 16. Récapitulatif des agents pouvant induire les différents types de lésions sur l'ADN et les mécanismes cellulaires mis en jeu afin de les réparer (d'après Bergin et al., 2009).

1/ Réparation des mésappariements : MMR

La voie de réparation des mésappariements (Mismatch Repair MMR) corrige les mésappariements dus à des substitutions de base. Ces derniers sont le plus souvent générés lors de la réplication de l'ADN. En cas d'inactivation du mécanisme, on observe des réarrangements de l'ADN, une élongation des télomères, et une augmentation du taux de mutation et donc la variabilité génétique. Ce procédé de réparation participe naturellement aux mutations hypersomatiques et aux recombinaisons VDJ ayant lieu dans les lymphocytes B. Il est également le gardien de la stabilité des microsatellites. En effet, ces zones du génome, constituée de longues répétitions, sont le siège de nombreux dérapages des polymérases et d'une mauvaise relecture, nécessitant ainsi l'action régulière du processus de réparation des mésappariements (Kunkel and Erie, 2005).

La voie MMR implique de nombreuses protéines notamment les complexes protéiques MSH2/6 et MSH2/3 dont la fonction principale est de se lier au mésappariement. Le premier complexe semblerait plutôt impliqué dans les mésappariements ne concernant qu'une seule base tandis que le second complexe agirait au niveau des mésappariements pouvant impliquer jusqu'à 16 bases. Ces deux complexes interagissent avec diverses protéines notamment la PCNA (proliferating cell nuclear antigen), PMS1, HMG1 et les MLH1/2/3. Plusieurs exonucléases sont également impliquées dans ce processus, la re-synthèse de l'ADN est notamment effectuée par la polymérase γ . Enfin, la DNMT1 semble favoriser ce processus de réparation (Kunkel and Erie, 2005).

2/ Réparation par excision de base : BER

Le mécanisme de réparation par excision de base (Base Excision Repair BER) facilite la résolution des dommages à l'ADN notamment ceux impliquant des sites abasiques, des lésions oxydatives, des bases alkylées ou alternatives ainsi que les cassures simple brin. Ce mécanisme requiert l'activité des glycosylases afin d'enlever la base altérée. Ces dernières laissent alors un site abasique. La protéine APE1 coupe ensuite le squelette ADN libérant les extrémités 3' hydroxyle et 5' phosphate. La polymérase β cible les extrémités 3' et comble le site abasique avec la base complémentaire. Le tout est enfin lié par le complexe de la ligase III/XRCC1 (Donigan and Sweasy, 2009).

Le type de glycosylase utilisée dépend du type d'altération sur la base nucléotidique. Par exemple, la méthylpurine-DNA glycosylase (MPG) enlève les purines tandis que l'uracil DNA glycosylase (UDG) enlève les uraciles de l'ADN. La MBD4 (methyl-CpG-binding

protein 4) est une thymidine/uracil glycosylase qui présente une forte affinité pour les sites CpG et a pour rôle d'empêcher les transitions C → T (Donigan and Sweasy, 2009).

3/ Réparation par excision de nucléotide : NER

Le processus de réparation par excision de nucléotide (Nucleotide Excision Repair NER) est responsable de la réparation des dimers de pyrimidines, des photo-produits provoqués par des expositions UV et des adduits encombrant (bulky adducts). Cette réparation, médiée par un large complexe enzymatique de plus de trente protéines, s'effectue en plusieurs étapes : (i) identification de la lésion, (ii) incision de l'ADN endommagé de part et d'autre de la lésion, (iii) excision du fragment contenant la lésion, (iv) synthèse d'ADN pour combler la brèche et enfin (v) ligation des brins d'ADN (Sung and Demple, 2006; Tremblay et al., 2009).

Ce processus se divise en deux voies : la première, dite « global genome repair » (GG-NER), agit sur l'ADN dont la transcription est inactive et sur le brin non transcrit, la seconde dite « couplée à la transcription » (TC-NER) réalise la réparation du brin transcrit des gènes actifs. En général, le procédé TC-NER est plus efficace que le GG-NER. Ces deux voies impliquent néanmoins les mêmes protéines à l'exception de celles impliquées dans l'identification de la lésion. Chez la levure, on retrouve les protéines de la famille Rad (Rad1,2,3,4,14,...) et les sous unités de la TFIIH tandis que chez l'homme les protéines XPG/F/D/C/A, ERCC1, CSA/B et les sous unités de la TFIIH sont impliquées (Sung and Demple, 2006; Tremblay et al., 2009).

4/ Réparation des cassures double-brin

Les cassures double-brin sont parmi les plus dangereuses atteintes au génome. Elles peuvent être causées par des espèces chimiques réactives, des échecs dans le fonctionnement de la topoisomérase, des irradiations, des problèmes lors de la réplication. Mais elles peuvent également se produire à l'état naturel, c'est notamment le cas lors des processus de recombinaison V(D)J des lymphocytes. De telles cassures peuvent être réparées selon deux voies distinctes : la recombinaison homologue qui nécessite la présence d'une séquence homologue pour assurer la réparation ou la jonction non homologue des extrémités qui s'effectue sans séquence homologue et entraîne souvent des délétions ou insertions au niveau du site de cassure. Ces deux voies de réparation ne sont pas utilisées au même moment du cycle cellulaire et dépendent de la nature de la lésion (Figure 17). Les mécanismes de réparation des cassures double-brin sembleraient jouer un rôle prédominant dans l'intégration

rétrovirale mais ce sujet reste très controversé (Sakurai et al., 2009; Smith et al., 2008; Taganov et al., 2001). Si les cassures double-brin ne sont pas ou mal réparées, la cellule peut entrer en mort programmée ou être sujette à des changements chromosomiques de grande échelle tels que les délétions, translocations, fusions, augmentant ainsi l'instabilité du génome (Shrivastav et al., 2008).

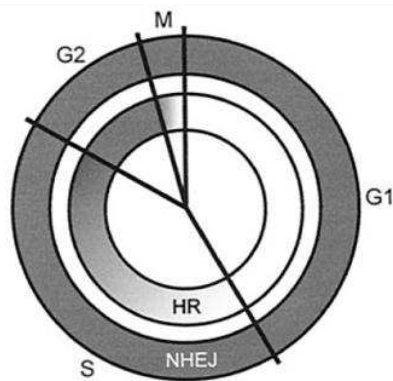


Figure 17. Corrélation entre les phases du cycle cellulaire et les voies de réparation des cassures double brin. La voie de recombinaison homologue (HR) est principalement utilisée en fin de phase S et en phase G2, lorsque la chromatide sœur est présente à proximité. La réparation par jonction non-homologue des extrémités (NHEJ) est, quant à elle, utilisée tout au long du cycle cellulaire pour réparer au plus vite certaines lésions.

a. Recombinaison homologue

La voie de recombinaison homologue (HR) est principalement utilisée en fin de phase S et en phase G2, la chromatide sœur étant disponible. Elle est le plus souvent activée en cas de problèmes lors de la réplication. Néanmoins, il est possible que cette voie soit activée en G1, la matrice utilisée pour la réparation correspond alors au chromosome homologue, et s'accompagne d'une perte de l'hétérozygotie. Une implication du processus de recombinaison homologue dans l'intégration du VIH a également été suggérée par l'étude de Nakai-Murakami (Nakai-Murakami et al., 2007).

La recombinaison homologue se subdivise en deux voies : la recombinaison homologue directe (Homologous Recombination HR) et l'hybridation simple brin (Single Strand annealing SSA) (Rothkamm et al., 2003; Shrivastav et al., 2008; Takata et al., 1998; Valerie and Povirk, 2003).

Initiée par un échange de brin, la recombinaison homologue directe se caractérise par l'invasion d'un duplex ADN par un brin simple. Il en résulte une conversion génique jusqu'à ce que les duplex ne soient réparés (Figure 18). En général, le potentiel mutagène de ce processus est faible, surtout lorsque la chromatide sœur sert de matrice, ce qui est souvent le cas.

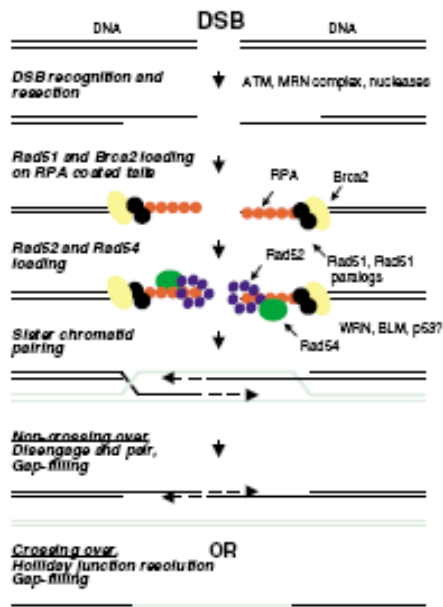


Figure 18. Mécanisme de recombinaison homologue directe HR (Valerie et al, 2003). Ce mécanisme nécessite l'action des protéines cellulaires ATM et ATR. Par la suite la réparation a proprement parlée est effectuée grâce aux facteurs RPA, Rad52, Rad 51 et aux les hélicases BLM et WRN. La réparation est initiée par l'appariement des chromatides sœurs puis l'invasion du duplex d'ADN par un simple brin. Le mécanisme de réparation peut s'accompagner d'un « crossing over » menant à une conversion génique définitive.

L'hybridation simple brin, la seconde forme de recombinaison homologue, se caractérise par la jonction de simple brin d'ADN complémentaires au niveau de répétitions directes. Après cassure double brin, l'ADN est érodé autour de la lésion jusqu'aux séquences répétées les plus proches où ces dernières seront liguées (Figure 19). Il en résulte une délétion de la séquence ADN présente entre les répétitions, de ce fait ce processus est constamment mutagène.

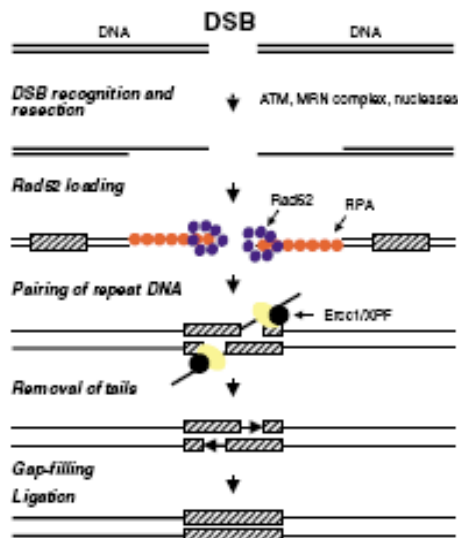


Figure 19. Mécanisme d'hybridation simple brin (Valerie et al, 2003). Ce mécanisme nécessite l'action des protéines cellulaires ATM et ATR. Par la suite la réparation a proprement parlée est effectuée grâce aux facteurs RPA, Rad52 et les nucléases Ercc1 et XPF. La réparation se caractérise par une jonction simple brin d'ADN complémentaires.

La recombinaison homologue directe et la voie de l'hybridation simple brin partagent des mécanismes intermédiaires comme l'érosion de simple brin d'ADN, certaines protéines comme Rad 52 et RPA leur sont communes. Cependant, d'autres facteurs semblent être spécifiques de chaque voie de réparation (Sonoda et al., 2006; Stark et al., 2004).

b. Jonction non homologue des extrémités

La voie de jonction non homologue (Non Homologous End Joining NHEJ) agit principalement lors des phases G1 et S et s'active suite aux cassures « accidentelles » notamment induites par des irradiations (Figure 20). Néanmoins, lorsque la cassure double brin a lieu dans un environnement de chromatine compactée pouvant être observée en G2 ou en G1, la recherche de la séquence homologue devient parfois très difficile. Dans ce cas, c'est la jonction non homologue qui est favorisée pour réparer au plus vite la lésion. Cette réparation, certes rapide, est encline aux mutations, mais sans elle, le génome pourrait perdre des centaines de gènes au sein d'un même segment de chromosome. La voie du NHEJ serait la principale voie de réparation utilisée par les rétrovirus lors de la finalisation de leur intégration (Daniel et al., 2004a; Li et al., 2001a). Durant le processus de jonction non homologue des extrémités, les deux extrémités de l'ADN cassé sont simplement reliées ensemble, parfois avec l'érosion ou l'ajout de quelques bases (Figure 19) (Burma et al., 2006; Lieber, 2008; Rothkamm et al., 2003; Shrivastav et al., 2008; Sonoda et al., 2006; Takata et al., 1998; Valerie and Povirk, 2003).

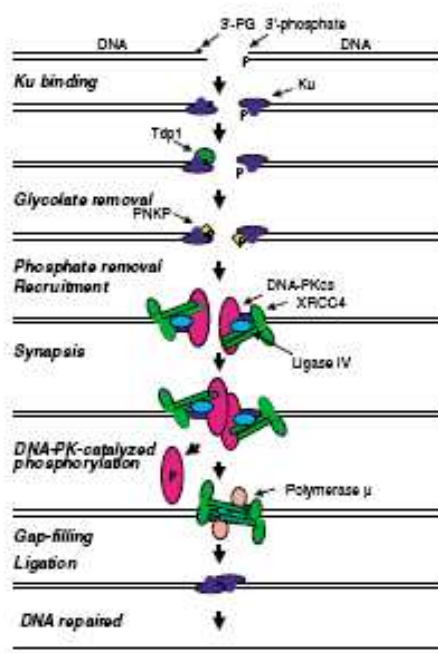


Figure 20. Mécanisme de jonction non-homologue des extrémités (Valerie et al, 2003). Ce mécanisme nécessite l'action de nombreuses protéines cellulaires et se caractérise par la simple jonction des extrémités lésées.

Les règles de réparation de l'ADN sont bien complexes et encore mal comprises pour certaines. Les différentes voies semblant souvent interconnectées.

L'action des différentes voies de réparation est étroitement liée aux acteurs du cycle cellulaire, notamment les Cdk (Branzei and Foiani, 2008) et aux protéines liées à l'apoptose dont p53 (Coultas and Strasser, 2000; Ford, 2005; Gatz and Wiesmuller, 2006). Nécessitant l'accès au plus près des nucléotides, les mécanismes de réparations sont également profondément liés à ceux du remodelage de la chromatine. Différentes études ont notamment montré le rôle prépondérant de l'histone déacétylase TIP60 et de l'histone acétyl-transférase Nu4A (Downs and Cote, 2005; Ikura et al., 2000; Utley et al., 2005) ainsi que des complexes INO80 et SWI/SNF (Downs and Cote, 2005; Misteli and Soutoglou, 2009)

Outre les nombreuses protéines déjà citées, d'autres ont également été identifiées comme facteurs impliqués dans les réparations. Ainsi, les protéines MDC1, 53BP (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009), BRIT (Chaplet et al., 2006) et XIP1 (Bekker-Jensen et al., 2007) s'associent avec les autres facteurs de réparation de l'ADN pour faciliter la réparation de la lésion et transmettre le signal de dommage à l'ADN.

Afin d'assurer le maintien de l'information génétique, la cellule a donc développé des mécanismes de réparation de la chromatine. Ces systèmes mettent en jeu de nombreux acteurs parmi lesquels ATM et ATR, les senseurs principaux des lésions de l'ADN. En parallèle des réparations de la chromatine, de nombreux autres processus cellulaires sont modulés, notamment le cycle cellulaire. En effet, en cas de lésion sur la chromatine, le processus de division cellulaire est en général stoppé, le temps que les réparations soient effectuées pour éviter toute division à partir d'une information génétique lésée.

III/ Le cycle cellulaire

A chaque division, la cellule réalise une série d'évènements collectivement appelés le cycle cellulaire. Ce cycle se divise en quatre phases qui ne se recoupent pas. Il inclut la duplication du génome durant la phase S de synthèse d'ADN, la ségrégation complète des chromosomes à chaque cellule fille durant la phase M. Des phases dites « Gap », nommées G1 et G2 permettent respectivement le lien entre la fin de la phase M et l'initiation de la phase S du cycle suivant, et la séparation des phases S et M d'un même cycle. Durant ces phases, les ARNm et les protéines s'accumulent de sorte à assurer la continuité du cycle. Selon les

conditions environnementales, les cellules en G1 peuvent temporairement ou définitivement quitter le cycle de division pour entrer en une phase de quiescence dite G0. Les analyses génomiques effectuées suite à l'infection par le VIH démontrent de nombreuses perturbations des facteurs du cycle cellulaire (Brass et al., 2008; Zhou et al., 2008). Hormis les analyses globales, de nombreuses autres études tendent également à valider l'implication prédominante du cycle cellulaire lors des infections rétrovirales (Amini et al., 2004; Andersen et al., 2008; Castedo et al., 2002; Paiardini et al., 2004; Romano and Giordano, 2008).

A/ Les protéines régulatrices

Le cycle cellulaire est finement régulé via le contrôle de l'expression et la destruction des cyclines, l'activation et l'inhibition des CDK (via leur phosphorylation et déphosphorylation) et l'expression et la destruction des protéines inhibitrices des CDK.

1/ Les CDK et les cyclines

La progression à travers le cycle cellulaire dépend de l'activation et de l'inactivation de kinases cycline dépendantes, les CDK, qui permettent la transition des phases successives du cycle (Figure 21). Les CDK sont des kinases sérine thréonine qui nécessitent (i) l'association avec une cycline et (ii) la phosphorylation de la boucle de liaison à l'ATP sur des sites spécifiques pour être activées. Leur action conjointe avec les cyclines permet la progression des phases G1, S, G2 et M. Les cyclines sont produites à chaque phase, ainsi, leur niveau protéique varie tout au long du cycle cellulaire. A l'inverse, le niveau protéique des CDK reste constant (Malumbres and Barbacid, 2009; van den Heuvel, 2005; Wohlbold and Fisher, 2009; Yata and Esashi, 2009).

Les Cdk1 (ou Cdc2), Cdk2, Cdk4 et Cdk6 s'associent directement avec les cyclines (A/E/D et B) pour permettre la progression du cycle cellulaire (Figure 20). Les infections par le VIH interagissent également avec la protéine Cdk1. Son activation est, en outre, liée à la mort par apoptose suite à l'infection virale (Castedo et al., 2002).

Mais d'autres CDK agissent en dehors du cycle cellulaire. Ainsi, la Cdk7 fait partie du complexe de transcription TFIIH, elle est responsable de la phosphorylation de la polymérase ARN II tandis que Cdk5 possède des fonctions neuronales et Cdk8/9 sont impliquées dans la régulation de la transcription. La protéine Cdk9, via son association avec la cycline T, est également liée à la réplication du VIH (Romano and Giordano, 2008).

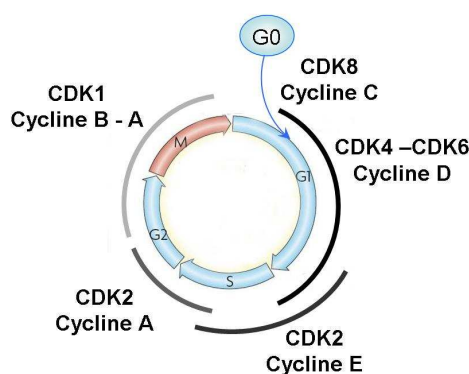


Figure 21. Phases du cycle cellulaire et activité des complexes CDK/Cycline. Au moment de la transition G0/G1, les cyclines D et C sont activées et s'associent à Cdk4/6 et Cdk8 respectivement pour favoriser l'entrée en division. Cdk2 permet ensuite la transition G1/S et la progression en phase S via son association avec la cycline E. Lors de la phase S, la cycline E est fortement présente, toujours complexée à Cdk2. Lors de la transition S/G2, la cycline A est activée et se lie à Cdk2 puis Cdk1 en phase G2. La progression en phase M requiert l'action spécifique de Cdk1 liée à la cycline B. Enfin, Cdk4 et Cdk6 s'associent avec la cycline D pour permettre la progression de la phase G1.

2/ Les inhibiteurs des CDK

De nombreuses protéines ont pour rôle de contrôler l'activité des CDK afin de renforcer la régulation du cycle cellulaire (Besson et al., 2008; Dai and Grant, 2003; Fischer et al., 2003; Galons et al., ; Maddika et al., 2007; Schwartz, 2002).

Les protéines Wee1 et Myt1 empêchent par exemple l'activation du complexe CDK/cycline en phosphorylant la boucle de fixation de l'ATP des CDK (Touny and Banerjee, 2006).

La famille des Cip/Kip (CDK interacting protein/kinase inhibitory protein) se compose de trois protéines : p21, p27 et p57 dont le rôle est encore mal connu (Coqueret, 2003; Maddika et al., 2007; Musgrove et al., 2004; Weiss, 2003). La protéine p21 a pour fonction majeure d'inhiber l'activité des cyclines A/E complexées à Cdk2 et donc de contrôler la transition G1/S. Le rôle précis de la protéine p21, molécule anti-apoptotique qui arrête le cycle cellulaire en G1, sera détaillé dans le paragraphe « La mort cellulaire ». La protéine p27 régule la transition G1/S en inhibant le complexe cycline E/Cdk2 et contrôle la fonction de Rb. La concentration de p27 au cours du cycle diminue lorsque les signaux mitogènes sont présents et augmente lorsqu'ils sont absents, la dégradation de p27 via l'action d'IL-2 est notamment nécessaire pour l'entrée en division de la cellule.

Le groupe des INK4 est constitué de 4 membres : p16/14 et p15, p18 et p19 (Canepa et al., 2007; Maddika et al., 2007; Tavera-Mendoza et al., 2006). La protéine p16 se lie à Cdk4/6 et empêche son interaction avec la cycline D tout en annulant le signal mitogénique E2F/Rb.

Ainsi, l'entrée en phase S est inhibée et la cellule reste en phase G1. La protéine p14, isoforme de p16, stabilise p53 et inhibe donc le cycle cellulaire. Cette protéine est également positivement régulée par E2F/Rb qui activent les promoteurs des gènes des cyclines A et E essentielles pour la phase S. Enfin, la protéine p15 bloque la phosphorylation de Rb par le complexe cycline D/Cdk4/6 et stoppe ainsi le cycle en phase G1 tandis que p18 et p19 augmentent la phase de transition G1/S. p18 agit notamment en synergie avec p27 pour contrôler Rb.

Enfin, les CDK sont régulées par deux complexes protéiques. Le complexe SCF possédant une activité E3 ubiquitine ligase cible les protéines en vue de leur dégradation et permet l'arrêt du cycle notamment via son action sur la cycline E. Il est lui-même régulé par l'action des kinases Plk1, Chk1/2. Le SCF est composé de trois protéines majoritaires : Skp1/Cul1/F-box protein. Le complexe APC, possédant également une activité E3 ubiquitine ligase, permet la séparation correcte des chromosomes durant la phase M et sera détaillé plus loin (Caldwell and Kaplan, 2009; Manchado et al., ; Nakayama and Nakayama, 2006; Skaar and Pagano, 2009; van den Heuvel, 2005).

3/ E2F et Rb

La protéine du rétinoblastome, Rb, est un répresseur transcriptionnel lié à la transition G1/S. Rb interagit avec un très grand nombre de protéines, la plupart étant couplées à la régulation de la transcription. Parmi ces protéines, on retrouve E2F et ses partenaires DP qui régulent les gènes essentiels du cycle cellulaire dont ceux responsables de la réplication en phase S et la réparation de l'ADN (Giacinti and Giordano, 2006; Maddika et al., 2007; van den Heuvel, 2005).

La famille Rb comprend trois membres : Rb, RBL1 et RBL2 qui provoquent l'arrêt du cycle cellulaire via leur rôle antagoniste à E2F/DP. Seules les formes sous-phosphorylées de Rb peuvent interagir avec E2F/DP pendant la phase G1 et empêcher la transcription. Rb est ensuite maintenue inactive durant tout le cycle (S, G2, M) via sa phosphorylation par les complexes Cdk/cyclines. La phosphorylation de Rb inactive sa capacité de répresseur transcriptionnel permettant ainsi l'expression des gènes sous le contrôle d'E2F/DP. Les complexes E2F/DP, sont divisés en deux sous groupes : les E2F activateurs (E2F1/2/3) et les E2F répresseurs de la transcription (E2F4/5/6).

Hormis leur action via E2F, les protéines Rb contrôlent la transcription d'une seconde manière : le remodelage de la chromatine. Elles recrutent notamment les HDAC, histones et ADN méthyltransférases, les complexes SWI/SNF, les protéines PcG.

B / Les points de contrôle

Les points de contrôle du cycle cellulaire sont généralement définis comme des voies de signalisation qui favorisent l'arrêt du cycle en cas de dommage à l'ADN, de réplication incomplète ou de division cellulaire imparfaite. Chaque phase du cycle cellulaire est ainsi finement contrôlée avant que la suivante ne soit activée, chaque point de contrôle agissant sur les acteurs de la phase suivante afin de l'inhiber (Figure 22) (Fuller and Stukenberg, 2009; Kastan and Bartek, 2004; Lisby and Rothstein, 2005).

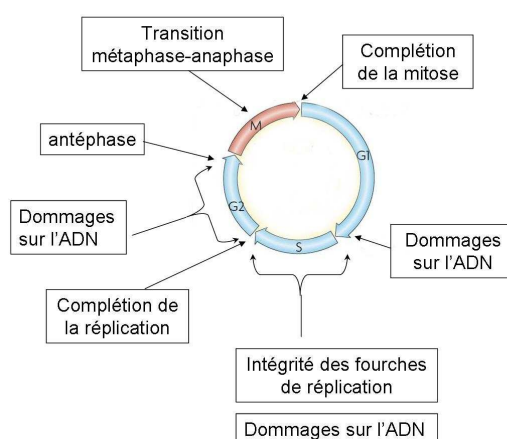


Figure 22. Les points de contrôle du cycle cellulaire. En début de phase G1, le contrôle de la complétion de la mitose vérifie que la cytokinèse soit complète et que chaque cellule fille comporte le bon nombre de chromosomes. Avant l'entrée en phase S et tout au long de la réplication, les senseurs ATM et ATR vérifient les dommages à l'ADN. Pendant la réplication, différents stress peuvent survenir aux origines et aux fourches de réplication. Les protéines RPA, diverses protéines Rad, Mec1, Mrc1 inhibent l'initiation de la réplication à partir d'origine défectueuse et protègent l'intégrité de la fourche de réplication en cas d'arrêt de cette dernière. Une fois la réplication terminée, la cellule vérifie que la totalité de l'ADN ait bien été répliqué avant que la cellule ne rentre en mitose. Toujours pour assurer que la mitose n'ait lieu qu'en présence de chromosomes intègres, les dommages à l'ADN sont contrôlés tout au long de la phase G2. Un autre point de contrôle se positionne en fin de phase G2, durant l'antéphase, avant que la cellule n'entre en mitose. Enfin, pendant la mitose, lors de la transition métaphase-anaphase, la ségrégation des chromosomes est contrôlée par l'Anaphase Promoting Complex (APC).

1/ Contrôle en phase G1

La phase G1 comporte deux points de contrôle : (i) vérification que la mitose précédente se soit bien passée et ait bien donné naissance à deux cellules filles séparées et (ii) vérification et réparation des dommages à l'ADN avant d'autoriser l'entrée en phase de réplication (de Bruin and Wittenberg, 2009; Kastan and Bartek, 2004).

C'est durant la dernière phase de la mitose, la télophase, que les deux cellules filles achèvent leur séparation pour rentrer en phase G1. Cette transition correspond à une phase de

contrôle de la complétion de la mitose, ainsi chaque cellule fille doit être correctement isolée de sa sœur (cytocinèse) et contenir le bon nombre de chromosomes.

En fin de phase G1 et avant d'autoriser la cellule à rentrer en phase de réplication et donc dans une nouvelle division cellulaire, les machineries de vérifications des dommages à l'ADN « scannent » le génome à la recherche de cassures. Ce n'est qu'une fois les réparations effectuées que l'activité des Chk1/2 diminue, favorisant l'activation du complexe cycline E/Cdk2 et l'entrée en phase S.

2/ Contrôle en phase S

C'est pendant la phase S que l'ADN est répliqué. Les contrôles peuvent se diviser en trois catégories (i) contrôle de l'intégrité des origines et des fourches de réplication, (ii) contrôle tout au long de la phase S des cassures ADN et réparation de ces dernières, enfin, (iii) contrôle en fin de phase S que la totalité de l'ADN a bien été répliquée (Kastan and Bartek, 2004; Segurado and Tercero, 2009)

Le premier point de contrôle peut être activé par différents stress touchant les origines et fourches de réplication tels qu'une déplétion en dNTP, une collision entre les fourches, des triplex d'ADN. Ce point de contrôle possède deux fonctions principales : inhiber l'initiation de la réplication à partir des origines défectueuses et protéger l'intégrité de la fourche de réplication en cas d'arrêt de cette dernière, et ce, jusqu'à ce que le stress soit passé. Il bloque également les origines tardives de réplication tant que les problèmes ne sont pas résolus.

Le contrôle des dommages à l'ADN, également appelé contrôle intra phase S est activé par les cassures double brin. Il permet d'activer les voies de réparation par recombinaison homologue et bloque les origines tardives de réplication. A l'inverse des contrôles de cassures ADN en phase G2 et G1, ce processus n'implique pas p53.

Le dernier contrôle qui prend place en fin de phase S a pour but de vérifier que la totalité de l'ADN ait bien été répliqué avant que la cellule ne rentre en mitose. Ce point de contrôle cible particulièrement l'activité de la cycline B/Chk1 et dépend des fourches de réplication.

3/ Contrôle en phase G2

Comme mentionné dans toutes les phases du cycle cellulaire précédentes, les dommages à l'ADN sont en permanence recherchés et réparés afin de maintenir l'intégrité du génome tout au long de la division cellulaire. En G2, ce point de contrôle a pour but principal de stopper le cycle après la réplication pour laisser aux machineries de réparation le temps de corriger les erreurs de l'ADN avant de rentrer en mitose. En phase G2, la cellule favorise la machinerie de

recombinaison. L'arrêt du cycle est provoqué par l'inhibition de la protéine Cdk1, le facteur principal du signal mitotique (Bassermann and Pagano, ; Kastan and Bartek, 2004). En cas d'infection par le VIH, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 est notamment induit par la protéine Vpr et provoque la mort cellulaire par apoptose (Amini et al., 2004; Andersen et al., 2008; Zhao and Elder, 2005).

Récemment, un nouveau point de contrôle a été identifié (Chin and Yeong). Ce dernier prend place durant l'antéphase, phase en G2 précédant la mitose à proprement dite mais où un début de condensation des chromosomes est visible. Contrairement aux autres contrôles en G2, il ne semble pas induit uniquement par les dommages à l'ADN ou les défauts de réplication. Pour le moment deux composants clé sont connus : les protéines CHFR et MAPK14/p38 (Chin and Yeong, ; Matsusaka and Pines, 2004). La protéine CHFR est une ubiquitine ligase interagissant notamment avec la kinase Aurora A, HDAC1 et les corps PML (Daniels et al., 2004; Privette et al., 2008; Yu et al., 2005). La protéine MAPK/p38 est une kinase bien connue, jouant un rôle majeur dans la signalisation cellulaire induite par différents stress tels que la radiation UV, les altérations de la structure de la chromatine (Thornton and Rincon, 2009).

4/ Contrôle en phase M

La mitose est un processus complexe faisant intervenir de nombreux acteurs et constituée de quatre grandes phases : prophase, métaphase, anaphase et télophase. Chacune de ces étapes est bien évidemment régulée par des facteurs spécifiques. Cependant, parmi ces différentes étapes, la transition métaphase-anaphase et son point de contrôle ont été particulièrement étudiés. La ségrégation des chromosomes est assurée par l'Anaphase Promoting Complex (APC) (Caldwell and Kaplan, 2009; Manchado et al.). Notamment composé de Cdc20 et CDH1, il possède une activité E3 ubiquitine ligase qui cible des facteurs clés du cycle tels que les cyclines B/A, la securine, NEK2, Aurora A/B et provoquent leur dégradation par le protéasome. L'APC est inhibé par les constituants du point de contrôle du fuseau mitotique. Celui-ci, nommé SAC (Spindle Assembly Checkpoint), est composé des protéines Mad1/2/3, Bud1/3 et Msp1. Il est activé pour inhiber l'APC jusqu'à ce que tous les chromosomes soient correctement attachés au fuseau mitotique (Fuller and Stukenberg, 2009; Malumbres and Barbacid, 2009).

La division cellulaire est un processus clé dans la vie d'une cellule. Pour assurer que cette division ne soit effectuée que dans des conditions optimales, de nombreux points de contrôle sont répartis tout au long des phases du cycle. Lorsqu'un point de contrôle ne peut pas être dépassé, signifiant par exemple la présence de dommages irréversibles de la chromatine, la cellule s'engage alors dans un processus de mort cellulaire.

IV/ La mort cellulaire

La mort cellulaire joue un rôle prédominant dans l'homéostasie des tissus, le développement et la réponse aux stress cellulaires. L'accumulation d'altérations génétiques des facteurs impliqués dans la croissance et la mort cellulaire est l'une des plus importantes causes de transformations malignes. Actuellement, plusieurs types de mort cellulaire ont été répertoriés. Ils sont divisés en deux sous groupes : les voies apoptotiques et les voies non apoptotiques (Blank and Shiloh, 2007).

A/ Les voies apoptotiques

Ce premier groupe rassemble l'anoikis et l'apoptose. Le premier processus est induit lorsque la cellule perd ses points d'attachement à son substrat (matrice extra-cellulaire) ou aux autres cellules (Blank and Shiloh, 2007).

L'apoptose, processus de mort cellulaire le plus connu, engendre des changements cellulaires sur les plans morphologiques et biochimiques (Beere, 2005; Blank and Shiloh, 2007; Krammer et al., 2007; Kuribayashi and El-Deiry, 2008; Movassagh and Foo, 2008). Une cellule en apoptose se caractérise ainsi par des bourgeonnements de la membrane plasmique, une réduction du volume du cytoplasme, une condensation de la chromatine et une fragmentation du noyau. L'apoptose peut être induite par deux voies différentes : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Figure 23). La voie extrinsèque est initiée par la liaison de ligands extracellulaires FASL aux récepteurs FAS à la surface cellulaire tandis que la voie intrinsèque (dite mitochondriale) est activée par différents facteurs de stress tels que des dommages à l'ADN ou au cytosquelette, un stress du réticulum endoplasmique, une perte de l'adhésion. Certains de leurs points communs résident dans (i) la formation de l'apoptosome, (ii) l'activation des caspases initiatrices et effectrices et (iii) le rôle de la protéine Bid. Plusieurs liens entre les infections virales et la régulation de l'apoptose ont été clairement établis (Boya et al., 2004; Saggioro et al., 2009). En cas d'infection par le VIH, il a été noté que la déplétion des lymphocytes T CD4 était liée à leur mort par apoptose (Cossarizza, 2008; Gougeon and Piacentini, 2009; Varbanov et al., 2006). La protéine virale Vpr semble fortement liée à ce processus de mort cellulaire (Andersen et al., 2008). Enfin, la voie mitochondriale semble également jouer un rôle prédominant (Cossarizza, 2008; Shedlock et al., 2008).

Les caspases, des cystéines protéases, constituent les derniers acteurs des voies apoptotiques (Demon et al., 2009; Grutter, 2000; Kurokawa and Kornbluth, 2009; Slee et al., 1999; Zhivotovsky, 2003). De façon classique, elles sont divisées en deux catégories : les

caspases initiateuses ou régulatrices: 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 12 et 13 et les caspases effectrices : 3, 6, 7, 11 et 14. Les caspases régulatrices sont chargées d'activer les caspases effectrices par clivage protéolytique. Les caspases possèdent plusieurs substrats parmi lesquels on retrouve les protéines de structure (actine, laminine), les ACINUS (ayant pour fonction de condenser la chromatine), ICAD (dont le clivage engendre la fragmentation de l'ADN), les protéines de réparation de l'ADN (qui sont inhibées pour éviter toute tentative de réparation), les protéines MEKK-1, PKC, PAK-2, Akt1 et Raf7 essentielles pour la survie cellulaire. Les protéines du cycle cellulaire telles que PARP, Rb, Mdm2 sont également ciblées.

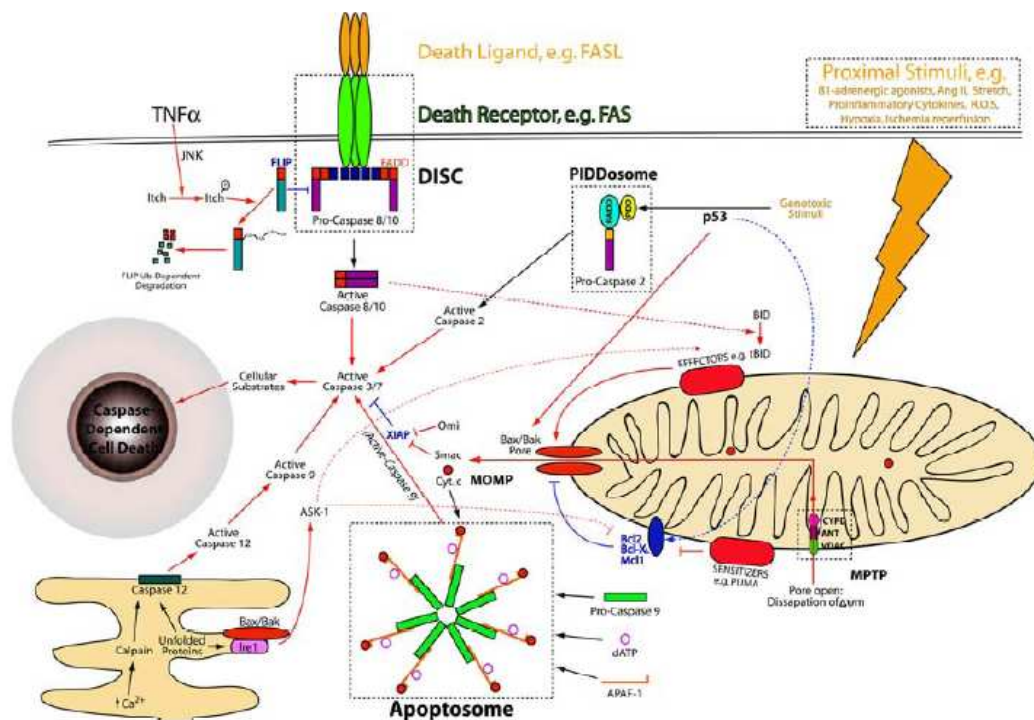


Figure 23. Les acteurs de l'apoptose (Movassagh et al., 2008). La voie dite extrinsèque est activée par la liaison de ligands extracellulaires (FASL) aux récepteurs de mort à la surface cellulaire (FAS). Cette association provoque le recrutement de divers facteurs intracellulaires, des adaptateurs qui forment alors le DISC (death inducing signaling complex). Ce signal aboutit à l'activation des caspases initiateuses puis des caspases effectrices et la formation de l'apoptosome. Ce complexe, formé par les protéines Apaf-1 et caspase 9 a pour fonction d'activer les caspases initiateuses et effectrices. La voie intrinsèque correspond à la voie dite mitochondriale. Cette voie de signalisation est basée sur les membres de la famille Bcl-2, certains sont pro-apoptotiques d'autres anti-apoptotiques. La mort cellulaire dépend de l'issue de la compétition pour se fixer à la membrane externe de la mitochondrie entre ces différents facteurs. Lors de ce processus, la membrane mitochondriale est sujette à la formation de pores par lesquels des protéines sont relarguées dans le cytoplasme. Le cytochrome c sert de cofacteur à la molécule Apaf-1 pour permettre la formation de l'apoptosome. Ce signal d'activation est responsable de l'induction de la MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization). Mais la perméabilisation de la mitochondrie provoque la libération de bien d'autres molécules pro-apoptotiques telles que Smac/Diablo, Omi/HtrA2. Ces dernières favorisent le signal pro-apoptotique en inactivant certaines molécules inhibitrices de l'apoptose nommées IAP. Enfin, l'homéostasie de la membrane mitochondriale est étroitement liée à la concentration du calcium du RE. Ainsi, la concentration du calcium cytosolique est régulé par Bax et Bcl-2 toutes deux présentes à la membrane mitochondriale. En cas de stress, on observe une forte libération de calcium dans le cytosol, via l'action des chaperonnes calreticuline et calnexine pouvant directement induire la MOMP et activer les caspases 12 et 9.

B/ Les voies non apoptotiques

Ce second groupe comprend cinq processus de mort cellulaire : l'autophagie, la nécrose, la mort cellulaire mitotique, la mort cellulaire indépendante des caspases et la sénescence (Blank and Shiloh, 2007; Rosner, 2003).

L'autophagie constitue l'un des mécanismes majeurs de mort cellulaire. Les protéines et les composants des organelles sont dirigés vers des lysosomes où ils seront dégradés. Une cellule en autophagie se caractérise par l'apparition de nombreuses structures de type vacuolaires à l'intérieur du cytoplasme nommées les autophagosomes. La déplétion des lymphocytes T CD4 lors d'une infection par le VIH pourrait également impliquer le processus d'autophagie (Espert and Biard-Piechaczyk, 2009; Espert et al., 2007; Gougeon and Piacentini, 2009). Ce processus d'autophagie implique la Beclin, protéine responsable de la formation des autophagosomes via son association avec la PI3K. D'autres facteurs ont été décrits comme acteurs de l'autophagie : p53, PTEN, AKT, DAPK (Balaburski et al., ; Blank and Shiloh, 2007; Funderburk et al.).

La nécrose est en général la conséquence de mauvaises conditions physiologiques telles qu'une infection, une inflammation, ou une ischémie. La nécrose se caractérise par une déplétion en énergie cellulaire (ATP), des dommages dans la membrane plasmique, l'activation de protéases non apoptotiques, et une dérégulation de l'homéostasie ionique (Blank and Shiloh, 2007).

La mort cellulaire mitotique (Mitotic Cell Death MCD) survient en cas de mitose aberrante aboutissant à la formation de cellules avec deux micronoyaux ou plus (Blank and Shiloh, 2007). Ce processus peu connu est surtout observé dans les cellules défectueuses pour les points de contrôle du cycle cellulaire. Deux mécanismes d'action pour la MCD sont proposés : la duplication aberrante des centrosomes menant à une mitose multipolaire et donc la formation de plusieurs micronoyaux ou l'activation inopinée de Cdk1 et l'entrée en mitose alors que l'ADN n'a pas été réparé.

La mort cellulaire indépendante des caspases (Caspase Independent Cell Death CICD) fait intervenir la voie mitochondriale via l'induction de la MOMP sans que les caspases ne soient activées (Blank and Shiloh, 2007; Tait and Green, 2008).

La sénescence est décrite comme un programme de transduction d'un signal aboutissant à l'arrêt irréversible de la croissance cellulaire (Blank and Shiloh, 2007; Campisi, 1998). Les cellules en sénescence possèdent une membrane plasmique dont l'intégrité reste

intacte mais sont incapables de se multiplier. Deux types de sénescence existent : la sénescence accélérée et la répllicative. La sénescence répllicative résulte du raccourcissement progressif des télomères durant les divisions cellulaires ayant pour résultats l'induction d'un signal menant à l'arrêt permanent de la croissance cellulaire. La sénescence accélérée est observée à la suite de dommages à l'ADN. La sénescence s'accompagne le plus souvent de changements morphologiques, ainsi la cellule devient plus volumineuse et présente une forte granularité. De plus, des altérations dans la structure de la chromatine et dans l'expression des gènes ont été observées.

C/ Les protéines clés

1/ La protéine p53

Le gène suppresseur de tumeur p53 code pour une protéine nucléaire dont la fonction est altérée dans plus de 50% des cancers humains. La plupart des infections virales impliquent également la dérégulation de cette protéine, c'est notamment le cas des infections par le VIH (Castedo et al., 2005; Imbeault et al., 2009; Perfettini et al., 2004). La protéine p53 est une protéine clé de la cellule, puissant activateur transcriptionnel régulant de nombreux gènes (p21, GADD45, 14-3-3, BRG2,...) elle agit sur de nombreuses fonctions cellulaires, allant de la réparation des lésions de l'ADN à la mort cellulaire (Adimoolam and Ford, 2003; Farnebo et al., ; Ford, 2005; Gatz and Wiesmuller, 2006; Giono and Manfredi, 2006; Helton and Chen, 2007; Talos and Moll, ; Vousden, 2000; Zuckerman et al., 2009).

Ainsi, en cas de stress génotoxique, la protéine p53 est directement activée par les protéines ATM et DNA-PK. La protéine p53 peut par la suite induire soit l'apoptose soit l'arrêt transitoire du cycle cellulaire, laissant le temps à la cellule en division de réparer ses lésions.

Lors de la transition G1/S et en cas de stress, la protéine p53 active p21. Cette dernière inhibe la phosphorylation de la protéine Rb qui reste alors complexée aux facteurs E2F empêchant ainsi la transcription des gènes impliqués dans la phase S. Au moment de la transition G2/M, p53 active la protéine 14-3-3. Celle-ci séquestre alors le complexe cycline B/Cdk1 dans le cytoplasme, ce qui empêche la progression en mitose.

Lorsque la cellule ne peut plus réparer ses lésions, p53 induit la mort cellulaire programmée par apoptose en provoquant une diminution de Bcl-2 et une augmentation de Bax. De plus, p53 inhibe les gènes des facteurs anti-apoptotiques tel que la survivine tout en activant transcriptionnellement les gènes (i) pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, (ii) de la protéine Apaf-1, composant essentiel de l'apoptosome, (iii) des caspases effectrices.

Mais la fonction de p53 ne se résume pas à la protection contre les lésions génotoxiques. L'activation d'oncogène, l'hypoxie, les anomalies dans la concentration des ribonucléotides conduisent également à l'activation de la protéine. Deux protéines homologues ont également été identifiées : p63 et p73, constituant ainsi la famille p53 et possédant des rôles redondants (Kaghad et al., 1997; Murray-Zmijewski et al., 2006; Pietsch et al., 2008; Yang et al., 1998).

L'activité de la protéine p53 est finement régulée de manière post-traductionnelle. En effet, son activation fait intervenir des événements de stabilisation/déstabilisation de la protéine sans aucune variation au niveau transcriptionnel. Ainsi, la protéine est inactivée et parfois dégradée lorsqu'elle est complexée avec Mdm2 (Prives, 1998; Zhang and Xiong, 2001).

2/ La protéine p21

La protéine p53 décrite précédemment régule la transcription de nombreux gènes parmi lesquels on retrouve la protéine p21. Cette dernière répond à de nombreux stimuli pour permettre l'inhibition de la croissance cellulaire, l'arrêt du cycle et la régulation de la transcription (Abbas and Dutta, 2009; Besson et al., 2008; Coqueret, 2003; Fischer et al., 2003; Schwartz, 2002; Weiss, 2003).

Le cycle cellulaire est négativement régulé par p21, cette dernière possédant la capacité de se lier à (i) la protéine PCNA, inhibant la réplication de l'ADN et les mécanismes de réparations par MMR et BER et à (ii) Cdk1/2 inhibant ainsi leur activité. La protéine p21 servirait à protéger la cellule de l'apoptose en arrêtant le cycle cellulaire, en laissant le temps aux mécanismes de réparation, en favorisant la transcription des gènes anti-apoptotiques et supprimant l'induction des gènes pro-apoptotique (induits par Myc et E2F1).

La protéine p21 est régulée à différents niveaux. En effet, elle lève la répression transcriptionnelle médiée par p300/BREBBP, ayant pour conséquence l'activation du gène CDKN1A codant pour p21 elle-même. Cette boucle d'amplification positive permet le renforcement de l'action de la protéine. La transcription du gène CDKN1A est également régulée par p53, la voie des MAP kinases, les récepteurs aux acides rétinoïques, à la vitamine D et aux androgènes. Mais la protéine est également régulée de façon post-traductionnelle. Sa dégradation par le protéasome est médiée par les complexes APC et SPC, sa localisation cellulaire ainsi que sa stabilité sont contrôlées par diverses phosphorylation via les kinases Cdk2 et Akt1.

3/ La famille Bcl-2

La famille des protéines intracellulaires Bcl-2 constitue le régulateur central de l'activation des caspases via la signalisation mitochondriale. La famille se divise en trois groupes : (i) les protéines de type Bcl-2, (ii) les BH3 only et (iii) les protéines de type Bax. Les fonctions antagonistes pro et anti apoptotique des membres de cette famille arbitrent la décision de vie ou de mort d'une cellule. Ainsi, un excès de Bcl-2 signe la survie tandis qu'un excès de Bax est synonyme de mort (Cory and Adams, 2002; Zinkel et al., 2006).

Le groupe de protéines de type Bcl-2 comprend cinq membres : Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, A1 et Mcl1. Ces protéines anti-apoptotiques se localisent sur les membranes de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique et du noyau. Tandis que Bcl-2 est un composant permanent de ces membranes, les autres protéines ne s'y retrouvent qu'en cas de stress cellulaire. Bcl-2 peut contrôler l'apoptose via le réticulum endoplasmique et la caspase 12, indépendamment de la présence d'Apaf1 et du cytochrome c. Les protéines Bcl-2 agiraient à la membrane de la mitochondrie pour empêcher l'oligomérisation de Bax et Bak. La protéine Bcl-2 serait étroitement régulée par la protéine virale Tat du VIH. Ainsi l'activation transcriptionnelle par Tat induirait l'expression de Bcl-2 afin d'inhiber le processus d'apoptose (Corallini et al., 2002; Zheng et al., 2007).

Les deux autres groupes sont composés de molécules pro-apoptotiques. Le groupe des BH3 only comprend huit membres : Bid, Noxa, Puma, Bad, Bik, Bmf, Hrk et Bim. Ces protéines favorisent l'apoptose en cas de stress cellulaires et ne peuvent pas induire la mort sans l'action des protéines de type Bax. L'action des protéines Bim et Bmf est régulée par des interactions protéiques, elles sont en effets respectivement séquestrées par la dynéine associée aux microtubules et par l'actine du cytosquelette. Bad devient active après sa phosphorylation par AKT et la PKA, lui permettant de se lier à la protéine 14-3-3 tandis que Bid nécessite un clivage protéolytique par la caspase 8 pour être fonctionnelle. Enfin, Noxa, Puma et Hrk sont régulées au niveau transcriptionnel.

Le groupe de type Bax, composé de Bax, Bak et Bok, joue majoritairement un rôle au niveau de la mitochondrie bien qu'une action dans le réticulum endoplasmique ne soit pas exclue. Ces protéines pro-apoptotiques, sous forme oligomérique, contribuent à la perméabilisation de la membrane mitochondriale permettant ainsi la libération des protéines apoptogéniques comme le cytochrome c. Bax se retrouve sous forme monomérique dans le cytosol. En cas d'induction de l'apoptose, la conformation de la protéine change et elle intègre la membrane externe de la mitochondrie sous forme d'oligomères. A l'inverse, même hors condition de stress, Bak est un constituant oligomérique permanent de la membrane

externe de la mitochondrie. Un changement conformationnel de Bak, qui induirait la formation de plus gros agrégats, serait également provoqué par l'induction de l'apoptose.

Les processus de mort cellulaire sont donc divers, le plus étudié étant l'apoptose. Cette dernière, étroitement liée aux autres processus cellulaires tels que le cycle de division, la réparation de l'ADN ou les stress oxydatifs, est mise en route en dernier recours, lorsque la cellule ne peut plus ni réparer ses dommages ni passer outre le stress subit. Ce mécanisme de mort cellulaire programmée est essentiel pour l'intégrité de l'organisme puisqu'il permet l'élimination des cellules lésées, c'est ainsi que l'organisme se protège notamment de la survenue des tumeurs.

Chapitre 4 : Relation hôte-pathogène : la cellule face au VIH

Puisque notre étude utilise le VIH comme outil intégratif, permettant l'insertion de l'ADN étranger au sein du génome de la cellule infectée, ce dernier chapitre sera consacré aux facteurs cellulaires identifiés lors d'études préliminaires et modulés en cas d'infections au VIH. Ce dernier chapitre se divise en deux parties. Dans un premier temps, les mécanismes de défenses cellulaires comprenant l'immunité innée ainsi que certains facteurs de restriction spécifique au VIH seront abordés. En effet, cette notion d'immunité sera par la suite revue lors des résultats de notre étude. La seconde partie sera consacrée aux facteurs déjà identifiés lors des études globales précédentes, menées sur la totalité du cycle viral et impliquant donc le processus d'intégration, qui nous intéresse plus particulièrement.

I/ Les défenses cellulaires

A/ L'immunité innée

La présence d'un système immunitaire efficace, permettant à la fois la reconnaissance et l'élimination des pathogènes, est cruciale pour que l'organisme se défende contre les infections. Le système immunitaire se divise en deux catégories : la réponse innée qui est immédiate et constitue la première barrière défensive et une réponse plus tardive mais hautement spécifique nommée réponse adaptative.

L'induction de l'immunité innée se caractérise notamment par la détection des pathogènes ou de leurs constituants via les interactions des Pattern Recognition Receptor (PRR) et des Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP). Cette liaison initie par la suite les cascades de signalisation. L'immunité innée dépend également des cellules sécrétrices de messagers et initiateurs de la réponse adaptative telles que les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les cellules NK (Natural Killer).

Les PRR présentent des localisations subcellulaires et des ligands spécifiques (Kumar et al., 2009; Ranjan et al., 2009; Takeuchi and Akira, 2009). Ils se subdivisent en plusieurs catégories : les Toll-like Receptor (TLR), les Rig-like Receptor (RLR) et les Nod-like Receptor (NLR) (Figure 24).

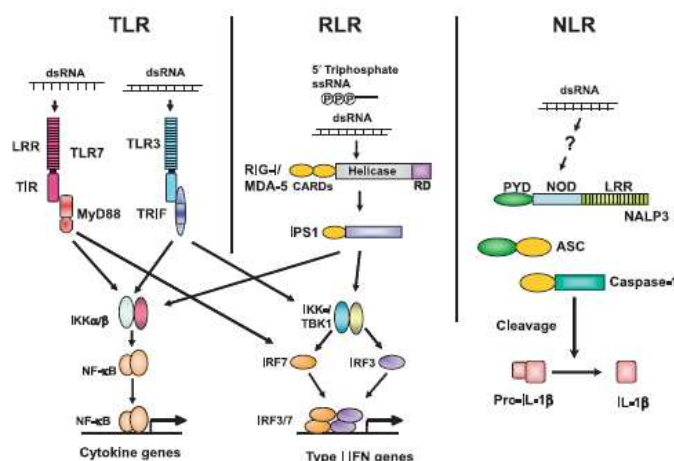


Figure 24. Signalisation par les Pattern Recognition Receptor (Takeuchi et al, 2009). Les PRR se divisent en trois classes : (i) les Toll-like Receptor (TLR), (ii) les Rig-like Receptor (RLR) et (iii) les Nod-like Receptor (NLR). Ces voies de signalisation, activées par la détection des pathogènes, permettent l'activation des gènes des cytokines, des interférons de type I et l'activation de l'interleukine IL-1β.

Les NLR comportent plus de 20 membres et sont des senseurs majeurs du stress et des infections intracellulaires. Les membres les plus connus sont NOD1 et NOD2, impliqués dans la reconnaissance des bactéries, et CIITA, essentiel dans les mécanismes de défense antivirale et la présentation au CMH II (Bryant and Fitzgerald, 2009; Shaw et al.).

La famille des RLR comporte deux membres essentiels : RIG-1 et MDA-5 (Barral et al., 2009). Ces deux protéines sont impliquées dans la reconnaissance des ARN cytoplasmiques de nombreux virus (paramyxovirus, VSV et influenza pour RIG-1 et picornavirus pour MAD-5) (Postigo and Ferrer, 2009).

Parmi les TLR, les TLR7 et 8, récepteurs présents dans les endosomes, sont impliqués dans la reconnaissance des ARN simple brin viraux notamment ceux du VIH. Il est à noter que le TLR7 est indispensable pour la reconnaissance du VIH contrairement au TLR8 (Genin et al., 2009). L'infection par le VIH a également été impliquée dans l'activation d'autres TLR comme TLR4 et 3 via l'enveloppe du virus (Cavaleiro et al., 2007; Sanders et al., 2008). Après activation des TLR, le signal intracellulaire est médié par un adaptateur, celui-ci interagit avec d'autres adaptateurs et permet l'activation des facteurs tels que les IFN de type 1 et NF-κB. Par la suite, les cytokines et chémokines pro-inflammatoires type TNFα, et les interleukines 1/6/12 sont libérées afin de coordonner l'immunité innée et l'immunité adaptative (Postigo and Ferrer, 2009).

Les TLR et RLR sont des acteurs de l'induction des IFN et des cytokines tandis que les NLR agissent principalement au niveau de l'expression de l'interleukine 1β. De part leur

fonction clé dans la signalisation de la présence d'un pathogène, de nombreux virus tentent d'inhiber les interactions protéiques ou les cascades de signalisation induites par les PRR (Postigo and Ferrer, 2009) (Figure 25). Ainsi, le HVC bloque la signalisation par le TLR3, en clivant l'adaptateur TRIF, le VSV inhibe TRAF6 et IRAK2 tandis que les virus influenza et les paramyxovirus de type V empêchent l'action de RIG-1 et MDA-5 respectivement. On sait désormais que le VIH inhibe l'action de IRF3 afin d'empêcher la signalisation via les TLR (Doehle et al., 2009).

