

Université Louis Pasteur de Strasbourg I
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse

Présentée par

Céline MARBAN

En vue d'obtenir le grade de

*Docteur de l'Université Louis Pasteur
de Strasbourg*

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

*CTIP2, un répresseur de la transcription des
gènes du HIV-1 dans les cellules microgliales*

Soutenue le 9 décembre 2005 devant la Commission d'Examen

Pr Bernard EHRESMANN

Président du jury

Pr Olivier ROHR

Directeur de thèse

Dr Franck DEQUIEDT

Rapporteur externe

Dr Pascale GIRAUDON

Rapporteur externe

Dr Dominique AUNIS

Examineur

A mes parents

A mes grands-parents y abuelos

Remerciements

En premier lieu, je tiens à saluer l'aimable contribution de l'ensemble des membres du jury :

Le Docteur **Dominique Aunis**, directeur de l'unité Inserm 575, qui m'a accueillie dans son laboratoire.

Mon directeur de thèse, le Professeur **Olivier Rohr**, qui a guidé mes premiers pas dans le monde de la recherche et orienté mes travaux de manière judicieuse tout en me laissant une grande liberté de travail. Un grand merci, « Le Boss », pour ta disponibilité, tes qualités humaines exceptionnelles, tes nombreux conseils, ta patience et surtout, merci de m'avoir accordé ta confiance malgré un début de thèse semé d'embûches... J'espère que nous aurons l'occasion de retravailler ensemble, d'autant plus que je n'ai toujours pas eu l'honneur de goûter ta fameuse tarte au fromage blanc !

Le Docteur **Franck Dequiedt** qui a participé activement à mon travail : son savoir-faire et ses connaissances sur la chromatine m'ont été d'une aide inconditionnelle dans l'avancée de mes recherches. Je tiens également à le remercier pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire à Gembloux... malgré la centri des sixties ! Un grand merci, Franck, pour m'avoir transmis la fibre chromatinienne !

Mon ancien professeur de biochimie, le Professeur **Bernard Ehresmann**, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Le Docteur **Pascale Giraudon** a qui j'exprime toute ma gratitude pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe « Régulation de la transcription des gènes du HIV-1 » pour la réelle convivialité qui règne dans ce groupe : **Stella Suzanne-Khadra**, **Laetitia Redel**, **Thomas Cherrier** et **Dominique Lecestre**. Je tiens tout particulièrement à remercier les filles pour leur aide dans la mise en page de ce manuscrit ainsi qu'à souligner la « zen attitude » de Thomas face au trio détonnant que nous formons Stella, Laeti et moi !

Je tiens également à remercier le Docteur **Carine Van Lint** de m'avoir permis de réaliser mes premières expériences de CHIP dans son laboratoire, le Docteur **Sylvette Chasserot-Golaz** pour l'acquisition des images de microscopie confocale ainsi que le Docteur **Guy Roussel** pour la relecture de ce manuscrit.

Cette thèse n'aurait pas été la même sans la bonne humeur :

Des aficionados passés et présents de la « cafet' du 3^{ème} » : **Claire Gasnier, Yannick Goumon, Patricia Bender, Martine Rivet, Patrice Gadroy, Amar Bennasroune, Jean-Eric Ghia, Elise Glattard, Peiman Shooshtarizadeh** et **Delphine Carouge**. Je garde un excellent souvenir de nos éclats de rire partagés au détriment d'une forte augmentation de nos IMC !

Des « doctoneuros » des étages inférieurs (**Benjamin Tournier, Matthias Corotte, Caroline Graff, Magalie Malacombe, Isabelle Buard, Renaud Thiébaud, Stéphane Heitz** et **Florent Revel**) et en particulier de mon acolyte et grande amie **Céline Steinmetz**.

Je dédie cette thèse aux six personnes sans qui rien de tout ça n'aurait été possible :

Mes parents à qui j'adresse mon incommensurable gratitude pour leur soutien sans faille. Un immense merci à vous pour m'avoir permis de réaliser mes rêves, tant au niveau sportif que scolaire

Mes grand-parents qui me sont d'un soutien inconditionnel depuis toujours

Mis abuelos que se han hido demasiado pronto, pero que siempre llevaré en mi corazón

Je remercie tout particulièrement **Stéphane** pour sa patience, sa compréhension et son soutien durant les derniers moments de ma thèse.

Je tiens également à remercier mes indispensables proches :

Mon filleul **Arnaud** et sa grande sœur **Morgane** que j'affectionne tout particulièrement

Ma « cousine » **Laetitia** et mon « frère » **Vincent**, mes meilleurs amis

Solange et **Fernand**, **Eva** et **Julien**, **Raymond** et **Josiane**, **Pierre** et **Odile**

Alain et **Carole** avec qui j'ai partagé mes premières longueurs de bassin

Marie-Christine, **Christophe** et la petite **Chloé**, **Christelle**, **Olivier** et **Laurence**

J'aurais également une petite pensée pour les quatre pattes de velours qui, constamment entrecroisées sur les piles de papiers de mon bureau, n'ont presque rien loupé de ma scolarité.

Pour terminer, à **Celle** ou ceux qui ont porté préjudice au bon déroulement de ma thèse, sachez que : « Toute méchanceté a sa source dans la faiblesse » (Sénèque).

Table des matières

<u>LISTE DES ABRÉVIATIONS</u>	1
<u>INTRODUCTION</u>	5
<u>AVANT-PROPOS</u>	6
<u>LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 (HIV-1)</u>	8
<u>1. GÉNÉRALITÉS SUR LES VIRUS DES CELLULES EUCARYOTES</u>	8
<u>1.1. Définition des virus</u>	8
<u>1.2. Structure des virus</u>	8
<u>1.2.1. Le génome</u>	8
<u>1.2.2. La capsid</u>	8
<u>1.3. Cycle de réplication des virus</u>	9
<u>1.4. Classification des virus</u>	9
<u>2. LE HIV-1 EST UN RÉTROVIRUS COMPLEXE</u>	12
<u>2.1. Caractéristiques des rétroviridae</u>	12
<u>2.2. Historique des rétroviridae</u>	12
<u>2.3. Classification des rétroviridae</u>	13
<u>2.3.1. Les orthorétroviridae</u>	13
<u>2.3.2. Les spumarétroviridae</u>	13
<u>2.4. Caractéristiques du HIV-1</u>	14
<u>2.4.1. Le HIV-1 dans la classification des rétroviridae</u>	14
<u>2.4.2. Origines du HIV-1</u>	14
<u>2.4.3. Variabilité génétique du HIV-1</u>	14
<u>3. STRUCTURE DE LA PARTICULE VIRALE HIV-1</u>	15
<u>3.1. L'enveloppe</u>	16
<u>3.2. La matrice</u>	16
<u>3.3. La capsid</u>	16
<u>3.4. La nucléocapsid</u>	16
<u>3.5. Les molécules encapsidées</u>	16
<u>4. ORGANISATION DE L'ARN GÉNOMIQUE DU HIV-1</u>	17
<u>4.1. Régions non-codantes</u>	17
<u>4.1.1. La région 5' non-codante</u>	17
<u>4.1.2. La région 3' non-codante</u>	18
<u>4.1.3. Les régions non-codantes internes</u>	18

4.2. Régions codantes	18
5. CYCLE DE RÉPLICATION DU HIV-1	21
5.1. Phase pré-intégrative	21
5.1.1. L'entrée du virus dans la cellule hôte	21
5.1.2. La décapsidation	22
5.1.3. La transcription inverse	22
5.1.4. L'import nucléaire de l'ADN viral	25
5.1.5. L'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte	25
5.2. Phase post-intégrative	26
5.2.1. L'expression de l'ADN viral	26
5.2.1.1. La phase initiale de l'expression virale	27
5.2.1.2. La phase finale de l'expression virale	27
5.2.2. La production de nouveaux virions	28
5.2.2.1. L'assemblage des constituants viraux	28
5.2.2.2. Le bourgeonnement des particules virales immatures	28
5.2.3. La maturation des particules virales	29
1. INFECTION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE	30
1.1. Manifestations cliniques	30
1.1.1. La phase de primo-infection	31
1.1.2. La phase asymptomatique	31
1.1.3. La phase symptomatique ou stade SIDA	31
1.2. Effets cytopathogènes	31
1.2.1. L'infection des cellules dendritiques	32
1.2.2. L'infection des lymphocytes T CD4+	33
1.2.3. L'infection des monocytes et des macrophages	34
2. INFECTION DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL	35
2.1. Manifestations cliniques	35
2.2. Entrée du HIV-1 dans le système nerveux central	36
2.3. Effets cytopathogènes	37
2.3.1. L'infection des cellules microgliales	37
2.3.2. Les effets cytopathogènes sur les astrocytes	38
2.3.3. Les effets cytopathogènes sur les oligodendrocytes	39
2.3.4. Les effets cytopathogènes sur les neurones	39
3. THÉRAPIES ANTI-RÉTROVIRALES	41
3.1. Les thérapies anti-rétrovirales actuelles	41
3.1.1. La trithérapie	41
3.1.1.1. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse	41
3.1.1.2. Les inhibiteurs de la protéase	42
3.1.2. Le T-20	43
3.2. Les thérapies anti-rétrovirales futures	43

TRANSCRIPTION DES GÈNES DU HIV-1 45

1. TRANSCRIPTION DES GÈNES DE CLASSE II 45

- 1.1. Le promoteur 45
 - 1.1.1. Le promoteur minimal 45
 - 1.1.2. Les séquences régulatrices 46
- 1.2. L'ARN polymérase II 47
- 1.3. Les facteurs généraux de transcription 47
- 1.4. Les étapes de la transcription 49
 - 1.4.1. L'initiation de la transcription 49
 - 1.4.2. L'élongation de la transcription 51
 - 1.4.3. La terminaison de la transcription 52

2. SPÉCIFICITÉS CONCERNANT LA TRANSCRIPTION DES GÈNES DU HIV-1 52

- 2.1. Le promoteur du HIV-1 53
 - 2.1.1. La région U3 53
 - 2.1.1.1. Le promoteur minimal 54
 - 2.1.1.2. Le domaine activateur 54
 - 2.1.1.3. Le domaine modulateur 54
 - 2.1.2. La région R 55
 - 2.1.3. La région U5 55
- 2.2. Les étapes de la transcription des gènes du HIV-1 55
 - 2.2.1. L'initiation de la transcription 55
 - 2.2.2. L'élongation de la transcription 56
 - 2.2.3. La terminaison de la transcription 56

RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION DES GÈNES DU HIV-1 57

1. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION 57

- 1.1. Les facteurs de transcription cellulaires 57
 - 1.1.1. Structure 57
 - 1.1.1.1. Le domaine de fixation à l'ADN 57
 - 1.1.1.2. Le domaine effecteur 58
 - 1.1.2. Les facteurs de transcription cellulaires impliqués dans la régulation de la transcription des gènes du HIV-1 59
 - 1.1.2.1. AP-1 59
 - 1.1.2.2. La famille C/EBP 59
 - 1.1.2.3. CREB 60
 - 1.1.2.4. Ets-1 61
 - 1.1.2.5. LEF-1 61
 - 1.1.2.6. La famille LSF 62
 - 1.1.2.7. La famille NF-AT 62
 - 1.1.2.8. NF- κ B 63
 - 1.1.2.9. Les récepteurs nucléaires 63
 - 1.1.2.10. Sp1 64
 - 1.1.2.11. Sp3 65
 - 1.1.2.12. USF-1 65
 - 1.1.2.13. YY1 65

1.2. Le facteur de transcription viral Tat	66
1.3. Régulation de la phase initiale de la transcription des gènes du HIV-1	67
1.3.1. Les lymphocytes T CD4+	67
1.3.2. Les monocytes et les macrophages	68
1.3.3. Les cellules microgliales	69
1.4. Régulation de la phase finale de la transcription des gènes du HIV-1	70
2. LES FACTEURS DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE	72
2.1. Les différents degrés d'organisation de la chromatine	72
2.1.1. <i>Le nucléosome</i>	73
2.1.2. <i>La fibre solénoïdale</i>	73
2.1.3. <i>Le chromosome</i>	73
2.2. Les enzymes de modifications post-traductionnelles des histones	74
2.2.1. L'acétylation des histones	74
2.2.1.1. Généralités	74
2.2.1.2. Les enzymes impliquées dans l'acétylation des histones	75
2.2.2. La méthylation des histones	78
2.2.2.1. Généralités	78
2.2.2.2. Les enzymes impliquées dans la méthylation des histones	79
2.2.3. La phosphorylation des histones	80
2.2.4. L'ubiquitinylation des histones	80
2.2.5. Le « code histone »	81
2.2.5.1. Définition	81
2.2.5.2. Exemple illustrant la complexité du « code histone »	81
2.2.6. Régulation de la transcription des gènes du HIV-1	82
2.3. Les facteurs de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP	84
2.3.1. Classification	84
2.3.2. Mode d'action	85
2.3.3. Régulation de la transcription des gènes du HIV-1	85
2.4. Les ADN méthyltransférases	86
2.4.1. La méthylation de l'ADN	86
2.4.2. Classification	86
2.4.3. Régulation de la transcription des gènes du HIV-1	87
<u>BUT DU TRAVAIL</u>	88

<u>PUBLICATIONS</u>	91
----------------------------------	-----------

<u>PUBLICATION 1</u>	92
----------------------------	----

<u>PUBLICATION 2</u>	94
----------------------------	----

<u>PUBLICATION 3</u>	95
----------------------------	----

<u>DISCUSSION</u>	99
--------------------------------	-----------

<u>CONCLUSION</u>	109
--------------------------------	------------

<u>ANNEXE</u>	112
----------------------------	------------

<u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	114
---	------------

Liste des abréviations

ADA :	Adénosine DéAminase
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AF :	Activation Function
ALL :	T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia
ALV :	Avian Leukosis Virus
AML :	T-cell Acute Myeloblastic Leukemia
AMPc :	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP :	Activator Protein
APOBEC :	APOlipoprotein B-Editing Catalytic subunit
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNm :	ARN messenger
ARNr :	ARN ribosomique
ARNsn :	petits ARN nucléaires
ARNt :	ARN de transfert
ARP :	Acetylcholinesterase Related Peptide
ATF :	Activating Transcription Factor
ATP :	Adénosine TriPhosphate
ATPase :	Adénosine TriPhosphatase
bZIP :	basic-leucine ZIPper transcription factor
BAF :	BRG or BRM Associated Factor
BCR :	B-Cell Receptor
BRE :	TFII-B Responsive Element
BRG :	Brahma Related Gene
BRM :	BRahMa
CA :	CApside
CAD :	Context dependant Activation Domain
CCR :	Chemokine (CC motif) Receptor
CD :	Cluster of Differentiation
CDK :	Cyclin Dependant Kinase
C/EBP :	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CFV :	Chimpanzee Foamy Virus
ChIP :	Chromatine ImmunoPrecipitation
CK :	Caseins Kinases
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV :	CytoMegaloVirus
Co-REST :	RE1-Silencing Transcription Factor Corepressor
COUP-TF :	Chicken Ovalbumin Upstream Promotor-Transcription Factor
CP :	CCAAT binding Protein
CPSF :	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor
CRE :	Cyclic AMP Response Element
CREB :	CRE Binding protein
CREM :	CRE Modulator
CRS :	Cis-acting Repression Sequence
CTD :	Carboxy-Terminal Domain

CTIP :	COUP-TF Interacting Protein
CTS :	Central Termination Signal
CXCR :	Chemokine (CXC motif) Receptor
DNAses :	DésoxyriboNucléAses
Dnmt :	DNA méthyltransférase
DPE :	Downstream Promoter Element
DSIF :	DRB Sensitivity Inducing Factor
Ear :	ErbA related protein
ELL :	Eleven-nineteen Lysine-rich Leukemia
env :	enveloppe
ESCRT :	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
Ets :	E26 transformation specific
gag :	group-specific antigen
GM-CSF :	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GNAT :	Gcn5-related N-acetyltransferases
gp41 :	glycoprotéine 41
gp120 :	glycoprotéine 120
GR :	Glucocorticoid Receptor
GRE :	Glucocorticoid Responsive Element
GRH :	GRainyHead
HAD :	HIV Associated Dementia
HAT :	Histone AcétylTransférase
HDAC :	Histone DéACétylase
HIV :	Human Immunodeficiency Virus
HMBP :	Histone Methyl-Binding Protein
HMG :	High Mobility Group
HMT :	Histone MéthylTransférase
HP1 :	Heterochromatin Protein 1
HS :	Hypersensitive Site
HTLV :	Human T-cell Lymphotropic Virus
I κ B :	Inhibitor of NF- κ B
IKK. :	I κ B Kinases
IN :	INtegrase
Inr :	Initiator
ISWI :	Imitation of Switch
KID :	Kinase Inductible Domain
LEF :	Lymphoid Enhancer binding Factor
LSD :	Lysine Specific Demethylase
LSF :	Late Simian virus 40 Factor
LTR :	Long Terminal Repeat
MA :	MAtrice
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCMD :	Minor Cognitive and Motor Disorder
MYST :	MOZ, Ybf2/sas3, Sas2, Tip60
NC :	NucleoCapside
N-CoR :	Nuclear Receptor Corepressor
Nef :	Negative factor
NELF :	Negative ELongation Factor
NES :	Nuclear Export Signal
NF-AT :	Nuclear Factor of Activated T-Cells

NF-IL6 :	Nuclear Factor of InterLeukine 6
NF-κB :	Nuclear Factor κB
NLS :	Nuclear Localization Signal
NRRE :	Nuclear Receptor Responsive Element
nuc-1 :	nucléosome-1
NuRD :	Nucleosome Remodeling and Deacetylating complex
PAD :	PeptidylArginine Deiminase
PAF :	Platelet Activating Factor
PCAF :	P300/CBP-Associated Factor
PIC :	Pré-Intégration Complex
PKA :	Protein Kinase A
PMA :	Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
PMRT :	Protein Arginine MethylTransferases
pol :	polymérase
PPT :	PolyPurine Tract
PPTc :	PolyPurine Tract central
PR :	PRotease
P-TEFb :	Positive-Transcription Elongation Factor b
RAR :	Retinoic Acid Receptor
Région R :	Région Répétée
Région U3 :	Région Unique en 3'
Région U5 :	Région Unique en 5'
rev :	regulator of virion expression
RIZ :	Retinoblastoma Interacting Zinc finger
RNase H :	RiboNucléAse H
RRE :	Rev Response Element
RSV :	Rous Sarcoma Virus
RT :	Reverse Transcriptase
RXR :	Retinoic X Receptor
SAM :	S-AdénosylMéthionine
SANT :	<u>SWI3</u> , <u>ADA2</u> , <u>N</u> -CoR, <u>TFIIB</u>
PBS :	Primer Binding Site
SIDA :	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis
SIR :	Silent Information Regulator
SIV :	Simian Immunodeficiency Virus
SMRT :	Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors
SNC :	Système Nerveux Central
Sp1 :	Specificity protein 1
SRC :	Steroid Receptor Coactivator
STAT :	Signal Transducer and Activator of Transcription
SU :	SURface
SUV :	SUPpressor of Variegation
SWI/SNF :	SWItch/Sucrose Non Fermenting
TAR :	Transactivation Response Element
tat :	TransActivator of Transcription
TBP :	TATA box Binding Protein
TCF :	T-Cell specific Factor
TCR :	T-cell receptor
TFII :	Transcription Factor of RNA polymerase II
TM :	TransMembrane

TNF : Tumor Necrosis Factor
TR : Thyroid hormone Receptor
TRE : TPA Responsive Element
TSA : TrichoStatine A
UAS : Upstream Activating Sequence
URS : Upstream Repressing Sequence
USF : Upstream Stimulating Factor
vif : viral infectivity factor
vpr : viral protein r
vpu : viral protein u
YY1 : Ying Yang 1

Introduction

Avant-propos

1981...Los Angeles

Un article intitulé *Pneumocystis pneumonia - Los Angeles* paraît dans la revue américaine *Morbidity and Mortality Weekly Report*. L'auteur y décrit les manifestations cliniques observées chez cinq patients américains. Il fait état d'une pneumonie déclenchée suite à l'infection par la bactérie *Pneumocystis carinii* combinée à une importante déplétion des lymphocytes T (Gottlieb M.S., 1981). Peu de temps après, des cliniciens français observent des patients présentant des symptômes similaires. A Paris, les cliniciens s'associent rapidement à un groupe de chercheurs afin d'étudier la maladie émergente. L'hypothèse de l'implication d'un virus comme agent étiologique de la maladie devient rapidement une évidence.

1983...Paris

Début janvier, des cellules issues d'un nodule lymphatique d'un patient atteint de lymphadénopathie sont mises en culture à l'Institut Pasteur. Quelques semaines plus tard, une activité transcriptase inverse est mise en évidence dans l'échantillon. L'agent étiologique responsable de la maladie est donc un rétrovirus. Effectivement, les premières images du virus de l'immunodéficience humaine (HIV) prises par microscopie électronique sont publiées en mai dans la revue scientifique *Science* (Barré-Sinoussi F., 1983). Des travaux menés en parallèle aux Etats-Unis et publiés dans le même numéro du journal *Science* confortent cette découverte (Gallo R.C., 1983).

2005...dans le monde

Vingt-deux ans après, malgré les avancées considérables de la recherche biomédicale, le SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise) constitue une épidémie d'ampleur mondiale. Le nombre total des personnes vivant avec le virus augmente d'année en année pour atteindre début 2006 le plus haut niveau jamais enregistré. L'ONUSIDA fait état de plus de quarante millions de personnes contaminées. Durant l'année 2005, cinq millions de personnes ont contracté le HIV et trois millions de décès dus au SIDA ont été recensés. Alors que la prévalence des épidémies d'Afrique subsaharienne semble en voie de stabilisation,

celle des épidémies d'Asie centrale, d'Asie de l'est et d'Europe orientale est en forte progression. Néanmoins, l'Afrique subsaharienne reste de loin la région la plus touchée par la pandémie (http://www.unaids.org/epi/2005/doc/EPIupdate2005_pdf_fr/epi_update_2005_fr.pdf). **(Figure 1)**

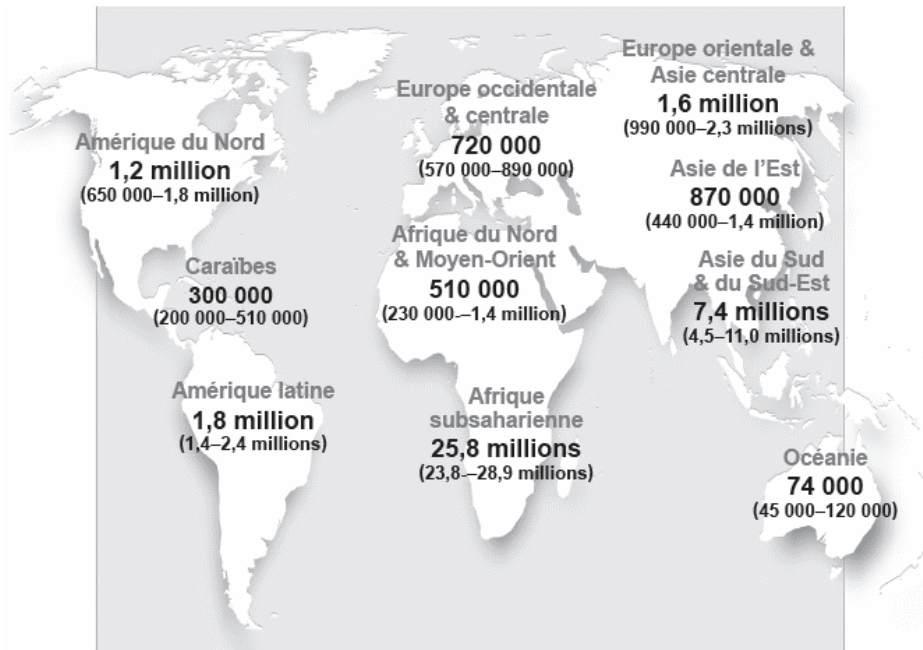


Figure 1 : Adultes et enfants vivant avec le HIV (estimation fin 2005). D'après http://www.unaids.org/epi/2005/doc/EPIupdate2005_pdf_fr/epi_update_2005_fr.pdf.

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1)

1. Généralités sur les virus des cellules eucaryotes

Les virus sont des agents étiologiques responsables de nombreuses infections chez les animaux et les végétaux. Chez l'homme, on les retrouve à l'origine de pathologies bénignes comme la grippe, la varicelle, la rougeole ou de maladies graves comme la poliomyélite, certaines hépatites ou le SIDA.

1.1. Définition des virus

Le concept de virus a été défini en 1953 par André Lwoff. Un virus est un parasite intracellulaire obligatoire capable de se multiplier uniquement dans les cellules animales ou végétales vivantes en détournant la machinerie cellulaire de l'hôte à son profit.

1.2. Structure des virus

La forme extracellulaire du virus, appelée particule virale ou virion, est composée d'au moins deux éléments constants et obligatoires : un acide nucléique porteur de l'information génétique et une coque de nature protéique appelée capsid capable d'assurer la protection du virus et sa survie dans le milieu extérieur.

1.2.1. Le génome

Le génome des virus eucaryotes peut se présenter sous différentes configurations : il peut être monocaténaire ou bicaténaire, linéaire ou circulaire, à ARN ou ADN.

1.2.2. La capsid

La capsid est une structure polymérisée dont les protéines constitutives sont codées par le génome viral. D'un point de vue morphologique, on distingue les virus possédant une capsid hélicoïdale (les sous-unités protéiques se fixent le long de l'acide nucléique) des virus

possédant une capsidie icosaédrique (les sous-unités protéiques se répartissent sur un icosaèdre, polyèdre régulier possédant 20 faces et 12 sommets).

1.3. Cycle de réplication des virus

Le cycle de réplication des virus est basé sur le parasitisme des cellules hôtes. En effet, les virus mettent à profit la machinerie cellulaire de l'hôte pour se multiplier.

L'attachement des particules virales au niveau de la membrane cellulaire constitue la première étape du cycle biologique d'un virus. Le virion va ensuite entrer dans la cellule. La destruction de la capsidie va libérer le génome viral qui va ainsi pouvoir être transcrit puis traduit. L'assemblage des différents constituants viraux synthétisés va ensuite permettre la libération des particules virales néoformées dans le milieu extracellulaire.

1.4. Classification des virus

La classification des virus des cellules eucaryotes est présentée dans le **Tableau 1**. Elle repose sur les caractéristiques génomiques, morphologiques et antigéniques des virus (<http://ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fr-fst-h.htm>).

Famille	Genre
Adenoviridae	Mastadenovirus
	Aviadenovirus
	Atadenovirus
	Siadenovirus
Arenaviridae	Arenavirus
Arteriviridae	Arterivirus
Asfarviridae	Asfivirus
Astroviridae	Masmatrovirus
	Avastrovirus
Birnaviridae	Avibirnavirus
Bornaviridae	Bornavirus
Bunyaviridae	Orthobunyavirus
	Hantavirus
	Nairovirus
	Phlebovirus
Caliciviridae	Vesivirus
	Lagovirus
	Norovirus
	Sapovirus
Circoviridae	Circovirus
	Gyrovirus
Coronaviridae	Coronavirus
	Torovirus
	Deltavirus
Ebolaviridae	Marburgvirus
	Ebolavirus
Flaviviridae	Flavivirus
	Pestivirus
	Hepacivirus
Hepadnaviridae	Orthohepadnavirus
	Avihepadnavirus
	Virus semblable au virus de l'hépatite E
Herpesviridae	
αherpesvirinae	Simplexvirus
	Varicellovirus
	Virus de la maladie de Marek
	Virus infectieux de la trachée et du larynx
βherpesvirinae	Cytomegalovirus
	Muromegalovirus
	Roseolovirus
γherpesvirinae	Lymphocryptovirus
	Rhadinovirus
Iridoviridae	Ranavirus
	Lymphocystivirus
Nodaviridae	α nodavirus
	β nodavirus
Orthomyxoviridae	Influenzavirus A
	Influenzavirus B
	Influenzavirus C

Famille	Genre
Orthomyxoviridae	Thogotovirus
	Isavirus
	Papillomavirus
Paramyxoviridae	
βparamyxovirinae	Respirovirus
	Morbillivirus
	Rubulavirus
	Henipavirus
	Avulavirus
Pneumovirinae	Pneumovirus
	Metapneumovirus
Parvoviridae	
βparvovirinae	Parvovirus
	Erythrovirus
	Dependovirus
Picornaviridae	Enterovirus
	Rhinovirus
	Hepatovirus
	Cardiovirus
	Aphovirus
	Parechovirus
Polyomaviridae	Polyomavirus
Poxviridae	
βchordipoxvirinae	Orthopoxvirus
	Parapoxvirus
	Avipoxvirus
	Capripoxvirus
	Leporipoxvirus
	Suipoxvirus
	Molluscipoxvirus
	Yatapoxvirus
Reoviridae	Orthoreovirus
	Orbivirus
	Rotavirus
	Coltivirus
	Aquareovirus
Retroviridae	α retrovirus
	β retrovirus
	γ retrovirus
	δ retrovirus
	ϵ retrovirus
	Lentivirus
Rhabdoviridae	Spumavirus
Rhabdoviridae	Vesiculovirus
	Lyssavirus
	Ephemerovirus
	Novirhabdovirus
Togaviridae	α virus
	Rubivirus

Tableau 1 : Classification des virus des cellules eucaryotes. D'après <http://ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fr-fst-h.htm>.

2. Le HIV-1 est un rétrovirus complexe

2.1. Caractéristiques des rétroviridae

Les rétroviridae constituent une vaste famille de virus infectant les oiseaux et les mammifères. Ils possèdent une géométrie icosaédrique et leur taille varie entre 80 et 100nm de diamètre.

Le génome viral est constitué de deux molécules homologues d'ARN simple brin de polarité positive. La taille du génome de chaque monomère varie entre 7000 et 11000 nucléotides. Les deux ARN sont étroitement associés à des protéines de nucléocapside. Cet ensemble constitue un complexe ribonucléoprotéique qui porte le nom de nucléocapside. Les rétrovirus sont principalement caractérisés par la présence d'une enzyme appelée transcriptase inverse capable de catalyser la synthèse d'un ADN bicaténaire à partir de l'ARN génomique viral (Baltimore D., 1970 ; Temin H.M., 1970). Cet ADN bicaténaire ou provirus est alors intégré dans le génome de la cellule hôte pour y être transcrit.

La capsidie encore appelée core renferme non seulement la nucléocapside, mais également de nombreuses molécules d'enzymes virales indispensables à la réplication du virus (intégrase, transcriptase inverse et protéase).

La capsidie est protégée par une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique provenant de la membrane plasmique de la cellule hôte préalablement infectée et dans laquelle sont enchâssées des spicules.

La face interne de l'enveloppe virale est tapissée par des protéines de matrice.

2.2. Historique des rétroviridae

Les fondements de la rétrovirologie ont été établis dès le début du vingtième siècle avec la découverte des rétrovirus aviaires : le virus de la leucose aviaire (ALV) en 1908 (Ellerman V., 1908), puis quelques années plus tard, le virus du sarcome de Rous (RSV) (Rous P., 1911).

Par la suite, d'autres rétrovirus associés à différentes formes de cancers chez les mammifères furent isolés comme le virus de la tumeur mammaire murine (MMTV) ou le virus de la leucémie bovine (BLV). Le premier rétrovirus humain fut isolé en 1980 par le Professeur Robert Gallo et porte le nom de virus de la leucémie humaine des cellules T de type I ou HTLV-I (Poiesz B.J., 1980).

L'année 1983 fut marquée par la découverte de l'agent pathogène responsable du SIDA : le HIV-1, presque simultanément par les équipes du Professeur Luc Montagnier (Barré-Sinoussi F., 1983) et du Professeur Robert Gallo (Gallo R.C., 1983). En 1986, soit trois ans après la découverte du HIV-1, l'équipe du Professeur Luc Montagnier isolait un deuxième virus associé à l'immunodépression humaine à partir d'échantillons sanguins de patients originaires d'Afrique de l'Ouest atteints cliniquement du SIDA. Il a été dénommé HIV-2 pour virus de l'immunodéficience humaine de type 2 (Clavel F., 1986).

2.3. Classification des rétroviridae

Des alignements des séquences protéiques de la transcriptase inverse ont permis au Comité International sur la Taxonomie des Virus de classer les rétroviridae en deux sous-familles : les orthorétroviridae et les spumarétroviridae.

2.3.1. Les orthorétroviridae

Les orthorétrovirus sont subdivisés en six genres : les alpharétrovirus, les bêtarétrovirus, les gammarétrovirus, les deltarétrovirus, les epsilon-rétrovirus et les lentivirus. Ils se distinguent par la morphologie des particules virales et les manifestations cliniques qu'ils induisent. Parmi ces six genres, il est possible de distinguer les rétrovirus simples (alpharétrovirus, bêtarétrovirus et gammarétrovirus) dont le génome ne contient que trois gènes (*gag*, *pol* et *env*) des rétrovirus complexes (deltarétrovirus, epsilon-rétrovirus et lentivirus) dont le génome code également pour plusieurs protéines régulatrices et accessoires.

2.3.2. Les spumarétroviridae

Ces rétrovirus complexes doivent leur nom à l'aspect des lésions qu'ils induisent, semblables à de la mousse. La sous-famille des spumarétroviridae ne contient à ce jour qu'un seul genre : les spumavirus, dont l'espèce type est le virus spumeux du chimpanzé (CFV). Ils ont également été isolés chez l'homme mais aucune implication pathologique n'est connue à ce jour.

2.4. Caractéristiques du HIV-1

2.4.1. Le HIV-1 dans la classification des rétroviridae

Le HIV-1 est un orthorétrovirus du genre lentivirus. Comme tous les lentivirus, le HIV-1 est un agent cytopathogène responsable d'infections persistantes et progressives, caractérisées par une phase de latence clinique généralement très longue.

2.4.2. Origines du HIV-1

L'hypothèse la plus couramment admise concernant l'origine de la pandémie actuelle du SIDA est celle de l'adaptation d'un virus simien chez l'homme (Hahn B.H., 2000). En effet, des lentivirus simiens associés à une immunodépression et apparentés au HIV-1 ont été identifiés à partir de 1985 et sont capables d'infecter de nombreuses espèces de primates (mandrills, singes verts d'Afrique, etc). Ces rétrovirus simiens ont été regroupés sous le terme de virus de l'immunodéficience simienne (SIV).

Une phylogénie des lentivirus des primates a pu être établie à partir d'alignements des séquences génomiques des virus. Celle-ci montre un éloignement prononcé entre les virus HIV-1 et HIV-2, attestant une origine différente. En effet, le HIV-1 est apparenté au SIV isolé chez le chimpanzé (SIVcpz) alors que le HIV-2 se rapproche génétiquement du SIV isolé chez le singe mangabey (SIVsm).

2.4.3. Variabilité génétique du HIV-1

Le HIV-1 est caractérisé par une très grande variabilité génétique. De nombreuses mutations peuvent ainsi apparaître dans les régions codantes ou non codantes du génome, contribuant ainsi à la génération de nombreux variants viraux intra-individuels et inter-individuels.

La variabilité génétique du HIV-1 est liée à plusieurs mécanismes. Tout d'abord, contrairement aux ADN polymérases cellulaires, la transcriptase inverse est dépourvue

d'activité correctrice (exonucléase 3'-5') et provoque ainsi statistiquement une erreur tous les 10000 nucléotides rétrotranscrits (Mansky L.M., 1995).

De plus, dans certains cas de co-infection par deux virus distincts, il est possible d'observer des phénomènes de recombinaison entre les deux génomes viraux au moment de la transcription inverse (Hu W.S., 1990).

Parmi ces différents variants viraux de HIV-1, il est possible de différencier trois groupes sur la base de leur séquence génétique : les isolats du groupe M (Main), les isolats du groupe O (Outlier) et les isolats du groupe N (non M non O). Les isolats du groupe M, eux-mêmes subdivisés en 11 sous-types (de A à K), sont retrouvés à travers le monde et sont les responsables majeurs de la pandémie du SIDA. Ils diffèrent dans l'efficacité de transmission (Renjifo B., 2003) ou la progression de la maladie (Kaleebu P., 2001). Les isolats des groupes O et N sont, quant à eux, restreints à l'Afrique centrale et l'Afrique de l'Ouest.

3. Structure de la particule virale HIV-1

La morphologie des virions HIV-1 a été établie grâce aux techniques de microscopie électronique et de cryomicroscopie (Gelderblom H.R., 1987 ; Gelderblom H.R., 1989). Ils possèdent une géométrie icosaédrique avec un diamètre d'environ 100nm. Des spicules ou projections sont incluses dans l'enveloppe virale, dont la face interne est tapissée par des protéines de matrice. L'enveloppe contient un core de forme conique renfermant la nucléocapside ainsi que de nombreuses molécules d'origine virale et cellulaire. (**Figure 2**)

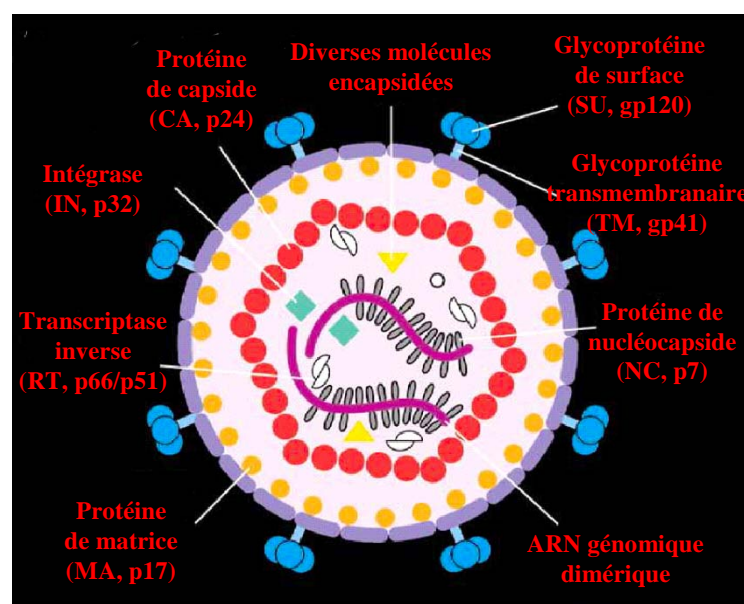


Figure 2 : Structure de la particule virale HIV-1. D'après Sherman M.P., 2002 avec modifications.

3.1. L'enveloppe

L'enveloppe virale est composée d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire. Sa composition lipidique est toutefois légèrement différente de celle de la membrane de la cellule hôte (Aloia R.C., 1993). Soixante douze spicules sont insérées dans l'enveloppe virale, chacune d'entre-elles étant constituée d'un trimère de la glycoprotéine transmembranaire (TM, gp41) lié de manière non covalente à un trimère de la glycoprotéine de surface (SU, gp120) (Lu M., 1995).

3.2. La matrice

Directement sous l'enveloppe, la matrice est formée par l'oligomérisation de la protéine de matrice (MA, p17). La myristilation de l'extrémité N-terminale de la protéine de matrice lui permet de s'enchâsser dans l'enveloppe virale.

3.3. La capsid

Localisée au centre de la particule virale, la capsid est formée par l'assemblage de la protéine de capsid (CA, p24). De forme conique, elle renferme la nucléocapsid ainsi que de nombreuses molécules d'origine cellulaire ou virale impliquées dans le cycle répliatif du virus.

3.4. La nucléocapsid

Le génome du HIV-1 est constitué de deux molécules identiques d'ARN simple brin de polarité positive, liées de façon non covalente à proximité de leur extrémité 5'. Elles présentent les modifications post-transcriptionnelles des ARNm cellulaires classiques, c'est-à-dire une structure CAP à l'extrémité 5' et une extrémité 3' polyadénylée. La taille de chacun des deux brins d'ARN est de 9200 nucléotides.

Pour former la nucléocapsid, des protéines de nucléocapsid (NC, p7) se fixent de manière spécifique sur l'ARN génomique viral.

3.5. Les molécules encapsidées

Les particules virales contiennent de nombreuses molécules d'origine virale intervenant à différentes étapes du cycle de répliation : la protéase (PR, p12), la transcriptase inverse (RT,

p66 et p51), l'intégrase (IN, p32), la protéine p6, le peptide p2, le peptide p1 et les protéines accessoires Vpr (Accola M.A., 2000 ; Kondo E., 1995), Nef (Kotov A., 1999) et Vif (Camaur D., 1996).

Les virions renferment également des molécules d'origine cellulaire : des ARNt dont l'ARNt^{3^{lys}} qui sert d'amorce pour la transcription inverse (Kleiman L., 2002), des ARNt synthétases (Cen S., 2001), de la cyclophiline A (Braaten D., 1996) ou encore de l'actine (Wilk T., 1999).

4. Organisation de l'ARN génomique du HIV-1

4.1. Régions non-codantes

Sur l'ARN génomique du HIV-1, on retrouve de part et d'autre des gènes viraux, deux séquences régulatrices non-codantes. Quelques séquences non-codantes impliquées dans différentes étapes du cycle réplcatif viral sont également disséminées dans les régions codantes du génome viral.

4.1.1. La région 5' non-codante

Elle est très structurée et impliquée dans de nombreuses étapes du cycle de réplication du virus. Elle peut être subdivisée en quatre régions : la région R (Répétée), la région U5 (Unique en 5'), la séquence PBS (Primer Binding Site) et la région leader.

La région R comprend deux motifs tige-boucle impliqués dans la transcription des gènes viraux.

Le premier motif dénommé TAR (TransActivation Response element) joue un rôle crucial dans l'activation de la transcription des gènes viraux en interagissant avec le facteur de transcription viral Tat au niveau d'une protubérance latérale de trois pyrimidines (Dingwall C., 1989). Le mécanisme d'action de Tat sera détaillé dans le chapitre consacré à la régulation de la transcription des gènes du HIV-1.

Le deuxième motif comprend le signal de polyadénylation AAUAAA (Valsamakakis A., 1991).

La région U5 constitue le premier module à être transcrit lors de la transcription inverse.

La séquence PBS lie de manière spécifique l'ARNt^{lys} cellulaire utilisé comme amorce lors de l'étape de transcription inverse (Kleiman L., 2002).

La région leader est comprise entre la séquence PBS et la phase codante du gène *gag* (Clever J.L., 2002). Elle est composée de quatre motifs tige-boucle impliqués dans les processus de dimérisation de l'ARN génomique pour SL1 (Paillart J.C., 2004), d'épissage pour SL2 (O'Reilly M.M., 1995) et d'encapsidation du génome viral pour SL3 (Berkovitz R.D., 1996).

4.1.2. La région 3' non-codante

Elle est subdivisée en deux régions : la région U3 (Unique en 3') et la région R (Répétée), strictement identique à celle retrouvée en 5'.

4.1.3. Les régions non-codantes internes

Au sein du gène *rev*, se trouve une séquence appelée RRE (Rev Responsive Element) structurée en tiges-boucles et impliquée dans l'export nucléaire des transcrits (Malim M.H., 1989)

L'ARN génomique viral renferme également deux séquences riches en purines : la séquence PPT 3' (PolyPurine Tract 3') située en amont de la région U3 et la séquence PPTc (PolyPurine Tract central) située au sein du gène *pol* (Charneau P., 1992). Cette richesse en purines leur confère une résistance à l'activité enzymatique ribonucléase H et ainsi un rôle prépondérant dans l'étape de transcription inverse.

Au centre du génome viral se trouve une séquence riche en nucléotides AT appelée séquence CTS (Central Termination Signal) et impliquée dans l'étape de terminaison de la transcription inverse (Charneau P., 1994).

4.2. Régions codantes

L'ARN génomique du HIV-1 permet l'expression de 16 protéines distinctes (Frankel A.D., 1998). Il contient les trois gènes communs à tous les rétrovirus : *gag* (group-specific antigen), *pol* (polymerase) et *env* (enveloppe) permettant l'expression de protéines structurales et enzymatiques. Cependant, comme tous les rétrovirus complexes, le HIV-1 possède également des gènes codant pour des protéines régulatrices ou accessoires (Peterlin B.M., 2003).
(Figure 3)

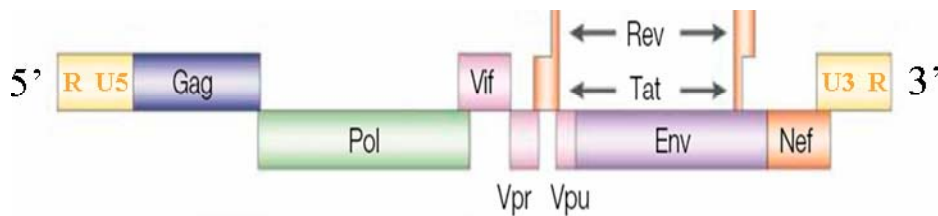


Figure 3 : Organisation de l'ARN génomique du HIV-1. D'après Peterlin B.M., 2003 avec modifications.

Le gène *gag* permet l'expression d'une polyprotéine ($\text{Pr}55^{\text{Gag}}$) clivée par la protéase virale pour libérer la protéine de matrice (MA, p17), la protéine la capside (CA, p24), le peptide p2 impliqué dans la sélection des ARNm non-épissés au cours de l'encapsidation (Russell R.S., 2003), la protéine de nucléocapside (NC, p7), le peptide p1 ainsi que la protéine p6 impliquée dans l'incorporation de Vpr dans la particule virale (Kondo E., 1995 ; Paxton W., 1993) et dans le bourgeonnement des particules virales néoformées (Göttlinger H.G., 1991).

Le gène *pol* permet la synthèse d'un précurseur polypeptidique ($\text{Pr}160^{\text{Gag-Pol}}$) obtenu suite à un décalage du cadre de lecture à la fin du gène *gag* (Jacks T., 1985). Libérée par un mécanisme d'autocatalyse (Debouck C., 1987), la protéase (PR, p12) va alors cliver le précurseur pour libérer la transcriptase inverse (RT, p66 et p51) et l'intégrase (IN, p32).

Le gène *env* permet l'expression d'un précurseur polypeptidique ($\text{Pr}160^{\text{Env}}$) clivé par une protéase d'origine cellulaire pour donner les deux protéines constituant les spicules : la glycoprotéine de surface (SU, gp120) et la glycoprotéine transmembranaire (TM, gp41).

Le gène *tat* (*transactivator of transcription*) permet l'expression de la protéine Tat (p14). Lorsque Tat se fixe sur la séquence d'ARN TAR, elle permet une forte activation de la transcription des gènes viraux (Dingwall C., 1989). Son mode d'action sera détaillé dans le chapitre consacré à la régulation de la transcription des gènes du HIV-1.

Le gène *rev* (*regulator of virion expression*) code pour la protéine de régulation post-transcriptionnelle Rev (p19). Cette protéine permet l'exportation nucléo-cytoplasmique des transcrits viraux non-épissés ou mono-épissés (Malim M.H., 1989).

Le gène *nef* (*negative factor*) permet l'expression de la protéine Nef (p27). Improprement baptisée, cette protéine agit au contraire comme un facteur positif puisqu'elle stimule la

réplication virale en agissant à différents niveaux. Tout d'abord, Nef provoque la levée de l'inhibition de la réplication virale des lymphocytes T quiescents en stimulant l'expression du facteur de transcription NF-AT (Manninen A., 2000). Nef potentialise également l'infectivité virale en provoquant l'internalisation des récepteurs CD4 (Aiken C., 1994) et des molécules du CMHI (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I) présents à la surface des cellules infectées (Schwartz O., 1996).

Le gène *vif* (*viral infectivity factor*) code pour le facteur d'infectivité virale Vif (p23). Dans les particules virales, Vif interagit directement avec le génome viral par l'intermédiaire de son extrémité 5' (Henriet S., 2005).

Des cytidines déaminases cellulaires dénommées APOBEC3F et APOBEC3G ont été décrites comme provoquant des hypermutations dans le brin négatif de l'ADN du HIV-1 au moment de la transcription inverse. Ces modifications conduisent soit à une dégradation de l'ADN hypermuté par des enzymes cellulaires, soit à la synthèse de protéines virales non fonctionnelles (Harris R.S., 2003 ; Lecossier D., 2003 ; Mangeat B., 2003 ; Zhang H., 2003). Afin d'échapper à ce mécanisme de défense cellulaire contre le virus, Vif va inhiber l'action antivirale des enzymes APOBEC3F (Bishop K.N., 2004 ; Liddament M.T., 2004 ; Wiegand H.L., 2004 ; Zheng Y.H., 2004) et APOBEC3G (Kao S., 2003 ; Mariani R., 2003 ; Sheehy A.M., 2002) en induisant leur dégradation par le protéasome (Mehle A., 2004 ; Sheehy A.M., 2003).

Le gène *vpr* (*viral protein r*) permet l'expression de la protéine Vpr (p15) pour laquelle plusieurs fonctions ont été décrites. Vpr est impliquée dans l'import du complexe de pré-intégration viral (Bukrinsky M.I., 1998), la diminution du taux de mutations lors de la rétrotranscription (Chen R., 2004 ; Mansky L.M., 2000), la transactivation de la transcription des gènes viraux (Agostini I., 1996 ; Wang L., 1995) et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (He J., 1995 ; Jowett J.B., 1995).

Le gène *vpu* (*viral protein u*) permet l'expression de la protéine Vpu (p16). Vpu facilite le bourgeonnement des particules virales immatures (Bour S., 2003) et contribue avec Nef à l'infectivité virale en internalisant les récepteurs CD4 présents à la surface des cellules infectées (Chen B.K., 1996).

5. Cycle de réplication du HIV-1

Le cycle répliatif du HIV-1 peut être divisé en deux phases : une phase pré-intégrative et une phase post-intégrative. La phase pré-intégrative débute avec l'interaction entre le virus et la cellule hôte et se termine par l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. La phase post-intégrative est déclenchée après une phase de latence plus ou moins longue et se termine par le bourgeonnement et la maturation des particules virales néoformées (Freed E.O., 2002). (**Figure 4**)

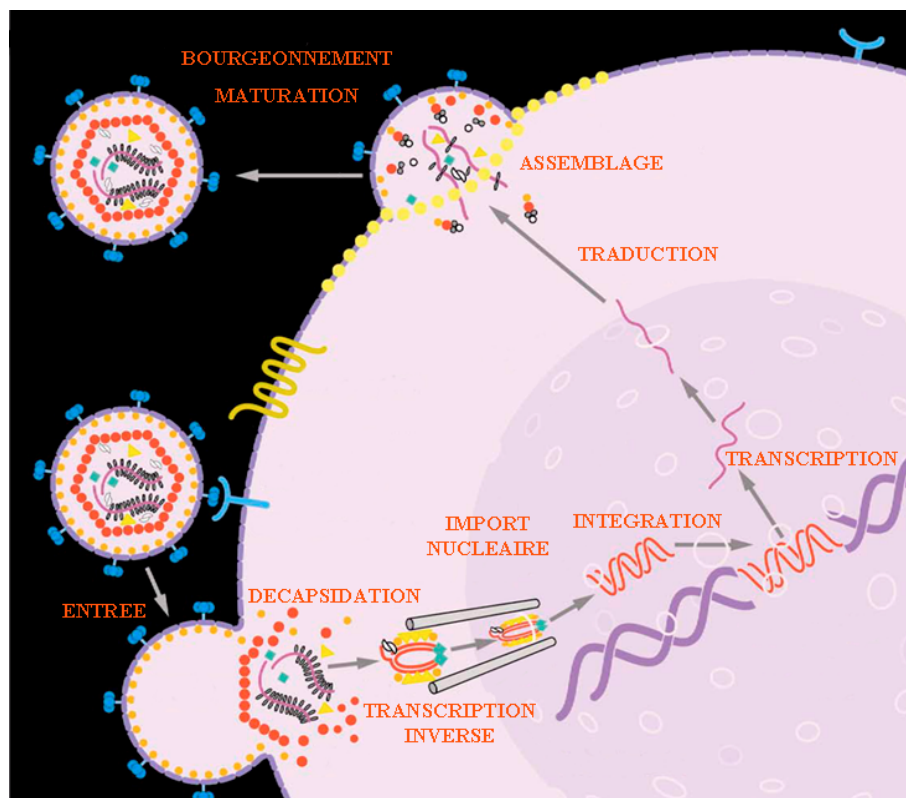


Figure 4 : Cycle de réplication du HIV-1. D'après Sherman M.P., 2002 avec modifications.

5.1. Phase pré-intégrative

5.1.1. L'entrée du virus dans la cellule hôte

Le récepteur cellulaire du HIV-1 a été découvert dès le milieu des années 1980 : il s'agit de la protéine CD4 (Dalglish A.G., 1984). Cependant, sa seule présence n'est pas suffisante pour

déclencher le processus de fusion membranaire. En effet, quelques années après l'identification du récepteur du HIV-1, certains membres de la famille des récepteurs des chimiokines ont été identifiés comme étant les corécepteurs impliqués dans l'entrée du virus dans la cellule hôte (Berger E.A., 1999 ; Doms R.W., 1997). Deux d'entre eux jouent un rôle particulièrement important dans l'infection virale : les corécepteurs CXCR4 et CCR5.

L'attachement du virus à la surface de la cellule hôte passe par une interaction spécifique entre le récepteur CD4 et la protéine virale gp120. Cette liaison va provoquer un changement de conformation de la protéine gp120 qui va ainsi exposer sa boucle hypervariable V3 alors enfouie à l'intérieur de la protéine. Le complexe CD4/gp120 va ensuite s'associer avec le corécepteur par l'intermédiaire de la boucle V3.

Cette interaction permet de définir le tropisme cellulaire des différentes souches de HIV-1. En effet, les souches dites X4 utilisent préférentiellement les corécepteurs CXCR4 présents à la surface des lymphocytes T, les souches dites R5 utilisent préférentiellement les corécepteurs CCR5 présents à la surface des cellules dendritiques, des macrophages et des lymphocytes T et les souches dites X4R5 utilisent indifféremment les deux types de corécepteurs (Doms R.W., 2000).

La formation du trimère CD4/gp120/corécepteur aboutit finalement à un réarrangement conformationnel de la protéine virale gp41 qui va insérer le domaine N-terminal de sa région transmembranaire (encore appelé peptide de fusion) dans la membrane de la cellule hôte, facilitant ainsi le rapprochement puis la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire (Cooley L.A., 2003).

5.1.2. La décapsidation

La capsid est ainsi internalisée dans le cytoplasme de la cellule hôte puis rapidement déstabilisée pour libérer un complexe nucléoprotéique appelé complexe de transcription inverse et comprenant le génome viral, l'ARNt3^{lys} ainsi que différentes molécules d'origine cellulaire et virale. Cette étape est facilitée par la cyclophiline A incorporée dans le virion (Braaten D., 1996 ; Luban J., 1996).

5.1.3. La transcription inverse

La transcription inverse permet la synthèse d'un ADN proviral double brin à partir de l'ARN génomique (Götte M., 1999). Elle requiert la transcriptase inverse, enzyme multifonctionnelle

possédant une activité ADN polymérase ARN dépendante, une activité ADN polymérase ADN dépendante et une activité ribonucléase H (RNase H).

Les différentes étapes de la transcription inverse sont schématisées dans la **Figure 5**.

La synthèse du brin d'ADN de polarité négative ou ADN (-) est initiée par l'hybridation des 18 nucléotides 3' terminaux de l'ARNt3^{lys} sur les 18 nucléotides complémentaires de la région PBS située dans la région 5' non codante du génome viral (Ratner L., 1985). La transcriptase inverse assure alors la synthèse des régions U5 puis R. Le brin d'ADN ainsi néoformé est appelé « ADN (-) strong stop ».

La matrice d'ARN correspondant au brin nouvellement synthétisé est ensuite hydrolysée par l'activité RNase H de la transcriptase inverse.

L'« ADN (-) strong stop » est ensuite transféré au niveau de l'extrémité 3' du génome viral de manière à pouvoir s'apparier avec la région R de la matrice d'ARN (Kim J.K., 1997 ; Wu W., 1995). Cette étape est communément appelée le premier saut de brin.

L'« ADN (-) strong stop » sert d'amorce pour la synthèse du brin d'ADN (-) qui se poursuit jusqu'à la séquence PBS. L'activité RNase H de la transcriptase inverse va ensuite dégrader la matrice d'ARN à l'exception de deux séquences riches en purines appelées PPT 3' et PPTc. La séquence PPT 3' sert d'amorce pour la synthèse du brin U (+) ou « ADN (+) strong stop ». Alors que la synthèse de l'« ADN (+) strong stop » se poursuit jusqu'à la séquence PBS, la synthèse du brin D (+) est initiée à partir de la séquence PPTc.

Après hydrolyse des amorces d'ARN et clivage de l'ARNt3^{lys} par l'activité RNase H de la transcriptase inverse, l'« ADN (+) strong stop » va ensuite subir un deuxième saut de brin pour s'hybrider au niveau de la séquence PBS de l'ADN (-) (Peliska J.A., 1992).

L'ADN (-) va alors servir de matrice pour une synthèse complète des brins U (+) et D (+) de même que le brin U (+) va servir de matrice pour la synthèse complète de l'ADN (-). La synthèse du brin U (+) se termine après un déplacement du brin D (+) sur une centaine de nucléotides par la transcriptase inverse au niveau de la région CTS (Charneau P., 1994).

Le produit de la transcription inverse est une molécule d'ADN double brin linéaire contenant un recouvrement central d'une centaine de nucléotides appelé ADN flap et deux extrémités identiques, chacune constituée des trois séquences U3, R et U5 encore appelées LTR (Long Terminal Repeat).

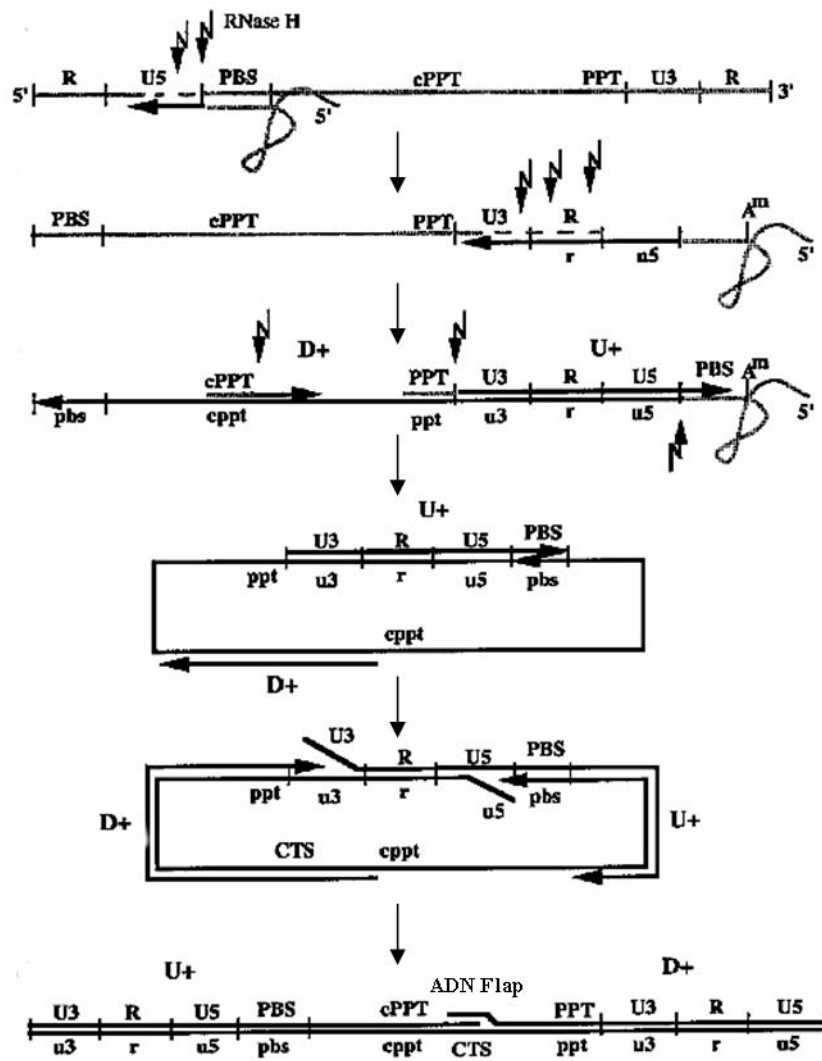


Figure 5 : Les étapes de la transcription inverse. D'après Götte M., 1999 avec modifications.

5.1.4. L'import nucléaire de l'ADN viral

Comme tous les lentivirus, le HIV-1 est capable d'infecter des cellules qui ne se divisent pas comme les macrophages. Pour cela, il a développé un mécanisme de transport de son matériel génétique sous la forme d'un complexe de pré-intégration ou PIC à travers les pores de la membrane nucléaire (Sherman M.P., 2002). Le PIC est obtenu après l'étape de transcription inverse et comprend l'ADN viral néosynthétisé, de nombreuses protéines virales dont l'intégrase, la protéine de matrice, la transcriptase inverse et Vpr ainsi que quelques protéines d'origine cellulaire comme la protéine HMG-I (Y) (Farnet C.M., 1997 ; Miller M.D., 1997). Pour traverser les pores nucléaires, le PIC utilise la machinerie cellulaire d'import nucléaire (Bukrinsky M.I., 1999). Il semblerait cependant que ce transport soit facilité par les éléments constitutifs du PIC et notamment l'ADN flap (Zennou V., 2000) ainsi que l'intégrase, la protéine de matrice et Vpr qui contiennent des séquences de localisation nucléaire ou NLS (Bouyac-Bertoia M., 2001 ; Haffar O.K., 2000 ; Jenkins Y., 1998). (**Figure 6**)

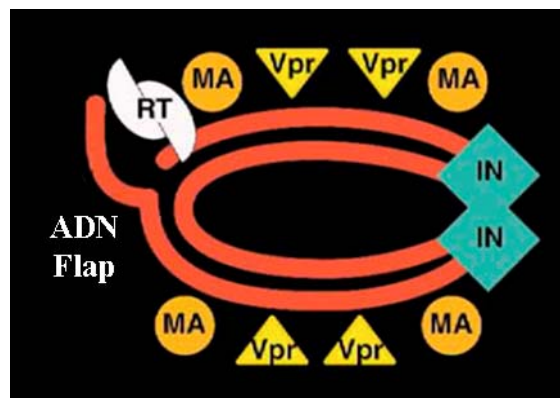


Figure 6 : Structure du PIC. D'après Sherman M.P., 2002 avec modifications.

5.1.5. L'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte

Une fois dans le noyau, l'intégrase va catalyser l'insertion de l'ADN viral dans l'ADN chromosomique de l'hôte (Van Maele B., 2005). Dans un premier temps, l'intégrase va reconnaître une séquence d'environ 20 paires de bases située aux extrémités 3' de chacune des séquences LTR (Sherman P.A., 1990). Elle clive alors à chaque extrémité un dinucléotide GT, générant ainsi une molécule d'ADN viral aux extrémités 3' porteuses de groupements hydroxyles. Parallèlement à cette action, l'intégrase va cliver l'ADN cellulaire cible. Finalement, l'intégration de l'ADN viral passe par une réaction de transestérification entre les

extrémités 3' hydroxyles libres de l'ADN viral et les extrémités 5' phosphates libres de l'ADN cellulaire.

Outre l'intégrase, cette étape nécessite des cofacteurs cellulaires comme les protéines HMG-I (Y) (Hindmarsh P., 1999), Ini 1 (Kalpana G.V., 1994) et BAF (Chen H., 1998).

Les sites d'intégration du provirus sont multiples et la majorité des cellules infectées renferme plus d'un provirus intégré (Jung A., 2002). Il semblerait que l'intégration du provirus ne soit pas aléatoire, mais s'opèrerait au niveau de sites préférentiels localisés dans des régions renfermant des gènes activés suite à l'infection par le HIV-1 (Schröder A.R., 2002).

5.2. Phase post-intégrative

5.2.1. L'expression de l'ADN viral

Une fois intégré dans le génome de la cellule hôte, le provirus acquiert la même stabilité génétique et le même statut qu'un gène cellulaire. Il peut donc s'exprimer activement pour produire de nouveaux virions ou rester complètement silencieux. On parle alors de latence post-intégrationnelle. L'expression des gènes viraux est déterminée par l'état de prolifération et d'activation de la cellule hôte mais également par le site d'intégration du provirus (Jordan A., 2001). En effet, bien que le provirus s'intègre préférentiellement dans des zones activement transcrites, la faible proportion de génome viral intégré dans les zones hétérochromatiniennes contribue à la formation de cellules réservoirs insensibles à la thérapie anti-rétrovirale actuelle (Scherdin U., 1990).

La transcription des gènes viraux nécessite la machinerie transcriptionnelle de l'hôte et est modulée par de nombreux mécanismes faisant intervenir des protéines d'origine cellulaire et virale. Les mécanismes moléculaires qui gouvernent la transcription des gènes du HIV-1 ainsi que sa régulation seront détaillés plus loin.

Trois types de transcrits viraux sont obtenus après épissage : les ARNm multi-épissés permettant l'expression des protéines Tat, Rev et Nef, les ARNm mono-épissés permettant l'expression des protéines Vif, Vpr, Vpu et Env et les ARNm non-épissés permettant

l'expression des protéines de structure et des enzymes virales ou faisant office de génome viral.

La transcription des gènes du HIV-1 peut être subdivisée en deux phases : une phase initiale au cours de laquelle sont synthétisées les protéines Tat, Rev et Nef et une phase finale permettant l'expression des protéines de structure, des enzymes virales et des protéines accessoires restantes.

5.2.1.1. La phase initiale de l'expression virale

La machinerie transcriptionnelle de la cellule hôte va permettre la synthèse des premiers transcrits viraux. Cependant, en absence de Tat, l'activité transcriptionnelle de base ne génère que très peu de transcrits matures. Certains d'entre eux vont tout de même subir un mécanisme d'épissage alternatif grâce à la présence en leur sein de nombreux sites donneurs et accepteurs (Schwartz S., 1990). A ce stade, la traduction des transcrits non-épissés et mono-épissés est inhibée par des séquences CRS (Cis-acting Repression Sequence) présentes dans les gènes *gag*, *pol* et *env* et qui agiraient comme des signaux de rétention nucléaire (Maldarelli F., 1991 ; Rosen C.A., 1988). Par conséquent, seuls les ARNm multi-épissés qui codent pour les protéines Tat, Rev et Nef et qui sont dépourvus de ces séquences, s'accumulent dans le cytoplasme pour y être traduits. Les protéines Tat et Rev vont ensuite regagner le noyau.

5.2.1.2. La phase finale de l'expression virale

Dans le noyau, Rev va se fixer sous la forme d'un multimère sur la séquence RRE présente sur les ARNm non-épissés et mono-épissés (Olsen H.S., 1990). Grâce à son signal d'export nucléaire ou NES (Nuclear Export Signal), Rev va pouvoir interagir avec la machinerie d'export nucléaire de la cellule et permettre un transport cytoplasmique de ces transcrits pour y être traduits par la machinerie cellulaire ou servir d'ARN génomique (Neville M., 1997).

Parallèlement à l'action de Rev, le transactivateur viral Tat va jouer un rôle crucial dans la phase tardive de la transcription des gènes viraux en permettant une élongation efficace et rapide des transcrits viraux (Berkhout B., 1989). Le mécanisme d'action de Tat sera détaillé dans le chapitre consacré à la régulation de la transcription des gènes du HIV-1.

5.2.2. La production de nouveaux virions

5.2.2.1. L'assemblage des constituants viraux

L'assemblage des différents constituants viraux se fait au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte. En effet, la myristylation des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} au niveau du domaine MA leur permet de s'ancrer dans la bicouche lipidique (Göttlinger H.G., 1989) préférentiellement au niveau des radeaux lipidiques (Ono A., 2001).

Le domaine p2 des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} semble être impliqué dans la sélection des ARN génomiques non-épissés au cours de l'encapsidation (Russell R.S., 2003). L'encapsidation et la dimérisation du génome viral ont lieu de manière concomitante (Aldovini A., 1990). L'encapsidation de l'ARN génomique résulte de l'interaction spécifique entre le domaine SL3 de la région leader et le domaine NC des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} (Lever A., 1989). La dimérisation du génome viral fait intervenir le domaine SL1 de la région leader (Paillart J.C., 2004).

Le précurseur Pr160^{Env} est clivé par une protéase cellulaire au niveau de l'appareil de Golgi pour donner les deux protéines des spicules gp120 et gp41 qui seront recrutées par le domaine MA des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} (Cosson P., 1996 ; Freed E.O., 1996).

Les précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} vont également permettre le recrutement des molécules nécessaires au bon fonctionnement du futur virion comme l'ARNt3^{lys} par l'intermédiaire du domaine RT (Mak J., 1997), Vpr par l'intermédiaire du domaine p6 (Kondo E., 1995 ; Paxton W., 1993) ou encore la cyclophiline A par l'intermédiaire du domaine CA (Luban J., 1993).

Approximativement 1500 molécules des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} doivent s'assembler pour former une particule virale immature (Wilk T., 2001).

5.2.2.2. Le bourgeonnement des particules virales immatures

Le HIV-1 est capable de détourner la machinerie cellulaire d'exocytose pour permettre le bourgeonnement des particules virales immatures (Gomez C., 2005). Ce mécanisme fait intervenir le domaine p6 des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} (Göttlinger H.G., 1991). En effet, en interagissant avec la protéine cellulaire Tsg101 (Garrus J.E., 2001), le domaine p6 va

pouvoir recruter le complexe ESCRT-1 (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) (Martin-Serrano J., 2003) et ainsi provoquer l'exocytose des particules virales immatures.

5.2.3. La maturation des particules virales

La maturation des particules virales se fait de manière simultanée ou juste après l'étape de bourgeonnement. L'interaction entre deux précurseurs Pr160^{Gag-Pol} lors de l'assemblage permet la dimérisation des domaines PR pour former un homodimère actif. La protéase virale est ensuite libérée par un mécanisme autocatalytique (Debouck C., 1987). Elle va alors cliver les précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} pour libérer les protéines structurales (MA, CA, p2, NC, p1 et p6) et les enzymes virales (RT et IN). Toutes ces protéines vont ensuite s'agencer pour former des particules virales infectieuses (Wieggers K., 1998).

La maturation des virions provoque des changements morphologiques visibles en microscopie électronique. En effet, les virions se caractérisent par une concentration du génome viral et des protéines associées au centre de la particule virale, formant ainsi un cône caractéristique dense aux électrons.

Pathologie de l'infection par le HIV-1

Le tropisme cellulaire du HIV-1 est dicté par la distribution des protéines cellulaires (récepteur CD4 et corécepteurs) dont le virus a besoin pour initier son cycle de réplication. Ces protéines permettent au virus d'infecter non seulement plusieurs types cellulaires du système immunitaire, mais également certains types cellulaires caractéristiques du système nerveux central. Ainsi, après le système immunitaire, le système nerveux central (SNC) constitue la deuxième grande cible du HIV-1.

1. Infection du système immunitaire

1.1. Manifestations cliniques

La cinétique de l'infection des patients infectés par le HIV-1 et non traités peut être décomposée en trois phases : la phase de primo-infection, la phase asymptomatique et la phase symptomatique encore appelée stade SIDA. (Figure 7)

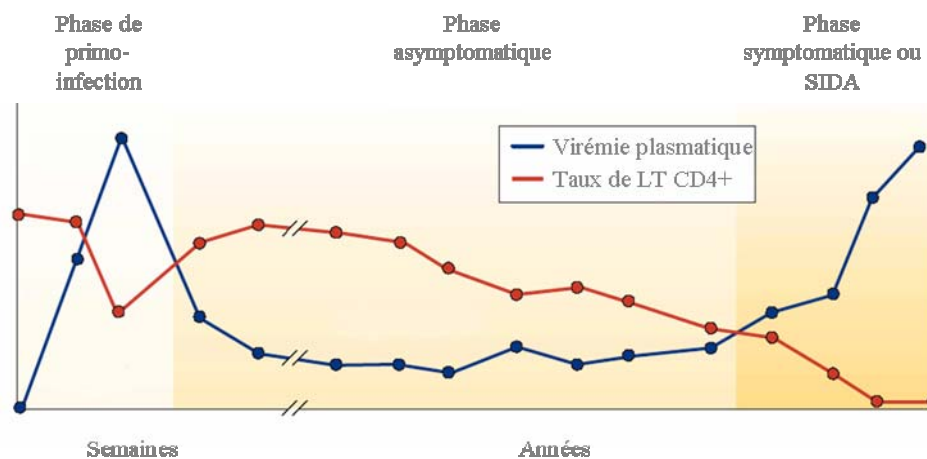


Figure 7 : Les phases cliniques de l'infection par le HIV-1. D'après Simon V., 2003 avec modifications.

1.1.1. La phase de primo-infection

La phase de primo-infection se caractérise par une augmentation exponentielle de la virémie dans le plasma des individus infectés (Clark S.J., 1991). Cette phase de réplication virale intense favorise la dissémination du virus dans l'ensemble de l'organisme. Elle dure trois à six semaines et peut s'accompagner de signes cliniques semblables à ceux d'une mononucléose infectieuse (fièvre, maux de tête) (Cooper D.A., 1985).

On observe également une chute massive, mais transitoire du taux de lymphocytes T CD4+ sanguins et le développement d'une réponse immunitaire spécifique du HIV-1 qui va faire chuter la virémie jusqu'à un point d'équilibre qui varie selon les individus.

La transition entre la phase de primo-infection et la phase asymptomatique est appelée séroconversion et correspond à l'apparition des premiers anticorps anti-HIV-1 dans le sang des individus infectés.

1.1.2. La phase asymptomatique

La phase asymptomatique varie entre six et onze ans et correspond à une latence clinique. Cette phase se caractérise cependant par une réplication virale intense et permanente et par un renouvellement très important des lymphocytes T CD4+ (Ho D.D., 1995). Malgré le combat du système immunitaire contre le virus, il en résulte tout de même un déclin graduel du nombre de lymphocytes T CD4+ dans le sang ainsi qu'une légère remontée de la charge virale.

1.1.3. La phase symptomatique ou stade SIDA

Malgré une vigoureuse réponse immunitaire cellulaire et humorale, la virémie augmente et le nombre de lymphocytes T CD4+ chute en dessous d'un seuil critique d'environ 200 lymphocytes T CD4+ par millilitre de sang correspondant à une réduction de plus de la moitié du nombre total de lymphocytes T CD4+ dans le corps. La défaillance du système immunitaire conduit à l'apparition de maladies opportunistes (infections virales de type CMV, toxoplasmose) et de tumeurs (syndrome de Kaposi, lymphomes). En absence de traitement, le stade SIDA s'étale en moyenne sur douze à dix-huit mois.

1.2. Effets cytopathogènes

Outre les lymphocytes T CD4+, le HIV-1 infecte également les cellules du type monocyte ou macrophage et les cellules dendritiques (Stevenson M., 2003).

Après pénétration dans l'organisme par voie muqueuse ou sanguine, le HIV-1 est massivement retenu dans les ganglions, où il est en grande partie exposé à la surface des cellules dendritiques sous forme de complexes immuns opsonisés. Ainsi, les lymphocytes T CD4+ qui traversent un ganglion pourront être infectés par les particules virales qui restent infectantes, et disséminer l'infection (Pope M., 2003).

1.2.1. L'infection des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques doivent leur nom à leurs longs prolongements cytoplasmiques caractéristiques. Les cellules dendritiques immatures sont localisées dans presque tous les tissus non-lymphoïdes et sont spécialisées dans la capture antigénique. Après maturation, on les retrouve dans les organes lymphoïdes où elles constituent les principales cellules présentatrices d'antigène des lymphocytes T.

Les cellules dendritiques ont la capacité d'augmenter la virémie selon deux mécanismes. Ces cellules sont tout d'abord susceptibles d'être infectées directement par le virus, mais elles peuvent également capturer les virions pour les présenter aux lymphocytes T CD4+ (Cameron P.U., 1992). En effet, les cellules dendritiques expriment des protéines membranaires appelées DC-SIGN capables de fixer les virions et provoquer leur endocytose. Une faible proportion des virions endocytés va échapper à la dégradation. En effet, après fusion entre la membrane des endosomes et la membrane plasmique, les virions libérés vont pouvoir infecter les lymphocytes T CD4+ par un mécanisme appelé trans-infection (Kwon D.S., 2002).

(Figure 8)

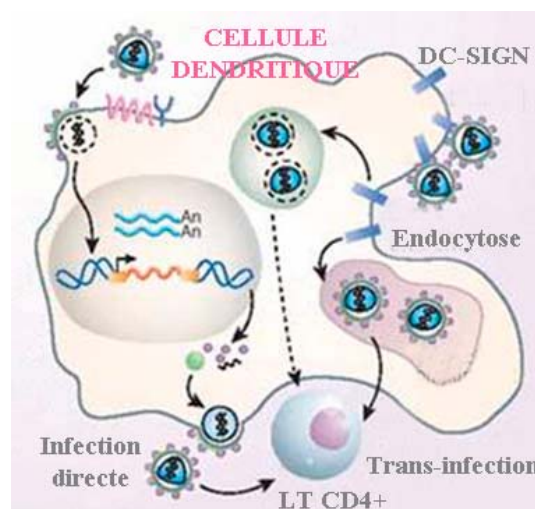


Figure 8 : Infection des cellules dendritiques par le HIV-1. D'après Stevenson M., 2003 avec modifications

1.2.2. L'infection des lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T assurent l'immunité à médiation cellulaire et jouent un rôle essentiel dans la régulation des réponses immunitaires.

L'expression du provirus est fortement influencée par l'état d'activation des lymphocytes T CD4+. En effet, dans les lymphocytes T CD4+ quiescents infectés par HIV-1, le provirus est présent sous forme latente (Schnittman S.M., 1989). Ces cellules se caractérisent également par un état de latence pré-intégrationnelle due à un blocage du cycle viral aux étapes de transcription inverse et d'intégration (Zack J.A., 1990). Ainsi, au stade quiescent, les lymphocytes T CD4+ constituent d'importants réservoirs cellulaires pour le HIV-1. Cependant, des signaux spécifiques comme la présence de certaines cytokines sont suffisants pour faire passer les cellules du stade quiescent G₀ au stade G₁ du cycle cellulaire (Unutmaz D., 1999). La protéine virale Nef va ensuite lever l'inhibition sur l'infection virale en favorisant l'entrée du virus (Miller M.D., 1994 ; Spina C.A., 1994). La production virale des lymphocytes T CD4+ à l'état G₁ reste tout de même très réduite.

Lorsqu'ils sont activés, les lymphocytes T CD4+ sont le siège d'une réplication virale rapide et efficace. Cependant, les effets cytotoxiques engendrés par l'infection virale aboutissent inévitablement à la mort de la cellule. (**Figure 9**)

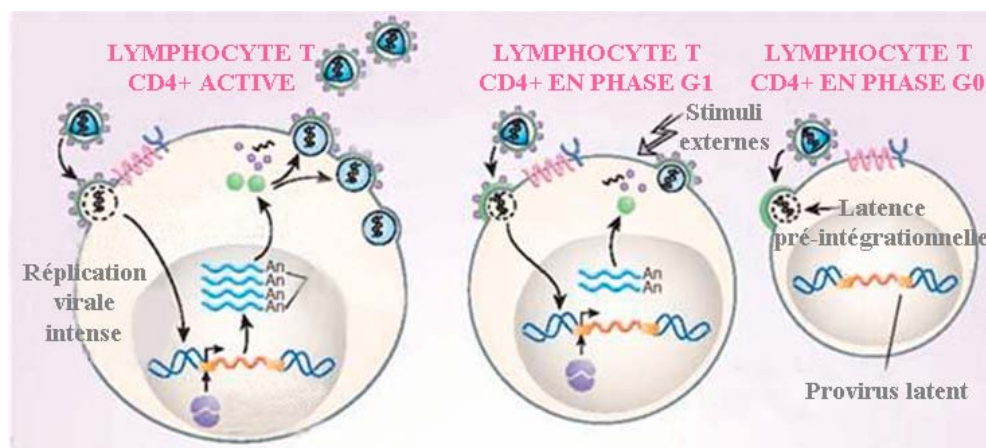


Figure 9 : Infection des lymphocytes T CD4+ par le HIV-1. D'après Stevenson M., 2003 avec modifications.

1.2.3. L'infection des monocytes et des macrophages

Les monocytes et les macrophages sont des cellules phagocytaires. En effet, leur fonction est de capturer les agents pathogènes, les antigènes et les débris cellulaires afin de les dégrader.

L'infection des monocytes et des macrophages par le HIV-1 est connue depuis le milieu des années 1980 (Koenig S., 1986). Il semblerait que le HIV-1 se soit adapté à l'infection de cellules incapables de se diviser. En effet, pour pallier à l'absence de désorganisation de la membrane nucléaire de ces cellules, le HIV-1 a développé un système de transport nucléaire de son matériel génétique sous la forme d'un complexe nucléoprotéique appelé complexe de pré-intégration (PIC) constitué de protéines pourvues de séquences NLS (Lewis P., 1992).

L'étape d'assemblage des constituants viraux diffère quelque peu dans les macrophages par rapport au cycle viral dans les autres cellules cibles du virus. En effet, dans ces cellules, la majeure partie des particules virales immatures est assemblée au niveau de la membrane de vésicules cytoplasmiques enrichies en molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMHII). A ce stade, les particules virales immatures peuvent être libérées après fusion entre la membrane vésiculaire et la membrane plasmique, être dégradées ou encore se stabiliser dans le cytoplasme de la cellule (Raposo G., 2002). Les macrophages constituent également à ce titre des réservoirs cellulaires pour le HIV-1. (**Figure 10**)

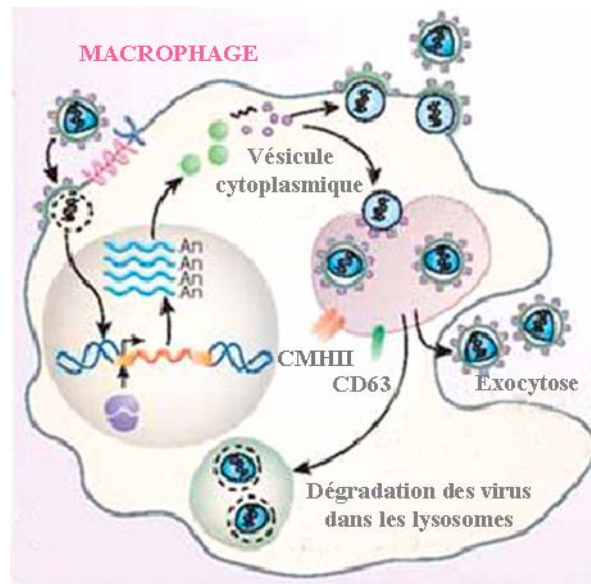


Figure 10 : Infection des macrophages par le HIV-1.
D'après Stevenson M., 2003 avec modifications.

2. Infection du système nerveux central

Le SNC est susceptible d'être infecté par différents genres de rétrovirus et par les membres du genre lentivirus en particulier (Giraudon P., 1996 ; Giraudon P., 1997 ; Clements J.E., 1996). L'invasion du SNC par le HIV-1 est un événement très précoce intervenant dès la séroconversion (Davis L.E., 1992).

2.1. Manifestations cliniques

Environ 20 à 30% des individus infectés par le HIV-1 et non traités présentent des symptômes neurologiques d'ordre cognitif et moteur collectivement regroupés sous le terme de démence associée au HIV ou HAD (Navia B.A., 1986). Une échelle clinique de gravité des détériorations cognitives et motrices liées à cette pathologie a été établie (Price R.W., 1988). Ainsi, aux symptômes classiques de défaillance de la mémoire à court terme, de manque de concentration et de faiblesse des membres, s'associent souvent des troubles du comportement comme un changement de personnalité, une apathie, un retrait social. Dans sa forme la plus sévère, la démence associée au HIV peut conduire à un état mutique et semi-végétatif.

La trithérapie a fortement réduit l'incidence de la démence associée au HIV malgré l'omniprésence du virus dans le cerveau des patients traités. En effet, la proportion de patients sous trithérapie qui développent la maladie est estimée à environ 10%. Cependant, encore 30% des individus traités développent un dysfonctionnement mineur du SNC appelé désordre cognitif et moteur mineur ou MCMD. En effet, les symptômes de perte de mémoire et de diminution des fonctions corticales associés à cette pathologie sont fortement atténués (Sacktor N., 2002).

2.2. Entrée du HIV-1 dans le système nerveux central

Le SNC est isolé du reste de l'organisme par une barrière anatomique qui porte le nom de barrière hémato-encéphalique. Cette structure est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées. Cet épithélium vasculaire particulier est étroitement associé à des astrocytes et à des macrophages périvasculaires qui aident au maintien de l'intégrité de cette structure. La barrière hémato-encéphalique est indispensable au maintien de l'homéostasie cérébrale. En effet, elle constitue un filtre qui régule étroitement les échanges entre le sang et le liquide céphalorachidien (Ballabh P., 2004).

La complexité de cette structure n'empêche pas la pénétration du HIV-1 dans le cerveau. Trois hypothèses permettant d'expliquer l'entrée du HIV-1 dans le SNC ont été avancées : le passage du virus par l'intermédiaire d'un monocyte ou d'un lymphocyte T CD4+ infecté, le passage du virus libre par transcytose ou la libération de virions par les cellules endothéliales infectées (Albright A.V., 2003). Alors que les hypothèses de transcytose et d'infection des cellules endothéliales sont encore controversées, de nombreuses études confortent celle d'une infection du parenchyme cérébral par l'intermédiaire des cellules CD4+ infectées, et en particulier des monocytes (Gartner S., 2000). En effet, plusieurs types cellulaires du système immunitaire dont les monocytes et les lymphocytes T, sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique par diapédèse (Miller D.W., 1999). **(Figure 11)**

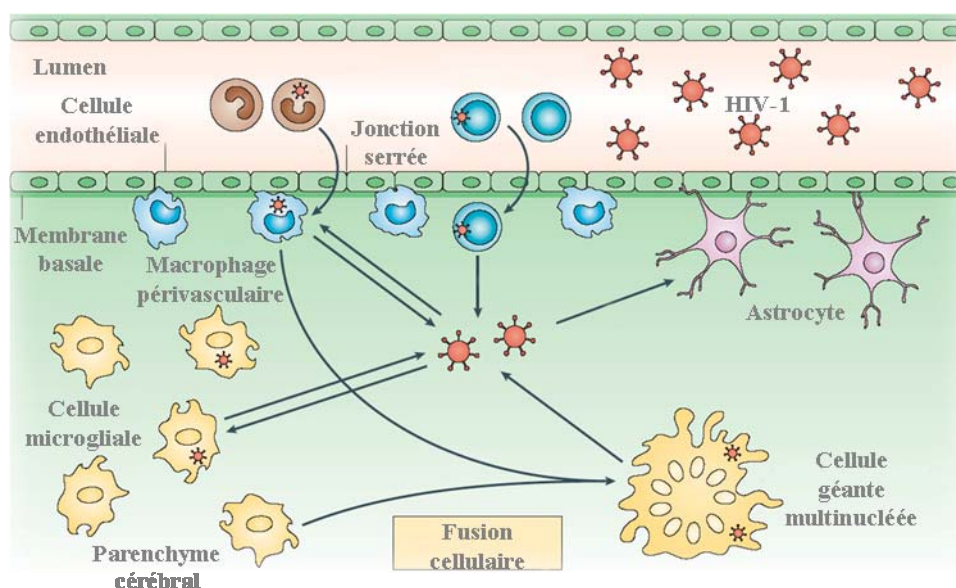


Figure 11 : Entrée du HIV-1 dans le SNC et formation des cellules géantes multinucléées. D'après González-Scarano F., 2005 avec modifications.

2.3. Effets cytopathogènes

Après avoir franchi la barrière hémato-encéphalique, les macrophages infectés vont libérer des particules virales dans le parenchyme cérébral. Les virus néoformés vont ensuite infecter les cellules microgliales qui constituent, avec les macrophages périvasculaires, les cellules immunocompétentes du cerveau, mais surtout les seules cellules du SNC à être infectées de manière productive par le HIV-1 (Peudenier S., 1991).

2.3.1. L'infection des cellules microgliales

Dans l'infection des cellules microgliales, le virus utilise majoritairement les corécepteurs CCR5 présents à la surface de ces cellules (Jordan C.A., 1991). Ces cellules expriment cependant d'autres corécepteurs du virus comme CCR2b, CCR8, CXCR6, CX3CR1, mais il semblerait qu'ils soient beaucoup moins efficaces que le corécepteur CCR5 (Bajetto A., 2002). Les cellules microgliales infectées vont alors fortement contribuer à la production virale cérébrale. Les glycoprotéines des spicules exprimées à la surface des cellules infectées vont ensuite interagir avec les récepteurs et corécepteurs viraux exprimés à la surface des cellules non infectées. Ces interactions vont provoquer une fusion cellulaire et ainsi la formation de cellules géantes multinucléées (Dickson D.W., 1986). **(Figure 11)**

L'infection des cellules microgliales induit également leur activation. Activées, ces cellules vont sécréter de nombreuses molécules toxiques pour les astrocytes et les neurones dont les protéines virales comme gp120, Tat et Vpr, des cytokines comme le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), de l'acide quinolinique, de l'acide arachidonique, du PAF (Platelet Activating Factor) et du monoxyde d'azote (González-Scarano F., 2005 ; Kaul M., 2001). **(Figure 12)**

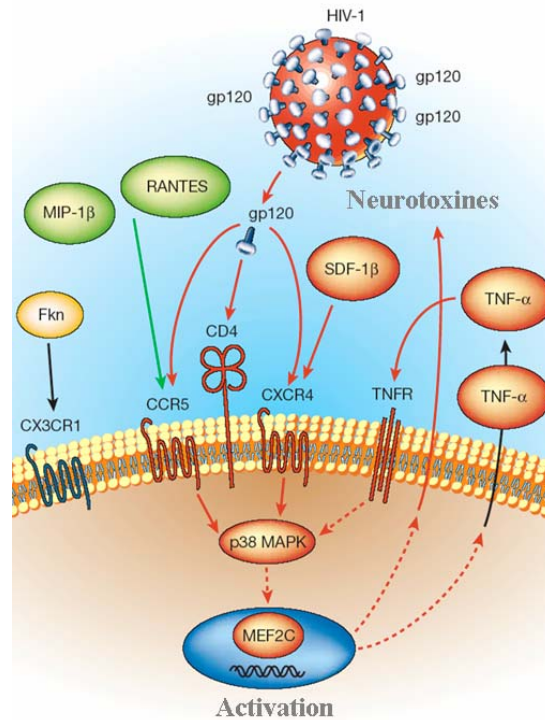


Figure 12 : Infection des cellules microgliales par le HIV-1. D'après Kaul M., 2001 avec modifications.

2.3.2. Les effets cytopathogènes sur les astrocytes

Dans le SNC, le rôle des astrocytes est de maintenir l'homéostasie. Ils expriment de nombreux récepteurs leur permettant de réguler le taux de nombreux médiateurs du SNC comme le glutamate (Matute C., 2005).

Les astrocytes sont le siège d'une infection virale très faiblement productive, à la limite de la détection pouvant s'expliquer par un défaut d'expression du récepteur CD4 à leur surface.