Les interférons se divisent en deux groupes : type 1 (α et β) et type 2 (γ). Les IFN de type 1 sont produits par les cellules dendritiques, et dans une moindre mesure par les cellules épithéliales et les fibroblastes (Genin et al., 2009). Ils initient les réponses innées et adaptatives en régulant l'expression de plus d'une centaine de gènes. Ils induisent également la maturation des cellules dendritiques ainsi que la présentation des antigènes par le CMH I. L'interféron de type 2, ou IFN γ , est une cytokine aux propriétés antivirales et anti tumorales.

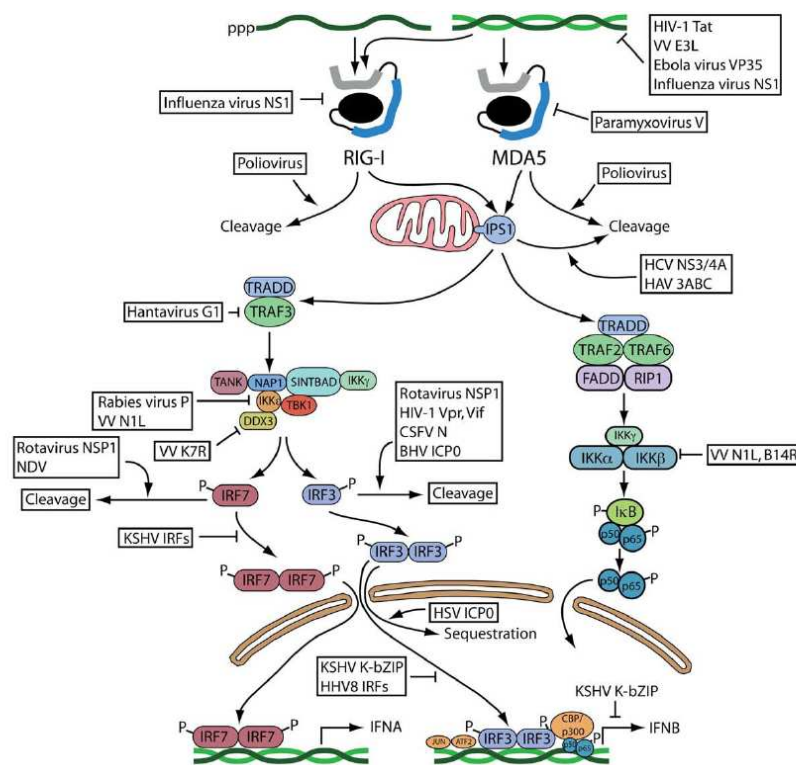


Figure 25. Interaction entre les voies de signalisation des PRR et les virus (Barral et al, 2009). Afin de limiter la réponse cellulaire induite par l'infection virale, de nombreuses protéines virales ont pour rôle de bloquer les voies de signalisation liées aux PRR.

Une infection provoque en premier lieu l'activation des voies PRR ce qui engendre la production des IFN ainsi que le recrutement des effecteurs de l'immunité (monocytes, macrophages, les cellules dendritiques et Natural Killer) et la libération des molécules de

signalisation (cytokines et chémokines). Cette cascade de médiateurs engendre l'activation des cellules de l'immunité adaptative, en particulier les lymphocytes T et B.

B/ Les facteurs de restriction des infections par le VIH

Au cours des dernières années, un nombre croissant de facteurs cellulaires ayant la capacité d'inhiber la réplication des rétrovirus ont été identifiés. Ces facteurs de restrictions aux rétrovirus ont été découverts à la suite d'une observation faite sur les infections par le SIV. En effet, les cellules humaines ne pouvaient pas être affectées par le SIV tandis que le VIH ne pouvait infecter que les cellules de primates. Ces facteurs ciblent différentes étapes du cycle de réplication du VIH, notamment la décapsidation, la reverse transcription et le bourgeonnement.

1/ La famille des TRIPartite Motif (TRIM)

La protéine TRIM5 α est un des facteurs de restriction les plus étudiés. Cette protéine constitue une barrière à la transmission des rétrovirus entre les espèces. En effet, la protéine humaine bloque le rétrovirus MuLV tandis qu'elle n'affecte pas le VIH. A l'inverse, la protéine des singes verts d'Afrique les protège contre le VIH mais n'a aucune action sur SIV (Song et al., 2005; Stremlau et al., 2005).

Les TRIM font partie des complexes E3 ubiquitine ligase, chaque TRIM présente une localisation particulière et la plupart se regroupent sous forme de foyers subcellulaires (Williams and Burdo, 2009). Ceci est notamment le cas de la protéine PML, bien connue pour son lien avec les infections virales, son rôle précis restant néanmoins à définir (Everett and Chelbi-Alix, 2007; Regad and Chelbi-Alix, 2001). Les TRIM possèdent une séquence RING responsable des interactions protéiques. L'interaction entre TRIM5 α et les rétrovirus s'effectue via la protéine de capsid au moment de la décapsidation. L'action de cette protéine sur la réplication virale est encore mal comprise mais TRIM5 α ciblerait la capsid et, via sa relation avec les E3 ubiquitine ligases, provoquerait sa dégradation par le protéasome, empêchant ainsi la poursuite du cycle viral (Black and Aiken, ; Williams and Burdo, 2009). TRIM5 α pourrait agir d'autres manières, notamment en séquestrant les cores des virions dans les foyers qu'elles créent ou en perturbant le transport du PIC (Freed and Mouland, 2006; Williams and Burdo, 2009).

2/ La famille APOBEC

Les protéines APOBEC sont des cytidines déaminases, elles transforment donc une base cytosine en uracile. La première protéine de cette famille identifiée comme facteur de restriction à l'infection par le VIH fut APOBEC3G (Goila-Gaur and Strebel, 2008; Harris and Liddament, 2004). Cette protéine est encapsidée dans les virions au moment du bourgeonnement viral grâce à son interaction avec les protéines Gag et l'ARN viral. Néanmoins, elle n'agit que lors du cycle réplcatif suivant. Ainsi, au moment de l'étape de réverse transcription, APOBEC3G agit sur 4% du brin ADN négatif, la transformation C→U sur le brin (-) engendre des mutations G→A sur le brin (+). Ces hypermutations rendent l'ADN viral instable et cible de la protéine APE1, elles empêchent également le bon encodage des protéines virales et inhibent ainsi le cycle viral.

L'action d'APOBEC3G est contrecarrée par la protéine virale Vif (Harris and Liddament, 2004; Williams and Burdo, 2009). Cette dernière est indispensable au virion infectant une cellule exprimant APOBEC. Vif inactive APOBEC au moment du bourgeonnement. Elle empêcherait son encapsidation en abaissant le niveau cytoplasmique de la protéine et en la dirigeant vers une dégradation par le protéasome. La protéine Vif du VIH n'agit que sur APOBEC3G des cellules humaines ou de chimpanzé mais pas sur la protéine des rongeurs ou des singes verts d'Afrique. Le rôle restrictif d'APOBEC3G serait également valable pour les virus de l'hépatite B (HBV) et HTLV-1 constituant ainsi un des composants majeur de l'immunité innée antivirale (Strebel et al., 2009). A noter que de nombreux autres membres de la famille APOBEC possèderaient un rôle antiviral similaire (Dang et al., 2006; Doehle et al., 2009; Harris and Liddament, 2004; Holmes et al., 2007; Luo et al., 2007; Takeuchi and Akira, 2009). Cette famille de protéine jouerait également un rôle sur le contrôle des éléments transposables (transposons et rétrovirus endogènes (Sawyer et al., 2004).

3/ Bst-2 / Tetherine

BST-2 est une glycoprotéine transmembranaire de type II contenant une ancre GPI. Cette dernière confèrerait à BST-2 la propriété de retenir les virions à la surface cellulaire et de les lier entre eux, empêchant ainsi le bourgeonnement des particules virales (Tokarev et al., 2009). L'infection virale induit la réponse IFN qui elle-même active l'expression de Bst-2. Pour contrer l'action de Bst-2, les infections par le VIH requièrent l'action de Vpu au moment du bourgeonnement. A l'inverse, les virions infectant des cellules n'exprimant pas BST-2 ne nécessitent pas l'action de Vpu pour leur libération (Neil et al., 2006; Strebel et al., 2009; Tokarev et al., 2009).

Vpu agirait sur BST-2 par une interaction protéique directe. A la surface cellulaire, l'expression de BST-2 est fortement abaissée sans que les mécanismes d'endocytoses cellulaires ne soient altérés (Strebel et al., 2009). L'action de Vpu consisterait plutôt à empêcher l'arrivée de BST-2 à la membrane. On note que le niveau cellulaire global de BST-2 est fortement réduit sous l'action de Vpu sans que le mécanisme sous-jacent ne soit précisément connu. BST-2 pourrait être la cible d'une dégradation par le protéasome, ou d'une séquestration intracellulaire (Goffinet et al., 2009). Le VIH est sensible aux protéines BST-2 de différentes espèces dont la souris, le rat et le singe mais seule les protéines BST-2 humaine et du chimpanzé sont sensibles à l'action de Vpu du VIH (Goffinet et al., 2009; McNatt et al., 2009)

4/ Autres

D'autres protéines cellulaires ont été identifiées comme facteurs limitant de la réplication rétrovirale. Ainsi la protéine Rad51 régulerait l'activité de l'intégrase (Desfarges et al., 2006). Des expériences menées chez les levures exprimant l'intégrase du VIH corrélées avec des tests d'activité de la protéine démontrent que Rad51 abaisserait l'activité de l'intégrase. La protéine ZAP pourrait bloquer l'accumulation cytoplasmique des ARNm de plusieurs virus dont MuLV et les alphavirus. Cette action nécessiterait une courte séquence ARN située au niveau du LTR 3' (Goff, 2004). Certaines activités de restriction par ARNi ou par des miARN ont également été identifiées lors d'infections par le VIH. Pour contrer ces inhibiteurs, le VIH code pour des supprimeurs d'ARNi contenus dans la protéine Tat et la région TAR (Lu and Liston, 2009; Strebel et al., 2009).

II/ Les modifications cellulaires globales provoquées par l'infection au VIH

Depuis de nombreuses années les scientifiques s'attachent à identifier les facteurs cellulaires essentiels à la réplication virale. Les nouvelles techniques de puces à ADN, d'ARNsi et de protéomique bidimensionnelle ou sur chromatographie permettent désormais d'identifier de nombreux facteurs en une seule analyse globale.

A/ Les analyses transcriptomiques

Beaucoup d'études se sont attachées à l'analyse du transcriptome des cellules infectées par le VIH ou un vecteur dérivé. Les analyses réalisées entre les années 2000 et 2006 sont

répertoriées dans la revue de Giri et al. (Giri et al., 2006). Les populations cellulaires analysées sont multiples, allant des CD4⁺, monocytes et PBMC aux cellules HeLa et les systèmes d'études sont le plus souvent *in vitro*.

Parmi les articles cités, l'équipe de Wen a testé l'expression génique de deux lignées cellulaires U937 (pré-monocytes) et Hut78 (CD4⁺) suite à une infection par le VIH (Wen et al., 2005). Les données ont été collectées et analysées 2 à 3 jours après infection sur des puces à ADN contenant 550 gènes spécifiques de l'immunité. Globalement, on note deux fois plus d'inhibition que d'activation à la suite de l'infection virale. En prenant une variation minimale de 1,5 entre les cellules infectées et non infectées, 38 facteurs modulés par le VIH chez les U937 ont été identifiés contre 28 chez les Hut78. Par la suite, les auteurs ont validé ces résultats par RT PCR quantitative.

Une étude similaire a été réalisée sur les cellules CEM infectées ou non par le VIH (Geiss et al., 2000). Les données ont également été analysées 2 à 3 jours après infection, sur des puces contenant environ 1500 gènes. Peu de variations ont été observées à 2 jours p.i. mais 20 gènes ont pu être identifiés comme modulés par l'infection virale avec une variation minimale de 1,5. Ces dérégulations de gènes, participant à de nombreuses fonctions cellulaires (trafic intracellulaire, régulation de la transcription, métabolisme, ...) ont ensuite été validées par northern blot.

Par la suite, les lymphocytes CD4⁺ provenant de 5 donneurs sains ont été isolés et soumis à des infections par le VIH (Imbeault et al., 2009). Les analyses ont été réalisées à 8h et 24h après infection. Parmi les 12 600 gènes analysés, 404 sont notés dérégulés par l'infection virale avec une variation minimale de 2. Les fonctions cellulaires telles que l'apoptose, la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire et le métabolisme des ARN sont impliquées. Les auteurs se sont, par la suite, attachés à l'étude de la surexpression de p53 et de l'induction de la réponse interféron par des analyses en PCR quantitative et western blot.

Les études suivantes ont été menées sur des PBMC issues de patients séropositifs. Les patients séropositifs se divisent en deux classes : les « non progressseurs » présentent une charge virale faible malgré l'infection et l'absence de traitement, les « progressseurs » présentent une charge virale plus élevée et nécessitent un traitement antiviral pour la contrôler. Deux études ont notamment été réalisées sur des patients non infectés, ou présentant différents stades de l'infection par le VIH (Hyrca et al., 2007; Li et al., 2009a).

La première analyse est réalisée sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ d'une vingtaine de donneurs (i) progressseurs en phase aigüe, (ii) progressseurs en phase chronique, (iii) non progressseurs et (iv) sains (Hyrca et al., 2007). Les analyses sont réalisées sur des puces

ciblant 16 500 gènes. A la suite des premières analyses, les classes (i)/(ii) et (iii)/(iv) ont été regroupées, en effet aucune différence n'a été mise en évidence entre les patients sains et les non progresseurs. De même seuls 4 gènes différentiellement exprimés ont été identifiés entre les groupes de patients progresseurs. En comparant les classes regroupées, un total de 533 gènes ont été annotés comme sur exprimés chez les patients progresseurs contre 844 gènes sous exprimés. De nombreux facteurs impliqués dans l'immunité ont été décrits, à la fois pour les cellules CD4⁺ et les CD8⁺. Pour valider leurs résultats, une analyse par PCR quantitative sur 77 gènes choisis arbitrairement a été réalisée. Une discordance d'environ 10% entre les résultats des puces et ceux des PCR quantitatives a été rapportée.

La seconde étude a été menée sur les PBMC de 27 donneurs (i) sains, (ii) progresseurs en phase aigüe, (iii) progresseurs asymptomatique et (iv) progresseurs en stade SIDA (Li et al., 2009a). Les auteurs constatent que chaque stade de l'infection possède sa propre signature transcriptomique. Au total, l'étude a démontré 766 gènes dérégulés par l'infection au VIH parmi les quelques 47 000 transcrits contenus sur la puce (variation minimale de 1,7). La plupart des gènes sont associés à la phase aigüe de l'infection (70%) et seulement 6% des gènes communs aux trois stades de l'infection. Lors de cette phase aigüe, de nombreuses fonctions biologiques sont altérées telles que le cycle cellulaire (notamment la cycline E), la réponse immunitaire (APOBEC3B, F, G), l'apoptose, le métabolisme et la régénération des tissus et des cellules. Les résultats ont, là encore, été validés par RT PCR quantitative.

Des études ont également été menées afin de comparer le profil transcriptomique de patients infectés par le VIH et soumis ou non à un traitement antiviral (Rotger et al., ; Van den Bergh et al., ; Wu et al., 2008). Toutes ont pour but d'étudier les mécanismes naturels de contrôle de l'infection par le VIH chez les patients non progresseurs. En comparant les profils transcriptomiques des différents patients, ces études aboutissent aux mêmes voies cellulaires (en outre l'apoptose, le cycle cellulaire, le protéasome et la voie de l'interféron). Ceci laisse supposer que ces voies cellulaires soient impliquées dans l'infection au VIH sans pouvoir déterminer si elles sont liées à la charge virale du patient ou au contrôle de l'infection par des mécanismes antiviraux.

Dans une première analyse, les lymphocytes T CD8⁺ des patients non progresseurs sont comparés à ceux issus des patients sains ou des patients progresseurs sous traitement (198 donneurs au total) (Wu et al., 2008). Là encore, peu de différences ont été notées entre les non progresseurs et les patients séronégatifs. En effet, seuls 7 gènes ont été identifiés sur les 48 000 testés. La comparaison des progresseurs et non progresseurs a permis de mettre en évidence 68 gènes dérégulés par la forte charge virale. Certains de ces facteurs étaient déjà liés au VIH, comme TRIM5 mais bien d'autres voies cellulaires ont été mises en évidence telles que la voie de l'interféron, le cycle cellulaire, la cytotoxicité, le métabolisme.

Dans une autre étude, la comparaison des non progresseurs et des progresseurs non traités a mis en évidence la dérégulation de 260 gènes associés à une forte réplication virale. Parmi ces gènes, ceux codants pour les protéines APOBEC3G, BST2 et pour les autres facteurs appartenant aux défenses cellulaires innées, ont été identifiés. De plus, les profils de ces 260 gènes ont été comparés sur (i) les non progresseurs, (ii) les progresseurs non traités, (iii) les progresseurs efficacement traités, (iv) les progresseurs non efficacement traités et (v) les patients sains. Les auteurs ont constaté que les profils de ces gènes chez les patients efficacement traités étaient similaires à ceux des patients non progresseurs et se rapprochaient des patients sains ; confirmant les résultats des précédentes études et suggérant que ces 260 gènes soient liés à la charge virale plutôt qu'au contrôle de l'infection (Rotger et al.).

B/ Les analyses protéomiques

De nombreuses études protéomiques ont été menées en parallèles des analyses transcriptomiques afin d'identifier les protéines dont l'expression est modulée par la réplication du VIH. Les premières études portent sur l'étude des modulations cellulaires induites par l'infection par le VIH tandis que d'autres analyses ont porté sur l'effet de la protéine virale Tat ou sur la composition des particules virales en protéines cellulaires.

Dans une première étude, les lysats de monocytes infectés par le VIH ont été analysés par chromatographie échangeuse de cations et par interaction en réversion de phase (Carlson et al., 2004). Afin d'éliminer la variabilité entre les donneurs, le seuil de différence entre les monocytes infectés et les non infectés a été défini à un signal supérieur ou égal à 3. Une forte corrélation entre les variations des profils protéiques et la dose virale quantifiée en test RT est observée. En effet, plus la dose virale détectée est élevée, plus les profils protéiques présentent des fortes variations. Par micro séquençage, 367 protéines ont été identifiées. Les variations les plus élevées sont notamment observées pour les protéines actine, vimentine et annexines.

Une étude similaire a été menée sur les cellules CEM infectées par le VIH (Chan et al., 2007). La technique de chromatographie en phase liquide est couplée à un marquage isotopique et à une analyse en spectrométrie de masse pour identifier le profil d'expression de 3200 protéines cellulaires. Lors du pic de production virale, se produisant à 36h p.i., 21% des protéines identifiées (soit 687 protéines) présentent un profil différentiel causé par l'infection. Parmi les 344 facteurs qui sont sur-régulés, on retrouve la protéine DNA-PK, l'annexine A2

et parmi les 343 sous-régulations sont annotées les protéines importines ainsi que diverses sous unités du protéasome.

Un nouvel essai sur cellules CD4⁺ primaires infectées par le VIH est réalisé (Chan et al., 2009). Les lysats cellulaires analysés en chromatographie en phase liquide révèlent une variation d'expression pour 178 protéines pour un seuil de variation placé à 1,5. On y retrouve notamment les protéines CAPN2, LLMNB1, MAPK1, PARP1, UBE2ZI et la famille YWH (AB/E/G/H/Q/Z).

Ces études ont été complétées par une analyse sur des lymphocytes T humains infectés ou non par le VIH (Ringrose et al., 2008). Les échantillons ont été analysés par séparation bidimensionnelle couplée à un marquage isotopique. Sur les 2000 protéines définies sur les gels, 15% présentaient une variation au pic de l'infection (7 à 10 jours après l'infection). Parmi elles, 92 protéines ont pu être identifiées (27 sous régulées et 65 sur-régulées) et se classent parmi les fonctions cellulaires déjà connues telles que le cycle cellulaire, la division cellulaire, la croissance, la mort, l'homéostasie, la mobilité, le transport, l'organisation du cytosquelette et des chromosomes. Une protéine d'un intérêt particulier, puisque interagissant de l'intégrase (Parissi et al., 2001) a notamment été identifiée lors de cette analyse, il s'agit d'HSP60.

La dernière étude protéomique en date a été effectuée sur des PBMC de neuf patients séropositifs et onze séronégatifs, analysés par séparation bidimensionnelle (Zhang et al.). Parmi les 1200 protéines détectées sur gel, 26 présentent une variation minimale de 1,5 due à l'infection, et 20 ont pu être identifiées en spectrométrie de masse. Parmi elles, 7 sont redondantes, notamment l'actine et l'énolase et 13 correspondent à des protéines uniques telles que la taline, la filamine, la vinculine.

Une étude menée sur des cellules Jurkat (CD4⁺ humaines) infectées par le VIH et soumises à une forte expression de la protéine virale Tat. Cette étude par gel bidimensionnelle permet de mettre en avant le rôle anti-apoptotique de la protéine ainsi que son absence de fonction dans le cycle cellulaire et révèle notamment la modulation des protéines de structure comme la tubuline, l'actine, les annexines, la colfiline. (Coiras et al., 2006).

Par la suite, l'équipe de Wang a cherché à identifier les modifications protéomiques induites par le VIH sur des microglies de souris (Wang et al., 2008). Les analyses sont effectuées par séparation bidimensionnelle couplée à un marquage isotopique. Il en ressort que parmi les quelques 2000 spots protéiques identifiés sur les gels, plus de 500 protéines sont

dérégulés par le VIH. Les protéines caractérisées appartiennent au cytosquelette : β -actine, vimentine, tubulline mais également à d'autres fonctions cellulaires : ferritine, calmoduline, enolase,...

D'autres études ont porté sur la particule virale en elle-même. La méthode de chromatographie en phase liquide couplée à une analyse en spectrométrie de masse est utilisée pour caractériser la composition protéique des virions VIH (Saphire et al., 2006). De nombreuses protéines virales sont évidemment identifiées : précurseur Gag et Pol, IN, MA, NC, CA, Vpr et Vif mais de nombreuses protéines cellulaires sont également caractérisées. On retrouve ainsi la cyclophiline A, HSP70, eF1 α , de nombreuses histones, SUMO-1. Par la suite, l'équipe de Denard a réalisé une analyse sur les virions complets par séparation bidimensionnelle (Denard et al., 2009). La spectrométrie de masse permet de mettre en évidence la présence de protéines virales classiques telles que VSV-G, MA, CA, RT, IN et de nombreuses protéines cellulaires déjà identifiées dans les infections par le VIH comme la cyclophiline A, l'énolase α , l'annexine, la clatherine, la tubuline, HSP90,... Les auteurs présentent également une estimation du nombre de copie de chaque protéine présente dans le virion.

C/ Les analyses par ARN interférence

Trois analyses globales basées sur la technique des ARNi ont été effectuées (Brass et al., 2008; Konig et al., 2008; Zhou et al., 2008). Le principe est globalement identique à chaque fois : des cellules, productrices de la β -galactosidase sous l'induction de Tat, sont transfectées avec des pools de 4 siRNA ciblant un maximum de gènes cellulaires. Après quelques heures ces cellules transfectées sont infectées avec le VIH. Par la suite, (i) les cellules infectées sont fixées et utilisées pour des tests de détection de la p24 permettant de juger l'efficacité de l'infection virale de l'étape d'entrée jusqu'à la traduction des protéines virales et (ii) les surnageants viraux sont récupérés pour ré-infecter les mêmes types cellulaires que précédemment afin d'observer l'expression du gène rapporteur et juger l'efficacité des étapes d'assemblage et de bourgeonnement (Figure 26).

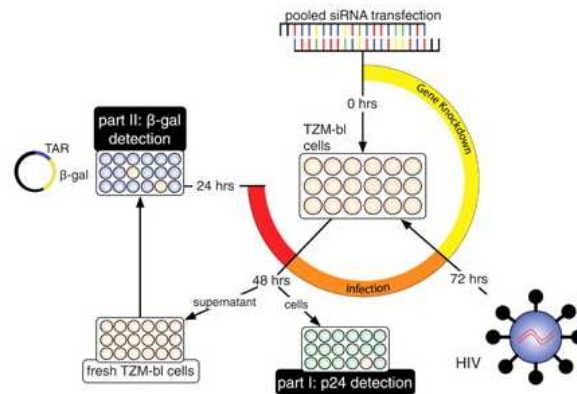


Figure 26. Méthode d'analyse par RNA interférence (Brass et al, 2008). Des cellules, productrices de la β -galactosidase sous l'induction de Tat, sont transfectées avec des siRNA pendant 72h avant d'être infectées par le VIH. L'infection dure 48h avant que les cellules ne soient fixées et soumises à une détection de la p24 (part I). En parallèle, les surnageants viraux sont récupérés et utilisés pour une ré-infection sur le même type cellulaire. Après 24h d'infection, une détection du gène de la β -galactosidase est effectuée (Part II).

Par cette technique la première équipe identifie 273 facteurs dont 36 ont précédemment été reliés aux infections par le VIH (Brass et al., 2008). Parmi les 237 restants, des fonctions de transporteur, d'hélicase, de facteurs de transcription, d'hydrolase, de liaison aux protéines Rho ou aux GTP ont été annotées. Certains facteurs ont été par la suite testés quant à leur rôle sur l'expression du gène rapporteur, la présence des protéines en western blot, la reverse transcription en quantification des produits de RT. Cette même technique a permis l'identification de 232 facteurs dont 44 préalablement liés au VIH (Zhou et al., 2008). Les analyses des équipes de Brass et Zhou présentent 15 gènes en communs.

Par la suite, une analyse plus approfondie a été réalisée (Konig et al., 2008). Cette analyse était également basée sur l'étude du cycle viral du VIH sous l'effet des siRNA. Elle a été complétée par (i) l'étude des virus MuLV et AAV, (ii) des tests de toxicité et (iii) une quantification des produits de reverse transcription. Les données initiales ont été compilées avec d'autres résultats comme ceux issus de leurs analyses double hybride, la banque de données des interactants du VIH, la classification par ontologie de gène, l'expression des récepteurs CD4, CCR5, CXRC4 sur différents tissus et lignées cellulaires. Sur 800 gènes identifiés, 245 inhibent l'infection par le VIH et 75 présentent une expression parfaitement corrélée à celle des récepteurs CD4/CXRC4/CCR5. 25 fonctions et processus biologiques ont été annotés ; notamment, l'activité ligase, la réparation de l'ADN, la voie d'ubiquitinylation et du protéasome, la fixation des ions.

L'infection par le VIH engendre donc diverses modifications cellulaires et implique en premier lieu les acteurs de l'immunité innée mais également les facteurs de restriction. Comme nous l'ont démontré les analyses globales présentées, de nombreux facteurs et processus cellulaires sont modulés par le cycle viral, qui comprend notamment le processus d'intégration. Puisque notre étude a utilisé ce processus viral pour intégrer un ADN étranger dans le génome cellulaire, les données présentées pourront être très utiles à notre analyse et sont à garder en mémoire.

III/ L'intégration du VIH et l'utilisation des machineries cellulaires de réparation de l'ADN

Comme déjà mentionné, le processus d'intégration du VIH nécessite la présence et l'action de nombreux facteurs cellulaires. Outre ces co-facteurs précédemment développés, la dernière étape du processus d'intégration, la ligation, requerrait également l'action de facteurs cellulaires liés aux mécanismes de réparation de l'ADN. Parmi les nombreuses protéines impliquées dans les processus de réparation de l'ADN, les senseurs ATM, ATR et DNA-PK ont été les plus étudiés.

L'implication de la DNA-PK dans le processus d'intégration du VIH a été mise en évidence par l'étude de cellules SCID, déficientes en DNA-PKc (sous unité catalytique de la DNA-PK). Dans ces cellules, une forte baisse de la transduction de vecteurs dérivés du VIH a été observée et a pu être restaurée par l'addition de la protéine sauvage (Daniel et al., 2004a; Daniel et al., 1999; Sakurai et al., 2009). Néanmoins, le rôle essentiel de la protéine DNA-PK dans le processus d'intégration du HIV n'a pas été corroboré par toutes les études. Ainsi, des tests de siRNA couplés à l'utilisation de drogues inhibant les senseurs des lésions à l'ADN (caféine et wortmannine) n'ont pu mettre en évidence une quelconque variation dans la transduction des vecteurs VIH suite à l'inhibition de la DNA-PKc (Ariumi et al., 2005). Des résultats identiques, invalidant le rôle essentiel de la DNA-PK lors de l'intégration virale, ont été observés dans une autre étude menées sur des cellules SCID ou déficientes en protéines Ku (Baekelandt et al., 2000). L'observation des formes virales 2LTR et des formes intégrées dans des cellules déficientes en Ku80 a néanmoins démontré son implication dans la circularisation de l'ADN viral et la localisation de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire (Jeanson et al., 2002; Masson et al., 2007). L'implication des protéines Ku70 et Ku80 (sous unité de liaison à l'ADN de la DNA-PK) dans la circularisation de l'ADN viral a également été confirmée par une autre étude (Li et al., 2001a).

Le rôle des protéines ATM et ATR dans le processus d'intégration du VIH est également un sujet controversé. En effet, certaines études tendent à démontrer le rôle

prédominant de ces senseurs dans l'intégration virale (Daniel et al., 2003; Daniel et al., 2001; Daniel et al., 2005; Nunnari et al., 2005; Sakurai et al., 2009; Smith et al., 2008) tandis que d'autres tendent à invalider ces résultats (Ariumi et al., 2005; Dehart et al., 2005). L'utilisation de drogues inhibitrices (caféine et wortmannine) et l'étude de cellules déficientes en ATR a mis en évidence une baisse du nombre de cellules transduites par des vecteurs VIH et une diminution du nombre de provirus (Daniel et al., 2003; Daniel et al., 2001; Daniel et al., 2005; Nunnari et al., 2005). Des cellules déficientes en ATM ont également présenté des jonctions provirus-ADN cellulaire anormales, pouvant être restaurées par complémentation avec la protéine sauvage (Sakurai et al., 2009). Enfin, des essais d'immunoprécipitation de la chromatine ont mis en évidence la liaison des protéines NBS1, ATM et ATR à l'ADN viral (Smith et al., 2008). Cette même étude a également montré que le taux de transduction était fortement réduit lors d'infection dans des cellules déficientes en protéines ATM ou NBS1, résultats corroborés par d'autres (Sakurai et al., 2009). Néanmoins, deux études réalisées avec des ARN interférents ciblant ATM et ATR n'ont observé aucune variation du taux de transduction de vecteurs VIH et aucune baisse d'intégration du vecteur après inhibition des protéines cellulaires (Ariumi et al., 2005; Dehart et al., 2005). Ces mêmes études comportent également des tests utilisant des drogues inhibitrices ou des cellules déficientes en ATR et n'ont pu mettre en évidence le rôle prédominant des protéines ATM et ATR dans le processus d'intégration.

D'autres protéines impliquées dans les mécanismes de réparation pourraient jouer un rôle lors du processus d'intégration telles que la ligase IV, Mre11, Artémis, l'histone H2AX ainsi que l'histone désacétylase HDAC4 (Daniel et al., 2004a; Daniel et al., 2004b; Sakurai et al., 2009; Smith et al.). Bien que la voie de réparation par jonction non homologue (NHEJ) soit la plus étudiée, d'autres études tendent à impliquer d'autres voies de réparation telle que la recombinaison homologue (Nakai-Murakami et al., 2007; Taganov et al., 2001)

Malgré les nombreuses études réalisées dans le but de clarifier l'étape de ligation du processus d'intégration rétrovirale, les données restent contradictoires quant au rôle des protéines cellulaires de réparation de l'ADN. Il a été envisagé que l'implication controversée de ces facteurs soit dépendante du système cellulaire utilisé (Yang et al.). De plus, certains auteurs ont mis en évidence une interaction possible entre les drogues inhibitrices utilisées dans certains tests et le niveau d'expression du transgène. Ainsi, la caféine interférerait avec le promoteur CMV et en abaisserait le niveau de transcription (Dehart et al., 2005).

Objectifs

Comme nous avons eu l'occasion de le voir, une cellule eucaryote est soumise à de nombreuses atteintes à l'intégrité de son génome (mutations, cassures simple ou double brin, translocations, intégration virale,...). Malgré les nombreuses recherches effectuées sur les cancers viro-induits ou non, sur les outils de la thérapie génique et sur le VIH, peu d'informations sont disponibles quant aux perturbations subies par la cellule suite à des mouvements de gènes.

Le présent projet avait pour objectif d'identifier les modifications cellulaires induites par des mouvements de gènes, notamment par l'insertion d'un ADN étranger au sein du génome.

Nous avons choisi de provoquer l'insertion d'un ADN dans le génome cellulaire par le biais des vecteurs lentiviraux de type VIH-1. Pour isoler les signaux cellulaires uniquement dus à l'intégration de l'ADN étranger, deux vecteurs, l'un intégratif et l'autre non ont été développés. La propriété du vecteur non intégratif est due à une mutation du site catalytique de l'intégrase virale.

La technique de production des suspensions virales sera développée en annexe. De même, les expériences ayant permis de (i) valider les suspensions virales (titre viral et propriété intégrative), (ii) purifier les suspensions virales par élimination des plasmides résiduels et enfin (iii) vérifier une possible recombinaison entre les plasmides, seront détaillées en annexe.

Dans le but de choisir le système cellulaire le mieux adapté pour notre étude, différentes lignées CD4⁺ et des cellules primaires du derme humain ont été caractérisées face à l'infection virale. Cette partie sera détaillée dans le chapitre 1 notamment avec le premier article (en préparation) abordant la notion de variabilité entre les différentes cellules quant à l'expression du transgène. Les cellules primaires, parfaitement infectable par les vecteurs, ont retenu notre attention pour les futures analyses portant sur les modifications cellulaires suite à l'intégration d'un ADN étranger, puisqu'elles portent bien moins de modifications cellulaires que les lignées établies.

Afin de définir la dose virale ainsi que le temps post infection optimal pour nos futures analyses, la méthode de détection des ADN viraux intégrés a été développée et couplée à des cinétiques d'intégration qui seront détaillées dans les données complémentaires du chapitre 1. L'efficacité de cette méthode de détection pour définir un titre viral sera également abordée dans l'article 1.

Pour avoir une vision globale des modifications cellulaires induites par l'intégration de l'ADN étranger, deux types d'analyses ont été menées couplées à une comparaison entre les cellules infectées soit par le vecteur intégratif soit par le vecteur non intégratif.

La première étude, qui a visé à identifier les perturbations au niveau du transcriptome, c'est-à-dire sur l'ensemble des ARN de la cellule, sera abordée dans le chapitre 2. Cette analyse a été réalisée sur puces à ADN, contenant la totalité des gènes humains. Les données globales, présentées dans l'article 2 (en préparation), ont été analysées via des logiciels informatiques couplés à une classification manuelle. Cette analyse a révélée que la totalité des processus cellulaires étaient perturbées suite à l'intégration de l'ADN étranger. Cinq fonctions principales, reliées au cycle cellulaire, à la mort cellulaire, aux mécanismes de réparation de l'ADN, au processus de modification de la chromatine et à l'immunité ou la réponse au stress, ont été mises en évidence suite au développement d'un réseau d'interactions moléculaires couplé à une étude des fonctions biologiques de chacun des facteurs identifiés.

Cette étude a été complétée par une analyse globale des perturbations protéiques qui sera détaillée dans le chapitre 3. Les protéines totales cellulaires ont été observées sur gel bidimensionnel permettant leur séparation selon leur pH isoélectrique et leur poids moléculaire. L'article 3 (en préparation) présentera notamment les 9 protéines modulées par l'intégration de l'ADN étranger et identifiées en spectrométrie de masse. Ces facteurs sont principalement liés au cytosquelette et au stress cellulaire.

Enfin, les suites expérimentales à donner à cette étude ainsi que les perspectives thérapeutiques associées seront abordées lors de la conclusion générale.

Résultats

Chapitre 1 : Définition des conditions optimales pour l'analyse des modifications cellulaires

I/ Objectifs

Pour permettre l'analyse des réponses cellulaires provoquées par l'insertion d'un ADN étranger, plusieurs conditions devaient être préalablement définies. Premièrement, et puisque nous avons choisi de provoquer l'intégration de cet ADN étranger par le biais de vecteurs lentiviraux, les techniques de production, de titration et de concentration des suspensions virales devaient être maîtrisées. Deuxièmement, afin de définir le temps post infection optimal pour l'analyse des réponses cellulaires, la méthode de quantification du nombre de copies de virus intégrées dans chaque cellule devaient être développée. Enfin, dans le but de tester la méthode de quantification et de choisir le type cellulaire optimal pour l'analyse des réponses cellulaires, le comportement de différentes lignées face à l'infection par les vecteurs VIH-1 a été caractérisé.

Les premiers essais de productions ont été suivis par des tests de concentration, et de titration. Les titres viraux déjà élevés lors de la production, n'ont finalement nécessité aucune concentration pour la suite des expériences. Le développement des techniques de titration est allé de paire avec la mise au point de la méthode de quantification des formes d'ADN viral intracellulaires. Ainsi, les suspensions virales produites ont été titrées de trois manières complémentaires : (i) par l'analyse de l'expression du gène rapporteur GFP, (ii) la mesure de l'activité reverse transcriptase et (iii) la quantification des formes d'ADN viral totales ou seulement les formes intégrées. Afin de confirmer la sureté des vecteurs, une PCR permettant de détecter les formes recombinantes a été réalisée. Enfin, pour purifier les suspensions virales, les plasmides résiduels ont été éliminés. La totalité de ces données seront détaillée dans l'annexe 1.

La quantification des formes virales totales, a été réalisée grâce à la technique de PCR en temps réel. La méthode est un peu plus complexe concernant les formes intégrées, une première amplification « classique » cible les régions virales gag et les régions génomiques Alu, permettant une sélection des intégrés. Cette étape est suivie d'une PCR en temps réel ciblant les LTR et permettent la quantification des intégrés. La phase essentielle des mises au point a porté sur la définition et la création d'une gamme de quantification des formes virales intégrées. Cette dernière a été réalisée à partir de cellules Ach-2, outils génétiques créés en 1983, ne contenant qu'une seule copie de VIH intégrée dans leur génome. De telles cellules nous ont permis d'obtenir une quantification allant de 1 copie intégrée/cellule à 0,01 copie

intégrée/cellule. Cette méthode particulièrement efficace pour définir un titre viral en particules infectieuses sera abordée dans l'article 1.

Enfin, dans l'objectif de choisir une lignée cellulaire adéquate pour les essais de quantification des formes virales et pour l'analyse des réponses cellulaires, différentes lignées CD4⁺ ont été analysées en parallèle d'une culture de fibroblastes humains primaires. L'analyse de leur comportement face à l'infection par le vecteur VIH-1 sera abordée dans l'article 1. Beaucoup des lignées cellulaires de lymphocyte CD4⁺ se sont révélées peu profitables en raison d'une forte variation du titre viral. En effet, certaines lignées présentaient des titres viraux différents et faibles, certaines mêmes se sont révélées peu permissives pour le vecteur. Ces expériences nous ont conduits à sélectionner les SupT1 pour les vérifications de la méthode de quantification.

Cependant, nous souhaitons réaliser nos analyses transcriptomiques et protéomiques sur des fibroblastes primaires humains. Ces cellules ont donc également été testées en termes (i) d'efficacité de transduction par les vecteurs et (ii) de changements morphologiques au cours du maintien en culture. Enfin, le choix du temps post infection a été effectué grâce à plusieurs expériences combinant des cinétiques d'intégration à différentes MOI et utilisant la technique de quantification des formes virales intracellulaires. Les validations des cellules primaires pour leur utilisation lors de nos futures analyses seront détaillées dans l'article 1 et dans les données complémentaires

II/ Article 1

Evaluation of HIV-1-based vectors infectious titer: influence of the cell type and cell concentration

Manuscrit en préparation

Evaluation of HIV-1-based vectors infectious titer: influence of the cell type and cell concentration

Virginie Gay, Karen Moreau, Corinne Ronfort*

Keywords: *lentiviral vector, GFP titer, DNA titer, real time PCR, integration*

Université de Lyon, Lyon, France.

INRA, UMR754 Rétrovirus et Pathologie Comparée, IFR128 Biosciences Gerland-Lyon Sud, Lyon, France.

Université Lyon 1, Lyon, F-69007, France.

Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Marcy L'étoile, F-69000, France.

Ecole Pratique des Hautes Etudes, Lyon, France.

* Corresponding author: ronfort@univ-lyon1.fr. Tel +33 437 287 629. Fax +33 437 287 605.

ABSTRACT

Lentiviral vectors are advantageous gene transfer vehicles, used for both research and gene therapy applications, because of their stable integration in non-dividing and dividing cells and long-term transgene expression. A self-inactivating (SIN) HIV-1-based lentiviral vector pseudotyped with the VSV-G envelope and encoding the GFP protein was used as a probe for lentivirus titration to transduce conventional CD4⁺ cell lines or primary cells (human dermal fibroblasts; HDFa). We found that infectious titers, determined by flow cytometry of GFP expression, were dependent of the cell type and concentration. We also demonstrated that CEM-SS cells are not fully permissive for the vector. Real time PCR amplification of integrated form of lentiviral DNA seemed to be the most reliable assay to estimate the vector infectious titers, provided the cell substrate used for titration and experimental conditions would be perfectly standardized.

INTRODUCTION

HIV-1 based lentiviral vectors are advantageous gene transfer vehicles for both research and gene therapy applications because of their stable integration in dividing and non-dividing cell, as well as the long-term transgene expression. Multiple sequential modifications to the original system have been proposed to optimize their transduction efficiency. This was achieved by pseudotyping lentiviral vectors with foreign glycoproteins (Cronin et al., 2005), the addition of cPPT sequence to facilitate reverse transcription and nuclear import (Sirven et al., 2000; Van Maele et al., 2003), and the addition of WPRE element to improve mRNA half (Demaision et al., 2002; Schambach et al., 2000; Zufferey et al., 1999). At the same time, considerable research was devoted to designing lentiviral vectors with improved biosafety features, e.g. the removal of accessory genes (Zufferey et al., 1997) and deletion of the U3 region to generate self-inactivating (SIN) vectors (Pauwels et al., 2009; Yu et al., 1986; Zhou et al.).

All these studies required an accurate determination of the lentiviral vector titers. To this purpose, several methods have been developed which include both functional (infectivity) and non-functional (biophysical, biochemical or immunological) assays (Andreadis et al., 2000; Geraerts et al., 2006; Martin-Rendon et al., 2002; Nair et al., 2008; Salmon and Trono, 2007; Sastry et al., 2002). The non-functional assays are based on CAp24 antigen or viral RNA quantification, or on reverse transcriptase (RT) activity. These assays, which do not involve a cell transduction step, do not provide any information on the proportion of infectious particles contained in virus or vector stocks. Functional tests however, such as the quantification of reporter gene expression or the quantification of integration events (Brussel and Sonigo, 2003; Butler et al., 2001; Martin-Rendon et al., 2002; O'Doherty et al., 2002), assay the vector infectivity.

Because these functional assays require a step of transduction into cells, some variations in

the titre definition are expected due to the time of adsorption, the inoculum volume of vector, the LTR, the cPPT (Farley et al., 2007; Ginn et al., 2003; Logan et al., 2004; Morgan et al., 1995; Zhang et al., 2004a). Usually titre is related to transgene expression quantification, commonly performed on HEK293 or 293T cells. Some studies also tested the accessibility of different cell lines such as cardiac myocytes (Sakoda et al., 1999), FRL19, NIH3T3 (Zhang et al., 2004a) cancer cells from different types (Pellinen et al., 2004), CD34⁺ cells (Szyda et al., 2006) and others (Chang, ; Demaison et al., 2002; Lee and Reiner, 2009; Parker et al., ; Wu and Lu). All these studies conclude to an efficient gene transfer into the cells using viral vector

For any study of host cell response to HIV-1 infection or to HIV-1-based lentivirus transduction, it is essential to standardize the assay for titration of infectious lentiviral particles. In the present study, we used WPXLd, a HIV-1-based vector expressing GFP, as a viral probe to investigate the influence of experimental conditions on lentivirus infectious titer. We found that (i) the cell type and cell concentration at the time of infection significantly influenced the transduction efficiency and hence the infectious titer based on GFP assays and (ii) expression of GFP reporter gene correlated with the copy number of integrated viral DNA for SupT1 whereas it did not for other, especially in human primary cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human epithelial 293T cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% of Foetal Bovine Serum, penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml). Human CD4⁺ SupT1, Hut78, Jurkat and CEM-SS cells and Ach-2 cells (containing one copy of integrated HIV per genome, provided by NIH, USA) were maintained in RPMI medium supplemented with 10% of inactivated Foetal

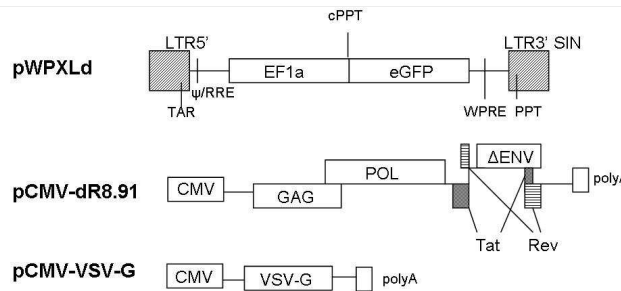


Figure 1. Plasmids used for production of the VSV-G pseudotyped HIV-based vector. WPXLd is a Self-Inactivating (SIN) HIV-based vector that encodes the GFP marker under the control of the EF1 α promoter. The pCMV-dR8.91 plasmid encodes HIV Gag and Pol structural proteins as well as the HIV Tat and Rev accessory proteins. The pCMV-VSV-G plasmid encodes the envelope glycoprotein of the Vesicular Stomatitis Virus. The HIV-1-based WPXLd vector was produced in 293T cells by calcium phosphate co-transfection of pWPXLd, pCMV-dR8.91 and pCMV-VSV-G plasmids. Viral supernatant was harvested 24 hours later, treated 1 hour at 37°C with 10 U/ml of DNase (Promega) and finally stored at -80°C until used to infect cells.

Bovine Serum, penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml). For SupT1 and Hut78 1mM of sodium pyruvate and Hepes were added in the medium. Primary Human Dermal Fibroblast adult cells (HDFa, Invitrogen) were maintained in M106 medium supplemented with 10% of Low Serum Growth Supplement (LSGS, Invitrogen).

Vectors production

The pWPXLd and pCMV-dR8.91 plasmids were obtained from Dr D.Trono (University of Geneva, Switzerland). The pCMV-VSV-G plasmid, was obtained from Dr D. Nègre (ENS Lyon, France). The HIV-1-based WPXLd vector was produced in 293T cells by calcium phosphate co-transfection of pWPXLd, pCMV-dR8.91 and pCMV-VSV-G. Viral supernatant was harvested 24 hours later, centrifuged at 430 g for 10 min at 4°C, filtered through a 0.45 μ m membrane, treated 1 hour at 37°C with 10 U/ml of DNase (Promega) and finally stored at -80°C.

Vector titration

Infected cells were harvested 24 hours post-infection, centrifuged at 430 g for 10 min at 4°C. The cellular pellet was resuspended in PBS and cells were analysed using flow cytometry (FacsCan FasCalibur 3C). Percentage of GFP positive cells was determined using the following formula ([number of target cells] x [% of GFP+ cells]) / [volume of viral suspension in ml] and viral titers were expressed in Transducing Unit/ml (TU/ml).

Real time PCR

24h post infection, total cellular DNA was extracted using the phenol-chloroform method (ref) and quantified by measuring optical density A260 (NanoDrop).

Quantitation of viral DNA was carried out by real time PCR with an ABI Prism 7000 instrument (Applied Biosystems, Foster city, CA), using the SYBRTM Green I technology and the Platinum[®] taq DNA polymerase reaction kit according to the manufacturer instructions (Invitrogen). Normalisation of the samples was performed using the amplification of the β -globin gene as previously described (O'Doherty et al., 2002).

Assay for integrated DNA

Integrated viral DNA was quantified using a two step PCR amplification method previously described (O'Doherty et al., 2002) with minor modifications. Briefly, the initial non kinetic amplification was performed on 50 ng of DNA with alu and gag primers (O'Doherty et al., 2002) and Platinum[®] taq DNA polymerase according to the manufacturer instructions (Invitrogen). The first amplification was performed by a 2 min hot start at 94°C followed by 17 steps of 30 sec at 94°C, 1 min at 50°C and 1 min 40 sec at 72°C. The second round real-time quantitative PCR was performed using 5 μ l of a 1/10 dilution of pre amplification product, 800 nM of mixed-LTR primers. Each sample was tested in duplicate. In order to quantify the copy number of integrated viral DNA per cell, a standard curve was realized using Ach-2 cells containing 1copy/cell of HIV DNA (NIH, USA). Ach-2 DNA was subjected to serial dilutions into non-infected SupT1 cells DNA and used for the two step PCR amplification.

RESULTS

HIV-1 infectious titers depended on the cell type and cell density at the time of infection

WPXLd vector is a self-Inactivating (SIN) HIV-based pseudotyped with VSV-G envelope. It

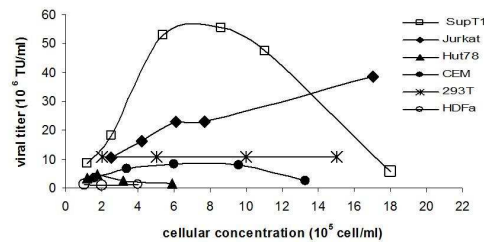


Figure 2. Effect of the cellular concentration on the viral titer determination. Non adherent SupT1, Jurkat, Hut78, CEM cells and adherent 293T, and HDFa cells were plated at different cellular concentrations and counted before transduction: they reached a cellular concentration ranging from 1.10^5 cells/ml to 17.10^5 cells/ml. Then, each cell line transduced with 5 μ l or 10 μ l of WPXLd viral supernatant. 24 h after transduction, the quantity of GFP-expressing cells was measured by flow cytometry and viral titers were calculated in TU/mL with the following formula: titre in TU/ml = ([number of target cells] x [% of GFP+ cells]) / [volume of viral suspension expressed in ml]

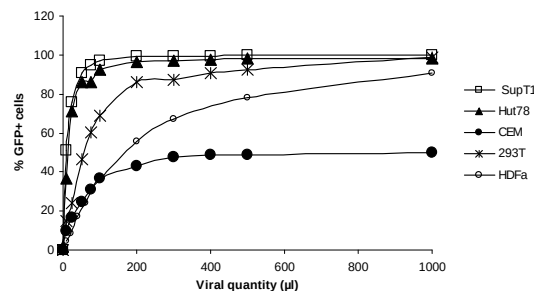


Figure 3. Rate of transduction for the different cell lines. Hut78, CEM, SupT1, 293T and HDFa were transduced at the best cellular concentration defined in the previous figure (i.e. $1.8.10^5$ cell/ml, 8.10^5 cells/ml, $7.2.10^5$ cells/ml, $1.55.10^6$ cells/ml and $4.6.10^5$ cells/ml respectively), and transduced with increasing amount of the WPXLd vector. 24 h post infection, the GFP expressing cells were quantified by flow cytometry.

encodes GFP protein under the control of EF1a (human elongation factor 1 α) promoter. EF1a promoter is a constitutive promoter commonly used in mammalian systems with allows a strong expression of gene (Qin et al.). WPXLd was produced in 293T cell by co transfection of three plasmids pWPXLd, pCMV-dR8.91 and pCMV-VSV-G (Figure 1).

Infectious titer of vector samples was determined by quantification of transduction of different cell types, adherent or nonadherent, measured by the level of GFP expression. Cell monolayers consisted of the 293T cell line and primary human cells HDFa; nonadherent, CD4+ cells consisted of CEM-SS, supT1, Jurkat and Hut78 cells. Cells, at concentrations ranging from 1.0×10^5 cells to 1.8×10^6 cells per ml and per well of 6-well plate, were infected with 5 μ l and 10 μ l of the WPXLd vector preparation, and GFP expression was determined by flow cytometry at 24 h post infection (Fig. 2). Low volumes of viral suspension were used to ensure the non-saturation of the GFP expression that may result in an under-evaluation of the viral titer.

The viral titers obtained using 293T and HDFa cells (2×10^7 TU/ml, and 1×10^6 TU/ml, respectively) remained stable for adherent cells, regardless of the number of cells plated per well, between 2×10^5 and 15×10^5 for 293T, and between

1×10^5 and 4×10^5 cells for HDFa. These results mean that the viral titre is not dependent on the target cell quantity for the adherent cells.

However, the cell concentration appeared to play a major role in the values of viral titer in cells maintained in suspension culture. The viral titer increased in parallel with the cell density for supT1, and the maximum value (5.5×10^7 to 7×10^7 TU/ml) was obtained when cells were seeded at 8×10^5 cells/ml. At higher cell densities, the infectious titer values decreased (Fig. 1 B). A similar profile was observed for vector titers measured in CEM-SS and Hut78 cells. The higher viral titer – (0.8×10^7 TU/ml) was obtained with a cellular concentration ranging from 6×10^5 to 8×10^5 cells/ml for CEM-SS cells. In Hut78 cells, we observed a high mortality at high cell concentrations, and could only determine the vector titers at concentrations lower than 6×10^5 cells/ml, and the maximum viral titer value was 4×10^6 TU/ml at a cell concentration of 2×10^5 cells/ml. Finally, the viral titre increases with Jurkat cell concentration in a proportional way until 4.5×10^7 TU/ml in our experiment. Taking together, these results indicate that the viral titre is dependent on the target cell quantity for the cells cultured in suspension.

The highest values for the infectious titer were obtained with SupT1 and Jurkat cells (5.5×10^7

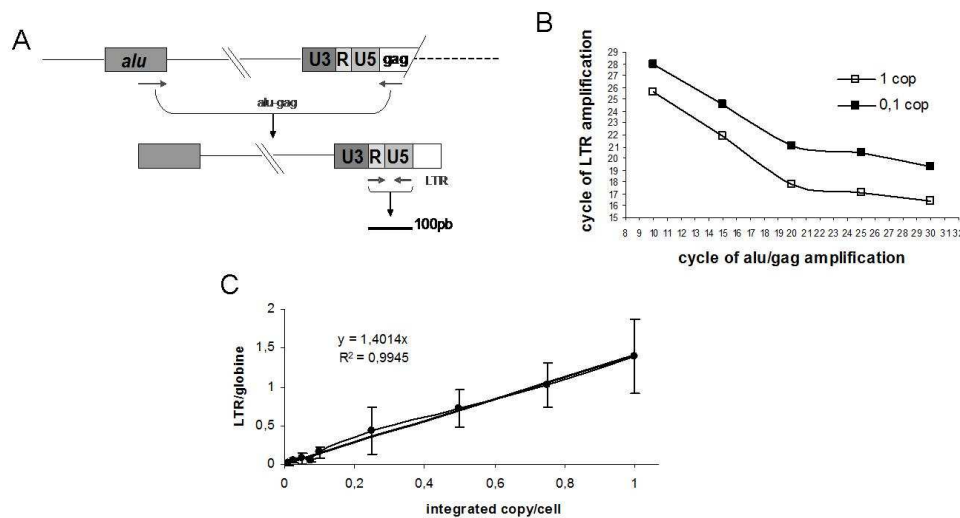


Figure 4. A. Two step method for the detection of the viral DNA integrated forms. The first PCR uses primers that bind genomic *alu* and HIV-1 *gag* sequences. Substrates and enzyme are not limiting and products of variable length are generated. They are used for the second real time PCR, to quantify HIV-1 specific sequences using primers within the LTR sequence. **B. Optimal condition of the first PCR amplification.** To avoid any PCR saturation during the first PCR amplification, several amplification cycles were tested on Ach-2 DNA, containing one copy of integrated HIV/cell and on diluted Ach-2 DNA containing 0,1 integrated HIV copy/cell. The PCR products were then used for the second real time PCR. We observe a saturation profile after 20 cycles of the first alu/gag amplification. Thus, in following experiments, only 17 cycles of amplification will be performed during the first PCR. **C. Standard curve for the quantification of integrated products in copy/cell.** Ach-2 cells DNA containing 1 copy/cell was subjected to serial dilution with DNA from non-infected cell. Then, each diluted DNA was subjected to the two step PCR amplification. The Ltr quantification was normalized with the β -globin amplification. The experiments of the standard curve was repeated 4 times and was validated with a Spearman statistical test (p -value = $1,225 \cdot 10^{-15}$). We are able to quantify samples containing from 1 to 0,01 integrated HIV/cell in a reproducible and linear manner.

and 4.5×10^7 TU/ml, respectively), and the lowest titers with Hut78 and HDFa cells (0.4×10^7 and 0.1×10^7 TU/ml, respectively). Note that even if the cell lines are compared at equal cellular concentration, the viral titre remains different, underlining the effect of the cell line. Indeed, for the cellular concentration of 6.10^5 cells/ml we still observe differences in the viral titre (1.10^6 TU/ml for Hut78, 9.10^6 TU/ml for CEM, 2.10^7 TU/ml for 293T, $2.2.10^7$ TU/ml for Jurkat and $5.5.10^7$ TU/ml for SupT1). These data mean that transduction efficiency may vary more than 50 times (from $0.1.10^7$ to $5.5.10^7$ TU/ml) between cell types.

To conclude, the viral titre is consequently fully dependant on the cell line used for the transduction and for a given CD4⁺ cell type the titer is dependent on the target cell quantity whereas it is not for adherent cell lines.