Les cytokines inflammatoires libérées suite à l'activation des cellules microgliales vont provoquer l'activation des astrocytes. Cette activation astrocytaire va provoquer la libération de nombreuses toxines ainsi qu'une stimulation des transporteurs du glutamate présents à la surface de ces cellules conduisant à une libération massive de glutamate dans le milieu extracellulaire. L'activation des astrocytes va également provoquer une désorganisation de la barrière hémato-encéphalique et donc une augmentation de sa perméabilité, facilitant ainsi l'infiltration des monocytes infectés (González-Scarano F., 2005 ; Kaul M., 2001). (**Figure 13**)

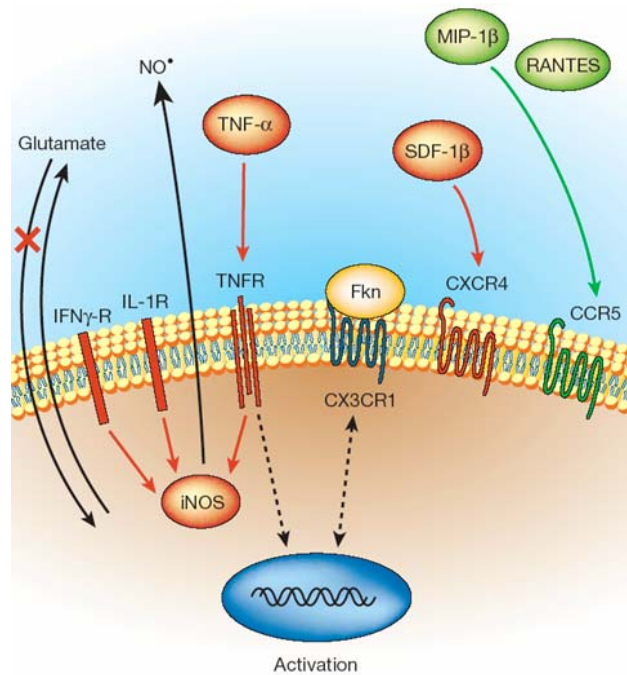


Figure 13 : Effets astropathogènes de l'infection par le HIV-1. D'après Kaul M., 2003 avec modifications.

2.3.3. Les effets cytopathogènes sur les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont responsables de la production des gaines de myéline entourant les axones dans le SNC. La présence des gaines de myéline autour des axones permet la conduction saltatoire de l'influx nerveux.

L'infection des oligodendrocytes est encore controversée. En effet, alors que quelques études ont permis de mettre en évidence des acides nucléiques viraux dans les oligodendrocytes (An S.F., 1999 ; Bagasra O., 1996 ; Nuovo G.J., 1994), d'autres sont formelles quant à l'absence de marqueur d'infection virale (Takahashi K., 1996).

2.3.4. Les effets cytopathogènes sur les neurones

Les neurones constituent l'unité fonctionnelle du système nerveux. Les prolongements axonaux des neurones sont responsables de la conduction de l'influx nerveux.

L'infection des neurones a été rapportée dans quelques études (Cantó-Nogués C., 2005 ; Trillo-Pazos G., 2003). Cependant, d'autres études menées pour tenter de détecter des produits viraux dans les neurones se sont avérées infructueuses (Takahashi K., 1996 ; Wiley C.A., 1999). Quoiqu'il en soit, si on peut effectivement parler d'infection neuronale, celle-ci reste très faiblement productive, voire non-productive.

Dans les neurones, les effets cytopathogènes provoqués par l'infection virale sont principalement d'ordre indirect puisqu'ils découlent de l'activation des cellules microgliales et des astrocytes. En effet, le glutamate et les neurotoxines libérés suite à l'activation de ces cellules vont activer de nombreuses cascades moléculaires comme la voie p38 MAPK et la voie des caspases et ainsi provoquer une apoptose neuronale massive. Les protéines virales gp120 libérées dans le milieu extracellulaire par les cellules microgliales activées peuvent également exercer un rôle toxique direct sur les neurones. En effet, en se fixant sur le corécepteur CXCR4 présent à la surface des neurones, la gp120 est capable d'activer la voie p38 MAPK et ainsi favoriser l'apoptose neuronale (González-Scarano F., 2005 ; Kaul M., 2001) (**Figure 14**)

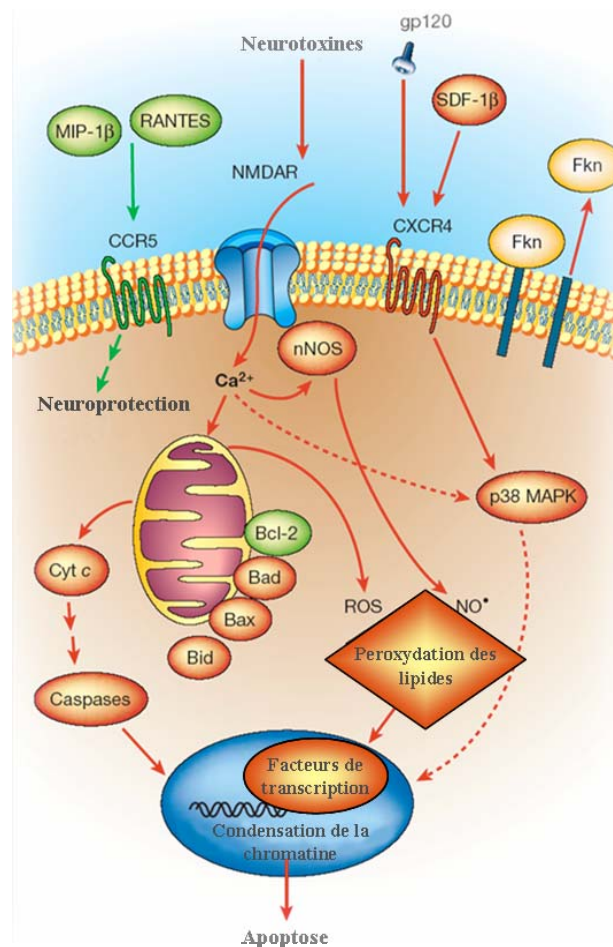


Figure 14 : Effets neuropathogènes de l'infection par le HIV-1. D'après Kaul M., 2001 avec modifications.

3. Thérapies anti-rétrovirales

3.1. Les thérapies anti-rétrovirales actuelles

3.1.1. La trithérapie

La trithérapie consiste en l'association de trois médicaments anti-rétroviraux parmi les inhibiteurs de la transcriptase inverse et les inhibiteurs de la protéase disponibles sur le marché. L'utilisation d'une telle combinaison retarde la progression de la maladie en maintenant la charge virale plasmatique sous le seuil de détection et en diminuant ainsi le risque d'émergence de souches résistantes, mais ne permet pas d'éradiquer le virus (Richman D.D., 2001).

3.1.1.1. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

L'étape de transcription inverse joue un rôle crucial dans le cycle de réplication du HIV-1. La transcriptase inverse constitue donc une cible privilégiée pour une thérapie anti-rétrovirale. Il existe deux types d'inhibiteurs dirigés contre la transcriptase inverse : les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non-nucléosidiques.

Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse sont des inhibiteurs compétitifs. Ils s'incorporent à la chaîne d'ADN naissante puis bloquent la synthèse car ils sont dépourvus du groupement hydroxyle en position 3' du désoxyribose.

Les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse sont des inhibiteurs allostériques. Ils se fixent dans une poche hydrophobe (site allostérique) à proximité du site actif de l'enzyme. Cette fixation va provoquer un changement de conformation de la transcriptase inverse et ainsi une diminution de la vitesse d'incorporation des nucléotides. (Figure 15)

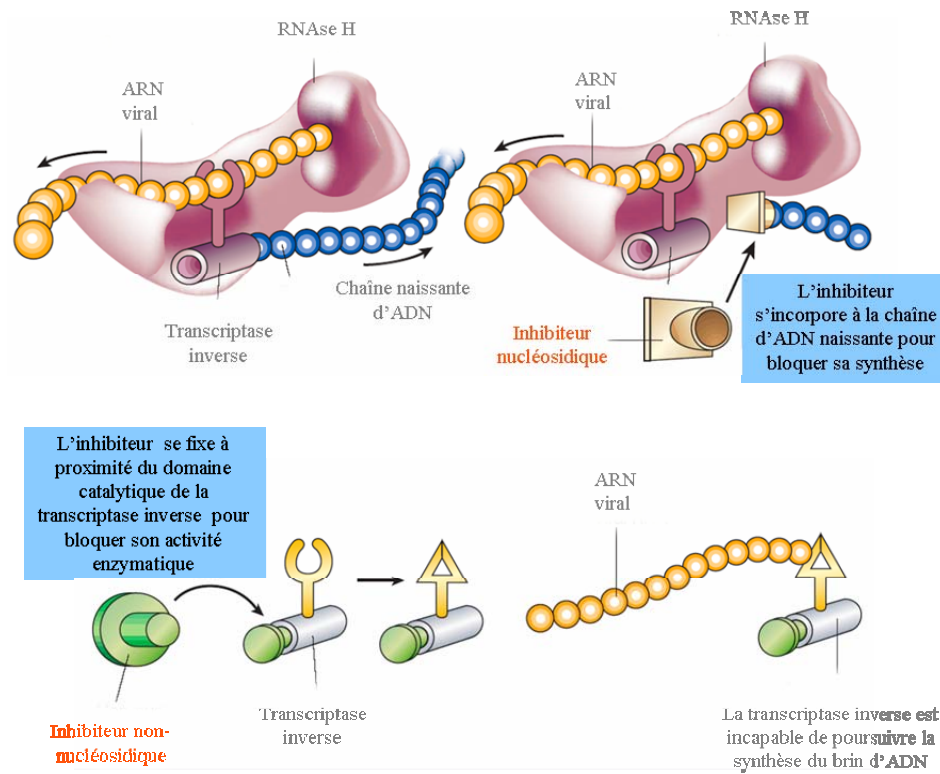


Figure 15 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de la transcriptase inverse. D'après Richman D.D., 2001 avec modifications.

3.1.1.2. Les inhibiteurs de la protéase

Les inhibiteurs de la protéase se fixent au niveau du site catalytique de l'enzyme pour bloquer son activité protéolytique et ainsi empêcher la maturation des particules virales. (**Figure 16**)

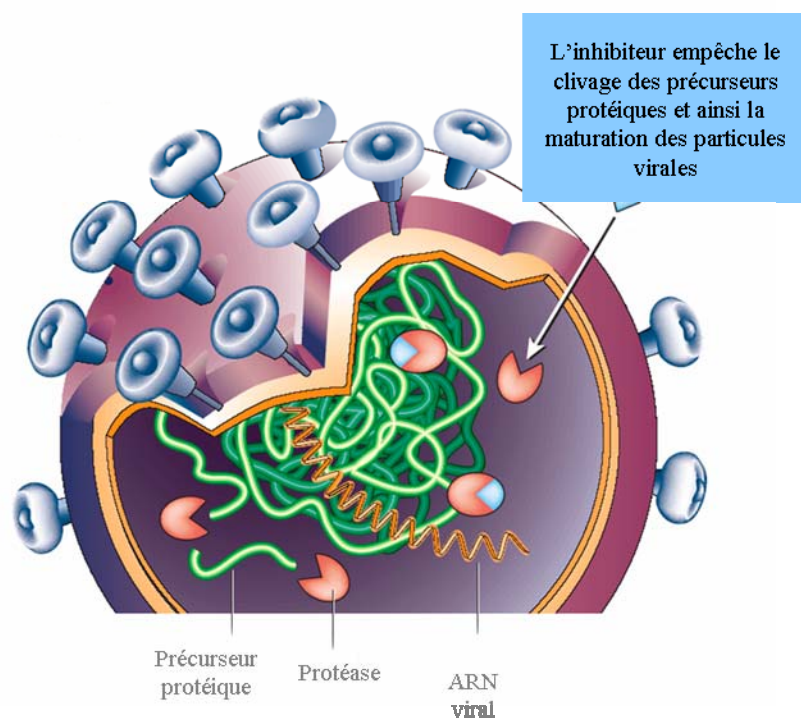


Figure 16 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de la protéase. D'après Richman D.D., 2001 avec modifications.

3.1.2. Le T-20

Depuis 2003, un nouveau médicament anti-rétroviral ciblant l'entrée du HIV-1 dans la cellule hôte est disponible sur le marché. Son principe actif appelé T-20 (Enfuvirtide®) est un polypeptide capable de se fixer sur la glycoprotéine virale gp41 pour bloquer l'activité du peptide de fusion et ainsi empêcher l'entrée du virus dans la cellule hôte (Lambert D.M., 1996). Ce médicament est utilisé en cas d'échappement thérapeutique à la trithérapie et permet de faire chuter considérablement la virémie des patients.

3.2. Les thérapies anti-rétrovirales futures

Après plus de vingt années de lutte contre le HIV-1, les thérapies anti-rétrovirales ont permis de freiner l'évolution de la maladie et d'améliorer de manière considérable la qualité de vie des patients vivant avec le virus. Cependant, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement capable d'éradiquer le HIV-1. De plus, de nombreux problèmes liés aux thérapies anti-rétrovirales en vigueur subsistent comme les phénomènes de résistances médicamenteuses, la persistance de réservoirs cellulaires du virus ou encore les problèmes de biodisponibilité posés par la barrière hémato-encéphalique. L'élaboration de nouvelles stratégies anti-rétrovirales reste donc incontournable pour vaincre la maladie.

L'importante variabilité génétique du virus rend une approche vaccinale très compliquée. Cependant, de nombreux progrès ont été réalisés dans l'espoir de développer un vaccin anti-HIV efficace. En effet, un grand nombre de candidats sont actuellement engagés dans les différentes phases d'essais cliniques (McMichael A.J., 2003).

Ces dernières années, de nouveaux composés au potentiel anti-rétroviral ont été identifiés. La majorité d'entre eux ciblent de nouvelles molécules d'origine virale comme la gp120, les corécepteurs du virus, l'intégrase ou la protéine transactivatrice Tat (Butera S.T., 2000 ; De Clercq E., 2001).

Pour compléter ces nouvelles stratégies anti-rétrovirales, un concept récent consistant à purger les réservoirs cellulaires du virus semble être une piste très intéressante dans l'espoir

d'aboutir un jour à l'éradication du virus. Le principe est de stimuler l'expression des provirus latents pour permettre l'accès de ces cellules à la trithérapie. Une étude clinique récente montre qu'un traitement associant la trithérapie, l'Enfuvirtide® (T20) et l'acide valproïque, un activateur transcriptionnel, provoque une chute du taux de lymphocytes T CD4+ quiescents d'environ 75% (Lehrman G., 2005).

Transcription des gènes du HIV-1

Le provirus du HIV-1 fonctionne comme un gène de classe II. Par conséquent, la transcription des gènes viraux est assurée par la machinerie transcriptionnelle de la cellule infectée pour permettre l'expression des différentes protéines virales.

1. Transcription des gènes de classe II

Chez les organismes eucaryotes, trois enzymes sont responsables de la transcription de l'ensemble des gènes cellulaires. L'ARN polymérase I transcrit les gènes codant pour les ARN ribosomiaux (ARNr) à l'exception de l'ARNr 5S. L'ARN polymérase II transcrit les gènes de classe II codant pour les ARN messagers (ARNm) et les petits ARN nucléaires (ARNsn) à l'exception de l'ARNsn U6. Associée aux facteurs généraux de la transcription, l'ARN polymérase II assure l'activité transcriptionnelle de base au niveau de séquences géniques régulatrices spécifiques. L'ARN polymérase III est responsable de la transcription des ARN de transfert (ARNt), de l'ARNr 5S et de l'ARNsn U6.

1.1. Le promoteur

L'expression génique est contrôlée par de nombreuses protéines qui reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques regroupées en une unité fonctionnelle appelée promoteur.

Les promoteurs des gènes de classe II peuvent être décomposés en deux parties : le promoteur minimal et les séquences régulatrices.

1.1.1. Le promoteur minimal

Le promoteur minimal est défini comme étant la plus petite séquence d'ADN nécessaire à l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II et les facteurs généraux de transcription à partir du site spécifique d'initiation également appelé site +1.

Le promoteur minimal est constitué de plusieurs motifs : la boîte TATA (TATA box), l'élément initiateur (Inr), la séquence BRE (TFII-B Responsive Element) et la séquence DPE (Downstream Promoter Element). La boîte TATA et l'élément initiateur sont indépendamment capables de diriger la formation d'un complexe transcriptionnellement compétent (Smale S.T., 1989). Il est cependant possible de retrouver ces deux éléments sur un même promoteur où ils semblent avoir une action synergique (Emami K.H., 1997).

La boîte TATA est une séquence consensus TATA(A/T)A(A/T) localisée à une trentaine de paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (Breathnach R., 1981). Elle est reconnue par la machinerie transcriptionnelle par l'intermédiaire du facteur général de transcription TFII-D (Davison B.L., 1983).

L'élément initiateur (Inr) est une séquence riche en pyrimidines située autour du site d'initiation de la transcription. Il est responsable de la transcription des gènes dépourvus de boîte TATA. Plusieurs protéines sont capables de se fixer sur l'élément initiateur : l'ARN polymérase II, TFII-D, TFII-I et YY-1 (Butler J.E., 2002).

La séquence BRE est une région riche en guanine localisée directement en amont de la boîte TATA et spécifiquement reconnue par le facteur général de transcription TFII-B. On retrouve cette séquence dans environ 12% des promoteurs (Lagrange T., 1998).

La séquence DPE est située à une trentaine de paires de bases en aval du site d'initiation. Reconnue par le facteur général de transcription TFII-D, elle est essentiellement présente dans les promoteurs dépourvus de boîte TATA (Burke T.W., 1996).

1.1.2. Les séquences régulatrices

Les séquences régulatrices permettent un contrôle de l'expression des gènes par des protéines régulatrices et ainsi une adaptation de son niveau d'expression aux besoins physiologiques et à l'état de différenciation de la cellule. Les séquences régulatrices localisées à proximité du site d'initiation sont regroupées sous le terme de séquences régulatrices proximales, par opposition aux séquences régulatrices distales qui en sont très éloignées.

Les séquences régulatrices proximales sont généralement situées entre 40 et 110 paires de bases en amont du site d'initiation. En fonction de l'activité de la protéine qui les reconnaît,

elles peuvent avoir un effet activateur (UAS : Upstream Activating Sequence) ou répresseur (URS : Upstream Repressing Sequence). Parmi les séquences les mieux caractérisées, on trouve la boîte GC (GC box) reconnue par le facteur de transcription Sp1 (Kadonaga J.T., 1987).

Les séquences régulatrices distales peuvent être situées à plusieurs milliers de paires de base en amont ou en aval du site d'initiation (Ptashne M., 1988). Ces éléments sont respectivement dénommés « enhancers » ou « silencers » selon qu'ils activent ou inhibent la transcription. L'hypothèse la plus probable permettant d'expliquer comment ces séquences éloignées régulent la transcription stipule qu'un repliement de l'ADN permettrait le rapprochement de ces séquences régulatrices avec le site d'initiation et ainsi la machinerie transcriptionnelle de base (Morris J.R., 1998).

1.2. L'ARN polymérase II

L'ARN polymérase II eucaryote est un complexe multiprotéique constitué de douze sous-unités nommées Rpb1 à Rpb12. Les douze gènes de l'enzyme ont été clonés et montrent une remarquable conservation fonctionnelle et structurale de la levure à l'homme. De récents travaux ont permis de résoudre la structure cristallographique de l'ARN polymérase II de levure et ainsi de mieux comprendre son mécanisme d'action (Armache K.J., 2003 ; Armache K.J., 2005 ; Bushnell D.A., 2003 ; Kettenberger H., 2004).

La sous-unité Rpb1 de l'ARN polymérase II possède au niveau de son extrémité C-terminale un domaine particulièrement important pour l'activité de l'enzyme : le domaine CTD (Carboxy-Terminal Domain). Chez l'homme, ce domaine est constitué de cinquante deux répétitions d'un heptapeptide $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ (Allison L.A., 1985). La phosphorylation du domaine CTD sur les résidus Y_1 , S_2 et S_5 permet une régulation de l'activité de l'enzyme lors des différentes étapes de la transcription (Dahmus M.E., 1981).

1.3. Les facteurs généraux de transcription

L'ARN polymérase II est incapable d'initier spécifiquement à elle seule la transcription et requiert à ce titre des facteurs auxiliaires appelés facteurs généraux de transcription. Ils sont au nombre de six : TFII-A, TFII-B, TFII-D, TFII-E, TFII-F et TFII-H (Orphanides G., 1996). Leur rôle, composition et fonctions sont répertoriés dans le **Tableau 2**.

Facteur	Composition	Propriétés
TFII-A	α (37 kD)	Dissocie les dimères de TBP Requise pour l'activation de la transcription
	β (19 kD)	Requises pour l'activation et l'anti-répression de la transcription
	γ (13 kD)	
TFII-B	35kD	Stabilise le complexe TFII-D-ADN Sélectionne le site d'initiation Recrute le complexe TFII-F-ARN polymérase II
TFII-D	TBP (38 kD)	Interagit avec la boîte TATA
	TAF _{II} 250	Activités histone acétyltransférase, histone ubiquitine-ligase et kinase
	TAF _{II} 150	Interagit avec l'élément DPE
	TAF _{II} 135	
	TAF _{II} 100	
	TAF _{II} 80/70	Structure de type histone
	TAF _{II} 55	
	TAF _{II} 31/32	Structure de type histone
	TAF _{II} 30	
	TAF _{II} 28	Structure de type histone
	TAF _{II} 20/15	Structure de type histone
	TAF _{II} 18	Structure de type histone
TFII-E	α (56 kD)	Recrute et module les activités de TFII-H
	β (34 kD)	
TFII-F	α /RAP7 (58kD)	Recrute l'ARN polymérase II Facteur d'élongation
	β /RAP30 (26kD)	Activité kinase
TFII-H	CycH ; cdk7 ; MAT1 p44 ; XPB ; p34 ; XPD p52 ; p62	Activités hélicases, ATPases et kinases

Tableau 2 : Les facteurs généraux de transcription. D'après Orphanides G., 1996 avec modifications.

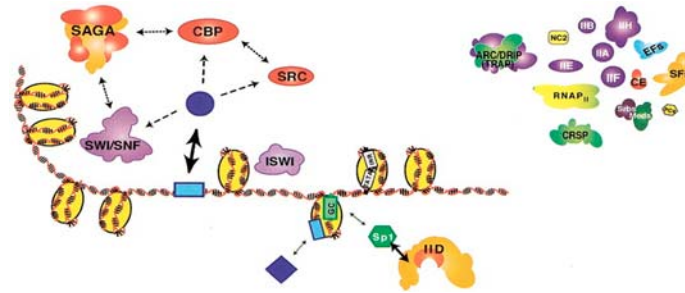
1.4. Les étapes de la transcription

La transcription des gènes de classe II peut être divisée en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

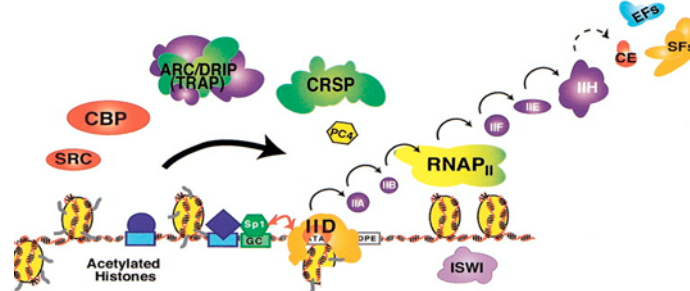
1.4.1. L'initiation de la transcription

L'initiation de la transcription débute par l'assemblage du complexe de pré-initiation sur le promoteur (Lemon B., 2000). Sur les promoteurs possédant une boîte TATA, l'étape initiale de la formation de ce complexe est la reconnaissance de la boîte TATA par la sous-unité TBP du facteur général de transcription TFII-D (Davison B.L., 1983). Cette fixation va engendrer une distorsion de l'ADN d'environ 90°, facilitant ainsi le recrutement des autres membres du complexe (Burley S.K., 1996 ; Nikolov D.B., 1997).

Les premières expériences menées *in-vitro* laissaient penser que le complexe de pré-initiation se formait de manière séquentielle (Lemon B., 2000). Ainsi, une fois TFII-D associé au promoteur, il va recruter les autres membres du complexe dans un ordre bien établi. Dans un premier temps, TFII-A va venir stabiliser le complexe TFII-D/TATA en interagissant directement avec le promoteur en amont de la boîte TATA (Imbalzano A.N., 1994). La structure tridimensionnelle formée par l'association du complexe TFII-D/TATA/TFII-A est reconnue par TFII-B (Maldonado E., 1990). Ce complexe est ensuite lui-même reconnu par l'association de l'ARN polymérase II sous sa forme hypophosphorylée avec le facteur TFII-F (Zawel L., 1995). Par l'intermédiaire de son domaine CTD, l'ARN polymérase II va interagir avec la sous-unité TBP de TFII-D (Buratowski S., 1991). TFII-E va ensuite rejoindre le complexe en interagissant avec l'ARN polymérase II, TFII-F et la sous-unité TBP de TFII-D (Orphanides G., 1996). Enfin, TFII-H est recruté grâce à une interaction avec TFII-E (Maxon M.E., 1994). **(Figure 17)**



Remodelage de la chromatine pour permettre à la machinerie transcriptionnelle de base d'accéder à la chromatine



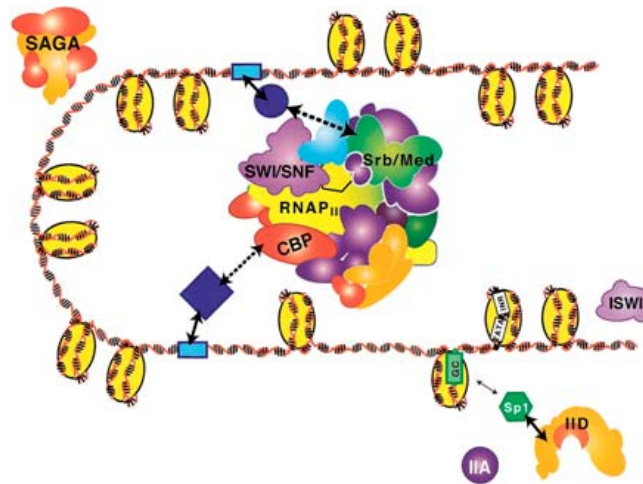
Recrutement séquentiel des constituants du complexe d'initiation sur le promoteur



Activation du complexe d'initiation de la transcription

Figure 17 : Initiation de la transcription – Modèle séquentiel.
D'après Lemon B. 2000 avec modifications.

Cependant, ce modèle a été remis en cause après la découverte d'un complexe macromoléculaire appelé holoenzyme constitué non seulement de la machinerie transcriptionnelle de base, mais également de protéines régulatrices de la transcription. La composition de l'holoenzyme varie en fonction de l'organisme étudié et de la méthode de purification (Chao D.M., 1996 ; Kim Y.J., 1994 ; Koleske A.J., 1995 ; Maldonado E., 1996 ; Neish A.S., 1998 ; Ossipow V., 1995 ; Wilson C.J., 1996). Ce complexe serait recruté une fois TFII-D en place sur la boîte TATA. (**Figure 18**)



Recrutement de l'holoenzyme sur le promoteur

Figure 18: Initiation de la transcription - Modèle de l'holoenzyme. D'après Lemon B., 2000 avec modifications.

Lorsque le complexe de pré-initiation est assemblé sur le promoteur, l'activité hélicase portée par TFII-H va ouvrir l'ADN entre les positions -9 et +2, formant ainsi une « bulle de transcription » (Holstege F.C., 1996). L'initiation de la synthèse de l'ARN, par la formation de la première liaison phosphodiester, aboutit à la formation d'un diribonucléotide qui stabilise le complexe mais n'empêche pas l'avortement de nombreuses synthèses (Holstege F.C., 1997). La formation d'un complexe stable n'est obtenu qu'après la synthèse d'un transcrit d'au moins 4 ribonucléotides (Holstege F.C., 1996). La bulle de transcription va alors se propager au fur et à mesure de l'allongement du transcrit.

Lorsque la bulle de transcription atteint le nucléotide en position +11, l'ADN en amont de la machinerie transcriptionnelle se referme de la position -9 jusqu'à la position +3. Ce passage de l'initiation à l'élongation de la transcription est appelé « échappée du promoteur » (promoter escape) puisque les complexes atteignant la position +11 sont incapables de ré-initier la transcription (Holstege F.C., 1997). L'initiation de la transcription s'achève par la libération des facteurs d'initiation favorisée par la phosphorylation du domaine CTD de l'ARN polymérase II par TFII-H (Yan Q., 1999).

1.4.2. L'élongation de la transcription

L'élongation de la transcription débute lors du recrutement des facteurs d'élongation aux côtés de l'ARN polymérase II. Leur rôle est d'augmenter la vitesse catalytique de l'enzyme.

L'ARN polymérase II oscille à chaque ajout de nucléotide, entre une conformation active puis inactive, marquant ainsi une pause dans l'élongation du transcrit. Cette pause se traduit par un recul de l'enzyme de 2 à 4 nucléotides (Uptain S.M., 1997). TFII-F, les élongines et les protéines de la famille ELL (Eleven-nineteen Lysine-rich Leukemia) interagissent directement avec l'enzyme pour supprimer ses arrêts transitoires (Shilatifard A., 2003).

Lorsque le recul de l'enzyme est trop important (de 7 à 14 nucléotides), l'ARN polymérase II est incapable de ré-initier l'élongation (Komissarova N., 1997). Le facteur d'élongation TFII-S permet alors à l'enzyme de reprendre l'élongation grâce à un mécanisme de clivage puis de resynthèse du transcrit naissant (Rudd M.D., 1994).

Le facteur d'élongation P-TEFb (Positive-Transcription Elongation Factor b) constitué de la kinase CDK9 (cyclin dependant kinase 9) et de la cycline T1 favorise l'allongement des transcrits en phosphorylant le domaine CTD de l'ARN polymérase II (Marshall N.F., 1996). En effet, la phosphorylation du domaine CTD de l'enzyme provoque la dissociation de deux facteurs négatifs d'élongation dénommés DSIF (DRB Sensitivity Inducing Factor) et NELF (Negative ELongation Factor) qui, en l'absence de P-TEFb, s'associent à l'enzyme pour s'opposer à sa progression (Yamaguchi Y., 2002).

1.4.3. La terminaison de la transcription

La terminaison de la transcription se caractérise d'une part par la libération du transcrit et d'autre part par la dissociation de l'ARN polymérase II de la matrice d'ADN. L'arrêt de la transcription est directement lié à la présence d'un signal de terminaison appelé signal de polyadénylation (Birse C.E., 1998) reconnu par le facteur CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) associé au domaine CTD de l'ARN polymérase II (Dantonel J.C., 1997).

2. Spécificités concernant la transcription des gènes du HIV-1

L'ADN proviral du HIV-1 est encadré par deux séquences non-codantes identiques appelées LTR (Long Terminal Repeat) constituée chacune de trois régions : U3, R et U5. Alors que la séquence LTR située en 3' du génome viral renferme les signaux de terminaison de la transcription, la séquence LTR située en 5' fait office de promoteur viral.

2.1. Le promoteur du HIV-1

La variabilité génétique du HIV-1 génère de nombreux variants viraux inter-individuels et intra-individuels. Ces variants viraux se caractérisent par des mutations ciblant l'ensemble du génome viral, y compris la séquence LTR. En effet, de nombreuses variations de séquence ont été observées sur le promoteur viral des différents variants viraux. A titre d'exemple, chaque sous-type du groupe M est caractérisé par une configuration unique du promoteur viral (De Baar M.P., 2000 ; Jeeninga R.E., 2000).

Le HIV-1 a également développé la capacité de s'adapter au type cellulaire dans lequel il se réplique et ainsi contribuer à une compartimentation des séquences LTR au sein d'un même organisme. En effet, les souches virales isolées au niveau du SNC, du sang, des ganglions lymphatiques ou des poumons peuvent présenter des séquences LTR distinctes (Ait-Khaled M., 1995).

La séquence LTR du HIV-1 appartenant à la souche LAI du sous-type B (le sous-type majoritaire en Europe et en Amérique du Nord) servira de modèle dans la description du promoteur viral.

La taille du promoteur viral est de 638 paires de bases, la région U3 allant de -454 à -1, la région R allant de +1 à +98 et la région U5 allant de +99 à +184 (Starcich B., 1985 ; Wain-Hobson S., 1985). (**Figure 19**)

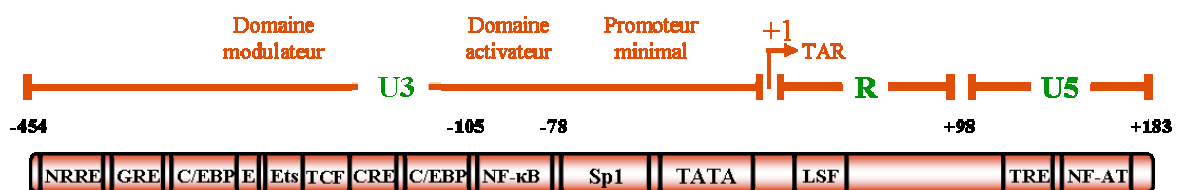


Figure 19 : Le promoteur du HIV-1.

2.1.1. La région U3

La région U3 peut elle-même être subdivisée en trois domaines : le promoteur minimal entre les nucléotides -78 à -1, le domaine activateur entre les nucléotides -105 à -79 et le domaine modulateur entre les nucléotides -454 à -104 (Roebuck K.A., 1999). Elle contient de

nombreux sites potentiels de fixation pour des facteurs de transcription dont le rôle et le mécanisme d'action seront détaillés dans le chapitre concernant la régulation de la transcription des gènes du HIV-1.

2.1.1.1. Le promoteur minimal

Il est composé d'une boîte TATA, d'un élément initiateur et de trois boîtes GC.

La séquence consensus de la boîte TATA du HIV-1 (CATATAA) diffère légèrement de celle des promoteurs des gènes de classe II, si bien que le terme de boîte CATA peut également être employé (van Opijnen T., 2004). Elle est localisée 27 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription et permet le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base de la cellule hôte.

L'élément initiateur est situé en aval de la boîte CATA, entre les nucléotides -6 et +30. Les deux éléments qui le composent sont indispensables à une initiation correcte de la transcription (Zenzie-Gregory B., 1993). L'activité de cet initiateur bipartite est complètement dépendante de la présence et du positionnement correct de la boîte CATA.

Trois séquences consensus riches en bases GC sont localisées en amont de la boîte CATA entre les nucléotides -78 et -46 et constituent des sites potentiels de fixation pour le facteur de transcription cellulaire Sp1 (Garcia J.A., 1987 ; Jones K.A., 1986).

2.1.1.2. Le domaine activateur

Deux séquences consensus de fixation pour le facteur de transcription cellulaire NF- κ B sont localisées en amont du promoteur minimal entre les nucléotides -105 et -79 et constituent le domaine activateur du promoteur viral (Gaynor R.B., 1988 ; Nabel G., 1987).

2.1.1.3. Le domaine modulateur

Localisé en amont du domaine activateur, le domaine modulateur contient de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription cellulaires (Pereira L.A., 2000).

Parmi les éléments les plus importants dans la régulation de la transcription des gènes viraux, on distingue un site NRRE (Nuclear Receptor Responsive Element) localisé entre les nucléotides -357 et -324 et présentant une homologie frappante avec le site de fixation des

membres de la famille des récepteurs nucléaires (Orchard K., 1990), un site GRE (Glucocorticoid Responsive Element) entre les nucléotides -264 et -259 (Ghosh D., 1992), deux sites potentiels de fixation pour les protéines de la famille C/EBP entre les nucléotides -177 et -157 ainsi que -132 et -97 (Tesmer V.M., 1993), un site potentiel de fixation pour les membres de la famille USF encore appelé boîte E (E-box) entre les nucléotides -173 et -157 (d'Adda di Fagagna F., 1995), un site potentiel de fixation pour TCF entre les nucléotides -142 et -122 (Steger D., 1997), un site potentiel de fixation pour les membres de la famille Ets entre les nucléotides -149 et -141 (Sheridan P.L., 1995) et un site CRE (Cyclic AMP Responsive Element) entre les sites potentiels de fixation pour TCF et NF- κ B (Krebs F.C., 1997).

2.1.2. La région R

Le premier nucléotide de la région R constitue le site d'initiation de la transcription. Cette région sera donc transcrite, mais non traduite. Elle contient la séquence d'ADN permettant la synthèse de la TAR ainsi que de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription dont le site potentiel de fixation des membres de la famille LSF entre les nucléotides -10 et +27 (Coull J.J., 2000).

2.1.3. La région U5

Comme la région R, la région U5 sera transcrite mais non traduite. Elle renferme également quelques sites de fixation pour des facteurs de transcription dont deux sites TRE (TPA Responsive Element) entre les nucléotides +95 et +160 (Rabbi M.F., 1997) et un site potentiel de fixation pour le facteur de transcription NF-AT (Van Lint C., 1997).

2.2. Les étapes de la transcription des gènes du HIV-1

2.2.1. L'initiation de la transcription

La transcription des gènes viraux est initiée par l'assemblage du complexe de pré-initiation sur le promoteur viral. La première étape de la formation de ce complexe est la fixation de la sous-unité TBP du facteur d'initiation TFII-D sur la boîte CATA (Pendergrast P.S., 1996). Les autres composants de la machinerie transcriptionnelle de base de la cellule seront alors recrutés pour initier la transcription basale du génome viral.

2.2.2. L'élongation de la transcription

Lors de la phase tardive de la transcription des gènes du HIV-1, l'élongation des transcrits viraux est dictée par l'action du transactivateur viral Tat. Le rôle et le mécanisme d'action de Tat seront détaillés dans le chapitre concernant la régulation de la transcription des gènes du HIV-1.

2.2.3. La terminaison de la transcription

La terminaison de la transcription des gènes viraux fait intervenir le signal de polyadénylation présent dans la région R de la séquence LTR localisée en 3' du génome viral (Valsamakis A., 1991).

Régulation de la transcription des gènes du HIV-1

De manière comparable aux gènes de classe II, la transcription des gènes du HIV-1 est un processus finement régulé faisant intervenir de nombreuses protéines aux différentes étapes du processus de transcription. Ces protéines peuvent être classées en deux catégories : les facteurs de transcription et les facteurs de remodelage de la chromatine.

1. Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines responsables de la régulation de l'activité transcriptionnelle de base assurée par l'ARN polymérase II associée aux facteurs généraux de transcription. La transcription des gènes du HIV-1 présente la particularité d'être régulée par des facteurs de transcription d'origine cellulaire et virale.

1.1. Les facteurs de transcription cellulaires

1.1.1. Structure

Les facteurs de transcription cellulaires sont constitués de plusieurs domaines structuraux indépendants dont un domaine de fixation leur permettant de se lier de manière spécifique sur une séquence régulatrice d'ADN et un domaine effecteur capable d'induire un effet positif ou négatif sur la transcription.

1.1.1.1. Le domaine de fixation à l'ADN

La structure du domaine de fixation à l'ADN est à la base de la classification des facteurs de transcription. En effet, plus de 80% de ces facteurs contiennent au moins l'un de ces quatre motifs : le motif hélice-tour-hélice, le motif doigt de zinc, le motif crémaillère à leucine et le motif hélice-boucle-hélice (Papavassiliou A.G., 1995).

Le motif hélice-tour-hélice (helix turn-helix) est constitué de deux hélices α de 8 à 10 acides aminés chacune et séparées par quelques acides aminés formant un coude β . L'hélice en position C-terminale encore appelée hélice de reconnaissance, s'ajuste dans le grand sillon de l'ADN grâce au soutien de l'hélice N-terminale.

Le motif doigt de zinc (zinc finger) est un domaine d'environ 30 acides aminés qui se replie autour d'un atome de zinc que coordonnent deux cystéines et deux histidines (C2H2) ou quatre cystéines (C4). La séquence située à la base du motif est responsable de l'interaction avec l'ADN.

Le motif crémaillère à leucine (leucine zipper) contient quatre à cinq leucines en répétition tous les sept acides aminés et qui, dans une structure hélicoïdale de type α , se retrouvent alignés sur la même face. Les leucines de domaines homologues de deux monomères s'associent par des liaisons de type hydrophobe pour former un dimère. La région N-terminale adjacente au domaine de dimérisation est impliquée dans l'interaction avec l'ADN.

Le motif hélice-boucle-hélice (helix-loop-helix) est constitué de deux hélices α reliées par une boucle. Les hélices α de deux monomères sont capables de s'associer par des liaisons de type hydrophobe pour former un dimère. Le domaine de liaison à l'ADN est localisé à l'extrémité N-terminale du motif.

1.1.1.2. Le domaine effecteur

En interagissant avec les différents constituants de la machinerie transcriptionnelle de base, le domaine effecteur est responsable de l'activité du facteur de transcription.

Il peut avoir un potentiel activateur ou répresseur. Les domaines d'activation présentent des motifs structuraux pouvant être classés en trois grands groupes : les domaines riches en acides aminés acides, les domaines riches en glutamine et les domaines riches en proline. Les domaines répresseurs sont quant à eux souvent riches en alanine, glutamine et/ou proline.

1.1.2. Les facteurs de transcription cellulaires impliqués dans la régulation de la transcription des gènes du HIV-1

Parmi les nombreux facteurs de transcription cellulaires impliqués dans la régulation de la transcription des gènes du HIV-1, on distingue : AP-1, certains membres de la famille C/EBP, CREB, Ets-1, certains membres de la famille LSF, certains membres de la famille NF-AT, NF- κ B, certains membres de la famille des récepteurs nucléaires, Sp1, Sp3, TCF-1, USF-1 et YY1.

1.1.2.1. AP-1

AP-1 (Activator Protein -1) est un facteur de transcription ubiquitaire dont l'expression est inductible par de nombreux stimuli (facteurs de croissance, cytokines, esters de phorbol). Il agit sous forme d'hétérodimères ou d'homodimères de membres des familles Jun, Fos, Maf et ATF (Chinenov Y., 2001).

Tous ces proto-oncogènes ont en commun un motif particulier nommé bZIP qui consiste en une région basique suivie d'une crémaillère à leucine. Ce motif bZIP est impliqué dans la dimérisation et la fixation du facteur de transcription sur la séquence consensus TRE TGAG/CTCA, mais également sur la séquence palindromique CRE TGACGTCA (Ryseck R.P., 1991). La fixation de AP-1 sur la séquence TRE induit une courbure de l'ADN dont l'orientation dépend de la nature du dimère (Kerppola T.K., 1991). De plus, alors que certains dimères sont capables d'activer la transcription (FosB/c-jun), d'autres l'inhibent (Fra1/c-jun) (Nakabeppu Y., 1991). Il en résulte une régulation transcriptionnelle propre à chaque complexe.

La régulation de l'activité de AP-1 est complexe puisqu'elle intervient à des niveaux aussi différents que la régulation transcriptionnelle, la demi-vie des ARNm, la demi-vie des protéines, les modifications post-traductionnelles ou l'interaction avec d'autres protéines pouvant soit interférer soit agir de manière synergique avec AP-1 (Karin M., 1997).

AP-1 intervient dans les mécanismes de prolifération cellulaire, de transformation oncogénique et d'apoptose (Shaulian E., 2002).

1.1.2.2. La famille C/EBP

Les facteurs de transcription de la famille C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) sont regroupés en six membres : C/EBP α , C/EBP β (NF-IL6 chez l'homme), C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ et C/EBP ζ .

L'activité de ces facteurs est régulée par de nombreux activateurs ou répresseurs aux différentes étapes de leur mode d'action dont la capacité de liaison à l'ADN ou le potentiel activateur. Ils sont impliqués dans la régulation de nombreux processus cellulaires comme le contrôle de la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, le métabolisme et l'inflammation (Ramji D.P., 2002).

Seuls NF-IL6 et C/EBP γ sont impliqués dans la régulation de la transcription des gènes du HIV-1. Ces deux facteurs de transcription sont exprimés de manière ubiquitaire et appartiennent, comme les facteurs AP-1, à la famille des protéines bZIP (Hurst H.C., 1995). Alors que la région basique du motif bZIP leur permet de lier l'ADN au niveau de la séquence consensus CCAAT, le motif crémaillère à leucine est impliqué dans leur dimérisation (Landschulz W.H., 1989). Contrairement à NF-IL6, C/EBP γ est dépourvu de domaine activateur. Il existe trois isoformes de la protéine NF-IL6 : l'isoforme minoritaire LAP* ainsi que les isoformes majoritaires LAP et LIP. L'isoforme LAP possède un domaine activateur alors que l'isoforme LIP en est dépourvu (Descombes P., 1990 ; Descombes P., 1991).

1.1.2.3. CREB

Avec les protéines CREM (Cyclic AMP Response Element Modulator) et ATF-1 (Activating Transcription Factor -1), CREB (cAMP Response Element Binding protein) constitue une famille de facteurs de transcription sensible aux variations intracellulaires d'AMPc (AMP cyclique).

Exprimée de manière ubiquitaire, la protéine activatrice CREB contient un domaine d'induction par les kinases appelé domaine KID (Kinase Inductible Domain) et constitué d'un site de phosphorylation pour l'enzyme PKA (Protein Kinase A) et de plusieurs sites potentiels de phosphorylation pour les kinases CKI et II (Caseins Kinases I et II). Deux domaines activateurs sont retrouvés de part et d'autre du domaine KID. Le motif bZIP localisé à l'extrémité C-terminale de la protéine permet la dimérisation du facteur de transcription ainsi que sa fixation au niveau de la séquence palindromique CRE (Mayr B., 2001).

L'activité de CREB est principalement régulée par phosphorylation. La voie de l'AMPc constitue le mécanisme de prédilection pour la phosphorylation de CREB. En effet, l'enzyme adénylate cyclase activée suite à une stimulation de la cellule, va catalyser la synthèse d'un second messenger appelé AMPc. L'AMPc va ensuite activer la PKA. Les sous-unités

catalytiques de la PKA vont ensuite migrer dans le noyau pour phosphoryler CREB sur le résidu sérine en position 133. La forme phosphorylée de CREB va induire la transcription en recrutant la sous-unité CTD de l'ARN polymérase II puis l'ensemble de la machinerie transcriptionnelle de base (Carlezon W.A., 2005). Outre la phosphorylation, l'action de CREB est également modulée par d'autres modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, l'ubiquitinylation, la sumoylation et la glycosylation. La liaison de CREB avec de nombreuses protéines telles que NF-IL6, p53 ou YY-1 contribue également fortement à la régulation de son activité (Johannessen M., 2004).

Le facteur de transcription CREB est impliqué dans la régulation de nombreux gènes intervenant dans des processus aussi variés que le métabolisme, le cycle cellulaire, la transduction du signal ou le transport cellulaire (Mayr B., 2001).

1.1.2.4. Ets-1

Ets-1 (E26 Transformation Specific -1) est le membre type des facteurs de transcription de la famille Ets. Ce facteur est essentiellement exprimé dans les thymocytes et les lymphocytes T (Bhat N.K., 1989).

Il possède deux domaines activateurs ainsi qu'un motif hélice-tour-hélice encore appelé domaine ETS lui permettant de se fixer à l'ADN au niveau de séquences contenant un motif central GGA. De nombreuses protéines partenaires se fixent sur Ets-1 par l'intermédiaire du domaine ETS ou de domaines spécifiques lui permettant ainsi d'être recruté sur de nombreux promoteurs cibles (Sementchenko V.I., 2000).

Ets-1 est impliqué dans la survie des lymphocytes T et dans la différenciation des lymphocytes T « natural killer » (Verger A., 2002).

1.1.2.5. LEF-1

LEF-1 (Lymphoid Enhancer binding Factor -1) ou TCF-1 α est un membre de la famille TCF/LEF. La fixation de LEF-1 sur l'ADN par l'intermédiaire d'un domaine spécifique appelé HMG (High Mobility Group) entraîne une courbure de l'ADN lui permettant ainsi de recruter d'autres facteurs de transcription (Grosschedl R., 1994). Contrairement aux autres membres de la famille TCF/LEF incapables d'activer directement la transcription, LEF-1 possède un domaine CAD (Context dependant Activation Domain) capable d'activer la transcription en présence du coactivateur ALY (Bruhn L., 1997).

Le facteur de transcription LEF-1 est exprimé dans les lymphocytes T où il est impliqué dans le contrôle de l'expression du TCR α (Yamada T., 1993) et du CD4 (Sawada S., 1991).

1.1.2.6. La famille LSF

La famille LSF (Late Simian virus 40 Factor) est divisée en deux sous-familles de facteurs de transcription ubiquitaires : la sous-famille LSF-CP2 (LSF-CCAAT binding Protein 2) et la sous-famille GRH (GRainyHead) (Venkatesan K., 2003). Alors que les membres de la sous-famille LSF-CP2 se fixent sur l'ADN sous forme de tétramères (Murata T., 1998 ; Shirra M.K., 1998) au niveau de deux régions répétées (G)CTGG, les membres de la famille GRH dimérisent (Attardi L.D., 1993 ; Shirra M.K., 1998) pour se fixer sur une seule région (G)CTGG (Venkatesan K., 2003). En plus du domaine de liaison à l'ADN qui représente plus de 50% de la protéine, les facteurs de transcription de la famille LSF possèdent deux domaines activateurs et un domaine répresseur leur permettant d'activer ou de réprimer la transcription ainsi qu'un domaine de dimérisation (Shirra M.K., 1998).

Les membres de la famille LSF sont capables de réguler la transcription en s'associant avec des membres de la même sous-famille ou encore avec d'autres partenaires cellulaires comme le facteur de transcription YY-1 (Romerio F., 1997).

Les membres de la famille LSF interviennent essentiellement dans des processus biologiques généraux comme la progression du cycle cellulaire et la croissance cellulaire (Veljkovic J., 2004).

1.1.2.7. La famille NF-AT

La famille NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cells) comprend quatre membres : NF-AT1, NF-AT2, NF-AT3 et NF-AT4. Ils sont présents dans la plupart des cellules du système immunitaire, mais sont particulièrement abondants dans les lymphocytes T, leur principale fonction étant de réguler l'activation des lymphocytes T (Crabtree G.R., 1989).

L'activité des facteurs NF-AT est régulée par déphosphorylation et plus précisément par une phosphatase appelée calcineurine. A l'état inactif, NF-AT est séquestré dans le cytoplasme. L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire faisant suite à la stimulation de la cellule provoque l'activation de la calcineurine qui va alors déphosphoryler NF-AT. NF-AT ainsi activé va entrer dans le noyau pour activer de nombreux gènes dont les gènes permettant l'expression des interleukines 2, 3, 4 et 5, le TNF α et le GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) (Serfling E., 2000).

Seuls NF-AT1 et NF-AT2 sont impliqués dans la régulation des gènes du HIV-1. Ces deux protéines partagent de nombreuses caractéristiques structurales dont le domaine de fixation à l'ADN constitué de dix feuillets β . La boucle reliant les deux premiers feuillets est impliquée

dans la liaison avec l'ADN (Jain J., 1995). Ce domaine de fixation à l'ADN présente de nombreuses similarités avec celui du facteur de transcription NF- κ B, si bien que les protéines NF-AT sont capables d'occuper les sites potentiels de fixation pour NF- κ B (Kinoshita S., 1997). Ils ont également en commun deux domaines activateurs, un domaine d'interaction avec AP-1, un domaine régulateur ainsi qu'une séquence NLS. Le domaine régulateur contient de nombreux sites de phosphorylation et peut être subdivisé en deux motifs dénommés SP et SRR. Plusieurs isoformes de ces deux facteurs sont exprimées et diffèrent au niveau de leurs extrémités N-terminale et C-terminale (Serfling E., 2000).

1.1.2.8. NF- κ B

NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) est un facteur de transcription ubiquitaire et inductible par de nombreux stimuli (TNF α , esters de phorbol) composé de différentes sous-unités agencées sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. La forme active la plus fréquente est constituée des deux sous-unités p50 et p65 (ou Rel A) (Hayden M.S., 2004).

Outre le domaine activateur, les protéines de la famille NF- κ B contiennent un domaine très conservé d'environ 300 acides aminés responsable de la dimérisation, de l'interaction avec I κ B et de la liaison à l'ADN.

A l'état inactif, NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par I κ B α . Après activation de la cellule par divers stimuli extracellulaires comme le TNF α , I κ B α va être phosphorylé par un complexe macromoléculaire contenant des I κ B kinases ou IKK. La phosphorylation de I κ B α va rapidement provoquer son ubiquitinylation puis sa dégradation par le protéasome. Ainsi, la dégradation de I κ B α va libérer NF- κ B qui va alors pouvoir entrer dans le noyau pour activer la transcription de nombreux gènes (Chen L.F., 2004).

NF- κ B est impliqué dans de nombreux processus biologiques, mais il joue un rôle particulièrement important dans le système immunitaire. En effet, il intervient dans la régulation de nombreux gènes de cytokines et de facteurs de croissance en réponse à la stimulation de récepteurs impliqués dans l'immunité comme le TCR (T-Cell Receptor) ou le BCR (B-Cell Receptor) (Bonizzi G., 2004).

1.1.2.9. Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription agissant sous forme de dimères et présentant la particularité d'être activés par un ligand. Leur activité est contrôlée par des protéines appelées cofacteurs inhibiteurs ou activateurs.

Ils sont constitués de cinq régions fonctionnelles : la région A/B possède un domaine d'activation indépendant du ligand ou AF-1 (Activation Function 1), la région C contient un motif doigt de zinc de type C4 lui permettant de se fixer sur l'ADN au niveau d'une séquence minimale de six paires de bases AGGTCA, la région D correspond à un domaine charnier entre les régions A/B et C, la région E contient le domaine de fixation du ligand, le domaine de dimérisation ainsi qu'un domaine d'activation dépendant du ligand ou AF-2 (Activation Function 2). La région F est souvent absente et peu conservée (Gronemeyer H., 1995).

Ils comprennent entre autre les récepteurs des acides rétinoïques (RAR et RXR), le récepteur de l'hormone thyroïdienne (TR) ou encore le récepteur des glucocorticoïdes (GR). Cette famille contient également quelques membres dont les ligands demeurent inconnus et qui portent le nom de récepteurs orphelins. Parmi eux, on distingue les récepteurs de la famille COUP-TF (Chicken Ovalbumin Upstream Promoteur-Transcription Factor). Dans cette famille, deux protéines dénommées COUP-TFI (ou EAR3) et COUP-TFII (ou ARP1) ont été identifiées chez les mammifères (Qiu Y., 1995 ; Wang L.H., 1989).

Avec les récepteurs nucléaires RAR, RXR et GR, COUP-TFI participe activement à la régulation de la transcription des gènes du HIV-1. COUP-TFI intervient dans de nombreux mécanismes moléculaires impliquant ou non des cofacteurs pour stimuler ou réprimer la transcription génique. Cette protéine est impliquée dans le développement et la différenciation cellulaire et en particulier dans la neurogenèse (Park J.I., 2003).

1.1.2.10. Sp1

Sp1 (Specificity Protein 1) est une protéine ubiquitaire qui participe à la régulation de nombreux gènes de ménage (Philipsen S., 1999). Elle est constituée de deux domaines activateurs riches en glutamines et de trois motifs doigt de zinc (C2H2) lui permettant d'interagir avec l'ADN au niveau de séquences consensus GGGGCGGGG encore appelées boîtes GC (Kadonaga J.T., 1988). Sur les promoteurs possédant plusieurs boîtes GC contiguës, Sp1 est capable de former des multimères et ainsi d'exercer une synergie d'activation de la transcription (Mastrangelo I.A., 1991). De plus, elle coopère avec de nombreuses protéines comme COUP-TF (Rohr O., 1997), HDAC1 (Doetzlhofer A., 1999), p300 (Suzuki T., 2000), p53 (Ohlsson C., 1998) ou YY-1 (Lee J.S., 1993) pour moduler son activité transcriptionnelle.

L'activité transcriptionnelle de Sp1 est essentiellement régulée au niveau post-traductionnel par des mécanismes de phosphorylation (Samson S.L., 2002), de glycosylation (Brasse-

Lagnel C., 2003 ; Han I., 1997 ; Jackson S.P., 1988) ou d'acétylation (Dempsey N.J., 2003 ; Ferrante R.J., 2003 ; Ryu H., 2003).

1.1.2.11. Sp3

La protéine Sp3 (Specificity Protein 3) intervient dans la régulation de nombreux gènes de ménage (Philipsen S., 1999).

Elle existe sous la forme de trois isoformes ubiquitaires : une forme longue de 115kDa (L-Sp3) et deux formes courtes de 80kDa (M1-Sp3) et 78kDa (M2-Sp3) (Li L., 2004). La structure modulaire de la forme longue est comparable à celle de Sp1. Les formes courtes sont dépourvues de domaine activateur, leur conférant ainsi un potentiel inhibiteur (Majello B., 1994). Le domaine d'interaction avec l'ADN de Sp3 présente 90% d'homologie avec celui de Sp1 et lui permet donc également de se fixer sur les boîtes GC (Philipsen S., 1999).

1.1.2.12. USF-1

USF-1 (Upstream Stimulating Factor -1) est une protéine ubiquitaire appartenant aux facteurs de transcription de la famille USF. Son domaine de liaison à l'ADN est hautement conservé et consiste en une région basique suivie d'un motif hélice-boucle-hélice puis d'un motif crémaillère à leucine. La région basique est principalement responsable de l'ancrage du facteur de transcription au niveau des boîtes E (Baxevanis A.D., 1993). Les motifs hélice-boucle-hélice et crémaillère à leucine sont quant à eux plutôt impliqués dans la dimérisation, bien que l'intégrité du motif crémaillère à leucine soit requise pour la fixation sur l'ADN (Sha M., 1995).

USF-1 participe à l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes impliqués dans plusieurs fonctions essentielles comme la réponse au stress, la réponse immunitaire, le cycle cellulaire, la prolifération ou le métabolisme des glucides et des lipides (Corre S., 2005).

USF-1 peut utiliser trois mécanismes différents pour activer la transcription de ces gènes : la fixation sur les boîtes E (Ferré-D'Amaré A.R., 1994), l'interaction avec différents facteurs de transcription dont Sp1 (Andrews G.K., 2001) ou l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle de base (Chiang C.M., 1995).

1.1.2.13. YY1

YY1 (Ying Yang 1) est un facteur de transcription ubiquitaire capable d'activer ou de réprimer la transcription de nombreux gènes associés à la prolifération ou à la différenciation cellulaire (Shestakova E.A., 2004). Ce facteur se fixe sur l'ADN par l'intermédiaire de motifs

doigt de zinc. Outre le domaine de liaison à l'ADN, YY-1 est également pourvu de domaines activateurs et répresseurs (Thomas M.J., 1999).

Son mécanisme d'action passe soit par une interaction directe avec l'ADN, soit par une interaction indirecte, par l'intermédiaire de facteurs de transcription comme Sp1 (Seto E., 1991) ou LSF (Romerio F., 1997). De plus, la capacité de YY-1 à moduler l'état chromatinien est confirmée par la mise en évidence de son interaction avec les facteurs de remodelage de la chromatine p300 (Lee J.S., 1995), HDAC1 (Coull J.J., 2000) et HDAC2 (Yang W.M., 1996).

1.2. Le facteur de transcription viral Tat

Le facteur transactivateur viral Tat est retrouvé *in vivo* sous la forme d'une protéine de 101 acides aminés. Cependant, dans certaines souches de laboratoire (LAI, HXB2, NL4-3), Tat est présente sous une forme tronquée de 86 acides aminés. Cette forme non naturelle résulte d'une mutation du génome viral ayant pour conséquence le remplacement du résidu sérine en position 87 par un codon stop et donc à un arrêt prématuré de la traduction de la protéine. La perte de ces quelques résidus C-terminaux n'influence cependant que très peu la fonction transactivatrice de la protéine.

La protéine Tat peut être subdivisée en cinq domaines fonctionnels : le domaine N-terminal 1-20, le domaine 20-40 riche en cystéines impliqué dans la formation de ponts disulfures intramoléculaires, le domaine 40-48, le domaine 48-72 riche en acides aminés basiques qui contient une séquence NLS ainsi que le domaine d'interaction avec la TAR et le domaine C-terminal 72-101 (Kuppuswamy M., 1989). Le domaine basique confère ainsi à Tat la propriété de se fixer sur la protubérance du motif tige-boucle TAR présent à l'extrémité 5' de tous les transcrits naissants (Dingwall C., 1989).

L'activité transactivatrice de Tat est régulée par acétylation au niveau des résidus lysines en position 28 et 50 appartenant respectivement au domaine transactivateur et au domaine de liaison à la TAR (Kiernan R.E., 1999). La déacétylation de Tat est catalysée par l'histone déacétylase de classe III SIRT1 (Pagans S., 2005). De plus, de nombreuses protéines régulatrices interagissent avec Tat soit pour appuyer son effet comme Sp1 (Kamine J., 1992), soit pour le contrecarrer comme p53 (Li C.J., 1995).

Outre son activité transactivatrice, Tat est également connue pour son effet neurotoxique (Magnuson D.S., 1995), sa capacité à induire l'angiogenèse et l'inflammation (Mitola S., 2000) ou encore son implication dans la transcription inverse (Garcia J.A., 1988).

1.3. Régulation de la phase initiale de la transcription des gènes du HIV-1

La régulation de la phase initiale de la transcription des gènes du HIV-1 par les facteurs de transcription cellulaires s'opère essentiellement au niveau de la région U3 du promoteur viral. Elle dépend à la fois du type cellulaire et de l'état physiologique des cellules infectées. Ainsi, les différents facteurs de transcription activateurs et répresseurs présents sur le promoteur viral vont combiner leurs effets afin de définir le rythme transcriptionnel. Cependant, cette combinaison d'effets activateurs et répresseurs conduit pratiquement toujours à l'activation globale de la transcription des gènes viraux.

1.3.1. Les lymphocytes T CD4+

Dans les lymphocytes T CD4+, la transcription des gènes viraux est régulée par de nombreux facteurs de transcription inductibles. Ainsi, l'activation des lymphocytes T CD4+ va provoquer une translocation des facteurs NF-AT1, NF-AT2, CREB et NF- κ B dans le noyau. L'activité transactivatrice de CREB ne fait pas intervenir le site CRE présent sur le promoteur viral. En effet, suite à une activation par la dopamine, CREB va se fixer de manière indirecte sur le promoteur proximal (entre les nucléotides -40 et +80) (Rohr O., 1999). De plus, l'activation de CREB par la prostaglandine E2 conduit à une interaction coopérative entre CREB et NF-IL6 au niveau des sites potentiels de fixation pour les membres de la famille C/EBP (Dumais N., 2002).

Une fois dans le noyau, NF- κ B, NF-AT1 et NF-AT2 vont se fixer sur les sites potentiels de fixation du facteur NF- κ B pour activer alternativement la transcription des gènes viraux (Giffin M.J., 2003).

En absence de stimulation des lymphocytes T CD4+, la transcription de base des gènes viraux est assurée par d'autres facteurs cellulaires.

Dans les lymphocytes T CD4+, les protéines Sp1 se fixent sur les trois boîtes GC du promoteur minimal pour activer la transcription des gènes viraux et servent également d'ancrage aux facteurs de transcription activateurs NF-IL6 (Buckner A.E., 2002 ; Schwartz C., 2000) et COUP-TF (Rohr O., 1999).

Au niveau du domaine modulateur, la fixation des facteurs de transcription activateurs COUP-TF (Rohr O., 1999), GR (Kino T., 2000 ; Russo F.O., 1999), NF-IL6 (Schwartz C., 2000), USF-1 (Naghavi M.H., 2001), Ets-1 (Seth A., 1993) et TCF-1 (Sheridan P.L., 1995)

sur leurs sites respectifs contribue à l'activation de la transcription des gènes viraux. De plus, une interaction entre USF-1 et Ets-1 est nécessaire pour une activation transcriptionnelle optimale (Sieweke M.H., 1998).

Le facteur de transcription YY-1 est un puissant répresseur de la transcription des gènes viraux dans les lymphocytes T CD4+ quiescents. Il agit de manière indirecte en interagissant avec LSF au niveau du promoteur proximal (entre les nucléotides -10 et +27) (Margolis D.M., 1994). (**Figure 20**)

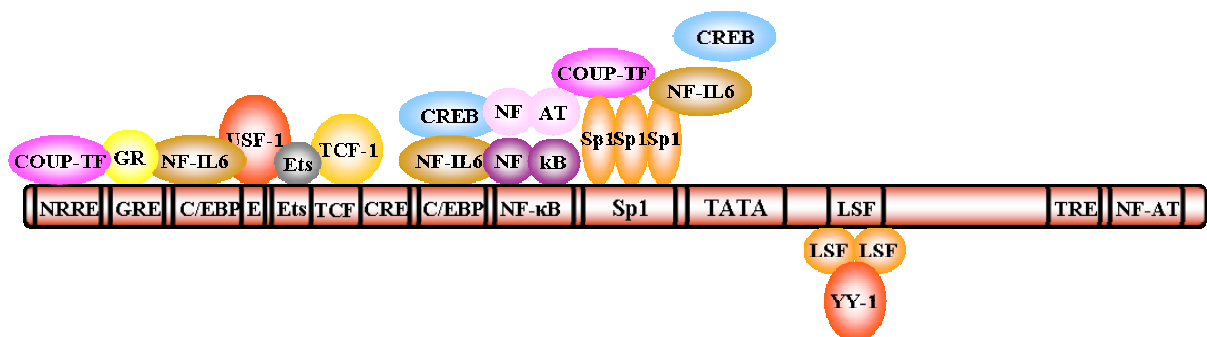


Figure 20 : Régulation de la phase initiale de la transcription des gènes du HIV-1 dans les lymphocytes T CD4+ par les facteurs de transcription cellulaires. Les facteurs de transcription activateurs sont représentés au-dessus du promoteur viral et les facteurs de transcription répresseurs sont représentés en-dessous du promoteur viral.

1.3.2. Les monocytes et les macrophages

Comme dans les lymphocytes T CD4+, les protéines Sp1 occupent leurs trois sites de fixation au niveau du promoteur proximal et contribuent fortement à l'activation des gènes viraux (Demarchi F., 1993).

Le domaine activateur est occupé par le facteur NF-κB. Cependant, dans les cellules non traitées par le PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acétate), le récepteur nucléaire RAR utilise les sites potentiels de fixation de NF-κB pour inhiber la transcription des gènes viraux (Towers G., 1995). Lorsque ces cellules sont activées par le PMA, ce récepteur nucléaire se comporte comme un facteur de transcription activateur en agissant sur la région proximale du promoteur viral (entre les nucléotides -83 et +80) (Maciaszek J.W., 1994).

Au niveau du domaine modulateur, les facteurs de transcription NF-IL6 et CREB (Ross H.L., 2001) ainsi que USF-1 se fixent sur le promoteur viral au niveau de leurs sites respectifs pour

activer la transcription des gènes viraux. Le facteur de transcription GR exerce, quant à lui, un effet répresseur en se fixant sur le site GRE du promoteur viral (Kino T., 2000 ; Russo F.O., 1999).

La répression coopérative entre YY-1 et LSF au niveau du promoteur proximal (entre les nucléotides -10 et +27) est également observée dans les cellules du type monocyte ou macrophage (Margolis D.M., 1994). (**Figure 21**)

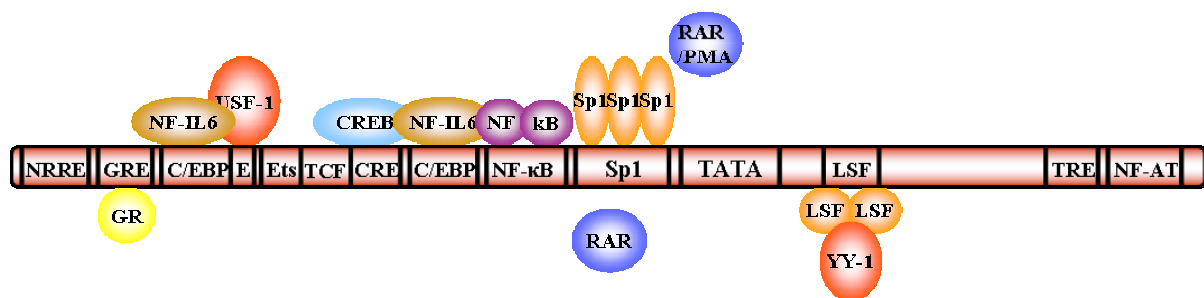


Figure 21 : Régulation de la phase initiale de la transcription des gènes du VIH-1 dans les cellules du type monocyte/macrophage par les facteurs de transcription cellulaires. Les facteurs de transcription activateurs sont représentés au-dessus du promoteur viral et les facteurs de transcription répresseurs sont représentés en-dessous du promoteur viral.

1.3.3. Les cellules microgliales

Les facteurs de transcription Sp1 jouent un rôle essentiel dans la régulation de la transcription des gènes du HIV-1 dans les cellules microgliales. En effet, Sp1 contribue fortement à l'activation de la transcription des gènes viraux, mais sert également de point d'ancrage pour des facteurs de transcription activateurs comme COUP-TF (Rohr O., 1997) et NF-IL6 (Schwartz C., 2000) ou répresseurs comme C/EBP γ (Schwartz C., 2000).

Cependant, dans les cellules microgliales, Sp3 se fixe également sur les boîtes GC du promoteur viral proximal pour exercer un effet répresseur sur la transcription des gènes viraux (Rohr O., 1997).

Contrairement aux lymphocytes T CD4⁺ et aux cellules du type monocyte ou macrophage, le domaine modulateur du promoteur viral influence très peu son activité transcriptionnelle. La fixation du facteur de transcription COUP-TF (Rohr O., 1997) sur le site NRRE a cependant

été décrite comme participant à l'activation de la transcription des gènes viraux dans les cellules microgliales. (**Figure 22**)

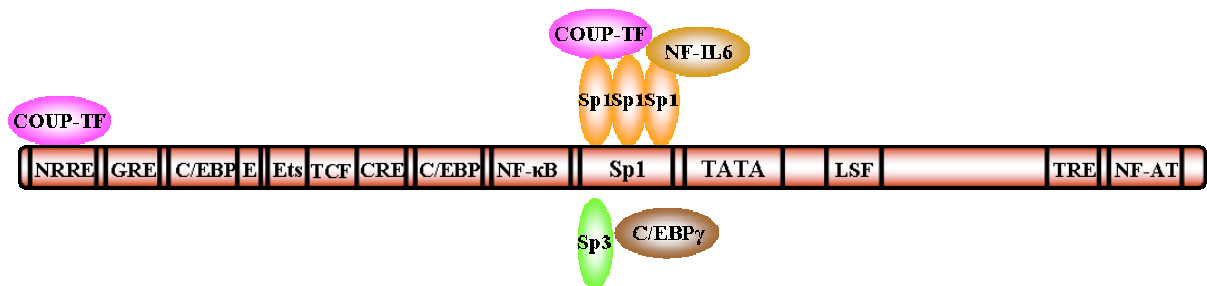


Figure 22 : Régulation de la transcription des gènes du HIV-1 dans les cellules microgliales par les facteurs de transcription cellulaires. Les facteurs de transcription activateurs sont représentés au-dessus du promoteur viral et les facteurs de transcription répresseurs sont représentés en-dessous du promoteur viral.

1.4. Régulation de la phase finale de la transcription des gènes du HIV-1

La régulation de la phase finale de la transcription virale est essentiellement régulée par le transactivateur viral Tat.

Tat favorise essentiellement l'élongation des transcrits viraux, bien qu'un rôle additionnel dans l'initiation de la transcription des gènes viraux lui ait été conféré (Veschambre P., 1995). Les nombreuses études destinées à mieux comprendre son action transactivatrice dans l'étape d'élongation des transcrits viraux ont permis d'établir un modèle de son mode d'action (Barboric M., 2005).

La transcription des gènes viraux est initiée par le recrutement de l'ARN polymérase II sur le promoteur viral. Le domaine CTD de l'enzyme, alors masqué par des protéines régulatrices, est sous sa forme inactive non phosphorylée. La sous-unité CDK7 du facteur général de transcription TFII-H va ensuite libérer le domaine CTD pour le phosphoryler sur le résidu sérine en position 5. L'ARN polymérase II ainsi activée va transcrire la région TAR mais elle sera rapidement bloquée par la fixation des deux facteurs négatifs d'élongation DSIF et NELF. L'acétylation de Tat sur la lysine 28 par l'enzyme PCAF est un pré-requis au recrutement du facteur d'élongation P-TEFb (Kiernan R.E., 1999). En effet, le domaine d'activation de Tat, qui comprend les domaines 1-20 et 20-40, interagit avec P-TEFb par l'intermédiaire de la cycline T1 puis le complexe Tat/P-TEFb se fixe de manière coopérative sur la TAR (Wei P., 1998). La sous-unité CDK9 de P-TEFb va ensuite augmenter la processivité de l'ARN polymérase II en phosphorylant son domaine CTD sur le résidu sérine en position 2. La phosphorylation de DSIF et NELF par P-TEFb conduit également à la levée

de l'inhibition induite par ces facteurs. L'acétylation de Tat sur le résidu lysine en position 50 par les enzymes p300 et GCN5 va inhiber l'interaction Tat-TAR (Col E., 2001 ; Ott M., 1999). Le complexe Tat/P-TEFb alors libéré permet à l'ARN polymérase II d'allonger de manière efficace les transcrits viraux. Finalement, Tat est rapidement déacétylée par l'histone déacétylase de classe III SIRT1 pour favoriser l'élongation de nouveaux transcrits viraux (Pagans S., 2005). (**Figure 23**)

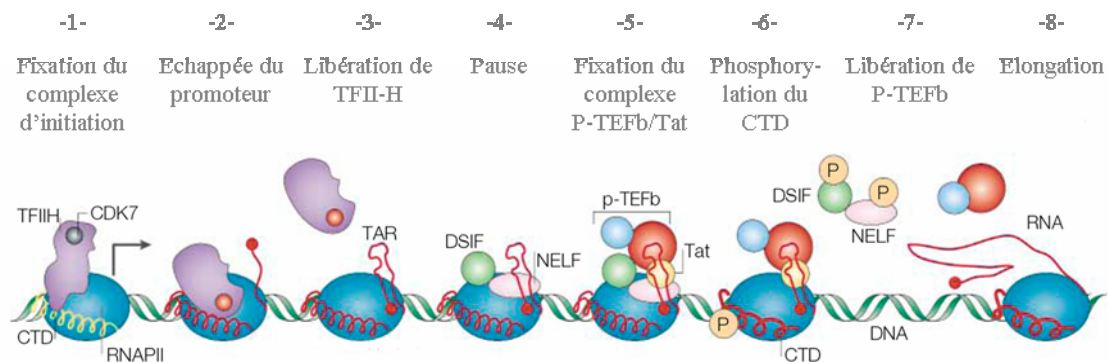


Figure 23 : Mécanisme d'action du transactivateur viral Tat. D'après Peterlin B.M., 2003 avec modifications.

Les deux protéines virales Vpr et Nef participent également à la régulation de la phase tardive de la transcription des gènes viraux.

L'activité transactivatrice de Vpr est étroitement liée à sa propriété de provoquer un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Gummuluru S., 1999). Alors que la connexion entre ces deux mécanismes n'a pas encore pu être établie, quelques études ont mis en évidence la capacité de Vpr à activer les facteurs de transcription NF- κ B et NF-IL6 (Roux P., 2000) et à interagir directement avec les protéines Sp1 (Wang L., 1995), GR (Kino T., 1999), p300 (Felzien L.K., 1998) et TFII-B (Agostini I., 1996).

Nef participe à l'activation de la transcription des gènes du HIV-1 de manière indirecte, en activant les facteurs de transcription NF-AT (Manninen A., 2000), STAT-1 (Federico M., 2001), CDK9 (Simmons A., 2001), NF- κ B et AP-1 (Varin A., 2003).

2. Les facteurs de remodelage de la chromatine

Les nombreuses études menées ces dernières années démontrent que la structure chromatinienne joue un rôle prépondérant dans de nombreux processus cellulaires dont la régulation de la transcription génique. En effet, le remodelage de la chromatine est nécessaire pour faciliter l'accès de la machinerie transcriptionnelle de base et des facteurs de transcription sur le promoteur.

La modulation de l'état chromatinien est principalement régulée par trois types de facteurs : les enzymes de modifications post-traductionnelles des histones, les facteurs de remodelage dépendants de l'ATP et les ADN méthyltransférases. Ces trois types de facteurs sont souvent associés au sein d'un même complexe enzymatique.

2.1. Les différents degrés d'organisation de la chromatine

La chromatine est une structure dynamique conférant à l'ADN un très haut niveau de compaction. La compaction de l'ADN peut être décomposée en trois étapes : le nucléosome, la fibre solénoïdale et le chromosome (Felsenfeld G., 2003). (**Figure 24**)

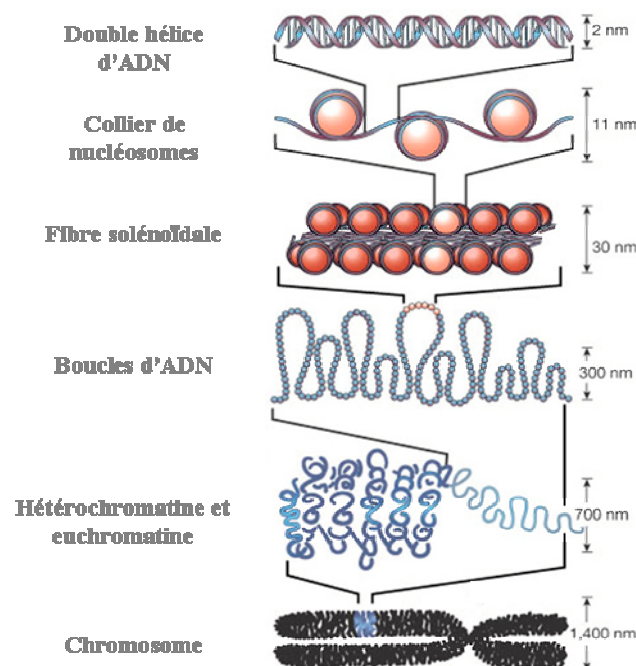


Figure 24 : Les différents degrés d'organisation de la chromatine.
D'après Felsenfeld G., 2003 avec modifications.

2.1.1. Le nucléosome

Le nucléosome constitue l'unité de base de la chromatine. Il est constitué de 146 paires de base d'ADN enroulées en 1,65 tours autour d'un cœur protéique constitué d'un octamère d'histones : deux copies de l'histone H2A, deux copies de l'histone H2B, deux copies de l'histone H3 et deux copies de l'histone H4 (Luger K., 1997).

Les régions des histones qui forment le cœur globulaire de l'octamère sont impliquées dans les interactions avec l'ADN alors que les régions N-terminales de ces protéines pointent vers l'extérieur du nucléosome.

2.1.2. La fibre solénoïdale

D'autres protéines nucléosomales comme l'histone H1 vont ensuite ponter deux nucléosomes voisins et ainsi permettre un enroulement du collier de nucléosomes sur lui-même selon une hélice régulière comprenant six nucléosomes par tour. Il se forme alors une fibre de 30nm de diamètre encore appelée fibre solénoïdale (Zlatanova J., 1998).

2.1.3. Le chromosome

La fibre solénoïdale va ensuite s'ancrer sur la matrice nucléaire en formant des boucles d'ADN d'environ 300nm de hauteur et constituant ainsi la forme peu condensée du chromosome ou euchromatine. Ces boucles d'ADN peuvent également se replier sur elles-mêmes pour constituer la forme très condensée du chromosome ou hétérochromatine.

Les domaines euchromatiniens des chromosomes constituent des fragments de génome accessibles pour la machinerie transcriptionnelle de base ainsi que pour les facteurs de transcription et sont donc activement transcrits.

Au contraire, les domaines hétérochromatiniens sont inaccessibles et ne sont donc pas transcrits. Les chromosomes contiennent de grands domaines d'hétérochromatine indispensables à leur fonction comme les centromères ou les télomères, mais ils renferment également des domaines hétérochromatiniens plus petits dispersés le long du chromosome (Grewal S.I., 2002).

2.2. Les enzymes de modifications post-traductionnelles des histones

Les extrémités N-terminales accessibles des histones nucléosomales sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles covalentes et réversibles comme l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitinylation. Ces réactions sont catalysées par les enzymes de modifications post-traductionnelles des histones (Santos-Rosa H., 2005). (**Figure 25**)

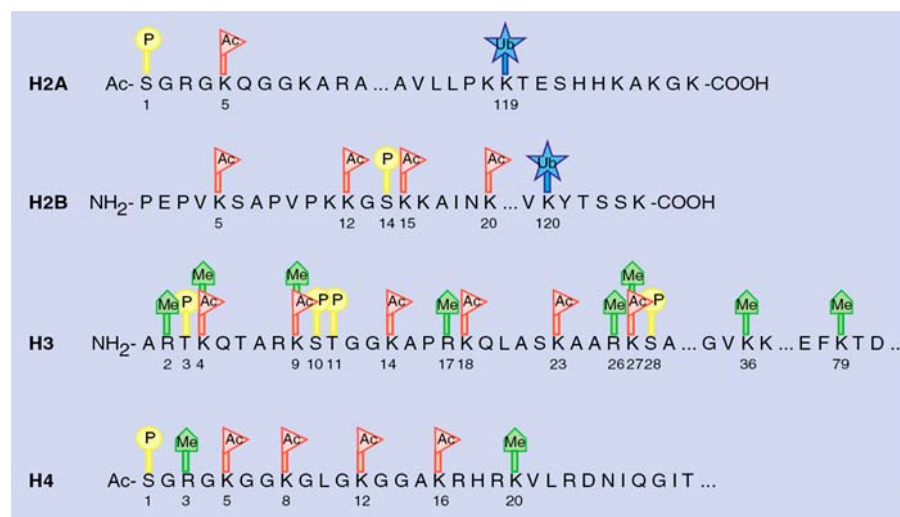


Figure 25 : Modifications post-traductionnelles des extrémités N-terminales des histones. Ac : acétylation ; Me : méthylation ; P : phosphorylation ; Ub : ubiquitinylation. D'après Peterson C.L., 2004 avec modifications.

2.2.1. L'acétylation des histones

2.2.1.1. Généralités

L'acétylation des histones est fortement corrélée avec un état transcriptionnellement actif de la chromatine (Brownell J.E., 1996 ; Grunstein M., 1997 ; Wolfe A.L., 1996). La réaction d'acétylation des histones consiste en un transfert du groupement acétyl porté par une molécule d'acétyl-coenzyme A sur le groupement ε-aminé d'un résidu lysine. (**Figure 26**)

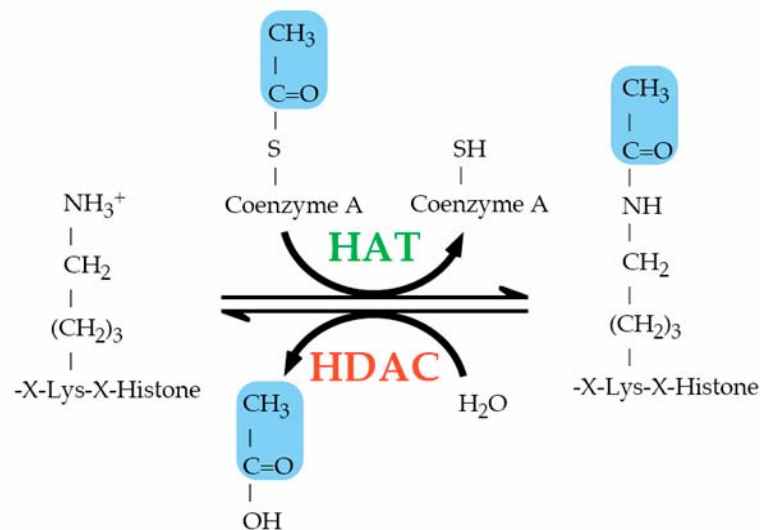


Figure 26 : Réaction d'acétylation des histones. D'après Kuo M.H., 1998 avec modifications.

2.2.1.2. Les enzymes impliquées dans l'acétylation des histones

L'acétylation des histones est régulée par l'action concertée des histones acétyltransférases (HAT) et des histones déacétylases (HDAC) (Roth S.Y., 2001).

De nombreuses HAT font partie de grands complexes enzymatiques recrutés au niveau des promoteurs de manière indirecte, grâce à des interactions avec des facteurs de transcription activateurs (Utley R.T., 1998). Elles peuvent être divisées en deux groupes : les HAT de type A qui sont nucléaires et responsables de l'acétylation des histones nucléosomales et les HAT de type B qui sont cytoplasmiques et responsables de l'acétylation des protéines histones nouvellement synthétisées (Grant P.A., 1999). Les HAT de type A peuvent être subdivisées en six familles : la famille GCN5/PCAF, la famille MYST, la famille CBP/p300, la famille SRC, la famille TAFII250 et la famille ATF2 (Marmorstein R., 2001).

Chez l'homme, les HDAC peuvent être subdivisées en quatre groupes : les HDAC de classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8), les HDAC de classe II (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10), les HDAC de classe III (SIRT1 à 7) et les HDAC de classe IV (HDAC11) (Holbert M.A., 2005)

Les HDAC de classe I sont ubiquitaires et majoritairement nucléaires. HDAC1 et HDAC2 présentent une identité de séquence d'environ 82%. Leur domaine catalytique constitue la majeure partie de la protéine. Ces deux protéines peuvent faire partie intégrante de grands complexes macromoléculaires comme les complexes sin3, NuRD ou Co-REST (Wade P.A., 1999) ou interagir directement avec des facteurs de transcription comme Sp1 (Doetzlhofer A., 1999) ou YY1 (Yao Y.L., 2001). HDAC3 possède une séquence NES (Yang W.M., 2002) et fait également partie intégrante de complexes macromoléculaires comme N-CoR ou SMRT (Guenther M.G., 2001). (**Figure 27**)

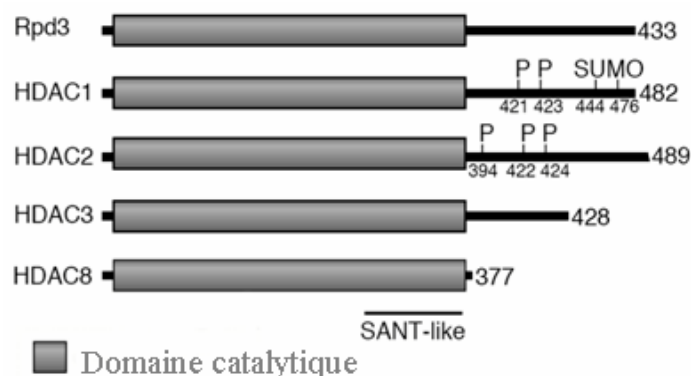


Figure 27 : Les HDAC de classe I. Les différents membres qui constituent le groupe des HDAC de classe I sont homologues à l'enzyme de levure Rpd3. D'après Yang X.J., 2003 avec modifications.

Les HDAC de classe II sont exprimées de manière spécifique d'un tissu à l'autre. Elles peuvent être regroupées en deux sous-classes : la sous-classe IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9) et la sous-classe IIb (HDAC6, HDAC10) (Verdin E., 2003).

Les HDAC de classe IIa contiennent deux régions fonctionnelles distinctes. La région N-terminale contient un site de fixation pour les facteurs de transcription de la famille MEF-2 ainsi que des résidus sérines conservés impliqués dans leur régulation. La région C-terminale

contient le domaine catalytique très conservé (Verdin E., 2003). Ces enzymes sont impliquées dans divers processus cellulaires comme le développement des lymphocytes T (Dequiedt F., 2003 ; Dequiedt F., 2005), la différenciation des cellules musculaires (McKinsey T.A., 2000) ou l'hypertrophie cardiaque (Zhang C.L., 2002). Elles possèdent des séquences NLS et NES leur conférant la propriété de traverser les pores nucléaires.

Les HDAC de classe IIb se caractérisent par une répétition en tandem de leur domaine catalytique. Alors qu'aucun rôle de l'enzyme HDAC10 n'a encore pu être défini, l'implication de HDAC6 dans la motilité cellulaire est à présent clairement établie (Hubbert C., 2002). (**Figure 28**)

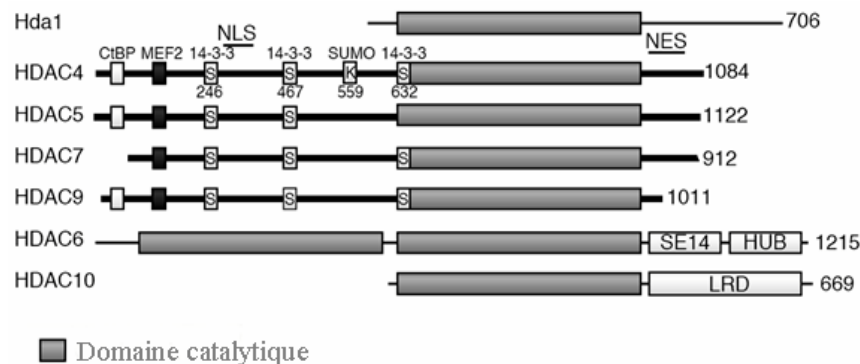


Figure 28 : Les HDAC de classe II. Les différents membres qui constituent le groupe des HDAC de classe I sont homologues à l'enzyme de levure Hda1. D'après Yang X.J., 2003 avec modifications.

Les HDAC de classe III constituent une classe particulière puisqu'elles ne présentent aucune homologie de séquence avec les HDAC de classe I et II. De plus, leur activité catalytique est dépendante de la présence du NAD⁺ (Imai S., 2000 ; Landry J., 2000 ; Langley E., 2002). Ces enzymes interviennent essentiellement dans la déacétylation de protéines non histones nucléaires et cytoplasmiques. En effet, SIRT1 est responsable de la déacétylation de nombreuses protéines intervenant dans la régulation transcriptionnelle comme p53 (Luo J., 2001 ; Smith J.S., 2000 ; Vaziri H., 2001), PCAF (Fulco M., 2003), p300 (Motta M.C., 2004)

ou la sous-unité p65 du facteur de transcription NF- κ B (Yeung F., 2004). De plus, la protéine cytoplasmique SIRT2 est associée aux microtubules où elle déacétyle la tubuline α (North B.J., 2003) alors que SIRT3 présente une localisation mitochondriale (Onyango P., 2002 ; Schwer B., 2002).

2.2.2. La méthylation des histones

2.2.2.1. Généralités

D'un point de vue transcriptionnel, la méthylation des histones peut avoir un effet activateur ou répresseur en fonction de la nature et de la position du résidu affecté (Kouzarides T., 2002). La réaction de méthylation des histones consiste en un transfert du groupement méthyl porté par une molécule de S-adénosyl-méthionine (SAM) sur le groupement ϵ -aminé d'un résidu lysine ou arginine (Zhang Y., 2001).

Il existe trois différents degrés de méthylation : la monométhylation, la diméthylation et la triméthylation. Alors que la monométhylation et la diméthylation sont retrouvées sur les lysines et sur les arginines, la triméthylation est spécifique des lysines. Il semblerait que le degré de modification d'un résidu méthylé soit un indicateur du degré de transcription (Santos-Rosa H., 2002). (**Figure 29**)

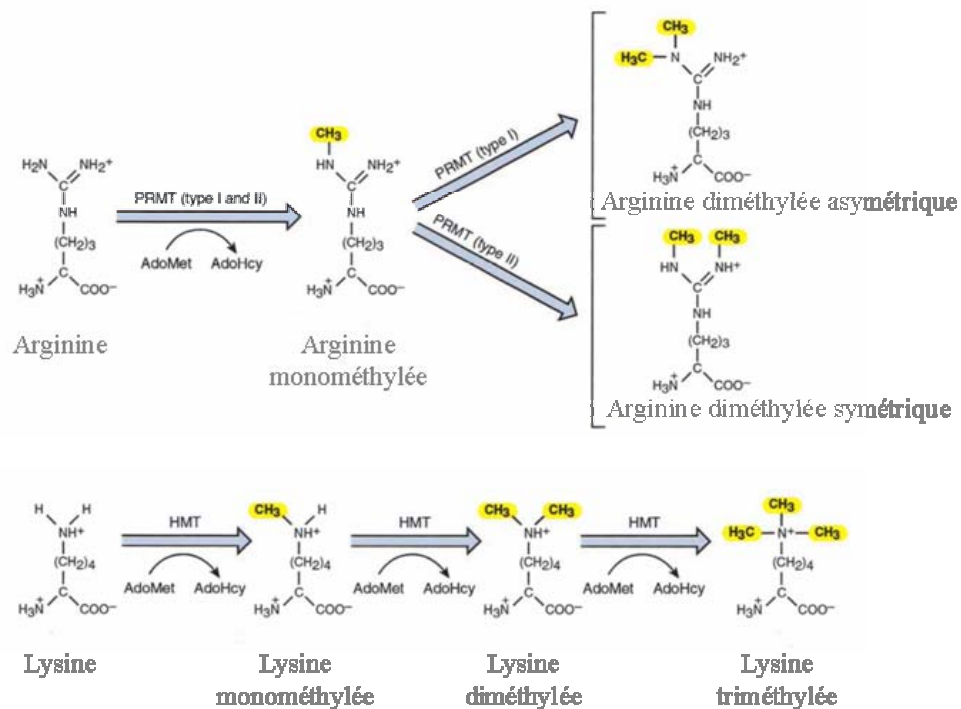


Figure 29 : Réaction de méthylation des histones. D'après Zhang Y., 2001 avec modifications.