Transduction efficiency and permissivity to the WPXLd vector

In order to determine the reasons for such differences in viral titers obtained in various cell targets, we explored their permissivity to the WPXLd vector, using the GFP assay. Hut78, CEM-

SS and SupT1 were used at the cell density previously defined as giving the maximum titer value, i.e. 1×8.10^5 cell/ml, 7×2.10^5 cells/ml, and 8×10^5 cells/ml, respectively. For adherent cells, 293T and HDFa cells were seeded at 1.55×10^6 cells and 4.6×10^5 cells per well of 6-well plate, respectively. Jurkat cells were not tested because no optimal concentration was defined. Cells were infected with increasing volumes of the viral supernatant, and the percentage of GFP-expressing cells was determined by flow cytometry at 24 h post infection (Fig. 3).

We can first observe that Hut78 and SupT1 are respectively tested at 1.10^5 cell/ml and 8.10^5 cells/ml (fold change 8) but both reached a maximum of 100% of GFP⁺ cells with a viral suspension volume of 100 μ l. On the contrary, CEM and SupT1 cells were tested at similar concentrations (6.10^5 cell/ml and 8.10^5 cells/ml respectively, fold change 1.33) but only the SupT1 reached a rate of 100% of GFP⁺ cells whereas CEM cells never exceed 47% of positive cells. These results support the data of the figure 1, suggesting that the transduction is not equally performed in every cell line even if the cellular concentration is the same for each cell line.

The dose-response curve of GFP-positive cells versus vector input reached the 100% value at

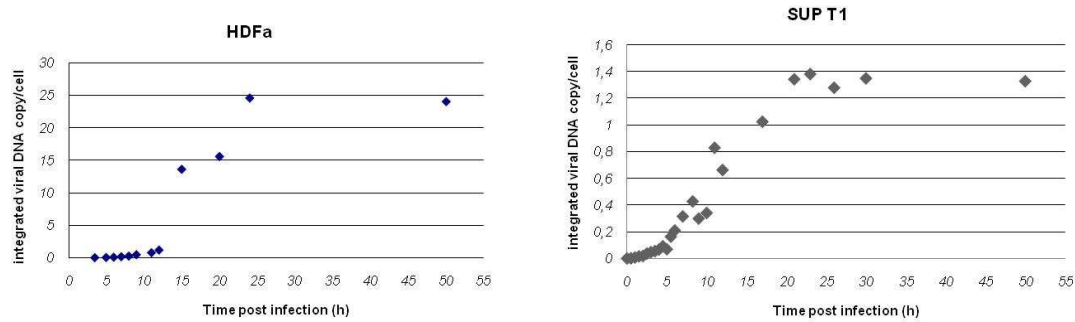


Figure 5. Integration kinetic in supT1 and HDFa cells. SupT1 and HDFa cells were transduced at a multiplicity of infection of 1, according to their respective viral titer previously defined (i.e. $5.15 \cdot 10^7$ TU/ml and $0.15 \cdot 10^7$ TU/ml respectively). At different times post transduction, DNA was extracted and subjected to quantification of viral integrated DNA, with the two steps PCR amplification. Note that the scale is different between the two graphics.

low vector doses for non-adherent cells Hut78 and SupT1 cells (ca. 100 μ l each), and at much higher doses for adherent cells 293T and HDFa (200 and 1,000 μ l, respectively). However, the curve of CEM-SS cells showed a plateau at 45-50% GFP-positive cells. The degree of transduction efficiency (TE), which reflected the cell permissiveness to the WPXLd vector, was quantitatively evaluated by the vector doses required to obtain 50 % (TE₅₀) and 90 % (TE₉₀) GFP-positive cells. Our results suggested the occurrence of three phenotypes in terms of cell permissivity to HIV-1-based lentivectors : (i) group I contained fully permissive cells Hut78 and SupT1, with TE₅₀ = 10 μ l and TE₉₀ = 50 μ l; group II contained the lesser permissive cells 293T (with TE₅₀ = 50 μ l ; TE₉₀ = 200 μ l) and HDFa (TE₅₀ = 200 μ l ; TE₉₀ = 1,000 μ l); group III was represented by CEM-SS cells, a cell line which was half refractory to GFP expression, and therefore only semi-permissive to the WPXLd lentivector.

Consequently, we conclude that some cell lines are not fully transduced by our HIV-based vector.

Variations of the viral titration complicate the definition of MOI and its relationship with viral DNA integration events.

From the GFP expression data presented in Fig. 1 C, the same lentivirus vector sample would have an apparent infectious titer of $0.1 \cdot 10^7$ TU/ml using HDFa, versus $5.0 \cdot 10^7$ TU/ml using SupT1, viz. a 50-fold difference.

To determine if this viral titre do really reflect the infectious nature of our vector in a given cell line (entry, RT or integration impairment), or if it does only reflect a slow down GFP expression in some cell line because of the promoter we used, 293T, SupT1 and HDFa cells were tested for their content in integrated viral DNA forms at 24 h post infection at a multiplicity of infection (MOI) of 1.

The volume of viral supernatant used to obtain a MOI value of 1 was determined for each cell line, and based on the specific infectious titers previously determined by GFP expression quantification (refer to Fig. 2). The mean titer values used (average of two titrations) were $5.15 \cdot 10^7$ TU/ml for SupT1 and $0.15 \cdot 10^7$ TU/ml for HDFa. The cells were then harvested at different time post infection and the total DNA extracted and processed for integrated viral DNA quantification, using a two-step PCR method (Fig. 4).

The integrated viral forms were specifically quantified through a two step PCR method as previously described (Figure 4A) (O'Doherty et al., 2002). Briefly, a first round PCR targeting the highly repeated genomic Alu sequences and the viral sequence gag is performed. We observe that the saturation of this first PCR is reached at 20 cycles (Figure 4B). Thus, we performed all our experiments with 17 cycles of first amplification. Then, the first product is used for a second PCR, using the real time process, targeting the LTR of the vector. The LTR amplification is normalized with the corresponding β -globin quantification. We manage to develop an absolute quantification by creating an appropriate standard curve using Ach-2 cells DNA, containing 1 copy of integrated HIV / cell. Using this method, we are able to quantify samples containing from 1 to 0,01 integrated HIV/cell in a reproducible and linear manner (figure 4C). The experiments was repeated 4 times and the final standard curve was validated with a Spearman statistical test (p-value = $1,225 \cdot 10^{-15}$). Note that for samples containing more than 1 copy/cell, a dilution is performed before the alu/gag PCR to ensure samples will enter the standard curve.

Regarding the kinetic of integration events, we obtained a maximum of integrated copy/cell at 24 hours post infection for both supT1 and HDFa cell lines (figure 5). Therefore, it seems that early

step of viral replication cycle (entry, reverse transcription and integration) were realized within the same lapse of time in both cell lines.

As shown in Fig. 5, 24.00 ± 0.26 copies/cell were found to be integrated in HDFa cell genome at 24 h post infection, versus 1.37 ± 0.17 copies/cell in SupT1, a 17-fold difference in terms of integration events.

As a maximum of $1,37 \pm 0,17$ integrated copy/cell was quantified in SupT1 infected at MOI 1 and taking into account the experiment variability, we can conclude that the two titration methods used, GFP transduction and integrated viral DNA quantifications, do greatly correlate for this cell line.

On the contrary, these two methods do not correlate at all for HDFa cells. Indeed, more than 20 copies of integrated vector were detected with an MOI of 1. From this experiment, we concluded that the viral titer based on GFP expression in HDFa analyses is not correlated to the physical infectious particles number. Therefore, we manage to underlie that, despite the poor GFP titer obtained on this cell line, HDFa cells are highly permissive to WPXLd infection.

DISCUSSION

In this study, we evaluated the behavior of different CD4⁺ cell lines, the classical 293T and one human primary cell line during the transduction with a HIV-based vector.

Therefore, we first observed that the viral titer is dependent on the target cell concentration for the cells cultured in suspension whereas it is not for adherent cell lines. These results mean that from the same CD4⁺ cell line, several vector titers can be obtained, depending on cell concentration at the time of infection, complicating the definition of the MOI and further experiments.

Furthermore, we observed that the best titers obtained were very dependant of the cell line. Indeed, the highest viral titers were obtained with SupT1 and Jurkat cells (titers of $5,5.10^7$ TU/ml and $4,5.10^7$ TU/ml, respectively) and the lowest titers were obtained on Hut78 and HDFa cells ($0,4.10^7$ TU/ml and $0,1.10^7$ TU/ml).

Moreover, the decrease of viral titer while increasing the cell concentration was unexpected. We suggest that at high density, cells entered into senescence and became resistant to viral infection.

Among the cell line tested, we also observed that some of them are not fully transduced by our HIV-based vector. We first observed that Hut78 and SupT1 reached a maximum of 100% of GFP expressing cells with 100 μ l of viral suspension. For 293T and HDFa cells, 100% GFP

expressing cells was obtained with higher volume of viral supernatant. This highlights that the cell lines were not transduced with the same efficiency.

Moreover, CEM-SS cells never exceeded 47% of positive cells. Therefore it appears that this cell line is not fully permissive to the vector. We can not exclude that the population of CEM-SS cells is not homogenous. In fact, CEM-SS cells are a subclone of the CEM parental T-cell line (Nara et al., 1987). It has been clearly demonstrated that parental CEM cells are not permissive to HIV virions deleted of the *vif* viral protein on the contrary to CEM-SS cells (Sheehy et al., 2002). However, it is not clear if CEM-SS cell line represent an homogenous cell population. In fact, another subclone of CEM cells, called CEM NRK, has been isolated and presents a new restriction phenotype affecting reverse transcription step (Han et al., 2008). In the present study, we conclude, as CEM-SS are not fully permissive to lentivector, these cells are not useful for vector titration and for other analysis on HIV-based vectors.

Over again, although both HDFa and SupT1 cell lines present a maximum rate of transduction (100% of GFP⁺ cells), we titrated the same viral suspension from $0,1.10^7$ TU/ml on HDFa to 5.10^7 TU/ml on SupT1 leading to a variation of more than 50 times. These results could be explained by several hypotheses: (i) HDFa cells are not fully permissive to VSV-G pseudotyped HIV-based vectors entry, (ii) HDFa are not fully permissive to vector replication (reverse transcription and integration impairments), (iii) cells do not express efficiently the GFP protein from the EF1 α promoter. The first hypothesis seems rather improbable knowing that, even if the exact nature of its cellular receptor is still undetermined, the envelope of the VSV has the particularity to enter every cell type from a great majority of species. Nevertheless, studies showed that transduction efficiency may vary even among the VSV glycoproteins (Farley et al., 2007; Yu and Schaffer, 2006) and some transduction process seems greater with other pseudotyping (Frecha et al., 2008a). Hypothesis (ii) was eliminated by our last experiments searching for the viral integrated DNA into the target cells. We managed to underlie that, despite the poor viral titre obtained on this cell line, HDFa cells are highly permissive to WPXLd infection. Indeed, more than 30 copies of integrated vector were detected at 24 h post transduction. From this experiment, we concluded that the viral titer based on GFP expression in HDFa analyses is not correlated to the physical infectious particles number. This result means that the GFP expression is probably slowed down in these cells, validating the last hypothesis. Even if our EF1 α promoter is commonly used (Jakobsson et al., 2003; Mautino

and Morgan, 2002; Zhou et al., 2003), studies underlined the role of the promoter used for each transduction (Logan et al., 2004; Takayama et al., 2008) and we can not exclude the fact that the transduction may be greater with another promoter for some of the tested cell lines

Finally, we conclude that the two titration methods used, GFP transduction and integrated viral DNA quantifications, do greatly correlate for SupT1 cells, as a maximum of $1,37 \pm 0,17$ integrated copy/cell was quantified at MOI 1 (defined on the GFP expression).

In conclusion, while trying to determine the viral titer of WPXLd lentiviral vector that we produced, by a functional assay, we demonstrated that was not so easy. Viral titration may be influenced by the methods itself and by the cell type and concentration. Here we show that the real time PCR amplification of integrated form of viral DNA is the most reliable estimate of functional titers as this is least influenced by factors such as vector expression level.

Finally, lentiviral vectors are powerful challenge for gene therapy (Escors and Breckpot, ; Pluta and Kacprzak, 2009) and promise results were already obtained (Manjunath et al., 2009; Parker et al., ; Singer and Verma, 2008; Zhou et al.). More and more advances are made to improve the capacities of such vector, creating targetable vectors for example (Frecha et al., 2008b; Matrai et al.). But more experiments have to be done to better understand the rules of the transduction. It seems evident that each cell line has its own behavior in front of a given vector.

In conclusion, while trying to determine the viral titer of WPXLd lentiviral vector that we produced, by a functional assay, we demonstrated that was not so easy. Viral titration may be influenced by the methods itself and by the cell type and concentration. Here we show that the real time PCR amplification of integrated form of viral DNA is the most reliable estimate of functional titers as this is least influenced by factors such as vector expression level.

Finally, lentiviral vectors are powerful challenge for gene therapy (Escors and Breckpot, ; Pluta and Kacprzak, 2009) and promise results were already obtained (Manjunath et al., 2009; Parker et al., ; Singer and Verma, 2008; Zhou et al.). More and more advances are made to improve the capacities of such vector, creating targetable vectors for example (Frecha et al., 2008b; Matrai et al.). But more experiments have to be done to better understand the rules of the transduction. It seems evident that each cell line has its own behavior in front of a given vector.

ACKNOWLEDGMENTS.

We thank Dr D.Trono (University of Geneva, Switzerland) for providing us the pWPXLd and pCMV-dR8.91 plasmids and Dr D. Negre (ENS Lyon, France) for the pCMV-VSV-G plasmid and its help for the production of vector preparation. We are grateful to the technical qPCR and flow cytometry platforms of the IFR128, Gerland BioScience Lyon Sud. V. Gay is supported by a PhD grant from the cluster 10 Infectiology of Rhone-Alpes Region.

REFERENCES

- Andreadis, S., Lavery, T., Davis, H.E., Le Doux, J.M., Yarmush, M.L. and Morgan, J.R., 2000. Toward a more accurate quantitation of the activity of recombinant retroviruses: alternatives to titer and multiplicity of infection. *J Virol* 74, 3431-9.
- Brussel, A. and Sonigo, P., 2003. Analysis of early human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis by use of a new sensitive assay for quantifying integrated provirus. *J Virol* 77, 10119-24.
- Butler, S.L., Hansen, M.S. and Bushman, F.D., 2001. A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. *Nat Med* 7, 631-4.
- Chang, L.J., Lentiviral vector transduction of dendritic cells for novel vaccine strategies. *Methods Mol Biol* 614, 161-71.
- Cronin, J., Zhang, X.Y. and Reiser, J., 2005. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* 5, 387-98.
- Demaision, C., Parsley, K., Brouns, G., Scherr, M., Battmer, K., Kinnon, C., Grez, M. and Thrasher, A.J., 2002. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 13, 803-13.
- Escors, D. and Breckpot, K., Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58, 107-19.
- Farley, D.C., Iqbal, S., Smith, J.C., Miskin, J.E., Kingsman, S.M. and Mitrophanous, K.A., 2007. Factors that influence VSV-G pseudotyping and transduction efficiency of lentiviral vectors-in vitro and in vivo implications. *J Gene Med* 9, 345-56.
- Frecha, C., Costa, C., Negre, D., Gauthier, E., Russell, S.J., Cosset, F.L. and Verhoeven, E., 2008a. Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. *Blood* 112, 4843-52.
- Frecha, C., Szecsi, J., Cosset, F.L. and Verhoeven, E., 2008b. Strategies for targeting lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* 8, 449-60.
- Geraerts, M., Willems, S., Baekelandt, V., Debyser, Z. and Gijssels, R., 2006. Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnol* 6, 34.
- Ginn, S.L., Fleming, J., Rowe, P.B. and Alexander, I.E., 2003. Promoter interference mediated by the U3 region in early-generation HIV-1-derived lentivirus vectors can influence detection of transgene expression in a cell-type and species-specific manner. *Hum Gene Ther* 14, 1127-37.
- Han, Y., Wang, X., Dang, Y. and Zheng, Y.H., 2008. Demonstration of a novel HIV-1 restriction phenotype from a human T cell line. *PLoS One* 3, e2796.
- Jakobsson, J., Ericson, C., Jansson, M., Bjork, E. and Lundberg, C., 2003. Targeted transgene expression in rat brain using lentiviral vectors. *J Neurosci Res* 73, 876-85.

- Lee, J.S. and Reiner, N.E., 2009. Stable lentiviral vector-mediated gene silencing in human monocytic cell lines. *Methods Mol Biol* 531, 287-300.
- Logan, A.C., Nightingale, S.J., Haas, D.L., Cho, G.J., Pepper, K.A. and Kohn, D.B., 2004. Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 15, 976-88.
- Manjunath, N., Wu, H., Subramanya, S. and Shankar, P., 2009. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 732-45.
- Martin-Rendon, E., White, L.J., Olsen, A., Mitrophanous, K.A. and Mazarakis, N.D., 2002. New methods to titrate EIAV-based lentiviral vectors. *Mol Ther* 5, 566-70.
- Matrai, J., Chuah, M.K. and VandenDriessche, T., Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol Ther* 18, 477-90.
- Mautino, M.R. and Morgan, R.A., 2002. Enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by novel lentiviral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope antisense RNA. *Hum Gene Ther* 13, 1027-37.
- Morgan, J.R., LeDoux, J.M., Snow, R.G., Tompkins, R.G. and Yarmush, M.L., 1995. Retrovirus infection: effect of time and target cell number. *J Virol* 69, 6994-7000.
- Nair, A., Xie, J., Joshi, S., Harden, P., Davies, J. and Hermiston, T., 2008. A rapid and efficient branched DNA hybridization assay to titer lentiviral vectors. *J Virol Methods* 153, 269-72.
- Nara, P.L., Hatch, W.C., Dunlop, N.M., Robey, W.G., Arthur, L.O., Gonda, M.A. and Fischinger, P.J., 1987. Simple, rapid, quantitative, syncytium-forming microassay for the detection of human immunodeficiency virus neutralizing antibody. *AIDS Res Hum Retroviruses* 3, 283-302.
- O'Doherty, U., Swiggard, W.J., Jeyakumar, D., McGain, D. and Malim, M.H., 2002. A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration. *J Virol* 76, 10942-50.
- Parker, D.G., Coster, D.J., Brereton, H.M., Hart, P.H., Koldej, R., Anson, D.S. and Williams, K.A., Lentivirus-mediated gene transfer of interleukin 10 to the ovine and human cornea. *Clin Experiment Ophthalmol* 38, 405-13.
- Pauwels, K., Gijssbers, R., Toelen, J., Schambach, A., Willard-Gallo, K., Verheust, C., Debyser, Z. and Herman, P., 2009. State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. *Curr Gene Ther* 9, 459-74.
- Pellinen, R., Hakkarainen, T., Wahlfors, T., Tulimaki, K., Ketola, A., Tenhunen, A., Salonen, T. and Wahlfors, J., 2004. Cancer cells as targets for lentivirus-mediated gene transfer and gene therapy. *Int J Oncol* 25, 1753-62.
- Pluta, K. and Kacprzak, M.M., 2009. Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochim Pol* 56, 531-95.
- Qin, J.Y., Zhang, L., Clift, K.L., Hult, I., Xiang, A.P., Ren, B.Z. and Lahn, B.T., Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One* 5, e10611.
- Sakoda, T., Kasahara, N., Hamamori, Y. and Kedes, L., 1999. A high-titer lentiviral production system mediates efficient transduction of differentiated cells including beating cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 31, 2037-47.
- Salmon, P. and Trono, D., 2007. Production and titration of lentiviral vectors. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 12, Unit 12 10.
- Sastry, L., Johnson, T., Hobson, M.J., Smucker, B. and Cornetta, K., 2002. Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther* 9, 1155-62.
- Schambach, A., Wodrich, H., Hildinger, M., Bohne, J., Krausslich, H.G. and Baum, C., 2000. Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol Ther* 2, 435-45.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D. and Malim, M.H., 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646-50.
- Singer, O. and Verma, I.M., 2008. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. *Curr Gene Ther* 8, 483-8.
- Sirven, A., Pflumio, F., Zennou, V., Titeux, M., Vainchenker, W., Coulombel, L., Dubart-Kupperschmitt, A. and Charnéau, P., 2000. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* 96, 4103-10.
- Szyda, A., Paprocka, M., Krawczyński, A., Lenart, K., Heimrath, J., Grabarczyk, P., Mackiewicz, A. and Dus, D., 2006. Optimization of a retroviral vector for transduction of human CD34 positive cells. *Acta Biochim Pol* 53, 815-23.
- Takayama, K., Torashima, T., Horiuchi, H. and Hirai, H., 2008. Purkinje-cell-preferential transduction by lentiviral vectors with the murine stem cell virus promoter. *Neurosci Lett* 443, 7-11.
- Van Maele, B., De Rijck, J., De Clercq, E. and Debyser, Z., 2003. Impact of the central polypurine tract on the kinetics of human immunodeficiency virus type 1 vector transduction. *J Virol* 77, 4685-94.
- Wu, C. and Lu, Y., High-titre retroviral vector system for efficient gene delivery into human and mouse cells of haematopoietic and lymphocytic lineages. *J Gen Virol* 91, 1909-18.
- Yu, J.H. and Schaffer, D.V., 2006. Selection of novel vesicular stomatitis virus glycoprotein variants from a peptide insertion library for enhanced purification of retroviral and lentiviral vectors. *J Virol* 80, 3285-92.
- Yu, S.F., von Ruden, T., Kantoff, P.W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W.F., Wagner, E.F. and Gilboa, E., 1986. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3194-8.
- Zhang, B., Metharom, P., Jullie, H., Ellem, K.A., Cleghorn, G., West, M.J. and Wei, M.Q., 2004. The significance of controlled conditions in lentiviral vector titration and in the use of multiplicity of infection (MOI) for predicting gene transfer events. *Genet Vaccines Ther* 2, 6.
- Zhou, S., Mody, D., Deravin, S.S., Hauer, J., Lu, T., Ma, Z., Hachein-Bey Abina, S., Gray, J.T., Greene, M.R., Cavazzana-Calvo, M., Malech, H.L. and Sorrentino, B.P., A self-inactivating lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy that does not activate LMO2 expression in human T cells. *Blood* 116, 900-8.
- Zhou, X., Cui, Y., Huang, X., Yu, Z., Thomas, A.M., Ye, Z., Pardoll, D.M., Jaffee, E.M. and Cheng, L., 2003. Lentivirus-mediated gene transfer and expression in established human tumor antigen-specific cytotoxic T cells and primary unstimulated T cells. *Hum Gene Ther* 14, 1089-105.
- Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D. and Hope, T.J., 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73, 2886-92.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L. and Trono, D., 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15, 871-5.

III/ Données complémentaires

A/ Evolution des cellules primaires lors du maintien en culture

Les fibroblastes primaires du derme humain que nous souhaitons utiliser pour les expériences de transcriptomique et protéomique sont, comme toutes cellules primaires, extrêmement instables. Afin de savoir pendant combien de passages nous pouvions les maintenir en culture tout en considérant que leur état « primaire » était conservé, nous avons étudié l'évolution de la population par cytométrie en flux. Les cellules ont été maintenues en culture pendant 6 passages successifs et analysées soit 48h après le nouvel ensemencement soit 72h après. Comme nous l'attendions, la population cellulaire change assez rapidement surtout sur le plan de la granulosité (SSC) tandis que la taille évolue légèrement (FSC) (Figure 27). Des observations similaires ont pu être faites par observation au microscope. Ces changements certainement associés à d'autres modifications intracellulaires peuvent fausser l'analyse des réponses cellulaires. Pour assurer l'état « primaire » des cellules tout en prenant en compte des contraintes techniques (quantité de cellules disponibles) nous avons donc choisi d'effectuer nos expériences futures après un maximum de 2 passages.

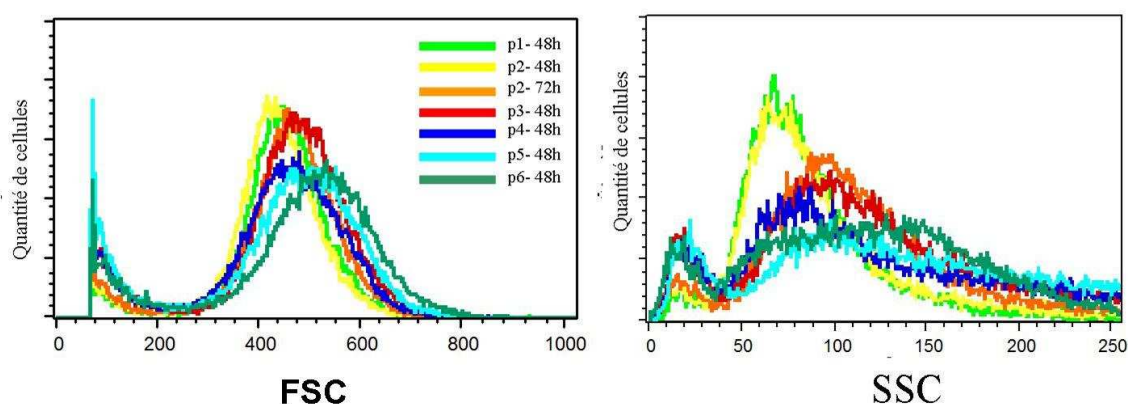


Figure 27 : Evolution de la population cellulaire primaire au cours des passages en culture. Les fibroblastes primaires du derme humain ont été maintenus en culture durant 6 passages et analysés en cytométrie en flux à 48h ou 72h après chaque passage. La taille, révélée par le Forward Scatter (FSC) présente une tendance à l'augmentation tandis que la granulosité, révélée par le Side Scatter (SSC) montre une très forte tendance à l'augmentation.

B/ Cinétique d'infection à différentes MOI sur les cellules primaires

Afin de définir la dose virale à utiliser pour nos analyses futures, différents tests ont été réalisés. Dans un premier temps, l'expression de la GFP a été observée au cours du temps à différentes MOI. Par la suite trois MOI ont été testées afin d'observer l'évolution du nombre

de copies de virus intégrées au cours du temps. Finalement la plus forte MOI a été choisie mais les quantifications du vecteur non intégratif ont révélé quelques intégrations, et des ajustements ont donc été nécessaires avant le lancement des analyses transcriptomiques et protéomiques.

Comme mentionné dans l'article 1, l'expression de la GFP est en réalité réduite dans les HDFa, ne permettant pas la définition d'un titre viral biologiquement valable. Les MOI mentionnées ci-dessous correspondent donc au titre viral calculé après les premiers tests de cinétique d'intégration par PCR quantitative sur HDFa. Ce titre viral s'est en fait révélé très proche du titre obtenu par cytométrie en flux sur les 293T. Pour faciliter les manipulations, les suspensions virales ont donc par la suite été titrées par cytométrie en flux sur 293T.

1/ Expression de la GFP

Dans un premier temps, nous avons choisi d'observer l'évolution de la GFP au cours du temps après infection sur différentes MOI. Nous souhaitons voir si l'expression de la GFP est rapidement visible aux fortes doses avant de lancer les cinétiques plus lourdes de quantification des formes virales intracellulaires. Ainsi, les cellules primaires ont été infectées avec 4 doses différentes de virus (MOI 80, 120, 160 et 200) et analysées en cytométrie en flux entre 0h et 24h post infection (Figure 28). Les quatre doses présentent le même profil bien que la plus élevée engendre un pic de cellules GFP+ plus abondant à 12h30 que les autres. Dès 12h30 post infection on observe quand même un léger décalage des populations cellulaires, signifiant probablement que toutes les cellules expriment déjà à moindre dose la GFP tandis qu'elles l'expriment à très forte dose à 24h post infection reflétant l'énorme décalage des populations. Globalement, on observe un décalage progressif de la fluorescence de la population au cours de l'infection pour finalement atteindre 100% de cellules positives après 24h d'infection. Le processus est d'autant plus rapide que la dose virale est forte bien que les différences ne soient pas non plus phénoménales. Ces résultats encourageants nous ont permis de lancer les cinétiques de quantification des intégrations.

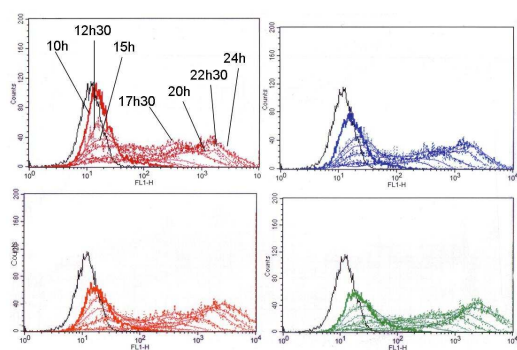


Figure 28 : Evolution de l'expression de la GFP dans les cellules primaires infectées à différentes doses virales. Les fibroblastes humains ont été infectés avec différentes MOI (80, 120, 160, 200) et analysées entre 0h et 24h post infection en cytométrie en flux. Il en ressort que dès 12h30, la fluorescence de la population se décale légèrement pour finalement se déplacer complètement sur la droite après 24h d'infection, reflétant une population entièrement positive. Les différentes MOI testées se comportent globalement de la même façon bien que le décalage soit d'autant plus rapide que la dose virale est forte.

2/ Quantification des formes intégrées

Pour définir le temps post infection auquel nous allons réaliser nos analyses transcriptomiques et protéomiques, il nous fallait avoir une corrélation entre la dose virale, le temps post infection et le nombre de virus intégrés. Des cinétiques d'intégration ont donc été réalisées entre 0 et 75h pour 3 MOI différentes (200, 30 et 3) et les formes virales intégrées ont été quantifiées par la méthode de PCR nichée quantitative précédemment présentée. Pour choisir le temps idéal, nous souhaitions combiner plusieurs conditions : (i) toutes les cellules atteintes par au moins une intégration pour assurer que la population entière réponde, (ii) un processus d'intégration en cours pour assurer la détection des réponses précoces et (iii) de nombreuses intégrations dans un temps restreint pour assurer l'homogénéité des réponses cellulaires.

Concernant les deux MOI les plus faibles, on observe un processus intégratif lent (Figure 29). Bien qu'au final, toutes les cellules soient touchées par une intégration, elles ne le sont pas de façon homogène dans le temps. Ainsi, les réponses cellulaires seront décalées dans le temps et probablement inobservable en transcriptome. A l'inverse, pour la MOI 200, on observe un processus intégratif précoce et exponentiel. Ainsi la totalité de la population cellulaire est touchée par le processus d'intégration dans un temps restreint. Pour assurer une réponse précoce des cellules nous avons choisi de nous placer à 13h post infection à une MOI 200 pour nos futures analyses. A ce temps, la population cellulaire est entièrement touchée et une cellule a subi en moyenne une cinquantaine d'intégrations.

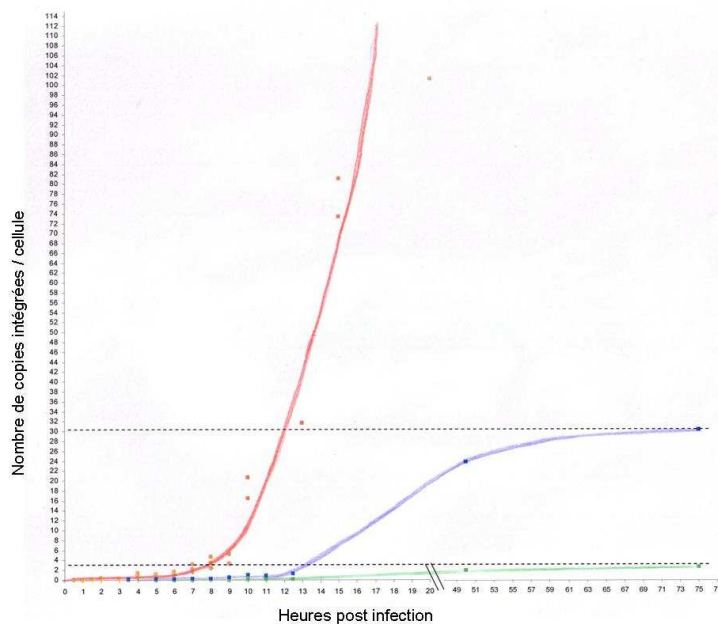


Figure 29 : Cinétique d'intégration sur cellules primaires. Les fibroblastes humains ont été infectés avec différentes doses du vecteur IN/ Δ P et les formes virales intégrées ont été quantifiées au cours du temps post infection. La plus faible dose (MOI 3 en vert) et la dose moyenne (MOI 30 en bleu) présente une évolution lente tandis que la forte dose (MOI 200 en rouge) présente une évolution exponentielle du nombre d'intégrés par cellule. Souhaitant analyser les réponses précoces d'une population cellulaire à la suite de l'intégration virale et souhaitant également que la réponse soit la plus homogène possible, nous avons sélectionné le temps 13h p.i. de la MOI 200 pour nos futures analyses.

3/ Elimination des formes non intégrées contaminantes

Après avoir choisi le temps 13h p.i. pour les analyses des réponses cellulaires, j'ai souhaité faire un essai « à blanc » de l'expérience du transcriptome. Cela consistait simplement en l'infection de ces cellules primaires à la fois avec le vecteur intégratif IN+ et le vecteur non intégratif IN- puis en l'extraction de l'ADN cellulaire quelques heures après l'infection, dans le but de vérifier (i) les temps précoces de la cinétique, (ii) le comportement du vecteur non intégratif et (iii) l'égalité des doses virales entre les deux vecteurs.

La cinétique et l'équivalence des doses virales (PCR sur les formes virales totales) ont été validés (Figure 30 A). On constate, en effet, que les formes virales totales quantifiées sont équivalentes entre les deux lots de cellules testés et les conditions intégratives (IN+) ou non intégratives (IN-). Mais le comportement du vecteur non intégratif comme le montre la figure 30 B a posé des problèmes. En effet, les cinétiques des conditions intégratives et non intégratives ne se séparent pas entre 4h et 9h post infection. De plus, plus d'une copie par cellule est quantifiée dans les conditions non intégratives signifiant qu'en moyenne toutes les cellules de la population auraient subi une intégration. L'expérience a été répétée mais des résultats similaires ont été observés.

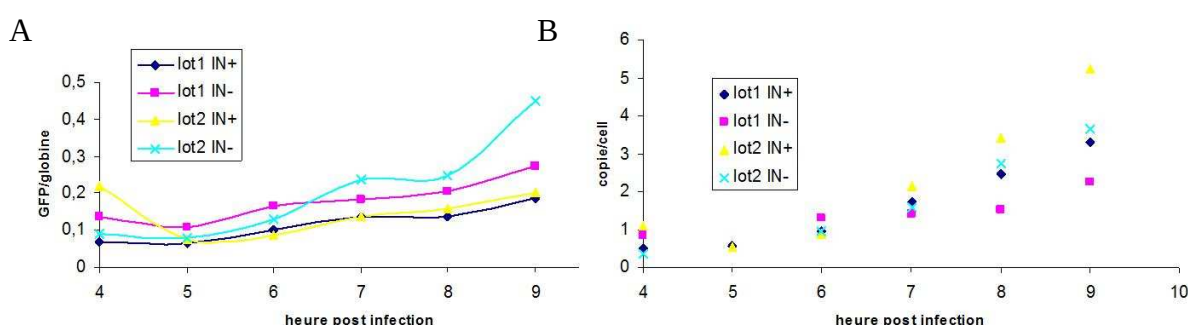


Figure 30 : Vérification des conditions intégratives et non intégratives à fortes doses virales sur deux lots de cellules primaires. A. Quantification des formes virales intracellulaires totales par amplification du gène de la gfp (normalisation avec le β-globine). On constate que dans tous les cas la quantité de formes virales intracellulaires est équivalente ce qui atteste que (i) les deux lots de cellules primaires se comportent de la même façon face aux vecteurs et (ii) les doses virales pour les vecteurs IN+ et IN- sont bien ajustées. B. Quantification des formes virales intégrées par la méthode de PCR nichée quantitative. On constate que les deux lots de cellules se comportent également de la même manière mais que les conditions intégratives et non intégratives sont difficilement séparables.

Il était possible que les formes virales non intégrées, présentes en trop grand nombre dans la cellule comparé aux formes intégrées, rendaient la PCR moins spécifique pour les formes virales intégrées. Une cinétique sur le vecteur non intégratif a permis de constater que

la détection plafonnait à 5 copies/cellules au-delà de 15h post infection, se séparant parfaitement de la condition intégrative atteignant plus de 200 copies/cellules à son maximum. Souhaitant vérifier la validité biologique de ces 5 copies détectées, une infection massive des cellules primaires a été effectuée pendant 5 heures puis les cellules ont été maintenues en culture pendant trois passages successifs afin de leur laisser le temps d'éliminer les formes virales non intégrées. Les ADN cellulaires ont ensuite été extraits et les formes virales intégrées quantifiées. Il en est ressorti que 82 copies de virus avaient été intégrées par cellule dans la population en présence du vecteur intégratif contre 0,12 copies dans la population en présence du vecteur non intégratif. Pour conclure : (i) le comportement non intégratif du vecteur a été validé même à très forte dose virale et (ii) la technique de PCR nichée quantitative n'est pas suffisamment puissante pour séparer les formes intégrées et non intégrées à des temps post infection précoces et lorsque la dose virale est élevée.

IV/ Discussion-Conclusion

Les nombreuses lignées cellulaires classiquement utilisées en recherche sur le VIH ou ses vecteurs se sont révélées inadaptées car peu permissives et définissant un titre viral variable. En effet, pour une même lignée, nous avons remarqué que la concentration cellulaire à laquelle étaient ensemencées les cellules avait un impact considérable sur le titre viral. Il est bien évidemment probable que l'utilisation d'autres vecteurs, de vecteurs similaires mais d'enveloppe différente ou d'un autre promoteur, puisse avoir un effet bien différent sur la transduction des cellules (Farley et al., 2007; Frecha et al., 2008a; Ginn et al., 2003; Logan et al., 2004; Qin et al., ; Yu and Schaffer, 2006).

La méthode de détection des formes virales totales et intégrées semble plus favorable pour définir un titre viral infectieux plutôt que celle basée sur l'expression du transgène. Dans notre système, nous avons néanmoins pu vérifier que dans le cas des SupT1, le titre viral défini par l'expression de la GFP correspondait bien à la quantité de formes virales intracellulaires après infection. En effet, pour une MOI 1 définie par l'expression de la GFP, nous quantifions 1,3 copies de virus intégrés par cellule. Nous avons pu également vérifier que, malgré une définition du titre viral inexacte sur les cellules primaires via l'expression de la GFP, le processus d'intégration s'effectuait de manière similaire aux SupT1 et les cellules étaient parfaitement infectables par nos vecteurs. A la suite de ces expériences de cinétique, un titre viral basé sur les intégrés en cellules primaires a pu être défini, correspondant finalement au titre viral obtenu en cytométrie en flux sur les 293T.

Ces mises au point, en plus de nous avoir permis de définir les lignées cellulaires à utiliser pour nos futures expériences, nous ont également permis de mettre en place une méthode de visualisation et de quantification efficace et précise du nombre de copies de virus intégrées. Ainsi, une gamme de quantification allant jusqu'à 0,01 copie/cellule a été développée.

En conclusion de cette première partie et dans l'objectif d'effectuer l'analyse des réponses cellulaires induites par l'intégration d'un ADN étranger, les vecteurs dérivés du VIH-1 ont été développés. Des cellules primaires fibroblastiques humaines ont été sélectionnées pour les futures études puisqu'elles se sont révélées parfaitement infectables par les vecteurs. Pour choisir le temps post infection auquel seraient effectuée l'analyse des réponses cellulaires, trois conditions devaient être réunies : (i) toute la population cellulaire touchée par au moins une intégration, (ii) un processus intégratif en cours de réalisation et (iii) une synchronisation du processus intégratif dans la population totale. Parmi les MOI testées, c'est la plus élevée qui a été retenue car elle seule permettait la dernière condition. Le temps 13h post infection a finalement été retenu.

Chapitre 2 : analyses transcriptomiques

I/ Objectifs

Ayant pour objectif de définir les modifications cellulaires induites par l'intégration d'un ADN étranger auein du génome, des analyses globales de la population d'ARNm intracellulaires ont été effectuée. A la suite des différentes cinétiques d'intégration réalisées sur les cellules primaires, le temps 13h post infection de la MOI 200 a été sélectionné pour les analyses transcriptomiques.

Quatre lots de cellules primaires ont été testés afin de s'affranchir des variabilités entre donneurs. Pour chacun, environ 1.10^6 cellules ont été infectées soit avec le vecteur intégratif et soit avec le non intégratif. C'est par comparaison et analyse différentielle entre les résultats du système intégratif et ceux du système non intégratif que nous avons mis en évidence les signaux cellulaires spécifiquement induits par l'intégration du vecteur.

Puisque les variations induites par les infections sont souvent très faibles, nous avons choisi de nous placer à un seuil minimal de différence égal à 1,3. Afin d'ientifier les facteurs dérégulés par l'intégration et communs aux quatre donneurs, une première analyse des lots cellulaires par paire (le lot 1 intégratif avec le lot 1 non intégratif, de même pour les lots 2, 3 et 4) a été effectuée. Les données de chaque lot cellulaire ont été recoupées pour ne conserver que les facteurs communs. Cette analyse a mis en évidence la modulation de 113 facteurs suite au processus d'intégration.

Pour élargir l'étude, cette méthode d'analyse par paire a été répétée pour ne conserver que les facteurs communs à au moins trois lots cellulaires sur les quatre trestés. Un total de 1002 dérégulés par le processus d'intégration a été révélé.

Finalement pour augmenter la stringence de l'analyse, un test par permutation a été effectué. Cela consiste à comparer le lot 1 intégratif avec les lots 1, 2, 3 et 4 non intégratif et ainsi de suite. Seuls les facteurs communs à la totalité des croisement, au nombre de 8, sont conservés.

Une des premières observations notable à la suite de ces analyses tient dans le fait que la grande majorité des facteurs cellulaires mis en évidence sont sous-exprimés (65%). De plus, comme mentionné plus loin, toutes les fonctions cellulaires sont perturbées, autant celles qui étaient prévisibles telle que le remodelage de la chromatine ou le cycle cellulaire que d'autres dont nous ne soupçonnions pas le rôle comme l'homéostasie de l'oxydoréduction, le cytosquelette ou l'adhésion cellulaire.

Par la suite, je me suis intéressée à chacun des facteurs quant à son rôle biologique et ses interactions moléculaires. Afin de mettre en évidence les principales fonctions cellulaires liées entre elles et dérégulées par l'intégration, des analyses préliminaires sous le logiciel Ingenuity ont complétée par des études manuelles et m'ont permis de construire un réseau d'interactions. Les fonctions majoritaires mise en évidence correspondent au cycle cellulaire, à la mort cellulaire, à la modification de la chromatine, à la réparation et à l'immunité ou la réponse au stress. Un travail de vérification de certains facteurs a ensuite été effectué (i) manuellement par alignement des sondes de nos puces avec les databases, puis (ii) par RTqPCR.

Enfin, lors de la première expérience sur les lots 1 et 2, des cellules témoins non infectées ont également été analysées nous permettant d'analyser quelques effets des étapes précoces du cycle viral sur la cellule (entrée, RT, transport du PIC). Ces analyses, en marge du sujet de thèse, seront brièvement présentées dans les données complémentaires.

***Microarray analysis of cellular gene regulation
upon a foreign DNA integration into human
fibroblast cells***

Manuscrit en preparation

Microarray analysis of cellular gene regulation upon a foreign DNA integration into human fibroblast cells

Authors: : Virginie GAY ^{1,2,3,4,5}, Karen MOREAU ^{1,2,3,4,5}, Catherine LEGRAS-LACHUER ^{1,2,3,4,5} and Corinne RONFORT ^{1,2,3,4,5,*}.

Keywords: Microarray, transcriptome, HIV, DNA integration.

¹ Université de Lyon, Lyon, France.

² INRA, UMR754 Rétrovirus et Pathologie Comparée, IFR128 Biosciences Gerland-Lyon Sud, Lyon, France.

³ Université Lyon 1, Lyon, F-69007, France.

⁴ Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Marcy L'étoile, F-69000, France.

⁵ Ecole Pratique des Hautes Etudes, Lyon, France.

* corresponding author: ronfort@univ-lyon1.fr. Tel +33 437 287 629. Fax +33 437 287 605.

ABSTRACT

HIV vectors are now commonly used in fundamental research and are new promising tool for gene therapy. A characteristic of HIV infection is the stable integration of the double stranded viral DNA into the host chromosome by the integrase viral protein. The aim of our work was to identify cellular modification induced by the integration of a foreign DNA into the host genome. We performed a microarray analysis in human primary fibroblast upon HIV vector integration. To analyse the effect of the only integration step, signals obtained from two vectors, integrative or not, were compared. Considering a fold change of 1,3, about a hundred of genes were commonly found disturbed in the four cell batches tested and a thousand a least common three batches. We observed a global inhibition of the transcription of genes involved in many biological processes. Among the most represented are the cell cycle, the cell death, the chromatin modification, the immunity and stress responses and DNA repair. These results, in agreement with other studies, bring new knowledges on the vector integration process effects and more generally of all mechanisms involved in response to chromatin injury.

INTRODUCTION

To replicate and express their genome, several viruses and transposable elements integrate their genomic DNA into a chromosome of the host cell. This concerns retroviruses or retrotransposons that insert a reverse transcribed copy of their genomic RNA but also Adeno-Associated Viruses (AAV) or DNA transposons.

In retroviruses, the protein responsible for integration is the viral integrase (IN). However, many studies showed that the virus is assisted by cellular proteins to achieve this essential process. Lens epithelium-derived growth factor/p75 (LEDGF/p75, a misnamed transcriptional co-activator) is one of the major host co-factors, able to bind tightly and specifically to lentiviral IN (Cherepanov et al., 2003; Maertens et al., 2003). It has been shown to protect IN against proteolysis *in vivo*, to drive nuclear localization of HIV IN when both proteins are produced at high levels, and to tether the PIC to the host chromosome (Engelman and Cherepanov, 2008; Hombrouck et al., 2007; McKee et al., 2008; Pandey et al., 2007; Shun et al., 2007). Other proteins such as Barrier to auto-integration factor-1 (BAF), emerin, lamina-associated peptide-2 α (LAP2 α) may be involved in integration (Jacque and Stevenson, 2006; Lin and Engelman, 2003; Van Maele et al., 2006). Specific acetylation of HIV-1 IN by the cellular acetyltransferases p300 and GCN5 has been shown to enhance viral integration (Cereseto et al., 2005). Other IN-interacting proteins await further validation, such as HSP60, human polycomb EED protein, Ini1/hSNF5, HMGI(Y) (Hindmarsh et al., 1999; Kalpana et al., 1994; Parissi et al., 2001; Violot et al., 2003).

By contrast, the last step of retroviral DNA integration, repair and reconstitution of the appropriate chromatin structure and composition, is accomplished by host factors. It has been shown that the non-homologous end-joining (NHEJ) repair pathway, the damage signaling kinases ATM and ATR, Ku70 and Ku80 and some related elements of

the chromatin remodeling system are essential to complete integration, at least for Avian Sarcoma Leukosis Virus (ASLV) and Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1), and that a failure in this process results in apoptosis (Daniel et al., 2004a; Daniel et al., 2001; Li et al., 2001a; Skalka and Katz, 2005). However, the exact repair remains unclear and other processes of DNA repair, Homologous Recombination (HR) and Single Strand Annealing (SSA), may also be recruited by the virus to achieve its integration (Nakai-Murakami et al., 2007; Taganov et al., 2001).

Recently, by combining genome wide siRNA analyses with data of human interactome databases König *et al* (Konig et al., 2008) identified seven proteins with diverse functional roles, including nuclear import, nucleic acid binding, ubiquitination and transcription regulation or DNA repair that were found to be important for viral DNA integration (Brass et al., 2008; Zhou et al., 2008)..

Infection with HIV-1 has been shown to modify expression of a large area of genes. Several studies, using microarray strategies (Brass et al., 2008; Geiss et al., 2000; Imbeault et al., 2009; Li et al., 2009a; Zhou et al., 2008) and proteomic studies (Carlson et al., 2004; Ringrose et al., 2008; Wang et al., 2008) have identified numerous host cell proteins whose expression is modulated by HIV-1 infection. However, there is a paucity of data regarding the modifications in gene expression profiles induced by integration of the viral genome.

To get further insights into genes and pathways specifically regulated by DNA integration, we thus performed a transcriptomic analysis of genes up- or down- regulated by a foreign DNA integration. We focused on early transcriptional events (13 h post-infection). As cell lines are either cancerous or transformed and can thus harbor numerous defects in multiple pathways compared to primary cells (notably in their apoptosis-related metabolism, cell cycle and DNA repair functions), we used fibroblast primary cells for analyses. To induce integration of DNA into

genomic DNA, we used an HIV-based retroviral vector. To eliminate all signals due to entry, reverse transcription and nucleus transport of the vector, we examined signals induced by an infectious but integration-defective vector. Both vectors do not express any protein in order to avoid effects of the reporter gene on cellular gene expression. Finally, we could identify 105 genes whose expression was up- or down regulated with a fold change threshold of ± 1.3 by integration and seven genes whose expression was completely turned on or off. Genes with known biological function partners were classified. Five major biological functions were underlined corresponding to the cell cycle, the cell death, the chromatin modification, the immunity and the stress and finally the DNA repair.

MATERIALS AND METHODS

Cells culture. 293T cells were cultured in Dubelco Modified Eagle Medium (Invitrogen) supplemented with 10% of inactivated Foetal Bovine Serum (Invitrogen), penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml) (Invitrogen). Primary Human Dermal Fibroblast adult cells (HDFa, Invitrogen) from 4 distinct donors (named batches 1 to 4) were grown in M106 medium supplemented with 10% of Low Serum Growth Supplement (LSGS, Invitrogen). Cells were maintained in culture according to the manufacturer's instructions.

Plasmids used. The pWPXLd and pCMV-dR8.91 plasmids were kindly provided by Dr D.Trono (University of Geneva, Switzerland). WPXLd contains the *eGFP* (enhanced green fluorescent protein) gene under control of the EF1 α (elongation factor 1 α) promoter. These sequences are bordered by the HIV LTRs with a SIN ("self-inactivating") deletion in 3'LTR. The pWPXLd- Δ prom plasmid was derived from the pWPXLd by deleting the promoter between SalI and SmaI restriction sites. Consequently WPXLd- Δ prom does not express the eGFP protein. The pCMV-dR8.91 plasmid encodes the HIV structural Gag and Pol proteins as well as the Tat and Rev HIV regulatory proteins. In the pCMV-dR8.91-IN* plasmid, derived from the pCMV-dR8.91, sequence of the viral IN was mutated on residue E152 of the catalytic site by site directed mutagenesis according to the manufacturer instructions (QuickChange® II site-directed mutagenesis, Stratagene). This mutation should inactivate the enzyme (Lu et al., 2005). The pCMV-VSV-G plasmid was kindly provided by Dr. D. Nègre (Lyon, France). It expresses the Vesicular Stomatitis Virus envelope glycoprotein (VSV-G) under control of the strong CMV (cytomegalovirus) promoter. This envelope coats the recombinant virions.

Production of virus stocks. HIV-1-based vectors were produced by calcium phosphate co-transfection of 3 plasmids into 293T cells as already described (Gay et al). Briefly, 5×10^6 293T cells were transfected with three plasmid simultaneously (i) 9 μ g of either pWPXLd or pWPXLd- Δ prom (ii) 9 μ g of either pCMV-R8.91 or pCMV-R8.91-IN* and (iii) 2.7 μ g of pCMV-VSV-G. Vector supernatants were collected 24 h later, cleared by centrifugation at 430 g / 4°C for 10 min, filtered through 0.45 μ m filters (Millipore). Samples were aliquoted and the virals stocks were stored at -80°C. All virus preparations underwent a single freeze-thaw cycle before initiation of infection studies.

Vector titration.

GFP titer. The IN+/GFP+ vector was titrated on 293T cells. At the time of vector addition (t=0), the number of cells was recorded for use in calculating the titer (generally 5×10^5 cells per 6-wells). Cells were harvested 24 h after and were assessed in flow cytometry for eGFP expression (FACSCalibur, Becton Dickinson). Titers were calculated by using the following equation: transducing units (TU) / ml = [(% of eGFP-positive cells / 100) $\times$ dilution factor $\times$ number of cells at t=0. The Multiplicity of Infection (MOI) has been defined taking into account this GFP titer.

Reverse transcriptase activity. When no detectable protein as eGFP was produced by the IN+/GFP- and IN/GFP- vectors, relative titer was determined. Virus in each virus preparation were quantified by using a reverse transcriptase quantitative colorimetric immunoassay (Roche), according to the manufacturer's instructions. A "relative titer" was calculated by comparison with that of the IN+/GFP+ vector, to define the MOI of these vectors.

Quantification of total and integrated viral DNA.

Proviral DNA levels were determined by an Alu-Gag Real Time quantitative as previously described (Gay et al). Briefly, total cellular DNA was extracted using the phenol-chloroform method. Gene specific primers for Alu sequences and for the viral gag (O'Doherty et al., 2002) were used for a first preamplification, performed by a 2 min hot start at 94°C followed by 17 steps of 30 sec at 94°C, 1 min at 50°C and 1 min 40 sec at 72°C. Then, 1/10 th of the preamplification was used with primers LTR (O'Doherty et al., 2002) to run PCR reactions in duplicate in an ABI Prism 7000 instrument (Applied Biosystems, Foster city, CA), using the SYBRTM Green I technology and the Platinum® taq DNA polymerase reaction kit according to the manufacturer instructions (Invitrogen).

Total viral DNA levels were quantified by a real time PCR analyses on the *gfp* gene using the

following primers: 5'-ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA-3' and 5'-CTC GCC GGA CAC GCT GAA CT-3'. The PCR is performed as previously described for the LTR amplification.

In parallel, primers x et y were used to amplify in the same way the β -globine gene. Total and proviral DNA was normalised using the β -globin as a housekeeping gene.

Infection of HDFa cells. Kinetic analyses. For kinetic analysis of figure 2.4.10⁵, HDFa cells (batches 1 and 2) were either unexposed or exposed to the IN+/GFP- or the IN-/GFP- vectors stocks for 8, 10, 12 or 16 hours at different MOI (3, 30 and 200). Total cellular DNA was extracted as above-mentioned by using a nested-qPCR method to quantify proviral DNA.

Microarrays analyses. For the microarray analyses, 2 x10⁶ HDFa cells per well in six-well plates, from each batch were left unexposed or were infected with the IN+/GFP- or the IN-/GFP- vectors at a MOI of 200. Cells were harvested 13 hours after infection by centrifugation at 180 g for 10 minutes at 4°C. Cell pellets were frozen at -80°C until isolation of total mRNA

Microarray samples preparation and assay. Total RNAs from the primary cells were extracted using RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Total RNA yield was measured using optical density OD₂₆₀, and the quality of the RNAs was evaluated with the Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). 2 μ g of total RNAs were amplified and labeled by a single round *in vitro* transcription (IVT) using the GeneChip Expression 3'-Amplification Kit (Affymetrix) according to the manufacturer's instructions. All tubes were also spiked with synthetic mRNA to check the quality of the amplification. The biotin-labeled cRNA yield was measured using optical density OD₂₆₀, and the quality of the cRNAs was evaluated with the Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). 15 μ g of the biotin-labeled cRNA were then fragmented with 5 μ l of fragmentation buffer in a final volume of 20 μ l. The fragmented cRNA were added to the hybridization solution in a final volume of 260 μ l and injected into the arrays. We used the GeneChip Human Genome U133 plus 2.0 arrays (Affymetrix) containing probe sets representing 54 675 transcripts. The arrays were hybridized overnight at 37°C under agitation. The slides were washed in a stringent buffer (Tris-HCl, NaCl, Tween 20) at 46°C for 1 hour followed by a streptavidin-cy5 detection step. Each slide was incubated in 3.4 ml of streptavidin-cy5 solution for 30 min, then washed four times in 240 ml of TNT buffer. For the final washes, the slides were rinsed twice in 240 ml of water containing 0.2% triton,

and dried by centrifugation at 600 rpm. Then the slides were scanned.