2.2.2.2. Les enzymes impliquées dans la méthylation des histones

La méthylation des histones est catalysée par les histones méthyltransférases (HMT). Chez l'homme, ces enzymes peuvent être classées en deux catégories : les PRMT (Protein Arginine MethylTransferases) qui catalysent la méthylation des résidus arginines et les enzymes contenant un domaine SET qui catalysent la méthylation des résidus lysines.

Les PRMT (PRMT1 à 7) sont elles-mêmes subdivisées en deux sous-familles selon qu'elles catalysent une diméthylation symétrique ou asymétrique : les PRMT de classe I catalysent les réactions de diméthylations asymétriques et les PRMT de classe II catalysent les réactions de diméthylations symétriques (Zhang Y., 2001). Les PRMT sont capables de méthyler une grande variété de substrats autres que les histones. En effet, parmi les PRMT identifiées, seules PRMT1, PMRT4/CARM1 et PMRT5 possèdent une activité HMT à proprement parlé (McBride A.E., 2001).

Les protéines contenant un domaine SET peuvent être subdivisées en quatre sous-familles : la sous-famille SET1, la sous-famille SET2, la sous-famille RIZ et la sous-famille SUV39 (Kouzarides T., 2002). Les enzymes appartenant aux sous-familles SET1 et SET2 sont respectivement homologues des enzymes de *S. cerevisiae* ySET1 et ySET2. Les membres de la sous-famille RIZ (Retinoblastoma Interacting Zinc finger) présentent la particularité de posséder de nombreux motifs doigt de zinc en position C-terminale. Les enzymes de la sous-famille SUV39 (SUppressor of Variegation 39) possèdent en amont du domaine catalytique un domaine appelé PRE-SET qui leur confère une spécificité d'action sur la lysine 9 de l'histone H3 (Rea S., 2000). **(Figure 30)**

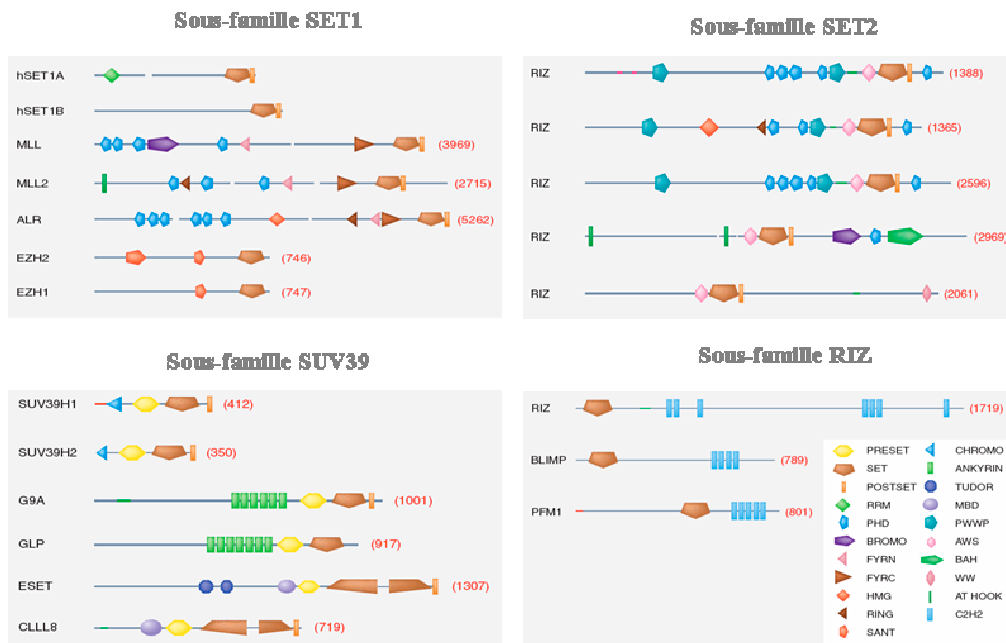


Figure 30 : Les différentes sous-familles de HMT possédant un domaine SET. D'après Kouzarides T., 2002 avec modifications.

Les premières enzymes catalysant la réaction de déméthylation des histones et nommées déméthylases, ont été identifiées très récemment. Ainsi, l'enzyme PAD4 est une déméthylase spécifique des résidus arginines qui catalyse la transformation de ces arginines nucléosomales en citrulline (Wang Y., 2004). De plus, l'enzyme LSD1 catalyse de manière spécifique la déméthylation des résidus lysine des histones (Shi Y., 2004 ; Forneris F., 2005).

2.2.3. La phosphorylation des histones

La phosphorylation des histones est impliquée dans l'activation de la transcription, mais également dans le processus de condensation des chromosomes durant la mitose, l'apoptose et la réparation de l'ADN (Koshland D., 1996 ; Thomson S., 1999). La réaction de phosphorylation des histones consiste en un transfert d'un groupement phosphate porté par une molécule d'ATP sur le groupement ϵ -aminé d'un résidu sérine ou thréonine. Cette réaction est catalysée par des histones kinases (HK).

2.2.4. L'ubiquitinylation des histones

Les histones ubiquitinylés sont localisées dans les régions transcriptionnellement actives de la chromatine (Davie J.R., 1990). En effet, cette modification post-traductionnelle entraîne une perturbation de la structure nucléosomale, facilitant ainsi l'accès des facteurs de transcription

à l'ADN. Le transfert de l'ubiquitine sur les extrémités N-terminales des histones est catalysé par la machinerie classique du processus d'ubiquitylation de la cellule.

2.2.5. Le « code histone »

2.2.5.1. Définition

La régulation de l'état de compaction de la chromatine semble être régie par un ensemble de règles regroupées sous le terme de « code histone » (Histone code). Ce code stipule que plusieurs modifications post-traductionnelles des histones peuvent s'associer pour former des combinaisons de modifications capables de contrôler l'association de protéines régulatrices avec la chromatine. Cette régulation nécessite deux types de facteurs : les enzymes de modification post-traductionnelle qui « écrivent le code » en ajoutant ou en supprimant des modifications au niveau de sites spécifiques des histones, ainsi que des protéines qui « interprètent le code » en interagissant avec les histones au niveau de ces marques spécifiques puis en déclenchant un processus biologique donné (transcription, mitose) (Strahl B.D., 2000 ; Fischle W., 2003).

2.2.5.2. Exemple illustrant la complexité du « code histone »

De nombreuses études destinées à déchiffrer le « code histone » ont montré qu'il était à la fois subtil et très complexe (Fischle W., 2003 ; Santos-Rosa H., 2005). Les seules modifications post-traductionnelles des histones H3 constituent une preuve évidente de cette complexité. En effet, les extrémités N-terminales des histones H3 renferment de nombreuses lysines qui constituent des cibles potentielles pour le système HAT/HDAC : K4/H3, K9/H3, K18/H3, K23/H3 et K27/H3. Les extrémités N-terminales des histones H3 contiennent également de nombreux sites de méthylation : R2/H3, K4/H3, K9/H3, R17/H3, R26/H3, K27/H3, K36/H3 et K79/H3. La méthylation des résidus R2/H3, K4/H3, R17/H3, R26/H3, K36/H3 et K79/H3 est associée à une activation de la transcription, alors que la méthylation des résidus K9/H3 et K27/H3 est associée à une répression transcriptionnelle. Les histones H3 renferment également quelques sites de phosphorylation : T3/H3, S10/H3, S11/H3 et S28/H3.

Comme le prévoit le code histone, ces différentes modifications post-traductionnelles s'influencent mutuellement pour réguler de nombreux processus cellulaires.

A titre d'exemple, les modifications post-traductionnelles sur les résidus K9/H3 et S10/H3 régulent de manière très fine l'état chromatinien au cours de la mitose. En effet, la méthylation du résidu K9/H3 fonctionne comme un marqueur d'hétérochromatine en servant de site de fixation pour les trois isoformes de la famille HP1 (HP1 α , HP1 β et HP1 γ). Les protéines de la famille HP1 sont des répresseurs transcriptionnels capables d'induire la formation de domaines hétérochromatiniens puis de les maintenir. Par l'intermédiaire de son chromodomaine, HP1 est capable de se fixer de manière spécifique sur le résidu K9/H3 triméthylé (Lachner M., 2001).

Cependant, le résidu K9/H3 ne peut être méthylé qu'après avoir été préalablement déacétylé par une HDAC (Rea S., 2000).

Enfin, deux études récentes ont montré que les protéines HP1 sont libérées de la chromatine lors de la phase M du cycle cellulaire alors que le taux de résidus K9/H3 triméthylés reste inchangé. La libération des protéines HP1 de leur site de fixation est régulée par la phosphorylation du résidu S10/H3 (Fischle W., 2005 ; Hirota T., 2005).

2.2.6. Régulation de la transcription des gènes du HIV-1

La transcription des gènes du HIV-1 est également sous le contrôle du code histone.

La position des nucléosomes sur le provirus est très précise et permet de définir plusieurs zones d'hypersensibilité aux DNAses dont certaines jouent un rôle essentiel dans la régulation de la transcription des gènes viraux (Verdin E., 1991).

Dans les conditions de latence post-intégrationnelle, le nucléosome nuc-1 jouxtant le site d'initiation de la transcription permet de définir deux vastes zones hypersensibles (HS2 + HS3 et HS4) avec les nucléosomes adjacents nuc-0 et nuc-2. L'activation transcriptionnelle du provirus est liée au remodelage du nucléosome nuc-1 suggéré par la création d'un nouveau site hypersensible aux DNAses au niveau de son emplacement initial. Le nucléosome nuc-1 constitue ainsi un puissant répresseur transcriptionnel permettant de garder le promoteur viral à l'état latent (El Kharroubi A., 1998 ; Verdin E., 1993). (**Figure 31**)

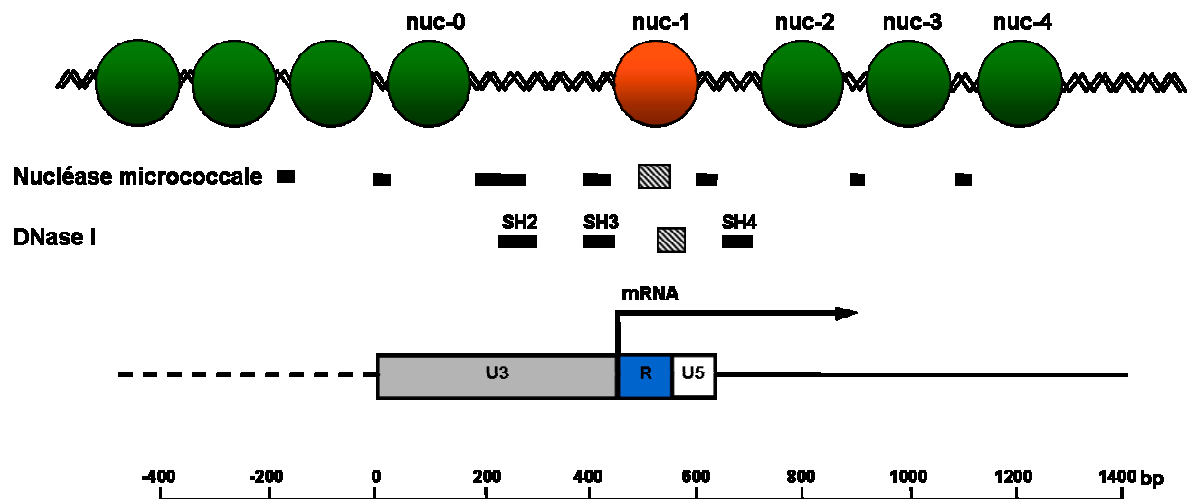


Figure 31: Positionnement des nucléosomes sur le promoteur du HIV-1. Les sites de clivage par la DNase I et la nucléase micrococcale sont indiqués par des rectangles noirs et sont alignés avec les régions U3, R et U5 du promoteur viral. Les sites hypersensibles SH2, SH3 et SH4 sont indiqués. Le rectangle hachuré correspond à la région qui devient hypersensible aux nucléases lors de l'activation de la transcription. D'après Van Lint C., 2000 avec modifications.

La zone d'hypersensibilité aux DNases HS7 localisée au sein du gène *pol* participe également à la régulation de la transcription du provirus (Van Lint C., 1994). Elle renferme de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription activateurs et participe ainsi fortement à la régulation transcriptionnelle des gènes du HIV-1 (Goffin V., 2005 ; Van Lint C., 1994).

L'état d'acétylation des histones joue un rôle essentiel dans la régulation de la transcription des gènes du HIV-1. Les premières études concernant le recrutement de HAT et de HDAC sur le promoteur viral font état d'une activation transcriptionnelle en présence de TSA (TrichoStatine A), un inhibiteur des HDAC de classe I et II (Van Lint C., 1996). D'autres études ont ensuite conforté le rôle critique de l'acétylation des histones dans l'activation transcriptionnelle des gènes viraux dans les cellules latentes (Sheridan P.L., 1997).

Plusieurs HAT (CBP, hGCN5 et PCAF) sont capables d'acétyler les histones H3 et H4 présents sur le promoteur du HIV-1 (Lusic M., 2003). Certaines d'entre-elles peuvent également être recrutées sur le promoteur viral par l'intermédiaire d'autres facteurs comme Tat, capable de recruter p300/CBP et PCAF (Benkirane M., 1998 ; Hottiger M.O., 1998 ; Marzio G., 1998).

Des activités HDAC peuvent également être recrutées sur le promoteur du HIV-1 de manière indirecte, par l'intermédiaire des facteurs YY1 (Coull J.J., 2000) ou du récepteur de l'hormone thyroïdienne non couplé à son ligand (Hsia S.C., 2002).

Il semblerait que la méthylation des histones soit également impliquée dans la régulation transcriptionnelle du provirus. En effet, l'activité kinase CDK9 de P-TEFb joue un rôle critique dans la méthylation de l'histone H3 sur les résidus lysine 4 et lysine 36 connus pour être associés à un état actif de la transcription (Zhou M., 2004).

2.3. Les facteurs de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP

Ils font partie intégrante de complexes macromoléculaires incluant une sous-unité contenant une activité ATPase appartenant à la famille SNF2 (Eisen J.A., 1995).

2.3.1. Classification

Chez l'homme, les facteurs de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP peuvent être subdivisés en plusieurs sous-familles en fonction des motifs protéiques adjacents au domaine catalytique de la sous-unité portant l'activité ATPase : la sous-famille SWI2/SNF2, la sous-famille ISWI et la sous-famille Mi-2 (Lusser A., 2003). (**Figure 32**)

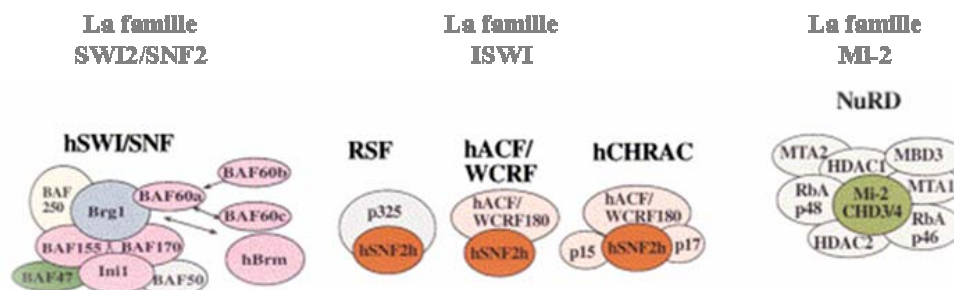


Figure 32: Les différentes familles de facteurs de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP. D'après Narlikar G.J., 2002 avec modifications.

La sous-famille SWI2-SNF2 comprend de grands complexes moléculaires (environ 2MDa) incluant une sous-unité ATPase pourvue d'un bromodomaine comme les protéines BRG1 ou BRM. Ces complexes sont recrutés au niveau des régions régulatrices de l'ADN par l'intermédiaire de protéines régulatrices comme NF-IL6 (Kowenz-Leutz E., 1999) ou GR (Fryer C.J., 1998 ; Ostlund Farrants A.K., 1997).

Les membres de la sous-famille ISWI constituent des complexes moléculaires beaucoup plus petits que les complexes SWI2/SNF2 (environ 500kDa). La sous-unité possédant l'activité ATPase contient un domaine SANT (SWI3, ADA2, N-CoR, TFIIB).

A l'exemple du complexe NuRD, la sous-famille Mi-2 est constituée de grands complexes moléculaires (environ 2MDa). Leur sous-unité ATPase contient un chromodomaine ainsi que des motifs doigt de zinc. Ces complexes sont associés à une activité HDAC suggérant une facilitation de la déacétylation des histones par les facteurs de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP (Zhang Y., 1999).

2.3.2. Mode d'action

Le mécanisme d'action de ces complexes peut être subdivisé en trois étapes : la fixation du complexe protéique sur la chromatine, la déstabilisation du nucléosome en présence d'ATP et le remodelage de la chromatine (Vignali M., 2000).

Alors que les complexes du type SWI2/SNF2 se fixent sur les nucléosomes avec une grande affinité (Quinn J., 1996), les complexes du type ISWI ne sont pas capables de former des complexes stables avec les nucléosomes (Tsukiyama T., 1995).

Ces complexes vont alors déstabiliser les interactions entre les histones et l'ADN pour augmenter l'accessibilité des facteurs de transcription et ainsi provoquer une activation ou une répression de la transcription (Sudarsanam P., 2000). Les complexes SWI2/SNF2 sont également capables de catalyser la réaction inverse, à savoir le retour du nucléosome dans sa conformation initiale (Lorch Y., 1998 ; Schnitzler G., 1998).

Deux modèles ont été proposés pour expliquer ce mécanisme de remodelage de la chromatine : une translocation de l'ADN utilisée par les complexes du type ISWI et un transfert latéral de l'ADN utilisé par les complexes du type SWI2/SNF2 (Lusser A., 2003).

2.3.3. Régulation de la transcription des gènes du HIV-1

Une seule étude fait état du recrutement d'un complexe de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP sur le promoteur du HIV-1. En effet, suite à la stimulation de son activité par des esters de phorbol, le facteur de transcription ATF3 (un membre de la famille CREB) est capable de recruter le complexe SWI2/SNF2 contenant la sous-unité ATPase BRG1 sur le nucléosome nuc-1 du promoteur viral. Ce recrutement provoque un rapide remodelage de nuc-1 et ainsi l'activation de la transcription des gènes viraux (Henderson A., 2004).

2.4. Les ADN méthyltransférases

2.4.1. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une modification post-synthétique qui consiste en un transfert d'un groupement méthyl porté par une molécule de S-adénosyl-méthionine (SAM) sur le carbone en position 5 d'une cytosine (Razin A., 1980).

La méthylation de l'ADN est fortement corrélée à l'état chromatinien et donc à la transcription génique. En effet, la méthylation de l'ADN est généralement associée à un état transcriptionnellement inactif de la chromatine (Razin A., 1977).

2.4.2. Classification

Cette réaction est catalysée par des ADN méthyltransférases. Les dinucléotides CpG constituent les cibles préférentielles de ces enzymes (Gruenbaum Y., 1981).

A ce jour, quatre ADN méthyltransférases ont été identifiées chez l'homme : Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a et Dnmt3b. Alors que le rôle de l'enzyme Dnmt2 n'a pas encore été clairement établi, Dnmt1 a été particulièrement bien caractérisée. Dnmt1 cible préférentiellement les sites hémiméthylés et est ainsi impliquée dans le maintien du profil de méthylation de l'ADN après la réplication de l'ADN (Leonhardt H., 1992). Dnmt3a et Dnmt3b sont des ADN méthyltransférases dites *de novo*. En effet, elles sont responsables de la méthylation de sites CpG n'ayant préalablement pas été méthylés sur le brin d'ADN parental et jouent ainsi un rôle essentiel dans la régulation de nombreux processus développementaux (Li E., 2002).

Les ADN méthyltransférases sont capables d'interagir avec de nombreuses protéines régulatrices de la transcription. En effet, Dnmt1 est connue pour interagir avec HDAC1 (Robertson K.D., 2000), HDAC2 (Rountree M.R., 2000), p53 (Estève P.O., 2005), SUV39H1 et HP1 (Fuks F., 2003). De la même manière, Dnmt3b interagit avec le complexe SWI2/SNF2, HDAC1, HDAC2, SUV39H1 et HP1 (Geiman T.M., 2004). Ces interactions suggèrent une coopération très étroite entre les différentes protéines régulatrices de la transcription.

Bien que de nombreuses évidences vont dans le sens de la réversibilité de la méthylation de l'ADN (Ramchandani S., 1999 ; Mayer W., 2000 ; Simonsson S., 2004), aucune ADN déméthylase n'a été caractérisée à ce jour.

2.4.3. Régulation de la transcription des gènes du HIV-1

Le promoteur du HIV-1 renferme des sites de méthylation CpG (Bednarik D.P., 1987).

Des études préliminaires menées in-vitro ont associé la méthylation des sites CpG à une inhibition de la transcription des gènes du HIV-1 et ainsi à la contribution des phénomènes de latence virale (Bednarik D.P., 1990 ; Singh M.K., 1992).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ce constat. Tout d'abord, les protéines HMBP-1 et HMBP-2 (Histone Methyl-Binding Protein-1 and 2) sont capables de se fixer sur des boîtes GC méthylées et ainsi inhiber la fixation de Sp1 (Joel P., 1993 ; Shao W., 1997). Enfin, les facteurs de transcription activateurs NF- κ B et USF perdent leur affinité pour leurs sites potentiels de fixation lorsqu'ils sont méthylés (Bednarik D.P., 1991).

Cependant, une étude plus récente menée à partir de modèles cellulaires de latence virale rapporte une absence de corrélation entre les phénomènes de méthylation du provirus et de latence virale (Pion M., 2003).

But du travail

Les protéines CTIP1 (Bcl11a) et CTIP2 (Bcl11b) (COUP-TF Interacting Factors 1 and 2) sont des cofacteurs du facteur de transcription COUP-TF. Elles présentent 86% d'identité de séquence au niveau de leur domaine C-terminal (634-743 pour CTIP1 et 605-716 pour CTIP2) (Avram D., 2000). (**Figure 33**)

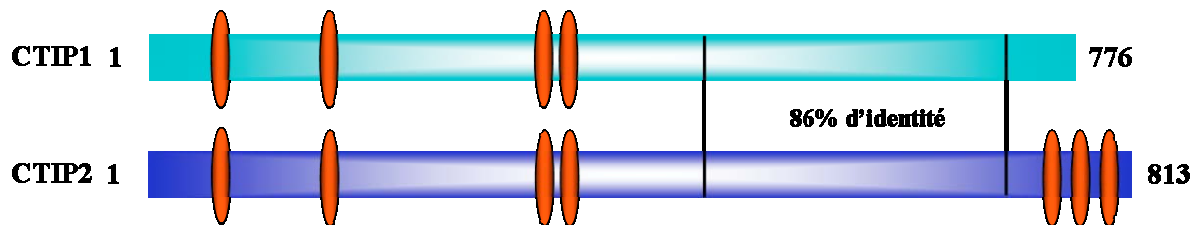


Figure 33 : Représentation schématique des protéines CTIP1 et CTIP2. Chaque ovale rouge représente un motif doigt de zinc.

CTIP1 et CTIP2 sont fortement exprimées dans le système immunitaire (Satterwhite E., 2001) et dans le SNC (Avram D., 2000).

Dans le système immunitaire, CTIP1 et CTIP2 jouent respectivement un rôle crucial dans le développement des lymphocytes B (Liu P., 2003) et des lymphocytes T (Wakabayashi Y., 2003). De plus, ces protéines sont impliquées dans des pathologies liées à la prolifération des lymphocytes. En effet, la translocation $t(2;14)(p13;q32.3)$ impliquant le locus CTIP1 est associé à quelques cas de leucémies chroniques des lymphocytes B (Satterwhite E., 2001), alors que l'inversion $inv(14)(q11.2q32.31)$ et la translocation $t(6;14)(q25-q27;q32)$ impliquant le locus CTIP2 sont respectivement associées à une leucémie des lymphocytes T de type ALL (T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia) (Przybylski G.K., 2005) et une leucémie des lymphocytes T de type AML (T-cell acute Myeloblastic Leukemia) (Bezrookove V., 2004). À côté de ce rôle oncogénique induit par des remaniements chromosomiques, la modulation de l'expression de CTIP1 et CTIP2 semble également être impliquée dans les mécanismes d'oncogenèse. Cependant, alors que la surexpression de CTIP2 a plutôt une fonction suppresseur de tumeur (Wakabayashi Y., 2003), il semblerait que la surexpression de variants de CTIP1 provoquerait des leucémies myéloïdes (Nakamura T., 2000).

CTIP1 et CTIP2 contribuent fortement au développement et au fonctionnement du SNC (Leid M., 2004). À ce titre, CTIP2 joue un rôle particulièrement important dans le développement des projections axonales des neurones moteurs corticospinaux (Arlotta P., 2005).

D'un point de vue structural, CTIP1 et CTIP2 sont des protéines riches en motifs doigts de zinc de 776 et 813 acides aminés respectivement. Ces protéines sont capables d'interagir directement avec tous les membres de la sous-famille COUP-TF (COUP-TFI, ARP1/COUP-TFII et Ear2/COUP-TFIII). (**Figure 33**)

In vitro, ces deux protéines sont capables de se fixer directement sur une séquence consensus d'ADN GGCCGGAGG, très proche de la séquence des boîtes GC qui constituent des sites potentiels de fixation pour le facteur de transcription cellulaire Sp1 (Avram D., 2002). De plus, la fixation de CTIP1 et CTIP2 sur un promoteur hétérologue contenant des multimères de cette séquence a un effet répressif sur la transcription (Avram D., 2002).

Mark Leid et ses collaborateurs ont très vite exclu l'implication des HDAC de classe I et II dans l'activité répressive de CTIP1 et CTIP2 comme le suggèrent les nombreuses expériences décrivant l'insensibilité de ces facteurs à la TSA, un inhibiteur des HDAC de classe I et II (Avram D., 2000 ; Avram D., 2002 ; Senawong T., 2003).

L'activité répressive de CTIP1 et CTIP2 a ensuite été imputée au recrutement de SIRT1, une HDAC de classe III, sur un promoteur cible, provoquant ainsi la déacétylation des histones H3 et H4 et par la même occasion une répression de la transcription. Ces résultats ont été confortés par une levée du potentiel inhibiteur de CTIP1 et CTIP2 en présence de nicotinamide, un inhibiteur des HDAC de classe III (Senawong T., 2003 ; Senawong T., 2005).

De manière très surprenante, Dorina Avram et ses collaborateurs ont publié des résultats contradictoires dans une étude très récente. En effet, ils font état de l'implication du complexe NuRD dans l'action inhibitrice de CTIP2. Or ce complexe inclut HDAC1 et HDAC2, deux HDAC de classe I (Cismasiu V.B., 2005).

Face à la publication de tels résultats contradictoires, il subsiste une grande incertitude quant au mécanisme d'action de CTIP2.

Dans l'optique de découvrir de nouveaux répresseurs de la transcription des gènes du HIV-1 dans les cellules microgliales, nous nous sommes intéressés à l'effet des protéines CTIP1 et CTIP2 sur la transcription du provirus. Mon travail de thèse a précisément consisté en l'étude du mécanisme d'action des cofacteurs transcriptionnels CTIP, et plus particulièrement CTIP2, dans le cadre de l'infection par le HIV-1.

Publications

Publication 1

Recruitment of Tat to heterochromatin protein HP1 via interaction with CTIP2 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in microglial cells

Rohr O, Lecestre D, Chasserot-Golaz S, Marban C, Avram D, Aunis D, Leid M, Schaeffer E

J Virol., 2003 May, 77(9):5415-27

Dans les cellules microgliales, CTIP2 recrute le transactivateur viral Tat dans des structures nucléaires contenant HP1 α

La protéine virale Tat joue un rôle crucial dans l'activation de la transcription des gènes du HIV-1. Dans cette étude nous montrons que CTIP2, un cofacteur du facteur de transcription cellulaire COUP-TF, est capable d'inhiber le pouvoir transactivateur de Tat dans les cellules microgliales. En effet, la surexpression de CTIP2 dans ces cellules provoque une inhibition de l'activité transactivatrice de Tat et ainsi une chute drastique de la réplication virale. Contrairement à CTIP2, CTIP1 est incapable de perturber l'activité transactivatrice de Tat et donc la réplication du HIV-1.

Nos expériences de microscopie confocale nous ont permis de visualiser la distribution nucléaire de Tat en présence des protéines CTIP. En effet, alors que CTIP1 ne semble pas perturber la localisation nucléaire de Tat, la surexpression de CTIP2 provoque une relocalisation de Tat dans des structures nucléaires sphériques.

Des expériences d'interaction *in-vitro* et *in-vivo* nous ont également permis de mettre en évidence une interaction physique entre CTIP2 et HP1 α , une protéine associée à l'hétérochromatine. De manière plus précise, CTIP2 possède deux domaines d'interaction pour Tat et HP1 α : les domaines 145-434 et 717-813. CTIP2 et HP1 α s'associent avec Tat pour former un complexe ternaire dans lequel le domaine 145-434 de CTIP2 interagit avec la région N-terminale de Tat et le domaine 717-813 de CTIP2 interagit avec HP1 α . L'importance de ces domaines d'interaction dans le mécanisme d'action de CTIP2 a été confirmée par des tests transcriptionnels dans des cellules microgliales surexprimant différents mutants de CTIP2.

Ainsi, nos travaux montrent que l'inhibition de la réplication virale par CTIP2 est corrélée avec la relocalisation de Tat dans des domaines hétérochromatiniens par l'intermédiaire de la protéine HP1 α . Ces résultats suggèrent un nouveau mécanisme d'inactivation de Tat par relocalisation nucléaire dans des domaines transcriptionnellement inactifs et ainsi une inhibition du processus infectieux du HIV-1.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Recruitment of Tat to Heterochromatin Protein HP1 via Interaction with CTIP2 Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Microglial Cells

Olivier Rohr, Dominique Lecestre, Sylvette Chasserot-Golaz, **Céline Marban**, Dorina Avram, Dominique Aunis, Mark Leid, and Evelyne Schaeffer

Journal of Virology, 2003, Vol. 77, No. 9, pages 5415-5427

Pages 5415 à 5427 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://jvi.asm.org/cgi/content/full/77/9/5415>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Publication 2

**COUP-TF interacting protein 2 represses the initial phase of HIV-1 gene transcription
in human microglial cells**

Marban C, Redel L, Suzanne S, Van Lint C, Lecestre D, Chasserot-Golaz S, Leid M, Aunis
D, Schaeffer E, Rohr O

Nucleic Acids Res., 2005 Apr, 22;33(7):2318-31

CTIP2 réprime la phase initiale de la transcription des gènes du HIV-1 dans les cellules microgliales

La transcription des gènes du HIV-1 peut être subdivisée en deux phases temporelles : une phase initiale et une phase finale. La phase initiale de la transcription des gènes viraux est sous le contrôle des facteurs de transcription cellulaires, alors que la phase finale est essentiellement régulée par le puissant transactivateur viral Tat.

Dans cette étude nous faisons état de l'effet inhibiteur des protéines CTIP au cours de la phase initiale de la transcription des gènes du HIV-1 dans les cellules microgliales. En effet, CTIP2 est capable d'inhiber l'activité transactivatrice des facteurs de transcription cellulaires COUP-TF et Sp1, les deux facteurs principalement impliqués dans la régulation de la phase initiale de la transcription du provirus dans les cellules microgliales. Des expériences d'interaction *in vitro* et *in vivo* nous ont permis de mettre en évidence l'existence d'un complexe ternaire entre Sp1, COUP-TF et CTIP2 par l'intermédiaire de son domaine 145-434.

Des expériences de microscopie confocale nous ont permis de mettre en évidence la colocalisation entre ce complexe ternaire et HP1 α dans le noyau des cellules microgliales. Ainsi, à l'image de Tat, les protéines COUP-TF et Sp1 sont concentrées dans des structures nucléaires sphériques correspondant à des domaines d'hétérochromatine.

De plus, des expériences de retard sur gel et d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) nous ont permis de montrer que CTIP2 était recruté sur le promoteur du HIV-1 de manière indirecte, par l'intermédiaire des protéines Sp1 fixées sur les boîtes GC situées sur le promoteur minimal.

Ainsi, nos travaux démontrent que le recrutement de CTIP2 sur le promoteur proximal du HIV-1 provoque une inhibition de la phase initiale de la transcription des gènes viraux en induisant la formation de domaines hétérochromatiniens.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

COUP-TF interacting protein 2 represses the initial phase of HIV-1 gene transcription in human microglial cells

Céline Marban, Laetitia Redel, Stella Suzanne, Carine Van Lint, Dominique Lecestre, Sylvette Chasserot-Golaz, Mark Leid, Dominique Aunis, Evelyne Schaeffer and Olivier Rohr

Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, N°7, Pages 2318-2331

Pages 2318 à 2331 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/33/7/2318>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Publication 3

Recruitment of chromatin modifying enzymes to the HIV-1 gene promoter by CTIP2 promotes viral transcriptional silencing in infected microglial cells

Marban C, Dequiedt F, Suzanne S, de Walque S, Redel L, , Van Lint C, Chasserot-Golaz S, Aunis D, Rohr O

Soumis

CTIP2 favorise la formation d'un environnement hétérochromatinien sur le promoteur du HIV-1 et réprime ainsi la transcription des gènes viraux dans les cellules microgliales

Après transcription inverse, l'ADN proviral du HIV-1 est transporté dans le noyau pour être intégré dans le génome de la cellule hôte. La structure chromatinienne au niveau du site d'intégration joue un rôle essentiel dans la régulation transcriptionnelle du provirus. En effet, à l'instar des cellules infectées de manière productive, l'intégration du provirus dans des domaines hétérochromatiniens est fréquente pour les clones latents. La persistance de ces réservoirs cellulaires permet au virus d'échapper à la trithérapie anti-rétrovirale actuelle.

Dans cette étude, nous montrons que le répresseur transcriptionnel CTIP2 recrute un complexe multienzymatique contenant des enzymes de modifications post-traductionnelles des histones et établit un environnement hétérochromatinien au niveau du promoteur du HIV-1 pour réprimer la transcription des gènes viraux.

En effet, nos travaux nous ont permis de montrer que CTIP2 est capable de recruter HDAC1 et HDAC2, deux enzymes sensibles à la TSA, sur le promoteur du HIV-1 pour y induire une déacétylation locale de l'histone H3. Ce recrutement est corrélé à une coopération entre CTIP2 et chacune de ces deux enzymes pour inhiber la réplication et plus particulièrement la transcription des gènes viraux. De plus, l'extinction de l'expression de HDAC1 et HDAC2 abolit complètement l'activité inhibitrice de CTIP2 sur la réplication du HIV-1.

Outre le recrutement de HP1 α et d'activités HDAC, nos résultats nous ont permis de montrer que CTIP2 est également capable de recruter l'histone méthyltransférase SUV39H1 sur le promoteur du HIV-1 pour y induire une augmentation du niveau de méthylation du résidu K9/H3.

De plus, nos expériences de microscopie confocale démontrent que dans les cellules microgliales, l'ensemble des membres de ce complexe : HDAC1, HDAC2, SUV39H1 et HP1 α colocalisent au sein des structures nucléaires induites par CTIP2.

Ainsi, en recrutant des activités enzymatiques HDAC et HMT, CTIP2 va provoquer le recrutement de HP1 α sur le promoteur du HIV-1 pour y induire la formation d'un domaine hétérochromatinien, et ainsi une inhibition de la transcription des gènes viraux. En d'autres termes, dans les cellules microgliales, CTIP2 semble favoriser les phénomènes de latence post-intégrationnelle et ainsi contribuer à la formation de réservoirs cellulaires.

Recruitment of Chromatin Modifying enzymes to the HIV-1 Gene Promoter by CTIP2 Promotes Viral Transcriptional Silencing in Infected Microglial cells

Céline Marban¹, Franck Dequiedt^{2†}, Stella Suzanne^{1†}, Stéphane de Walque³, Laetitia Redel¹, Carine Van Lint³, Sylvette Chasserot-Golaz⁴, Dominique Aunis¹ and Olivier Rohr^{1 5 *}

¹ INSERM unité 575 Pathophysiology of Nervous System, Centre de Neurochimie, 5, rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France. ² Cellular and Molecular Biology Unit, Faculty of Agronomy, B-5030 Gembloux, Belgium. ³ University of Bruxelles (ULB), Institute for Biology and Molecular Medicine (IBMM), Laboratory of Molecular Virology, 12 rue des Professeurs Jeener et Brachet, 6041 Gosselies, Belgium. ⁴ Unité CNRS/ULP UMR 7168, 5, rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France. ⁵ IUT Louis Pasteur de Schiltigheim, 1 Allée d'Athènes, 67300 Schiltigheim, France.

Running Head : Silencing of HIV-1 gene transcription via CTIP2

Key Words : HIV-1 latency, CTIP2, Transcription, Microglial cells, Chromatin

[†] These authors contributed equally to the present work

*To whom correspondence should be addressed. Tel:+33 388 45 66 01. Fax: +33 388 60 08 06
E-mail: rohr@neurochem.u-strasbg.fr

ABSTRACT

Following entry and reverse transcription, the HIV-1 genome is integrated into the host cellular DNA. In contrast to productively infected cells, latently infected cells frequently harbor HIV-1 genomes integrated in heterochromatic structures, allowing viral persistence of these transcriptionally-silent proviruses. These latently-infected cells are insensitive to currently available therapeutic tools and escape to the immune response. Very recently, the long-lived brain macrophages have been described as an important source of latently HIV-1 infected cells. Microglial cells, the brain resident macrophages, are the main HIV-1 target cells in the Central Nervous System and constitute an important reservoir for viral pathogenesis. In the present work we show that, in microglial cells, the repressor CTIP2 recruits a multi-enzymatic chromatin-modifying complex and establishes a heterochromatic environment at the HIV-1 promoter. We report that CTIP2 specifically associates with a TSA-sensitive Histone Deacetylase (HDAC) complex containing HDAC1 and HDAC2. Chromatin immunoprecipitation assays showed that DNA-anchored CTIP2 recruits HDAC1 and HDAC2 to the HIV-1 proximal promoter region. This HDAC targeting to the HIV-1 promoter was correlated with local histone H3 deacetylation. Finally, knock-down experiments demonstrated that HDAC1 and HDAC2 cooperate with CTIP2 to repress HIV-1 gene transcription and viral replication. Similarly, we observed that DNA-anchored CTIP2 also associates with histone methyltransferase (HMT) SUV39H1. This association correlates with increased local histone H3 lysine 9 methylation level at the HIV-1 promoter. CTIP2-mediated recruitment of HDACs and HMT were confirmed in the monocytic U1 cell line, a model for post-integration latency. Altogether, our studies demonstrate the recruitment of chromatin-modifying enzymes to the HIV-1 promoter by CTIP2 in microglial cells. This allows concomitant binding of HP1 α and formation of local heterochromatin which results in HIV-1 silencing. Altogether, our results strongly suggest the involvement of CTIP2 in the establishment of transcriptional HIV-1 latency in the brain. Thereby, our findings uncover new therapeutic opportunities for purging latent HIV-1 viruses from its cellular sanctuaries in infected patients.

INTRODUCTION

HIV-1 gene transcription is a crucial step in the control of the virus life cycle (reviewed in (Greene and Peterlin, 2002)). After entry into the target cell and reverse transcription, viral genes are integrated into the host genome. Following integration, transcription of the HIV-1 genome is regulated by multiple interactions of cellular and viral transcription factors with the proviral 5' end Long Terminal Repeat (LTR) region. Chromatin structure plays a critical role in gene transcription (Workman and Kingston, 1998). This holds true for integrated HIV-1 LTR since it is now well established that the viral promoter activity is directly governed by its chromatin environment (reviewed in (Van Lint, 2000)). Nucleosomes, the basic units of chromatin, are precisely positioned at the HIV-1 promoter (Van Lint et al., 1996; Verdin et al., 1993). Nuc-1, a nucleosome located immediately downstream of the transcriptional initiation site impedes directly on LTR activity. Epigenetic modifications and disruption of Nuc-1 is a prerequisite to activation of LTR-driven transcription and viral expression (for review (Van Lint, 2000)). Nucleosomes are constituted of DNA wrapped around a core of specific proteins called histones. Specific residues in the basic N-terminal tails of the nucleosomal histones undergo extensive post-translational modifications such as acetylation, methylation, phosphorylation and ubiquitination (reviewed in (Fischle et al., 2003; Margueron et al., 2005; Peterson and Laniel, 2004)). The compaction of chromatin and its permissiveness for transcription are directly dependent on the post-translational modifications of histones. Euchromatin, a relaxed state of chromatin, is often associated with active transcription. On the other hand, heterochromatin, a compacted and more structured chromatin environment, is repressive for transcription. In contrast to productively infected cells, latently infected cells frequently harbor HIV-1 genomes integrated in heterochromatic structures, which allows viral persistence as a silenced integrated proviruses (Jordan et al., 2003). In addition, a heterochromatic environment also favours viral post-integration latency (Jordan et al., 2001). Altogether, these observations might at least partially explain how the virus can escape the host immune response and the current therapeutic tools (Finzi et al., 1997; Pierson et al., 2000). Understanding the molecular mechanisms underlying HIV-1 transcriptional silencing is thus a major challenge in the fight against AIDS. The fact that histone deacetylase (HDAC) inhibitors can induce expression from integrated quiescent viruses not only directly implicates chromatin-modifying activities in HIV-1 transcription, but also uncovers new therapeutic opportunities (Chen et al., 1997; Demonte et al., 2004; Quivy et al., 2002; Ylisastigui et al., 2004a).

HP1 α is associated with transcriptionally inactive chromatin. It has been shown to bind methylated lysine 9 of histone H3 at heterochromatin sites where it promotes gene silencing (Bannister et al., 2001). Epigenetic histone modifications such as methylation and acetylation can act as either repressive or active marks. For histone H3, methylation of lysines K4, K36 and K79 are associated with transcriptional activation. Similarly, acetylation of K9/H3 is associated with active transcription.

In contrast, H3 methylation on K9, K27 and K20 correlates with transcriptional repression. Interestingly, deacetylation is a prerequisite for methylation and HP1 binding (for review (Fischle et al., 2003)). Therefore, transition from an active to inactive transcriptional state implies a series of ordered recruitment of histone-modifying enzymes. This is exemplified for K9/H3 methylation and HP1 recruitment which requires the stepwise recruitment of HDAC (to first remove the acetyl group) and Histone Methyl Transferase (HMT) activities.

The eighteen human HDACs are grouped into three classes. Human class I enzymes are homologous to the yeast *yRPD3* and class II members to *yHDA1*. Human class III HDACs share no homology to class I or II and are related to *ySIR2*. In addition, while class I and II HDACs are sensitive to trichostatin A (TSA), the class III HDACs require NAD as a cofactor and are inhibited by nicotinamide (Gray and Ekstrom, 2001; Landry et al., 2000). HIV-1 gene transcription has been shown to be activated by TSA treatment and several transcription factors bound to the viral LTR recruit class I or class II HDACs to this region (Coull et al., 2000; Quivy et al., 2002; Van Lint et al., 1996; Williams et al., 2006) (reviewed in (Marzio and Giacca, 1999)). However, to date, the mechanisms associated with the establishment of a heterochromatic environment at the HIV-1 promoter remains unclear.

Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor (COUP-TF) Interacting Protein 2 (CTIP2) is a recently cloned transcriptional repressor that can associate with members of the COUP-TF family (Avram et al., 2000). This cofactor is expressed in the brain and the immune system (Leid et al., 2004). By regulating both differentiation and survival of thymocytes, CTIP2 is necessary for T-lymphocyte development (Wakabayashi et al., 2003). In the brain, CTIP2 plays a key role in the development of corticospinal motor neuron axonal projections to the spinal cord (Arlotta et al., 2005).

Recently, we reported that CTIP2 inhibits HIV-1 replication in human microglial cells (Marban et al., 2005; Rohr et al., 2003). Microglial cells constitute the CNS resident macrophages. They are the main HIV-1 target cells in the brain, and because they are long lived and relatively protected by the blood brain barrier, they constitute an important reservoir of viruses. Recently, brain macrophages have been described as latently HIV-1 infected cellular reservoirs (Barber et al., 2006). It is now clear that the long-lived reservoirs of HIV-1 can persist for years in the presence of HAART. However, contrary to CD4+ T-lymphocytes reservoirs (reviewed in (Marcello, 2006)), information on the virus state within macrophages and microglial cells is very limited.

Here we report that CTIP2 inhibits HIV-1 gene transcription by recruiting a chromatin-modifying complex and by establishing a heterochromatic environment at the HIV-1 promoter in microglial cells. Immuno-affinity purified CTIP2 associates with a TSA-sensitive HDAC complex containing HDAC1

and HDAC2 but not HDAC3. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) experiments showed that DNA-bound CTIP2 recruits HDAC1 and HDAC2 at the viral promoter. Since cellular knock-down of CTIP2 strongly stimulated HIV-1 production, HDAC1 or HDAC2 knock-down further enhanced CTIP2-mediated repression. CTIP2-mediated targeting of HDAC1/2 to the viral promoter was correlated with histone H3 deacetylation at the Nuc-1 binding site of the LTR region. As deacetylation of a lysine residue is a prerequisite for its subsequent methylation, we have further investigated on CTIP2 ability to promote K9/H3 methylation. We observed that CTIP2 associates with HMT SUV39H1 and promotes K9/H3 methylation at the viral promoter. Using the monocytic latently-infected U1 cell line, we demonstrate the recruitment in vivo of CTIP2 and HP1 α to the HIV-1 promoter proximal region in the context of integrated HIV-1 proviruses. Transcriptional activation of the HIV-1 promoter by PMA was associated with impaired recruitment of CTIP2 and HP1 α , and decreased levels of K9/H3 methylation. Altogether, these results strongly suggest the recruitment of HDAC and HMT activities to the viral promoter by CTIP2. This would allow HP1 binding to the LTR, heterochromatin formation and HIV-1 silencing in microglial cells. Understanding HIV-1 silencing in the cellular reservoirs is actually the major challenge to viral eradication. Thereby, CTIP2, HDAC and HMT recruitments might uncover new therapeutic opportunities.

RESULTS

CTIP2 associates with TSA-sensitive HDAC activities.

Our previous studies (Marban et al., 2005; Rohr et al., 2003) have suggested that CTIP2 may represses HIV-1 transcription through association with HDAC activities.

To further test this hypothesis, vector encoding FLAG-tagged CTIP2 was transfected into HEK 293T cells. The recombinant protein was immunoprecipitated from cell extracts and associated HDAC activity was assessed. As a control, cells transfected with the empty vector were used in parallel (Figure 1A). CTIP2 associated with significant HDAC activity (Figure 1A, column 3). By comparison, the relative amount of HDAC activity associated with CTIP2 was about 9-fold higher than that observed with the control cellular extracts. Interestingly, addition of Trichostatin A (TSA), a compound known to inhibit class I and II but not class III HDACs totally abolished CTIP2-associated HDAC activity (Figure 1A, column 4). These observations strongly suggest that CTIP2 interacts with class I or class II HDACs.

CTIP2 associates with HDAC1 and HDAC2

To further investigate the above findings, we tested the presence of HDAC-1, -2 and -3 in the material associated with CTIP2 (Figure 1B). Western blot analysis revealed that CTIP2 specifically associated with HDAC1 and HDAC2 but not with HDAC3 (Figure 1B, column 3). As a control, HDAC1, -2 and -3 were not observed for the control empty vector (Figure 1B, column 2). To refine these observations we performed GST pull-down experiments. Bacterially expressed GST-CTIP2 was incubated with in vitro translated ³⁵S-labelled HDAC1 and HDAC2 proteins. After extensive washing, the material associated with GST-CTIP2 was resolved by SDS-PAGE and the presence of HDAC1 or -2 was detected by autoradiography. As shown on Figure 1C, about 10% of the engaged HDAC1 and HDAC2 proteins associated specifically with GST-CTIP2 (Figure 1C, column 3) but not with the GST control (Figure 1C, column 2). We have further verified the association of CTIP2 with HDAC 1/2 in vivo by immunofluorescence confocal microscopy (Supplement Figure S1A). Altogether, these results demonstrate that CTIP2 can associate with HDAC activity which comprises HDAC1 and -2.

Several multiproteic complexes containing HDAC-1 and -2 have been described, such as Sin3, NuRD or Co-REST. To further investigate the nature of CTIP2-associated HDAC complex, Western blot analysis were performed on affinity-purified CTIP2 from HEK 293T cell extracts. Although Sin3, NuRD or Co-REST were present in CTIP2-expressing cells, no interaction was detected with CTIP2 (data not shown). This suggests that CTIP2 may not be involved in any of the HDAC1/2 containing complexes identified to date.

The HDAC-interacting domain of CTIP2 is located in its N-terminus

To delineate the CTIP2 region mediating HDAC interaction, we performed HDAC activity assays on affinity-purified materials from cells expressing truncated mutants of CTIP2 (Figure 2A). The N-terminal part of CTIP2 (aa 1-354) was sufficient to recruit HDAC activity (Figure 2A column 5). Interestingly, neither the 145-434 (Figure 2A column 7) nor the 350-813 (Figure 2A column 9) segments associated with HDAC activity suggesting that the 1-145 region of CTIP2 may be responsible for HDAC association. Again, the deacetylase activity associated with the full-length and the N-terminal truncated form of CTIP2 was fully repressed by TSA treatment (Figure 2A, columns 4 and 6).

To verify the correlation between CTIP2-associated HDAC activity and the presence of HDAC1/2, we performed Western blot analysis of the material associated with the various CTIP2 mutants (Figure 2B).

As expected, the full-length (Figure 2B column 7) and the N-terminal part of CTIP2 (Figure 2B column 8) but not the 145-434 (Figure 2B column 9) nor the 350-813 (Figure 2B column 10) fragments associated with HDAC1 and HDAC2.

HDAC1 and HDAC2 cooperate with CTIP2 to repress HIV-1 gene transcription and viral replication

To decipher whereby HDAC1 and HDAC2 participate in CTIP2 repressive function, we examined their effect on CTIP2-mediated repression of chromatin-integrated HIV-1 promoter. TZM-bl cells, which contain a chromatin-integrated LTR, were co-transfected with CTIP2 and HDAC1 or HDAC2 expression vectors as indicated (Figure 3A). Overexpression of HDAC1 and HDAC2 alone did not significantly affect LTR-driven transcription (Figure 3A, columns 3 and 7 respectively). Moreover CTIP2-mediated repression (Figure 3A, column 2) of chromatin-integrated HIV-1 promoter was synergistically potentiated by the presence of increasing amounts of HDAC1 (Figure 3A, columns 4 to 6) and HDAC2 (Figure 3A, columns 8 to 10). To determine whether HDAC recruitment further impacts on HIV-1 replication, microglial cells were transfected with the HIV-1 pNL4-3 and the indicated CTIP2, HDAC1 and HDAC2 expression vectors (Figure 3B). 48 hours after transfection, soluble p24 was assessed in the supernatant by ELISA. These experiments confirmed the repressive activity of CTIP2 on HIV-1 expression (Figure 3B, column 2) and revealed that HDAC1 (Figure 3B, lanes 4 to 6) and HDAC2 (Figure 3B, Lanes 8 to 10) can further enhance this repression. Again, overexpression of HDAC1 (Figure 3B column 3) or HDAC2 (Figure 3B column 7) alone did not affect significantly HIV-1 replication. To further evaluate the functional cooperation of endogenous CTIP2 with HDAC1/2 enzymes, we quantified the p24 production of infected microglial cells knocked-down for CTIP2 alone (Figure 3C, columns 4 to 6), HDAC1 alone (Figure 3C column 2), HDAC2 alone (Figure 3C column 3), CTIP2 and HDAC1 (Figure 3C, column 7), or CTIP2 and

HDAC2 (Figure 3C column 8). Since HDAC-1 or -2 knock down stimulated HIV-1 replication about 6 fold (Figure 3C, columns 2 and 3), CTIP2 knock-down stimulated HIV-1 production up to 60 fold (Figure 3C, column 6) confirming the high repressive potential of the microglial endogenous protein. Moreover, concomitant knock-down of CTIP2 with either HDAC-1 or HDAC-2 enhanced viral production up to 170 fold (Figure 3C, column 7 and 8). These observations revealed a functional cooperation of CTIP2 with HDAC1 and HDAC2 in HIV-1 gene silencing.

Association of CTIP2 with the HIV-1 proximal promoter induces recruitment of HDAC1 and HDAC2 and local H3 deacetylation

We previously reported that CTIP2 was anchored to the HIV-1 promoter by a direct interaction with the cellular transcription factor Sp1. To determine whether CTIP2 recruitment impacts on LTR local acetylation levels, we performed chromatin immunoprecipitation experiments with an anti-Ac-H3 antibody (Figure 4, lane α -Ac/H3). The control GAPDH gene promoter (panel PCR3), the LTR Nuc-1 binding region (panel PCR2) and the LTR proximal region (PCR1) were targeted by PCR.

As expected, CTIP2 associates specifically with the LTR proximal region (Figure 4, lane α -FLAG, column 3) but not with the Nuc-1 binding region (Figure 4, lane α -FLAG, column 6) or the GAPDH control promoter (Figure 4, lane α -FLAG, column 9). In the absence of overexpressed CTIP2, low levels of Ac-H3 was associated with the Nuc-1 binding region of the LTR marking a reduced basal activity of the LTR (Figure 4, lane α -Ac/H3, column 5). Interestingly, overexpression of CTIP2 resulted in decreased levels of histone H3 acetylation (Figure 4 lane α -AcH3, column 6). As control, the high levels of acetylated H3 at the GAPDH gene promoter was not affected by CTIP2 overexpression (Figure 4 lane α -Ac/H3, column 9), confirming the inability of CTIP2 to bind the GAPDH promoter (Figure 4 lane α -FLAG, column 9).

The decrease in H3 acetylation at the HIV-1 promoter would imply the local recruitment of HDAC enzymes. Based on the above results, we investigated whether HDAC1 and HDAC2 were recruited to the HIV-1 promoter by CTIP2. Both enzymes were detected in association with the HIV-1 LTR proximal and the Nuc-1 binding regions (Figure 4 lanes α -HDAC1 and α -HDAC2, columns 2 and 5). This constitutive localization of HDAC1 and -2 to the HIV-1 promoter is in total accordance with the effect of their knock-down on HIV-1 replication (Figure 3C). In contrast, neither HDAC1 nor HDAC2 was detected in association with the GAPDH gene promoter region used as a control (Figure 4 lanes α -HDAC1 and α -HDAC2, columns 7 to 9). Overexpression of CTIP2 further increases recruitment of HDAC1 and HDAC2 to the Sp1 binding site region (Figure 4 lanes α -HDAC1 and α -HDAC2, column 3) and to the Nuc-1 binding region (Figure 4 lanes α -HDAC1 and α -HDAC2, column 6) of the LTR. These results strongly suggest that CTIP2 targets HDAC1 and HDAC2 to the HIV-1 gene promoter to establish a chromatin environment detrimental to transcription by inducing local histone deacetylation.

CTIP2 associates with Histone Methyl Transferase SUV39H1

We have previously reported that CTIP2 promotes HP1 α recruitment to the HIV-1 promoter (Marban et al., 2005). In heterochromatic environments, HP1 α associates with the methylated form of the histone H3 lysine 9 (Bannister et al., 2001). Methylation of K9/H3 is a sequential process that imply previous deacetylation of the lysine residue by HDACs. Since CTIP2 promotes deacetylation of H3 at the viral promoter, we investigated the ability of CTIP2 to associate with HMTs. Since methylation of lysine 9 of H3 is typically mediated by SUV39H1. We logically tested whether CTIP2 could interact with SUV39H1 in coimmunoprecipitation assays. As shown on Figure 5, full-length CTIP2 associated with SUV39H1 (Figure 5A, lane 1). In addition, the central 145-434 domain (Figure 5A, lane 3) but not the N-terminal and C-terminal domains (Figure 5A, lanes 2 and 4) of CTIP2 associate with SUV39H1. To further investigate the association of SUV39H1 with CTIP2, we performed GST pull-down experiments with bacterially expressed GST-SUV39H1 and ³⁵S-labelled in vitro translated CTIP2 proteins. About 5% of CTIP2 proteins interacted with GST-SUV39H1 in vitro (Figure 5B, column 3) but not with the control GST (Figure 5B, column 2). Finally, CTIP2 association with SUV39H1 was confirmed by confocal microscopy in nuclei of microglial cells (Supplement Figure S1B).

CTIP2 cooperates with SUV39H1 to repress HIV-1 gene transcription and viral replication.

To further characterize the functional relevance of CTIP2 and SUV39H1 interaction, we performed luciferase assays on cellular extracts from TZM-bl cells overexpressing or not CTIP2 and SUV39H1 (Figure 5C). While overexpression of SUV39H1 alone did not significantly alter LTR-driven transcription (Figure 5C column 2), its coexpression with CTIP2 produce a higher repression (Figure 5C column 4) than that observed for CTIP2 alone (Figure 5C column 3). These results suggest a functional cooperation between CTIP2 and SUV39H1. To examine the effect of this functional cooperation on HIV-1 replication, we next overexpressed CTIP2 and SUV39H1 in pNL4-3 transfected microglial cells (Figure 5D). As expected, p24 production was unaffected by SUV39H1 alone (Figure 5D column 2). However, CTIP2 repressive activity (Figure 5D column 3) was strongly potentiated by SUV39H1 (Figure 5D column 4) confirming the functional cooperation between CTIP2 and SUV39H1 observed at the transcriptional level.

CTIP2-mediated recruitment of SUV39H1 to the HIV-1 proximal promoter induces K9/H3 methylation in the adjacent Nuc-1 region

K9/H3 methylation is the ultimate epigenetic modification necessary for HP1 α association and polymerisation. To better understand the biological significance of CTIP2-mediated recruitment of SUV39H1, we performed chromatin immunoprecipitation experiments with anti-tri-methyl-K9/H3, anti-SUV39H1, and anti-HP1 α antibodies in the presence or not of CTIP2 (Figure 5E). Again, the

control GAPDH gene promoter (Figure 5E, panel PCR3), the LTR nuc-1 binding region (Figure 5E, panel PCR2) and the LTR proximal region (Figure 5E, PCR1) were analyzed by PCR.

As expected, CTIP2 associates with the proximal LTR region (Figure 5E lane α -FLAG column 3). In addition, CTIP2 binding correlates with the specific recruitment of HP1 α to the proximal and to the Nuc-1 binding LTR regions (Figure 5E lane α -HP1 α , column 3 and 6). In the absence of CTIP2, no SUV39H1 could be detected on the viral proximal region (Figure 5E, lane α -SUV39H1, columns 2 and 5). Interestingly, binding of CTIP2 was associated with SUV39H1 recruitment (Figure 5E lane α -SUV39H1 columns 3 and 6) and increased K9/H3 methylation on the adjacent Nuc-1 binding region (Figure 5E lane α -MeK9/H3 column 6)

Decreased recruitment of CTIP2 and HP1 α to the HIV-1 promoter proximal region during transcriptional activation in the latently-infected monocytic U1 cell line

To evaluate the biological relevance of our findings, we performed ChIP assays using a model cell line for postintegration latency, the monocytic HIV-infected U1 cell line. ChIP assays were carried out on either mock-treated or PMA-treated cells in order to examine the association of CTIP2, HP1 α and MeK9/H3 with the LTR under two distinct transcriptional states, low or no transcriptional activity in latency/basal conditions and activated transcriptional activity following PMA treatment. Formaldehyde cross-linked chromatin from the mock-treated or PMA-treated cells was used for immunoprecipitation with antibodies directed against CTIP2, HP1 α , or tri-methyl-K9/H3 or with a purified rabbit IgG as negative control. Following reverse of the cross-link, the purified DNA was subjected to PCR analysis using a set of primers flanking either the LTR proximal region or the LTR Nuc-1 region, respectively (Figure 6, PCR1 and PCR2 panels). Figure 6 also shows amplification of the input DNAs. Analysis of PCR products from immunoprecipitated DNA showed a significant enrichment of the viral proximal LTR when immunoprecipitation was carried out with the anti-CTIP2 or the anti-HP1 α antibody (Figure 6 lanes α -CTIP2 column 1 and α -HP1 α , columns 1 and 3). In contrast, no such enrichment was observed following immunoprecipitation of the cross-linked chromatin with purified rabbit IgG (Figure 6 lane Ab control). Remarkably, treatment of cells with PMA resulted in a decreased level of both CTIP2 and HP1 α recruited to the LTR proximal region compared with the samples in the absence of PMA (Figure 6 lane α -CTIP2 column 2 and α -HP1 α , column 2 and 4). Furthermore, our ChIP assays indicated that CTIP2 recruitment to the promoter proximal region was accompanied by K9/H3 histone methylation in the adjacent Nuc-1 region (Figure 6 lane α -MeK9/H3 column 3) and that the degree of methylation decreased in response to transcriptional activation by PMA (Figure 6 lane α -MeK9/H3 column 4). Immunoprecipitations with all the antibodies did not enrich eluates with DNA from the GAPDH gene promoter region in U1 cell chromatin, demonstrating the specificity of the recruitments described above for the proximal promoter region and Nuc-1 regions (data not shown).

These results demonstrate the presence of CTIP2 and HP1 α at the HIV-1 promoter proximal region in the context of integrated HIV-1 proviruses in vivo. Transcriptional activation of the HIV-1 promoter by PMA is accompanied by a decreased recruitment of CTIP2 and HP1 α to the same region. Moreover, in U1 cells, CTIP2 favored increased K9/H3 methylation of the histones associated with the adjacent Nuc-1 region. These data support the notion that CTIP2 plays an important role in HIV-1 transcriptional repression by dictating a repressive chromatin structure in the viral LTR.

DISCUSSION

Microglial cells, the CNS resident macrophages, are the main HIV-1 target cells in the brain. Protected by the blood brain barrier, microglial cells constitute a major viral reservoir insensitive to HAART. Moreover, only limited studies focused on HIV-1 gene transcriptional regulation in these potential cellular sanctuary. In a recent study, we reported that the nuclear cofactor CTIP2 inhibits HIV-1 replication in microglial cells by impacting on HIV-1 gene transcription via two different mechanisms. First CTIP2 represses the initial phase of HIV-1 transcription via a direct association with the LTR-bound transcription factor Sp1. This physical interaction induces CTIP2-mediated HP1 α recruitment to the LTR region and viral gene silencing (Marban et al., 2005). Second, CTIP2 also represses the late phase of HIV-1 gene transcription which mainly depends on the viral transactivator Tat. Via HP1 α , CTIP2 relocates the Tat protein to transcriptionally inactive regions of chromatin (Rohr et al., 2003). By forcing a local heterochromatic environment at the viral promoter, CTIP2 inhibits HIV-1 replication in human microglial cells, the main HIV-1 target and reservoir cells of the central nervous system.

Here we address the intimate molecular mechanisms whereby CTIP2 promotes a local heterochromatic environment to repress HIV-1 gene transcription in microglial cells. Biochemical analysis revealed that CTIP2 associates with a TSA-sensitive HDAC activity. Co-immunoprecipitation experiments demonstrate that this activity was mainly composed of class I members HDAC1 and HDAC2. HDAC1 and HDAC2 are often found in association as illustrated for the HDAC complexes identified to date (for review (Ahringer, 2000)). Interestingly, no component of known HDAC1/2 complexes could be detected in association with CTIP2. This suggest that CTIP2 could interact directly with HDAC1/2 or as part of new HDAC1/2 containing complex. Biochemical purification and complete identification of CTIP2-associated proteins should allow to discriminate between both hypotheses. A previous study has reported that CTIP2 physically and functionally interacted with SirT1, a human class III TSA-insensitive HDAC (Senawong et al., 2003). However, enzymatic assays or Western blot analysis did not allow us to detect class III members in association with CTIP2 (data not shown).

Expression of truncated forms of CTIP2 and the analysis of associated HDAC activity revealed that interaction with HDAC enzymes was mediated by the N-terminus of CTIP2 (aa 1-145). In previous studies, we reported that the central domain of CTIP2 (aa 145-434) was involved in interactions with the cellular Sp1, COUP-TF and the viral Tat proteins while its C-terminus (aa 717-813) associated with HP1 α (Marban et al., 2005; Rohr et al., 2003). CTIP2 does not directly bind to DNA but is recruited to the HIV-1 promoter via its association with Sp1. Therefore, association of HDACs with the N-terminal region of CTIP2 is fully compatible with the recruitment of their activity to the HIV-1 promoter. Chromatin immunoprecipitation experiments confirmed the recruitment of HDAC1 and

HDAC2 to the viral promoter. Interestingly a small amount of HDAC1 and HDAC2 is associated with the viral promoter in the absence of CTIP2 overexpression. These associations may be the result of other HDAC recruiting factors such as Sp3 that has been shown to associate with HDAC1 and HDAC2 (He et al., 2005). Moreover CTIP2-mediated recruitment of HDAC1/2 to the viral promoter was correlated with local deacetylation of H3. These observations indicate that HDAC1 and HDAC2 interact with CTIP2 anchored to the HIV-1 LTR and suggested that HDAC enzymes collaborate with CTIP2 for HIV-1 gene silencing. As shown, both HDAC enzymes synergistically cooperate with CTIP2 to repress HIV-1 replication. Thereby, CTIP2 knock-down synergizes with HDACs knock-down to stimulate HIV-1 replication. These results confirm the biological relevance of the association between CTIP2 and HDACs that we unravel in this study. In addition, they imply that both HDAC1 and HDAC2 are necessary for CTIP2 repressive function and contribute to the establishment of a repressive state of HIV-1 gene transcription in microglial cells.

In contrast to Histone Acetyl Transferases (HAT), there have been few articles to report HDAC recruitment to the HIV-1 promoter. The HIV-1 transcriptional repressors YY1 and LSF have been shown to recruit HDAC1 (Coull et al., 2000). Blocking LSF-mediated recruitment of HDAC1 to the HIV-1 promoter produced a rebound of HIV-1 replication in resting CD4+ T-cells from HIV-infected patients whose viremia had been suppressed by therapy (Ylisastigui et al., 2004b). Very recently, NF- κ B p50 has been shown to promote HIV-1 latency through HDAC recruitment (Williams et al., 2006). These results are in favor of a role for TSA-sensitive HDACs in the establishment of persistent and quiescent reservoir of HIV-1 infection. Thus, understanding HDAC recruitment to HIV-1 promoter is crucial for developing strategies to purge the quiescent reservoir and eradicate the virus.

We previously reported that CTIP2 recruited HP1 α to the HIV-1 promoter. In heterochromatic environment, HP1 α specifically interacts with the methylated forms of the histone H3 lysine 9 (Bannister et al., 2001). Since CTIP2-mediated recruitment of HDAC1 and HDAC2 induced K9/H3 deacetylation, we further investigated the ability of CTIP2 to associate with histone methyltransferase activity. CoIP experiments revealed that CTIP2 associates with the histone methyltransferase SUV39H1. Moreover, ChIP experiments confirmed CTIP2-mediated recruitment of SUV39H1 to the viral LTR and the concomitant methylation of K9/H3 to the HIV-1 Nuc-1 binding region. In eukaryotic cells, lysine 9 of histone H3 is specifically methylated by SUV39H1 (Rea et al., 2000) creating a binding site for the chromodomain of HP1 (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Targeting HP1 to chromatin also requires direct physical interaction with SUV39H1 (Stewart et al., 2005). Here we reveal that CTIP2 can recruit both SUV39H1 and HP1 to the viral promoter. Interestingly, SUV39H1 has been shown to associate with many other proteins, including histone deacetylases. HDAC1, -2 and -3 were shown to associate with SUV39H1 suggesting that transcriptional repression by SUV39H1 could be the consequence of HDAC recruitment (Vaute et al., 2002). Moreover, methylation of K9/H3 can suppress transcription independently of HP1 through a mechanism involving histone deacetylation (Stewart et al., 2005). Altogether, HDAC1, HDAC2,

SUV39H1 and HP1 proteins are deeply involved in the formation of heterochromatic environments and gene silencing. Moreover, in the context of latently infected cells, transcriptional activation of the HIV-1 promoter is accompanied by a decreased recruitment of CTIP2, HP1 α and K9/H3 methylation to the same region. This confirms the notion that CTIP2 plays an important role in HIV-1 transcriptional repression by dictating a repressive chromatin structure in the viral LTR..

As illustrated in Figure 9, the present work strongly suggests the concomitant recruitment of HDAC1, HDAC2 and SUV39H1 enzymes to the viral promoter by CTIP2. The ordered histone modifications would allow HP1 binding, heterochromatin formation and HIV-1 silencing. As such, it suggests a possible involvement of transcriptional repressors such as CTIP2 in the establishment of viral persistence and postintegration latency in the brain.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids :

Most of the constructs used in our assays have been described previously : pcDNA3, GST-CTIP2 and full-length construct pFLAG-CTIP2 1-813 (Avram et al., 2000); pNL4-3 and deletions constructs pFLAG-CTIP2 (Rohr et al., 2003); pRFP-CTIP2 (Marban et al., 2005); pcDNA3-HDAC1, pcDNA3-HDAC2 and pcDNA3-HDAC3 expression vectors (Fischle et al., 1999). Several plasmids were kindly provided by the following investigators : pGFP-HDAC1 and pGFP-HDAC2 by E. Seto (Yang et al., 2002), pshRNA-HDAC1 and pshRNA-HDAC2 by M.A. Lazar (Ishizuka and Lazar, 2003) and pMyc-SUV39H1, pGFP-SUV39H1 and pGST-SUV39H1 by T. Jenuwein (Schotta et al., 2004). The episomal LTR-LUC vector was constructed by cloning the luciferase gene under the control of the HIV-1 LTR into a modified pREP10 episomal vector. pshRNA-CTIP2 was constructed by inserting the sequence directed against CTIP2 in the pSuper plasmid as recommended by the manufacturer.

Cell culture :

The human microglial cell line (provided by M. Tardieu, Paris, France) (Janabi et al., 1995), the TZM-bl (Derdeyn et al., 2000; Wei et al., 2002), the U1 and the HEK 293T cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum and 100U/mL penicillin-streptomycin.

GST pull-down assays :

Production of GST fusion proteins was described previously (Rohr et al., 1997). The ³⁵S-labelled HDAC1, HDAC2 and HDAC3 proteins were prepared by in vitro transcription-translation using the TNT® T7 Coupled Wheat Germ Extract System (Promega). GST pull-down assays were performed essentially as previously described (Rohr et al., 2003).

Coimmunoprecipitation Assays :

HEK 293T cells cultured in 100 mm-diameter dishes were transfected using the calcium phosphate coprecipitation method with the indicated pFLAG -CTIP2, pFLAG -CTIP2 deletion constructs (30µg) or pcDNA3 (30µg) vectors. Two days post-transfection, cells were washed twice with cold PBS, harvested and lysed in IPLS buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 10% glycerol) in the presence of a protease inhibitor mixture (Roche). Lysates were immunoprecipitated by incubation with the M2 anti-FLAG (Sigma) or the anti-SUV39H1 (Santa Cruz) antibodies overnight at 4 °C. Immune complexes were recovered by adding 60 µl of Protein A/G Plus-Agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) for 4 hours at 4 °C and washing three times with IPLS buffer, three times with IPHS buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5M NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5%

Nonidet P-40, 10% glycerol) and twice with IPLS buffer. Finally, the immunoprecipitated complexes were processed for SDS-PAGE and Western blot analysis or histone deacetylase assays.

Histone deacetylase assays :

The immunoprecipitated complexes were washed twice with HDAC buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl, 10% glycerol). For inhibition studies, they were preincubated with trichostatin A (450 nM) in HDAC buffer for 45 min at 4 °C. Beads were resuspended in 30 μ l of histone deacetylase buffer containing 20000 cpm of an acetylated H4 peptide. Histone deacetylase activity was determined after incubation for 2 h at 37 °C. The reaction was stopped by adding 0.04M acetic acid and 250mM HCl. The mixture was extracted with ethyl acetate and the released [³H]acetic acid was quantified by scintillation counting.

SDS-PAGE and Western blot analysis :

SDS-PAGE were performed using standard techniques. Proteins were detected using antibodies directed against the FLAG epitope (M2 mouse monoclonal from Sigma), HDAC1, HDAC2 and HDAC3 proteins (Santa Cruz). Proteins were visualized by chemiluminescence using the Super Signal Chemiluminescence Detection System (Pierce).

Luciferase assays

TZM-bl cells cultured in 48-well plates were transfected with the indicated pcDNA3, pFLAG-CTIP2, pcDNA3-HDAC1, pcDNA3-HDAC2, pMyc-SUV39H1 and pshRNA-CTIP2 vectors using the calcium phosphate coprecipitation method with. Two days later, cells were collected and luciferase activity was determined using the Dual-GloTM Luciferase Assay System (Promega).

Viral replication

Microglial cells cultured in 12-well plates were transfected using the calcium phosphate coprecipitation method with HIV-1 pNL4-3, pFLAG-CTIP2, pcDNA3-HDAC1, pcDNA3-HDAC2, pMyc-SUV39H1, pshRNA-CTIP2, pshRNA-HDAC1 or pshRNA-HDAC2 plasmids as indicated. Total amounts of DNA were normalized with the corresponding empty vector. HIV-1 replication was monitored as described previously (Rohr et al., 2003).

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assays :

HEK 293T cells cultured in 100 mm-diameter dishes were transfected using the calcium phosphate coprecipitation method with the indicated pcDNA3, episomal pLTR-LUC and/or pFLAG-CTIP2 (30 μ g) vectors. ChIP assays were performed using the Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit (Upstate) 48h post-transfection. U1 cells were mock-treated (-) or treated (+) with PMA (100 nM)

for 1h before ChIP assays. The primary antibodies used for the chromatin immunoprecipitation were : M2 anti-FLAG (Sigma), anti-HDAC1, anti-HDAC2, anti-Ac/H3, anti-triMeK9/H3, anti-HP1 α (Upstate) and anti-SUV39H1 (Abcam). DNA was subjected to PCR amplification and the resulting PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Three separate experiments were performed. Two LTR-HIV-1 regions were selected for amplification (PCR1 and PCR2) as well as the human constitutively expressed cellular gene for glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GAPDH) (PCR3). For PCR1, we used a 5' primer 5'-GATAAGGTAGAAGAGGCC-3' corresponding to the LTR sequence located 293 nucleotides downstream of the transcriptional start site and a 3' primer 5'-CTAACCAGAGAGACCCAGTAC-3' corresponding to a region just upstream of the transcriptional start site. The 5' primer 5'-CAGCTGCTTTTGCCTGTACTG-3' and the 3' primer 5'-TCCCACTGACTAAAAGGGTCTGA-3' were designed to amplify the nuc-1 binding region (PCR2). The GAPDH primers used as control amplifications in PCR3 were : 5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3' (5' primer) and 5'-GGTGTCGCTGTTGAAGTCA GAG-3' (3'primer).

Acknowledgments

We thank T. Jenuwein for providing SUV39H1 expression vectors, E. Seto for providing GFP-HDAC1 and GFP-HDAC2 vectors and M.A. Lazar for providing pshRNA vectors directed against HDAC1 and HDAC2. We also thank C. Moog, V. Holl and the "plateforme d'imagerie in vitro" for their technical support.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), by grants from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) to OR and from the French Ministry of Research ("ACI JC 5364" to OR and doctoral grant to SS) and by a doctoral INSERM / Conseil Régional d'Alsace grant to C.M. FD is "chercheur qualifié" at the FNRS and OR is "Professor" at the "IUT Louis Pasteur de Schiltigheim" (University of Strasbourg I, France).

The work in CVL's laboratory was supported by grants from the "Fonds National de la Recherche Scientifique" (FNRS, Belgium), the Télévie-Program of the FNRS, the "Action de Recherche concertée du Ministère de la Communauté Française" (ULB, ARC program no. 04/09-309), the Internationale Brachet Stiftung (I.B.S.), the Région Wallonne-Commission Européenne FEDER (Intergenes Project, Interreg III program), the Theyskens-Mineur Foundation, and the "Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS, France)". C.V.L. is Maître de Recherches of the FNRS. S.dW. is supported by a post-doctoral fellowship from the "Région Wallonne" (Program WALEO 021/5347).

REFERENCES

- Ahringer, J. (2000). NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet* *16*, 351-356.
- Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., and Macklis, J. D. (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* *45*, 207-221.
- Avram, D., Fields, A., Pretty On Top, K., Nevriy, D. J., Ishmael, J. E., and Leid, M. (2000). Isolation of a novel family of C(2)H(2) zinc finger proteins implicated in transcriptional repression mediated by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) orphan nuclear receptors. *J Biol Chem* *275*, 10315-10322.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* *410*, 120-124.
- Barber, S. A., Gama, L., Dudaronek, J. M., Voelker, T., Tarwater, P. M., and Clements, J. E. (2006). Mechanism for the Establishment of Transcriptional HIV Latency in the Brain in a Simian Immunodeficiency Virus-Macaque Model. *J Infect Dis* *193*, 963-970.
- Chen, W. Y., Bailey, E. C., McCune, S. L., Dong, J. Y., and Townes, T. M. (1997). Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 5798-5803.
- Coull, J. J., Romerio, F., Sun, J. M., Volker, J. L., Galvin, K. M., Davie, J. R., Shi, Y., Hansen, U., and Margolis, D. M. (2000). The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. *J Virol* *74*, 6790-6799.
- Demonte, D., Quivy, V., Colette, Y., and Van Lint, C. (2004). Administration of HDAC inhibitors to reactivate HIV-1 expression in latent cellular reservoirs: implications for the development of therapeutic strategies. *Biochem Pharmacol* *68*, 1231-1238.
- Derdeyn, C. A., Decker, J. M., Sfakianos, J. N., Wu, X., O'Brien, W. A., Ratner, L., Kappes, J. C., Shaw, G. M., and Hunter, E. (2000). Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J Virol* *74*, 8358-8367.
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L. M., Buck, C., Chaisson, R. E., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., *et al.* (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* *278*, 1295-1300.
- Fischle, W., Emiliani, S., Hendzel, M. J., Nagase, T., Nomura, N., Voelter, W., and Verdin, E. (1999). A new family of human histone deacetylases related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p. *J Biol Chem* *274*, 11713-11720.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 172-183.
- Gray, S. G., and Ekstrom, T. J. (2001). The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* *262*, 75-83.
- 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*, 673-680.
- He, S., Sun, J. M., Li, L., and Davie, J. R. (2005). Differential intranuclear organization of transcription factors sp1 and sp3. *Mol Biol Cell* *16*, 4073-4083.
- Ishizuka, T., and Lazar, M. A. (2003). The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol* *23*, 5122-5131.
- Janabi, N., Peudenier, S., Heron, B., Ng, K. H., and Tardieu, M. (1995). Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. *Neurosci Lett* *195*, 105-108.
- Jordan, A., Bisgrove, D., and Verdin, E. (2003). HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *Embo J* *22*, 1868-1877.
- Jordan, A., Defechereux, P., and Verdin, E. (2001). The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *Embo J* *20*, 1726-1738.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* *410*, 116-120.

Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., and Sternglanz, R. (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 5807-5811.

Leid, M., Ishmael, J. E., Avram, D., Shepherd, D., Fraulob, V., and Dolle, P. (2004). CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns* *4*, 733-739.

Marban, C., Redel, L., Suzanne, S., Van Lint, C., Lecestre, D., Chasserot-Golaz, S., Leid, M., Aunis, D., Schaeffer, E., and Rohr, O. (2005). COUP-TF interacting protein 2 represses the initial phase of HIV-1 gene transcription in human microglial cells. *Nucleic Acids Res* *33*, 2318-2331.

Marcello, A. (2006). Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology* *3*, 7.

Margueron, R., Trojer, P., and Reinberg, D. (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* *15*, 163-176.

Marzio, G., and Giacca, M. (1999). Chromatin control of HIV-1 gene expression. *Genetica* *106*, 125-130.

Peterson, C. L., and Laniel, M. A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol* *14*, R546-551.

Pierson, T., McArthur, J., and Siliciano, R. F. (2000). Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol* *18*, 665-708.

Quivy, V., Adam, E., Collette, Y., Demonte, D., Chariot, A., Vanhulle, C., Berkhout, B., Castellano, R., de Launoit, Y., Burny, A., *et al.* (2002). Synergistic activation of human immunodeficiency virus type 1 promoter activity by NF-kappaB and inhibitors of deacetylases: potential perspectives for the development of therapeutic strategies. *J Virol* *76*, 11091-11103.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., and Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* *406*, 593-599.

Rohr, O., Aunis, D., and Schaeffer, E. (1997). COUP-TF and Sp1 interact and cooperate in the transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in human microglial cells. *J Biol Chem* *272*, 31149-31155.

Rohr, O., Lecestre, D., Chasserot-Golaz, S., Marban, C., Avram, D., Aunis, D., Leid, M., and Schaeffer, E. (2003). Recruitment of Tat to heterochromatin protein HP1 via interaction with CTIP2 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in microglial cells. *J Virol* *77*, 5415-5427.

Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* *18*, 1251-1262.

Senawong, T., Peterson, V. J., Avram, D., Shepherd, D. M., Frye, R. A., Minucci, S., and Leid, M. (2003). Involvement of the histone deacetylase SIRT1 in chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)-interacting protein 2-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem* *278*, 43041-43050.

Stewart, M. D., Li, J., and Wong, J. (2005). Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol* *25*, 2525-2538.

Van Lint, C. (2000). Role of chromatin in HIV-1 transcriptional regulation. *Adv Pharmacol* *48*, 121-160.

Van Lint, C., Emiliani, S., Ott, M., and Verdin, E. (1996). Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *Embo J* *15*, 1112-1120.

Vaute, O., Nicolas, E., Vandel, L., and Trouche, D. (2002). Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Res* *30*, 475-481.

Verdin, E., Paras, P., Jr., and Van Lint, C. (1993). Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *Embo J* *12*, 3249-3259.

Wakabayashi, Y., Watanabe, H., Inoue, J., Takeda, N., Sakata, J., Mishima, Y., Hitomi, J., Yamamoto, T., Utsuyama, M., Niwa, O., *et al.* (2003). Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. *Nat Immunol* *4*, 533-539.

- Wei, X., Decker, J. M., Liu, H., Zhang, Z., Arani, R. B., Kilby, J. M., Saag, M. S., Wu, X., Shaw, G. M., and Kappes, J. C. (2002). Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* *46*, 1896-1905.
- Williams, S. A., Chen, L. F., Kwon, H., Ruiz-Jarabo, C. M., Verdin, E., and Greene, W. C. (2006). NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *Embo J* *25*, 139-149.
- Workman, J. L., and Kingston, R. E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* *67*, 545-579.
- Yang, W. M., Tsai, S. C., Wen, Y. D., Fejer, G., and Seto, E. (2002). Functional domains of histone deacetylase-3. *J Biol Chem* *277*, 9447-9454.
- Ylisastigui, L., Archin, N. M., Lehrman, G., Bosch, R. J., and Margolis, D. M. (2004a). Coaxing HIV-1 from resting CD4 T cells: histone deacetylase inhibition allows latent viral expression. *Aids* *18*, 1101-1108.
- Ylisastigui, L., Coull, J. J., Rucker, V. C., Melander, C., Bosch, R. J., Brodie, S. J., Corey, L., Sodora, D. L., Dervan, P. B., and Margolis, D. M. (2004b). Polyamides reveal a role for repression in latency within resting T cells of HIV-infected donors. *J Infect Dis* *190*, 1429-1437.

FIGURES LEGENDS

Figure 1 : TSA-sensitive HDAC-1 and -2 interact with CTIP2

(A and B) HEK 293T cells were transfected with the indicated pFLAG-CTIP2 expression vector and the empty vector as control. Immunoprecipitated complexes were tested for HDAC activities (A) and for the presence of HDAC1, HDAC2 and HDAC3 by Western blot (B).

(C) GST pull-down assays were performed with ³⁵S-labelled HDAC1 or HDAC2 incubated with GST (column 2) or GST-CTIP2 fusion proteins (column 3). Approximately 10% of the total ³⁵S-labelled proteins obtained was loaded as input control (column 1).

Figure 2 : CTIP2 associates with HDAC1 and HDAC2 via its N-Terminal domain

(A and B) HEK 293T cells were transfected with the indicated pFLAG-CTIP2 constructs and the empty vector as control. Cells extracts were normalised for the quantities of overexpressed FLAG-CTIP2 proteins and endogenous HDAC1 and HDAC2. Immunoprecipitated complexes were tested for HDAC activities (A) and for the presence of HDAC1, HDAC2 and FLAG-CTIP2 proteins by Western blot (B). (B) Input controls for HDAC1, HDAC2 (columns 1 to 5) and FLAG-CTIP2 constructs expression (α -FLAG panel) are presented. A schematic CTIP2 linear structure is also drawn for a better visualisation of CTIP2 domains.

Figure 3 : HDAC1 and HDAC2 cooperate with CTIP2 to repress HIV-1 gene transcription and viral replication.

(A) TZM-bl cells were transfected with the pFLAG-CTIP2 expression vector and/or increasing amounts of pcDNA3-HDAC1 or pcDNA3-HDAC2 plasmids. Two days post-transfection, LUC activities were measured and expressed relative to the value obtained with the empty vector. (B) Microglial cells were transfected with pNL4-3, pFLAG-CTIP2 and increasing amount of pcDNA3-HDAC1 or pcDNA3-HDAC2. Two days post-transfection, culture supernatants were analysed for p24 Gag contents and expressed relative to value obtained with the pNL4-3 alone taken as 1 (this value varied between 150 and 350 pg/ml). (C) Microglial cells were transfected with pNL4-3 and increasing amount of pshRNA-CTIP2 in the presence or not of pshRNA-HDAC1 or pshRNA-HDAC2. DNA quantities were normalized with the control empty vector. Culture supernatants were analysed for p24 Gag contents 48h post-transfection. Values correspond to an average of at least three independent experiments done in duplicate. Knock-down efficiency of the shRNA constructions were controlled by western-blot (Supplement Figure 2)

Figure 4 : Association of CTIP2 with the HIV-1 proximal promoter induces local H3 deacetylation with concomitant recruitment of HDAC1 and HDAC2

ChIP experiments were performed on HEK 293T cells transfected with the HIV-1 LTR-LUC episomal vector and/or the FLAG-CTIP2 expression vector as indicated. Input columns correspond to positive controls conducted with a fraction of the lysates used for the immunoprecipitation. Control correspond to immunoprecipitation reactions performed without antibodies. Anti-FLAG, anti-HDAC1, anti-HDAC2 and anti-Ac/H3 lines represent amplification reactions from samples immunoprecipitated with the indicated antibodies. Results are representative of three independent experiments.

Figure 5 : CTIP2 associates with Histone Methyl transferase SUV39H1 via its central domain allowing its targeting to the viral LTR, K9/H3 methylation and HP1 α recruitment.

(A) HEK 293T cells were transfected with the indicated pFLAG-CTIP2 constructs. Cell extracts were normalised for the quantities of overexpressed FLAG-CTIP2 proteins and endogenous SUV39H1. Complexes immunoprecipitated with the anti-SUV39H1 antibodies or the control Non Immune Serum were immunodetected for the presence of the FLAG-CTIP2 proteins by Western blot. (B) GST pull-down assays were performed with ³⁵S-labelled CTIP2 protein incubated with GST (column 2) or GST-SUV39H1 fusion proteins (column 3). Approximately 10% of the total ³⁵S-labelled proteins obtained was loaded as input control (column 1). (B) TZM-bl cells were transfected with the pFLAG-CTIP2 and the pMyc-SUV39H1 expression vectors as indicated. Two days posttransfection, LUC activities were measured and expressed relative to the value obtained with the empty vector. (D) Microglial cells were transfected with pNL4-3, pFLAG-CTIP2 and pMyc-SUV39H1 as indicated. Two days post-transfection, culture supernatants were analysed for p24 Gag contents and expressed relative to value obtained with the pNL4-3 alone taken as 1 (this value varied between 150 and 350 pg/ml). (E) ChIP experiments were performed on HEK 293T cells transfected with the HIV-1 LTR-LUC episomal vector and/or the Flag-CTIP2 expression vector as indicated. Input columns correspond to positive controls conducted with a fraction of the lysates used for the immunoprecipitation. Ab control correspond to immunoprecipitation reactions performed without antibodies. Anti-FLAG, anti-tri-MeK9/H3, anti-SUV39H1 and anti-HP1 α lines represent amplification reactions from samples immunoprecipitated with the indicated antibodies. Results are representative of three independent experiments.

Figure 6 : Transcriptional HIV-1 activation is accompanied by a decreased recruitment of CTIP2 and HP1 α to the viral proximal promoter in vivo in the chromosomal context of integrated proviruses. ChIP assays were used to detect association of CTIP2, HP1 α or methylated K9/H3 with the promoter proximal region (PCR1) or the Nuc-1 binding region (PCR2) respectively. U1 cells were mock-treated (-) or treated (+) with PMA (100 nM) for 1h. DNA and proteins were

cross-linked with formaldehyde for 10 min. and DNA was sheared. The cross-linked protein/DNA complexes were immunoprecipitated with an anti-CTIP2, anti-HP1 α or anti-tri-Methyl-K9/H3 antibody or with a purified rabbit IgG as negative control. The protein/DNA cross-links were reversed and the purified DNA was amplified by PCR using primers amplifying the promoter proximal region or the Nuc-1 binding region.

Figure 7 : Model for CTIP2-mediated establishment of heterochromatin environment to HIV-1 gene promoter and viral silencing.

CTIP2 first recruits HDAC1 and HDAC2 enzymes to deacetylate H3 histones located at the viral promoter and particularly Nuc-1 H3 histones. After H3 deacetylation, CTIP2 recruits SUV39H1 to methylate Nuc-1 histone H3 lysine 9. This last H3 modification allows HP1 binding and polymerisation, heterochromatin formation and HIV-1 silencing.

Supplement Figure 1: CTIP2 colocalizes with HDAC1, HDAC2 and SUV39H1 in subnuclear distinct structures

Microglial cells cultured in 24-well plates were transfected using Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) with pRFP-CTIP2, pGFP-HDAC1, pGFP-HDAC2 (S1A) and pGFP-SUV39H1 (S1B) expression vectors. Cells were fixed and permeabilized as previously described (Rohr et al., 2003). The coverslips were then incubated for 10min at room temperature with TOPRO3 (Molecular Probes). The stained cells were analyzed by confocal microscopy using a Zeiss laser scanning microscope (model 510 invert) equipped with a Planapo oil (63X) immersion lens (numerical aperture = 1,4). Quantitative analysis were performed with CLSM instrument software (3.2). The scale bar represents 10 μ m.

Pattern of expression of fluorescent proteins expressed alone are presented on the upper panels. Lower panels present concomitant expression of RFP-CTIP2 and GFP-HDACs (S1A) or RFP-CTIP2 and GFP-SUV39H1 (S1B).

(S1A lower panel) An average of 88.4 +/- 6.3% and 89.6 +/- 6.2% of RFP-CTIP2 proteins colocalize with GFP-HDAC1 (images 12 and 13) and GFP-HDAC2 (images 16 and 17) respectively.

(S1B lower panel) An average of 89.7 +/- 7.14 % of RFP-CTIP2 proteins colocalize with GFP-SUV39H1 (merge and mask images).

Supplement Figure 2 : Control of HDAC1, HDAC2 and CTIP2 knock-down efficiency.

Cell lines expressing HDAC1, HDAC2 and CTIP2 were transfected with shRNAs directed against HDAC1, HDAC2 or CTIP2 (columns 2) and with the control empty vector (columns 1) as described in figure 3. HDAC1, HDAC2, CTIP2 and β actin expression were tested by Western blot 48h post-transfection.