Microarray data analysis. The overall raw hybridization signal intensity of arrays was normalized using Expression Control Software (Affymetrix). The threshold of detection was calculated using the normalized signal intensity of 100 negative controls represented in the array. Spots with signal intensity below the threshold were termed "absent" (A), those with signal intensity upper the threshold were termed "present" (P), and the other were termed "marginal" (M). Quality of processing was evaluated by generating scatter plots of positive signal distribution. Comparison and filtering were performed using Partek Genomics Suite software (Partek). The set of differentially expressed genes was compiled by filtering the data according to a fold change ≥ 1.3 for each batch

Functional analyses. The networks and canonical pathways were generated by using the Ingenuity Pathways Analysis software, IPA (Ingenuity systems). The data set containing the gene identifiers and their corresponding expression values in our array assays was uploaded into the IPA application. For network generation, each gene identifier was mapped to its corresponding object in the IPA Data Base and overlaid onto a pre-defined global molecular network. Finally, the network was completed with additional protein interactions and functions, searched for each factors on the NCBI database.

qRT-PCR analyses. The expression level of some specific transcripts was determined by Real-time PCR. The total RNAs were extracted as described in "microarray samples preparation". The RNA concentration was determined by using the optical density OD₂₆₀. Reverse transcription was performed on 750 ng of RNAs using 1 μ l of the iScript DNA amplification enzyme (Biorad) in a final volume of 20 μ l. Products of the reverse transcription were diluted to 1/10 and 5 μ l of this dilution was subjected to qPCR using the SYBR Green PCR (Roche) with 10 μ M of primer mix, in a final volume of 20 μ l. Cycling conditions were as follows 95°C for 10 min, then 40 cycles of 95°C, 15 s and 60°C 40 s. The qPCR was performed with the fast procedure on the StepOne instrument (Applied Biosystems). The primer pairs from each individual gene were designed using the RefSeq sequence of each selected gene and the combination of Beacon Designer and Amplify softwares (Supplementary data 3) Three house-keeping genes were used for the data normalization: GAPDH fwd 5'-CAC CCA CTC CTC CAC CTT TGA C-3' and rev 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3', GUSB1

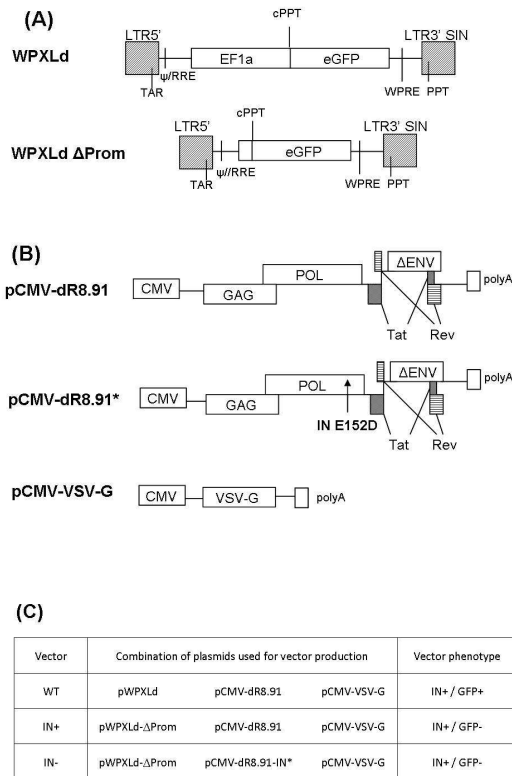


Figure 1: HIV-based vectors production.

(A). Schematic diagrams of vectors. The pWPXLd plasmid serves to production of the SIN HIV-based vector. In this vector, eGFP expression is placed under the control of the EF1 α promoter. The WPXLd- Δ Prom vector was derived from the WPXLd vector by deleting the EF1 α promoter. This vector is thus unable to express the eGFP protein. LTR HIV long terminal repeat. SIN LTR : long terminal repeat with the SIN deletion. eGFP : enhanced green fluorescent protein gene, EF1 α elongation factor 1 α promoter . Ψ : encapsidation signal. RRE Rev-responsive element, TAR Tat-responsive element. PPT: polypurine tract. cPPT central polypurine tract .WPRE woodchuck hepatitis virus responsive element.

(B). Schematic diagrams of the plasmid used for viral particles production. The pCMV-dR8.91 plasmid encodes the HIV Gag, Pol, Tat and Rev proteins. In the pCMV-dR8.91* plasmid, derived from the pCMV-dR8.91, the sequence of IN was mutated on residue 152 of the catalytic site (change of E to D). The pCMV-VSV-G plasmid encodes the envelope glycoprotein of the Vesicular Stomatitis Virus. CMV cytomegalovirus strong promoter. polyA polyadenylation signal , Gag / Pol / Tat / Rev ORFs coding for the HIV-1 proteins. VSV-G Vesicular Stomatitis Virus envelope glycoprotein. IN: sequence encoding for Integrase. IN E152D loss-of-function mutation in the integrase catalytic site,

(C). Scheme of vector production. Three vectors were used. The WT vector is produced by cells co-transfected with pWPXLd, pCMV-dR8.91 and pCMV-VSV-G plasmids. This vector is integration-competent and allows GFP expression (IN+ / GFP+). The integrative IN+ vector is produced by cells co-transfected with pWPXLd- Δ Prom, pCMV-dR8.91 and pCMV-VSV-G plasmids. This vector is integration-competent and does not express GFP (IN+ / GFP-). The IN- vector is produced in supernatants of cells co-transfected with pWPXLd- Δ Prom, pCMV-dR8.91* and pCMV-VSV-G plasmids. This vector is integration-defective and does not express GFP (IN- / GFP-). Vector IN+/GFP+ serves as referent for viral production and titration. Vectors IN+/GFP- and IN-/GFP- were used in the microarray assays analyses.

fwd 5'-GAT TGC CAA TGA AAC CAG GTA TCC C-3' and rev 5'-ACA CGC AGG TGG TAT CAG TCT TG-3' and TBP fwd 5'-TGC TCA TAC CGT GCT GCT ATC TG-3' and rev 5'-TTC TCC CTC AAA CCA ACT TGT CAA C-5'.

When the strongest normalized ratio was in integrative conditions, i.e when the considered gene was up-regulated during integration, the fold change was expressed as a positive number (ranged from 1 to $+\infty$). On the contrary, when the strongest normalized ratio was in non-integrative conditions, i.e. when the considered gene was down-regulated during integration, the fold change was expressed as a negative number (ranged from -1 to $-\infty$). This convention of fold change is referred here as 'IN+' versus 'IN-'. Student's t-test was undergone to check the statistical significance of the fold changes with $p \leq 0.05$ (*) or $p \leq 0.01$ (**).

RESULTS

Preparation of the viral vectors

The WPXLd HIV-based vector (Figure 1A) encodes the eGFP under the control of the EF1 α promoter. WPXLd viral preparations were produced in 293T cells by co- transfection of three plasmids: pWPXLd, pCMV-dR8.91 (that encode the HIV-1 Gag, Pol Tat and Rev proteins) and pCMV-VSV-G that encodes for the envelope glycoprotein of the Vesicular Stomatitis Virus (Figure 1B), as described in the M and M section. To check the GFP expression, 293T cells were

infected with serial dilutions of the viral preparation and picked up 24 hours post-infection for FACS analyses. The WPXLd vector was produced at a titer of $1.8.10^7$ TU/ml.

The vector used for transcriptomic analyses (WPXLd- Δ Prom) was derived from WPXLd by deleting the EF1 α promoter in order to abolish the GFP expression. Two viral preparations of the vector were produced. The first one (the IN+ integrative vector) was prepared as described above with the WT vector by co-transfecting the pWPXLd- Δ Prom, pCMV-dr8.91 and the pCMV-VSV-G plasmids into 293T cells (Figures 1B and 1C). The second (the IN- non-integrative vector) was prepared in the same way except that the pCMV-dr8.91 was replaced by the pCMV-dr8.91* plasmid (Figures 1B and 1C). This plasmid encodes for an IN enzyme in which residue E152 was replaced by D. This mutation allows every viral step from the entry of virus to the cell to nucleus transport but does not allow the integration process (Lu et al)(and see below). After infection of 293T cells with 500 μ l of viral suspension, FACS analyses confirmed that both IN+ and IN- vector were unable to express the GFP protein.

Normalisation of the viral suspension

The effective production of each viral suspension was checked using the reverse transcriptase immunoassay.

Then, we compared the relative DNA level released by each vector into target cells. In this

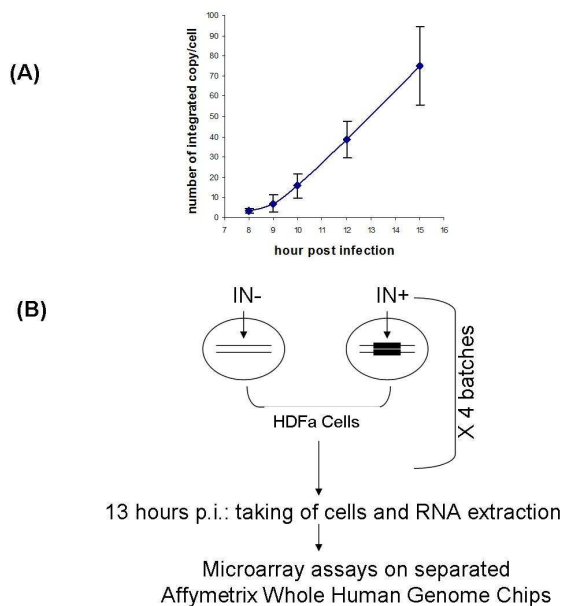


Figure 2. Experimental design.

(A). Kinetic of vector integration in genome of HDFa cells. HDFa cells of batch 1 were infected with the WT vector at a MOI of 200. The number of integrated viral copy per cell was determined at different time post-infection by using an Alu-Gag qPCR method. Experiment was reproduced 3 times.

(B). Experimental scheme for microarrays assays. HDFa cells from batches 1 to 4 were infected with the IN+ or the IN- vector at a MOI of 200. At 13 hours p.i., cells were picked up and total RNA was extracted. The Microarray analyses were performed on Affymetrix whole human genome U133 Plus 2.0 arrays.

purpose, we quantified: i) the total viral DNA forms (integrated and not) ii) the integrated viral forms. 293T cells were infected with dilutions of each vector. Cells were picked up 24 hours post infection, total DNA was extracted and analysed by Real Time PCR. We observed that the IN+ and IN- vector produced 1,6 and 1,25 fold more DNA than the WT vector, respectively. Integrated DNA was then quantified by an Alu-Gag qPCR method. The WT and IN+ vectors integrated the same level of DNA into target cells whereas no integration was detected after infection with the IN- vector.. These data confirm that mutation of E152 to D mutation of IN creates a defective protein, as previously shown (Lu). Finally, the viral titer of IN+ and IN- vector were estimated to $2,88.10^7$ TU/ml and $2,25.10^7$ TU/ml respectively.

Preparation of the cells infected with IN+ and IN- vectors.

The IN+ vector was used to infect two batches of HDFa cells (batches 1 and 2) at three MOI of 3, 30 and 200. Cells were picked up at 8, 9, 10, 12 and 15 hours post-infection and integrated DNA was quantified by Alu-Gag RT PCR (Figure 2A). The increase in the integrated copy number/cell was slow when using MOI 2 and 30 and 2. Indeed, HDFa cells integrated only 1 copy/cell at 30 hours post-infection at MOI 2 and at 20 hours post infection when using MOI 30 (data not shown). By contrast, when using a MOI 200, we observed a rapid exponential increase in the number of integrated copies per cell. At 10 hours post infection (beginning of the exponential phase), 15 copies of vector DNA were integrated per cells (figure 2A). At 13 hours p.i, the average number of

copy/cell was 50. These last conditions of infection (MOI 200 and samples taking of at 13 hours p.i) were retained for further analyses.

Then, we checked the defectiveness of the IN- vector at this high concentration of viral DNA. HDFa cells (batch 2) were subjected to an infection with IN+ or IN- vectors at MOI 200. 5 hours post-infection, infection was stopped by washing cells three times. Cells were then cultured during 3 weeks in order to eliminate non-integrated viral DNA forms [these forms, if present in high quantity, could disturb the nested-qPCR-based quantification (data not shown)]. We determined that cells infected by the IN+ vector contained a mean of 83.57 WPXLD-ΔProm copies/cells whereas cells infected with the IN- vector contained only 0.12 integrated copy/cell (data not shown). The difference of integrated copy number generated by the IN+ and IN- vector could thus be estimated to 700 fold.

Microarray assays and global analyses.

Four batches of human fibroblast HDFa cells were infected with IN+ or IN- vectors at a MOI of 200 (Figure 2B). 13 hours post infection, cells were picked up and total RNA were extracted and prepared to microarray hybridization with human genome U133 Plus 2.0 arrays (Affymetrix). These chips could permit the analysis of the expression levels of about 47,000 human transcripts that correspond to 38,500 well-characterized human genes. Data were analyzed from the 4 batches of HDFa cells, infected in two independent experiments (batches 1 and 2, batches 3 and 4). 45.6% to 48.3% of genes were found to be

expressed depending on the batch sample, corresponding to 25,000 to 26,000 genes.

Results from IN+ and IN- conditions from each cell batch were compared using the GeneSpring GX software taking into account a fold change of 1.3 between both conditions. Then, data from each batch were intersected.

Two methods of analysis were used. In the paired method, each cell batch was compared to itself, then, data from each batch were intersected. Briefly, IN+ 1 was compared to IN- 1, IN+ 2 to IN- 2, IN+ 3 to IN- 3 and IN+ 4 to IN- 4, and data obtained from 1,2,3,4 were intersected. In permutation method, every single condition of a cell batch is compared to the other condition of the four cell batches. For example IN+ 1 is compared to

IN- 1, 2, 3, 4; IN+ 2 to IN- 1, 2, 3, 4 and so on.

The permutation method is highly stringent since it means that basal level of gene expression is identical in the four batches. Among the eight factors identified using this method (Supplementary data 1), 5 were down regulated while only 3 were up, still correlating the previous observation of a global transcriptional down-regulation. Corresponding cellular functions are immune response coupled to the protein regulation, regulation of transcription and cellular signalisation or unknown.

With the paired method we have identified 113 genes (Supplementary data 2) that were differentially expressed in the four cell batches. Cells infected with the IN+ vector were compared to cells with the IN- vector (Figure 3A). Eight

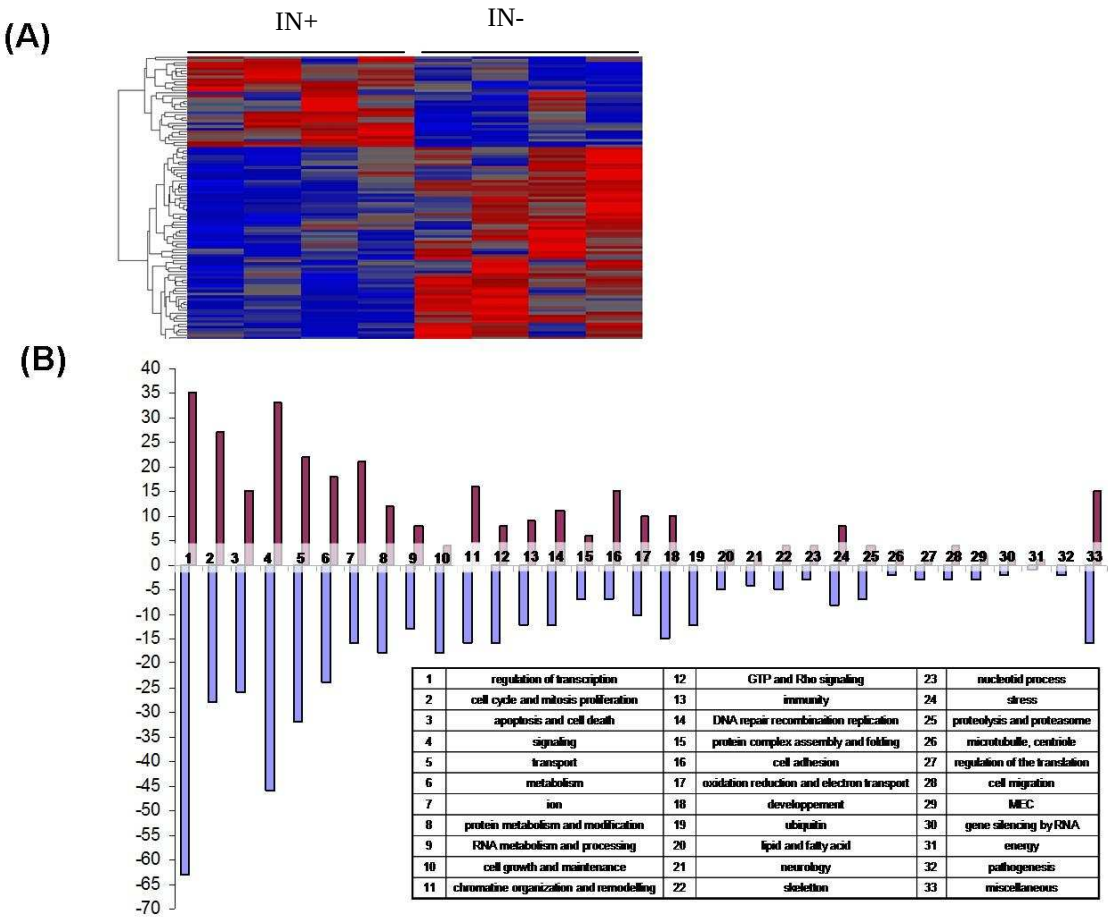


Figure 3. Hierarchical clustering and gene ontology analysis of microarrays data.
(A). Cluster of expression of genes differently expressed in 4/4 batches. A hierarchy clustering of the 105 genes whose expression is differentially modulated (with a fold change threshold ≥ 1.3) by IN+ or IN- vector at 13h post-infection has been defined using the correlation function of GeneSpring GX Software. The 73 and genes down-regulated are represented in blue; the 32 up-regulated genes are in red.
(B) Biological process of genes differently expressed in 3/4 batches. Genes deregulated after the integration process in three cell batches out of the four tested (obtained as in (B)) were added to the initial list of 105 factors. 1002 were then obtained. Among them, 481 were annotated for their biological process in Gene Ontology. The up- and down- regulated genes (in red and blue, respectively) were classified according to these biological processes. Note that one factor can be found in several biological processes.

factors were identified as “Present”/“Absent”, underlining an on (activation) /off (repression) - type response. Two of them are up-regulated whereas the six others were down-regulated. Regarding others, 73 genes were down-regulated (with fold change of 1.3 to 2.2) while 32 were up-regulated (with fold change of 1.3 to 3.92). These observations underline a global down regulation of the transcription process in the cell subjected to the integration. Among the 105 genes, only 17 were disturbed more than 2 times, showing that the integration does indeed disturb the cellular transcriptomic pattern but without huge level.

To refine the significance of these up- and down-regulated genes, we investigated the biological functions and interactions of these genes using Ingenuity Pathways Analysis (IPA software). The IPA analysis permit the identification of top canonical pathways ($p < 0.001$) among which we found: (i) Cell cycle :G /S Chceckpoint Regulation (ii) p53 signaling and (iii) Molecular Mechanisms of Cancer.

We next extended our first analyses to genes for which transcriptomic variation were found in 3 out of the 4 batches tested with the fold

change at 1.3. A second list of 1002 factors was generated, showing 350 up-regulated and 652 down-regulated genes. 481 factors were annotated and could be classified for their biological process (Figure 3B). Gene functions in the top of the list were transcriptional regulation, cell cycle and cell death with respectively 63, 28 and 26 genes down-regulated and 35, 27, and 15 genes up-regulated.

Gene classification, selection and validation

Our first approach for a functional analysis of our microarray results consisted in the creation of an interaction network using Ingenuity software. We decided to focus on the network containing the more factors linked to our study. This pathway named “molecular mechanism of cancer” is the core of the network present in annexe. Because Ingenuity software only recognizes certain protein, the network was completed with additional protein interactions, searched for each factors on the NCBI database. Others factors, not in the network, are unnamed factors or factors of unknown interaction and function.

Then, the biological processes involved for

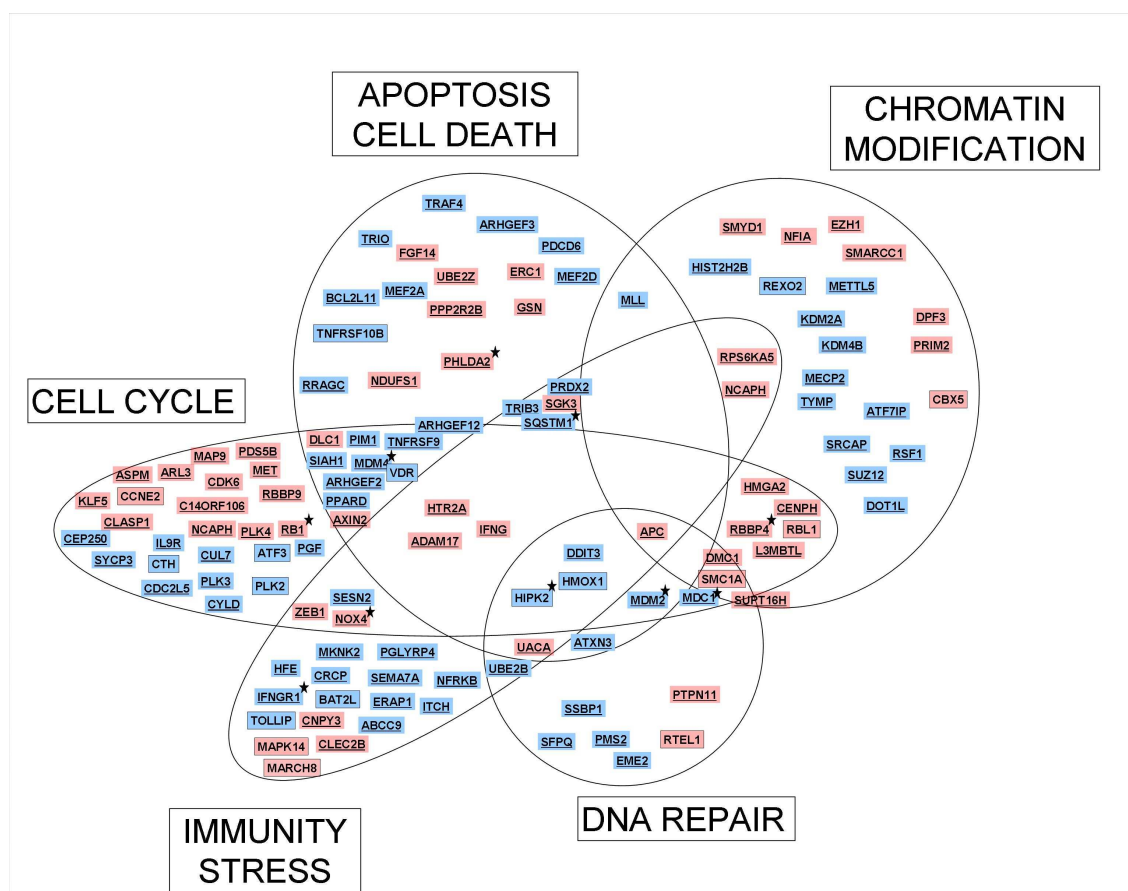


Figure 4. Factors corresponding to the biological processes of interest. Factors encoded by the deregulated genes identified in figure 3B were searched on the NCBI protein database to further investigate their biological function and to identify potential interactants. The five biological processes shown here are the most represented in this functional analysis. Factors pertaining to the DNA repair process, to immunity and cellular stress, chromatin modification, to cell cycle and to cell death are represented in a black box if there are common to the 4 cell batches, underlined if they are common to 3 cell batches. Factor in blue are down-regulated, up-regulated in red. A star represent factor selected and validated in RT-qPCR. Note that we were not able to create relevant network based on biofunctions corresponding to metabolism, ion, cell signaling, although these factors were found in great number in the global analysis. This was either due to the complexity of the molecular interactions or due the poor data available for these genes.

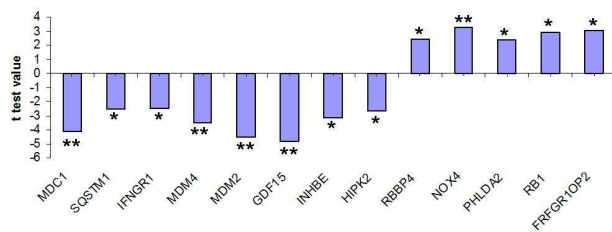


Figure 5: Real Time RT PCR analysis of mRNA level of up- or down- expressed genes in HDFa cells infected with the IN+ vector vs the IN-vector. Statistically significant fold changes ('IN+' versus 'IN-') observed by RTqPCR analysis.. The total RNA of 4 or 5 batches of HDFa cells were infected in three independent experiments were extracted 13 hours post-infection. The expression of genes was measured using real time PCR. Data were normalized with three housekeeping genes (*gus*, *gapdh*, *tbp*). Fold change is a mean of the three fold changes. ± 1 would mean that the gene is expressed similarly in both conditions. >1 indicates that the gene is over-expressed following integration. < -1 indicates that the gene is less expressed following integration. Paired Student's t-test data was undergone and $p \leq 0.05$ (*) or $p \leq 0.01$ (**) are indicated.

each factor of the network was searched. This led to five major biological functions (Fig. 4).

DNA repair comprise genes involved in all the DNA repair processes as the ATXN3 protein is implicated in the Nucleotid-Excision Repair pathway. This pathway is composed of 18 factors and about 39% of up regulation meaning that this pathway seems more inhibited by the integration and that inhibition/activation are imbalanced in this group, according to the global analyses. We can notice that the balance is recovered for factors linked to the DNA repair and another function as 42% are up-regulated.

Chromatin remodelling corresponds to every process that could affect the chromosome integrity from histone modification with the DOT1L, DNA méthylation (ATF7IP) to assembly and segregation with CENPH and CBX5. The global tendency of activation/inhibition is conserved in this group as 58% of the factors are up-regulated. But, factors implicated both in chromatin remodelling and in another group are up-regulated at 92%. This huge inversion may reflect complex cell defence or foreign DNA survival signatures, implicating many chromatin modifications.

In the "Immunity/Stress" group are factors responsible for the innate immunity (CRCP) or linked to a cellular response to stress (DDIT3). For the global tendency, we observed a conserved balance between activation and inhibition as 41% of the factors are down-regulated. Again, 55,5% of factors implicated both in this group and in another are up-regulated, demonstrating a balanced inhibition / activation.

The cell cycle group is composed of genes of the regulation of the cell division as ARHGEF2. This cell cycle group is composed of the majority of annotated factors as 64 out of the 118 are implicated in. Among the 64 genes of this group, 45% are up-regulated. Again, the balance between activation and inhibition is respected. Among factors belonging to both this group and another

one 52% are up-regulated and 48% down-regulated. Nevertheless, we can observe that among the 52% of up-regulated factors, 53% are linked to the chromatin remodelling pathway and, among the 48% of down-regulated factors, more than 78% are linked to the cell death pathway. This suggests that even if the balance between activation and inhibition is globally respected for the cell cycle group, many of the up-regulated genes are link to the chromatin remodelling group whereas the most part of down-regulated genes are linked to the cell death.

The "cell death" is linked to every factors implicated in the cell death from apoptosis (BCL2L11) to other forms of death (HTR2A). Among the 41 factors of the group, 63% are down-regulated, demonstrating a low imbalance between activation and inhibition. Moreover among factors both linked to the cell death and to another group, 75% are downregulated revealing a huge inhibition. We can notice that as already mentioned most of down regulated factors are linked to the cell cycle process.

Only 16 factors of the first 113 genes (4/4 batches) were added in the figure that contains 118 factors meaning that 102 genes of the figure were identified only on 3 batches out of the four. Moreover, 80 genes only correspond to one cellular function whereas 38 present multiple functions. Notably, DDIT3, HMOX1 and HIPK2 are linked to 4 functions out of the five while APC is implicated in all.

Note that we were not able to create relevant network based on biological functions corresponding to metabolism, ion, cell signaling, although these factors were found in great number in the global analysis (figure 3C). This was either due to the complexity of the molecular interactions or due the poor data available for these genes.

RT-qPCR validation

Expression of 13 genes was further analysed by RT-qPCR for validation (Supplementary data 3). Gene normalization was performed using three housekeeping gene (GAPDH, TBP and GUS) expression (Figure 5). Statistical validation was performed using the paired t Student Test method considering a p value < 0,05.

We noticed a great concordance between transcriptomic and qPCR results. Indeed, NOX4 mRNA was validated as up-regulated with a p-value < 0,01 whereas four genes were validated as down-regulated with a p-value < 0,01 (MDC1, MDM4, GDF15, MDM2). Finally, among the 13 tested genes, corresponding either to 4 batches or 3 we combined every possibilities of expression. Indeed, some factors are down regulated in the four batches (HIPK2, GDF15), others are down or up – regulated in 3 batches whereas the last batch present an inversed regulation (SQSTM1, FGFR1OP2). For example, the SQSTM1 is down regulated for 3 batches and is up for the last one. But we also have factors that are down or up regulated for 3 batches while the last one present the same deregulation but do not overcome the fold change of 1,3 (IFNGR1, MDM4, MDC1, RB1, INHBE, MDM2, NOX4, PHLDA2 and RBBP4). Moreover, Figure 4 shows the associated biological function of each factor and demonstrate that genes implicated in every group were selected. From this data we can conclude that the global analyses corresponding to factors disturbed after the integration and commonly found in 3 batches out of the four is validated.

In conclusion, we compile a collection of 1002 genes for which the modulation of expression was associated with HIV DNA integration. Among them, 13 were further validated by RT-qPCR. All the cellular processes are modulated, among them five major biological function were identified corresponding to the cell cycle, the cell death, the immunity and the stress, the chromatin modifications and the DNA repair

DISCUSSION

Foreign DNA integration modulates many cellular factors

In this study, we analyzed the effect of a foreign DNA integration into the genome. For this, integration was performed using HIV-based vectors. To ensure the isolation of specific signals of the integration step, two vectors were compared, one integrative and one non integrative. Primary human dermal fibroblasts were selected for the

infection. Because we not only focused on HIV integration but also on the global genome injuries by DNA intrusion, we did not want to perform the study on primary lymphocytes. Indeed, such cells, permissive to some particular recombination, may not respond or only partially to the integration of a foreign DNA. To select the better time post infection for the analyses, several kinetic of integration were performed at different multiplicity of infection. The integrated viral forms were quantified by the previously described nested real-time PCR method (O'Doherty et al., 2002)). Finally, the analyses were done at a time post infection corresponding to 50 integrated copies per cell, while the integration process was in run.

We obtained 113 genes presenting a disturbed expression of at least 1,3 fold after the integration process. As they only correspond to factors common to the four cell batches tested, and as differences between cell batches are greater than differences due to the integration, the analyses were extended to genes commonly disturbed in three out of the four batches. Finally, 1002 factors were underlined, presenting more a down-regulation (65%) than an up one (35%). Biological process classification showed that all cellular pathways are disturbed by the integration as already observed in other studies on HIV (Brass et al., 2008; Imbeault et al., 2009; Konig et al., 2008; Li et al., 2009a; Rotger et al., ; Wu et al., 2008). Finally, five major biological functions were highlighted with our functional study focused on protein interaction and cellular function. 118 genes were grouped among this five functions and 46 % were up-regulated. This first result demonstrates that inhibition and activation are finally equal after the functional analyses even if inhibition is higher in the global study. This is probably an artefact due to the poor annotation available for many factors.

A great correlation was found with literature. Indeed, the same cellular functions as cell cycle, DNA repair and apoptosis were identified by other HIV studies (Brass et al., 2008; Imbeault et al., 2009; Konig et al., 2008; Li et al., 2009a; Rotger et al., ; Wu et al., 2008). Moreover, inflammation and involvement of the immunity was highlighted in others (Li et al., 2009a; Rotger et al., ; Wu et al., 2008). More precisely, same factors or genes of the same family were also identified by other works on HIV infection. Our analyses revealed the CCNE2 as other revealed this one (Li et al., 2009a) or the related CCNB1 (Croker et al., 2007; Imbeault et al., 2009; Li et al., 2009a). The factor HMGA2 of our study is tightly linked to the HMGA1 of others (Li et al., 2009a) or to HMGB1 revealed by Konig (Konig et al., 2008). Two other studies also identified the IFNG and the TNFRSF25, linked to our TNFRSF10B (Imbeault et al., 2009; Li et al., 2009a).

The DNA repair machinery

The DNA repair pathway is already known to be implicated in the integration process of retrovirus (Daniel et al., 2004a; Daniel et al., 2003; Daniel et al., 1999; Daniel et al., 2004b; Sakurai et al., 2009; Yang et al.) but the precise method of repair is still controversial subject (Ariumi et al., 2005; Dehart et al., 2005).

In our study, ATXN3 is down regulated and clearly implicated in the Nucleotide Excision Repair pathway (NER) through its interaction with Rad23 and HRR23 proteins (Wang et al., 2000). Three other factors, SMC1A, SSBP1 and MDC1 are tightly linked to the DNA repair of double strand break implicating ATM and DNA-PK proteins (Bauerschmidt et al., ; Huang et al., 2009; Li et al., 2009b; Patel et al., ; Richard et al., 2008; Takahashi et al.). Although SSBP1 seems only linked to the DNA repair machinery and is found down modulated, both SMC1A and MDC1 display other functions. SMC1A, up-regulated, is for example member of the cohesion, implicated in the holding of chromatin sister together (Bauerschmidt et al., ; Griese et al.) whereas MDC1, down regulated, present a great role in the regulation of the G2/M checkpoint of the cell cycle (Becherel et al., ; Bu et al., ; Shibata et al.).

Among its numerous functions, the MDM2 protein is also tightly implicated in the DNA repair process through its interaction with MRN complex and its role in p53 negative regulation and apoptosis is already well known (Bouska and Eischen, 2009; Verma et al.). MDM2 is also found down regulated in our study what may involve a decrease of its p53 negative regulation and may reflect a cellular defence signature. The HIPK2 protein seems involved both in the DNA damage sensing and signalling but also posses a function in modulation of p53 and in the regulation of apoptosis (Bitomsky and Hofmann, 2009; Nardinocchi et al., 2007). Finally, a role in DNA repair was subjected for the DDIT3 protein (Lee et al., 2006) although this factor is mostly implicated in the cellular stress response and the apoptosis (Anand et al., 2005; Bakhshi et al., 2008; Schmitt-Ney and Habener, 2000).

The chromatin modulations

The chromatin remodelling pathway includes the major functions implicated in the remodelling, methylation, segregation and condensation of the chromatin, and histone modifications. As our study is only focussed on the effect of a foreign DNA integration, such results are not surprising.

DOT1L and METTL5 are both histone méthyltransférase. Although poor studies are available on METTL5, we know that DOT1L is specifically responsible for the methylation of

residue K79 of the H3 histone, signature of the euchromatine state (Steger et al., 2008). DOT1L is down regulated by the integration process what implies an up modulation of the chromatin silencing. Another regulator of heterochromatin formation is CBX5, also known as HP1 α , interactant of the Brg1 and Brm proteins of the SWI/SNF remodelling complex (Lavigne et al., 2009). The loss of CBX5 was proved to provoke genomic instability while this factor regulates the chromatin structure (Dinant and Luijsterburg, 2009). In this study, CBX5 is up regulated, what provokes the same reaction as DOT1L. This up regulation of the chromatin silencing may be a cellular defence against the foreign DNA expression and can explain the global down regulation of the transcription observed in the study.

Among the many factors presented in the figure 4, both RBBP4 (or RbAp48) and HMGA2 are implicated in the chromatin structure modulation. RBBP4, a member of chromatin remodelling complexes (Bonuccelli et al.) is a histone chaperone that interact both with H3 and H4 during the establishment and the maintain of the chromatin structure (Murzina et al., 2008). HMGA2 also known to modulate chromatin structure and the transcription (Reeves, ; Zhang and Wang) is tightly linked to HMGA1, already identified as key protein during the integration process of HIV (Farnet and Bushman, 1997; Van Maele et al., 2006). Both are up regulated, reflecting that chromatin state is changing.

The immune response and the sensing of cellular stress

Among the expected results were the immunity, response to cellular stress and inflammation pathways, all grouped as “immunity./stress”. Indeed, every cellular perturbation provokes a stress that should be corrected by the cell for surviving.

Among the identified factors, four were annotated as implicated in the innate immunity (CRCP, ERAP1, PGLYRP4 and CNPY3) but only CNPY3 was up-regulated. The down regulation of the majority of innate immunity factor could be explained by a foreign DNA survival defence. Further studies have to be done on this factor as literature is still not available. Moreover the Toll Like Receptor pathway was highlighted with the TOLLIP factor which is up-regulated and the IFN γ pathway was also implicated in the cellular response as the IFN γ is up regulated whereas its receptor IFNGR1 is down. IFN γ signalling is a well known pathway implicated in the cellular defence against many pathogens including viruses, fungi, parasites and bacteria and this pathway was already implicated in many viral infection as HBV (Zhou et al., 2009) and HSV-1 (Eisemann et al., 2007). Both

TOLLIP and IFN γ are up regulated, reflecting a cellular defence initiation against the foreign DNA.

The ABCC9 factor seems also implicated in the cellular defence against infection (Crocker et al., 2007) but the exact role of this member of the transport adenosine triphosphate family, ATP sensitive and related to K⁺ pores, remains unknown. Moreover, we can notice the presence of MKNK2 involved in the mRNA stability, the MAPK kinase pathway and responsible for the production of inflammatory mediators (Buxade et al., 2008). This factor is down regulated probably indicating a cellular defence modulation by the foreign DNA.

Among factors implicated in the cellular stress, many are linked to the oxidative stress and redox system regulation, as DDIT3, NOX4 and PRDX2 factors. DDIT3 protein already discussed in the DNA repair group is thus tightly linked to the reticulum endoplasmic stress (Bakhshi et al., 2008). NOX4, a NADH oxidase protein is also linked to the redox homeostasis and its expression is up-regulated during oxidative damages (Diebold et al., 2009; Lener et al., 2009). This factor was also already described as over regulated during HCV infection (Boudreau et al., 2009). Finally, PRDX2 is an antioxidant protein that scavenges the ROS and protects lipid and protein from oxidative stress (Johnson et al., 2003; Sanchez-Font et al., 2003; Shiota et al., 2008).

The regulation of the cell cycle

The cellular cell cycle is tightly linked to the cell health. Indeed, every cellular stress is subjected to control and correction before the cell enters in division to ensure the correct propagation of the identity.

Some factors of this study are directly linked to the cell cycle regulation as CCNE2, CDC2L5 and CYLD. CCNE2 is a cyclin member regulated by the well known PTEN protein (Wu et al., 2009). The CCNE2 protein is responsible for the activation of both CDK2 and CDK3 (Honda et al., 2005) and interacts with the CDK inhibitors of the CIP/KIP family (Zariwala et al., 1998). This cyclin plays a major role during the cell cycle progression, regulating (i) the entry from G0 stage and (ii) the G1/S phase and the initiation of the DNA replication (Honda et al., 2005; Payton and Coats, 2002; Payton et al., 2002; Zariwala et al., 1998). Cyclin E is up regulated in the study, reflecting a successful entry in S phase. This observation may be a sign of a foreign DNA signature to ensure its own survival. Indeed we can suppose that, in front of such DNA damages provoked by the integration, the cell would probably have stopped the cell cycle. The CYLD protein is an ubiquitinase tightly linked to the NF- κ B signalling and also negatively regulate the entry

into mitosis and the G1/S transition (Stegmeier et al., 2007; Sun, 2007; Wickstrom et al., 2007). The down regulation of CYLD is consistent with the up regulation of CCNE2, indicating a successful cell cycle progression in spite of the cellular damages.

Also controlling the cell cycle progression, CDC2L5 is a member of the CDK like kinase family (Even et al., 2006). Finally members of the same PLK family are observed but only one is activated as poor data are available concerning their precise role in the cell cycle.

The programmed cell death

Finally, the last biological function underlined is the cell death process. This multistep process is a key regulator of the cell health and survival. The cell death does not seem to be particularly activated, we can wonder if the integration dose was sufficient to overcome the repair process and induce the cell death, probably not. Another possibility is that integration provokes this inhibition of cell death for its own survival. This hypothesis is supported by microscopic observations and cell culture where no apoptosis was observed.

Among factors identified, some are directly related to the apoptosis as BCL2L11 and TNFRSF10B. Indeed, the BCL2L11 protein also called Bim, is a BH3-only member of the Bcl-2 family, pro-apoptotic factor tightly linked to the apoptosis (Bouillet et al., 2002; Bouillet and Strasser, 2002; Hughes et al., 2008; Hutcheson et al., 2008). Bim is down regulated in this study, what implies a down modulation of the intrinsic apoptosis and may reflect a foreign DNA survival signature. Also linked to the apoptosis TNFRSF10B, also known as DR5 or TRAIL-R2, is a member of the TRAIL signalling, involved in the extrinsic apoptosis pathway. This factor is a key member of the Death Inducing Signaling Complex, DISC, and directly linked to caspases (Gonzalez and Ashkenazi, 2002; Pennarun et al., 2002; Testa, 2002). TRAIL-R2 is down regulated in our study, also implicating a down modulation of the extrinsic apoptosis probably for the foreign DNA to survive.

Finally among the cell death group we can notice the presence of two MEF2 factors, MEFA2A and MEF2D. Both are activated by the p38/MAPK14 kinase and are directly cleaved by the caspases during apoptosis (Li et al., 2001b; Okamoto et al., 2002). The cell death group is also composed of the HIPK2 and the DDIT3 proteins already discussed for their role in the DNA repair.

Conclusive remarks

Finally, many factors appear disturbed in response to the integration process. But, as the non integrative vector produces non-integrated forms that finally accumulate in a greater manner in the infected cell than with the integrative vector, we can not eliminate the possibility that some disturbed

factors are in fact more linked to the cytoplasmic forms accumulation. Nevertheless, (i) an average of 50 integrated copies per cell is detected for the integrative condition, (ii) both IN⁺ and IN⁻ vectors are used in the same quantity and (iii) both IN⁺ and IN⁻ infected cells are still subjected to cytoplasmic forms accumulation as the infection is still running at the time of analyses. We can thus conclude that an average of 50 copies of more non integrated forms accumulate in the cell infected with the IN⁻ vector. The question is if this differential quantity is enough to induce some cellular perturbations detectable in our analyses. This is probably the case for some factors.

In conclusion, we have shown that integration of a foreign DNA results in profound alteration of host cell functions. These results can easily be explained as the integration directly disturbs the chromatin state by inducing double strand breaks which are source of cellular stress, solved by the DNA repair machinery (Daniel et al., 2004a; Daniel et al., 2003; Daniel et al., 2004b; Skalka and Katz, 2005). While these solving is processing, employing chromatin remodelling factors, the cell may probably modulate its division cycle to ensure the chromosome integrity before mitosis. The presence of apoptosis-linked factors is evident as both cell cycle and apoptosis are tightly linked. Indeed pro-apoptotic factors are ready to play when cell cycle checkpoints are activated and in the case of the cellular damage are not solved.

Nevertheless, the observed deregulation could be due to a cellular response against the integration or a strategy of the foreign DNA to survive. Thus, a great part of factors may not be entirely linked to a cellular response but also to a foreign DNA survival mechanism. Indeed, it is possible that the foreign DNA fends off the cellular defences, favouring the cell division (as CCNE2 and CYLD may indicate) and down modulating the apoptosis (as Bim and TRAIL-R2 may indicate) to ensure its own maintenance. Cellular immunity may also be induced by the only presence of the foreign DNA into the cell as IFN γ and TOLLIP seem to prove.

Nevertheless we can also still not definitively conclude on the precise modulation of each pathway (i.e. progression of the cell cycle or apoptosis arrest) as many factors still have an imprecise role (i.e. pro or anti apoptotic for example).

Finally, further analyses have to be done on several factors of interest, as DDIT3, HIPK2 and others located in the joining of several biological functions. The transient or persistent nature of the response identified must also be tested. Moreover, validations have to be done in other cell lines to conclude on the cell specific nature of each factor.

The full delineation of the cellular mechanisms triggered by retroviral integration has large implications in gene transfer using integrative vectors or in understanding V(D)J recombination, transposable elements integration, DSB repair and cancer. Such studies may also increase our knowledge on the effect of a foreign DNA integration, as much for the gene therapy involving integrative vectors as for the HIV infection

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research grants from the Institut National de la Recherche Agronomique and from The Region Rhône-Alpes (Emergence grants). The authors are grateful to the technical platform "Analyse Génétique et Vectorologie and to Dr D. Negre for assistance in vector production and for the pCMV-VSV-G plasmid. We also thank Dr D.Trono (University of Geneva, Switzerland) for providing us the pWPXLd and pCMV-dR8.91 plasmids. We are grateful to the technical qPCR and flow cytometry platforms of the IFR128, Gerland BioScience Lyon Sud. The authors also thank Séverine Crozet (ProfilXpert) for technical assistance with microarrays, Joël Lachuer for helpful discussion, Nicolas Nazaret help in the microarray analysis, Laurian Jaffre for her help during E152D mutation creation and Matthias Schultz for his help during RT-qPCR experiments. VG is supported by a PhD grant from the Cluster 10 Infectiology of the Rhône-Alpes Region.

REFERENCES

- Anand, S., Chakrabarti, E., Kawamura, H., Taylor, C.R. and Maytin, E.V., 2005. Ultraviolet light (UVB and UVA) induces the damage-responsive transcription factor CHOP/gadd153 in murine and human epidermis: evidence for a mechanism specific to intact skin. *J Invest Dermatol* 125, 323-33.
- Ariumi, Y., Turelli, P., Masutani, M. and Trono, D., 2005. DNA damage sensors ATM, ATR, DNA-PKcs, and PARP-1 are dispensable for human immunodeficiency virus type 1 integration. *J Virol* 79, 2973-8.
- Bakhshi, J., Weinstein, L., Poksay, K.S., Nishinaga, B., Bredeisen, D.E. and Rao, R.V., 2008. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program in mouse melanoma cells: effect of curcumin. *Apoptosis* 13, 904-14.
- Bauerschmidt, C., Arrichiello, C., Burdak-Rothkamm, S., Woodcock, M., Hill, M.A., Stevens, D.L. and Rothkamm, K., Cohesin promotes the repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in replicated chromatin. *Nucleic Acids Res* 38, 477-87.
- Becherel, O.J., Jakob, B., Cherry, A.L., Gueven, N., Fusser, M., Kijas, A.W., Peng, C., Katyal, S., McKinnon, P.J., Chen, J., Epe, B., Smerdon, S.J., Taucher-Scholz, G. and Lavin, M.F., CK2 phosphorylation-dependent interaction between aprataxin and MDC1 in the DNA damage response. *Nucleic Acids Res* 38, 1489-503.
- Bitomsky, N. and Hofmann, T.G., 2009. Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. *Febs J* 276, 6074-83.

- Bonuccelli, L., Rossi, L., Lena, A., Scarcelli, V., Rainaldi, G., Evangelista, M., Iacopetti, P., Gremigni, V. and Salvetti, A., An RbAp48-like gene regulates adult stem cells in planarians. *J Cell Sci* 123, 690-8.
- Boudreau, H.E., Emerson, S.U., Korzeniowska, A., Jendrysik, M.A. and Leto, T.L., 2009. Hepatitis C virus (HCV) proteins induce NADPH oxidase 4 expression in a transforming growth factor beta-dependent manner: a new contributor to HCV-induced oxidative stress. *J Virol* 83, 12934-46.
- Bouillet, P., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Zhang, L.C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J.M. and Strasser, A., 2002. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415, 922-6.
- Bouillet, P. and Strasser, A., 2002. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115, 1567-74.
- Bouska, A. and Eischen, C.M., 2009. Mdm2 affects genome stability independent of p53. *Cancer Res* 69, 1697-701.
- Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J. and Elledge, S.J., 2008. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319, 921-6.
- Bu, Y., Suenaga, Y., Okoshi, R., Sang, M., Kubo, N., Song, F., Nakagawara, A. and Ozaki, T., NFB1/MDC1 participates in the regulation of G2/M transition in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 397, 157-62.
- Buxade, M., Parra-Palau, J.L. and Proud, C.G., 2008. The Mnk: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases). *Front Biosci* 13, 5359-73.
- Carlson, K.A., Ciborowski, P., Schellpeper, C.N., Biskup, T.M., Shen, R.F., Luo, X., Destache, C.J. and Gendelman, H.E., 2004. Proteomic fingerprinting of HIV-1-infected human monocyte-derived macrophages: a preliminary report. *J Neuroimmunol* 147, 35-42.
- Cereseto, A., Manganaro, L., Gutierrez, M.I., Terreni, M., Fittipaldi, A., Lusic, M., Marcello, A. and Giacca, M., 2005. Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration. *Embo J* 24, 3070-81.
- Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., De Clercq, E. and Debyser, Z., 2003. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem* 278, 372-81.
- Crocker, B., Crozat, K., Berger, M., Xia, Y., Sovath, S., Schaffer, L., Eleftherianos, I., Imler, J.L. and Beutler, B., 2007. ATP-sensitive potassium channels mediate survival during infection in mammals and insects. *Nat Genet* 39, 1453-60.
- Daniel, R., Greger, J.G., Katz, R.A., Taganov, K.D., Wu, X., Kappes, J.C. and Skalka, A.M., 2004a. Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the nonhomologous end joining repair pathway. *J Virol* 78, 8573-81.
- Daniel, R., Kao, G., Taganov, K., Greger, J.G., Favorova, O., Merkel, G., Yen, T.J., Katz, R.A. and Skalka, A.M., 2003. Evidence that the retroviral DNA integration process triggers an ATR-dependent DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4778-83.
- Daniel, R., Katz, R.A., Merkel, G., Hittle, J.C., Yen, T.J. and Skalka, A.M., 2001. Wortmannin potentiates integrase-mediated killing of lymphocytes and reduces the efficiency of stable transduction by retroviruses. *Mol Cell Biol* 21, 1164-72.
- Daniel, R., Katz, R.A. and Skalka, A.M., 1999. A role for DNA-PK in retroviral DNA integration. *Science* 284, 644-7.
- Daniel, R., Ramcharan, J., Rogakou, E., Taganov, K.D., Greger, J.G., Bonner, W., Nussenzweig, A., Katz, R.A. and Skalka, A.M., 2004b. Histone H2AX is phosphorylated at sites of retroviral DNA integration but is dispensable for postintegration repair. *J Biol Chem* 279, 45810-4.
- Dehart, J.L., Andersen, J.L., Zimmerman, E.S., Ardon, O., An, D.S., Blackett, J., Kim, B. and Planelles, V., 2005. The ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related protein is dispensable for retroviral integration. *J Virol* 79, 1389-96.
- Diebold, I., Flugel, D., Becht, S., Belaiba, R.S., Bonello, S., Hess, J., Kietzmann, T. and Gorch, A., The hypoxia-inducible factor-2alpha is stabilized by oxidative stress involving NOX4. *Antioxid Redox Signal* 13, 425-36.
- Dinant, C. and Luijsterburg, M.S., 2009. The emerging role of HP1 in the DNA damage response. *Mol Cell Biol* 29, 6335-40.
- Eisemann, J., Muhl-Zurbes, P., Steinkasserer, A. and Kummer, M., 2007. Infection of mature dendritic cells with herpes simplex virus type 1 interferes with the interferon signaling pathway. *Immunobiology* 212, 877-86.
- Engelman, A. and Cherepanov, P., 2008. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog* 4, e1000046.
- Even, Y., Durieux, S., Escande, M.L., Lozano, J.C., Peaucellier, G., Weil, D. and Genevieve, A.M., 2006. CDC2L5, a Cdk-like kinase with RS domain, interacts with the ASF/SF2-associated protein p32 and affects splicing in vivo. *J Cell Biochem* 99, 890-904.
- Farnet, C.M. and Bushman, F.D., 1997. HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* 88, 483-92.
- Geiss, G.K., Bumgarner, R.E., An, M.C., Agy, M.B., van 't Wout, A.B., Hammersmark, E., Carter, V.S., Upchurch, D., Mullins, J.I. and Katze, M.G., 2000. Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology* 266, 8-16.
- Gonzalez, F. and Ashkenazi, A., New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene*.
- Griese, J.J., Witte, G. and Hopfner, K.P., Structure and DNA binding activity of the mouse condensin hinge domain highlight common and diverse features of SMC proteins. *Nucleic Acids Res* 38, 3454-65.
- Hindmarsh, P., Ridky, T., Reeves, R., Andrade, M., Skalka, A.M. and Leis, J., 1999. HMG protein family members stimulate human immunodeficiency virus type 1 and avian sarcoma virus concerted DNA integration in vitro. *J Virol* 73, 2994-3003.
- Hombrouck, A., De Rijck, J., Hendrix, J., Vandekerckhove, L., Voet, A., De Maeyer, M., Witvrouw, M., Engelborghs, Y., Christ, F., Gijssels, R. and Debyser, Z., 2007. Virus evolution reveals an exclusive role for LEDGF/p75 in chromosomal tethering of HIV. *PLoS Pathog* 3, e47.
- Honda, R., Lowe, E.D., Dubinina, E., Skamnik, V., Cook, A., Brown, N.R. and Johnson, L.N., 2005. The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles. *Embo J* 24, 452-63.
- Huang, J., Gong, Z., Ghosal, G. and Chen, J., 2009. SOSS complexes participate in the maintenance of genomic stability. *Mol Cell* 35, 384-93.
- Hughes, P.D., Belz, G.T., Fortner, K.A., Budd, R.C., Strasser, A. and Bouillet, P., 2008. Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity* 28, 197-205.
- Hutcheson, J., Scatizzi, J.C., Siddiqui, A.M., Haines, G.K., 3rd, Wu, T., Li, Q.Z., Davis, L.S., Mohan, C. and Perlman, H., 2008. Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity* 28, 206-17.
- Imbeault, M., Ouellet, M. and Tremblay, M.J., 2009. Microarray study reveals that HIV-1 induces rapid type-I interferon-dependent p53 mRNA up-regulation in human primary CD4+ T cells. *Retrovirology* 6, 5.
- Jacque, J.M. and Stevenson, M., 2006. The inner-nuclear-envelope protein emerlin regulates HIV-1 infectivity. *Nature* 441, 641-5.
- Johnson, R.M., Ho, Y.S., Yu, D.Y., Kuypers, F.A., Ravindranath, Y. and Goyette, G.W., The effects of disruption of genes for peroxiredoxin-2, glutathione peroxidase-1, and catalase on erythrocyte oxidative metabolism. *Free Radic Biol Med* 48, 519-25.
- Kalpna, G.V., Marmon, S., Wang, W., Crabtree, G.R. and Goff, S.P., 1994. Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science* 266, 2002-6.

- König, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T.L., Bonamy, G.M., Irelan, J.T., Chiang, C.Y., Tu, B.P., De Jesus, P.D., Lilley, C.E., Seidel, S., Opaluch, A.M., Caldwell, J.S., Weitzman, M.D., Kuhen, K.L., Bandyopadhyay, S., Ideker, T., Orth, A.P., Miraglia, L.J., Bushman, F.D., Young, J.A. and Chanda, S.K., 2008. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135, 49-60.
- Lavigne, M., Eskeland, R., Azebi, S., Saint-Andre, V., Jang, S.M., Batsche, E., Fan, H.Y., Kingston, R.E., Imhof, A. and Muchardt, C., 2009. Interaction of HP1 and Brg1/Brm with the globular domain of histone H3 is required for HP1-mediated repression. *PLoS Genet* 5, e1000769.
- Lee, J., Reddy, R., Barsky, L., Weinberg, K. and Driscoll, B., 2006. Contribution of proliferation and DNA damage repair to alveolar epithelial type 2 cell recovery from hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L685-L694.
- Lener, B., Koziel, R., Pircher, H., Hutter, E., Greussing, R., Herndler-Brandstetter, D., Hermann, M., Unterluggauer, H. and Jansen-Durr, P., 2009. The NADPH oxidase Nox4 restricts the replicative lifespan of human endothelial cells. *Biochem J* 423, 363-74.
- Li, L., Olvera, J.M., Yoder, K.E., Mitchell, R.S., Butler, S.L., Lieber, M., Martin, S.L. and Bushman, F.D., 2001a. Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *Embo J* 20, 3272-81.
- Li, M., Linseman, D.A., Allen, M.P., Meintzer, M.K., Wang, X., Laessig, T., Wierman, M.E. and Heidenreich, K.A., 2001b. Myocyte enhancer factor 2A and 2D undergo phosphorylation and caspase-mediated degradation during apoptosis of rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 21, 6544-52.
- Li, Q., Smith, A.J., Schacker, T.W., Carlis, J.V., Duan, L., Reilly, C.S. and Haase, A.T., 2009a. Microarray analysis of lymphatic tissue reveals stage-specific, gene expression signatures in HIV-1 infection. *J Immunol* 183, 1975-82.
- Li, Y., Bolderson, E., Kumar, R., Muniandy, P.A., Xue, Y., Richard, D.J., Seidman, M., Pandita, T.K., Khanna, K.K. and Wang, W., 2009b. HSSB1 and hSSB2 form similar multiprotein complexes that participate in DNA damage response. *J Biol Chem* 284, 23525-31.
- Lin, C.W. and Engelman, A., 2003. The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *J Virol* 77, 5030-6.
- Lu, R., Limon, A., Ghory, H.Z. and Engelman, A., 2005. Genetic analyses of DNA-binding mutants in the catalytic core domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Virol* 79, 2493-505.
- Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debyser, Z. and Engelborghs, Y., 2003. LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem* 278, 33528-39.
- McKee, C.J., Kessl, J.J., Shkriabai, N., Dar, M.J., Engelman, A. and Kvaratskhelia, M., 2008. Dynamic modulation of HIV-1 integrase structure and function by cellular lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) protein. *J Biol Chem* 283, 31802-12.
- Murzina, N.V., Pei, X.Y., Zhang, W., Sparkes, M., Vicente-Garcia, J., Pratap, J.V., McLaughlin, S.H., Ben-Shahar, T.R., Verreault, A., Luisi, B.F. and Laue, E.D., 2008. Structural basis for the recognition of histone H4 by the histone-chaperone RbAp46. *Structure* 16, 1077-85.
- Nakai-Murakami, C., Shimura, M., Kinomoto, M., Takizawa, Y., Tokunaga, K., Taguchi, T., Hoshino, S., Miyagawa, K., Sata, T., Kurumizaka, H., Yuo, A. and Ishizaka, Y., 2007. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* 26, 477-86.
- Nardinocchi, L., Puca, R., Sacchi, A. and D'Orazi, G., 2007. HIPK2 knock-down compromises tumor cell efficiency to repair damaged DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 249-55.
- O'Doherty, U., Swiggard, W.J., Jeyakumar, D., McGain, D. and Malim, M.H., 2002. A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration. *J Virol* 76, 10942-50.
- Okamoto, S., Li, Z., Ju, C., Scholzke, M.N., Mathews, E., Cui, J., Salvessen, G.S., Bossy-Wetzel, E. and Lipton, S.A., 2002. Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3974-9.
- Pandey, K.K., Sinha, S. and Grandgenett, D.P., 2007. Transcriptional coactivator LEDGF/p75 modulates human immunodeficiency virus type 1 integrase-mediated concerted integration. *J Virol* 81, 3969-79.
- Parissi, V., Calmels, C., De Soultrait, V.R., Caumont, A., Fournier, M., Chaignepain, S. and Litvak, S., 2001. Functional interactions of human immunodeficiency virus type 1 integrase with human and yeast HSP60. *J Virol* 75, 11344-53.
- Patel, A.N., Goyal, S., Wu, H., Schiff, D., Moran, M.S. and Haffty, B.G., Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1) expression as a prognostic marker for nodal recurrence in early-stage breast cancer patients treated with breast-conserving surgery and radiation therapy. *Breast Cancer Res Treat*.
- Payton, M. and Coats, S., 2002. Cyclin E2, the cycle continues. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 315-20.
- Payton, M., Scully, S., Chung, G. and Coats, S., 2002. Deregulation of cyclin E2 expression and associated kinase activity in primary breast tumors. *Oncogene* 21, 8529-34.
- Pennarun, B., Meijer, A., de Vries, E.G., Kleibeuker, J.H., Kruyt, F. and de Jong, S., Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1805, 123-40.
- Reeves, R., Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochim Biophys Acta* 1799, 3-14.
- Richard, D.J., Bolderson, E., Cubeddu, L., Wadsworth, R.I., Savage, K., Sharma, G.G., Nicolette, M.L., Tsvetanov, S., McIlwraith, M.J., Pandita, R.K., Takeda, S., Hay, R.T., Gautier, J., West, S.C., Paull, T.T., Pandita, T.K., White, M.F. and Khanna, K.K., 2008. Single-stranded DNA-binding protein hSSB1 is critical for genomic stability. *Nature* 453, 677-81.
- Ringrose, J.H., Jeeninga, R.E., Berkhout, B. and Speijer, D., 2008. Proteomic studies reveal coordinated changes in T-cell expression patterns upon infection with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 82, 4320-30.
- Rotger, M., Dang, K.K., Fellay, J., Heinzen, E.L., Feng, S., Descombes, P., Shianna, K.V., Ge, D., Gunthard, H.F., Goldstein, D.B. and Telenti, A., Genome-wide mRNA expression correlates of viral control in CD4+ T-cells from HIV-1-infected individuals. *PLoS Pathog* 6, e1000781.
- Sakurai, Y., Komatsu, K., Agematsu, K. and Matsuo, M., 2009. DNA double strand break repair enzymes function at multiple steps in retroviral infection. *Retrovirology* 6, 114.
- Sanchez-Font, M.F., Sebastia, J., Sanfeliu, C., Cristofol, R., Marfany, G. and Gonzalez-Duarte, R., 2003. Peroxiredoxin 2 (PRDX2), an antioxidant enzyme, is under-expressed in Down syndrome fetal brains. *Cell Mol Life Sci* 60, 1513-23.
- Schmitt-Ney, M. and Habener, J.F., 2000. CHOP/GADD153 gene expression response to cellular stresses inhibited by prior exposure to ultraviolet light wavelength band C (UVC). Inhibitory sequence mediating the UVC response localized to exon 1. *J Biol Chem* 275, 40839-45.
- Shibata, A., Barton, O., Noon, A.T., Dahm, K., Deckbar, D., Goodarzi, A.A., Lobrich, M. and Jeggo, P.A., Role of ATM and the damage response mediator proteins 53BP1 and MDC1 in the maintenance of G(2)/M checkpoint arrest. *Mol Cell Biol* 30, 3371-83.
- Shiota, M., Izumi, H., Miyamoto, N., Onitsuka, T., Kashiwagi, E., Kidani, A., Hirano, G., Takahashi, M., Ono, M., Kuwano, M., Naito, S., Sasaguri, Y. and Kohno, K., 2008. Ets regulates peroxiredoxin1 and 5 expressions through their interaction with the high-mobility group protein B1. *Cancer Sci* 99, 1950-9.
- Shun, M.C., Raghavendra, N.K., Vandegraaff, N., Daigle, J.E., Hughes, S., Kellam, P., Cherepanov, P. and Engelman, A., 2007. LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. *Genes Dev* 21, 1767-78.

- Skalka, A.M. and Katz, R.A., 2005. Retroviral DNA integration and the DNA damage response. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1, 971-8.
- Steger, D.J., Lefterova, M.I., Ying, L., Stonestrom, A.J., Schupp, M., Zhuo, D., Vakoc, A.L., Kim, J.E., Chen, J., Lazar, M.A., Blobel, G.A. and Vakoc, C.R., 2008. DOT1L/KMT4 recruitment and H3K79 methylation are ubiquitously coupled with gene transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 28, 2825-39.
- Stegmeier, F., Sowa, M.E., Nalepa, G., Gygi, S.P., Harper, J.W. and Elledge, S.J., 2007. The tumor suppressor CYLD regulates entry into mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8869-74.
- Sun, S.C., CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes. *Cell Death Differ* 17, 25-34.
- Taganov, K., Daniel, R., Katz, R.A., Favorova, O. and Skalka, A.M., 2001. Characterization of retrovirus-host DNA junctions in cells deficient in nonhomologous-end joining. *J Virol* 75, 9549-52.
- Takahashi, A., Mori, E. and Ohnishi, T., The foci of DNA double strand break-recognition proteins localize with gammaH2AX after heat treatment. *J Radiat Res (Tokyo)* 51, 91-5.
- Testa, U., TRAIL/TRAIL-R in hematologic malignancies. *J Cell Biochem* 110, 21-34.
- Van Maele, B., Busschots, K., Vandekerckhove, L., Christ, F. and Debyser, Z., 2006. Cellular co-factors of HIV-1 integration. *Trends Biochem Sci* 31, 98-105.
- Verma, R., Rigatti, M.J., Belinsky, G.S., Godman, C.A. and Giardina, C., DNA damage response to the Mdm2 inhibitor nutlin-3. *Biochem Pharmacol* 79, 565-74.
- Violot, S., Hong, S.S., Rakotobe, D., Petit, C., Gay, B., Moreau, K., Billaud, G., Priet, S., Sire, J., Schwartz, O., Mouscadet, J.F. and Boulanger, P., 2003. The human polycomb group EED protein interacts with the integrase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 77, 12507-22.
- Wang, G., Sawai, N., Kotliarova, S., Kanazawa, I. and Nukina, N., 2000. Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B. *Hum Mol Genet* 9, 1795-803.
- Wang, T., Gong, N., Liu, J., Kadiu, I., Kraft-Terry, S.D., Mosley, R.L., Volsky, D.J., Ciborowski, P. and Gendelman, H.E., 2008. Proteomic modeling for HIV-1 infected microglia-astrocyte crosstalk. *PLoS One* 3, e2507.
- Wickstrom, S.A., Masoumi, K.C., Khochbin, S., Fassler, R. and Massoumi, R., CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin. *Embo J* 29, 131-44.
- Wu, J.Q., Dwyer, D.E., Dyer, W.B., Yang, Y.H., Wang, B. and Saksena, N.K., 2008. Transcriptional profiles in CD8+ T cells from HIV+ progressors on HAART are characterized by coordinated up-regulation of oxidative phosphorylation enzymes and interferon responses. *Virology* 380, 124-35.
- Wu, Z., Cho, H., Hampton, G.M. and Theodorescu, D., 2009. Cdc6 and cyclin E2 are PTEN-regulated genes associated with human prostate cancer metastasis. *Neoplasia* 11, 66-76.
- Yang, Y.X., Guen, V., Richard, J., Cohen, E.A. and Berthoux, L., Cell context-dependent involvement of ATR in early stages of retroviral replication. *Virology* 396, 272-9.
- Zariwala, M., Liu, J. and Xiong, Y., 1998. Cyclin E2, a novel human G1 cyclin and activating partner of CDK2 and CDK3, is induced by viral oncoproteins. *Oncogene* 17, 2787-98.
- Zhang, Q. and Wang, Y., HMG modifications and nuclear function. *Biochim Biophys Acta* 1799, 28-36.
- Zhou, H., Xu, M., Huang, Q., Gates, A.T., Zhang, X.D., Castle, J.C., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Hazuda, D.J. and Espeseth, A.S., 2008. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* 4, 495-504.
- Zhou, J., Chen, D.Q., Poon, V.K., Zeng, Y., Ng, F., Lu, L., Huang, J.D., Yuen, K.Y. and Zheng, B.J., 2009. A regulatory polymorphism in interferon-gamma receptor 1 promoter is associated with the susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Immunogenetics* 61, 423-30.

SUPPLEMENTARY DATA

1. Genes identified with the permutation method

Probe Set ID	FoldChange	RefSeq Transcript ID	Gene Title
242752_at	2,823	---	---
231933_at	1,80038	NM_001002265 / NM_001002266 / NM_145021	membrane-associated ring finger (C3HC4) 8
219111_s_at	1,51312	NM_001111322 / NM_024072	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 54
214760_at	-1,46318	NM_015655	zinc finger protein 337
1554638_at	-1,70861	NM_001105251 /NM_014733	zinc finger, FYVE domain containing 16
235705_at	-1,79079	---	---
216766_at	-1,95078	---	---
223262_s_at	-2,78874	NM_015633	FGFR1 oncogene partner 2

2. Genes identified with the paired method

Probeset ID	Gene Symbol	Gene Title	RefSeq	FoldChange
215062_at	---	---		
1431_at	CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	NM_000773.3	
242752_at	---	---	---	2,823
208578_at	SCN10A	sodium channel, voltage-gated, type X, alpha subunit	NM_006514	2,20279
242134_at	---	---	---	1,94899
1555677_s_at	SMC1A	structural maintenance of chromosomes 1A	NM_006306	1,8593
1555153_s_at	FCHO2	FCH domain only 2	NM_001146032 / NM_138782	1,80782
1554512_a_at	CCDC123	coiled-coil domain containing 123	NM_032816	1,8035
231933_at	MARCH8	membrane-associated ring finger (C3HC4) 8	NM_001002265 / NM_001002266 / NM_145021	1,80038
234990_at	CBX5	chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog, Drosophila)	NM_001127321 / NM_001127322 / NM_012117	1,78873
1566954_at	---	---	---	1,7779
1559307_s_at	RBL1	retinoblastoma-like 1 (p107)	NM_002895 / NM_183404	1,73559
220564_at	RNLS	renalase, FAD-dependent amine oxidase	NM_001031709 / NM_018363	1,73409
236665_at	CCDC18	coiled-coil domain containing 18	NM_206886	1,69357
200917_s_at	SRPR	signal recognition particle receptor	NM_003139	1,68895
235723_at	BNC2	basonuclin 2	NM_017637	1,66827
238583_at	MSRB3	methionine sulfoxide reductase B3	NM_001031679 / NM_198080	1,60556
227662_at	SYNPO2	synaptopodin 2	NM_001128933 / NM_001128934 / NM_133477	1,59553
222855_s_at	TRPV2	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2	NM_016113	1,58926
244115_at	FAM126A	family with sequence similarity 126, member A	NM_032581	1,56654
231723_at	SNX12	sorting nexin 12	NM_013346	1,55361
205519_at	WDR76	WD repeat domain 76	NM_024908	1,53287
1562387_at	C5orf42	chromosome 5 open reading frame 42	NM_023073	1,5323
239415_at	MAP9	microtubule-associated protein 9	NM_001039580	1,51842
238649_at	PITPNC1	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1	contig	1,51673
219111_s_at	DDX54	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 54	NM_001111322 / NM_024072	1,51312
219842_at	ARL15	ADP-ribosylation factor-like 15	NM_019087	1,51221
217504_at	ABCA6	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6	NM_080284	1,49079
242458_at	RALGPS2	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2	NM_018037 / NM_152663	1,48625
211814_s_at	CCNE2	cyclin E2	NM_057749	1,47839
211087_x_at	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	NM_001315 / NM_139012 / NM_139013 / NM_139014	1,44898
1566527_at	---	---	---	1,43504
206092_x_at	RTEL1	regulator of telomere elongation helicase 1	NM_016434 / NM_032957	1,43042
204745_x_at	MT1G	metallothionein 1G	NM_005950	1,35672
209295_at	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	NM_003842 / NM_147187 /	-1,34271

			NR_027140	
242428_at	DCUN1D1	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1	contig	-1,35374
212069_s_at	BAT2L	HLA-B associated transcript 2-like	NM_013318	-1,39057
222469_s_at	TOLLIP	toll interacting protein	NM_019009	-1,40776
1565703_at	SMAD4	SMAD family member 4	contig	-1,44078
230810_at	JMJD4	jumonji domain containing 4	NM_023007	-1,45031
215854_at	---	---	---	-1,45862
214760_at	ZNF337	zinc finger protein 337	NM_015655	-1,46318
206085_s_at	CTH	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	NM_001902 / NM_153742	-1,46687
228787_s_at	BCAS4	breast carcinoma amplified sequence 4	NM_001010974 / NM_017843 / NM_198799	-1,47889
201939_at	PLK2	polo-like kinase 2 (Drosophila)	NM_006622	-1,50156
1562416_at	---	---	---	-1,5052
215281_x_at	POGZ	pogo transposable element with ZNF domain	contig	-1,50915
210239_at	IRX5	iroquois homeobox 5	NM_005853	-1,51992
204254_s_at	VDR	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	NM_000376 / NM_001017535	-1,52224
235464_at	---	---	---	-1,54049
213700_s_at	---	---	---	-1,55131
238733_at	---	---	---	-1,55545
244433_at	---	---	---	-1,55803
1553612_at	ZNF354B	zinc finger protein 354B	mismatch	-1,57193
1559360_at	---	---	---	-1,58761
231547_at	ZBTB37	zinc finger and BTB domain containing 37	NM_001122770 / NM_032522	-1,5924
244341_at	---	---	---	-1,62318
223800_s_at	LIMS3	LIM and senescent cell antigen-like domains 3	NM_033514 / XM_001129783	-1,62424
1555606_a_at	GDPD1	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1	NM_182569	-1,64288
203068_at	KLHL21	kelch-like 21 (Drosophila)	NM_014851	-1,6491
216680_s_at	EPHB4	EPH receptor B4	NM_004444	-1,65239
232889_at	---	---	---	-1,65687
225762_x_at	LOC284801	hypothetical protein LOC284801	XR_078610.1	-1,6623
225115_at	HIPK2	homeodomain interacting protein kinase 2	NM_001113239 / NM_022740	-1,66238
1565786_x_at	FLJ45482	hypothetical LOC645566	contig	-1,67737
1556110_at	---	---	---	-1,67955
1554638_at	ZFYVE16	zinc finger, FYVE domain containing 16	contig	-1,70861
227755_at	---	---	---	-1,71224
210791_s_at	RICS	Rho GTPase-activating protein	NM_001142685 / NM_014715	-1,71577
234084_x_at	---	---	---	-1,72028
242836_at	---	---	---	-1,73233
209921_at	SLC7A11	solute carrier family 7 member 11	NM_014331	-1,73421
230332_at	ZCCHC7	Zinc finger, CCHC domain containing 7	contig	-1,73654
233224_at	---	---	---	-1,74523
217678_at	SLC7A11	solute carrier family 7 member 11	NM_014331	-1,75516
1560485_at	HIVEP1	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1	contig	-1,7606

1559691_at	---	---	---	-1,7634
241418_at	LOC344887	similar to hCG2041270	contig	-1,76372
230802_at	ARHGAP24	Rho GTPase activating protein 24	contig	-1,77461
1558714_at	---	---	---	-1,78374
235705_at	---	---	---	-1,79079
210230_at	---	---	---	-1,803
1559391_s_at	---	---	---	-1,8124
203665_at	HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	NM_002133	-1,81265
233931_at	---	---	---	-1,83879
201195_s_at	SLC7A5	solute carrier family 7 member 5	NM_003486	-1,84019
238883_at	---	---	---	-1,84942
222371_at	---	---	---	-1,91193
1431_at	CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	NM_000773	-1,93289
216766_at	---	---	---	-1,95078
215528_at	---	---	---	-1,97775
200924_s_at	SLC3A2	solute carrier family 3	NM_001012661 / NM_001012662 / NM_001012663 / NM_001012664 / NM_001013251	-1,9864
232264_at	---	---	---	-2,0075
1569540_at	---	---	---	-2,09046
1555854_at	---	---	---	-2,10795
240594_at	---	---	---	-2,1376
215385_at	---	---	---	-2,15231
239496_at	---	---	---	-2,15544
232337_at	B3GNT7	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 7	NM_145236	-2,16922
233613_x_at	REXO2	REX2, RNA exonuclease 2 homolog	NM_015523	-2,24315
237310_at	---	---	---	-2,45349
202672_s_at	ATF3	activating transcription factor 3	NM_001030287 / NM_001040619 / NM_001674 / NM_004024	-2,5367
243993_at	---	---	---	-2,65236
237058_x_at	SLC6A13	solute carrier family 6 member 13	contig	-2,69075
223262_s_at	FGFR1OP2	FGFR1 oncogene partner 2	NM_015633	-2,78874
215062_at	---	---	---	-2,86333
221577_x_at	GDF15	growth differentiation factor 15	NM_004864	-3,9217
1552498_at	ZSCAN20	zinc finger and SCAN domain containing 20	NM_145238	
1562275_at	---	---	---	
208578_at	SCN10A	sodium channel, voltage-gated, type X, alpha subunit	NM_006514	
229945_at	CYHR1	Cysteine/histidine-rich 1	---	
230288_at	FGF14	fibroblast growth factor 14	---	
242752_at	---	---	---	

3. Primers for RT-qPCR validation

				Fold Change for each cell batch				average fold change
Probe ID	Gene symbol	Primer Fwd	Primer Rev	fc 1	fc 2	fc 3	fc 4	
203061_S_AT	MDC1	GCTAGAGGGCTATGAGAT	TAGTGGAATGGAGCAATG	-1,623	-1,306	-1,052	-2,174	-1,494
201471_S_AT	SQSTM1	CCTCCTAACAAGTGTATCTC	ACGACTATGTGACCTCTT	-1,791	-1,311	1,013	-1,424	-1,315
242903_AT	IFNGR1	CCAGTAACGGAACAGTATC	GAAGTGGCTACAAAGGTC	-1,611	-1,481	-1,376	-1,011	-1,366
225742_AT	MDM4	GGTAGAGGTAGAGTTAAGTATTG	CCAAGAGCATAATAGTTCT	-1,495	-1,373	-1,148	-1,468	-1,355
237891_AT	MDM2	ATCGTGAATGGTCTATAAGG	AACAGGCAATTACAATCTTAC	-2,095	-1,676	-1,161	-1,970	-1,677
229711_S_AT				-1,213	-1,408	-1,436	-1,362	-1,348
217373_X_AT				-1,847	-1,521	-1,825	1,439	-1,304
221577_X_AT	GDF15	GAAGTCAGGACGGTGAAT	AACTCTCGGAATCTGGAG	-7,071	-2,382	-3,345	-3,707	-3,922
210587_AT	INHBE	ATAATGGCAATGTGGTCAA	AACTTCATCTTGGTCTCTTC	-3,186	-8,373	-2,494	-2,637	-2,980
225115_AT	HIPK2	TTTAGCCAAAGAACCCTT	CTGGAAAGGAACGAAGG	-1,592	-2,004	-1,555	-1,508	-1,662
224065_AT				-1,366	-1,257	-1,583	-1,994	-1,547
210371_S_AT	RBBP4	GGTAGGTGTCTGAGCCATGAA	TGTGCATCCTGGAAAGTCAG	1,509	1,343	1,098	1,343	1,298
219773_AT	NOX4	GGAAACCAAGAGACCCTGA	GGGAGTTCTTGAATCCACCA	2,906	2,334	1,287	1,563	1,500
209802_AT	PHLDA2	CTTGAGGATGGAGTGAAGC	ACAGCCTCTCCAGCTATGG	1,398	5,616	1,173	1,760	1,694
211540_S_AT	RB1	TCAGTTAATGCTATGTGTCC	GCTGTTTATATGTTCTTTGA	1,395	1,354	1,682	1,736	1,578
236808_AT	FGFR1OP2	CAGCATTAGTGACCAACA	CAGACTCAGAACTCTTCAG	1,655	1,351	-1,284	1,467	1,198

III/ Données complémentaires

A/ Réseau d'interactions protéiques

A la suite des résultats de transcriptomique, les facteurs communs aux quatre lots cellulaires ont été analysés sur le logiciel Ingenuity Pathway Analysis afin d'identifier les interactions protéiques et les voies cellulaires pouvant relier entre eux nos facteurs.

Le logiciel n'a identifié qu'un petit nombre de facteurs et n'a pas permis de développer un réseau personnalisé par l'ajout de certains facteurs d'intérêt. Néanmoins, parmi les réseaux testés, c'est celui nommé « Molecular Mechanisms of Cancer » qui nous a permis de relier entre elles un maximum de nos données.

Pour approfondir ces résultats et agrandir le réseau d'interaction, les facteurs annotés et communs aux quatre lots cellulaires ont été recherchés dans la base de données de Pubmed afin d'identifier d'autres interactants potentiels et de mettre en évidence leurs fonctions cellulaires. La même manipulation a, par la suite, été effectuée avec les facteurs communs à au moins trois lots cellulaires. Le réseau d'interactions a ainsi été développé jusqu'à obtenir la figure 31.

Après analyse des fonctions biologiques de chaque facteur du réseau, les fonctions cellulaires correspondant au cycle cellulaire, à la mort cellulaire, à l'immunité et la réponse au stress, aux modifications de la chromatine et à la réparation de l'ADN ont été mises en évidence.

Finalement, les facteurs n'ayant pas d'interactants, et ne faisant donc pas partie du réseau mais ayant une de ces cinq fonctions biologiques, ont été ajoutés dans l'encadré (Figure 31). C'est à partir de cette analyse qu'a été construite la figure 4 présentée dans l'article 2, classant les différents facteurs au sein des cinq familles de fonctions biologiques majoritaires. Il faut préciser que, bien que les processus associés par exemple aux ions, à la signalisation cellulaire ou au métabolisme, soient représentés en grand nombre (Figure 3, article 2), aucun réseau d'interaction n'a pu être construit à partir des facteurs correspondant.

Il faut également noter que des analyses statistiques approfondies sont en cours de réalisation afin d'augmenter la stringence de notre étude. De ce fait, il est possible que certains facteurs soient finalement éliminés de l'étude.

B/ Etude préliminaire sur d'autres cellules

Dans le but d'approfondir les validations des gènes par RT-qPCR, des cellules primaires humains issus de la glande mammaire (épithéliales) ou du derme (fibroblastes) et

provenant d'autres équipes de recherche (C.Le Jan et SS.Hong) ont été testés pour les 13 gènes préalablement analysés (Figure 5 article 2). De la même manière que pour les quatre lots cellulaires précédent, ces cellules ont été infectées à une MOI 200 avec les vecteurs intégratifs et non intégratifs avant d'être récupérées à 13h post infection afin d'en extraire les ARN. Ces derniers ont été analysés en RT-qPCR selon la même procédure que celle présentée dans l'article.

Comme le montre la figure 32, cinq gènes ont été validés en considérant les quatre lots préalables additionnés des épithéliales de la glande mammaire contre sept pour les fibroblastes du derme. Finalement les sept mêmes gènes ont été validés sur la totalité des cellules. Ces données encourageantes devront être approfondies (i) en réitérant l'expérience sur ces mêmes cellules (nouvelles infections) et (ii) en testant d'autres lots cellulaires correspondants à ces mêmes cellules (i.e d'autres donneurs provenant du même fournisseur).

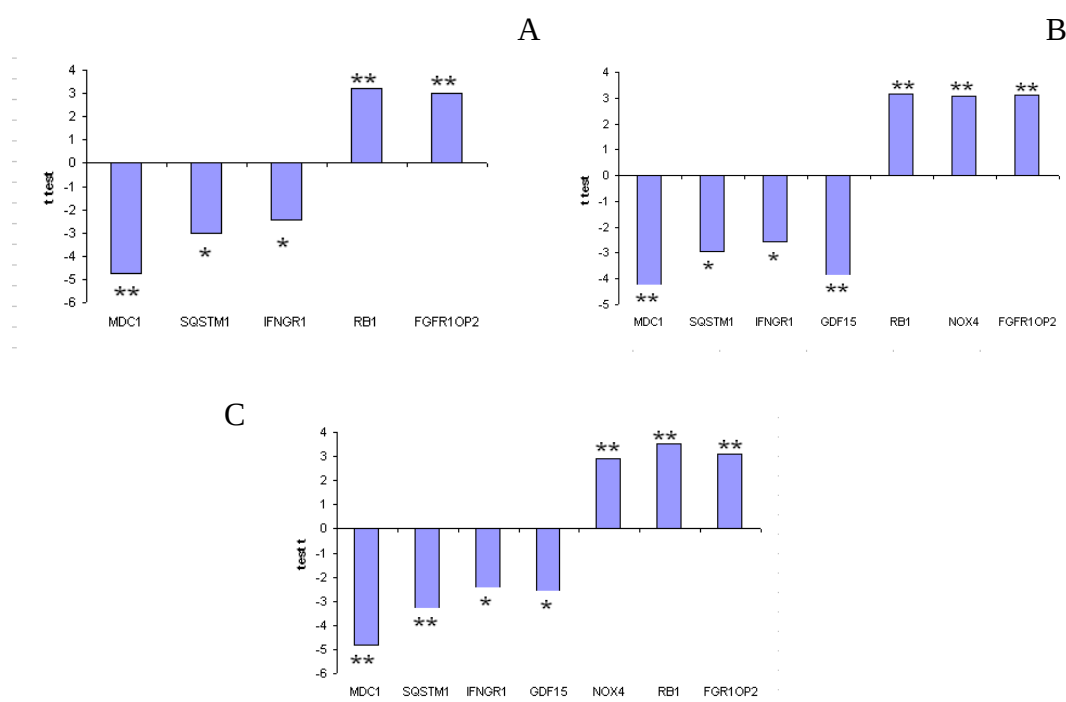


Figure 32. Validation de certains gènes sur d'autres cellules. A. Gènes validés en considérant les quatre lots de fibroblastes du derme, utilisé en transcriptomique additionnés des cellules épithéliales de la glande mammaire. B. Gènes validés en considérant les quatre lots de fibroblastes du derme, utilisé en transcriptomique additionnés des fibroblastes du derme d'un autre fournisseur. C. Gènes validés en considérant la totalité des cellules ensemble. Les statistiques ont été réalisées avec un test t de Student. Une étoile correspond à une p-value < 0,05, deux étoiles correspondent à une p-value < 0,01.

D/ Etude des différences entre les cellules saines et les cellules infectées

Les expériences de transcriptomique ont été réalisées en deux fois. Lors de la première expérience, les lots cellulaires 1 et 2 ont été testés sur trois conditions (i) cellules saines, (ii)

cellules infectées par le vecteur intégratif IN+ et (iii) cellules infectées par le vecteur non intégratifs IN-. En effet, afin de définir les facteurs dérégulés par les étapes précoces de l'infection, nous avons souhaité ajouter l'analyse des cellules saines, non infectées. Lors de la seconde expérience de transcriptomique, sur les lots cellulaires 3 et 4, les cellules saines n'ont pu être ajoutées.

Néanmoins, une analyse préliminaire des signaux induits par les étapes précoces de l'infection a été effectuée. Ainsi une première approche sous Ingenuity Pathway Analysis a révélé une modification des voies de signalisation Wnt, PDGF, PTEN et interféron, une modification des facteurs impliqués dans l'endocytose, le métabolisme, le cytosquelette, le cycle cellulaire ainsi que le transport intracellulaire

IV/ Discussion-Conclusion

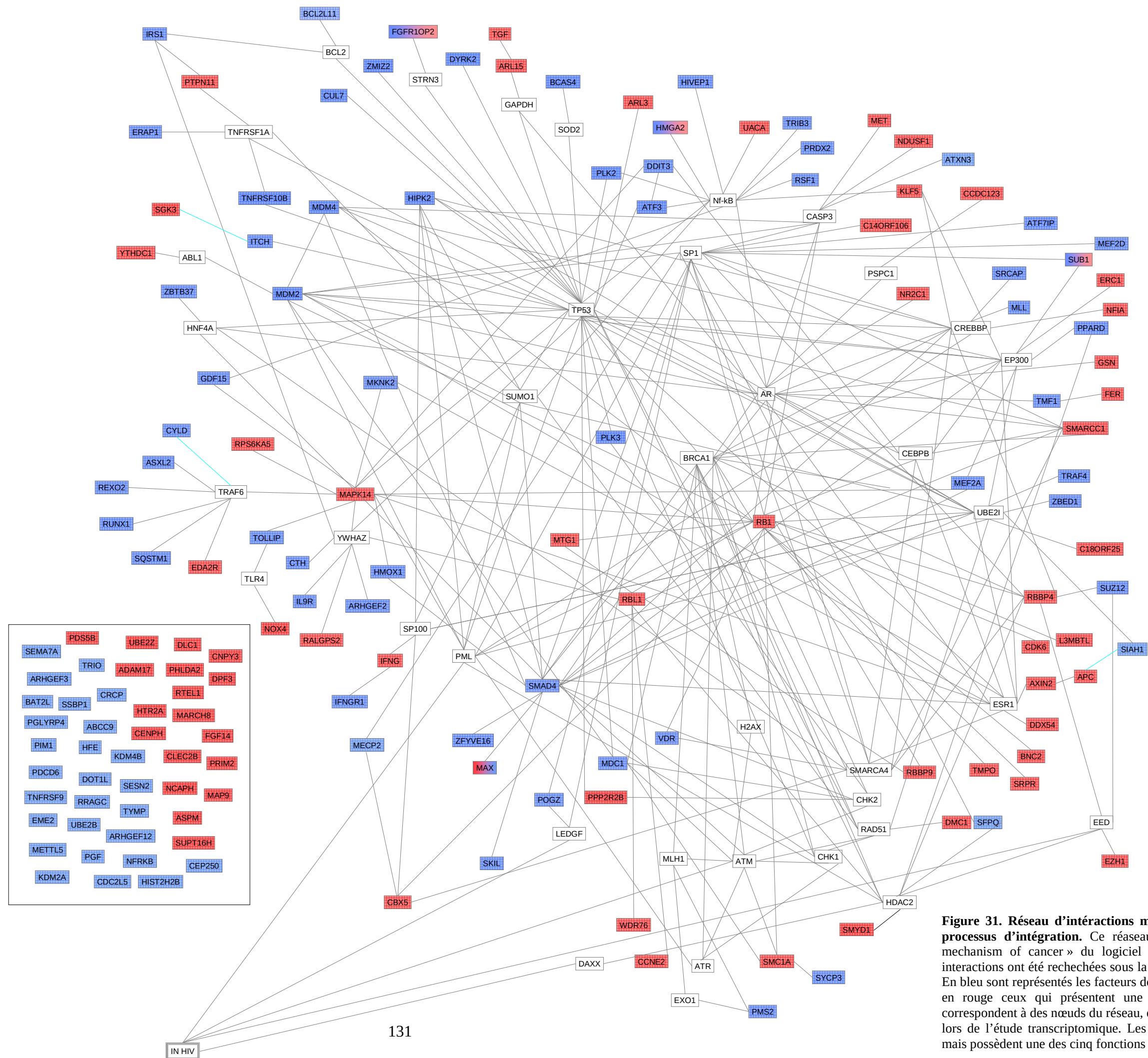
Les analyses transcriptomiques ici présentées ont été menées suivant différents paramètres. Une forte dose virale à tout d'abord été choisie afin d'assurer la détection des signaux induits par l'intégration. Ces derniers ont été extraits par comparaisons entre des conditions intégratives IN+ et non intégratives IN-, permises par des vecteurs lentiviraux. Quatre lots de cellules primaires du derme humain ont été analysés afin de s'affranchir au maximum des variabilités entre les donneurs. Les ARNm des cellules ont été récupérés 13 heures après infection ce qui correspond à une moyenne de 50 copies d'ADN viral intégré et un processus d'intégration en cours. Dans un premier temps, ont été retenus, les facteurs présentant une variation minimale de 1,3 entre les deux conditions IN-/IN+ et pour chacun des lots cellulaires. De cette analyse, 113 facteurs ont été identifiés comme modulés par le processus d'intégration. Par la suite, une seconde analyse a été réalisée, prenant en compte une variation minimale de 1,3 entre les deux conditions IN-/IN+ pour au moins trois lots cellulaires sur les quatre testés. 1002 facteurs ont ainsi été mis en évidence, dont 65% présentent une sous expression après l'intégration. Des analyses approfondies de chaque facteur quant à ses fonctions biologiques et ses interactants protéiques ont été menées et ont permis de mettre en évidence l'implication de cinq processus cellulaires correspondant (i) au remodelage de la chromatine, (ii) à la réparation de l'ADN, (iii) à l'immunité et au stress, (iv) au cycle cellulaire et enfin (v) à la mort cellulaire.

Ces fonctions biologiques présentent des liens notoires avec le processus d'intégration. En effet, l'intégration de l'ADN rétroviral entraîne des cassures doubles brin qui sont prises en charge par les mécanismes de réparation et les facteurs de remodelage de la chromatine. L'intégration, a proprement parlé, implique également les facteurs de modification de la chromatine ainsi qu'un stress cellulaire intense puisqu'elle constitue une perturbation directe

du génome cellulaire. En cas de lésions sur l'ADN, le cycle cellulaire, via l'induction des points de contrôle, est perturbé. Il en est de même pour les processus de mort cellulaire notamment l'apoptose qui présente un lien étroit avec les composants du cycle cellulaire. Enfin, la seule présence d'un ADN non cellulaire intégré peut expliquer la dérégulation des facteurs de l'immunité.

Certains facteurs tendent à dévoiler une stratégie de survie de la part de l'ADN viral. Ainsi, la cycline E et le facteur CYLD semblent indiquer que la progression du cycle cellulaire est favorisée malgré les nombreuses lésions sur l'ADN. De plus, Bim et TRAIL-R2 semblent démontrer une inhibition de l'apoptose. Néanmoins, compte tenu du trop grand nombre de facteurs dont le rôle précis n'est pas connu (i.e. pro ou anti apoptotique par exemple), nous ne pouvons conclure sur la voie exacte empruntée par la cellule à la suite de l'intégration (i.e. cycle cellulaire arrêté par exemple). De plus, les facteurs liés à une stratégie de survie de l'ADN viral ne peuvent pas être distingués de ceux liés à un mécanisme de défense cellulaire.

Néanmoins, au sein des cinq fonctions cellulaires majoritaires mises en évidence, plusieurs facteurs semblent jouer un rôle prépondérant. En effet, DDIT3, APC ou encore HIPK2 se retrouvent au cœur des différentes fonctions biologiques. Leur rôle associé au processus d'intégration devra être approfondi notamment par des expériences d'ARNi et de surexpression. De plus, chaque fonction biologique devra faire l'objet de plus amples analyses. Ainsi, les facteurs de modification de la chromatine comme DOT1L et CBX5 semblent indiquer une forte répression transcriptionnelle, ce que corroborent également les résultats du transcriptome puisque 65% des gènes sont sous régulés. La présence de cette chromatine réprimée pourra être analysée en recherchant notamment les marques qui lui sont spécifiques comme la méthylation de l'ADN ainsi que les modifications de certaines histones. Les perturbations du cycle et de l'apoptose pourront également être détaillées via des analyses en cytométrie de flux. L'immunité et les voies des TLR et de l'interféron γ ainsi que les voies de réparation pourront également faire l'objet d'analyses plus précises en regardant le comportement des autres facteurs impliqués dans ces signalisations soit par RT-qPCR soit par Western Blot. Enfin, le réseau d'interaction moléculaire met en évidence la présence de facteurs clé (en blanc). Ces facteurs ne sont pas issus de l'analyse transcriptomique, ils ne sont donc pas modulés transcriptionnellement par l'intégration. Néanmoins, ils sont la clé de la formation du réseau et correspondent en réalité à des facteurs dont l'activité est modulée de façon post-traductionnelle. Leurs modifications post-traductionnelles devront donc être analysées par western blot. Enfin, les tests sur d'autres types cellulaires devront être poursuivis afin de mettre en évidence des facteurs communs, impliqués dans le processus d'intégration.



Chapitre 3 : analyses protéomiques

I/ Objectifs

Les réponses cellulaires suite à l'intégration d'un ADN étranger peuvent concerner des modifications des ARN mais également des protéines totales. Dans l'esprit de compléter les analyses transcriptomiques nous avons souhaité procéder à une étude protéomique. En effet, la réponse cellulaire peut se caractériser par des modifications post-traductionnelles, l'augmentation ou la diminution de la traduction à partir des ARNm déjà présents, entraînant ainsi des changements dans la composition protéique de la cellule. Dans le but de mettre en évidence des réponses persistantes ou transitoires, immédiates ou plus tardives, trois temps post infection ont été étudiés.

La méthode de séparation sur gel bidimensionnel, permettant dans un premier temps la migration des protéines selon leur point isoélectrique puis dans un second temps selon leur masse moléculaire, a été couplée à une analyse en spectrométrie de masse pour permettre l'identification de protéines impliquées dans la réponse cellulaire suite à l'intégration.

Quelques mises au point ont été nécessaires pour effectuer une séparation optimale des protéines, elles seront présentées en annexe 2. Nous pensions dans un premier temps pouvoir séparer les protéines quelque soit leur pHi mais une séparation correcte n'a finalement été possible qu'entre les pH 4 et 7. Enfin, différentes techniques de coloration, révélant les protéines avec une sensibilité variable et permettant plus ou moins facilement les études de spectrométrie de masse ont été testées. Finalement un kit de coloration spécialement conçu pour les analyses 2D a été sélectionné.

Les analyses protéomiques, menées avec deux lots de cellules primaires et sur trois temps post infection, sont détaillées dans l'article 3. Des premiers essais à une MOI 50 ont été relativement concluants et nous ont permis de travailler à une MOI 2. Une fois les protéines séparées sur gel pour chacune des conditions (IN+/IN-, lot cellulaire, temps post infection), ces derniers ont été scannés puis analysés à l'aide d'un logiciel spécialisé (Image Master™ 2D Platinum Software). Là encore, les conditions intégratives et non intégratives ont été comparées pour isoler les signaux dus à l'intégration, et seuls les facteurs communs aux lots étudiés ont été pris en compte. Les analyses globales ont majoritairement révélé une augmentation de l'expression protéique, à chaque temps post infection. De plus, à l'aide d'une analyse multiple (plusieurs temps post infection analysés conjointement), une réponse persistante entre 13h et 24h et une seconde entre 24h et 72h ont pu être mises en évidence tandis qu'aucun facteur n'a présenté une expression fortement modifiée lors des 3 temps

testés. Parmi les quelques protéines que nous avons analysés en spectrométrie de masse, beaucoup se sont révélées liées au cytosquelette, d'autres au remodelage de la chromatine ou au stress cellulaire.

***2D Separation of cellular proteins disturbed
upon a foreign DNA integration into human
fibroblast cells***

Manuscrit en préparation

2D separation of cellular proteins disturbed upon a foreign DNA integration into human fibroblast cells

Virginie Gay, Karen Moreau, Corinne Ronfort*

Key words : proteomic, HIV, DNA integration.

Université de Lyon, Lyon, France.

INRA, UMR754 Rétrovirus et Pathologie Comparée, IFR128 Biosciences Gerland-Lyon Sud,
Lyon, France.

Université Lyon 1, Lyon, F-69007, France.

Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Marcy L'étoile, F-69000, France.

Ecole Pratique des Hautes Etudes, Lyon, France.

* Corresponding author: ronfort@univ-lyon1.fr. Tel +33 437 287 629. Fax +33 437 287 605.

ABSTRACT

HIV vectors are now commonly used in fundamental research and are new promise for gene therapy. A characteristic of HIV is the stable integration of the double stranded viral DNA into the host chromosome by the integrase viral protein. The aim of our work was to identify cellular modifications induced by a foreign DNA integration into the host genome. We performed a two-dimensional gel electrophoresis proteomic analysis in human primary fibroblast upon HIV vector integration. To analyse the transient or the latent effect of the integration, three times post infection were analyzed. On an average of 775 detected spots per condition, almost 40 spots presented a disturbed expression at each time. Nine of them were identified in mass spectrometry. Proteins of the cytoskeleton and the redox system were identified. These results, in agreement with other studies, bring new knowledges on the vector integration process effects and more generally of all mechanisms involved in response to chromatin injury.

INTRODUCTION

Retroviruses are intracellular parasites that lead to a wide variety of diseases ranging from malignancies to immunodeficiency syndromes. The human immunodeficiency virus (HIV), responsible for the AIDS, is a member of this retroviridae family. HIV-based vectors were defined as a powerful tool for gene therapy. A characteristic of the retroviridae family, responsible for their use in gene therapy, is the stable integration of the double stranded viral DNA into the host chromosome by the integrase viral protein. After integration, and because the host cell is manipulated to produce large quantities of viral RNAs and proteins, many cellular process are disturbed. The viral infection also leads to interaction between viral and host cell proteins and may finally results in profound alteration of host cell functions and morphology.

Several studies, using siRNA, microarray strategies, or proteomic analyses, already described a great number of host cell proteins modulated by the HIV replication in established cell lines (Brass et al., 2008; Chan et al., 2007; Konig et al., 2008; Ringrose et al., 2008; Zhou et al., 2008). Changes in the cellular gene expression or in the proteomic profiles and essential factors for the HIV replication were identified. Protein complexes that regulate proteolysis, DNA damage response, RNA splicing, cytoskeletal regulatory proteins, nuclear transport, ubiquitination and transcription were acknowledged as important modulators of HIV-1 replication.

A recent study generated a relationship network between each viral protein and each essential cellular factor (Brass et al., 2008). Concerning the integration step, a great number of the identified factors are implicated in the DNA repair process such as ATM, ATR, Ku70, Ku80. Indeed, the integration needs the NHEJ enzymes to fill the gap generated in the cellular chromosome by the insertion of the viral DNA. This was already proved by classical molecular analyses (Daniel et al., 2004a; Smith et al., 2008) and verified by recent global studies (Brass et al., 2008; Chan et al., 2007; Imbeault et al., 2009; Konig et al., 2008; Ringrose et al., 2008; Wen et al., 2005; Zhou et al., 2008). Thus, the infection with HIV-1 has been shown to

modulate a large array of host cell factors in established cell lines.

However a lot of works has to been done in order to clarify the role of each identified cellular factors in each step of the retroviral cycle. Moreover, it is likely that many other cellular factors and processes may be exploited by the virus notably during the integration step and the real biological processes disturbed by HIV infection in physiological conditions such as primary cells remains to be established.

Because the HIV integration process is a key step in the infection course and because HIV-based vectors are now promising tools for the treatment of many genetic diseases, it seems important to provide additional information on the possible changes in protein expression profile after some integration events in a physiological background. Thus the aim of our work was to identify cellular modifications induced by a foreign DNA integration into the host genome. In this work, the DNA integration process was performed with HIV-1-based vectors. The detection of cellular factors disturbed by the integration step was deduced by comparison of two signals produced by vectors capable or not to integrate a foreign gene into the host genome. Three times post infection were analysed to identify transient or persistent modifications. To study the protein expression pattern of primary cells transduced with these vectors, 2D analyses were performed. At each time post infection, many proteins were identified as up-regulated by the integration whereas only a few were down-regulated. Further analyses by mass spectrometry permitted to identify eight cellular factors involved in different pathways altered by the integration step.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human epithelial 293T cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% of Foetal Bovine Serum, penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (100

mg/ml). The primary Human Dermal Fibroblast adult cells (HDFa, Invitrogen) were maintained in M106 medium supplemented with 10% of Low Serum Growth Supplement (LSGS, Invitrogen). Cells were maintained in culture according to the manufacturer's instructions.

Vectors production and titration

The pWPXLd and pCMV-dR8.91 plasmids were obtained from Dr D.Trono (University of Geneva, Switzerland). The pWPXLd plasmid encodes the GFP protein under the control of the EF1 α promoter. These sequences are bordered by the HIV LTR with a deleted U3 region (SIN vector). The pWPXLd- Δ prom plasmid was derived from the pWPXLd by deleting the promoter with SalI and SmaI enzymes (Fermentas). The pCMV-dR8.91 plasmid encodes the HIV Gag and Pol as well as the Tat and Rev HIV accessory viral proteins. In the pCMV-dR8.91* plasmid, derived from the pCMV-dR8.91, the sequence of the viral integrase was mutated on residue 152 of the catalytic site by site directed mutagenesis according to the manufacturer instructions (QuickChange® II site-directed mutagenesis, Stratagene). The pCMV-VSV-G plasmid, obtained from Dr D. Nègre (ENS Lyon, France) encodes the envelope glycoprotein of the Vesicular Stomatitis Virus.

The HIV-1-based vectors were produced by calcium phosphate co-precipitation of 3 plasmids into 293T cells as already described (article de cinétique). Briefly, the cells were transiently co-transfected with pWPXLd or pWPXLd- Δ prom, with pCMV-dR8.91 or pCMV-dR8.91* and with pCMV-VSV-G to create integrative IN+/GFP- or the non integrative IN-/GFP- vectors. Cell-free supernatants were harvested 24 hours post transfection, filtered through a 0.45 μ m membrane and stored at -80°C.

Infection

2.10⁵ HDFa cells of the batch number 2 and 4 were seeded in a six-well plate, for a total quantity of 6.10⁵ cells. 24 h later, they were counted and infected with the integrative IN+/GFP- or the non integrative IN-/GFP- vectors at a Multiplicity Of Infection (MOI) of 2. Cells were picked up at different times post infection (13 hours, 24 hours or 72 hours) and equal quantity of cells were infected with one or the other vector was harvested by centrifugation at 180 g for 10 minutes at 4°C and stored at -80°C.

Samples preparation

Cellular pellets were resuspended in 390 μ l of rehydration buffer (7 M Urea, 2% Chaps, 50 mM DTT, 0,2 % Bio-Lytes, 3/10 Ampho-Lytes, 0,001 % Bromophenol blue; Ready Prep 2D Starter Kit Rehydration/Sample Buffer) and the lysis reaction was performed at room temperature overnight

under agitation. Then, cellular lysate was subjected to a centrifugation at 11 000 rpm, for 20 min at room temperature. The supernatant was used for the rehydration of the IPG strip according to the manufacturer instruction. Briefly, the supernatant was loaded into a focusing tray, and then a 17 cm strip of immobilized pH gradient (IPG strip, Biorad) of 4 to 7 was added onto the supernatant. The whole montage was covered with oil to avoid evaporation of the sample. The rehydration was performed passively, overnight at room temperature.

Isoelectric focusing

The first dimension for the separation of the proteins was done by partition depending on the isoelectric pH of each protein. The previously described montage was placed into the IEF protean instrument (Biorad). The IEF was performed at a first low voltage step of 250 volts for 15 min to remove salt ions and charged contaminants, then the voltage was programmed for a rapid ramping to 60 000 V/h. Finally, 500 V was maintained until the run is stopped to prevent diffusion of focused proteins.

Molecular Mass Separation

After the first dimension, strip were harvested and stabilized with a bath of (i) DTT (130 mM) in the equilibration buffer (6 M urea, 2 % SDS, 0,375 M Tris-HHCl pH 8.8, 20 % Glycerol) for 15 min at room temperature and of (ii) IAM (135 mM) in the same equilibration buffer for 15 min at room temperature. While stabilizing the strip, a polyacrylamide gel 20 cm x 20 cm was done at 10 % of acrylamide and recovered with agarose buffer (ReadyPrep™ Overlay Agarose, Biorad). The strip was loaded into the gel, covered by the agarose line. The electrophoresis was performed overnight at 50 V and at room temperature in the running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1 % SDS, pH 8.3).

Coloration

After electrophoresis, gels were colored using the Dodeca™ Silver Stain Kit (Biorad) following the manufacturer instructions. Briefly, the SDS of the running buffer was eliminated with a short rinse in water. Then gels were fixed with ethanol and acetic acid for 1 hour. The fixing solution was removed and replaced by a sensitizing solution for 30 min. Gels were washed three times in water before staining with silver reagent for 30 min. Another step of wash was performed before the developing step that can take from 10 to 30 min. Finally developing reaction was stopped with acetic acid and gels are washed again. After coloration gel can be stored in water at +4°C for a short period.

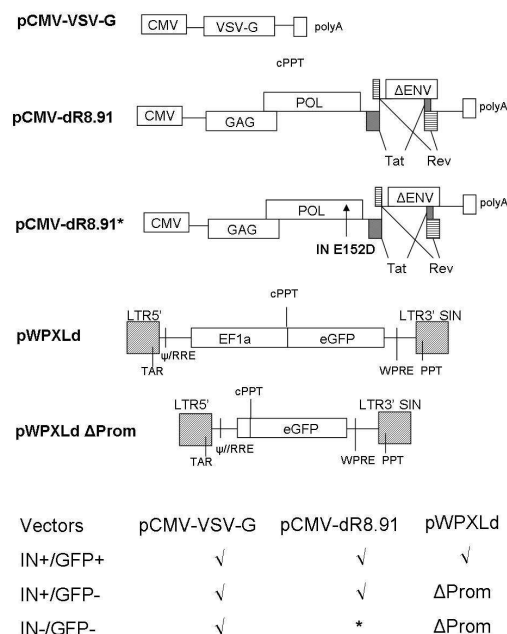


Figure 1. A. Representation of the plasmids used for the HIV-based vectors production. The pCMV-VSV-G plasmid encodes the envelope glycoprotein of the Vesicular Stomatitis Virus. The pCMV-dR8.91 plasmid encodes the HIV Gag and Pol as well as the Tat and Rev HIV accessory viral proteins. In the pCMV-dR8.91* plasmid, derived from the pCMV-dR8.91, the sequence of the viral integrase was mutated on residue 152 of the catalytic site. The pWPXLd plasmid encodes the GFP protein under the control of the EF1 α promoter. These sequences are bordered by the HIV LTR with a deleted U3 region (LTR3' SIN). The pWPXLd- Δ Prom plasmid was derived from the pWPXLd by deleting the promoter

B. Creation of the HIV-based vectors. The HIV-based control vector termed IN+/GFP+ is integration-competent and allows GFP expression. It serves as referent for the viral production. The vector termed IN+/GFP- is similar to the control, except for the promoter EF1 α of the pWPXLd which is deleted abolishing the GFP expression (pWPXLd Δ Prom). The last vector IN-/GFP- also contains a deleted promoter supplemented with a mutation E152D in the integrase gene of the pCMV-dR8.91 (named pCMV-dR8.91* when mutated). This mutation leads to a non integrative vector still able to perform the reverse transcription step. The last two vectors, used for the microarray assays, must be compared to highlight the cellular events only due to the integration process.

Global Analysis

Gels were scanned using LabScanTM Software (Amersham Biosciences). Data were analyzed using the Image MasterTM 2D Platinum Software (Amersham Biosciences). Briefly, total spot present on every gel was detected by the software. Gels were aligned and differences of intensity between integrative and non integrative conditions with a fold change greater than 1,5 were highlighted.

Mass Spectrometry Analysis

Spots of interest were cut from the gel, and subjected to LC/MS/MS mass spectrometry analyses on a Q-star XL instrument.

RESULTS

Creation and validation of the vectors:

The aim of this work was to identify cellular proteins whose expression was modified by the integration step. For this purpose, we had to eliminate the signals due to (i) the expression of the GFP protein and (ii) the early step of the viral infection (the entry of the viral particle, the formation of the active reverse transcription complex and the transport of pre-integration complex to the nucleus).

Several VSV-G pseudo-typed HIV-1-based vectors were produced (figure 1). The first vector IN+/GFP+ serves as a control; it encodes the GFP under the control of an active promoter. Then, two HIV-1 based vectors were created, both unable to express the GFP protein due to a deleted promoter, named IN+/GFP- and IN-/GFP-. These vectors differ by a single mutation on the residue E152 of

the catalytic site of the integrase viral protein. This unique mutation allows every viral step from the entry to the nucleus transport but avoids the integration process for the IN-/GFP- vector (Lu et al).

The vectors were analysed by flow cytometry to check the GFP expression. 293T cell were infected and picked up 24h post infection for FACS analyses. This experiment confirmed that IN+/GFP- and IN-/GFP- vectors were negative for the expression of the protein whereas the control IN+/GFP+ was not. It also allowed the determination of the viral titre of the control vector, corresponding to $1,8.10^7$ TU/ml.

Then, to assess the infection by GFP-vectors, total viral DNA forms were analyzed by qPCR and to assess the integration events a nested qPCR on the integrated viral forms was performed. 293T cells were infected (i) with the control vector at MOI 1 (based on the control vector titre) or (ii) with different amount of IN+/GFP- and IN-/GFP- vectors. Cells were picked up 24h post infection and total DNA was extracted and analysed by qPCR.

First, all vectors were positive for total viral DNA detection, confirming the efficiency of the transduction. Secondly, both IN+/GFP+ and IN+/GFP- vectors were positive for integrated DNA detection whereas IN-/GFP- was not. Thus, confirming the mutation on the integrase protein. Finally, this experiment was used to titre the IN+/GFP- and IN-/GFP- vectors supernatants by comparison with the control vector. We concluded that IN+/GFP- and IN-/GFP- were respectively 1,6 and 1,25 fold more concentrated than the control,

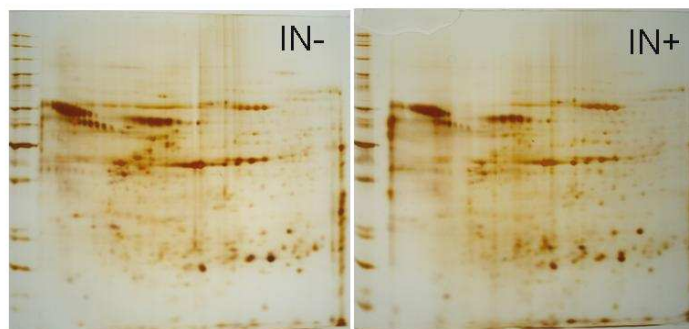


Figure 2. 2D separation of proteins from cells infected with the integrative vector (IN+) or the non integrative vector (IN-). 6,6. 10⁵ primary cells from the batch 4 were infected with either the non integrative or the integrative vector at MOI 2. Cells were picked up 72h post infected, total proteins were extracted and subjected to two dimensional separation on a pH 4-7 range. Gels were staining using the Dodeca™ Silver Stain Kit. A ladder was added as control for the second migration. We can observe that the global profiles of the total proteins are similar between both conditions. Nevertheless, few spots are differentially expressed in the two experiments corresponding to cellular response induced by the vector integration.

corresponding to 2,88.10⁷ TU/ml, and 2,25.10⁷ TU/ml.

2D separation

The global protein content was analysed using the 2D dimension separation method. Briefly, proteins are first separated depending on their isoelectric pH, before being separated by their molecular mass. Primary human dermal fibroblasts were infected with the integrative or the non integrative vectors at an MOI 2 considering their previously defined titres. Cells were harvested at three different times post infection 13 h, 24 h and 72 h to observe if the changes in proteins content are constant or transient during the integration course. Number of extracted cells was normalized for each assay, thus the same quantity of cell was extracted and analyzed for IN+ and IN- paired conditions. Depending on the experiments between 6.10⁵ and 8.10⁵ cells were analyzed. After different assays, separation between pH 4 and 7 were selected for giving the best results. Figure 2 shows an example of typical result. It represent the analyses of the cell batch number 4, infected at an MOI of 2 and extracted after 72h of infection. We can observe that global amount of cellular proteins is similar in each condition and that most of the time proteins are well separated and expressed allowing identification by mass spectrometry. The same experiment was repeated on cell batch 4, at 13h and 24h post infection and on cell batch 2 at 13h, 24h and 72h post infection. Similar results were obtained.

Global Analysis

After coloration, gels were scanned using LabScan Software and analyzed with the Image Master™ 2D Platinum Software. Number of spots detected in each gels are summarized in table 1. We can observe that the same number of spots was detected for each analysis, validating the experiment repetition. Only the study of cell batch 4 at 24h post infection give lower number of spots, it could be explained by impairment in the coloration procedure. Once every spot was detected, gels were aligned and grouped to allow

comparisons considering a fold change of 1.5. A first analysis consisted in the comparison of IN+ and IN- condition for both cell batches at a given time post infection. As showed in table 2, 36, 28 and 44 proteins were annotated as up-regulated after the integration process at 13h, 24 and 72h respectively whereas only 4, 2 and 3 proteins were noted as down-regulated at the same times. These data suggest that the cellular response to the integration process mainly correlates with an increase of the expression of some proteins all along the integration course.

To get further in our analyses, the same study was realized on time post infection grouped by pair (13h+24h / 13h+72h / 24h+72h) or all together (13h+24h+72h). We identify 28 up-regulated proteins common to times 13 and 24 versus only 3 down-regulated. For the times 24h and 72h, 46 proteins were commonly up-regulated versus only 3 down-regulated. A less number of proteins was found to be common between 13h and 72h post infection (6 up-regulated and 1 down) and finally no commonly disturbed proteins were found between the three times post infection taken together. These results suggest that a part of the cellular response is transient, only observable at a given time post infection whereas the other part of the response seems to be more constant during the integration course. Nevertheless, no commonly disturbed proteins were found for the three times tested but only for paired analysis (13h+24h and 24h+72h) revealing maybe a switch in the cellular response around 24h post infection.