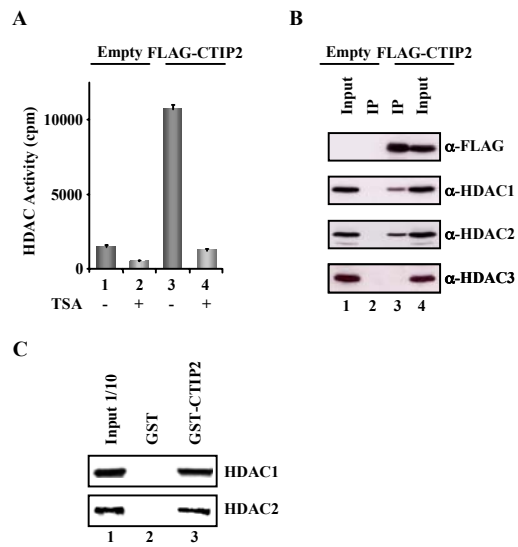
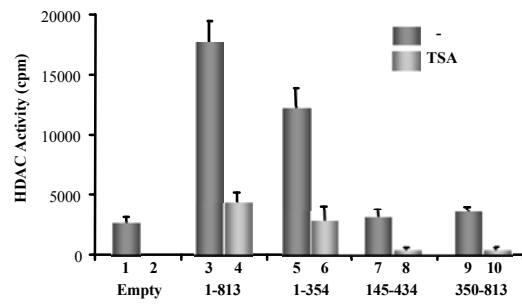


Figure 1

A



B

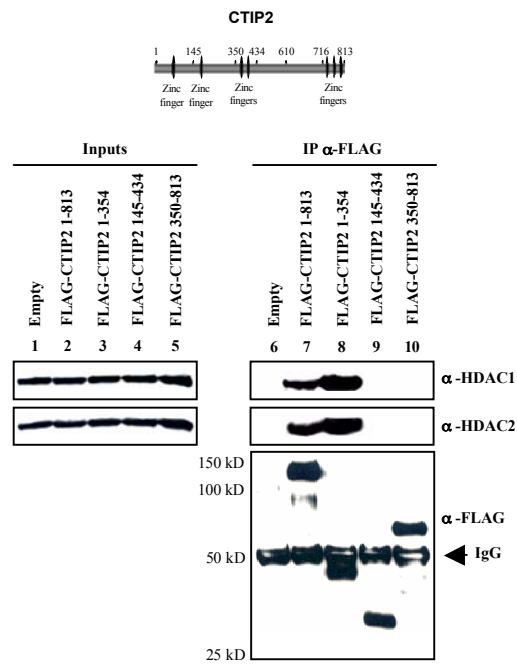


Figure 2

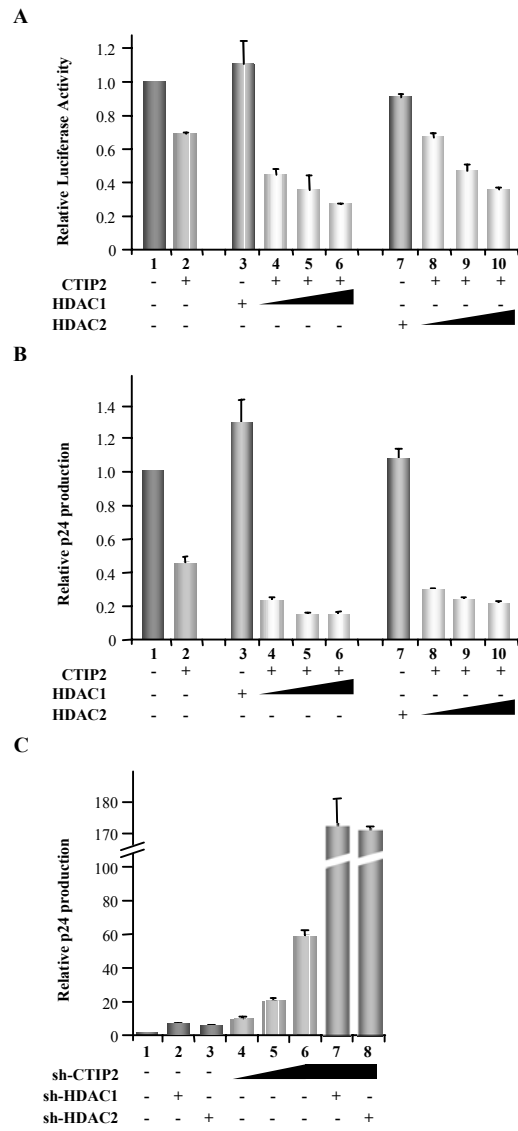


Figure 3

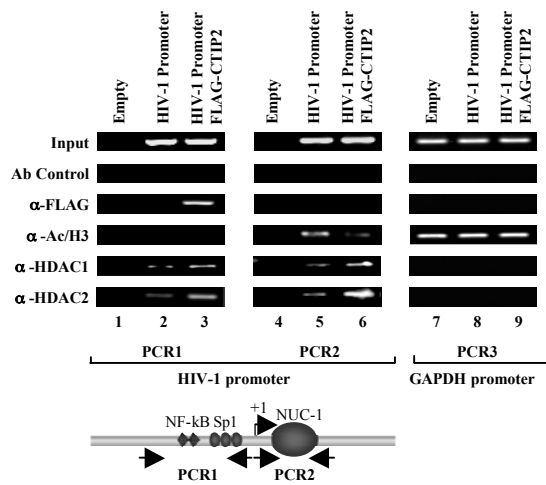


Figure 4

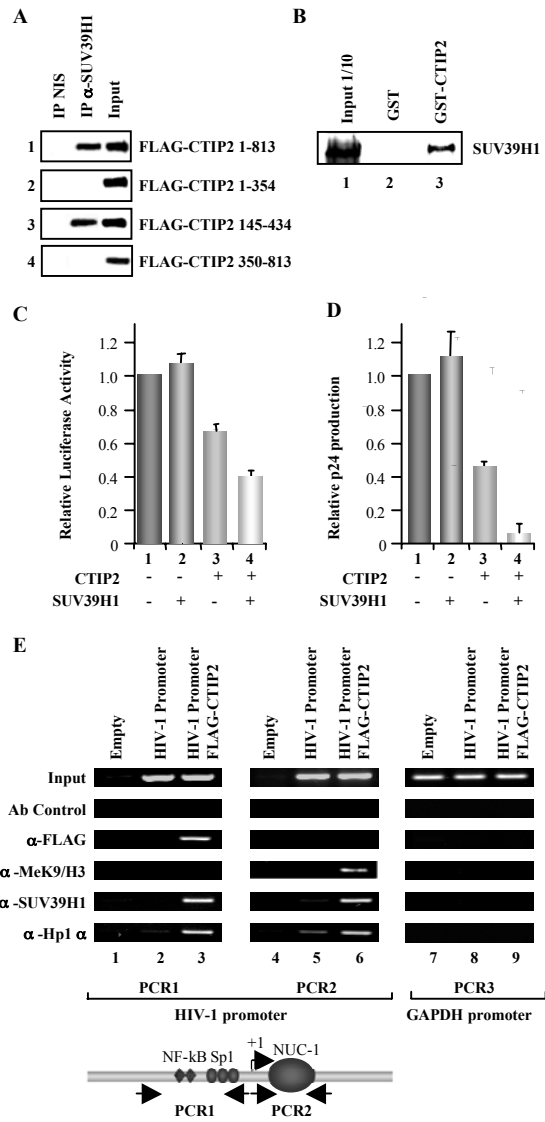


Figure 5

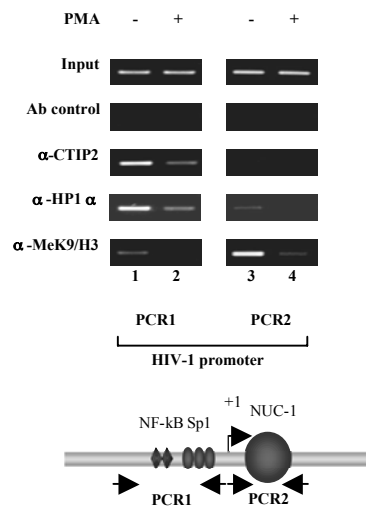


Figure 6

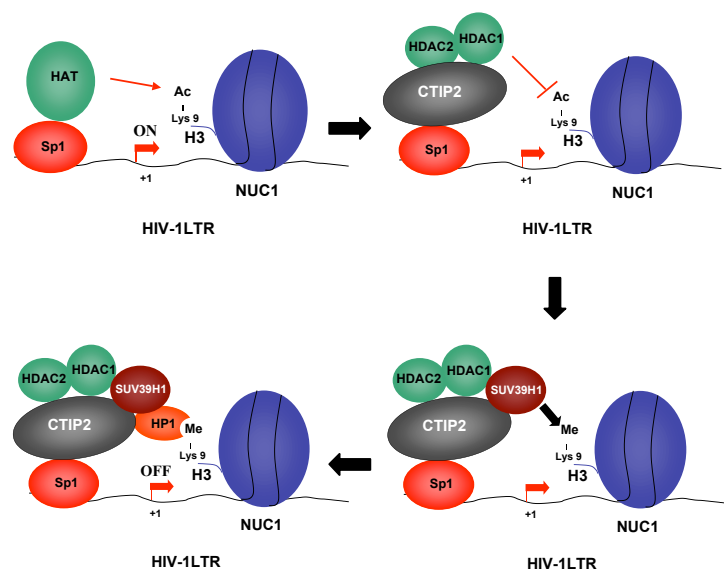


Figure 7

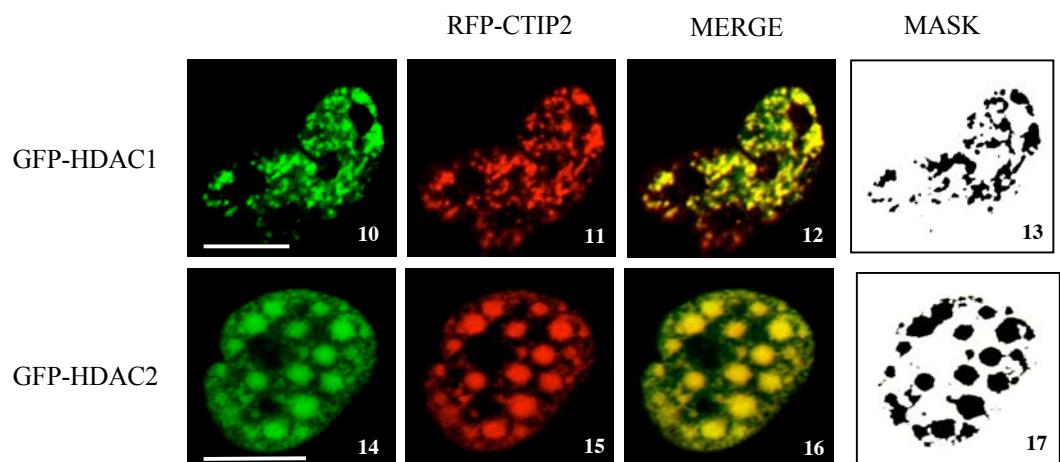
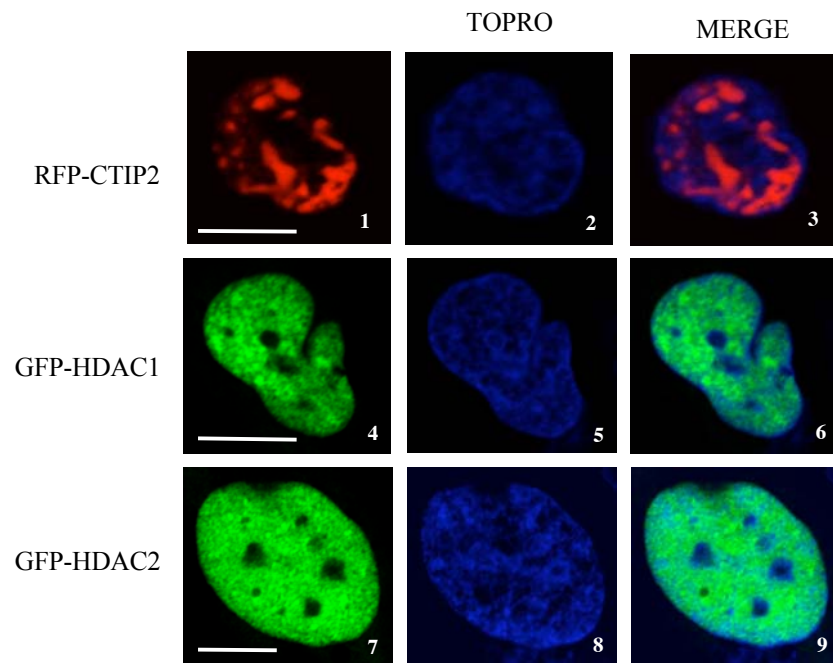


Figure S1

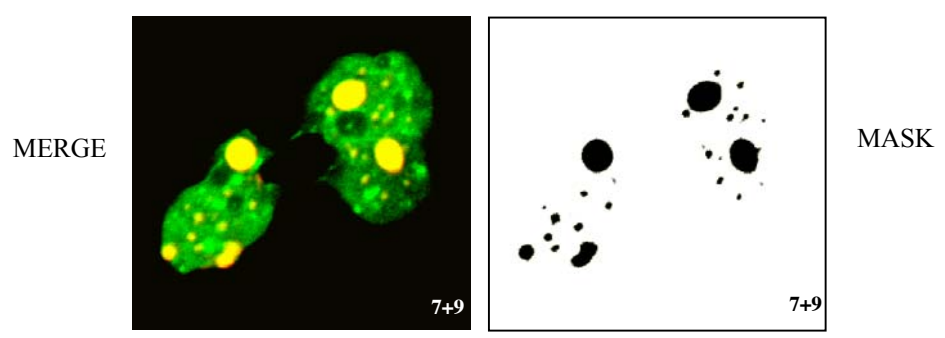
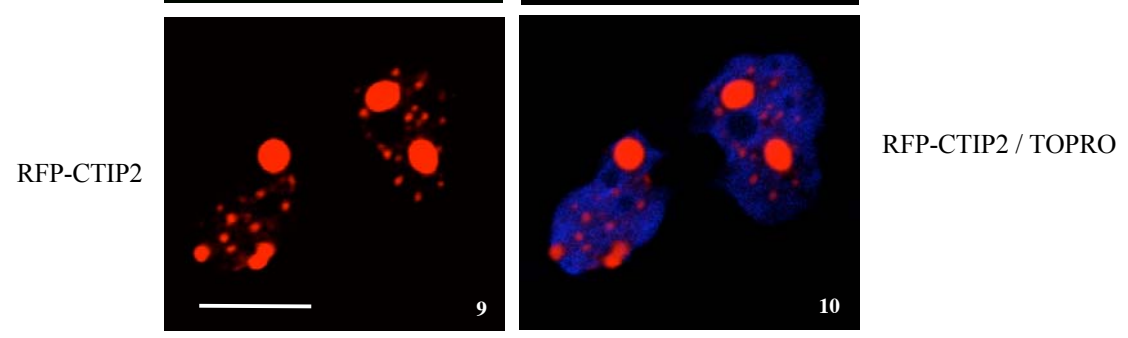
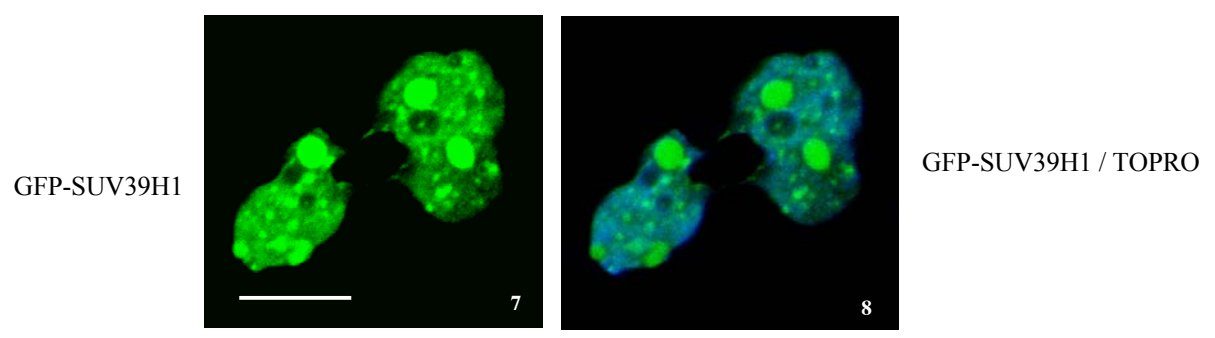
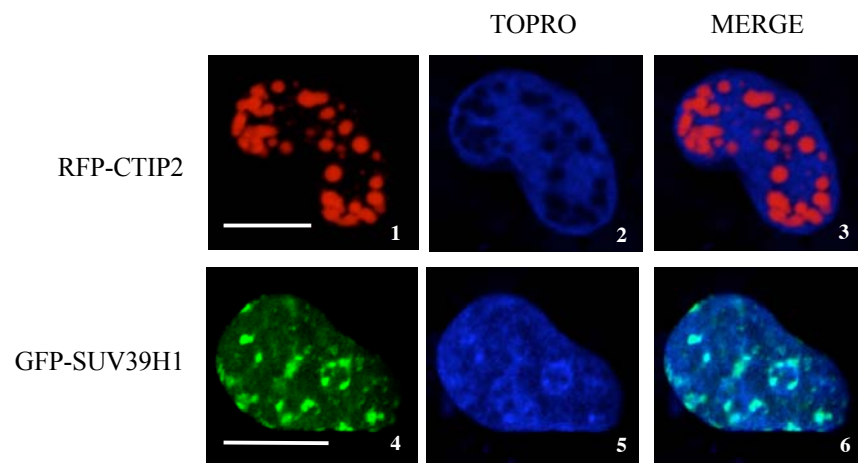


Figure S2

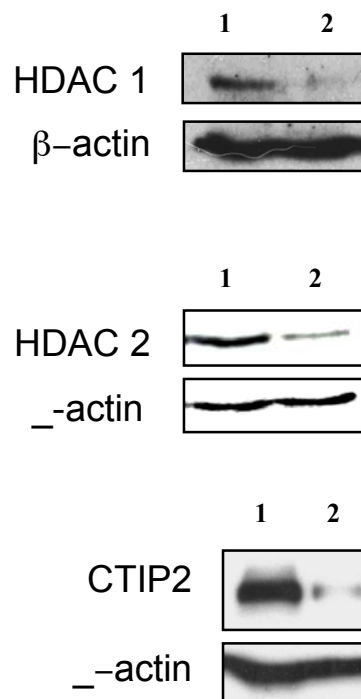


Figure S3

Discussion

Une fois intégré dans le génome de la cellule hôte, le provirus peut rester à l'état latent ou s'exprimer rapidement. La latence post-intégrationnelle peut survenir suite à divers événements comme des mutations dans la structure TAR ou au sein du promoteur viral (De Baar M.P., 2000 ; Jeeninga R.E., 2000). Le site d'intégration semble également jouer un rôle essentiel dans l'établissement de la latence virale. En effet, bien qu'il soit clairement établi que le provirus s'intègre de préférence dans des domaines transcriptionnellement actifs, une faible proportion d'entre-eux s'intègre dans les domaines hétérochromatiniens et contribue ainsi à la formation de réservoirs cellulaires pour le HIV-1 (Scherdin U., 1990).

La trithérapie anti-rétrovirale actuelle retarde la maladie mais ne permet pas d'éradiquer le HIV-1. Ce constat s'explique vraisemblablement par la persistance de réservoirs cellulaires pour le virus. Le développement de nouvelles stratégies anti-rétrovirales destinées à purger ces réservoirs paraît donc incontournable pour vaincre le HIV-1.

Le SNC constitue un véritable sanctuaire pour le virus puisque la barrière hématoencéphalique réduit fortement la biodisponibilité des médicaments anti-rétroviraux et notamment les inhibiteurs de la protéase virale (Dore G.J., 1999).

Les cellules microgliales constituent, avec les macrophages périvasculaires, les seules cellules du SNC à être infectées de manière productive par le HIV-1 (Peudenier S., 1991). Afin de mieux comprendre les mécanismes qui gouvernent la transcription des gènes du HIV-1 dans les cellules microgliales, nous nous sommes intéressées à l'effet de CTIP1 et CTIP2, deux des cofacteurs du facteur de transcription cellulaire COUP-TFI, dans la régulation transcriptionnelle du provirus.

La transcription des gènes du HIV-1 peut être divisée en deux phases : une phase initiale et une phase finale. La phase initiale est caractérisée par l'absence du puissant transactivateur viral Tat. Régulée par de nombreux facteurs cellulaires (facteurs de transcription, enzymes de modifications post-traductionnelles des histones, complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP, ADN méthyltransférases), elle ne permet cependant de générer que très peu de transcrits matures. La phase finale de la transcription des gènes viraux débute avec l'accumulation de Tat dans le noyau. L'action combinée de ces facteurs cellulaires et de Tat va alors contribuer à la génération rapide de nombreux transcrits viraux matures (Berkhout B., 1989).

CTIP2 réprime la transcription des gènes du HIV-1 dans les cellules microgliales Dans le but de déterminer l'effet des protéines CTIP sur la réplication du HIV-1, nous avons réalisé des expériences de dosage de la protéine p24 dans le surnageant de cellules microgliales surexprimant CTIP2 et infectées par le virus. Les résultats obtenus montrent que, malgré une importante identité de séquence, CTIP1 et CTIP2 ne présentent pas le même effet régulateur sur la réplication des gènes viraux. En effet, seul CTIP2 provoque une chute de la réplication du virus. Au vu de ces résultats, nous avons focalisé nos investigations sur le potentiel inhibiteur de CTIP2 sur la réplication virale. **(Publication 1)**

Afin de vérifier si l'effet inhibiteur de CTIP2 sur la réplication du HIV-1 pouvait s'expliquer par un effet sur la transcription, nous avons réalisé des tests transcriptionnels dans des cellules microgliales surexprimant CTIP2. Les résultats obtenus montrent que CTIP2 influence effectivement la transcription des gènes viraux puisqu'il provoque une inhibition drastique de la transcription du provirus en absence de Tat. **(Publication 1)**

De façon intéressante, nos résultats montrent que CTIP2 est également capable d'inhiber la phase finale de la transcription du provirus, c'est-à-dire en présence de Tat. **(Publication 1)**

Ainsi, CTIP2 est un des rares répresseurs de la transcription des gènes du HIV-1 dans les cellules microgliales, tant au niveau de la phase initiale qu'au niveau de la phase finale. En effet, hormis CTIP2, seuls Sp3 (Rohr O., 1997) et C/EBP γ (Schwartz C., 2000) sont connus à ce jour pour leur potentiel inhibiteur sur la transcription des gènes du HIV-1 dans ces cellules.

Au cours de la phase initiale de la transcription des gènes du HIV-1...

...CTIP2 est recruté sur le promoteur proximal du HIV-1...

Des tests transcriptionnels menés à partir de promoteurs viraux tronqués ont démontré que les boîtes GC du HIV-1 sont suffisantes pour maintenir l'activité répressive de CTIP2. **(Publication 2)** Ainsi, le site potentiel de fixation de COUP-TF identifié dans le domaine modulateur du promoteur viral ne semble pas être impliqué dans l'activité inhibitrice de

CTIP2, comme aurait pu le suggérer une étude précédente décrivant la capacité de CTIP1 à réprimer la transcription d'un gène rapporteur gouvernée par un promoteur hétérologue contenant un tel site potentiel de fixation (Avram D., 2000).

Ainsi, la phase initiale de la transcription des gènes du HIV-1 est essentiellement régulée au niveau du promoteur proximal du virus, et plus particulièrement au niveau des boîtes GC. Dans les cellules microgliales, les protéines Sp1, Sp3 et COUP-TF sont capables de se fixer sur ces boîtes GC (Rohr O., 1997). De plus, à ce niveau, l'activité transactivatrice des facteurs de transcription Sp1 et COUP-TF est principalement responsable de l'activation de la transcription des gènes viraux. En effet, COUP-TF ne se lie pas directement aux boîtes GC mais interagit indirectement avec Sp1 pour activer de manière synergique la transcription des gènes du HIV-1 (Rohr O., 1997 ; Sawaya B.E., 1996).

Des expériences de co-immunoprécipitation nous ont permis de montrer que l'activité inhibitrice de CTIP2 au cours de la phase initiale peut justement s'expliquer par une inhibition des activités transactivatrices de Sp1 et COUP-TF. En effet, le domaine 145-434 de CTIP2 est capable d'interagir directement avec Sp1 et COUP-TF au niveau de leurs domaines riches en motifs doigt de zinc, respectivement C-terminaux et N-terminaux, et ainsi perturber leur pouvoir transactivateur. Sp1 et COUP-TF n'entrent pas en compétition pour la fixation sur le domaine 145-434 de CTIP2, suggérant ainsi la formation d'un complexe ternaire entre CTIP2, Sp1 et COUP-TF. **(Publication 2)**

Les protéines CTIP1 et CTIP2 sont capables de se fixer sur l'ADN au niveau de séquences consensus voisines des boîtes GC (Avram D., 2002). Or, d'après nos résultats de retard sur gel, CTIP2 est incapable de se fixer directement sur les boîtes GC du promoteur minimal du HIV-1. **(Publication 2)** CTIP2 n'est donc pas responsable du recrutement du complexe ternaire sur le promoteur viral. En effet, ce sont les protéines Sp1 fixées sur les boîtes GC du promoteur proximal viral qui vont servir d'ancrage à COUP-TF et CTIP2. **(Publication 2)** Ainsi, la fixation de CTIP2 sur la région de Sp1 contenant son domaine de liaison à l'ADN ne semble pas perturber la capacité de Sp1 à se fixer sur les boîtes GC du promoteur viral.

La présence des protéines Sp1 fixées sur des boîtes GC est suffisante pour déclencher l'activité répressive de CTIP2. En effet, CTIP2 est capable de fortement réprimer l'activité transactivatrice de Sp1 sur un promoteur hétérologue ne contenant que trois boîtes GC.

(Publication 2) Ainsi, l'activité répressive de CTIP2 ne semble pas être limitée à la transcription des gènes du HIV-1 mais pourrait également s'appliquer à d'autres gènes cellulaires dont l'expression est régulée par Sp1. En effet, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la pathogenèse de l'infection par le HIV-1 est régulée par des promoteurs contenant des boîtes GC. A titre d'exemple, l'expression de p21, une protéine cellulaire impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 faisant suite à une infection par le HIV-1, est gouvernée par un promoteur contenant quatre boîtes GC (Gartel A.L., 1999). CTIP2 pourrait ainsi également réprimer la réplication virale de manière indirecte, en régulant la transcription de gènes impliqués dans la pathologie induite par le HIV-1.

Les résultats de nos tests transcriptionnels montrent qu'une mutation ou une délétion des boîtes GC provoque une chute de l'activité transcriptionnelle du promoteur viral d'environ 90%, confirmant une nouvelle fois l'importance de ces sites dans l'activation transcriptionnelle des gènes du HIV-1. Cependant, CTIP2 reste tout de même capable d'inhiber les 10% résiduels de l'activité du promoteur viral. Il semblerait donc que les trois boîtes GC du promoteur minimal soient suffisantes mais pas absolument nécessaires à l'activité répressive de CTIP2. **(Publication 2)**

Ainsi, CTIP2 serait capable de réprimer la transcription des gènes du HIV-1 par un autre mécanisme, indépendant de la fixation des protéines Sp1 sur les boîtes GC du promoteur minimal. Ce mécanisme encore inconnu semble cependant être indépendant du promoteur proximal. En effet, d'après nos expériences d'immunoprécipitation chromatinienne (ChIP), une mutation des boîtes GC du promoteur minimal provoque l'abolition du recrutement de CTIP2 sur la région du promoteur située entre les nucléotides -293 et +10. **(Publication 2)**

...pour y induire un environnement hétérochromatinien

L'état chromatinien, et en particulier l'état d'acétylation des histones, joue un rôle essentiel dans la régulation de la transcription génique (Brownell J.E., 1996 ; Grunstein M., 1997). L'acétylation des histones est régulée par l'action conjointe des HAT et des HDAC. Ces enzymes font généralement partie intégrante de grands complexes macromoléculaires recrutés sur les promoteurs par des facteurs ou des cofacteurs transcriptionnels. Ainsi, les facteurs de transcription cellulaires YY1 et LSF sont capables de recruter de manière coopérative

HDAC1 sur le promoteur du HIV-1 pour inhiber la transcription des gènes viraux (Coull J.J., 2000).

A la manière des facteurs répresseurs YY1 et LSF, CTIP2 s'associe à des HDAC pour réprimer la transcription des gènes du HIV-1. **(Publication 3)** En effet, des expériences de dosage de l'activité HDAC associée à CTIP2 nous ont permis de mettre en évidence une association entre CTIP2 et des activités HDAC sensibles à la TSA, un inhibiteur des HDAC de classe I et II. Des expériences complémentaires de co-immunoprécipitation et de microscopie confocale nous ont ensuite permis d'identifier les enzymes de classe I HDAC1 et HDCA2 comme étant responsables de cette activité. Nos résultats lèvent ainsi le doute sur la nature des activités HDAC associées à CTIP2.

Les enzymes HDAC1 et HDAC2 sont souvent associées au sein de grands complexes macromoléculaires comme Sin3, NuRD ou Co-REST et sont recrutées sur les histones par l'intermédiaire des cofacteurs constitutifs de ces complexes (de Ruijter A.J., 2003). Cependant, nos résultats démontrent que le complexe recruté par CTIP2 n'est apparenté à aucun des complexes associés à HDAC1 et HDAC2 décrits dans la littérature (résultats non publiés). Nous n'avons donc pas pu reproduire les résultats publiés récemment et faisant état de l'interaction de CTIP2 avec le complexe enzymatique NuRD (Cismasiu V.B., 2005). Ainsi, CTIP2 pourrait soit interagir directement avec HDAC1 et HDAC2 comme le suggèrent nos expériences d'interaction *in vitro*, ou encore recruter un complexe enzymatique contenant HDAC1 et HDAC2 encore inconnu. **(Publication 3)**

Alors qu'une étude ultérieure a permis de mettre en évidence des interactions physiques et fonctionnelles entre CTIP2 et SIRT1 (Senawong T., 2003), une HDAC de classe III dont l'activité enzymatique est insensible à la TSA. Nous n'avons cependant pas pu reproduire ces résultats.

Des expériences de dosage de l'activité HDAC associée à des formes tronquées de CTIP2 nous ont permis de montrer que le domaine N-terminal 1-354 de CTIP2 est impliqué dans son interaction avec HDAC1 et HDAC2. **(Publication 3)**

Les nucléosomes qui régissent la structure chromatinienne du HIV-1 sont positionnés de manière très précise (Verdin E., 1991). Le nucléosome nuc-1 localisé à proximité du site d'initiation de la transcription joue un rôle essentiel dans la régulation de la transcription des gènes du HIV-1. En effet, l'activation transcriptionnelle du provirus est corrélée avec un remodelage de nuc-1 (El Kharroubi A., 1998 ; Verdin E., 1993).

Nos expériences d'immunoprécipitation chromatinienne attestent qu'en absence de CTIP2, le faible recrutement des protéines HDAC1 et HDAC2 sur le promoteur du HIV-1 est associé à une faible déacétylation des histones. Ce recrutement est probablement lié au recrutement d'activités HDAC par le biais d'autres facteurs de transcription inhibiteurs comme Sp3 (He J., 1995) ou YY1/LSF (Coull J.J., 2000). De ce fait, la présence de CTIP2 sur le promoteur proximal du HIV-1 provoque une forte déacétylation de nuc-1 corrélée avec un recrutement local de HDAC1 et HDAC2.

L'importance fonctionnelle du recrutement des enzymes HDAC1 et HDAC2 dans l'activité inhibitrice de CTIP2 est confortée par des tests transcriptionnels dans les cellules microgliales. En effet, une extinction de l'expression de HDAC1 et HDAC2 lève complètement l'effet répresseur de CTIP2 et conduit à une augmentation drastique de la réplication du HIV-1. De plus la surexpression de HDAC1 ou HDAC2 potentialise l'activité inhibitrice de CTIP2 sur la transcription des gènes viraux et provoque une chute de la réplication du HIV-1. **(Publication 3)**

La thérapie anti-rétrovirale actuelle permet de faire chuter la virémie en-dessous du seuil de détection. Cependant, la persistance de provirus à l'état latent dans les lymphocytes T CD4+ quiescents empêche l'éradication complète du virus (Finzi D., 1997 ; Pierson T., 2000 ; Pomerantz R.J., 2003). Les HDAC de classe I et II sensibles à la TSA semblent jouer un rôle prépondérant dans les phénomènes de latence virale en favorisant l'état de quiescence des lymphocytes T CD4+. En effet, une étude récente a montré que l'administration d'acide valproïque, un inhibiteur des HDAC de classe I et II, conjointement à la trithérapie et à l'Enfuvirtide® fait chuter le taux de lymphocytes T CD4+ quiescents d'environ 75% (Lehrman G., 2005). HDAC1 semble jouer un rôle particulièrement important dans ces phénomènes de latence virale dans les lymphocytes T CD4+ quiescents puisque son recrutement sur le promoteur du HIV-1 provoque une répression de la production virale (Coull J.J., 2000 ; He J., 1995 ; Romerio F., 1997).

Dans le système immunitaire et le système nerveux central, l'établissement de réservoirs cellulaires est problématique puisqu'il permet de protéger le virus contre les thérapies anti-rétrovirales actuelles. La compréhension des mécanismes responsables du recrutement d'activités HDAC sur le promoteur du HIV-1 semble cruciale pour le développement de nouvelles stratégies anti-rétrovirales destinées à purger les réservoirs cellulaires du HIV-1 et ainsi éradiquer le virus. Nos résultats expérimentaux suggèrent que CTIP2 est capable de

recruter des activités HDAC sur le promoteur viral et ainsi favoriser l'établissement d'une latence virale post-intégrationnelle dans les cellules microgliales.

Les processus d'acétylation et de méthylation des histones sont étroitement liés comme le suggère une étude montrant l'association physique et fonctionnelle entre des HDAC et SUV39H1, une HMT de la sous-famille SUV39 (Vaute O., 2002).

Alors que la méthylation des résidus arginines de l'histone H3 est associée à une activation de la transcription, la méthylation des résidus lysines peut avoir un effet positif ou négatif sur la transcription génique en fonction de la nature du site de méthylation (Kouzarides T., 2002).

Le résidu K9/H3 méthylé est associé à une répression de la transcription et constitue un site de fixation spécifique pour les protéines de la famille HP1 (Bannister A.J., 2001 ; Lachner M., 2001). Ces protéines jouent un rôle prépondérant dans l'organisation de l'hétérochromatine (Grewal S.I., 2003) ; (Eissenberg J.C., 2000). De nombreuses HMT ont la capacité de méthyler le résidu K9/H3 (Kouzarides T., 2002), mais il semblerait que l'intervention de SUV39H1 soit indispensable au recrutement de HP1 (Stewart M.D., 2005).

Nos expériences de ChIP nous ont permis de mettre en évidence la capacité de CTIP2 à recruter SUV39H1 et HP1 α sur le promoteur du HIV-1. (**Publication 3**) Ce recrutement s'explique par des interactions physiques entre SUV39H1 et le domaine 145-434 de CTIP2 d'une part et entre le domaine 717-813 de CTIP2 et HP1 α d'autre part (**Publications 2 et 3**) Le domaine 145-434 de CTIP2 est donc engagé dans l'interaction avec les facteurs de transcription cellulaires Sp1 et COUP-TF, mais également avec SUV39H1.

Une interaction physique entre SUV39H1 et HP1 α paraît indispensable à l'établissement d'une structure hétérochromatinienne stable (Stewart M.D., 2005). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse d'un recrutement du facteur répresseur HP1 α sur le promoteur du HIV-1 par l'intermédiaire de SUV39H1. De plus, cette interaction pourrait être stabilisée par une interaction directe entre le domaine C-terminal 717-813 de CTIP2 et HP1 α . (**Publication 1**) SUV39H1 va alors générer de nouveaux sites de fixation pour le chromodomaine de HP1 α sur les nucléosomes adjacents à nuc-1. La polymérisation de HP1 α le long du provirus va ainsi l'inclure dans des structures d'hétérochromatine inaccessibles pour les protéines activatrices qui régulent la transcription des gènes du HIV-1. (**Publication 3**)

Plusieurs protéines ont été décrites dans la littérature comme étant capables de recruter un complexe similaire à celui recruté par CTIP2. En effet, en recrutant un complexe contenant des activités HDAC, SUV39H1 et HP1, la protéine Rb (Retinoblastoma) agit comme un répresseur transcriptionnel (Nielsen S.J., 2001 ; Vandel L., 2001). De plus, de nombreuses évidences expérimentales tendraient à montrer que les protéines Ikaros, Aiolos (Brown K.E., 1997 ; Koipally J., 1999) et KAP1 (Ryan R.F., 1999) agiraient de manière similaire.

Comme le montrent nos résultats de microscopie confocale, dans les cellules microgliales, les domaines hétérochromatiniens induits par CTIP2 s'organisent en structures sphériques très denses allant de 1 à 5µm de diamètre généralement dispersées dans le nucléoplasme. Leur nombre varie entre 10 et 30 par noyau. Dans quelques cellules, ces structures sphériques peuvent se concentrer au niveau de la membrane nucléaire interne, suggérant un processus dynamique qui pourrait être corrélé au cycle cellulaire. **(Publication 1)** Le noyau est une organelle très dynamique qui renferme de nombreuses structures comme le nucléole ou les corps de Cajal (Dundr M., 2001). Cependant, à l'exception du nucléole, aucune structure nucléaire n'excède 1,5µm de diamètre. Or nos expériences nous ont permis de montrer que les structures nucléaires induites par CTIP2 étaient totalement distinctes du nucléole. **(Publication 1)** Ainsi, de par leur taille, leur distribution et leur nombre, ces structures constituent une nouvelle classe de structures nucléaires.

Au cours de la phase finale de la transcription des gènes du HIV-1...

...CTIP2 séquestre Tat dans des zones hétérochromatiniennes

La phase finale de la transcription des gènes du HIV-1 est essentiellement régulée par Tat. Dans le but de vérifier si l'effet inhibiteur de CTIP2 passait par une interaction physique entre ces deux protéines, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation. Nos résultats nous ont permis de montrer qu'effectivement, le domaine 145-434 de CTIP2 et le domaine 1-48 de Tat sont capables d'interagir dans le contexte cellulaire des cellules microgliales. **(Publication 1)** Ainsi, en bloquant le domaine activateur 1-40 de Tat, CTIP2 pourrait inhiber l'interaction entre Tat et P-TEFb par l'intermédiaire de sa sous-unité cycline

T1 et donc son effet transactivateur. Cette propriété fait de CTIP2 un candidat potentiel de taille dans le développement d'une stratégie antivirale dirigée contre Tat.

Outre l'histone H3, les activités enzymatiques HDAC recrutées sur le promoteur du HIV-1 pourraient également cibler d'autres protéines importantes dans la régulation de la transcription du HIV-1 comme par exemple le transactivateur viral Tat. En effet, l'acétylation des résidus lysines en position 28 et 50 joue un rôle crucial dans la régulation de l'activité de Tat (Kiernan R.E., 1999). Une étude récente rapporte que l'enzyme HDAC de classe III SIRT1 est capable de déacétyler Tat (Pagans S., 2005). De la même manière, les enzymes HDAC1 et HDAC2 recrutées par CTIP2 sur le promoteur du HIV-1 pourraient également être impliquées dans la déacétylation de Tat. En effet, des résultats préliminaires menés *in vitro* tendraient à prouver que HDAC1 serait également capable de déacétyler le transactivateur viral Tat (Résultats non-publiés).

Conclusion

En intervenant au niveau de l'étape de transcription des gènes viraux, CTIP2 réprime la réplication du HIV-1 dans les cellules microgliales en induisant la formation de structures hétérochromatiniennes le long du provirus.

Nos résultats expérimentaux nous ont permis de montrer que le répresseur CTIP2 pouvait être subdivisé en trois domaines fonctionnels : le domaine N-terminal 1-354, le domaine 145-434 et le domaine C-terminal 717-813. (**Figure 34**)

Le domaine N-terminal 1-354 est responsable du recrutement des enzymes HDAC1 et HDAC2 sur le promoteur du HIV-1.

Le domaine 145-434 permet à CTIP2 d'être recruté sur le promoteur du HIV-1 par l'intermédiaire des facteurs de transcription cellulaires Sp1 et COUP-TF fixés sur les boîtes GC. Ce domaine est également capable de retenir Tat dans des domaines hétérochromatiniens, l'empêchant ainsi de jouer son rôle transactivateur et participe également au recrutement de SUV39H1, responsable de la méthylation du résidu K9/H3.

Le domaine C-terminal 717-813 intervient dans le recrutement de HP1 α sur le promoteur viral.

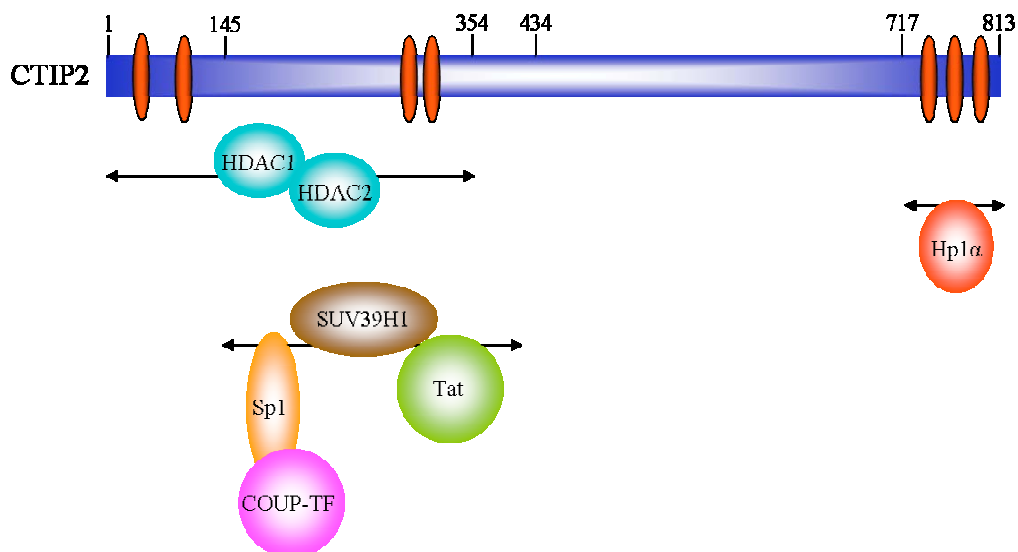


Figure 34 : Représentation schématique des différentes interactions protéiques entre CTIP2 et ses partenaires

Nos résultats nous ont permis d'affirmer qu'une fois ancré sur le promoteur du HIV-1, CTIP2 y recrute HDAC1 et HDAC2 par l'intermédiaire de son domaine N-terminal 1-354. Ces activités HDAC provoquent une déacétylation de l'histone H3 et notamment du résidu K9/H3. Puis le domaine central 145-434 de CTIP2 va permettre le recrutement de SUV39H1

qui va ainsi méthyler le résidu K9/H3 et donc créer un site de fixation pour HP1 α . La polymérisation de HP1 α le long du provirus va ainsi générer un domaine hétérochromatinien inaccessible pour les facteurs cellulaires et viraux impliqués dans la régulation de la transcription des gènes du HIV-1. (**Figure 35**)

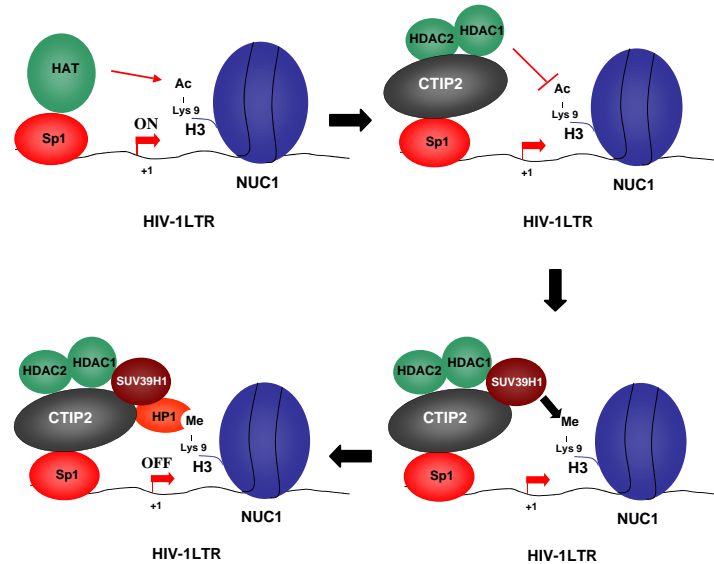


Figure 35 : Modèle du mécanisme de répression de la transcription des gènes du HIV-1 par CTIP2

Ainsi, à l'image du complexe LSF/YY1 dans les lymphocytes T CD4+, le répresseur transcriptionnel CTIP2 pourrait être impliqué dans l'établissement d'une latence post-intégrationnelle dans les cellules microgliales et ainsi contribuer à la constitution de réservoirs cellulaires au sein du système nerveux central.

Des investigations futures pourront peut être nous permettre de généraliser le mécanisme d'action de CTIP2 à tous les types cellulaires infectés de manière productive par le virus, et notamment les lymphocytes T CD4+. De plus, outre son action inhibitrice au cours de l'étape de transcription, CTIP2 intervient peut-être également au niveau d'autres étapes du cycle de réplication du HIV-1. Ainsi, ces perspectives pourraient s'avérer intéressantes dans l'optique de l'élaboration d'une nouvelle stratégie anti-rétrovirale basée sur l'activité inhibitrice de CTIP2.

Annexe

Annexe

Regulation of HIV-1 gene transcription : from lymphocytes to microglial cells

Rohr O, Marban C, Aunis D, Schaeffer E.