Mass spectrometry identification

Among all the spots detected as disturbed after the integration process, nine were selected for identification in mass spectrometry. The choice was motivated by (i) a fold change greater than 1.5 between integrative and non integrative conditions, (ii) a sufficient intensity to allow mass spectrometry analyses and (iii) a position in the gel allowing the isolation of the protein. Selected spots were picked up from different times post transduction. Indeed, four proteins are only found as disturbed in one time post transduction whereas spots five

Hour post infection	13		24		72	
donnor	IN+	IN-	IN+	IN-	IN+	IN-
4	617	604	290	394	532	539
2	582	595	471	469	594	511

Table 1. Total number of spots detected in each condition. Two donors of fibroblasts primary cells were tested and infected with either the integrative (IN+) or the non integrative vector (IN-) at MOI 2. Cells were picked up at different times post infection, 13h, 24h and 72h, and total proteins were extracted and subjected to two dimensional separations on a pH 4-7 range. Data were analyzed using the Image Master™ 2D Platinum Software. The total number of detected spots is similar for each condition. Only the experiment on cell batch 4 analyzed at 24h presented lower quantity of detected proteins, probably due to impairment during the coloration procedure.

Time of analyse	number of up regulated proteins	number of down regulated proteins
13	36	4
24	28	2
72	44	3
13+24	28	3
13+72	6	1
24+72	46	3
13+24+72	0	0

Table 2. Analysis of the 2D separation experiments. In every cases, IN+ and IN- conditions for both cell batches were compared using the Image Master™ 2D Platinum Software considering a fold change of 1.5. First each time post infection was analyzed separately. A great majority of the proteins detected as deregulated are overexpressed after the integration of the vector. The same study was realized on time post infection grouped by pair (13h+24h / 13h+72h / 24h+72h) or all together (13h+24h+72h). Here again more over expressed proteins are commonly found in times 13h and 24h post infection and 24h and 72h post infection. A less number of proteins was found to be common between 13h and 72h post infection whereas no commonly deregulated proteins were found between the three times post infection taken together.

Time of identification	name	function	link with HIV
13h	Protein disulfide-isomerase	formation, breakage and rearrangement of disulfide bonds / cell redox homeostasis	gp120
24h+72h	Superoxide dismutase	DNA fragmentation in apoptosis / activation of MAPK / double strand break repair /	gp120/ gp160 / tat
13h+72h	Heat shock proteine	T cells activation / activation of caspases / protein folding / regulation of apoptosis / TLR pathway /	gp41/ gag / IN
24h+72h	Vimentine	intermediate filaments	gp120/ / vif / PR
72h	Actin	MLL5 complex / Nu4 HACT complex / cytoskeleton	gp41 / nef / rev / tat / MA / NC / RT / vpr
13h+24h	Tubulin	microtubules	gp120 / rev / tat
24h	Lamin	nuclear lamina /	rev / tat / vpr
24h	PARK7	oxidative stress	/

Table 3. Mass spectrometry identification. Spots previously detected using the Image Master™ 2D Platinum Software as deregulated after the vector integration are selected and extracted from the gel for a mass spectrometry identification. Nine spots were selected if they present (i) a sufficient intensity to allow mass spectrometry analyses, (ii) a position in the gel allowing the isolation of the protein, and (iii) a fold change greater than 1.5 between integrative and non integrative conditions. Selected spots were picked up from different times post transduction, either corresponding to protein only found as deregulated in one time post infection or to protein deregulated at several times post infection. Only one down-regulated protein (Protein disulphide isomerase) was selected whereas all the eight other spots correspond to up regulated factors. The corresponding bio function of each protein is mentioned and we can also notice that among the eight proteins, seven are already linked to an HIV protein.

correspond to protein disturbed at several times post transduction. Only one down-regulated protein was selected (protein disulfide isomerase) whereas

all the eight other spots correspond to up regulated factors.

The protein disulfide isomerase, was identified as down disturbed at 13h whereas both

lamin and PARK7 proteins were found to be up regulated at 24h. Among the nine selected spots only two identified as a redundant protein corresponding to the β -actin and γ -actin, only disturbed at 72h. Concerning the paired analysis, another structural protein, the tubulin, was identified as up regulated both at 13h and 24h whereas vimentin and superoxide dismutase are up regulated at 24h and 72h. Finally, one protein identified as the heat shock protein HSP60 was found up regulated at 13h and 72h but not at 24h post transduction. Among the protein identified, one is involved in the protein homeostasis (protein, disulfide isomerase), two are implicated in the regulation of apoptosis (superoxide dismutase and HSP60), two are linked to the chromatin remodelling or the DNA repair (Actin and superoxide dismutase), two are related to a cellular response to stress (HSP60 and PARK7) and finally four are implicated in the cell structure (actin, vimentin, lamin and tubulin). We can also notice that among the eight proteins, seven are already linked to an HIV protein.

DISCUSSION

We studied the proteomic pattern changes in human primary fibroblasts after the integration of an HIV-based vector. Several times post infection were analyzed and revealed only subtle changes in the total protein content of the infected cell, as already observed in other studies (Carlson et al., 2004; Chan et al., 2007; Chan et al., 2009; Coiras et al., 2006; Ringrose et al., 2008; Wang et al., 2008). On an average of 775 detected spots per condition, 40, 30 and 47 were disturbed at 13h, 24 and 72h respectively.

Among the nine spots analyzed by mass spectrometry, four are related to the cellular cytoskeleton (actin γ , actin β , vimentin, tubulin $\alpha 6$), four plays are linked to RE or oxidative stress (PARK7, superoxide dismutase and disulfide isomerase and HSP60), and two are linked to the nucleus and chromatin structuration (Lamin A/C and actin β). A kinetic analysis of the integration process was performed (data not shown) and suggests that the deregulation of a protein expression at 13h post infection demonstrates its role during the early phase of the integration. Its role during the middle/ending phase of the integration process corresponds to 24h whereas 72h post infection correlates with the post-integration phase.

Structural proteins are modulated by the foreign DNA integration

The vimentin protein is a major constituent of intermediate filaments and was showed as up-expressed at both 24h and 72h post infection

probably meaning that it does not moved during the early phase of the infection. Another proteomic study of cellular proteins disturbed after HIV infection also revealed this protein (Carlson et al., 2004). Vimentin was also found in studies concerning other viral infections. Indeed, the protein was early showed to be processed during adenovirus infection (Belin and Boulanger, 1987) and its over expression was observed during HCV course (Singaravelu et al.) and influenza virus infection (Ohman et al., 2009).

Three other proteins of the cytoskeleton were identified as over expressed either during integration (13h and 24h for tubulin) or after the process (72h for actin β and γ). Actins and tubulin are notably responsible for the cellular organelles organization in the cytoplasm and chromosomes segregation during the cell division process (Hall, 2009; Kavallaris). All were already identified as factors involved in the HIV infection. Indeed, many global analyses performed on RNA or proteins revealed these factors (Carlson et al., 2004; Coiras et al., 2006; Li et al., 2009a; Wang et al., 2008; Wu et al., 2008). More precisely, actin was early found as an interactant of the RT complex (Bukrinskaya et al., 1998) and cleaved by the HIV protease (Adams et al., 1992). Finally, actin was found incorporated in HIV virions during the budding process (Denard et al., 2009; Khan et al., 2007). Other viral infections were proved to be linked to either or both actin and tubulin proteins. Indeed, both were also detected as over expressed proteins during the Influenza infection (Ohman et al., 2009) and the HTL-1 cell to cell transmission (Mazurov et al.), whereas β and α tubulin were linked to the HCV infection (Roohvand et al., 2009).

The up modulation of the three major components of the cytoskeleton may be due to a global modification of the intracellular trafficking. Indeed intracellular trafficking is tightly dependant on the cytoskeleton components as vesicles and proteins used the cytoskeleton to move across the cell. We can speculate that the disturbance in the trafficking is provoked by a profound perturbation of transcription and downstream events of translation, leading to the unusual production of proteins that have to be redistributed into other cellular compartments (i.e. plasma membrane for example) maybe to ensure the cell survival after the integration process. But disturbance of the trafficking may also be a direct result of a need to rapidly relocalize some already existing cellular factors to ensure the foreign DNA integration and/or the cellular defence.

β -actin is also a component of the remodelling SWI/SNF complex and its relationship with HIV Tat protein was demonstrated by co-immunoprecipitation assays (Mahmoudi et al., 2006). β -Actin was also correlated to the AcMNPV

infection (Fujita et al., 2006). Another nuclear structural protein was identified. The lamina is a complex network of nuclear proteins called lamina and nuclear proteins linked to them. Through this nuclear membrane the nuclear pores cross, regulating the nucleus access to cellular proteins. Lamins proteins exist in two forms A and B. The LMNA gene give rise to both lamin A and C precursors and if found over expressed at 24h post infection, probably revealing its role during the integration process but not in the early phase. The lamina seems to play a major role in the chromatin organization and DNA replication, seeing linked to the DNA repair process and the cell cycle progression (Andres and Gonzalez, 2009; Broers and Ramaekers, 2004; Broers et al., 2006; Lees-Miller, 2006). Lamina is also composed of BAF protein, identified as a HIV co-factor (Chen and Engelman, 1998; Lin and Engelman, 2003). Moreover, BAF was proved to directly interact with lamni A/C, histons cores, HMGA1, Lamin B2, Ledgf/p75 and γ -actin (Montes de Oca et al., 2009). Among these proteins, Ledgf/p75 is a well-known co-factor of the HIV integrase, responsible for the targeting of the PIC to the chromatin (Busschots et al., 2007; Levin et al., ; Merad et al., 2009). HMGA1 and actin (as already mentioned) was both found in relationship with HIV proteins (Adams et al., 1992; Bukrinskaya et al., 1998; Farnet and Bushman, 1997; Mahmoudi et al., 2006). Global HIV infection analysis revealed lamin A/C or B proteins (Li et al., 2009a; Wang et al., 2008) and other viruses as the CMV and the Cytoplasmique Vaccina Virus seem to use them during their replication cycle (Camozzi et al., 2008; Oh and Broyles, 2005).

Both β -actin and LMNA/C are linked to the cytoskeleton, itself linked to the chromosomes organization in the nucleus. Because the integration process directly altered the structure of the chromatin and required chromatin remodelling, it is possible that the structural proteins identified are required for the chromosomes movement and re-organization among the nucleus structure to allow the integration of the foreign DNA.

Factors linked to the cellular stress are modulated by the foreign DNA integration

The endoplasmic reticulum, a complex organelle of the cell, responsible for the correct folding and folding control of the cellular proteins, is extremely sensitive to every cellular change. Indeed perturbation in calcium homeostasis, nutriments deprivation, misfolded proteins, glucose deprivation, pathogens infection and variation in the redox status are causes of ER stress. One of the most known ER stress is induced by the non-proper proteins folding and is called UPR for Unfolded Proteins Response. This stress leads to the induction of proteins chaperones which role is to

prevent protein aggregation and control their correct folding. If this process is not successful, cell finally enters in a calcium dependent apoptosis through caspase 12 activation (Miao and St Clair, 2009; Schroder and Kaufman, 2005; Zhang and Kaufman, 2006). Moreover, protein folding include disulfide bonds formation, a PDI dependant process that may directly produce ROS and cause oxidative stress. In our study, four proteins were related to ER or oxidative stress (Tu and Weissman, 2004).

The disulfide isomerase protein PDI is the only one down regulated protein studied (13h p.i. only). It acts on the disulfide bonds and was already linked to the HIV gp120 proteins (Billington et al., 2007; Ou and Silver, 2006). Unfortunately, our system does not posses the gp120 and only focus on the integration process. As PDI is directly responsible for SS bonds formation in the ER thus directly linked to ROS formation, we can speculate that the integration may have provoked an early oxidative stress and that its solving primarily includes the down modulation of every ROS producers including the PDI. But as PDI is essential for the correct folding of the protein, its down modulation can not be persistence as it can provokes the induction of an UPR stress, in agreement with the induction of chaperons.

The superoxide dismutase protein, also known as Cu-SOD, is directly responsible for the degradation of Reactive Oxygen Species ROS during a cellular oxidative stress. It is also linked to the apoptosis and the MAPK signalling pathway (Miao and St Clair, 2009). Some studies showed that HIV infection is tightly related to cellular oxidative stress induction and ROS production (Aksenov et al., 2001; Mollace et al., 2002). A redox system modification after retrovirus infection was also observed in many other publications (Chan et al., 2009; Masutani et al., 2005; Suresh et al., 2009; Westendorp et al., 1995; Yoshimura and Luo, 2007). Nevertheless, other studies obtained opposite results. Indeed, Westendorp demonstrated that Tat HIV protein altered the redox system by inhibiting the Mn-SOD but nothing was demonstrated for the Cu-SOD (Westendorp et al., 1995) Moreover, HIV infected patients analyzed by Suresh also presented deregulation in the redox system except that it was correlated to a SOD reduction without any precision on the nature of the SOD protein tested. Authors noted that reports were already conflicting on this subject (Suresh et al., 2009) even if all were in agreement with the redox system modification. We obtained an over expression of the superoxide dismutase both at 24h and 72h post infection what may be linked to an over production of ROS after the integration process.

To underline our result, two chaperones were identified as over expressed. The HSP60 is a

major key in the prevention of protein aggregation in stress conditions. This protein was already identified as a direct interactant of the HIV integrase (Parissi et al., 2001) and also underlined in other 2D studies on Influenza infection (Ohman et al., 2009) and HBV (Liu et al., 2009). Surprisingly, the variation of its expression was not detected at 24h post infection. We can speculate that each chaperon is activated at a precise time indeed, at 24h post infection the role of the HSP60 could be replaced by the PARK7, only found at 24h post infection. PARK7 is also implicated in the redox system and the cell death. A direct interaction with DAXX was proved using a global PARK7 interactants screen (Junn et al., 2005), validated our analyses. Indeed, DAXX was also identified as an HIV integrase interactant (Huang et al., 2008).

Because the integration process directly induced stress on the chromatin, we can suppose that ER/oxidative stress are a direct consequence of global cellular disturbances. The solving of such stress includes the down modulation of ROS induction, the expression of chaperons and degradation of ROS by specialized enzymes.

To conclude, the integration of a foreign DNA, here provoked by the insertion of a viral vector, leads to subtle changes in the protein pattern of the cell. As expected, global changes seem to affect every cellular function. In our study, we observed that protein expression was preferentially over regulated during all the integration course (13h and 24h) and even later (72h). Among protein identified by mass spectrometry, two major cellular functions were underlined, the cytoskeleton and the ER/oxidative stress. To conclude on these promising results, more studies are needed to identify if these proteins are due to cellular response in front of the integration stress or if they part of viral cofactors.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research grants from the Institut National de la Recherche Agronomique and from The Region Rhône-Alpes (Emergence grants). The authors are grateful to the technical platform "Analyse Génétique et Vectorologie and to Dr D. Negre for assistance in vector production and for the pCMV-VSV-G plasmid. We also thank Dr D.Trono (University of Geneva, Switzerland) for providing us the pWPXLd and pCMV-dR8.91 plasmids. We are grateful to the technical qPCR and flow cytometry platforms of the IFR128, Gerland BioSciences Lyon Sud. We also thank Audrey Berger and Claudine Moratal for their help during experiments. V. Gay is supported by a PhD

grant from the cluster 10 Infectiology of Rhone-Alpes Region.

REFERENCES

- Adams, L.D., Tomasselli, A.G., Robbins, P., Moss, B. and Heinrikson, R.L., 1992. HIV-1 protease cleaves actin during acute infection of human T-lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 291-5.
- Aksenov, M.Y., Hasselrot, U., Bansal, A.K., Wu, G., Nath, A., Anderson, C., Mactutus, C.F. and Booze, R.M., 2001. Oxidative damage induced by the injection of HIV-1 Tat protein in the rat striatum. *Neurosci Lett* 305, 5-8.
- Andres, V. and Gonzalez, J.M., 2009. Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J Cell Biol* 187, 945-57.
- Belin, M.T. and Boulanger, P., 1987. Processing of vimentin occurs during the early stages of adenovirus infection. *J Virol* 61, 2559-66.
- Billington, J., Hickling, T.P., Munro, G.H., Halai, C., Chung, R., Dodson, G.G. and Daniels, R.S., 2007. Stability of a receptor-binding active human immunodeficiency virus type 1 recombinant gp140 trimer conferred by intermonomer disulfide bonding of the V3 loop: differential effects of protein disulfide isomerase on CD4 and coreceptor binding. *J Virol* 81, 4604-14.
- Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J. and Elledge, S.J., 2008. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319, 921-6.
- Broers, J.L. and Ramaekers, F.C., 2004. Dynamics of nuclear lamina assembly and disassembly. *Symp Soc Exp Biol*, 177-92.
- Broers, J.L., Ramaekers, F.C., Bonne, G., Yaou, R.B. and Hutchison, C.J., 2006. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev* 86, 967-1008.
- Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A. and Stevenson, M., 1998. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med* 188, 2113-25.
- Busschots, K., Voet, A., De Maeyer, M., Rain, J.C., Emiliani, S., Benarous, R., Desender, L., Debyser, Z. and Christ, F., 2007. Identification of the LEDGF/p75 binding site in HIV-1 integrase. *J Mol Biol* 365, 1480-92.
- Camozzi, D., Pignatelli, S., Valvo, C., Lattanzi, G., Capanni, C., Dal Monte, P. and Landini, M.P., 2008. Remodelling of the nuclear lamina during human cytomegalovirus infection: role of the viral proteins pUL50 and pUL53. *J Gen Virol* 89, 731-40.
- Carlson, K.A., Ciborowski, P., Schellpeper, C.N., Biskup, T.M., Shen, R.F., Luo, X., Destache, C.J. and Gendelman, H.E., 2004. Proteomic fingerprinting of HIV-1-infected human monocyte-derived macrophages: a preliminary report. *J Neuroimmunol* 147, 35-42.
- Chan, E.Y., Qian, W.J., Diamond, D.L., Liu, T., Gritsenko, M.A., Monroe, M.E., Camp, D.G., 2nd, Smith, R.D. and Katze, M.G., 2007. Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1-infected CD4+ cell proteome: dysregulated cell cycle progression and nuclear transport coincide with robust virus production. *J Virol* 81, 7571-83.
- Chan, E.Y., Sutton, J.N., Jacobs, J.M., Bondarenko, A., Smith, R.D. and Katze, M.G., 2009. Dynamic host energetics and cytoskeletal proteomes in human immunodeficiency virus type 1-infected human primary CD4 cells: analysis by multiplexed label-free mass spectrometry. *J Virol* 83, 9283-95.
- Chen, H. and Engelman, A., 1998. The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15270-4.
- Coiras, M., Camafeita, E., Urena, T., Lopez, J.A., Caballero, F., Fernandez, B., Lopez-Huertas, M.R., Perez-Olmeda, M. and Alcamí, J., 2006. Modifications in the human T cell proteome

- induced by intracellular HIV-1 Tat protein expression. *Proteomics* 6 Suppl 1, S63-73.
- Daniel, R., Greger, J.G., Katz, R.A., Taganov, K.D., Wu, X., Kappes, J.C. and Skalka, A.M., 2004. Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the nonhomologous end joining repair pathway. *J Virol* 78, 8573-81.
- Denard, J., Rundwasser, S., Laroudie, N., Gonnet, F., Naldini, L., Radrizzani, M., Galy, A., Merten, O.W., Danos, O. and Svinartchouk, F., 2009. Quantitative proteomic analysis of lentiviral vectors using 2-DE. *Proteomics* 9, 3666-76.
- Farnet, C.M. and Bushman, F.D., 1997. HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* 88, 483-92.
- Fujita, R., Matsuyama, T., Yamagishi, J., Sahara, K., Asano, S. and Bando, H., 2006. Expression of Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus genes in mammalian cells and upregulation of the host beta-actin gene. *J Virol* 80, 2390-5.
- Hall, A., 2009. The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28, 5-14.
- Huang, L., Xu, G.L., Zhang, J.Q., Tian, L., Xue, J.L., Chen, J.Z. and Jia, W., 2008. Daxx interacts with HIV-1 integrase and inhibits lentiviral gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 241-5.
- Imbeault, M., Ouellet, M. and Tremblay, M.J., 2009. Microarray study reveals that HIV-1 induces rapid type-I interferon-dependent p53 mRNA up-regulation in human primary CD4+ T cells. *Retrovirology* 6, 5.
- Junn, E., Taniguchi, H., Jeong, B.S., Zhao, X., Ichijo, H. and Mouradian, M.M., 2005. Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9691-6.
- Kavallaris, M., Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer* 10, 194-204.
- Khan, M.A., Goila-Gaur, R., Opi, S., Miyagi, E., Takeuchi, H., Kao, S. and Strebel, K., 2007. Analysis of the contribution of cellular and viral RNA to the packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions. *Retrovirology* 4, 48.
- Konig, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T.L., Bonamy, G.M., Irelan, J.T., Chiang, C.Y., Tu, B.P., De Jesus, P.D., Lilley, C.E., Seidel, S., Opaluch, A.M., Caldwell, J.S., Weitzman, M.D., Kuhen, K.L., Bandyopadhyay, S., Ideker, T., Orth, A.P., Miraglia, L.J., Bushman, F.D., Young, J.A. and Chanda, S.K., 2008. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135, 49-60.
- Lees-Miller, S.P., 2006. Dysfunction of lamin A triggers a DNA damage response and cellular senescence. *DNA Repair (Amst)* 5, 286-9.
- Levin, A., Rosenbluh, J., Hayouka, Z., Friedler, A. and Loyer, A., 2006. Integration of HIV-1 DNA is regulated by interplay between viral rev and cellular LEDGF/p75 proteins. *Mol Med* 16, 34-44.
- Li, Q., Smith, A.J., Schacker, T.W., Carlis, J.V., Duan, L., Reilly, C.S. and Haase, A.T., 2009. Microarray analysis of lymphatic tissue reveals stage-specific, gene expression signatures in HIV-1 infection. *J Immunol* 183, 1975-82.
- Lin, C.W. and Engelman, A., 2003. The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *J Virol* 77, 5030-6.
- Liu, K., Qian, L., Wang, J., Li, W., Deng, X., Chen, X., Sun, W., Wei, H., Qian, X., Jiang, Y. and He, F., 2009. Two-dimensional blue native/SDS-PAGE analysis reveals heat shock protein chaperone machinery involved in hepatitis B virus production in HepG2.2.15 cells. *Mol Cell Proteomics* 8, 495-505.
- Mahmoudi, T., Parra, M., Vries, R.G., Kauder, S.E., Verrijzer, C.P., Ott, M. and Verdin, E., 2006. The SWI/SNF chromatin-remodeling complex is a cofactor for Tat transactivation of the HIV promoter. *J Biol Chem* 281, 19960-8.
- Masutani, H., Ueda, S. and Yodoi, J., 2005. The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1, 991-8.
- Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., Lloyd, P. and Derse, D., Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS Pathog* 6, e1000788.
- Merad, H., Porumb, H., Zargarian, L., Rene, B., Hobaika, Z., Maroun, R.G., Mauffret, O. and Fermandjian, S., 2009. An unusual helix turn helix motif in the catalytic core of HIV-1 integrase binds viral DNA and LEDGF. *PLoS One* 4, e4081.
- Miao, L. and St Clair, D.K., 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med* 47, 344-56.
- Mollace, V., Salvemini, D., Riley, D.P., Muscoli, C., Iannone, M., Granato, T., Masuelli, L., Modesti, A., Rotiroli, D., Nistico, R., Bertoli, A., Perno, C.F. and Aquaro, S., 2002. The contribution of oxidative stress in apoptosis of human-cultured astroglial cells induced by supernatants of HIV-1-infected macrophages. *J Leukoc Biol* 71, 65-72.
- Montes de Oca, R., Shoemaker, C.J., Gucek, M., Cole, R.N. and Wilson, K.L., 2009. Barrier-to-autointegration factor proteome reveals chromatin-regulatory partners. *PLoS One* 4, e7050.
- Oh, J. and Broyles, S.S., 2005. Host cell nuclear proteins are recruited to cytoplasmic vaccinia virus replication complexes. *J Virol* 79, 12852-60.
- Ohman, T., Rintahaka, J., Kalkkinen, N., Matikainen, S. and Nyman, T.A., 2009. Actin and RIG-I/MAVS signaling components translocate to mitochondria upon influenza A virus infection of human primary macrophages. *J Immunol* 182, 5682-92.
- Ou, W. and Silver, J., 2006. Role of protein disulfide isomerase and other thiol-reactive proteins in HIV-1 envelope protein-mediated fusion. *Virology* 350, 406-17.
- Parissi, V., Calmels, C., De Soultrait, V.R., Caumont, A., Fournier, M., Chaignepain, S. and Litvak, S., 2001. Functional interactions of human immunodeficiency virus type 1 integrase with human and yeast HSP60. *J Virol* 75, 11344-53.
- Ringrose, J.H., Jeeninga, R.E., Berkhout, B. and Speijer, D., 2008. Proteomic studies reveal coordinated changes in T-cell expression patterns upon infection with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 82, 4320-30.
- Roohvand, F., Maillard, P., Lavergne, J.P., Boulant, S., Walic, M., Andreo, U., Goueslain, L., Helle, F., Mallet, A., McLauchlan, J. and Budkowska, A., 2009. Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein. *J Biol Chem* 284, 13778-91.
- Schroder, M. and Kaufman, R.J., 2005. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569, 29-63.
- Singaravelu, R., Blais, D.R., McKay, C.S. and Pezacki, J.P., Activity-based protein profiling of the hepatitis C virus replication in Huh-7 hepatoma cells using a non-directed active site probe. *Proteome Sci* 8, 5.
- Smith, J.A., Wang, F.X., Zhang, H., Wu, K.J., Williams, K.J. and Daniel, R., 2008. Evidence that the Nijmegen breakage syndrome protein, an early sensor of double-strand DNA breaks (DSB), is involved in HIV-1 post-integration repair by recruiting the ataxia telangiectasia-mutated kinase in a process similar to, but distinct from, cellular DSB repair. *Virol J* 5, 11.
- Suresh, D.R., Annam, V., Pratibha, K. and Prasad, B.V., 2009. Total antioxidant capacity—a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. *J Biomed Sci* 16, 61.
- Wang, T., Gong, N., Liu, J., Kadiu, I., Kraft-Terry, S.D., Mosley, R.L., Volsky, D.J., Ciborowski, P. and Gendelman, H.E., 2008. Proteomic modeling for HIV-1 infected microglia-astrocyte crosstalk. *PLoS One* 3, e2507.

III/ Discussion-conclusion

Les analyses protéomiques développées ici ont été menées afin de compléter les analyses transcriptomiques précédentes. Dans cette première approche, deux lots de cellules primaires ont été étudiés, sur trois temps post infection dans le but de mettre en évidence des réponses persistantes ou transitoires, immédiates ou plus tardives. Les analyses ont également été réalisées à une MOI beaucoup plus faible. Nous avons choisi d'étudier la composition protéique par séparation bidimensionnelle sur gel. Comme pour le transcriptome, les signaux dus à l'intégration ont été isolés par comparaison entre des conditions intégratives et non intégratives. Une fois les gels scannés et analysés sur Image MasterTM 2D Platinum, nous avons pu faire ressortir les facteurs communs aux lots cellulaires étudiés et différentiellement exprimés avec une variation minimale de 1,5. Majoritairement, nous avons constaté une augmentation de l'expression protéique, à chaque temps post infection. De plus, l'analyse multiple (plusieurs temps post infection analysés conjointement) a mis en évidence une première réponse persistante entre 13h et 24h et une seconde plus tardive entre 24h et 72h. Aucun facteur commun aux trois temps post infection n'a cependant été identifié.

Parmi les neuf protéines nous avons analysées en spectrométrie de masse, beaucoup se sont révélées liées au cytosquelette et au stress oxydatif ou du réticulum endoplasmique (RE). La vimentine, l'actine et la tubuline, des protéines structurales, ont déjà été identifiées lors des analyses globales réalisées sur l'infection par le VIH (Carlson et al., 2004; Coiras et al., 2006; Wang et al., 2008; Wu et al., 2008) et par d'autres systèmes viraux (Fujita et al., 2006; Mazurov et al., ; Ohman et al., 2009; Roohvand et al., 2009; Singaravelu et al.). De plus, la lamine A/C, composante majoritaire de la lamina du noyau, est étroitement liée à la protéine BAF, elle-même liée aux protéines LEDGF/p75, HMGA1 et β -actine, protéines ayant déjà un lien connu avec l'infection par le VIH (Chen and Engelman, 1998; Levin et al., ; Lin and Engelman, 2003; Mahmoudi et al., 2006). La modulation des facteurs associés au cytosquelette peut être liée à une profonde modification du trafic intracellulaire soit par relocalisation immédiate des protéines déjà présentes soit par la nécessité de relocaliser des protéines nouvellement synthétisées. La modulation des protéines liées au squelette nucléaire (LMNA/C et β -actine) s'explique par (i) l'atteinte directe des chromosomes par l'intégration de l'ADN étranger et (ii) le lien étroit existant entre les chromosomes et l'architecture nucléaire.

Concernant le stress cellulaire, quatre des protéines identifiées en spectrométrie de masse semblent avoir un lien avec ce dernier. Le statut d'oxydo-réduction de la cellule est étroitement lié au réticulum endoplasmique. En cas de stress du RE, pouvant être induit par un stress oxydatif, il est fréquent que la conformation ainsi que l'agrégation des protéines soient modifiés, les chaperonnes sont alors activées. De plus, un stress du RE est également

responsable de l'induction d'un stress oxydatif. Dans notre étude, la protéine disulfide isomérase (PDI) présente une sous-expression à 13h p.i. uniquement. La PDI est directement responsable de la formation des ponts disulfure lors de la conformation des protéines, cette modification s'accompagne d'une production de ROS (Tu and Weissman, 2004). La superoxyde dismutase SOD, responsable de la dégradation des espèces oxygènes réactives, a déjà été identifiée dans d'autres systèmes VIH mais son niveau d'expression reste controversé (Chan et al., 2007; Masutani et al., 2005; Suresh et al., 2009; Westendorp et al., 1995). La HSP60, protéine de choc, a également été identifiée en interaction directe avec le HIV, notamment avec la protéine intégrase (Parissi et al., 2001) et avec d'autres virus (Liu et al., 2009; Ohman et al., 2009). Finalement, la protéine DJ-1, ou PARK7, a été montrée en interaction avec la protéine DAXX, elle-même interagissant avec l'intégrase du VIH (Huang et al., 2008; Junn et al., 2005). Nous pouvons spéculer que l'intégration a provoqué un stress cellulaire intense, incluant une perturbation du système d'oxydo-réduction. La PDI responsable de production de ROS a certainement été préalablement sous régulée afin de limiter le stress oxydatif mais sa fonction étant essentielle, sa sous expression ne peut être permanente. Face au stress croissant, la SOD et les chaperonnes ont été activées afin de dégrader les ROS et assurer la conformation des protéines.

Nous ne pouvons pour le moment pas distinguer les facteurs associés à un possible mécanisme de défense cellulaire de ceux attribués à une stratégie de survie de la part de l'ADN intégré. Concernant les protéines qui apparaissent uniquement à certains temps post infection, il faudra approfondir leur présence au cours de l'infection (notamment par western blot), afin de confirmer leur surexpression transitoire et en comprendre la valeur biologique. Il serait également intéressant de tester l'interaction de ces facteurs avec l'intégrase du VIH afin d'identifier un potentiel rôle de cofacteur. Ces protéines devront également être les cibles d'expérience de surexpression et de siRNA afin d'observer leur action sur le processus d'intégration. D'autres protéines pourront également être identifiées en spectrométrie de masse. Tout comme pour les analyses transcriptomiques, il serait intéressant de faire les mêmes tests sur d'autres types cellulaires afin d'identifier un effet de l'intégration commun aux types cellulaires ou cellule-spécifique.

Discussion et conclusion générale

Aucune donnée n'est actuellement disponible sur les perturbations cellulaires induites par des modifications majeures de la chromatine. Le présent projet avait pour objectif principal d'identifier les perturbations cellulaires immédiatement induites par l'intégration d'un ADN étranger au sein du génome. L'étape d'intégration a été réalisée à l'aide de vecteurs dérivés du VIH, classiquement utilisés en laboratoire. Mais une telle étude nécessitait la définition de plusieurs paramètres notamment le type cellulaire étudié, la dose virale employée et le temps post infection choisi pour la récolte des échantillons.

Variabilité selon le type cellulaire :

Pour les analyses préliminaires, des cellules fibroblastiques du derme humain ont été préférées à des lymphocytes primaires pour s'affranchir notamment des recombinaisons V(D)J. Les cellules les plus adaptées en termes de disponibilité et de manipulation au moment de notre étude étaient les fibroblastes du derme humain.

Dans le but d'approfondir cette étude et de définir les facteurs spécifiques à une lignée cellulaire ou commun à toutes, d'autres types cellulaires pourraient être analysés. Dans cette optique, des cellules épithéliales de la glande mammaire et d'autres fibroblastes du derme humain ont été testées. Cette étude préliminaire devra être approfondie sur plusieurs donneurs mais elle a, d'ores et déjà, permis de valider certains facteurs préalablement identifiés en transcriptomique.

Une étude sur des PBMC primaires activés est également en cours. Néanmoins, même si les lymphocytes constituent les hôtes naturels du VIH, ces cellules sont difficilement isolables et infectables. Les premiers résultats montrent que nos systèmes viraux ne permettent l'infection de seulement 13% de la population lymphocytaire totale. Néanmoins, ces données correspondent à des analyses de l'expression de la GFP en cytométrie de flux. Comme mentionné dans l'article 1, le type cellulaire joue un rôle prédominant dans l'expression du gène rapporteur, ainsi des tests de PCR quantitative ciblant les ADN viraux intégrés sont en cours. Les résultats préliminaires montrent que l'intégration ne semble effectivement pas toucher toute la population cellulaire. Les analyses devront donc être poursuivies après isolation des cellules CD4⁺ activées.

Par la suite, d'autres types cellulaires devront être testés, toujours dans l'optique de distinguer les facteurs spécifiques de chaque cellule ou ceux communs à toutes les cellules.

L'outil intégratif : limite des vecteurs rétroviraux

Les vecteurs lentiviraux sont maintenant classiquement utilisés en laboratoire (Salmon and Trono, 2007). Dans notre étude, les signaux uniquement dus à l'intégration ont été isolés par comparaison de vecteurs intégratifs et non intégratifs. Néanmoins, et comme déjà mentionné, ces analyses ne permettent pas de différencier une possible défense cellulaire, d'une stratégie de maintien de la part de l'ADN intégré. Cette question est abordée par la plupart des analyses globales et reste pour le moment non résolue (Brass et al., 2008 ; Konig et al., 2008 ; Hyrcza et al., 2007 ; Li et al., 2009a, Wu et al., 2008 ; Rotger et al.)

De plus, l'utilisation d'un vecteur non intégratif implique l'accumulation de formes virales non intégrées. Bien que les doses virales entre les vecteurs intégratifs et non intégratifs soient identiques et bien que l'intégration soit en cours de réalisation au moment de nos analyses (impliquant donc que les formes non intégrées sont générées dans les deux conditions), nous ne pouvons pas exclure le fait que certains facteurs ne soient pas révélateurs de l'intégration mais plutôt de l'accumulation des formes virales non intégrées, en plus grand nombre dans la condition non intégrative. Là encore, le problème reste pour le moment sans solution.

La dose virale : variabilité dose-dépendante

Lors des analyses protéomiques, plusieurs expériences ont pu être menées en parallèle notamment différentes doses virales car les études sont bien moins lourdes en terme de coûts, de manipulation et d'analyse. Ainsi, différentes MOI ont pu être testées en études protéomiques préliminaires et les expériences finales ont pu être menées sur une MOI de 2. A l'inverse, les analyses transcriptomiques, se sont focalisées sur une seule dose virale, semblant la plus adaptée pour l'identification des modifications cellulaires induite par l'intégration. Ainsi, les études du transcriptome ont été menées avec une forte MOI. En effet, cette forte MOI nous permettait d'infecter la totalité des cellules en un temps restreint favorisant ainsi l'homogénéité des perturbations cellulaires et assurant ainsi une plus forte probabilité de réussite de l'expérience.

Afin d'identifier une réponse cellulaire potentiellement dose-dépendante, il serait aisé et intéressant de (i) mener l'expérience de protéomique à des doses virales plus fortes induisant donc plus de perturbations chromosomiques et de (ii) valider les gènes identifiés en

transcriptomique sur des doses virales plus faibles, réduisant donc le nombre de perturbations chromosomiques.

Dans le but d'approfondir cette question, des infections sur les fibroblastes du derme ont été menées à MOI 2, 50 et 200. Les échantillons ont été extraits soit pour une analyse en qPCR soit en Western Blot soit en 2D et sont en cours d'étude.

Le temps post infection : analyse des modifications cellulaires persistantes ou transitoires

Nous avons choisi d'effectuer les analyses transcriptomiques à 13h p.i., heure correspondant au début de la phase exponentielle du processus d'intégration. En effet, notre objectif initial était d'identifier les réponses ou perturbations cellulaires immédiates et précoces. Néanmoins, comme nous l'ont démontré les analyses protéomiques, ces perturbations cellulaires ne sont pas constantes au cours de l'infection. Ainsi les facteurs identifiés en transcriptomique à 13h p.i. ne sont certainement pas valables à d'autres heures. Dans l'optique de séparer les perturbations cellulaires transitoires des permanentes, des échantillons d'ARN et de protéines ont été récupérés à 24h, 48h et 72h post infection et doivent être analysés. Il est fort probable que les fonctions cellulaires déjà identifiées soient les mêmes mais que les facteurs impliqués soient différents. Mais il est également envisageable que certains processus cellulaires tels que la réparation de l'ADN ou les modifications de la chromatine ne soient perturbés que lors du processus d'intégration et redeviennent stables une fois l'intégration établie.

Corrélation entre les analyses transcriptomiques et protéomiques

Des corrélations sont observables entre les deux analyses protéomiques et transcriptomiques malgré le fait qu'elles n'aient pas été effectuées avec les mêmes variables. Ainsi, les chaperonnes de stress identifiées en protéomique sont étroitement liées à l'homéostasie du système redox, système également identifié en transcriptomique (PRDX2, DDIT3, MSRB3, NOX4, ect...). Il est donc fort probable que ce système joue un rôle prédominant dans la réponse cellulaire induite par l'intégration.

De même, de nombreuses protéines du cytosquelette telles que l'actine et la tubuline ont été identifiées en protéomique tandis que d'autres notamment la dynéine et la thymosine ont été identifiées en transcriptomique. Il est donc envisageable que les mêmes facteurs soient

identifiés à différents temps post infection et à différentes dose virales à la fois en transcriptomique et en protéomique. L'actine β identifiée en protéomique fait partie du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, les facteurs SMARCC1 et SRCAP identifiés dans l'étude transcriptomique sont également associés à ce complexe cellulaire. Ce complexe agissant directement sur le remodelage de la chromatine et le processus d'intégration ciblant également directement les chromosomes cellulaires, une telle corrélation est donc intéressante. Les différents composants de ce complexe protéique devront faire l'objet d'une étude approfondie quant à leur rôle précis lors du processus d'intégration par le biais de surexpression ou de siRNA.

Enfin, la Lamin A/C est à la fois identifiée en protéomique et en transcriptomique, appuyant son rôle lors de la réponse cellulaire suite à l'intégration. Cette dernière est également liée au remodelage de la chromatine, mais également à d'autres facteurs identifiés comme partenaire du processus d'intégration comme BAF. De plus, la lamine A/C a été également identifiée lors d'études menées sur le VIH ou sur d'autres infections virales, soulignant certainement un rôle important lors du processus d'intégration et d'infection. Cette dernière devra donc également être la cible d'études approfondies.

Perspectives expérimentales

Outre les analyses de siRNA, surexpression et western blot sur les facteurs identifiés lors des études de protéomiques et de transcriptomiques, d'autres études peuvent également découler de ce travail.

Il serait notamment intéressant d'approfondir les résultats de l'analyse des cellules témoins contre les cellules infectées, mentionné dans le dernier paragraphe des résultats de l'analyse transcriptomique. En effet, ces analyses, même menées sur deux lots de cellules uniquement, pourraient permettre de mettre en évidence des facteurs clés liés aux étapes précoces de l'infection virale.

Il est maintenant acquis que le VIH s'intègre préférentiellement dans les régions transcriptionnellement actives. Néanmoins, nous ne savons pas si cette donnée est valable même aux plus fortes doses virales, à terme les virus finissent peut être par s'auto-intégrer. Les sites d'intégration pourront donc être identifiés afin de définir des régions chromosomiques préférentielles telles que les sites fragiles.

De plus, de nombreux facteurs identifiés en transcriptomique sont liés à la régulation de la transcription. Il serait intéressant de caractériser les promoteurs des gènes modulés afin d'identifier certains facteurs de transcription clés.

Enfin, notre étude a porté sur les ARNm et les protéines soit les régulations transcriptionnelles et traductionnelles. Néanmoins, de nouveaux régulateurs cellulaires ont été récemment mis en évidence : les miRNA. Il existe maintenant des puces à miRNA qui pourraient permettre d'identifier la modulation d'un autre mode de régulation cellulaire après l'induction de perturbations chromosomiques.

Perspectives à long terme

Ce projet s'inscrit dans une étude visant à identifier et caractériser les modifications cellulaires pouvant être induites par des perturbations chromosomiques, mimées par l'intégration d'un rétrovirus dans le génome. Ainsi, des aboutissants plus appliqués sont envisagés notamment concernant les thérapies antirétrovirales et les thérapies géniques.

Les thérapies antirétrovirales

A l'heure actuelle, vu le fort taux de mutations du VIH provoquant l'apparition rapide des phénomènes de résistance, les thérapies tendent à s'orienter non plus vers une inhibition directe d'une protéine virale (RT ou IN) mais plutôt vers le ciblage de l'interaction avec un partenaire cellulaire essentiel tel Ledgf/p75 dans le cas de l'intégrase. Ainsi, notre étude pourrait permettre l'identification d'un partenaire cellulaire essentiel à l'intégration rétrovirale et donc le développement d'une molécule dirigée contre ce dernier.

Les perturbations chromosomiques inopinées

De nombreux cancers sont initiés par des phénomènes d'atteintes à l'intégrité du génome tels que des délétions, des hypermutations, des translocations ou des pertes / gains de grands fragments chromosomiques. Bien que désormais le lien entre de tels phénomènes et l'activation d'oncogènes soit clairement établi, leurs effets sur les profils d'expressions globales restent à déterminer. Il est établi que la perte ou le gain de larges régions chromosomiques altère des gènes impliqués dans l'inhibition ou l'activation transcriptomique, dérégulant ainsi l'expression de nombreux autres gènes (Stallings, 2007; Upender et al., 2004). Néanmoins, les facteurs ainsi que les voies cellulaires impliqués dans cette dérégulation restent difficiles à identifier. Notre étude pourrait apporter des connaissances sur

les gènes et les fonctions biologiques dérégulées lors d'atteintes à l'intégrité du génome, permettant ainsi d'envisager d'autres stratégies de traitement contre ces dernières.

Les thérapies géniques

Enfin, les virus et notamment les rétrovirus sont depuis peu un outil privilégié pour les thérapies géniques. L'intégration stable de leur génome dans l'ADN de la cellule hôte les rend extrêmement attractif pour l'expression au long terme du transgène. Le VIH est désormais le nouvel outil de la thérapie génique. Afin d'en assurer la sécurité biologique, les gènes pathogéniques ont été éliminés, les taux de recombinaison réduits et les vecteurs sont désormais non répliatifs. Néanmoins, les effets directs d'un tel outil sur les fonctions cellulaires n'ont encore été que peu étudiés. Les premiers essais de thérapie génique menés sur des enfants SCID et utilisant les vecteurs MuLV ont notamment révélés des effets néfastes d'une intégration stable puisque 2 patients ont finalement développé une leucémie à la suite de l'intégration du vecteur près d'un oncogène. L'étape d'intégration et ses conséquences globales ne sont pour le moment pas documentées et notre étude a notamment pour but d'apporter des connaissances dans ce domaine. Il est important de noter que cette question sur la sécurité de l'intégration a abouti au développement de vecteurs non intégratifs. L'expression du transgène n'étant de ce fait que transitoire (Banasik and McCray).

Mieux comprendre les effets immédiats et à long terme de l'intégration d'un vecteur dans la cellule cible pourra permettre d'augmenter la sécurité de l'outil biologique employé et de mieux développer les stratégies thérapeutiques.

Annexes

Annexe 1 : Manipulation des vecteurs lentiviraux

I/ Production

De façon classique, les vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 sont générés par co-transfection de 3 plasmides dans des cellules productrices, dans notre cas, les 293T (Figure 33).

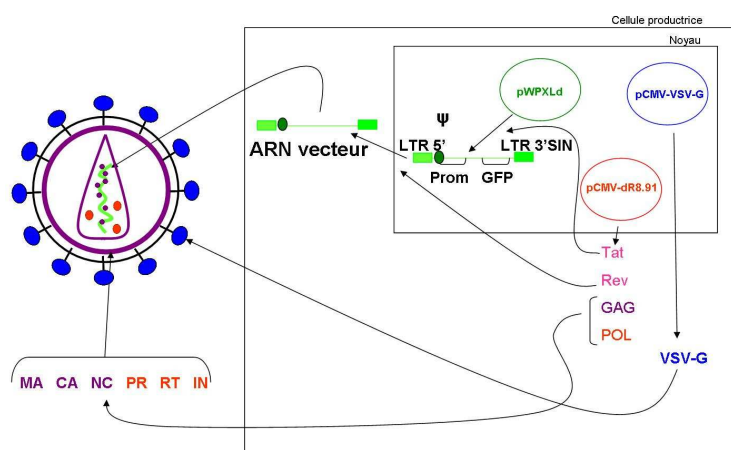


Figure 33 : Principe de production du vecteur rétroviral par co-transfection des plasmides dans les cellules 293T. Les plasmides pCMV-VSV-G, pCMV-dR8.91 et pWPXLd sont utilisés pour co-transfecter des cellules productrices 293T. Les protéines structurales (issues des plasmides pCMV-VSV-G et pCMV-dR8.91) une fois produites s'assemblent à la surface des cellules. Le génome viral issu du pWPXLd est transcrit grâce à l'action de Tat et exporté dans le cytoplasme grâce à Rev. L'ARN est ensuite encapsidé grâce à la séquence ψ. A l'inverse les ARN produits par les plasmides pCMV-VSV-G et pCMV-dR8.91 ne portent pas de séquences ψ et ne seront donc pas encapsidés. Il ressort des particules virales VIH, pseudotypées par l'enveloppe du VSV et porteuses d'un ARN vecteur comportant le gène *gfp*.

Abréviations : LTR Long Terminal Repeat, ψ séquence d'encapsidation, GFP Green Fluorescent Protein, VSV-G Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein-G, MA matrice, CA capsid, NC nucléocapside, PR protéase, RT reverse transcriptase, IN intégrase.

Le premier plasmide code pour les enzymes virales (réverse transcriptase, intégrase, et protéase) et les protéines de structure (matrice, capsid et nucléocapside). Les protéines de régulation Tat et Rev sont également conservées pour permettre l'activation transcriptionnelle et l'export des ARNm non épissés.

Le second plasmide code pour une protéine d'enveloppe, celle du Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV). Comme déjà mentionné dans la partie bibliographique, cette enveloppe stabilise la particule virale et en augmente le tropisme. Ainsi, bien d'autres cellules que les lymphocytes CD4+ peuvent être ciblés.

Enfin, le dernier plasmide code pour le gène de la GFP sous le contrôle d'un promoteur interne EF1 α . Ce plasmide comprend également les LTR du VIH, le LTR 5' est sauvage tandis que le LTR 3' est délété pour la région U3, contenant les sites de fixation des facteurs de transcription. Ainsi, après l'étape de reverse transcription, la délétion U3 se retrouve sur le LTR 5' et sur le LTR 3' abolissant toute activité transcriptionnelle à partir des LTR et donc toute réplication virale. Cette délétion crée des vecteurs dits SIN pour Self INactivated. Contrairement au VIH sauvage, les LTR de ces vecteurs n'encadrent pas les régions classiques *gag*, *pol*, *env*.

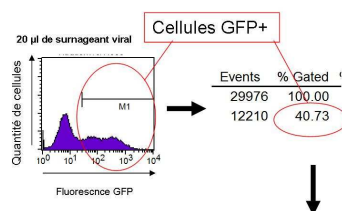
Lors de la transfection, toutes les protéines virales ainsi que la GFP, seront produites et assemblées à la membrane plasmique. Comme pour une infection classique, l'ARN viral sera encapsidé et des particules virales bourgeonneront à partir de la cellule productrice.

A noter que j'ai construit différents vecteurs par combinaison de plasmides. Une mutation de la protéine intégrase au niveau de son site catalytique (E152D) abolit le processus d'intégration et engendre donc des vecteurs non intégratifs dits IN-. Une délétion du promoteur EF1 α empêche l'expression de la GFP et engendre donc des vecteurs sans gène rapporteur notés Δ P. Les deux mutations combinées engendrent des vecteurs non intégratifs et sans gène rapporteur IN-/ Δ P.

II/ Titration

A/ Mesure de la GFP

D'une manière classique et extrêmement utilisée, les vecteurs rétroviraux sont titrés par mesure de l'expression d'un gène rapporteur : GFP ou luciférase par exemple. Pour ce faire, les vecteurs sont utilisés pour infecter des cellules 293T. Ces dernières sont ensuite récupérées 24h p.i. et l'expression de la GFP est analysée par cytométrie en flux.



À l'infection $\rightarrow 1.10^6$ cellules/puits

On obtient 40% de cellules GFP+ avec 20 μ l de virus

$$\frac{(40/100) \times 1.10^6}{20.10^{-3}} = 2.10^7 \text{ TU/ml}$$

Figure 34 : Méthode de titration des surnageants viraux par mesure d'un gène rapporteur en cytométrie en flux. Après infection, les cellules sont analysées en cytométrie en flux. Les cellules GFP+ sont annotées en région M1, correspondant ici à 40,73% de la population totale. Sachant qu'au moment de l'infection, la culture contenant 1.10^6 cellules et que 20 μ l de virus ont été utilisés pour l'expérience, on en déduit selon le calcul ci-contre que le titre viral est de 2.10^7 TU/ml.

Un titre viral peut être ainsi calculé si deux conditions sont remplies : (i) expression du gène rapporteur à partir des formes virales intégrées, non valable donc pour les vecteurs sans promoteur ou/et des vecteurs non intégratifs et (ii) une faible dose virale utilisée afin de ne pas saturer l'expression de la GFP (entre 0 et 20µl) (figure 34).

Dans mon cas, la grande majorité des suspensions virales ont été titrées entre 1 et 4.10^7 TU/ml pour le vecteur classique IN/P. Pour les autres vecteurs, comme le montre la figure 35, la technique de cytométrie en flux n'est pas adaptée soit à cause du promoteur délété soit à cause de l'intégrase mutée.

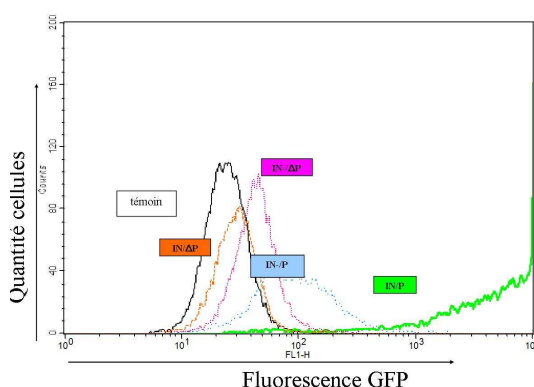


Figure 35 : Observation en cytométrie en flux du comportement des quatre vecteurs produits. Le vecteur classique IN/P engendre une très forte expression de la GFP tandis que les vecteurs IN-/ΔP et IN/ΔP présente une fluorescence comparable à celle des cellules non infectées. Enfin, le vecteur IN-/P permet la faible expression de la GFP via les formes virales non intégrées.

B/ Mesure de l'activité réverse transcriptase

D'autres méthodes existent pour la titration des suspensions virales. Ayant certains vecteurs sans expression de gène rapporteur, je me suis penchée sur la technique de mesure de l'activité réverse transcriptase. Le principe de l'expérience est le suivant : les particules virales sont lysées et la RT est mise en activité à partir d'une matrice fournie par le kit. Les dNTP sont à la fois couplés à la biotine et digoxogénine permettant la création d'un ADN modifié. Par la suite, les produits de RT sont déposés sur une plaque recouverte de streptavidine permettant leur fixation. La quantification des ADN fixés est effectuée par une réaction colorée grâce à un anticorps anti- digoxogénine couplé à la peroxidase. La quantification se fait ensuite par lecture classique des résultats sur une gamme. Malgré la qualité et la facilité de cette technique, les résultats suffisamment n'ont pas été suffisamment reproductibles (Figure 36) pour me permettre une quantification précise de mes suspensions virales. Néanmoins, j'ai continué à effectuer cette méthode après chaque production de vecteurs GFP- afin de vérifier la bonne production virale.

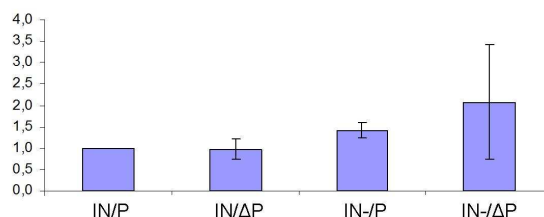


Figure 36 : Méthode de titration des vecteurs par mesure de l'activité réverse transcriptase. Le vecteur IN/P sert de contrôle et les valeurs obtenues sont arbitrairement placées à 1. Les trois autres vecteurs lui sont comparés afin de définir un titre viral. Par exemple, le vecteur IN-/P est 1,4 fois plus concentré que contrôle. Le contrôle ayant été défini à $1,8.10^7$ TU/ml, on en déduit par exemple que le vecteur IN-/P est à $2,5.10^7$ TU/ml.

C/ Quantification des ADN viraux intracellulaires

Lors de l'infection, la cellule renferme de nombreuses formes virales (Figure X). Avant intégration, des formes virales dites non intégrés sont observables, on y retrouve les formes circulaires 1 LTR et 2 LTR ainsi que le vecteur sous forme linéaire. Bien que ce sujet reste encore controversé, ces différentes formes virales semblent se retrouver à la fois dans le cytoplasme et le noyau. Hormis ces formes non intégrées, on observe également le vecteur sous forme de provirus, forme intégrée dans le génome de la cellule hôte.

La méthode de quantification des ADN viraux intégrées est détaillée dans l'article 1, figure 4. Cette technique de PCR nichée quantitative, couplée à la détection des formes virales totales (amplification PCR du gène de la GFP) a permis de donner un titre à chacun des virus utilisés. Pour voir un ordre d'idée du titre de chaque suspension virale, la méthode de l'activité réverse transcriptase est réalisée, en incluant le vecteur contrôle IN/P, analysable en FACS. Par la suite différentes concentrations de chaque vecteur sont testées pour effectuer une infection sur 293T, toujours en conservant le vecteur contrôle. Chaque échantillon est analysé en qPCR quant à la quantité d'ADN viral totale détectée et la quantité d'intégrés. Les données obtenues sont normalisées grâce à l'amplification du gène de la β -globine ou de la NAD4L. C'est par comparaison avec les données du vecteur contrôle que le titre viral des autres suspensions est obtenu : pour chaque vecteur, la concentration virale qui donnera les mêmes résultats que le vecteur contrôle est sélectionnée.

Le vecteur contrôle étant titré à $1,8.10^7$ TU/ml, l'expérience de PCR en temps réel (Figure 37) m'a permis de définir que les suspensions virales IN/ΔP, IN-/P et IN-/ΔP respectivement 1,6 ; 1,28 et 1,3 fois plus concentrées que mon vecteur contrôle donnaient des résultats similaires, j'ai donc déduit des titres respectifs de $2,88.10^7$ TU/ml, $2,3.10^7$ TU/ml et $2,34.10^7$ TU/ml.

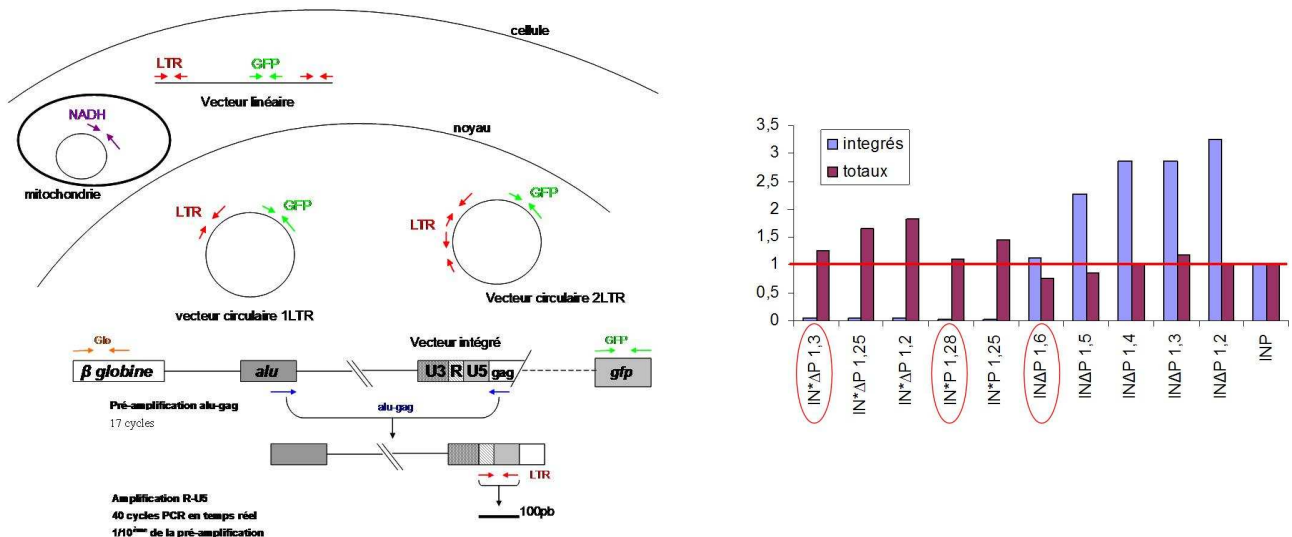


Figure 37 : Titration des vecteurs par qPCR ciblant les formes virales intracellulaires. A. Positions des amorces utilisées pour les analyses en PCR en temps réel des différentes formes d'ADN viral générées après infection. Les différentes formes de l'ADN viral sont ici représentées. Les extractions d'ADN totaux permettent la récupération de toutes les formes d'ADN viral : circulaire (1 et 2 LTR), linéaire et intégré. Le couple GFP correspond aux amorces GFP1 et GFP2 s'hybridant sur le gène *gfp* de l'ADN viral. Le couple LTR correspond aux amorces LTR1 et LTR2 s'hybridant sur les régions R et U5 de l'ADN viral. Le couple Glo correspond aux amorces Glo1 et Glo2 s'hybridant sur le gène β -globine de l'ADN génomique. Le couple NADH correspond aux amorces NADH1 et NADH2 s'hybridant sur le gène *NADH déshydrogénase sous-unité 4L* de l'ADN mitochondrial. Enfin, les amorces alu et gag s'hybrident sur les séquences génomiques répétées *alu* et sur la séquence *gag* virale. Le principe de la pré-amplification alu-gag pour la sélection des formes intégrées est ici représenté. Une première PCR classique est réalisée sur 17 cycles. Une seconde PCR, en temps réel, ciblant R-U5 est ensuite effectuée sur 1/10^{ème} des pré-amplifications. B. Résultat de PCR en temps réel pour la normalisation des vecteurs. Le vecteur contrôle IN/P est arbitrairement mis à 1 pour les formes totales et les formes intégrées. Par la suite différentes doses des autres vecteurs lui sont comparées. Ainsi le virus IN/ΔP testé avec une concentration 1,6 fois supérieure à celle du vecteur contrôle donne des résultats similaires. On en déduit que le titre viral de la suspension IN/ΔP est 1,6 fois supérieur à celui du contrôle ($1,8 \cdot 10^7$ TU/ml) soit $2,88 \cdot 10^7$ TU/ml. L'approche est réalisée de façon similaire avec les autres vecteurs pour obtenir un titre de $2,34 \cdot 10^7$ TU/ml pour le IN-/ΔP et $2,3 \cdot 10^7$ TU/ml pour le IN /ΔP

III/ Techniques de concentration des suspensions virales

Les vecteurs rétroviraux ici utilisés possèdent l'enveloppe du VSV ce qui leur confère une très grande stabilité. Au début de l'étude, je ne savais pas encore si mes productions virales allaient être suffisamment élevées en titre pour me permettre de faire mes analyses, j'ai donc testé deux techniques de concentration pour tenter d'augmenter le titre viral.

La première technique consiste en la précipitation des particules virales par ajout de polyéthylèneglycol (PEG). Ainsi à raison d'un volume de suspension virale pour un volume de PEG 8000 20%, suivi par une étape de centrifugation à 9 000g, +4°C pendant plus 1h 30min, les suspensions virales ont présenté une augmentation de titre d'un facteur 3,3 (Figure 38).

La seconde technique utilisée consiste en la filtration de la suspension virale sur une membrane de cellulose régénérée (Amicon Ultra-15, 100KDa, Millipore). Des centrifugations successives de la suspension virale ont permis de concentrer le titre d'un facteur 6,7 (Figure 38).

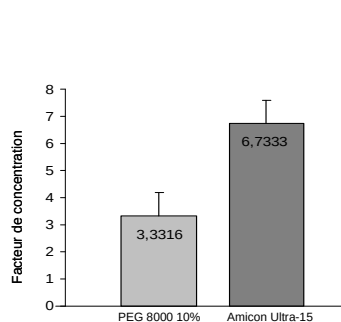


Figure 38 : Comparaison de deux méthodes de concentration des particules virales. Des expériences de concentration des particules virales, soit en présence de PEG 8000 10% soit sur colonne d'ultrafiltration Amicon Ultra-15 100kDa, ont été réalisées simultanément, sur trois productions virales différentes. Les titres avant et après concentration ont été déterminés par cytométrie de flux. Un facteur de concentration a ainsi été calculé. Les moyennes des facteurs de concentration obtenus en présence de PEG 8000 ou sur colonne Amicon ultra-15 sont ici représentées avec les écarts types correspondants.

IV/ Elimination des plasmides résiduels

Par ce que les productions virales se font à l'aide de plasmides, et parce que mes études futures de cinétiques des formes intégrées étaient basées sur une approche de PCR, il m'a paru nécessaire d'éliminer toute présence de plasmides résiduels dans la suspension virale. Pour ce faire, différentes DNase ont été testées : RQ1 (Promega) et Turbo (Ambion). Afin de ne pas perturber la suspension virale, le tampon de chacune des enzymes n'a pas été utilisé, et les enzymes n'ont pas été inactivées. Pour permettre le fonctionnement des enzymes, seuls 10 mM de MgCl₂ ont été ajouté pour 1ml de suspension virale et 10 U de DNase (1h à 37°C). Les suspensions virales traitées ou non à la DNase ont été analysées en PCR ciblant la région non virale LTR-SP6 du plasmide pWPXLd (figure 39). Le plasmide seul a été utilisé comme contrôle positif. La suspension virale non traitée se révèle positive en PCR tandis que les deux traitements à la DNase abolissent la détection. Il a été vérifié que le titre viral restait inchangé après cette étape de DNase. Par la suite, la totalité des suspensions virales a été traitée de cette façon pour éliminer les plasmides résiduels et ne pas fausser les résultats de PCR en temps réel.

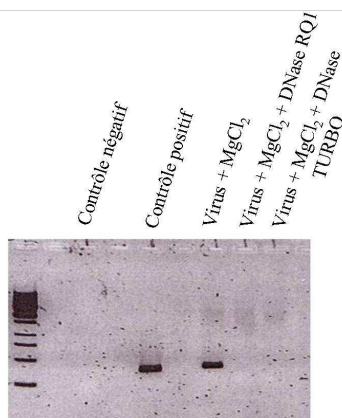


Figure 39 : Elimination des contaminations plasmidiques dans les suspensions virales par traitement à la DNase. L'amplification PCR correspond à la région non virale LTR-SP6 du plasmide pWPXLd. Le contrôle négatif est réalisé sans ADN tandis que le positif correspond au plasmide seul. Un témoin de suspension virale traitée avec du MgCl₂ seul a été réalisé. Deux Dnases ont été testées à 10U /ml de virus et provoquent l'absence d'amplification PCR, attestant de l'élimination de tout plasmide résiduel.

V/ Vérification de la non recombinaison

Concernant les vecteurs, une dernière vérification restait à faire. Utilisant trois plasmides différents il était envisageable que ces derniers recombinent au sein de la cellule productrice ou de la cellule infectée et génèrent un virus recombinant pathogène de type VIH sauvage pseudotypé VSV-G. Un tel virus pouvant poser des problèmes de sécurité, il était nécessaire de vérifier qu'aucune recombinaison n'avait lieu. Pour ce faire, des cellules 293T ont été massivement infectées avec la suspension virale et maintenues en culture pendant 3 passages successifs. Puis, l'ADN cellulaire a été extrait et testé en PCR pour la présence de séquence *gag-pol*. La séquence *gag-pol*, porteuse des gènes de structures et enzymes virales n'est normalement présente qu'au moment de la production mais ne doit pas être détectée lors des infections, mes vecteurs étant non réplcatifs. Différentes quantité de plasmides pCMV-dR8.91 ont été testées comme contrôle positif, au sein des ADN de cellules infectées et non infectées, 1pg de plasmide a également été ajouté pour vérifier qu'aucun inhibiteur de PCR ne soit présent dans les extractions. Finalement, nous n'avons observé aucune transmission des séquences *gag-pol* lors des infections virales, attestant de la sécurité des vecteurs (Figure 40).

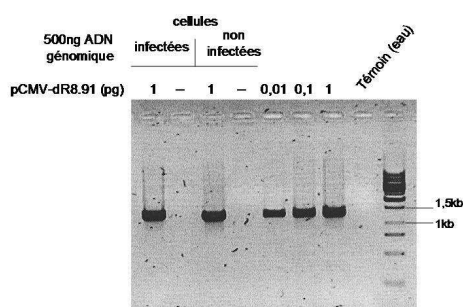


Figure 40 : Vérification de l'absence de transmission des séquences *gag-pol* du génome CMV-dR8.91.

Analyse sur gel d'agarose de la PCR ciblant les séquences *gag-pol* sur les ADN génomiques extraits de cellules infectées ou non. Trois témoins positifs sont réalisés sur 1 pg, 0,1 pg et 0,01 pg de plasmide pCMV-dR8.91 permettant de mettre en évidence la sensibilité de la PCR. Les essais sont réalisés sur 500 ng d'ADN génomiques supplémentés ou non avec 1 pg de plasmide pCMV-dR8.91 afin de vérifier l'absence d'inhibiteur de PCR dans les extractions d'ADN. Aucune amplification n'est observable à partir des ADN extraits des cellules infectées et non infectées. Ces résultats démontrent l'absence de transmission des séquences *gag-pol* du génome CMV-dR8.91.

Annexe 2 : Mises au point de la méthode d'analyse bidimensionnelle des protéines

I/ Les techniques de coloration

La spectrométrie de masse étant une méthode sensible d'identification des protéines, il nous a été conseillé de colorer nos gels au bleu de Coomassie, coloration moins invasive et donc plus facile à éliminer lors de la spectrométrie de masse. Cependant, les techniques au bleu de Coomassie sont réputées pour être bien moins sensibles que celles au nitrate d'argent. Afin de réaliser nos expériences dans les meilleures conditions possibles, nous avons testé quatre colorations différentes : deux au bleu de Coomassie et deux au nitrate d'argent (Figure 41).

La première coloration au bleu de Coomassie est basée sur le Coomassie Brilliant Blue G-250 tandis que la seconde utilise la solution PageBlue Protein Staining Solution (Fermentas). Concernant les méthodes coloration au Nitrate d'Argent, la première correspond à une procédure classique de Nitrate d'Argent tandis que la seconde emploie le DodecaTM Silver Stain Kit (Biorad).

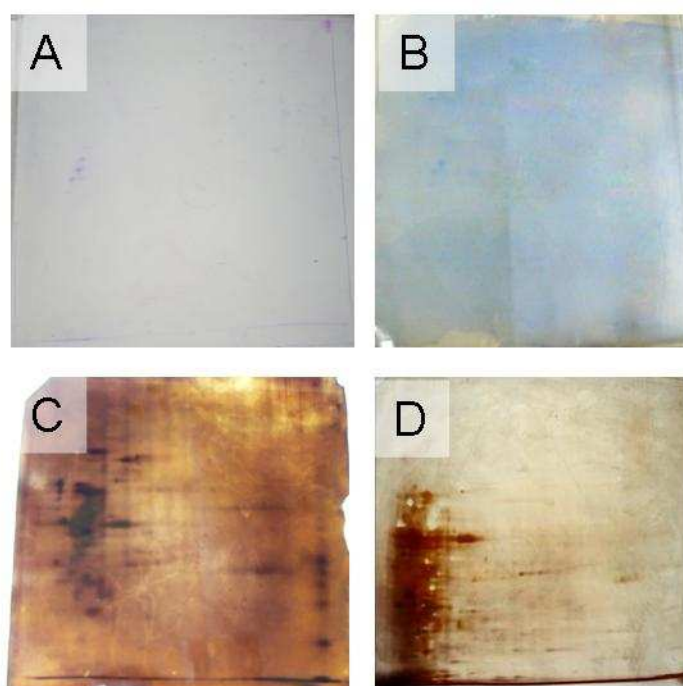


Figure 41 : Techniques de coloration des gels 2D. A. Coloration au bleu de Coomassie Brilliant Blue G-250. B. Coloration au bleu de Coomassie PageBlue Protein Staining Solution. C. Coloration au Nitrate d'Argent. D. Coloration au Nitrate d'Argent du kit DodecaTM Silver Stain. Les échantillons sont analysés sur une gamme de pH 3-10. On constate que les colorations au bleu de Coomassie ne révèlent quasiment aucun spot. La coloration au Nitrate d'Argent du kit donne de meilleurs résultats en termes de bruit de fond et de sensibilité que l'autre coloration au NiAg.

Les deux techniques de coloration au bleu de Coomassie ne se sont pas révélées très sensibles et aucune analyse en spectrométrie de masse n'était envisageable même en augmentant très fortement la quantité de protéines déposées. Parmi les deux techniques de nitrate d'argent, celle réalisée avec un kit de détection s'est révélée plus sensible et plus

spécifique. En effet, on constate que le bruit de fond avec le nitrate d'argent en kit est bien moins prononcé qu'avec le nitrate d'argent préparé en laboratoire. De ce fait, la coloration au nitrate d'argent du kit spécialisé a été retenue pour nos analyses, après avoir vérifié auprès des spécialistes que cette dernière était compatible avec les instruments de spectrométrie de masse dont nous disposions.

II/ Test des zones de pH

Notre bibliographie de référence (Ringrose et al., 2008) présentait une analyse 2D des protéines cellulaires totales sur une échelle de pH extrêmement large, allant de 3 à 11. Bien que les pH extrêmes, fortement acides ou fortement basiques, soient difficiles à analyser, j'ai souhaité réaliser les premiers essais sur une zone de pH la plus étendue possible : 3-10. Comme la figure 42 nous le montre, les résultats ne furent pas très concluants. En effet, les protéines ne se présentent pas sous forme de spots isolés mais forment des traînées. De plus, très peu de protéines sont observables au-delà des pH 6-7. Un second essai dans une zone plus restreinte (3-6) a été plus révélateur, nous avons toujours des traînées mais également quelques spots et une accumulation en pH 6. Cette forte présence de protéine en pH 6 nous a obligés à décaler très légèrement la zone d'analyse entre les pH 4 et 7. Les résultats étaient cette fois-ci largement exploitables. Il est à noter que, lors de ces expériences, les quantités de protéines déposées étaient relativement aléatoires lors de ces essais et dépendaient du nombre de cellules primaires que nous avions à disposition, expliquant la présence plus ou moins forte de spots/trainées.

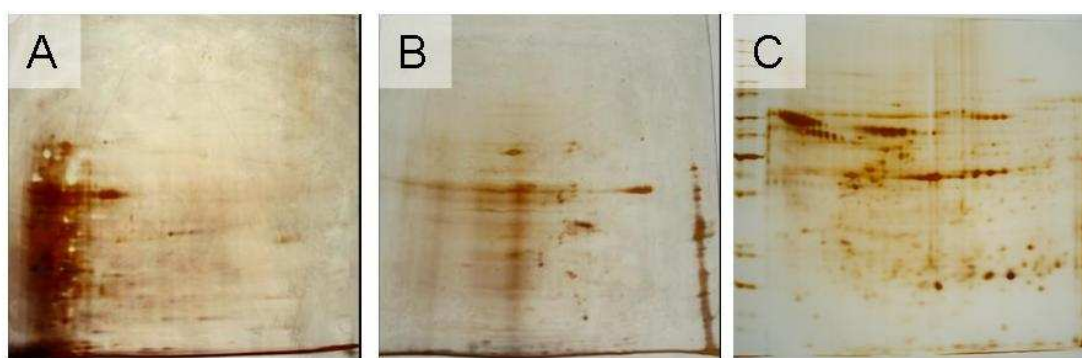


Figure 42 : Test des gammes de pH. A. gamme de pH 3 à 10. B. Gamme de pH 3 à 6. C. Gamme de pH 4 à 7. Les gels ont été colorés avec le DodecaTM Silver Stain Kit. On constate une meilleure séparation des protéines avec la gamme de pH 4 à 7.

Références

A

- Abbas, T. and Dutta, A., 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9, 400-14.
- Adams, L.D., Tomasselli, A.G., Robbins, P., Moss, B. and Heinrikson, R.L., 1992. HIV-1 protease cleaves actin during acute infection of human T-lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 291-5.
- Adimoolam, S. and Ford, J.M., 2003. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 2, 947-54.
- Agosto, L.M., Yu, J.J., Dai, J., Kaletsky, R., Monie, D. and O'Doherty, U., 2007. HIV-1 integrates into resting CD4+ T cells even at low inoculums as demonstrated with an improved assay for HIV-1 integration. *Virology* 368, 60-72.
- Aguilera, A. and Gomez-Gonzalez, B., 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* 9, 204-17.
- Aksenov, M.Y., Hasselrot, U., Bansal, A.K., Wu, G., Nath, A., Anderson, C., Mactutus, C.F. and Booze, R.M., 2001. Oxidative damage induced by the injection of HIV-1 Tat protein in the rat striatum. *Neurosci Lett* 305, 5-8.
- Altaf, M., Saksouk, N. and Cote, J., 2007. Histone modifications in response to DNA damage. *Mutat Res* 618, 81-90.
- Amini, S., Khalili, K. and Sawaya, B.E., 2004. Effect of HIV-1 Vpr on cell cycle regulators. *DNA Cell Biol* 23, 249-60.
- Anand, S., Chakrabarti, E., Kawamura, H., Taylor, C.R. and Maytin, E.V., 2005. Ultraviolet light (UVB and UVA) induces the damage-responsive transcription factor CHOP/gadd153 in murine and human epidermis: evidence for a mechanism specific to intact skin. *J Invest Dermatol* 125, 323-33.
- Andersen, J.L., Le Rouzic, E. and Planelles, V., 2008. HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Exp Mol Pathol* 85, 2-10.
- Andrake, M.D. and Skalka, A.M., 1995. Multimerization determinants reside in both the catalytic core and C terminus of avian sarcoma virus integrase. *J Biol Chem* 270, 29299-306.
- Andreadis, S., Lavery, T., Davis, H.E., Le Doux, J.M., Yarmush, M.L. and Morgan, J.R., 2000. Toward a more accurate quantitation of the activity of recombinant retroviruses: alternatives to titer and multiplicity of infection. *J Virol* 74, 3431-9.
- Andres, V. and Gonzalez, J.M., 2009. Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J Cell Biol* 187, 945-57.
- Ao, Z., Huang, G., Yao, H., Xu, Z., Labine, M., Cochrane, A.W. and Yao, X., 2007. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 integrase with cellular nuclear import receptor importin 7 and its impact on viral replication. *J Biol Chem* 282, 13456-67.
- Ariumi, Y., Turelli, P., Masutani, M. and Trono, D., 2005. DNA damage sensors ATM, ATR, DNA-PKcs, and PARP-1 are dispensable for human immunodeficiency virus type 1 integration. *J Virol* 79, 2973-8.

B

- Baekelandt, V., Claey, A., Cherepanov, P., De Clercq, E., De Strooper, B., Nuttin, B. and Debyser, Z., 2000. DNA-Dependent protein kinase is not required for efficient lentivirus integration. *J Virol* 74, 11278-85.
- Bakhshi, J., Weinstein, L., Poksay, K.S., Nishinaga, B., Bredesen, D.E. and Rao, R.V., 2008. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program in mouse melanoma cells: effect of curcumin. *Apoptosis* 13, 904-14.
- Balaburski, G.M., Hontz, R.D. and Murphy, M.E., p53 and ARF: unexpected players in autophagy. *Trends Cell Biol* 20, 363-9.
- Balvay, L., Soto Rifo, R., Ricci, E.P., Decimo, D. and Ohlmann, T., 2009. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta* 1789, 542-57.
- Bampi, C., Jacquenet, S., Lener, D., Decimo, D. and Darlix, J.L., 2004. The chaperoning and assistance roles of the HIV-1 nucleocapsid protein in proviral DNA synthesis and maintenance. *Curr HIV Res* 2, 79-92.
- Banasik, M.B. and McCray, P.B., Jr., Integrase-defective lentiviral vectors: progress and applications. *Gene Ther* 17, 150-7.
- Baranova, S., Tuzikov, F.V., Zakharova, O.D., Tuzikova, N.A., Calmels, C., Litvak, S., Tarrago-Litvak, L., Parissi, V. and Nevinsky, G.A., 2007. Small-angle X-ray characterization of the nucleoprotein complexes resulting from DNA-induced oligomerization of HIV-1 integrase. *Nucleic Acids Res* 35, 975-87.
- Barral, P.M., Sarkar, D., Su, Z.Z., Barber, G.N., DeSalle, R., Racaniello, V.R. and Fisher, P.B., 2009. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity. *Pharmacol Ther* 124, 219-34.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-71.
- Bassermann, F. and Pagano, M., Dissecting the role of ubiquitylation in the DNA damage response checkpoint in G2. *Cell Death Differ* 17, 78-85.
- Bauerschmidt, C., Arrichiello, C., Burdak-Rothkamm, S., Woodcock, M., Hill, M.A., Stevens, D.L. and Rothkamm, K., Cohesin promotes the repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in replicated chromatin. *Nucleic Acids Res* 38, 477-87.
- Baum, C., Schambach, A., Bohne, J. and Galla, M., 2006. Retrovirus vectors: toward the plentivirus? *Mol Ther* 13, 1050-63.
- Becherel, O.J., Jakob, B., Cherry, A.L., Gueven, N., Fusser, M., Kijas, A.W., Peng, C., Katyal, S., McKinnon, P.J., Chen, J., Epe, B., Smerdon, S.J., Taucher-Scholz, G. and Lavin, M.F., CK2 phosphorylation-dependent interaction between aprataxin and MDC1 in the DNA damage response. *Nucleic Acids Res* 38, 1489-503.
- Beere, H.M., 2005. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest* 115, 2633-9.
- Bekker-Jensen, S., Fugger, K., Danielsen, J.R., Gromova, I., Sehested, M., Celis, J., Bartek, J., Lukas, J. and Mailand, N., 2007. Human Xip1 (C2orf13) is a novel regulator of cellular responses to DNA strand breaks. *J Biol Chem* 282, 19638-43.
- Belin, M.T. and Boulanger, P., 1987. Processing of vimentin occurs during the early stages of adenovirus infection. *J Virol* 61, 2559-66.
- Berglund, J.A., Charpentier, B. and Rosbash, M., 1997. A high affinity binding site for the HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Res* 25, 1042-9.

- Bernstein, B.E., Meissner, A. and Lander, E.S., 2007. The mammalian epigenome. *Cell* 128, 669-81.
- Berthoux, L., Sebastian, S., Muesing, M.A. and Luban, J., 2007. The role of lysine 186 in HIV-1 integrase multimerization. *Virology* 364, 227-36.
- Besson, A., Dowdy, S.F. and Roberts, J.M., 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14, 159-69.
- Bilbao, C., Ramirez, R., Rodriguez, G., Falcon, O., Leon, L., Diaz-Chico, N., Perucho, M. and Diaz-Chico, J.C., Double strand break repair components are frequent targets of microsatellite instability in endometrial cancer. *Eur J Cancer*.
- Billington, J., Hickling, T.P., Munro, G.H., Halai, C., Chung, R., Dodson, G.G. and Daniels, R.S., 2007. Stability of a receptor-binding active human immunodeficiency virus type 1 recombinant gp140 trimer conferred by intermonomer disulfide bonding of the V3 loop: differential effects of protein disulfide isomerase on CD4 and coreceptor binding. *J Virol* 81, 4604-14.
- Bitomsky, N. and Hofmann, T.G., 2009. Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. *Febs J* 276, 6074-83.
- Black, L.R. and Aiken, C., TRIM5 α disrupts the structure of assembled HIV-1 capsid complexes in vitro. *J Virol* 84, 6564-9.
- Blank, M. and Shiloh, Y., 2007. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* 6, 686-95.
- Bolinger, C., Sharma, A., Singh, D., Yu, L. and Boris-Lawrie, K., RNA helicase A modulates translation of HIV-1 and infectivity of progeny virions. *Nucleic Acids Res* 38, 1686-96.
- Bonuccelli, L., Rossi, L., Lena, A., Scarcelli, V., Rainaldi, G., Evangelista, M., Iacopetti, P., Gremigni, V. and Salvetti, A., An RbAp48-like gene regulates adult stem cells in planarians. *J Cell Sci* 123, 690-8.
- Boudreau, H.E., Emerson, S.U., Korzeniowska, A., Jendrysik, M.A. and Leto, T.L., 2009. Hepatitis C virus (HCV) proteins induce NADPH oxidase 4 expression in a transforming growth factor beta-dependent manner: a new contributor to HCV-induced oxidative stress. *J Virol* 83, 12934-46.
- Bouillet, P., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Zhang, L.C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J.M. and Strasser, A., 2002. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415, 922-6.
- Bouillet, P. and Strasser, A., 2002. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115, 1567-74.
- Bouska, A. and Eischen, C.M., 2009. Mdm2 affects genome stability independent of p53. *Cancer Res* 69, 1697-701.
- Boya, P., Pauleau, A.L., Poncet, D., Gonzalez-Polo, R.A., Zamzami, N. and Kroemer, G., 2004. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim Biophys Acta* 1659, 178-89.
- Boyer, M., Yutin, N., Pagnier, I., Barrassi, L., Fournous, G., Espinosa, L., Robert, C., Azza, S., Sun, S., Rossmann, M.G., Suzan-Monti, M., La Scola, B., Koonin, E.V. and Raoult, D., 2009. Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21848-53.
- Braaten, D., Franke, E.K. and Luban, J., 1996. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol* 70, 3551-60.

- Brady, T., Agosto, L.M., Malani, N., Berry, C.C., O'Doherty, U. and Bushman, F., 2009. HIV integration site distributions in resting and activated CD4⁺ T cells infected in culture. *Aids* 23, 1461-71.
- Branzei, D. and Foiani, M., 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 297-308.
- Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J. and Elledge, S.J., 2008. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319, 921-6.
- Brin, E. and Leis, J., 2002. HIV-1 integrase interaction with U3 and U5 terminal sequences in vitro defined using substrates with random sequences. *J Biol Chem* 277, 18357-64.
- Broers, J.L. and Ramaekers, F.C., 2004. Dynamics of nuclear lamina assembly and disassembly. *Symp Soc Exp Biol*, 177-92.
- Broers, J.L., Ramaekers, F.C., Bonne, G., Yaou, R.B. and Hutchison, C.J., 2006. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev* 86, 967-1008.
- Brussel, A. and Sonigo, P., 2003. Analysis of early human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis by use of a new sensitive assay for quantifying integrated provirus. *J Virol* 77, 10119-24.
- Bryant, C. and Fitzgerald, K.A., 2009. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol* 19, 455-64.
- Bu, Y., Suenaga, Y., Okoshi, R., Sang, M., Kubo, N., Song, F., Nakagawara, A. and Ozaki, T., NFBD1/MDC1 participates in the regulation of G2/M transition in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 397, 157-62.
- Buhler, M., 2009. RNA turnover and chromatin-dependent gene silencing. *Chromosoma* 118, 141-51.
- Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A. and Stevenson, M., 1998. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med* 188, 2113-25.
- Burkle, A., 2006. DNA repair and PARP in aging. *Free Radic Res* 40, 1295-302.
- Burma, S., Chen, B.P. and Chen, D.J., 2006. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* 5, 1042-8.
- Bushell, M. and Sarnow, P., 2002. Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J Cell Biol* 158, 395-9.
- Bushman, F., 2003. Measuring covert HIV replication during HAART: the abundance of 2-LTR circles is not a reliable marker. *Aids* 17, 749-50.
- Busschots, K., Vercammen, J., Emiliani, S., Benarous, R., Engelborghs, Y., Christ, F. and Debyser, Z., 2005. The interaction of LEDGF/p75 with integrase is lentivirus-specific and promotes DNA binding. *J Biol Chem* 280, 17841-7.
- Busschots, K., Voet, A., De Maeyer, M., Rain, J.C., Emiliani, S., Benarous, R., Desender, L., Debyser, Z. and Christ, F., 2007. Identification of the LEDGF/p75 binding site in HIV-1 integrase. *J Mol Biol* 365, 1480-92.
- Butler, S.L., Hansen, M.S. and Bushman, F.D., 2001. A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. *Nat Med* 7, 631-4.
- Butler, S.L., Johnson, E.P. and Bushman, F.D., 2002. Human immunodeficiency virus cDNA metabolism: notable stability of two-long terminal repeat circles. *J Virol* 76, 3739-47.
- Buxade, M., Parra-Palau, J.L. and Proud, C.G., 2008. The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases). *Front Biosci* 13, 5359-73.

C

- Cai, M., Zheng, R., Caffrey, M., Craigie, R., Clore, G.M. and Gronenborn, A.M., 1997. Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase. *Nat Struct Biol* 4, 567-77.
- Cairns, B.R., 2005. Chromatin remodeling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Curr Opin Genet Dev* 15, 185-90.
- Caldwell, C.M. and Kaplan, K.B., 2009. The role of APC in mitosis and in chromosome instability. *Adv Exp Med Biol* 656, 51-64.
- Camozzi, D., Pignatelli, S., Valvo, C., Lattanzi, G., Capanni, C., Dal Monte, P. and Landini, M.P., 2008. Remodelling of the nuclear lamina during human cytomegalovirus infection: role of the viral proteins pUL50 and pUL53. *J Gen Virol* 89, 731-40.
- Campisi, J., 1998. The role of cellular senescence in skin aging. *J Investig Dermatol Symp Proc* 3, 1-5.
- Canepa, E.T., Scassa, M.E., Ceruti, J.M., Marazita, M.C., Carcagno, A.L., Sirkin, P.F. and Ogara, M.F., 2007. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* 59, 419-26.
- Carayon, K., Leh, H., Henry, E., Simon, F., Mouscadet, J.F. and Deprez, E., A cooperative and specific DNA-binding mode of HIV-1 integrase depends on the nature of the metallic cofactor and involves the zinc-containing N-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 38, 3692-708.
- Carlson, K.A., Ciborowski, P., Schellpeper, C.N., Biskup, T.M., Shen, R.F., Luo, X., Destache, C.J. and Gendelman, H.E., 2004. Proteomic fingerprinting of HIV-1-infected human monocyte-derived macrophages: a preliminary report. *J Neuroimmunol* 147, 35-42.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Piacentini, M. and Kroemer, G., 2005. p53-A pro-apoptotic signal transducer involved in AIDS. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 701-6.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T. and Kroemer, G., 2002. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 9, 1287-93.
- Cavaleiro, R., Brunn, G.J., Albuquerque, A.S., Victorino, R.M., Platt, J.L. and Sousa, A.E., 2007. Monocyte-mediated T cell suppression by HIV-2 envelope proteins. *Eur J Immunol* 37, 3435-44.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L. and Fischer, A., 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 669-72.
- Cereseto, A., Manganaro, L., Gutierrez, M.I., Terreni, M., Fittipaldi, A., Lusic, M., Marcello, A. and Giacca, M., 2005. Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration. *Embo J* 24, 3070-81.
- Chan, E.Y., Qian, W.J., Diamond, D.L., Liu, T., Gritsenko, M.A., Monroe, M.E., Camp, D.G., 2nd, Smith, R.D. and Katze, M.G., 2007. Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1-infected CD4+ cell proteome: dysregulated cell cycle progression and nuclear transport coincide with robust virus production. *J Virol* 81, 7571-83.
- Chan, E.Y., Sutton, J.N., Jacobs, J.M., Bondarenko, A., Smith, R.D. and Katze, M.G., 2009. Dynamic host energetics and cytoskeletal proteomes in human immunodeficiency

- virus type 1-infected human primary CD4 cells: analysis by multiplexed label-free mass spectrometry. *J Virol* 83, 9283-95.
- Chang, L.J., Lentiviral vector transduction of dendritic cells for novel vaccine strategies. *Methods Mol Biol* 614, 161-71.
- Chaplet, M., Rai, R., Jackson-Bernitsas, D., Li, K. and Lin, S.Y., 2006. BRIT1/MCPH1: a guardian of genome and an enemy of tumors. *Cell Cycle* 5, 2579-83.
- Charnay, N., Ivanyi-Nagy, R., Soto-Rifo, R., Ohlmann, T., Lopez-Lastra, M. and Darlix, J.L., 2009. Mechanism of HIV-1 Tat RNA translation and its activation by the Tat protein. *Retrovirology* 6, 74.
- Chen, H. and Engelman, A., 1998. The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15270-4.
- Chen, J.C., Krucinski, J., Miercke, L.J., Finer-Moore, J.S., Tang, A.H., Leavitt, A.D. and Stroud, R.M., 2000. Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8233-8.
- Cherepanov, P., Devroe, E., Silver, P.A. and Engelman, A., 2004. Identification of an evolutionarily conserved domain in human lens epithelium-derived growth factor/transcriptional co-activator p75 (LEDGF/p75) that binds HIV-1 integrase. *J Biol Chem* 279, 48883-92.
- Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., De Clercq, E. and Debyser, Z., 2003. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem* 278, 372-81.
- Cherepanov, P., Sun, Z.Y., Rahman, S., Maertens, G., Wagner, G. and Engelman, A., 2005. Solution structure of the HIV-1 integrase-binding domain in LEDGF/p75. *Nat Struct Mol Biol* 12, 526-32.
- Chin, C.F. and Yeong, F.M., Safeguarding entry into mitosis: the antephase checkpoint. *Mol Cell Biol* 30, 22-32.
- Ciuffi, A., 2008. Mechanisms governing lentivirus integration site selection. *Curr Gene Ther* 8, 419-29.
- Cockrell, A.S. and Kafri, T., 2007. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol* 36, 184-204.
- Coiras, M., Camafeita, E., Urena, T., Lopez, J.A., Caballero, F., Fernandez, B., Lopez-Huertas, M.R., Perez-Olmeda, M. and Alcamí, J., 2006. Modifications in the human T cell proteome induced by intracellular HIV-1 Tat protein expression. *Proteomics* 6 Suppl 1, S63-73.
- Coleman, J., Eaton, S., Merkel, G., Skalka, A.M. and Laue, T., 1999. Characterization of the self association of Avian sarcoma virus integrase by analytical ultracentrifugation. *J Biol Chem* 274, 32842-6.
- Coqueret, O., 2003. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 13, 65-70.
- Corallini, A., Sampaioles, R., Possati, L., Merlin, M., Bagnarelli, P., Piola, C., Fabris, M., Menegatti, M.A., Talevi, S., Gibellini, D., Rocchetti, R., Caputo, A. and Barbanti-Brodano, G., 2002. Inhibition of HIV-1 Tat activity correlates with down-regulation of bcl-2 and results in reduction of angiogenesis and oncogenicity. *Virology* 299, 1-7.
- Cory, S. and Adams, J.M., 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-56.
- Cossarizza, A., 2008. Apoptosis and HIV infection: about molecules and genes. *Curr Pharm Des* 14, 237-44.
- Coultas, L. and Strasser, A., 2000. The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis* 5, 491-507.

- Crocker, B., Crozat, K., Berger, M., Xia, Y., Sovath, S., Schaffer, L., Eleftherianos, I., Imler, J.L. and Beutler, B., 2007. ATP-sensitive potassium channels mediate survival during infection in mammals and insects. *Nat Genet* 39, 1453-60.
- Cronin, J., Zhang, X.Y. and Reiser, J., 2005. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* 5, 387-98.

D

- D'Costa, J., Mansfield, S.G. and Humeau, L.M., 2009. Lentiviral vectors in clinical trials: Current status. *Curr Opin Mol Ther* 11, 554-64.
- Dai, Y. and Grant, S., 2003. Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 3, 362-70.
- Dalal, Y., 2009. Epigenetic specification of centromeres. *Biochem Cell Biol* 87, 273-82.
- Dang, Y., Wang, X., Esselman, W.J. and Zheng, Y.H., 2006. Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. *J Virol* 80, 10522-33.
- Daniel, R., Greger, J.G., Katz, R.A., Taganov, K.D., Wu, X., Kappes, J.C. and Skalka, A.M., 2004a. Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the nonhomologous end joining repair pathway. *J Virol* 78, 8573-81.
- Daniel, R., Kao, G., Taganov, K., Greger, J.G., Favorova, O., Merkel, G., Yen, T.J., Katz, R.A. and Skalka, A.M., 2003. Evidence that the retroviral DNA integration process triggers an ATR-dependent DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4778-83.
- Daniel, R., Katz, R.A., Merkel, G., Hittle, J.C., Yen, T.J. and Skalka, A.M., 2001. Wortmannin potentiates integrase-mediated killing of lymphocytes and reduces the efficiency of stable transduction by retroviruses. *Mol Cell Biol* 21, 1164-72.
- Daniel, R., Katz, R.A. and Skalka, A.M., 1999. A role for DNA-PK in retroviral DNA integration. *Science* 284, 644-7.
- Daniel, R., Marusich, E., Argyris, E., Zhao, R.Y., Skalka, A.M. and Pomerantz, R.J., 2005. Caffeine inhibits human immunodeficiency virus type 1 transduction of nondividing cells. *J Virol* 79, 2058-65.
- Daniel, R., Ramcharan, J., Rogakou, E., Taganov, K.D., Greger, J.G., Bonner, W., Nussenzweig, A., Katz, R.A. and Skalka, A.M., 2004b. Histone H2AX is phosphorylated at sites of retroviral DNA integration but is dispensable for postintegration repair. *J Biol Chem* 279, 45810-4.
- Daniels, M.J., Marson, A. and Venkitaraman, A.R., 2004. PML bodies control the nuclear dynamics and function of the CHFR mitotic checkpoint protein. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1114-21.
- Das, S.R. and Jameel, S., 2005. Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med Res* 121, 315-32.
- de Bruin, R.A. and Wittenberg, C., 2009. All eukaryotes: before turning off G1-S transcription, please check your DNA. *Cell Cycle* 8, 214-7.
- De Palma, M., Montini, E., Santoni de Sio, F.R., Benedicenti, F., Gentile, A., Medico, E. and Naldini, L., 2005. Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells. *Blood* 105, 2307-15.

- Dehart, J.L., Andersen, J.L., Zimmerman, E.S., Ardon, O., An, D.S., Blackett, J., Kim, B. and Planelles, V., 2005. The ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related protein is dispensable for retroviral integration. *J Virol* 79, 1389-96.
- Delelis, O., Carayon, K., Saib, A., Deprez, E. and Mouscadet, J.F., 2008. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology* 5, 114.
- Demaison, C., Parsley, K., Brouns, G., Scherr, M., Battmer, K., Kinnon, C., Grez, M. and Thrasher, A.J., 2002. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 13, 803-13.
- Demon, D., Van Damme, P., Berghe, T.V., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Gevaert, K. and Vandenabeele, P., 2009. Caspase substrates: easily caught in deep waters? *Trends Biotechnol* 27, 680-8.
- Denard, J., Rundwasser, S., Laroudie, N., Gonnet, F., Naldini, L., Radrizzani, M., Galy, A., Merten, O.W., Danos, O. and Svinartchouk, F., 2009. Quantitative proteomic analysis of lentiviral vectors using 2-DE. *Proteomics* 9, 3666-76.
- Deng, Y. and Chang, S., 2007. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Lab Invest* 87, 1071-6.
- Denizot, M., Varbanov, M., Espert, L., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Garcia, E., Curriu, M., Mamoun, R., Blanco, J. and Biard-Piechaczyk, M., 2008. HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. *Autophagy* 4, 998-1008.
- Deprez, E., Tauc, P., Leh, H., Mouscadet, J.F., Auclair, C., Hawkins, M.E. and Brochon, J.C., 2001. DNA binding induces dissociation of the multimeric form of HIV-1 integrase: a time-resolved fluorescence anisotropy study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10090-5.
- Desfarges, S., San Filippo, J., Fournier, M., Calmels, C., Caumont-Sarcos, A., Litvak, S., Sung, P. and Parissi, V., 2006. Chromosomal integration of LTR-flanked DNA in yeast expressing HIV-1 integrase: down regulation by RAD51. *Nucleic Acids Res* 34, 6215-24.
- Dewannieux, M., Esnault, C. and Heidmann, T., 2003. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet* 35, 41-8.
- Diebold, I., Flugel, D., Becht, S., Belaiba, R.S., Bonello, S., Hess, J., Kietzmann, T. and Gorch, A., The hypoxia-inducible factor-2alpha is stabilized by oxidative stress involving NOX4. *Antioxid Redox Signal* 13, 425-36.
- Dimitri, P., Caizzi, R., Giordano, E., Carmela Accardo, M., Lattanzi, G. and Biamonti, G., 2009. Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma* 118, 419-35.
- Dinant, C. and Luijsterburg, M.S., 2009. The emerging role of HP1 in the DNA damage response. *Mol Cell Biol* 29, 6335-40.
- Doehle, B.P., Hladik, F., McNevin, J.P., McElrath, M.J. and Gale, M., Jr., 2009. Human immunodeficiency virus type 1 mediates global disruption of innate antiviral signaling and immune defenses within infected cells. *J Virol* 83, 10395-405.
- Donigan, K.A. and Sweasy, J.B., 2009. Sequence context-specific mutagenesis and base excision repair. *Mol Carcinog* 48, 362-8.
- Downs, J.A. and Cote, J., 2005. Dynamics of chromatin during the repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* 4, 1373-6.
- Duensing, S. and Munger, K., 2001. Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. *Biochim Biophys Acta* 1471, M81-8.
- Durocher, D. and Jackson, S.P., 2001. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol* 13, 225-31.

Dyda, F., Hickman, A.B., Jenkins, T.M., Engelman, A., Craigie, R. and Davies, D.R., 1994. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science* 266, 1981-6.

E

Eijkelenboom, A.P., van den Ent, F.M., Vos, A., Doreleijers, J.F., Hard, K., Tullius, T.D., Plasterk, R.H., Kaptein, R. and Boelens, R., 1997. The solution structure of the amino-terminal HHCC domain of HIV-2 integrase: a three-helix bundle stabilized by zinc. *Curr Biol* 7, 739-46.

Eisemann, J., Muhl-Zurbes, P., Steinkasserer, A. and Kummer, M., 2007. Infection of mature dendritic cells with herpes simplex virus type 1 interferes with the interferon signaling pathway. *Immunobiology* 212, 877-86.

Emiliani, S., Mousnier, A., Busschots, K., Maroun, M., Van Maele, B., Tempe, D., Vandekerckhove, L., Moisan, F., Ben-Slama, L., Witvrouw, M., Christ, F., Rain, J.C., Dargemont, C., Debyser, Z. and Benarous, R., 2005. Integrase mutants defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and HIV-1 replication. *J Biol Chem* 280, 25517-23.

Engelman, A., 1999. In vivo analysis of retroviral integrase structure and function. *Adv Virus Res* 52, 411-26.

Engelman, A., 2005. The ups and downs of gene expression and retroviral DNA integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1275-6.

Engelman, A., Bushman, F.D. and Craigie, R., 1993. Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex. *Embo J* 12, 3269-75.

Engelman, A. and Cherepanov, P., 2008. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog* 4, e1000046.

Engelman, A. and Craigie, R., 1992. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J Virol* 66, 6361-9.

Engelman, A., Hickman, A.B. and Craigie, R., 1994. The core and carboxyl-terminal domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 each contribute to nonspecific DNA binding. *J Virol* 68, 5911-7.

Escors, D. and Breckpot, K., Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58, 107-19.

Esnault, C., Maestre, J. and Heidmann, T., 2000. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet* 24, 363-7.

Espert, L. and Biard-Piechaczyk, M., 2009. Autophagy in HIV-induced T cell death. *Curr Top Microbiol Immunol* 335, 307-21.

Espert, L., Denizot, M., Grimaldi, M., Robert-Hebmann, V., Gay, B., Varbanov, M., Codogno, P. and Biard-Piechaczyk, M., 2007. Autophagy and CD4⁺ T lymphocyte destruction by HIV-1. *Autophagy* 3, 32-4.

Even, Y., Durieux, S., Escande, M.L., Lozano, J.C., Peaucellier, G., Weil, D. and Genevieve, A.M., 2006. CDC2L5, a Cdk-like kinase with RS domain, interacts with the ASF/SF2-associated protein p32 and affects splicing in vivo. *J Cell Biochem* 99, 890-904.

Everett, R.D. and Chelbi-Alix, M.K., 2007. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89, 819-30.

F

- Farley, D.C., Iqbal, S., Smith, J.C., Miskin, J.E., Kingsman, S.M. and Mitrophanous, K.A., 2007. Factors that influence VSV-G pseudotyping and transduction efficiency of lentiviral vectors-in vitro and in vivo implications. *J Gene Med* 9, 345-56.
- Farnebo, M., Bykov, V.J. and Wiman, K.G., The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 85-9.
- Farnet, C.M. and Bushman, F.D., 1997. HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* 88, 483-92.
- Farnet, C.M. and Haseltine, W.A., 1991. Circularization of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro. *J Virol* 65, 6942-52.
- Faure, A., Calmels, C., Desjobert, C., Castroviejo, M., Caumont-Sarcos, A., Tarrago-Litvak, L., Litvak, S. and Parissi, V., 2005. HIV-1 integrase crosslinked oligomers are active in vitro. *Nucleic Acids Res* 33, 977-86.
- Fillingham, J., Keogh, M.C. and Krogan, N.J., 2006. GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochem Cell Biol* 84, 568-77.
- Fischer, P.M., Endicott, J. and Meijer, L., 2003. Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Prog Cell Cycle Res* 5, 235-48.
- Fletcher, T.M., 3rd, Soares, M.A., McPhearson, S., Hui, H., Wiskerchen, M., Muesing, M.A., Shaw, G.M., Leavitt, A.D., Boeke, J.D. and Hahn, B.H., 1997. Complementation of integrase function in HIV-1 virions. *Embo J* 16, 5123-38.
- Ford, J.M., 2005. Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. *Mutat Res* 577, 195-202.
- Frecha, C., Costa, C., Negre, D., Gauthier, E., Russell, S.J., Cosset, F.L. and Verhoeven, E., 2008a. Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. *Blood* 112, 4843-52.
- Frecha, C., Szecsi, J., Cosset, F.L. and Verhoeven, E., 2008b. Strategies for targeting lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* 8, 449-60.
- Freed, E.O., 2001. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 26, 13-33.
- Freed, E.O. and Mouland, A.J., 2006. The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology* 3, 77.
- Fujita, R., Matsuyama, T., Yamagishi, J., Sahara, K., Asano, S. and Bando, H., 2006. Expression of Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus genes in mammalian cells and upregulation of the host beta-actin gene. *J Virol* 80, 2390-5.
- Fuller, B.G. and Stukenberg, P.T., 2009. Cell division: righting the check. *Curr Biol* 19, R550-3.
- Funderburk, S.F., Wang, Q.J. and Yue, Z., The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol* 20, 355-62.

G

- Galons, H., Oumata, N. and Meijer, L., Cyclin-dependent kinase inhibitors: a survey of recent patent literature. *Expert Opin Ther Pat* 20, 377-404.

- Gao, K., Butler, S.L. and Bushman, F., 2001. Human immunodeficiency virus type 1 integrase: arrangement of protein domains in active cDNA complexes. *Embo J* 20, 3565-76.
- Gao, X., Hou, Y., Ebina, H., Levin, H.L. and Voytas, D.F., 2008. Chromodomains direct integration of retrotransposons to heterochromatin. *Genome Res* 18, 359-69.
- Garcia-Dominguez, M. and Reyes, J.C., 2009. SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *Biochim Biophys Acta* 1789, 451-9.
- Gasparini, P., Sozzi, G. and Pierotti, M.A., 2007. The role of chromosomal alterations in human cancer development. *J Cell Biochem* 102, 320-31.
- Gatz, S.A. and Wiesmuller, L., 2006. p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ* 13, 1003-16.
- Ge, H., Si, Y. and Roeder, R.G., 1998. Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *Embo J* 17, 6723-9.
- Geiss, G.K., Bumgarner, R.E., An, M.C., Agy, M.B., van 't Wout, A.B., Hammersmark, E., Carter, V.S., Upchurch, D., Mullins, J.I. and Katze, M.G., 2000. Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology* 266, 8-16.
- Genin, P., Vaccaro, A. and Civas, A., 2009. The role of differential expression of human interferon- α genes in antiviral immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 283-95.
- Geraerts, M., Willems, S., Baekelandt, V., Debyser, Z. and Gijssbers, R., 2006. Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnol* 6, 34.
- Giacinti, C. and Giordano, A., 2006. RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25, 5220-7.
- Ginn, S.L., Fleming, J., Rowe, P.B. and Alexander, I.E., 2003. Promoter interference mediated by the U3 region in early-generation HIV-1-derived lentivirus vectors can influence detection of transgene expression in a cell-type and species-specific manner. *Hum Gene Ther* 14, 1127-37.
- Giono, L.E. and Manfredi, J.J., 2006. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J Cell Physiol* 209, 13-20.
- Giri, M.S., Nebozhyn, M., Showe, L. and Montaner, L.J., 2006. Microarray data on gene modulation by HIV-1 in immune cells: 2000-2006. *J Leukoc Biol* 80, 1031-43.
- Glover, T.W., Arlt, M.F., Casper, A.M. and Durkin, S.G., 2005. Mechanisms of common fragile site instability. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2, R197-205.
- Goff, S.P., 2004. Retrovirus restriction factors. *Mol Cell* 16, 849-59.
- Goff, S.P., 2007. Host factors exploited by retroviruses. *Nat Rev Microbiol* 5, 253-63.
- Goffinet, C., Allespach, I., Homann, S., Tervo, H.M., Habermann, A., Rupp, D., Oberbremer, L., Kern, C., Tibroni, N., Welsch, S., Krijnse-Locker, J., Banting, G., Krausslich, H.G., Fackler, O.T. and Keppler, O.T., 2009. HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor. *Cell Host Microbe* 5, 285-97.
- Goila-Gaur, R., Khan, M.A., Miyagi, E., Kao, S., Opi, S., Takeuchi, H. and Strebel, K., 2008. HIV-1 Vif promotes the formation of high molecular mass APOBEC3G complexes. *Virology* 372, 136-46.
- Goila-Gaur, R. and Strebel, K., 2008. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* 5, 51.
- Goldgur, Y., Dyda, F., Hickman, A.B., Jenkins, T.M., Craigie, R. and Davies, D.R., 1998. Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: an active site that binds magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9150-4.
- Gonzalvez, F. and Ashkenazi, A., New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene*.

- Gossen, M. and Bujard, H., 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-51.
- Gougeon, M.L. and Piacentini, M., 2009. New insights on the role of apoptosis and autophagy in HIV pathogenesis. *Apoptosis* 14, 501-8.
- Greene, W.C. and Peterlin, B.M., 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8, 673-80.
- Griese, J.J., Witte, G. and Hopfner, K.P., Structure and DNA binding activity of the mouse condensin hinge domain highlight common and diverse features of SMC proteins. *Nucleic Acids Res* 38, 3454-65.
- Gruh, I., Wunderlich, S., Winkler, M., Schwanke, K., Heinke, J., Blomer, U., Ruhparwar, A., Rohde, B., Li, R.K., Haverich, A. and Martin, U., 2008. Human CMV immediate-early enhancer: a useful tool to enhance cell-type-specific expression from lentiviral vectors. *J Gene Med* 10, 21-32.
- Grutter, M.G., 2000. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 10, 649-55.
- Guatelli, J.C., 2009. Interactions of viral protein U (Vpu) with cellular factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 339, 27-45.
- Gudmundsdottir, K. and Ashworth, A., 2006. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* 25, 5864-74.
- Guiot, E., Carayon, K., Delelis, O., Simon, F., Tauc, P., Zubin, E., Gottikh, M., Mouscadet, J.F., Brochon, J.C. and Deprez, E., 2006. Relationship between the oligomeric status of HIV-1 integrase on DNA and enzymatic activity. *J Biol Chem* 281, 22707-19.

H

- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J.I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L.E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T.H., Le Deist, F., Fischer, A. and Cavazzana-Calvo, M., 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-9.
- Haffar, O.K., Popov, S., Dubrovsky, L., Agostini, I., Tang, H., Pushkarsky, T., Nadler, S.G. and Bukrinsky, M., 2000. Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *J Mol Biol* 299, 359-68.
- Hall, A., 2009. The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28, 5-14.
- Han, Y., Wang, X., Dang, Y. and Zheng, Y.H., 2008. Demonstration of a novel HIV-1 restriction phenotype from a human T cell line. *PLoS One* 3, e2796.
- Handt, O., Sutherland, G.R. and Richards, R.I., 2000. Fragile sites and minisatellite repeat instability. *Mol Genet Metab* 70, 99-105.
- Hare, S., Gupta, S.S., Valkov, E., Engelman, A. and Cherepanov, P., Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* 464, 232-6.
- Harris, R.S. and Liddament, M.T., 2004. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* 4, 868-77.
- Hatzioannou, T., Perez-Caballero, D., Cowan, S. and Bieniasz, P.D., 2005. Cyclophilin interactions with incoming human immunodeficiency virus type 1 capsids with opposing effects on infectivity in human cells. *J Virol* 79, 176-83.

- Helton, E.S. and Chen, X., 2007. p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem* 100, 883-96.
- Henderson, A., Bunce, M., Siddon, N., Reeves, R. and Tremethick, D.J., 2000. High-mobility-group protein I can modulate binding of transcription factors to the U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 proviral promoter. *J Virol* 74, 10523-34.
- Henderson, A., Holloway, A., Reeves, R. and Tremethick, D.J., 2004. Recruitment of SWI/SNF to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol* 24, 389-97.
- Heuer, T.S. and Brown, P.O., 1997. Mapping features of HIV-1 integrase near selected sites on viral and target DNA molecules in an active enzyme-DNA complex by photo-cross-linking. *Biochemistry* 36, 10655-65.
- Hindmarsh, P., Ridky, T., Reeves, R., Andrade, M., Skalka, A.M. and Leis, J., 1999. HMG protein family members stimulate human immunodeficiency virus type 1 and avian sarcoma virus concerted DNA integration in vitro. *J Virol* 73, 2994-3003.
- Holmes, R.K., Malim, M.H. and Bishop, K.N., 2007. APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci* 32, 118-28.
- Hombrouck, A., De Rijck, J., Hendrix, J., Vandekerckhove, L., Voet, A., De Maeyer, M., Witvrouw, M., Engelborghs, Y., Christ, F., Gijsbers, R. and Debyser, Z., 2007. Virus evolution reveals an exclusive role for LEDGF/p75 in chromosomal tethering of HIV. *PLoS Pathog* 3, e47.
- Honda, R., Lowe, E.D., Dubinina, E., Skamnaki, V., Cook, A., Brown, N.R. and Johnson, L.N., 2005. The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles. *Embo J* 24, 452-63.
- Huang, J., Gong, Z., Ghosal, G. and Chen, J., 2009. SOSS complexes participate in the maintenance of genomic stability. *Mol Cell* 35, 384-93.
- Huang, L., Xu, G.L., Zhang, J.Q., Tian, L., Xue, J.L., Chen, J.Z. and Jia, W., 2008. Daxx interacts with HIV-1 integrase and inhibits lentiviral gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 241-5.
- Huen, M.S., Sy, S.M. and Chen, J., BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 138-48.
- Hughes, P.D., Belz, G.T., Fortner, K.A., Budd, R.C., Strasser, A. and Bouillet, P., 2008. Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity* 28, 197-205.
- Hutcheson, J., Scatizzi, J.C., Siddiqui, A.M., Haines, G.K., 3rd, Wu, T., Li, Q.Z., Davis, L.S., Mohan, C. and Perlman, H., 2008. Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity* 28, 206-17.
- Hyrca, M.D., Kovacs, C., Loutfy, M., Halpenny, R., Heisler, L., Yang, S., Wilkins, O., Ostrowski, M. and Der, S.D., 2007. Distinct transcriptional profiles in ex vivo CD4+ and CD8+ T cells are established early in human immunodeficiency virus type 1 infection and are characterized by a chronic interferon response as well as extensive transcriptional changes in CD8+ T cells. *J Virol* 81, 3477-86.

I

- Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J. and Nakatani, Y., 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 102, 463-73.

- Imbeault, M., Ouellet, M. and Tremblay, M.J., 2009. Microarray study reveals that HIV-1 induces rapid type-I interferon-dependent p53 mRNA up-regulation in human primary CD4⁺ T cells. *Retrovirology* 6, 5.
- Iordanskiy, S., Berro, R., Altieri, M., Kashanchi, F. and Bukrinsky, M., 2006. Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin. *Retrovirology* 3, 4.

J

- Jacque, J.M. and Stevenson, M., 2006. The inner-nuclear-envelope protein emerlin regulates HIV-1 infectivity. *Nature* 441, 641-5.
- Jakobsson, J., Ericson, C., Jansson, M., Bjork, E. and Lundberg, C., 2003. Targeted transgene expression in rat brain using lentiviral vectors. *J Neurosci Res* 73, 876-85.
- Jardim, M.J., Wang, Q., Furumai, R., Wakeman, T., Goodman, B.K. and Wang, X.F., 2009. Reduced ATR or Chk1 expression leads to chromosome instability and chemosensitization of mismatch repair-deficient colorectal cancer cells. *Mol Biol Cell* 20, 3801-9.
- Jeanson, L., Subra, F., Vaganay, S., Hervy, M., Marangoni, E., Bourhis, J. and Mouscadet, J.F., 2002. Effect of Ku80 depletion on the preintegrative steps of HIV-1 replication in human cells. *Virology* 300, 100-8.
- Jenkins, T.M., Engelman, A., Ghirlando, R. and Craigie, R., 1996. A soluble active mutant of HIV-1 integrase: involvement of both the core and carboxyl-terminal domains in multimerization. *J Biol Chem* 271, 7712-8.
- Jenkins, T.M., Esposito, D., Engelman, A. and Craigie, R., 1997. Critical contacts between HIV-1 integrase and viral DNA identified by structure-based analysis and photo-crosslinking. *Embo J* 16, 6849-59.
- Johnson, A.A., Santos, W., Pais, G.C., Marchand, C., Amin, R., Burke, T.R., Jr., Verdine, G. and Pommier, Y., 2006. Integration requires a specific interaction of the donor DNA terminal 5'-cytosine with glutamine 148 of the HIV-1 integrase flexible loop. *J Biol Chem* 281, 461-7.
- Johnson, R.M., Ho, Y.S., Yu, D.Y., Kuypers, F.A., Ravindranath, Y. and Goyette, G.W., The effects of disruption of genes for peroxiredoxin-2, glutathione peroxidase-1, and catalase on erythrocyte oxidative metabolism. *Free Radic Biol Med* 48, 519-25.
- Jones, K.S., Coleman, J., Merkel, G.W., Laue, T.M. and Skalka, A.M., 1992. Retroviral integrase functions as a multimer and can turn over catalytically. *J Biol Chem* 267, 16037-40.
- Junn, E., Taniguchi, H., Jeong, B.S., Zhao, X., Ichijo, H. and Mouradian, M.M., 2005. Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9691-6.

K

- Kafri, T., van Praag, H., Gage, F.H. and Verma, I.M., 2000. Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol Ther* 1, 516-21.
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F. and Caput, D., 1997.

- Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90, 809-19.
- Kalb, R., Neveling, K., Nanda, I., Schindler, D. and Hoehn, H., 2006. Fanconi anemia: causes and consequences of genetic instability. *Genome Dyn* 1, 218-42.
- Kalpana, G.V., Marmon, S., Wang, W., Crabtree, G.R. and Goff, S.P., 1994. Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science* 266, 2002-6.
- Kastan, M.B. and Bartek, J., 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-23.
- Katzman, M. and Sudol, M., 1995. Mapping domains of retroviral integrase responsible for viral DNA specificity and target site selection by analysis of chimeras between human immunodeficiency virus type 1 and visna virus integrases. *J Virol* 69, 5687-96.
- Kavallaris, M., Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer* 10, 194-204.
- Kazazian, H.H., Jr. and Goodier, J.L., 2002. LINE drive. retrotransposition and genome instability. *Cell* 110, 277-80.
- Kerzendorfer, C. and O'Driscoll, M., 2009. Human DNA damage response and repair deficiency syndromes: linking genomic instability and cell cycle checkpoint proficiency. *DNA Repair (Amst)* 8, 1139-52.
- Khan, M.A., Goila-Gaur, R., Opi, S., Miyagi, E., Takeuchi, H., Kao, S. and Strebel, K., 2007. Analysis of the contribution of cellular and viral RNA to the packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions. *Retrovirology* 4, 48.
- Khiytani, D.K. and Dimmock, N.J., 2002. Characterization of a human immunodeficiency virus type 1 pre-integration complex in which the majority of the cDNA is resistant to DNase I digestion. *J Gen Virol* 83, 2523-32.
- Konig, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T.L., Bonamy, G.M., Irelan, J.T., Chiang, C.Y., Tu, B.P., De Jesus, P.D., Lilley, C.E., Seidel, S., Opaluch, A.M., Caldwell, J.S., Weitzman, M.D., Kuhen, K.L., Bandyopadhyay, S., Ideker, T., Orth, A.P., Miraglia, L.J., Bushman, F.D., Young, J.A. and Chanda, S.K., 2008. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135, 49-60.
- Krammer, P.H., Kaminski, M., Kiessling, M. and Gulow, K., 2007. No life without death. *Adv Cancer Res* 97, 111-38.
- Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S., 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388, 621-5.
- Kumari, D., Somma, V., Nakamura, A.J., Bonner, W.M., D'Ambrosio, E. and Usdin, K., 2009. The role of DNA damage response pathways in chromosome fragility in Fragile X syndrome. *Nucleic Acids Res* 37, 4385-92.
- Kundu, S. and Peterson, C.L., 2009. Role of chromatin states in transcriptional memory. *Biochim Biophys Acta* 1790, 445-55.
- Kunkel, T.A. and Erie, D.A., 2005. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 74, 681-710.
- Kuppers, R. and Dalla-Favera, R., 2001. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20, 5580-94.
- Kuribayashi, K. and El-Deiry, W.S., 2008. Regulation of programmed cell death by the p53 pathway. *Adv Exp Med Biol* 615, 201-21.
- Kurokawa, M. and Kornbluth, S., 2009. Caspases and kinases in a death grip. *Cell* 138, 838-54.

L

- La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J.M. and Raoult, D., 2003. A giant virus in amoebae. *Science* 299, 2033.
- La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I., Robert, C., Barrassi, L., Fournous, G., Merchat, M., Suzan-Monti, M., Forterre, P., Koonin, E. and Raoult, D., 2008. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* 455, 100-4.
- Lavigne, M., Eskeland, R., Azebi, S., Saint-Andre, V., Jang, S.M., Batsche, E., Fan, H.Y., Kingston, R.E., Imhof, A. and Muchardt, C., 2009. Interaction of HP1 and Brg1/Brm with the globular domain of histone H3 is required for HP1-mediated repression. *PLoS Genet* 5, e1000769.
- Le Rouzic, E. and Benichou, S., 2005. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* 2, 11.
- Lee, J., Reddy, R., Barsky, L., Weinberg, K. and Driscoll, B., 2006. Contribution of proliferation and DNA damage repair to alveolar epithelial type 2 cell recovery from hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L685-L694.
- Lee, J.S. and Reiner, N.E., 2009. Stable lentiviral vector-mediated gene silencing in human monocytic cell lines. *Methods Mol Biol* 531, 287-300.
- Lees-Miller, S.P., 2006. Dysfunction of lamin A triggers a DNA damage response and cellular senescence. *DNA Repair (Amst)* 5, 286-9.
- Lener, B., Koziel, R., Pircher, H., Hutter, E., Greussing, R., Herndler-Brandstetter, D., Hermann, M., Unterluggauer, H. and Jansen-Durr, P., 2009. The NADPH oxidase Nox4 restricts the replicative lifespan of human endothelial cells. *Biochem J* 423, 363-74.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B., 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-9.
- Levin, A., Rosenbluh, J., Hayouka, Z., Friedler, A. and Loyter, A., Integration of HIV-1 DNA is regulated by interplay between viral rev and cellular LEDGF/p75 proteins. *Mol Med* 16, 34-44.
- Levin, J.G., Guo, J., Rouzina, I. and Musier-Forsyth, K., 2005. Nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: critical role in reverse transcription and molecular mechanism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 80, 217-86.
- Levy, J.A., 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 57, 183-289.
- Lewinski, M.K. and Bushman, F.D., 2005. Retroviral DNA integration--mechanism and consequences. *Adv Genet* 55, 147-81.
- Lewinski, M.K., Yamashita, M., Emerman, M., Ciuffi, A., Marshall, H., Crawford, G., Collins, F., Shinn, P., Leipzig, J., Hannenhalli, S., Berry, C.C., Ecker, J.R. and Bushman, F.D., 2006. Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathog* 2, e60.
- Li, L., Li, H.S., Pauza, C.D., Bukrinsky, M. and Zhao, R.Y., 2005. Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res* 15, 923-34.
- Li, L., Olvera, J.M., Yoder, K.E., Mitchell, R.S., Butler, S.L., Lieber, M., Martin, S.L. and Bushman, F.D., 2001a. Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *Embo J* 20, 3272-81.
- Li, M., Linseman, D.A., Allen, M.P., Meintzer, M.K., Wang, X., Laessig, T., Wierman, M.E. and Heidenreich, K.A., 2001b. Myocyte enhancer factor 2A and 2D undergo

- phosphorylation and caspase-mediated degradation during apoptosis of rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 21, 6544-52.
- Li, Q., Smith, A.J., Schacker, T.W., Carlis, J.V., Duan, L., Reilly, C.S. and Haase, A.T., 2009a. Microarray analysis of lymphatic tissue reveals stage-specific, gene expression signatures in HIV-1 infection. *J Immunol* 183, 1975-82.
- Li, Y., Bolderson, E., Kumar, R., Muniandy, P.A., Xue, Y., Richard, D.J., Seidman, M., Pandita, T.K., Khanna, K.K. and Wang, W., 2009b. HSSB1 and hSSB2 form similar multiprotein complexes that participate in DNA damage response. *J Biol Chem* 284, 23525-31.
- Lieber, M.R., 2008. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 283, 1-5.
- Lin, C.W. and Engelman, A., 2003. The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *J Virol* 77, 5030-6.
- Lisby, M. and Rothstein, R., 2005. Localization of checkpoint and repair proteins in eukaryotes. *Biochimie* 87, 579-89.
- Liu, K., Qian, L., Wang, J., Li, W., Deng, X., Chen, X., Sun, W., Wei, H., Qian, X., Jiang, Y. and He, F., 2009. Two-dimensional blue native/SDS-PAGE analysis reveals heat shock protein chaperone machinery involved in hepatitis B virus production in HepG2.2.15 cells. *Mol Cell Proteomics* 8, 495-505.
- Llano, M., Delgado, S., Vanegas, M. and Poeschla, E.M., 2004a. Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase. *J Biol Chem* 279, 55570-7.
- Llano, M., Vanegas, M., Fregoso, O., Saenz, D., Chung, S., Peretz, M. and Poeschla, E.M., 2004b. LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. *J Virol* 78, 9524-37.
- Llano, M., Vanegas, M., Hutchins, N., Thompson, D., Delgado, S. and Poeschla, E.M., 2006. Identification and characterization of the chromatin-binding domains of the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75. *J Mol Biol* 360, 760-73.
- Lloyd, R.E., 2006. Translational control by viral proteinases. *Virus Res* 119, 76-88.
- Logan, A.C., Nightingale, S.J., Haas, D.L., Cho, G.J., Pepper, K.A. and Kohn, D.B., 2004. Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 15, 976-88.
- Losada, A. and Hirano, T., 2005. Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev* 19, 1269-87.
- Lu, L.F. and Liston, A., 2009. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology* 127, 291-8.
- Lu, R., Limon, A., Ghory, H.Z. and Engelman, A., 2005. Genetic analyses of DNA-binding mutants in the catalytic core domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Virol* 79, 2493-505.
- Luban, J., Bossolt, K.L., Franke, E.K., Kalpana, G.V. and Goff, S.P., 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* 73, 1067-78.
- Luo, K., Wang, T., Liu, B., Tian, C., Xiao, Z., Kappes, J. and Yu, X.F., 2007. Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation. *J Virol* 81, 7238-48.
- Lusic, M., Marcello, A., Cereseto, A. and Giacca, M., 2003. Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. *Embo J* 22, 6550-61.

- Lutzke, R.A. and Plasterk, R.H., 1998. Structure-based mutational analysis of the C-terminal DNA-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: critical residues for protein oligomerization and DNA binding. *J Virol* 72, 4841-8.
- Lutzke, R.A., Vink, C. and Plasterk, R.H., 1994. Characterization of the minimal DNA-binding domain of the HIV integrase protein. *Nucleic Acids Res* 22, 4125-31.

M

- Mace, G., Briot, D., Guervilly, J.H. and Rosselli, F., 2007. [Fanconi anemia: cellular and molecular features]. *Pathol Biol (Paris)* 55, 19-28.
- Maddika, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K.D., Wiechec, E. and Los, M., 2007. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat* 10, 13-29.
- Maertens, G., Cherepanov, P., Debyser, Z., Engelborghs, Y. and Engelman, A., 2004. Identification and characterization of a functional nuclear localization signal in the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75. *J Biol Chem* 279, 33421-9.
- Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debyser, Z. and Engelborghs, Y., 2003. LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem* 278, 33528-39.
- Mahmoudi, T., Parra, M., Vries, R.G., Kauder, S.E., Verrijzer, C.P., Ott, M. and Verdin, E., 2006. The SWI/SNF chromatin-remodeling complex is a cofactor for Tat transactivation of the HIV promoter. *J Biol Chem* 281, 19960-8.
- Malanga, M. and Althaus, F.R., 2005. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. *Biochem Cell Biol* 83, 354-64.
- Malumbres, M. and Barbacid, M., 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-66.
- Mammas, I.N., Sourvinos, G., Giannoudis, A. and Spandidos, D.A., 2008. Human papilloma virus (HPV) and host cellular interactions. *Pathol Oncol Res* 14, 345-54.
- Manchado, E., Eguren, M. and Malumbres, M., The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions. *Biochem Soc Trans* 38, 65-71.
- Manjunath, N., Wu, H., Subramanya, S. and Shankar, P., 2009. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 732-45.
- Marculescu, R., Vanura, K., Montpellier, B., Roulland, S., Le, T., Navarro, J.M., Jager, U., McBlane, F. and Nadel, B., 2006. Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures. *DNA Repair (Amst)* 5, 1246-58.
- Martin-Rendon, E., White, L.J., Olsen, A., Mitrophanous, K.A. and Mazarakis, N.D., 2002. New methods to titrate EIAV-based lentiviral vectors. *Mol Ther* 5, 566-70.
- Mascarenhas, A.P. and Musier-Forsyth, K., 2009. The capsid protein of human immunodeficiency virus: interactions of HIV-1 capsid with host protein factors. *Febs J* 276, 6118-27.
- Masson, C., Bury-Mone, S., Guiot, E., Saez-Cirion, A., Schoevaert-Brossault, D., Brachet-Ducos, C., Delelis, O., Subra, F., Jeanson-Leh, L. and Mouscadet, J.F., 2007. Ku80 participates in the targeting of retroviral transgenes to the chromatin of CHO cells. *J Virol* 81, 7924-32.

- Masutani, H., Ueda, S. and Yodoi, J., 2005. The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1, 991-8.
- Matrai, J., Chuah, M.K. and VandenDriessche, T., Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol Ther* 18, 477-90.
- Matsusaka, T. and Pines, J., 2004. Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol* 166, 507-16.
- Mautino, M.R. and Morgan, R.A., 2002. Enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by novel lentiviral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope antisense RNA. *Hum Gene Ther* 13, 1027-37.
- Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., Lloyd, P. and Derse, D., Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS Pathog* 6, e1000788.
- McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M. and Hope, T.J., 2002. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* 159, 441-52.
- McKee, C.J., Kessl, J.J., Shkriabai, N., Dar, M.J., Engelman, A. and Kvaratskhelia, M., 2008. Dynamic modulation of HIV-1 integrase structure and function by cellular lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) protein. *J Biol Chem* 283, 31802-12.
- McNatt, M.W., Zang, T., Hatzioannou, T., Bartlett, M., Fofana, I.B., Johnson, W.E., Neil, S.J. and Bieniasz, P.D., 2009. Species-specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrane domain variants. *PLoS Pathog* 5, e1000300.
- Meaburn, K.J., Misteli, T. and Soutoglou, E., 2007. Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol* 17, 80-90.
- Mellone, B.G., 2009. Structural and temporal regulation of centromeric chromatin. *Biochem Cell Biol* 87, 255-64.
- Merad, H., Porumb, H., Zargarian, L., Rene, B., Hobaika, Z., Maroun, R.G., Mauffret, O. and Fermandjian, S., 2009. An unusual helix turn helix motif in the catalytic core of HIV-1 integrase binds viral DNA and LEDGF. *PLoS One* 4, e4081.
- Miao, L. and St Clair, D.K., 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med* 47, 344-56.
- Michellini, Z., Negri, D. and Cara, A., Integrase defective, nonintegrating lentiviral vectors. *Methods Mol Biol* 614, 101-10.
- Mieczkowski, P.A., Lemoine, F.J. and Petes, T.D., 2006. Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 5, 1010-20.
- Misteli, T. and Soutoglou, E., 2009. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 243-54.
- Mohn, F. and Schubeler, D., 2009. Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation. *Trends Genet* 25, 129-36.
- Mok, H.P. and Lever, A.M., 2007. Chromatin, gene silencing and HIV latency. *Genome Biol* 8, 228.
- Mollace, V., Salvemini, D., Riley, D.P., Muscoli, C., Iannone, M., Granato, T., Masuelli, L., Modesti, A., Rotiroti, D., Nistico, R., Bertoli, A., Perno, C.F. and Aquaro, S., 2002. The contribution of oxidative stress in apoptosis of human-cultured astroglial cells induced by supernatants of HIV-1-infected macrophages. *J Leukoc Biol* 71, 65-72.
- Montes de Oca, R., Shoemaker, C.J., Gucek, M., Cole, R.N. and Wilson, K.L., 2009. Barrier-to-autointegration factor proteome reveals chromatin-regulatory partners. *PLoS One* 4, e7050.

- Moreau, K., Faure, C., Violot, S., Gouet, P., Verdier, G. and Ronfort, C., 2004. Mutational analyses of the core domain of Avian Leukemia and Sarcoma Viruses integrase: critical residues for concerted integration and multimerization. *Virology* 318, 566-81.
- Moreau, K., Faure, C., Violot, S., Verdier, G. and Ronfort, C., 2003. Mutations in the C-terminal domain of ALSV (Avian Leukemia and Sarcoma Viruses) integrase alter the concerted DNA integration process in vitro. *Eur J Biochem* 270, 4426-38.
- Morgan, J.R., LeDoux, J.M., Snow, R.G., Tompkins, R.G. and Yarmush, M.L., 1995. Retrovirus infection: effect of time and target cell number. *J Virol* 69, 6994-7000.
- Movassagh, M. and Foo, R.S., 2008. Simplified apoptotic cascades. *Heart Fail Rev* 13, 111-9.
- Munshi, A., Shafi, G., Aliya, N. and Jyothy, A., 2009. Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics* 36, 75-88.
- Murawska, M., Kunert, N., van Vugt, J., Langst, G., Kremmer, E., Logie, C. and Brehm, A., 2008. dCHD3, a novel ATP-dependent chromatin remodeler associated with sites of active transcription. *Mol Cell Biol* 28, 2745-57.
- Murray-Zmijewski, F., Lane, D.P. and Bourdon, J.C., 2006. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* 13, 962-72.
- Murzina, N.V., Pei, X.Y., Zhang, W., Sparkes, M., Vicente-Garcia, J., Pratap, J.V., McLaughlin, S.H., Ben-Shahar, T.R., Verreault, A., Luisi, B.F. and Laue, E.D., 2008. Structural basis for the recognition of histone H4 by the histone-chaperone RbAp46. *Structure* 16, 1077-85.
- Musgrove, E.A., Davison, E.A. and Ormandy, C.J., 2004. Role of the CDK inhibitor p27 (Kip1) in mammary development and carcinogenesis: insights from knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 55-66.
- Muthumani, K., Choo, A.Y., Premkumar, A., Hwang, D.S., Thieu, K.P., Desai, B.M. and Weiner, D.B., 2005. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr-regulated cell death: insights into mechanism. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1, 962-70.

N

- Naim, V. and Rosselli, F., 2009. The FANC pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. *Nat Cell Biol* 11, 761-8.
- Nair, A., Xie, J., Joshi, S., Harden, P., Davies, J. and Hermiston, T., 2008. A rapid and efficient branched DNA hybridization assay to titer lentiviral vectors. *J Virol Methods* 153, 269-72.
- Nakai-Murakami, C., Shimura, M., Kinomoto, M., Takizawa, Y., Tokunaga, K., Taguchi, T., Hoshino, S., Miyagawa, K., Sata, T., Kurumizaka, H., Yuo, A. and Ishizaka, Y., 2007. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* 26, 477-86.
- Nakayama, K.I. and Nakayama, K., 2006. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 369-81.
- Nara, P.L., Hatch, W.C., Dunlop, N.M., Robey, W.G., Arthur, L.O., Gonda, M.A. and Fischinger, P.J., 1987. Simple, rapid, quantitative, syncytium-forming microassay for the detection of human immunodeficiency virus neutralizing antibody. *AIDS Res Hum Retroviruses* 3, 283-302.
- Nardinocchi, L., Puca, R., Sacchi, A. and D'Orazi, G., 2007. HIPK2 knock-down compromises tumor cell efficiency to repair damaged DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 249-55.

- Neil, S.J., Eastman, S.W., Jouvenet, N. and Bieniasz, P.D., 2006. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* 2, e39.
- Nisole, S., Stoye, J.P. and Saib, A., 2005. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 3, 799-808.
- Nunnari, G., Argyris, E., Fang, J., Mehlman, K.E., Pomerantz, R.J. and Daniel, R., 2005. Inhibition of HIV-1 replication by caffeine and caffeine-related methylxanthines. *Virology* 335, 177-84.

O

- O'Doherty, U., Swiggard, W.J., Jeyakumar, D., McGain, D. and Malim, M.H., 2002. A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration. *J Virol* 76, 10942-50.
- Oh, J. and Broyles, S.S., 2005. Host cell nuclear proteins are recruited to cytoplasmic vaccinia virus replication complexes. *J Virol* 79, 12852-60.
- Ohagen, A. and Gabuzda, D., 2000. Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* 74, 11055-66.
- Ohman, T., Rintahaka, J., Kalkkinen, N., Matikainen, S. and Nyman, T.A., 2009. Actin and RIG-I/MAVS signaling components translocate to mitochondria upon influenza A virus infection of human primary macrophages. *J Immunol* 182, 5682-92.
- Okamoto, S., Li, Z., Ju, C., Scholzke, M.N., Mathews, E., Cui, J., Salvesen, G.S., Bossy-Wetzel, E. and Lipton, S.A., 2002. Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3974-9.
- Ou, W. and Silver, J., 2006. Role of protein disulfide isomerase and other thiol-reactive proteins in HIV-1 envelope protein-mediated fusion. *Virology* 350, 406-17.

P

- Paiardini, M., Cervasi, B., Dunham, R., Sumpter, B., Radziewicz, H. and Silvestri, G., 2004. Cell-cycle dysregulation in the immunopathogenesis of AIDS. *Immunol Res* 29, 253-68.
- Pandey, K.K., Sinha, S. and Grandgenett, D.P., 2007. Transcriptional coactivator LEDGF/p75 modulates human immunodeficiency virus type 1 integrase-mediated concerted integration. *J Virol* 81, 3969-79.
- Parissi, V., Calmels, C., De Soultrait, V.R., Caumont, A., Fournier, M., Chaignepain, S. and Litvak, S., 2001. Functional interactions of human immunodeficiency virus type 1 integrase with human and yeast HSP60. *J Virol* 75, 11344-53.
- Park, N.H., Song, I.H. and Chung, Y.H., 2007. Molecular Pathogenesis of Hepatitis-B-virus-associated Hepatocellular Carcinoma. *Gut Liver* 1, 101-17.
- Parker, D.G., Coster, D.J., Brereton, H.M., Hart, P.H., Koldej, R., Anson, D.S. and Williams, K.A., Lentivirus-mediated gene transfer of interleukin 10 to the ovine and human cornea. *Clin Experiment Ophthalmol* 38, 405-13.
- Patel, A.N., Goyal, S., Wu, H., Schiff, D., Moran, M.S. and Haffty, B.G., Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1) expression as a prognostic marker for nodal

- recurrence in early-stage breast cancer patients treated with breast-conserving surgery and radiation therapy. *Breast Cancer Res Treat*.
- Pauwels, K., Gijssbers, R., Toelen, J., Schambach, A., Willard-Gallo, K., Verheust, C., Debyser, Z. and Herman, P., 2009. State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. *Curr Gene Ther* 9, 459-74.
- Pauza, C.D., Galindo, J.E. and Richman, D.D., 1990. Reinfection results in accumulation of unintegrated viral DNA in cytopathic and persistent human immunodeficiency virus type 1 infection of CEM cells. *J Exp Med* 172, 1035-42.
- Payton, M. and Coats, S., 2002. Cyclin E2, the cycle continues. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 315-20.
- Payton, M., Scully, S., Chung, G. and Coats, S., 2002. Deregulation of cyclin E2 expression and associated kinase activity in primary breast tumors. *Oncogene* 21, 8529-34.
- Pellinen, R., Hakkarainen, T., Wahlfors, T., Tulimaki, K., Ketola, A., Tenhunen, A., Salonen, T. and Wahlfors, J., 2004. Cancer cells as targets for lentivirus-mediated gene transfer and gene therapy. *Int J Oncol* 25, 1753-62.
- Pennarun, B., Meijer, A., de Vries, E.G., Kleibeuker, J.H., Kruijt, F. and de Jong, S., Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1805, 123-40.
- Perfettini, J.L., Roumier, T., Castedo, M., Larochette, N., Boya, P., Raynal, B., Lazar, V., Ciccocanti, F., Nardacci, R., Penninger, J., Piacentini, M. and Kroemer, G., 2004. NF-kappaB and p53 are the dominant apoptosis-inducing transcription factors elicited by the HIV-1 envelope. *J Exp Med* 199, 629-40.
- Petit, C., Schwartz, O. and Mammano, F., 1999. Oligomerization within virions and subcellular localization of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Virol* 73, 5079-88.
- Pierson, T.C., Zhou, Y., Kieffer, T.L., Ruff, C.T., Buck, C. and Siliciano, R.F., 2002. Molecular characterization of preintegration latency in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 76, 8518-31.
- Pietsch, E.C., Sykes, S.M., McMahon, S.B. and Murphy, M.E., 2008. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 27, 6507-21.
- Pluta, K. and Kacprzak, M.M., 2009. Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochim Pol* 56, 531-95.
- Podtelezchnikov, A.A., Gao, K., Bushman, F.D. and McCammon, J.A., 2003. Modeling HIV-1 integrase complexes based on their hydrodynamic properties. *Biopolymers* 68, 110-20.
- Pond, S.J., Ridgeway, W.K., Robertson, R., Wang, J. and Millar, D.P., 2009. HIV-1 Rev protein assembles on viral RNA one molecule at a time. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1404-8.
- Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M.A., Ratner, L., Lane, C.M., Moore, M.S., Blobel, G. and Bukrinsky, M., 1998. Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Embo J* 17, 909-17.
- Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E. and Gallo, R.C., 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224, 497-500.
- Postigo, A. and Ferrer, P.E., 2009. Viral inhibitors reveal overlapping themes in regulation of cell death and innate immunity. *Microbes Infect* 11, 1071-8.
- Prives, C., 1998. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 95, 5-8.
- Privette, L.M., Weier, J.F., Nguyen, H.N., Yu, X. and Petty, E.M., 2008. Loss of CHFR in human mammary epithelial cells causes genomic instability by disrupting the mitotic spindle assembly checkpoint. *Neoplasia* 10, 643-52.

- Pugliese, A., Vidotto, V., Beltramo, T., Petrini, S. and Torre, D., 2005. A review of HIV-1 Tat protein biological effects. *Cell Biochem Funct* 23, 223-7.
- Pumfery, A., Deng, L., Maddukuri, A., de la Fuente, C., Li, H., Wade, J.D., Lambert, P., Kumar, A. and Kashanchi, F., 2003. Chromatin remodeling and modification during HIV-1 Tat-activated transcription. *Curr HIV Res* 1, 343-62.

Q

- Qin, J.Y., Zhang, L., Clift, K.L., Hular, I., Xiang, A.P., Ren, B.Z. and Lahn, B.T., Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One* 5, e10611.
- Quivy, V., De Walque, S. and Van Lint, C., 2007. Chromatin-associated regulation of HIV-1 transcription: implications for the development of therapeutic strategies. *Subcell Biochem* 41, 371-96.

R

- Ranjan, P., Bowzard, J.B., Schwerzmann, J.W., Jeisy-Scott, V., Fujita, T. and Sambhara, S., 2009. Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity. *Trends Mol Med* 15, 359-68.
- Reeves, R., Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochim Biophys Acta* 1799, 3-14.
- Regad, T. and Chelbi-Alix, M.K., 2001. Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* 20, 7274-86.
- Ren, G., Gao, K., Bushman, F.D. and Yeager, M., 2007. Single-particle image reconstruction of a tetramer of HIV integrase bound to DNA. *J Mol Biol* 366, 286-94.
- Rice, P.A. and Baker, T.A., 2001. Comparative architecture of transposase and integrase complexes. *Nat Struct Biol* 8, 302-7.
- Richard, D.J., Bolderson, E., Cubeddu, L., Wadsworth, R.I., Savage, K., Sharma, G.G., Nicolette, M.L., Tsvetanov, S., McIlwraith, M.J., Pandita, R.K., Takeda, S., Hay, R.T., Gautier, J., West, S.C., Paull, T.T., Pandita, T.K., White, M.F. and Khanna, K.K., 2008. Single-stranded DNA-binding protein hSSB1 is critical for genomic stability. *Nature* 453, 677-81.
- Richards, R.I., 2001. Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends Genet* 17, 339-45.
- Ringrose, J.H., Jeeninga, R.E., Berkhout, B. and Speijer, D., 2008. Proteomic studies reveal coordinated changes in T-cell expression patterns upon infection with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 82, 4320-30.
- Romano, G. and Giordano, A., 2008. Role of the cyclin-dependent kinase 9-related pathway in mammalian gene expression and human diseases. *Cell Cycle* 7, 3664-8.
- Roohvand, F., Maillard, P., Lavergne, J.P., Boulant, S., Walic, M., Andreo, U., Goueslain, L., Helle, F., Mallet, A., McLauchlan, J. and Budkowska, A., 2009. Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein. *J Biol Chem* 284, 13778-91.
- Rosner, G., 2003. [Anoikis--a specific form of programmed cell death]. *Harefuah* 142, 857-61, 876.
- Rotger, M., Dang, K.K., Fellay, J., Heinzen, E.L., Feng, S., Descombes, P., Shianna, K.V., Ge, D., Gunthard, H.F., Goldstein, D.B. and Telenti, A., Genome-wide mRNA

- expression correlates of viral control in CD4⁺ T-cells from HIV-1-infected individuals. *PLoS Pathog* 6, e1000781.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L.H. and Lobrich, M., 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23, 5706-15.
- Ruprecht, K., Mayer, J., Sauter, M., Roemer, K. and Mueller-Lantzsch, N., 2008. Endogenous retroviruses and cancer. *Cell Mol Life Sci* 65, 3366-82.
- Rusche, L.N. and Lynch, P.J., 2009. Assembling heterochromatin in the appropriate places: A boost is needed. *J Cell Physiol* 219, 525-8.
- Ruthenburg, A.J., Li, H., Patel, D.J. and Allis, C.D., 2007. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 983-94.

S

- Saggioro, D., Silic-Benussi, M., Biasiotto, R., D'Agostino, D.M. and Ciminale, V., 2009. Control of cell death pathways by HTLV-1 proteins. *Front Biosci* 14, 3338-51.
- Sakaguchi, K., Zambrano, N., Baldwin, E.T., Shapiro, B.A., Erickson, J.W., Omichinski, J.G., Clore, G.M., Gronenborn, A.M. and Appella, E., 1993. Identification of a binding site for the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5219-23.
- Sakoda, T., Kasahara, N., Hamamori, Y. and Kedes, L., 1999. A high-titer lentiviral production system mediates efficient transduction of differentiated cells including beating cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 31, 2037-47.
- Sakurai, Y., Komatsu, K., Agematsu, K. and Matsuoka, M., 2009. DNA double strand break repair enzymes function at multiple steps in retroviral infection. *Retrovirology* 6, 114.
- Salmon, P. and Trono, D., 2007. Production and titration of lentiviral vectors. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 12, Unit 12 10.
- Sanchez-Font, M.F., Sebastia, J., Sanfeliu, C., Cristofol, R., Marfany, G. and Gonzalez-Duarte, R., 2003. Peroxiredoxin 2 (PRDX2), an antioxidant enzyme, is under-expressed in Down syndrome fetal brains. *Cell Mol Life Sci* 60, 1513-23.
- Sanders, C.M., Cruse, J.M. and Lewis, R.E., 2008. Toll-like receptors, cytokines and HIV-1. *Exp Mol Pathol* 84, 31-6.
- Saphire, A.C., Galloway, P.A. and Bark, S.J., 2006. Proteomic analysis of human immunodeficiency virus using liquid chromatography/tandem mass spectrometry effectively distinguishes specific incorporated host proteins. *J Proteome Res* 5, 530-8.
- Sarkis, C., Philippe, S., Mallet, J. and Serguera, C., 2008. Non-integrating lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* 8, 430-7.
- Sastry, L., Johnson, T., Hobson, M.J., Smucker, B. and Cornetta, K., 2002. Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther* 9, 1155-62.
- Sawyer, S.L., Emerman, M. and Malik, H.S., 2004. Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G. *PLoS Biol* 2, E275.
- Schambach, A., Wodrich, H., Hildinger, M., Böhne, J., Krausslich, H.G. and Baum, C., 2000. Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol Ther* 2, 435-45.
- Schmitt-Ney, M. and Habener, J.F., 2000. CHOP/GADD153 gene expression response to cellular stresses inhibited by prior exposure to ultraviolet light wavelength band C (UVC). Inhibitory sequence mediating the UVC response localized to exon 1. *J Biol Chem* 275, 40839-45.

- Schoder, C., Liehr, T., Velleuer, E., Wilhelm, K., Blaurock, N., Weise, A. and Mrasek, K., New aspects on chromosomal instability: chromosomal break-points in Fanconi anemia patients co-localize on the molecular level with fragile sites. *Int J Oncol* 36, 307-12.
- Schoeftner, S. and Blasco, M.A., 2009. A 'higher order' of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *Embo J* 28, 2323-36.
- Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R. and Bushman, F., 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521-9.
- Schroder, M. and Kaufman, R.J., 2005. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569, 29-63.
- Schubert, V., Weissleder, A., Ali, H., Fuchs, J., Lermontova, I., Meister, A. and Schubert, I., 2009. Cohesin gene defects may impair sister chromatid alignment and genome stability in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* 118, 591-605.
- Schwartz, G.K., 2002. CDK inhibitors: cell cycle arrest versus apoptosis. *Cell Cycle* 1, 122-3.
- Segurado, M. and Tercero, J.A., 2009. The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biol Cell* 101, 617-27.
- Sharma, P., Singh, D.P., Fatma, N., Chylack, L.T., Jr. and Shinohara, T., 2000. Activation of LEDGF gene by thermal-and oxidative-stresses. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 1320-4.
- Shaw, G.M., Hahn, B.H., Arya, S.K., Groopman, J.E., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F., 1984. Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science* 226, 1165-71.
- Shaw, P.J., Lamkanfi, M. and Kanneganti, T.D., NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome. *Eur J Immunol* 40, 624-7.
- Shedlock, D.J., Hwang, D., Choo, A.Y., Chung, C.W., Muthumani, K. and Weiner, D.B., 2008. HIV-1 viral genes and mitochondrial apoptosis. *Apoptosis* 13, 1088-99.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D. and Malim, M.H., 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646-50.
- Shibata, A., Barton, O., Noon, A.T., Dahm, K., Deckbar, D., Goodarzi, A.A., Lobrich, M. and Jeggo, P.A., Role of ATM and the damage response mediator proteins 53BP1 and MDC1 in the maintenance of G(2)/M checkpoint arrest. *Mol Cell Biol* 30, 3371-83.
- Shiloh, Y., 2001. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 11, 71-7.
- Shinohara, T., Singh, D.P. and Fatma, N., 2002. LEDGF, a survival factor, activates stress-related genes. *Prog Retin Eye Res* 21, 341-58.
- Shiota, M., Izumi, H., Miyamoto, N., Onitsuka, T., Kashiwagi, E., Kidani, A., Hirano, G., Takahashi, M., Ono, M., Kuwano, M., Naito, S., Sasaguri, Y. and Kohno, K., 2008. Ets regulates peroxiredoxin1 and 5 expressions through their interaction with the high-mobility group protein B1. *Cancer Sci* 99, 1950-9.
- Shrivastav, M., De Haro, L.P. and Nickoloff, J.A., 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 18, 134-47.
- Shun, M.C., Raghavendra, N.K., Vandegraaff, N., Daigle, J.E., Hughes, S., Kellam, P., Cherepanov, P. and Engelman, A., 2007. LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. *Genes Dev* 21, 1767-78.
- Silvers, R.M., Smith, J.A., Schowalter, M., Litwin, S., Liang, Z., Geary, K. and Daniel, R., Modification of integration site preferences of an HIV-1-based vector by expression of a novel synthetic protein. *Hum Gene Ther* 21, 337-49.

- Singaravelu, R., Blais, D.R., McKay, C.S. and Pezacki, J.P., Activity-based protein profiling of the hepatitis C virus replication in Huh-7 hepatoma cells using a non-directed active site probe. *Proteome Sci* 8, 5.
- Singer, O. and Verma, I.M., 2008. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. *Curr Gene Ther* 8, 483-8.
- Singh, D.P., Fatma, N., Kimura, A., Chylack, L.T., Jr. and Shinohara, T., 2001. LEDGF binds to heat shock and stress-related element to activate the expression of stress-related genes. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 943-55.
- Sirven, A., Pflumio, F., Zennou, V., Titeux, M., Vainchenker, W., Coulombel, L., Dubart-Kupperschmitt, A. and Charneau, P., 2000. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* 96, 4103-10.
- Skaar, J.R. and Pagano, M., 2009. Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Curr Opin Cell Biol* 21, 816-24.
- Skalka, A.M. and Katz, R.A., 2005. Retroviral DNA integration and the DNA damage response. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1, 971-8.
- Slee, E.A., Adrain, C. and Martin, S.J., 1999. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 1067-74.
- Smith, D.I., McAvoy, S., Zhu, Y. and Perez, D.S., 2007. Large common fragile site genes and cancer. *Semin Cancer Biol* 17, 31-41.
- Smith, J.A., Wang, F.X., Zhang, H., Wu, K.J., Williams, K.J. and Daniel, R., 2008. Evidence that the Nijmegen breakage syndrome protein, an early sensor of double-strand DNA breaks (DSB), is involved in HIV-1 post-integration repair by recruiting the ataxia telangiectasia-mutated kinase in a process similar to, but distinct from, cellular DSB repair. *Virology* 475, 11.
- Smith, J.A., Yeung, J., Kao, G.D. and Daniel, R., A role for the histone deacetylase HDAC4 in life-cycle of HIV-1-based vectors. *Virology* 475, 237.
- Smith, R.H., 2008. Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther* 15, 817-22.
- Sokolskaja, E., Sayah, D.M. and Luban, J., 2004. Target cell cyclophilin A modulates human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* 78, 12800-8.
- Song, B., Javanbakht, H., Perron, M., Park, D.H., Stremlau, M. and Sodroski, J., 2005. Retrovirus restriction by TRIM5alpha variants from Old World and New World primates. *J Virol* 79, 3930-7.
- Sonoda, E., Hohegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y. and Takeda, S., 2006. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 5, 1021-9.
- Stallings, R.L., 2007. Are chromosomal imbalances important in cancer? *Trends Genet* 23, 278-83.
- Stark, J.M., Pierce, A.J., Oh, J., Pastink, A. and Jasin, M., 2004. Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Mol Cell Biol* 24, 9305-16.
- Steger, D.J., Lefterova, M.I., Ying, L., Stonestrom, A.J., Schupp, M., Zhuo, D., Vakoc, A.L., Kim, J.E., Chen, J., Lazar, M.A., Blobel, G.A. and Vakoc, C.R., 2008. DOT1L/KMT4 recruitment and H3K79 methylation are ubiquitously coupled with gene transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 28, 2825-39.
- Stegmeier, F., Sowa, M.E., Nalepa, G., Gygi, S.P., Harper, J.W. and Elledge, S.J., 2007. The tumor suppressor CYLD regulates entry into mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8869-74.

- Stevenson, M., Haggerty, S., Lamonica, C.A., Meier, C.M., Welch, S.K. and Wasiak, A.J., 1990. Integration is not necessary for expression of human immunodeficiency virus type 1 protein products. *J Virol* 64, 2421-5.
- Strebel, K., Luban, J. and Jeang, K.T., 2009. Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med* 7, 48.
- Stremlau, M., Perron, M., Welikala, S. and Sodroski, J., 2005. Species-specific variation in the B30.2(SPRY) domain of TRIM5alpha determines the potency of human immunodeficiency virus restriction. *J Virol* 79, 3139-45.
- Suhasini, M. and Reddy, T.R., 2009. Cellular proteins and HIV-1 Rev function. *Curr HIV Res* 7, 91-100.
- Sun, S.C., CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes. *Cell Death Differ* 17, 25-34.
- Sung, J.S. and Demple, B., 2006. Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. *Febs J* 273, 1620-9.
- Suresh, D.R., Annam, V., Pratibha, K. and Prasad, B.V., 2009. Total antioxidant capacity--a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. *J Biomed Sci* 16, 61.
- Sutherland, G.R. and Richards, R.I., 1995. The molecular basis of fragile sites in human chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 5, 323-7.
- Szyda, A., Paprocka, M., Krawczyński, A., Lenart, K., Heimrath, J., Grabarczyk, P., Mackiewicz, A. and Dus, D., 2006. Optimization of a retroviral vector for transduction of human CD34 positive cells. *Acta Biochim Pol* 53, 815-23.

T

- Taganov, K., Daniel, R., Katz, R.A., Favorova, O. and Skalka, A.M., 2001. Characterization of retrovirus-host DNA junctions in cells deficient in nonhomologous-end joining. *J Virol* 75, 9549-52.
- Tait, S.W. and Green, D.R., 2008. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 27, 6452-61.
- Takahashi, A., Mori, E. and Ohnishi, T., The foci of DNA double strand break-recognition proteins localize with gammaH2AX after heat treatment. *J Radiat Res (Tokyo)* 51, 91-5.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A. and Takeda, S., 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J* 17, 5497-508.
- Takayama, K., Torashima, T., Horiuchi, H. and Hirai, H., 2008. Purkinje-cell-preferential transduction by lentiviral vectors with the murine stem cell virus promoter. *Neurosci Lett* 443, 7-11.
- Takeuchi, O. and Akira, S., 2009. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* 227, 75-86.
- Talos, F. and Moll, U.M., Role of the p53 family in stabilizing the genome and preventing polyploidization. *Adv Exp Med Biol* 676, 73-91.
- Tavera-Mendoza, L.E., Wang, T.T. and White, J.H., 2006. p19INK4D and cell death. *Cell Cycle* 5, 596-8.
- Testa, U., TRAIL/TRAIL-R in hematologic malignancies. *J Cell Biochem* 110, 21-34.

- Thomas, J.A. and Gorelick, R.J., 2008. Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus Res* 134, 39-63.
- Thompson, L.H., 2005. Unraveling the Fanconi anemia-DNA repair connection. *Nat Genet* 37, 921-2.
- Thornton, T.M. and Rincon, M., 2009. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* 5, 44-51.
- Tokarev, A., Skasko, M., Fitzpatrick, K. and Guatelli, J., 2009. Antiviral activity of the interferon-induced cellular protein BST-2/tetherin. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25, 1197-210.
- Touny, L.H. and Banerjee, P.P., 2006. Identification of both Myt-1 and Wee-1 as necessary mediators of the p21-independent inactivation of the cdc-2/cyclin B1 complex and growth inhibition of TRAMP cancer cells by genistein. *Prostate* 66, 1542-55.
- Tremblay, M., Toussaint, M., D'Amours, A. and Conconi, A., 2009. Nucleotide excision repair and photolyase repair of UV photoproducts in nucleosomes: assessing the existence of nucleosome and non-nucleosome rDNA chromatin in vivo. *Biochem Cell Biol* 87, 337-46.
- Trojer, P. and Reinberg, D., 2007. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* 28, 1-13.
- Tu, B.P. and Weissman, J.S., 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol* 164, 341-6.
- Turek-Plewa, J. and Jagodzinski, P.P., 2005. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 10, 631-47.
- Turelli, P., Doucas, V., Craig, E., Mangeat, B., Klages, N., Evans, R., Kalpana, G. and Trono, D., 2001. Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication. *Mol Cell* 7, 1245-54.
- Turlure, F., Maertens, G., Rahman, S., Cherepanov, P. and Engelman, A., 2006. A tripartite DNA-binding element, comprised of the nuclear localization signal and two AT-hook motifs, mediates the association of LEDGF/p75 with chromatin in vivo. *Nucleic Acids Res* 34, 1653-65.
- Turner, B.G. and Summers, M.F., 1999. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 285, 1-32.

U

- Upender, M.B., Habermann, J.K., McShane, L.M., Korn, E.L., Barrett, J.C., Difilippantonio, M.J. and Ried, T., 2004. Chromosome transfer induced aneuploidy results in complex dysregulation of the cellular transcriptome in immortalized and cancer cells. *Cancer Res* 64, 6941-9.
- Utey, R.T., Lacoste, N., Jobin-Robitaille, O., Allard, S. and Cote, J., 2005. Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4. *Mol Cell Biol* 25, 8179-90.

V

- Valerie, K. and Povirk, L.F., 2003. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 22, 5792-812.
- Van den Bergh, R., Florence, E., Vlieghe, E., Boonefaes, T., Grooten, J., Houthuys, E., Tran, H.T., Gali, Y., De Baetselier, P., Vanham, G. and Raes, G., Transcriptome analysis of monocyte-HIV interactions. *Retrovirology* 7, 53.

- van den Heuvel, S., 2005. Cell-cycle regulation. WormBook, 1-16.
- van den Hurk, J.A., Meij, I.C., Seleme, M.C., Kano, H., Nikopoulos, K., Hoefsloot, L.H., Sistermans, E.A., de Wijs, I.J., Mukhopadhyay, A., Plomp, A.S., de Jong, P.T., Kazazian, H.H. and Cremers, F.P., 2007. L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development. *Hum Mol Genet* 16, 1587-92.
- van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H. and Kanaar, R., 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2, 196-206.
- Van Maele, B., Busschots, K., Vandekerckhove, L., Christ, F. and Debyser, Z., 2006. Cellular co-factors of HIV-1 integration. *Trends Biochem Sci* 31, 98-105.
- Van Maele, B., De Rijck, J., De Clercq, E. and Debyser, Z., 2003. Impact of the central polypurine tract on the kinetics of human immunodeficiency virus type 1 vector transduction. *J Virol* 77, 4685-94.
- Vandegraaff, N., Kumar, R., Burrell, C.J. and Li, P., 2001. Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV) DNA integration in acutely infected cells as determined using a novel assay for detection of integrated HIV DNA. *J Virol* 75, 11253-60.
- Vanegas, M., Llano, M., Delgado, S., Thompson, D., Peretz, M. and Poeschla, E., 2005. Identification of the LEDGF/p75 HIV-1 integrase-interaction domain and NLS reveals NLS-independent chromatin tethering. *J Cell Sci* 118, 1733-43.
- Varbanov, M., Espert, L. and Biard-Piechaczyk, M., 2006. Mechanisms of CD4 T-cell depletion triggered by HIV-1 viral proteins. *AIDS Rev* 8, 221-36.
- Verma, R., Rigatti, M.J., Belinsky, G.S., Godman, C.A. and Giardina, C., DNA damage response to the Mdm2 inhibitor nutlin-3. *Biochem Pharmacol* 79, 565-74.
- Vidakovic, M., Poznanovic, G. and Bode, J., 2005. DNA break repair: refined rules of an already complicated game. *Biochem Cell Biol* 83, 365-73.
- Violot, S., Hong, S.S., Rakotobe, D., Petit, C., Gay, B., Moreau, K., Billaud, G., Priet, S., Sire, J., Schwartz, O., Mouscadet, J.F. and Boulanger, P., 2003. The human polycomb group EED protein interacts with the integrase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 77, 12507-22.
- Vousden, K.H., 2000. p53: death star. *Cell* 103, 691-4.

W

- Waheed, A.A. and Freed, E.O., 2009. Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. *Virus Res* 143, 162-76.
- Wang, G., Sawai, N., Kotliarova, S., Kanazawa, I. and Nukina, N., 2000. Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B. *Hum Mol Genet* 9, 1795-803.
- Wang, J.Y., Ling, H., Yang, W. and Craigie, R., 2001. Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein. *Embo J* 20, 7333-43.
- Wang, T., Gong, N., Liu, J., Kadiu, I., Kraft-Terry, S.D., Mosley, R.L., Volsky, D.J., Ciborowski, P. and Gendelman, H.E., 2008. Proteomic modeling for HIV-1 infected microglia-astrocyte crosstalk. *PLoS One* 3, e2507.
- Wanisch, K. and Yanez-Munoz, R.J., 2009. Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age. *Mol Ther* 17, 1316-32.
- Weiss, R.H., 2003. p21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers. *Cancer Cell* 4, 425-9.

- Wen, W., Chen, S., Cao, Y., Zhu, Y. and Yamamoto, Y., 2005. HIV-1 infection initiates changes in the expression of a wide array of genes in U937 promonocytes and HUT78 T cells. *Virus Res* 113, 26-35.
- Westendorp, M.O., Shatrov, V.A., Schulze-Osthoff, K., Frank, R., Kraft, M., Los, M., Krammer, P.H., Droge, W. and Lehmann, V., 1995. HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *Embo J* 14, 546-54.
- Wickstrom, S.A., Masoumi, K.C., Khochbin, S., Fassler, R. and Massoumi, R., CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin. *Embo J* 29, 131-44.
- Wielens, J., Crosby, I.T. and Chalmers, D.K., 2005. A three-dimensional model of the human immunodeficiency virus type 1 integration complex. *J Comput Aided Mol Des* 19, 301-17.
- Williams, K.C. and Burdo, T.H., 2009. HIV and SIV infection: the role of cellular restriction and immune responses in viral replication and pathogenesis. *Apmis* 117, 400-12.
- Williams, R.S. and Tainer, J.A., 2007. Learning our ABCs: Rad50 directs MRN repair functions via adenylate kinase activity from the conserved ATP binding cassette. *Mol Cell* 25, 789-91.
- Wiskerchen, M. and Muesing, M.A., 1995. Human immunodeficiency virus type 1 integrase: effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from unintegrated viral DNA templates, and sustain viral propagation in primary cells. *J Virol* 69, 376-86.
- Wohlbold, L. and Fisher, R.P., 2009. Behind the wheel and under the hood: functions of cyclin-dependent kinases in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 8, 1018-24.
- Wu, C. and Lu, Y., High-titre retroviral vector system for efficient gene delivery into human and mouse cells of haematopoietic and lymphocytic lineages. *J Gen Virol* 91, 1909-18.
- Wu, J.Q., Dwyer, D.E., Dyer, W.B., Yang, Y.H., Wang, B. and Saksena, N.K., 2008. Transcriptional profiles in CD8+ T cells from HIV+ progressors on HAART are characterized by coordinated up-regulation of oxidative phosphorylation enzymes and interferon responses. *Virology* 380, 124-35.
- Wu, X., Daniels, T., Molinaro, C., Lilly, M.B. and Casiano, C.A., 2002. Caspase cleavage of the nuclear autoantigen LEDGF/p75 abrogates its pro-survival function: implications for autoimmunity in atopic disorders. *Cell Death Differ* 9, 915-25.
- Wu, Y. and Marsh, J.W., 2001. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science* 293, 1503-6.
- Wu, Y. and Marsh, J.W., 2003. Early transcription from nonintegrated DNA in human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 77, 10376-82.
- Wu, Z., Cho, H., Hampton, G.M. and Theodorescu, D., 2009. Cdc6 and cyclin E2 are PTEN-regulated genes associated with human prostate cancer metastasis. *Neoplasia* 11, 66-76.

Y

- Yamamoto, N., Tanaka, C., Wu, Y., Chang, M.O., Inagaki, Y., Saito, Y., Naito, T., Ogasawara, H., Sekigawa, I. and Hayashida, Y., 2006. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 integration by using a specific, sensitive and quantitative assay based on real-time polymerase chain reaction. *Virus Genes* 32, 105-13.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D. and McKeon, F., 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 2, 305-16.
- Yang, Y.X., Guen, V., Richard, J., Cohen, E.A. and Berthouix, L., Cell context-dependent involvement of ATR in early stages of retroviral replication. *Virology* 396, 272-9.
- Yata, K. and Esashi, F., 2009. Dual role of CDKs in DNA repair: to be, or not to be. *DNA Repair (Amst)* 8, 6-18.
- Yoshimura, F.K. and Luo, X., 2007. Induction of endoplasmic reticulum stress in thymic lymphocytes by the envelope precursor polyprotein of a murine leukemia virus during the preleukemic period. *J Virol* 81, 4374-7.
- Yu, J.H. and Schaffer, D.V., 2006. Selection of novel vesicular stomatitis virus glycoprotein variants from a peptide insertion library for enhanced purification of retroviral and lentiviral vectors. *J Virol* 80, 3285-92.
- Yu, S.F., von Ruden, T., Kantoff, P.W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W.F., Wagner, E.F. and Gilboa, E., 1986. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3194-8.
- Yu, X., Minter-Dykhouse, K., Malureanu, L., Zhao, W.M., Zhang, D., Merkle, C.J., Ward, I.M., Saya, H., Fang, G., van Deursen, J. and Chen, J., 2005. Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation. *Nat Genet* 37, 401-6.
- Yung, E., Sorin, M., Pal, A., Craig, E., Morozov, A., Delattre, O., Kappes, J., Ott, D. and Kalpana, G.V., 2001. Inhibition of HIV-1 virion production by a transdominant mutant of integrase interactor 1. *Nat Med* 7, 920-6.

Z

- Zack, J.A., Haislip, A.M., Krogstad, P. and Chen, I.S., 1992. Incompletely reverse-transcribed human immunodeficiency virus type 1 genomes in quiescent cells can function as intermediates in the retroviral life cycle. *J Virol* 66, 1717-25.
- Zariwala, M., Liu, J. and Xiong, Y., 1998. Cyclin E2, a novel human G1 cyclin and activating partner of CDK2 and CDK3, is induced by viral oncoproteins. *Oncogene* 17, 2787-98.
- Zhang, B., Metharom, P., Jullie, H., Ellem, K.A., Cleghorn, G., West, M.J. and Wei, M.Q., 2004a. The significance of controlled conditions in lentiviral vector titration and in the use of multiplicity of infection (MOI) for predicting gene transfer events. *Genet Vaccines Ther* 2, 6.
- Zhang, J., Willers, H., Feng, Z., Ghosh, J.C., Kim, S., Weaver, D.T., Chung, J.H., Powell, S.N. and Xia, F., 2004b. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 24, 708-18.
- Zhang, K. and Kaufman, R.J., 2006. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 66, S102-9.

- Zhang, L., Jia, X., Zhang, X., Sun, J., Peng, X., Qi, T., Ma, F., Yin, L., Yao, Y., Qiu, C. and Lu, H., Proteomic analysis of PBMCs: characterization of potential HIV-associated proteins. *Proteome Sci* 8, 12.
- Zhang, Q. and Wang, Y., HMG modifications and nuclear function. *Biochim Biophys Acta* 1799, 28-36.
- Zhang, Y., Dimtchev, A., Dritschilo, A. and Jung, M., 2001. Ionizing radiation-induced apoptosis in ataxia-telangiectasia fibroblasts. Roles of caspase-9 and cellular inhibitor of apoptosis protein-1. *J Biol Chem* 276, 28842-8.
- Zhang, Y. and Xiong, Y., 2001. Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. *Cell Growth Differ* 12, 175-86.
- Zhao, R.Y., Bukrinsky, M. and Elder, R.T., 2005. HIV-1 viral protein R (Vpr) & host cellular responses. *Indian J Med Res* 121, 270-86.
- Zhao, R.Y. and Elder, R.T., 2005. Viral infections and cell cycle G2/M regulation. *Cell Res* 15, 143-9.
- Zheng, L., Yang, Y., Guocai, L., Pauza, C.D. and Salvato, M.S., 2007. HIV Tat protein increases Bcl-2 expression in monocytes which inhibits monocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-induced ligand. *Intervirology* 50, 224-8.
- Zheng, R., Jenkins, T.M. and Craigie, R., 1996. Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13659-64.
- Zhivotovsky, B., 2003. Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem* 39, 25-40.
- Zhou, H., Xu, M., Huang, Q., Gates, A.T., Zhang, X.D., Castle, J.C., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Hazuda, D.J. and Espeseth, A.S., 2008. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* 4, 495-504.
- Zhou, J., Chen, D.Q., Poon, V.K., Zeng, Y., Ng, F., Lu, L., Huang, J.D., Yuen, K.Y. and Zheng, B.J., 2009. A regulatory polymorphism in interferon-gamma receptor 1 promoter is associated with the susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Immunogenetics* 61, 423-30.
- Zhou, S., Mody, D., Deravin, S.S., Hauer, J., Lu, T., Ma, Z., Hacein-Bey Abina, S., Gray, J.T., Greene, M.R., Cavazzana-Calvo, M., Malech, H.L. and Sorrentino, B.P., A self-inactivating lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy that does not activate LMO2 expression in human T cells. *Blood* 116, 900-8.
- Zhou, X., Cui, Y., Huang, X., Yu, Z., Thomas, A.M., Ye, Z., Pardoll, D.M., Jaffee, E.M. and Cheng, L., 2003. Lentivirus-mediated gene transfer and expression in established human tumor antigen-specific cytotoxic T cells and primary unstimulated T cells. *Hum Gene Ther* 14, 1089-105.
- Zinkel, S., Gross, A. and Yang, E., 2006. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* 13, 1351-9.
- Zuckerman, V., Wolyniec, K., Sionov, R.V., Haupt, S. and Haupt, Y., 2009. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol* 219, 3-15.
- Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D. and Hope, T.J., 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73, 2886-92.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L. and Trono, D., 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15, 871-5.