J Leukoc Biol., 2003 Nov, 74(5):736-49

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells

Olivier Rohr, **Céline Marban**, Dominique Aunis, and Evelyne Schaeffer

Journal of Leukocyte Biology, 2003, Volume 74, Pages 736-749

Pages 736 à 749 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Références bibliographiques

- Accola M. A., Ohagen A. and Göttlinger H. G. (2000) Isolation of human immunodeficiency virus type 1 cores: retention of Vpr in the absence of p6 (gag). *J Virol*, 74, 6198-202.
- Agostini I., Navarro J. M., Rey F., Bouhamdan M., Spire B., Vigne R. and Sire J. (1996) The human immunodeficiency virus type 1 Vpr transactivator: cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIB. *J Mol Biol*, 261, 599-606.
- Aiken C., Konner J., Landau N. R., Lenburg M. E. and Trono D. (1994) Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*, 76, 853-64.
- Ait-Khaled M., McLaughlin J. E., Johnson M. A. and Emery V. C. (1995) Distinct HIV-1 long terminal repeat quasispecies present in nervous tissues compared to that in lung, blood and lymphoid tissues of an AIDS patient. *AIDS*, 9, 675-83.
- Albright A. V., Soldan S. S. and González-Scarano F. (2003) Pathogenesis of human immunodeficiency virus-induced neurological disease. *J Neurovirol*, 9, 222-7.
- Aldovini A. and Young R. A. (1990) Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J Virol*, 64, 1920-6.
- Allison L. A., Moyle M., Shales M. and Ingles C. J. (1985) Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell*, 42, 599-610.
- Aloia R. C., Tian H. and Jensen F. C. (1993) Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 5181-5.
- An S. F., Groves M., Gray F. and Scaravilli F. (1999) Early entry and widespread cellular involvement of HIV-1 DNA in brains of HIV-1 positive asymptomatic individuals. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58, 1156-62.
- Andrews G. K., Lee D. K., Ravindra R., Lichtlen P., Sirito M., Sawadogo M. and Schaffner W. (2001) The transcription factors MTF-1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein-I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development. *EMBO J*, 20, 1114-22.
- Arlotta P., Molyneaux B. J., Chen J., Inoue J., Kominami R. and Macklis J. D. (2005) Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, 45, 207-21.
- Armache K. J., Kettenberger H. and Cramer P. (2003) Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 6964-8.
- Armache K. J., Mitterweger S., Meinhart A. and Cramer P. (2005) Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J Biol Chem*, 280, 7131-4.

Attardi L. D. and Tjian R. (1993) Drosophila tissue-specific transcription factor NTF-1 contains a novel isoleucine-rich activation motif. *Genes Dev*, 7, 1341-53.

Avram D., Fields A., Pretty On Top K., Nevriy D. J., Ishmael J. E. and Leid M. (2000) Isolation of a novel family of C(2)H(2) zinc finger proteins implicated in transcriptional repression mediated by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) orphan nuclear receptors. *J Biol Chem*, 275, 10315-22.

Avram D., Fields A., Senawong T., Topark-Ngarm A. and Leid M. (2002) COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor)-interacting protein 1 (CTIP1) is a sequence-specific DNA binding protein. *Biochem J*, 368, 555-63.

Bagasra O., Lavi E., Bobroski L., Khalili K., Pestaner J. P., Tawadros R. and Pomerantz R. J. (1996) Cellular reservoirs of HIV-1 in the central nervous system of infected individuals: identification by the combination of in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *AIDS*, 10, 573-85.

Bajetto A., Bonavia R., Barbero S. and Schettini G. (2002) Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J Neurochem*, 82, 1311-29.

Ballabh P., Braun A. and Nedergaard M. (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*, 16, 1-13.

Baltimore D. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, 226, 1209-11.

Bannister A. J., Zegerman P., Partridge J. F., Miska E. A., Thomas J. O., Allshire R. C. and Kouzarides T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410, 120-4.

Barboric M. and Peterlin B. M. (2005) A new paradigm in eukaryotic biology: HIV Tat and the control of transcriptional elongation. *PLoS Biol*, 3, 76.

Barré-Sinoussi F., Chermann J. C., Rey F., Nugeyre M. T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vézinet-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.

Baxevanis A. D. and Vinson C. R. (1993) Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Curr Opin Genet Dev*, 3, 278-85.

Bednarik D. P., Cook J. A. and Pitha P. M. (1990) Inactivation of the HIV LTR by DNA CpG methylation: evidence for a role in latency. *EMBO J*, 9, 1157-64.

- Bednarik D. P., Duckett C., Kim S. U., Perez V. L., Griffis K., Guenther P. C. and Folks T. M. (1991) DNA CpG methylation inhibits binding of NF-kappa B proteins to the HIV-1 long terminal repeat cognate DNA motifs. *New Biol*, 3, 969-76.
- Bednarik D. P., Mosca J. D. and Raj N. B. (1987) Methylation as a modulator of expression of human immunodeficiency virus. *J Virol*, 61, 1253-7.
- Benkirane M., Chun R. F., Xiao H., Ogryzko V. V., Howard B. H., Nakatani Y. and Jeang K. T. (1998) Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferase. p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat. *J Biol Chem*, 273, 24898-905.
- Berger E. A., Murphy P. M. and Farber J. M. (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*, 17, 657-700.
- Berkhout B., Silverman R. H. and Jeang K. T. (1989) Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell*, 59, 273-82.
- Berkowitz R.D., Luban J. and Goff S.P. (1993) Specific binding of human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein and nucleocapsid protein to viral RNAs detected by RNA mobility shift assays. *J Virol*, 67, 7190-7200.
- Bezrookove V., van Zelderen-Bhola S. L., Brink A., Szuhai K., Raap A. K., Barge R., Beverstock G.C. and Rosenberg C. (2004) A novel t(6;14)(q25-q27;q32) in acute myelocytic leukemia involves the BCL11B gene. *Cancer Genet Cytogenet*, 149, 72-6.
- Bhat N. K., Komschlies K. L., Fujiwara S., Fisher R. J., Mathieson B. J., Gregorio T. A., Young H. A., Kasik J. W., Ozato K. and Papas T. S. (1989) Expression of ets genes in mouse thymocyte subsets and T cells. *J Immunol*, 142, 672-8.
- Birse C. E., Minvielle-Sebastia L., Lee B. A., Keller W. and Proudfoot N. J. (1998) Coupling termination of transcription to messenger RNA maturation in yeast. *Science*, 280, 298-301.
- Bishop K. N., Holmes R. K., Sheehy A. M., Davidson N. O., Cho S. J. and Malim M. H. (2004) Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol*, 14, 1392-6.
- Bonizzi G. and Karin M. (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, 25, 280-8.
- Bour S. and Strebel K. (2003) The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect*, 5, 1029-39.

Bouyac-Bertoia M., Dvorin J. D., Fouchier R. A., Jenkins Y., Meyer B. E., Wu L. I., Emerman M. and Malim M. H. (2001) HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol Cell*, 7, 1025-35.

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.

Braaten D., Franke E. K. and Luban J. (1996) Cyclophilin A is required for the replication of group M human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and simian immunodeficiency virus SIV(CPZ)GAB but not group O HIV-1 or other primate immunodeficiency viruses. *J Virol*, 70, 4220-7.

Brasse-Lagnel C., Fairand A., Lavoinnie A. and Husson A. (2003) Glutamine stimulates argininosuccinate synthetase gene expression through cytosolic O-glycosylation of Sp1 in Caco-2 cells. *J Biol Chem*, 278, 52504-10.

Breathnach R. and Chambon P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem*, 50, 349-83.

Brown K. E., Guest S. S., Smale S. T., Hahm K., Merckenschlager M. and Fisher A. G. (1997) Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*, 91, 845-54.

Brownell J. E. and Allis C. D. (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev*, 6, 176-84.

Bruhn L., Munnerlyn A. and Grosschedl R. (1997) ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function. *Genes Dev*, 11, 640-53.

Buckner A. E., Tesmer V. M. and Bina M. (2002) Regulation of HIV-1 transcription by NF-IL6 in activated Jurkat T cells. *Virus Res*, 89, 53-63.

Bukrinsky M. I. and Haffar O. K. (1998) HIV-1 nuclear import: matrix protein is back on center stage, this time together with Vpr. *Mol Med*, 4, 138-43.

Bukrinsky M. I. and Haffar O. K. (1999) HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Front Biosci*, 4, 772-81.

Buratowski S., Sopta M., Greenblatt J. and Sharp P. A. (1991) RNA polymerase II-associated proteins are required for a DNA conformation change in the transcription initiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 7509-13.

Burke T. W. and Kadonaga J. T. (1996) Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev*, 10, 711-24.

- Burley S. K. and Roeder R. G. (1996) Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem*, 65, 769-99.
- Bushnell D. A. and Kornberg R. D. (2003) Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 6969-73.
- Butera S. T. (2000) Therapeutic targeting of human immunodeficiency virus type-1 latency: current clinical realities and future scientific possibilities. *Antiviral Res*, 48, 143-76.
- Butler J. E. and Kadonaga J. T. (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev*, 16, 2583-92.
- Camaur D. and Trono D. (1996) Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J Virol*, 70, 6106-11.
- Cameron P. U., Freudenthal P. S., Barker J. M., Gezelter S., Inaba K. and Steinman R. M. (1992) Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science*, 257, 383-7.
- Cantó-Nogués C., Sánchez-Ramón S., Alvarez S., Lacruz C. and Muñoz-Fernández M. A. (2005) HIV-1 infection of neurons might account for progressive HIV-1-associated encephalopathy in children. *J Mol Neurosci*, 27, 79-89.
- Carlezon W. A., Duman R. S. and Nestler E. J. (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci*, 28, 436-45.
- Cen S., Khorchid A., Javanbakht H., Gabor J., Stello T., Shiba K., Musier-Forsyth K. and Kleiman L. (2001) Incorporation of lysyl-tRNA synthetase into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 75, 5043-8.
- Chao D. M., Gadbois E. L., Murray P. J., Anderson S. F., Sonu M. S., Parvin J. D. and Young R. A. (1996) A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature*, 380, 82-5.
- Charneau P., Alizon M. and Clavel F. (1992) A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol*, 66, 2814-20.
- Charneau P., Mirambeau G., Roux P., Paulous S., Buc H. and Clavel F. (1994) HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *J Mol Biol*, 241, 651-62.

- Chen B. K., Gandhi R. T. and Baltimore D. (1996) CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of vpu, env, and nef. *J Virol*, 70, 6044-53.
- 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 L. F. and Greene W. C. (2004) Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 392-401.
- Chen R., Le Rouzic E., Kearney J. A., Mansky L. M. and Benichou S. (2004) Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *J Biol Chem*, 279, 28419-25.
- Chiang C. M. and Roeder R. G. (1995) Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science*, 267, 531-6.
- Chinenov Y. and Kerppola T. K. (2001) Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*, 20, 2438-52.
- Cismasiu V. B., Adamo K., Gecewicz J., Duque J., Lin Q. and Avram D. (2005) BCL11B functionally associates with the NuRD complex in T lymphocytes to repress targeted promoter. *Oncogene*, 24, 6753-64.
- Clark S. J., Saag M. S., Decker W. D., Campbell-Hill S., Roberson J. L., Veldkamp P. J., Kappes J. C., Hahn B. H. and Shaw G. M. (1991) High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med*, 324, 954-60.
- Clavel F., Guetard D., Brun-Vézinet F., Chamaret S., Rey M.A., Santos-Ferreira M.O., Laurent A.G., Dauguet C., Rouzioux C. and al. (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233, 343-346.
- Clements J. E. and Zink M. C. (1996) Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin Microbiol Rev*, 9, 100-17.
- Clever J. L., Mirandar D. and Parslow T. G. (2002) RNA structure and packaging signals in the 5' leader region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol*, 76, 12381-7.
- Col E., Caron C., Seigneurin-Berny D., Gracia J., Favier A. and Khochbin S. (2001) The histone acetyltransferase, hGCN5, interacts with and acetylates the HIV transactivator, Tat. *J Biol Chem*, 276, 28179-84.

- Cooley L. A. and Lewin S. R. (2003) HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy. *J Clin Virol*, 26, 121-32.
- Cooper D. A., Gold J., Maclean P., Donovan B., Finlayson R., Barnes T. G., Michelmore H. M., Brooke P. and Penny R. (1985) Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet*, 1, 537-40.
- Corre S. and Galibert M. D. (2005) Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res*, 18, 337-48.
- Cosson P. (1996) Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO J*, 15, 5783-8.
- Coull J. J., Romerio F., Sun J. M., Volker J. L., Galvin K. M., Davie J. R., Shi Y., Hansen U. and Margolis D. M. (2000) The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. *J Virol*, 74, 6790-9.
- Crabtree G. R. (1989) Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science*, 243, 355-61.
- d'Adda di Fagagna F., Marzio G., Gutierrez M. I., Kang L. Y., Falaschi A. and Giacca M. (1995) Molecular and functional interactions of transcription factor USF with the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, 69, 2765-2775.
- Dahmus M. E. (1981) Phosphorylation of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerase. Identification of calf thymus RNA polymerase subunits phosphorylated by two purified protein kinases, correlation with in vivo sites of phosphorylation in HeLa cell RNA polymerase II. *J Biol Chem*, 256, 3332-9.
- Dalgleish A. G., Beverley P. C., Clapham P. R., Crawford D. H., Greaves M. F. and Weiss R. A. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312, 763-7.
- Dantonel J. C., Murthy K. G., Manley J. L. and Tora L. (1997) Transcription factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature*, 389, 399-402.
- Davie J. R. and Murphy L. C. (1990) Level of ubiquitinated histone H2B in chromatin is coupled to ongoing transcription. *Biochemistry*, 29, 4752-7.
- Davis L. E., Hjelle B. L., Miller V. E., Palmer D. L., Llewellyn A. L., Merlin T. L., Young S. A., Mills R. G., Wachsman W. and Wiley C. A. (1992) Early viral brain invasion in iatrogenic human immunodeficiency virus infection. *Neurology*, 42, 1736-9.

- Davison B. L., Egly J. M., Mulvihill E. R. and Chambon P. (1983) Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences. *Nature*, 301, 680-6.
- De Baar M. P., De Ronde A., Berkhout B., Cornelissen M., Van Der Horn K. H., Van Der Schoot A. M., De Wolf F., Lukashov V. V. and Goudsmit J. (2000) Subtype-specific sequence variation of the HIV type 1 long terminal repeat and primer-binding site. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16, 499-504.
- De Clercq E. (2001) New developments in anti-HIV chemotherapy. *Curr Med Chem*, 8, 1543-72.
- Debouck C., Gorniak J. G., Strickler J. E., Meek T. D., Metcalf B. W. and Rosenberg M. (1987) Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 8903-6.
- Demarchi F., D'Agaro P., Falaschi A. and Giacca M. (1993) In vivo footprinting analysis of constitutive and inducible protein-DNA interactions at the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 67, 7450-60.
- Dempsey N. J., Ojalvo L. S., Wu D. W. and Little J. A. (2003) Induction of an embryonic globin gene promoter by short-chain fatty acids. *Blood*, 102, 4214-22.
- Dequiedt F., Kasler H., Fischle W., Kiermer V., Weinstein M., Herndier B. G. and Verdin E. (2003) HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis. *Immunity*, 18, 687-98.
- Dequiedt F., Van Lint J., Lecomte E., Van Duppen V., Seufferlein T., Vandenhede J. R., Wattiez R. and Kettmann R. (2005) Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *J Exp Med*, 201, 793-804.
- de Ruijter A. J., van Gennip A. H., Caron H. N., Kemp S. and van Kuilenburg A. B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, 370, 737-49.
- Descombes P., Chojkier M., Lichtsteiner S., Falvey E. and Schibler U. (1990) LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev.*, 9, 1541-1551.
- Descombes P. and Schibler U. (1991) A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell*, 67, 569-79.
- Dickson D. W. (1986) Multinucleated giant cells in acquired immunodeficiency syndrome encephalopathy. Origin from endogenous microglia? *Arch Pathol Lab Med*, 110, 967-8.

- Dingwall C., Ernberg I., Gait M. J., Green S. M., Heaphy S., Karn J., Lowe A. D., Singh M., Skinner M. A. and Valerio R. (1989) Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 6925-9.
- Doetzlhofer A., Rotheneder H., Lagger G., Koranda M., Kurtev V., Brosch G., Wintersberger E. and Seiser C. (1999) Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol*, 19, 5504-11.
- Doms R. W. and Peiper S. C. (1997) Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology*, 235, 179-90.
- Doms R. W. and Trono D. (2000) The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev*, 14, 2677-88.
- Dore G. J., Correll P. K., Li Y., Kaldor J. M., Cooper D. A. and Brew B. J. (1999) Changes to AIDS dementia complex in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, 13, 1249-53.
- Dumais N., Bounou S., Olivier M. and Tremblay M. J. (2002) Prostaglandin E(2)-mediated activation of HIV-1 long terminal repeat transcription in human T cells necessitates CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) binding sites in addition to cooperative interactions between C/EBPbeta and cyclic adenosine 5'-monophosphate. *J Immunol*, 168, 274-82.
- Dundr M. and Misteli T. (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J*, 356, 297-310.
- Eisen J. A., Sweder K. S. and Hanawalt P. C. (1995) Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res*, 23, 2715-23.
- Eissenberg J. C. and Elgin S. C. (2000) The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr Opin Genet Dev*, 10, 204-10.
- El Kharroubi A., Piras G., Zensen R. and Martin M. A. (1998) Transcriptional activation of the integrated chromatin-associated human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol*, 18, 2535-44.
- Ellerman V. and Bang O. (1908) Experimentelle Leukäemie bei Hühnern. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr hyg*, 46, 595-609
- Emami K. H., Jain A. and Smale S. T. (1997) Mechanism of synergy between TATA and initiator: synergistic binding of TFIID following a putative TFIIA-induced isomerization. *Genes Dev*, 11, 3007-19.
- Estève P. O., Chin H. G. and Pradhan S. (2005) Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 1000-5.

- 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.
- Federico M., Percario Z., Olivetta E., Fiorucci G., Muratori C., Micheli A., Romeo G. and Affabris E. (2001) HIV-1 Nef activates STAT1 in human monocytes/macrophages through the release of soluble factors. *Blood*, 98, 2752-61.
- Felsenfeld G. and Groudine M. (2003) Controlling the double helix. *Nature*, 421, 448-53.
- Felzien L. K., Woffendin C., Hottiger M. O., Subbramanian R. A., Cohen E. A. and Nabel G. J. (1998) HIV transcriptional activation by the accessory protein, VPR, is mediated by the p300 co-activator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5281-6.
- Ferrante R. J., Kubilus J. K., Lee J., Ryu H., Beesen A., Zucker B., Smith K., Kowall N. W., Ratan R. R., Luthi-Carter R. and Hersch S. M. (2003) Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J Neurosci*, 23, 9418-27.
- Ferré-D'Amaré A. R., Pognonec P., Roeder R. G. and Burley S. K. (1994) Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *EMBO J*, 13, 180-9.
- Finzi D., Hermankova M., Pierson T., Carruth L. M., Buck C., Chaisson R. E., Quinn T. C., Chadwick K., Margolick J., Brookmeyer R., Gallant J., Markowitz M., Ho D. D., Richman D. D. and Siliciano R. F. (1997) Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, 278, 1295-300.
- Fischle W., Tseng B. S., Dormann H. L., Ueberheide B. M., Garcia B. A., Shabanowitz J., Hunt D. F., Funabiki H. and Allis C.D. (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*.
- Fischle W., Wang Y. and Allis C. D. (2003) Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature*, 425, 475-9.
- Fornieris F., Binda C., Vanoni M.A., Battaglioli E. and Mattevi A. (2005) Human histone demethylase LSD1 reads the histone code. *J Bio. Chem.*
- Frankel A. D. and Young J. A. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*, 67, 1-25.
- Freed E. O. (2002) Viral late domains. *J Virol*, 76, 4679-87.
- Freed E. O. and Martin M. A. (1996) Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol*, 70, 341-51.

- Fryer C. J. and Archer T. K. (1998) Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature*, 393, 88-91.
- Fuks F., Hurd P. J., Deplus R. and Kouzarides T. (2003) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, 31, 2305-12.
- Fulco M., Schiltz R. L., Iezzi S., King M. T., Zhao P., Kashiwaya Y., Hoffman E., Veech R. L. and Sartorelli V. (2003) Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell*, 12, 51-62.
- Gallo R. C., Sarin P. S., Gelmann E. P., Robert-Guroff M., Richardson E., Kalyanaraman V. S., Mann D., Sidhu G. D., Stahl R. E., Zolla-Pazner S., Leibowitch J. and Popovic M. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220, 865-7.
- Garcia J. A., Harrich D., Pearson L., Mitsuyasu R. and Gaynor R. B. (1988) Functional domains required for tat-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *EMBO J*, 7, 3143-7.
- Garcia J. A., Wu F. K., Mitsuyasu R. and Gaynor R. B. (1987) Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J*, 6, 3761-70.
- Garrus J. E., von Schwedler U. K., Pornillos O. W., Morham S. G., Zavitz K. H., Wang H. E., Wettstein D. A., Stray K. M., Côté M., Rich R. L., Myszka D. G. and Sundquist W. I. (2001) Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, 107, 55-65.
- Gartel A. L. and Tyner A. L. (1999) Transcriptional regulation of the p21(WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res*, 246, 280-9.
- Gartner S. (2000) HIV infection and dementia. *Science*, 287, 602-4.
- Gaynor R. B., Kuwabara M. D., Wu F. K., Garcia J. A., Harrich D., Briskin M., Wall R. and Sigman D. S. (1988) Repeated B motifs in the human immunodeficiency virus type I long terminal repeat enhancer region do not exhibit cooperative factor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 9406-10.
- Geiman T. M., Sankpal U. T., Robertson A. K., Zhao Y., Zhao Y. and Robertson K. D. (2004) DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochem Biophys Res Commun*, 318, 544-55.
- Gelderblom H. R., Hausmann E. H., Ozel M., Pauli G. and Koch M. A. (1987) Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology*, 156, 171-6.

Gelderblom H. R., Ozel M. and Pauli G. (1989) Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Arch Virol*, 106, 1-13.

Ghosh D. (1992) Glucocorticoid receptor-binding site in the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *J Virol*, 66, 586-90.

Giffin M. J., Stroud J. C., Bates D. L., von Koenig K. D., Hardin J. and Chen L. (2003) Structure of NFAT1 bound as a dimer to the HIV-1 LTR kappa B element. *Nat Struct Biol*, 10, 800-6.

Giraudon P., Buart S., Bernard A. and Belin M.F. (1997) Cytokines secreted by glial cells infected with HTLV-I modulate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their natural inhibitor (TIMPs) : possible involvement in neurodegenerative processes. *Mol Psychiatry*, 84, 107-10.

Giraudon P., Buart S., Bernard A., Thomasset N. and Belin M.F. (1996) Extracellular matrix-remodelling metalloproteinases and infection of the central nervous system with retrovirus human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Prog Neurobio.*, 49, 169-84.

Goffin V., Demonté D., Vanhulle C., de Walque S., de Launoit Y., Burny A., Collette Y. and Van Lint C. (2005) Transcription factor binding sites in the pol gene intragenic regulatory region of HIV-1 are important for virus infectivity. *Nucleic Acids Res*, 33, 4285-310.

Gomez C. and Hope T. J. (2005) The ins and outs of HIV replication. *Cell Microbiol*, 7, 621-6.

González-Scarano F. and Martín-García J. (2005) The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol*, 5, 69-81.

Götte M., Li X. and Wainberg M. A. (1999) HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophys*, 365, 199-210.

Gottlieb M. S. (1981) Pneumocystis pneumonia-Los Angeles. *MMWR morb Mortal Wkly Rep*, 30, 250-252.

Göttlinger H. G., Dorfman T., Sodroski J. G. and Haseltine W. A. (1991) Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3195-9.

Göttlinger H. G., Sodroski J. G. and Haseltine W. A. (1989) Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 5781-5.

Grant P. A. and Berger S. L. (1999) Histone acetyltransferase complexes. *Semin Cell Dev Biol*, 10, 169-77.

- Grewal S. I. and Elgin S. C. (2002) Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev*, 12, 178-87.
- Grewal S. I. and Moazed D. (2003) Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*, 301, 798-802.
- Gronemeyer H. and Moras D. (1995) Nuclear receptors. How to finger DNA. *Nature*, 375, 190-1.
- Grosschedl R., Giese K. and Pagel J. (1994) HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet*, 10, 94-100.
- Gruenbaum Y., Stein R., Cedar H. and Razin A. (1981) Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett*, 124, 67-71.
- Grunstein M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389, 349-52.
- Guenther M. G., Barak O. and Lazar M. A. (2001) The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol*, 21, 6091-101.
- Gummuluru S. and Emerman M. (1999) Cell cycle- and Vpr-mediated regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression in primary and transformed T-cell lines. *J Virol*, 73, 5422-30.
- 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.
- Hahn B. H., Shaw G. M., De Cock K. M. and Sharp P. M. (2000) AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*, 287, 607-14.
- Han I. and Kudlow J. E. (1997) Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol*, 17, 2550-8.
- Harris R. S., Bishop K. N., Sheehy A. M., Craig H. M., Petersen-Mahrt S. K., Watt I. N., Neuberger M. S. and Malim M. H. (2003) DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell*, 113, 803-9.
- Hayden M. S. and Ghosh S. (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, 18, 2195-224.
- He J., Choe S., Walker R., Di Marzio P., Morgan D. O. and Landau N. R. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol*, 69, 6705-11.

- 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.
- Henriet S., Richer D., Bernacchi S., Decroly E., Vigne R., Ehresmann B., Ehresmann C., Paillart J. C. and Marquet R. (2005) Cooperative and Specific Binding of Vif to the 5' Region of HIV-1 Genomic RNA. *J Mol Biol*, 354, 55-72.
- 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.
- Hirota T., Lipp J. J., Toh B.H. and Peters J.M. (2005) Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*.
- Ho D. D., Neumann A. U., Perelson A. S., Chen W., Leonard J. M. and Markowitz M. (1995) Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 373, 123-6.
- Holbert M.A. and Marmorstein R. (2005) Structure and activity of enzymes that remove histone modifications. *Curr Opin Struct Biol*.
- Holstege F. C., Fiedler U. and Timmers H. T. (1997) Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *EMBO J*, 16, 7468-80.
- Holstege F. C., van der Vliet P. C. and Timmers H. T. (1996) Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J*, 15, 1666-77.
- Holstege F. C. and Timmers H. T. (1997) Analysis of open complex formation during RNA polymerase II transcription initiation using heteroduplex templates and potassium permanganate probing. *Methods*, 12, 203-11.
- Hottiger M. O. and Nabel G. J. (1998) Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat with the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein. *J Virol*, 72, 8252-6.
- Hsia S. C. and Shi Y. B. (2002) Chromatin disruption and histone acetylation in regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol*, 22, 4043-52.
- Hu W. S. and Temin H. M. (1990) Retroviral recombination and reverse transcription. *Science*, 250, 1227-33.
- Hubbert C., Guardiola A., Shao R., Kawaguchi Y., Ito A., Nixon A., Yoshida M., Wang X. F. and Yao T. P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 417, 455-8.

- Hurst H. C. (1995) Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile*, 2, 101-68.
- Imai S., Armstrong C. M., Kaeberlein M. and Guarente L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403, 795-800.
- Imbalzano A. N., Zaret K. S. and Kingston R. E. (1994) Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J Biol Chem*, 269, 8280-6.
- Jacks T. and Varmus H. E. (1985) Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science*, 230, 1237-42.
- Jackson S. P. and Tjian R. (1988) O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell*, 55, 125-33.
- Jain J., Burgeon E., Badalian T. M., Hogan P. G. and Rao A. (1995) A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *J Biol Chem*, 270, 4138-45.
- Jeeninga R. E., Hoogenkamp M., Armand-Ugon M., de Baar M., Verhoef K. and Berkhout B. (2000) Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J Virol*, 74, 3740-51.
- Jenkins Y., McEntee M., Weis K. and Greene W. C. (1998) Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol*, 143, 875-85.
- Joel P., Shao W. and Pratt K. (1993) A nuclear protein with enhanced binding to methylated Sp1 sites in the AIDS virus promoter. *Nucleic Acids Res*, 21, 5786-93.
- Johannessen M., Delghandi M. P. and Moens U. (2004) What turns CREB on? *Cell Signal*, 16, 1211-27.
- Jones K. A., Kadonaga J. T., Luciw P. A. and Tjian R. (1986) Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science*, 232, 755-9.
- Jordan A., Defechereux P. and Verdin E. (2001) The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J*, 20, 1726-38.
- Jordan C. A., Watkins B. A., Kufta C. and Dubois-Dalcq M. (1991) Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent. *J Virol*, 65, 736-42.
- Jowett J. B., Planelles V., Poon B., Shah N. P., Chen M. L. and Chen I. S. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol*, 69, 6304-13.

Jung A., Maier R., Vartanian J. P., Bocharov G., Jung V., Fischer U., Meese E., Wain-Hobson S. and Meyerhans A. (2002) Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature*, 418, 144.

Kadonaga J. T., Carner K. R., Masiarz F. R. and Tjian R. (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*, 51, 1079-90.

Kadonaga J. T., Courey A. J., Ladika J. and Tjian R. (1988) Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science*, 242, 1566-70.

Kaleebu P., Ross A., Morgan D., Yirrell D., Oram J., Rutebemberwa A., Lyagoba F., Hamilton L., Biryahwaho B. and Whitworth J. (2001) Relationship between HIV-1 Env subtypes A and D and disease progression in a rural Ugandan cohort. *AIDS*, 15, 293-9.

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.

Kamine J. and Chinnadurai G. (1992) Synergistic activation of the human immunodeficiency virus type 1 promoter by the viral Tat protein and cellular transcription factor Sp1. *J Virol*, 66, 3932-6.

Kao S., Khan M. A., Miyagi E., Plishka R., Buckler-White A. and Strebel K. (2003) The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol*, 77, 11398-407.

Karin M., Liu Z. and Zandi E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 240-6.

Kaul M., Garden G. A. and Lipton S. A. (2001) Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*, 410, 988-94.

Kerppola T. K. and Curran T. (1991) DNA bending by Fos and Jun: the flexible hinge model. *Science*, 254, 1210-4.

Kettenberger H., Armache K. J. and Cramer P. (2004) Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS. *Mol Cell*, 16, 955-65.

Kiernan R. E., Vanhulle C., Schiltz L., Adam E., Xiao H., Maudoux F., Calomme C., Burny A., Nakatani Y., Jeang K. T., Benkirane M. and Van Lint C. (1999) HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J*, 18, 6106-18.

Kim J. K., Palaniappan C., Wu W., Fay P. J. and Bambara R. A. (1997) Evidence for a unique mechanism of strand transfer from the transactivation response region of HIV-1. *J Biol Chem*, 272, 16769-77.

- Kim Y. J., Björklund S., Li Y., Sayre M. H. and Kornberg R. D. (1994) A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*, 77, 599-608.
- Kino T., Gragerov A., Kopp J. B., Stauber R. H., Pavlakis G. N. and Chrousos G. P. (1999) The HIV-1 virion-associated protein vpr is a coactivator of the human glucocorticoid receptor. *J Exp Med*, 189, 51-62.
- Kino T., Kopp J. B. and Chrousos G. P. (2000) Glucocorticoids suppress human immunodeficiency virus type-1 long terminal repeat activity in a cell type-specific, glucocorticoid receptor-mediated fashion: direct protective effects at variance with clinical phenomenology. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 75, 283-90.
- Kinoshita S., Su L., Amano M., Timmerman L. A., Kaneshima H. and Nolan G. P. (1997) The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity*, 6, 235-44.
- Kleiman L. (2002) tRNA(Lys3): the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1. *IUBMB Life*, 53, 107-14.
- Koenig S., Gendelman H. E., Orenstein J. M., Dal Canto M. C., Pezeshkpour G. H., Yungbluth M., Janotta F., Aksamit A., Martin M. A. and Fauci A. S. (1986) Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science*, 233, 1089-93.
- Koipally J., Renold A., Kim J. and Georgopoulos K. (1999) Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO J*, 18, 3090-100.
- Koleske A. J. and Young R. A. (1995) The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *Trends Biochem Sci*, 20, 113-6.
- Komissarova N. and Kashlev M. (1997) RNA polymerase switches between inactivated and activated states By translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J Biol Chem*, 272, 15329-38.
- Kondo E., Mammano F., Cohen E. A. and Göttlinger H. G. (1995) The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J Virol*, 69, 2759-64.
- Koshland D. and Strunnikov A. (1996) Mitotic chromosome condensation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, 305-33.
- Kotov A., Zhou J., Flicker P. and Aiken C. (1999) Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol*, 73, 8824-30.
- Kouzarides T. (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev*, 12, 198-209.

- Kowenz-Leutz E. and Leutz A. (1999) A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol Cell*, 4, 735-43.
- Krebs F. C., Goodenow M. M. and Wigdahl B. (1997) Neuroglial ATF/CREB factors interact with the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat *J Neurovirol*, 3 (suppl.1), S28-S32.
- Kuo M.H. and Allis C.D. (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*, 8, 615-26.
- Kuppuswamy M., Subramanian T., Srinivasan A. and Chinnadurai G. (1989) Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res*, 17, 3551-61.
- Kwon D. S., Gregorio G., Bitton N., Hendrickson W. A. and Littman D. R. (2002) DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*, 16, 135-44.
- Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K. and Jenuwein T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410, 116-20.
- Lagrange T., Kapanidis A. N., Tang H., Reinberg D. and Ebright R. H. (1998) New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev*, 12, 34-44.
- Lambert D. M., Barney S., Lambert A. L., Guthrie K., Medinas R., Davis D. E., Bucy T., Erickson J., Merutka G. and Petteway S. R. (1996) Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2186-91.
- Landry J., Slama J. T. and Sternglanz R. (2000) Role of NAD(+) in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 278, 685-90.
- Landschulz W. H., Johnson P. F. and McKnight S. L. (1989) The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science*, 243, 1681-8.
- Langley E., Pearson M., Faretta M., Bauer U. M., Frye R. A., Minucci S., Pelicci P. G. and Kouzarides T. (2002) Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J*, 21, 2383-96.
- Lecossier D., Bouchonnet F., Clavel F. and Hance A. J. (2003) Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science*, 300, 1112.

- Lee J. S., Galvin K. M., See R. H., Eckner R., Livingston D., Moran E. and Shi Y. (1995) Relief of YY1 transcriptional repression by adenovirus E1A is mediated by E1A-associated protein p300. *Genes Dev*, 9, 1188-98.
- Lee J. S., Galvin K. M. and Shi Y. (1993) Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6145-9.
- Lehrman G., Hogue I. B., Palmer S., Jennings C., Spina C. A., Wiegand A., Landay A. L., Coombs R. W., Richman D. D., Mellors J. W., Coffin J. M., Bosch R. J. and Margolis D. M. (2005) Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet*, 366, 549-55.
- Leid M., Ishmael J. E., Avram D., Shepherd D., Fraulob V. and Dollé P. (2004) CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns*, 4, 733-9.
- Lemon B. and Tjian R. (2000) Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev*, 14, 2551-69.
- Leonhardt H., Page A. W., Weier H. U. and Bestor T. H. (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, 71, 865-73.
- Lever A., Gottlinger H., Haseltine W. and Sodroski J. (1989) Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J Virol*, 63, 4085-7.
- Lewis P., Hensel M. and Emerman M. (1992) Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J*, 11, 3053-8.
- Li C. J., Wang C., Friedman D. J. and Pardee A. B. (1995) Reciprocal modulations between p53 and Tat of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5461-4.
- Li E. (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 3, 662-73.
- Li L., He S., Sun J. M. and Davie J. R. (2004) Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol*, 82, 460-71.
- Liddament M. T., Brown W. L., Schumacher A. J. and Harris R. S. (2004) APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol*, 14, 1385-91.
- Liu P., Keller J. R., Ortiz M., Tessarollo L., Rachel R. A., Nakamura T., Jenkins N. A. and Copeland N. G. (2003) Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat Immunol*, 4, 525-32.

- Lorch Y., Cairns B. R., Zhang M. and Kornberg R. D. (1998) Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome. *Cell*, 94, 29-34.
- Lu M., Blacklow S. C. and Kim P. S. (1995) A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol*, 2, 1075-82.
- Luban J. (1996) Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell*, 87, 1157-9.
- 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.
- Luger K., Mäder A. W., Richmond R. K., Sargent D. F. and Richmond T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251-60.
- Luo J., Nikolaev A. Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L. and Gu W. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, 107, 137-48.
- 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.
- Lusser A. and Kadonaga J. T. (2003) Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays*, 25, 1192-200.
- Maciaszek J. W., Talmage D. A. and Viglianti G. A. (1994) Synergistic activation of simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 1 transcription by retinoic acid and phorbol ester through an NF-kappa B-independent mechanism. *J Virol*, 68, 6598-604.
- Magnuson D. S., Knudsen B. E., Geiger J. D., Brownstone R. M. and Nath A. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 tat activates non-N-methyl-D-aspartate excitatory amino acid receptors and causes neurotoxicity. *Ann Neurol*, 37, 373-80.
- Majello B., De Luca P., Hagen G., Suske G. and Lania L. (1994) Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res*, 22, 4914-21.
- Mak J., Khorchid A., Cao Q., Huang Y., Lowy I., Parniak M. A., Prasad V. R., Wainberg M. A. and Kleiman L. (1997) Effects of mutations in Pr160gag-pol upon tRNA(Lys3) and Pr160gag-plo incorporation into HIV-1. *J Mol Biol*, 265, 419-31.

- Maldarelli F., Martin M. A. and Strebel K. (1991) Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation. *J Virol*, 65, 5732-43.
- Maldonado E., Drapkin R. and Reinberg D. (1996) Purification of human RNA polymerase II and general transcription factors. *Methods Enzymol*, 274, 72-100.
- Maldonado E., Ha I., Cortes P., Weis L. and Reinberg D. (1990) Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex. *Mol Cell Biol*, 10, 6335-47.
- Malim M. H., Hauber J., Le S. Y., Maizel J. V. and Cullen B. R. (1989) The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*, 338, 254-7.
- Mangeat B., Turelli P., Caron G., Friedli M., Perrin L. and Trono D. (2003) Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*, 424, 99-103.
- Manninen A., Renkema G. H. and Saksela K. (2000) Synergistic activation of NFAT by HIV-1 nef and the Ras/MAPK pathway. *J Biol Chem*, 275, 16513-7.
- Mansky L. M., Preveral S., Selig L., Benarous R. and Benichou S. (2000) The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate. *J Virol*, 74, 7039-47.
- Mansky L. M. and Temin H. M. (1995) Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol*, 69, 5087-94.
- Margolis D. M., Somasundaran M. and Green M. R. (1994) Human transcription factor YY1 represses human immunodeficiency virus type 1 transcription and virion production. *J Virol*, 68, 905-10.
- Mariani R., Chen D., Schröfelbauer B., Navarro F., König R., Bollman B., Münk C., Nymark-McMahon H. and Landau N. R. (2003) Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell*, 114, 21-31.
- Marmorstein R. (2001) Structure and function of histone acetyltransferases. *Cell Mol Life Sci*, 58, 693-703.
- Marshall N. F., Peng J., Xie Z. and Price D. H. (1996) Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem*, 271, 27176-83.
- Martin-Serrano J., Zang T. and Bieniasz P. D. (2003) Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol*, 77, 4794-804.

- Marzio G., Tyagi M., Gutierrez M. I. and Giacca M. (1998) HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13519-24.
- Mastrangelo I. A., Courey A. J., Wall J. S., Jackson S. P. and Hough P. V. (1991) DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5670-4.
- Matute C., Domercq M. and Sanchez-Gomez M.V. (2005) Glutamate-mediated glial injury. *Glia*.
- Maxon M. E., Goodrich J. A. and Tjian R. (1994) Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIH: a model for promoter clearance. *Genes Dev*, 8, 515-24.
- Mayer W., Niveleau A., Walter J., Fundele R. and Haaf T. (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 403, 501-2.
- Mayr B. and Montminy M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 599-609.
- McBride A. E. and Silver P. A. (2001) State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell*, 106, 5-8.
- McKinsey T. A., Zhang C. L., Lu J. and Olson E. N. (2000) Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature*, 408, 106-11.
- McMichael A. J. and Hanke T. (2003) HIV vaccines 1983-2003. *Nat Med*, 9, 874-80.
- Mehle A., Strack B., Ancuta P., Zhang C., McPike M. and Gabuzda D. (2004) Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, 279, 7792-8.
- Miller D. W. (1999) Immunobiology of the blood-brain barrier. *J Neurovirol*, 5, 570-8.
- Miller M. D., Farnet C. M. and Bushman F. D. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol*, 71, 5382-90.
- Miller M. D., Warmerdam M. T., Gaston I., Greene W. C. and Feinberg M. B. (1994) The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med*, 179, 101-13.

- Mitola S., Soldi R., Zanon I., Barra L., Gutierrez M. I., Berkhout B., Giacca M. and Bussolino F. (2000) Identification of specific molecular structures of human immunodeficiency virus type 1 Tat relevant for its biological effects on vascular endothelial cells. *J Virol*, 74, 344-53.
- Morris J.R., Chen J.L., Geyer P.K. and Wu C.T. (1998) Two modes of transvection : enhancer action in trans and bypass of a chromatin insulator in cis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 10740-10745.
- Motta M. C., Divecha N., Lemieux M., Kamel C., Chen D., Gu W., Bultsma Y., McBurney M. and Guarente L. (2004) Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell*, 116, 551-63.
- Murata T., Nitta M. and Yasuda K. (1998) Transcription factor CP2 is essential for lens-specific expression of the chicken alphaA-crystallin gene. *Genes Cells*, 3, 443-57.
- Nabel G. and Baltimore D. (1987) An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*, 326, 711-3.
- Naghavi M. H., Estable M. C., Schwartz S., Roeder R. G. and Vahlne A. (2001) Upstream stimulating factor affects human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat-directed transcription in a cell-specific manner, independently of the HIV-1 subtype and the core-negative regulatory element. *J Gen Virol*, 82, 547-59.
- Nakabeppu Y. and Nathans D. (1991) A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell*, 64, 751-9.
- Nakamura T., Yamazaki Y., Saiki Y., Moriyama M., Largaespada D. A., Jenkins N. A. and Copeland N. G. (2000) Evi9 encodes a novel zinc finger protein that physically interacts with BCL6, a known human B-cell proto-oncogene product. *Mol Cell Biol*, 20, 3178-86.
- Narlikar G. J., Fan H. Y., Kingston R. E. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, 108, 475-87.
- Navia B. A., Jordan B. D. and Price R. W. (1986) The AIDS dementia complex: I. Clinical features. *Ann Neurol*, 19, 517-24.
- Neish A. S., Anderson S. F., Schlegel B. P., Wei W. and Parvin J. D. (1998) Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Res*, 26, 847-53.
- Neville M., Stutz F., Lee L., Davis L. I. and Rosbash M. (1997) The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol*, 7, 767-75.

- Nielsen S. J., Schneider R., Bauer U. M., Bannister A. J., Morrison A., O'Carroll D., Firestein R., Cleary M., Jenuwein T., Herrera R. E. and Kouzarides T. (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, 412, 561-5.
- Nikolov D. B. and Burley S. K. (1997) RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 15-22.
- North B. J., Marshall B. L., Borra M. T., Denu J. M. and Verdin E. (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*, 11, 437-44.
- Nuovo G. J., Gallery F., MacConnell P. and Braun A. (1994) In situ detection of polymerase chain reaction-amplified HIV-1 nucleic acids and tumor necrosis factor- α RNA in the central nervous system. *Am J Pathol*, 144, 659-66.
- O'Reilly M. M., McNally M. T. and Beemon K. L. (1995) Two strong 5' splice sites and competing, suboptimal 3' splice sites involved in alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology*, 213, 373-85.
- Ohlsson C., Kley N., Werner H. and LeRoith D. (1998) p53 regulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1. *Endocrinology*, 139, 1101-7.
- Olsen H. S., Cochrane A. W., Dillon P. J., Nalin C. M. and Rosen C. A. (1990) Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids. *Genes Dev*, 4, 1357-64.
- Ono A. and Freed E. O. (2001) Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13925-30.
- Onyango P., Celic I., McCaffery J. M., Boeke J. D. and Feinberg A. P. (2002) SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13653-8.
- Orchard K., Perkins N., Chapman C., Harris J., Emery V., Goodwin G., Latchman D. and Collins M. (1990) A T-cell protein which recognizes a palindromic DNA sequence in the negative regulatory element of the HIV-1 long terminal repeat with homology to steroid/thyroid hormone receptor binding sites. *Biochem Soc Trans*, 18, 555-6.
- Orphanides G., Lagrange T. and Reinberg D. (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*, 10, 2657-83.

Ossipow V., Tassan J. P., Nigg E. A. and Schibler U. (1995) A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation. *Cell*, 83, 137-46.

Ostlund Farrants A. K., Blomquist P., Kwon H. and Wrangé O. (1997) Glucocorticoid receptor-glucocorticoid response element binding stimulates nucleosome disruption by the SWI/SNF complex. *Mol Cell Biol*, 17, 895-905.

Ott M., Schnölzer M., Garnica J., Fischle W., Emiliani S., Rackwitz H. R. and Verdin E. (1999) Acetylation of the HIV-1 Tat protein by p300 is important for its transcriptional activity. *Curr Biol*, 9, 1489-92.

Pagans S., Pedal A., North B. J., Kaehlcke K., Marshall B. L., Dorr A., Hetzer-Egger C., Henklein P., Frye R., McBurney M. W., Hruby H., Jung M., Verdin E. and Ott M. (2005) SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS Biol*, 3, 41.

Paillart J. C., Shehu-Xhilaga M., Marquet R. and Mak J. (2004) Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat Rev Microbiol*, 2, 461-72.

Papavassiliou A. G. (1995) Molecular medicine. Transcription factors. *N Engl J Med*, 332, 45-7.

Park J. I., Tsai S. Y. and Tsai M. J. (2003) Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. *Keio J Med*, 52, 174-81.

Paxton W., Connor R. I. and Landau N. R. (1993) Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol*, 67, 7229-37.

Peliska J. A. and Benkovic S. J. (1992) Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, 258, 1112-8.

Pendergrast P. S., Morrison D., Tansey W. P. and Hernandez N. (1996) Mutations in the carboxy-terminal domain of TBP affect the synthesis of human immunodeficiency virus type 1 full-length and short transcripts similarly. *J Virol*, 70, 5025-34.

Pereira L. A., Bentley K., Peeters A., Churchill M. J. and Deacon N. J. (2000) A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res*, 28, 663-8.

Peterlin B. M. and Trono D. (2003) Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol*, 3, 97-107.

Peterson C. L. and Laniel M. A. (2004) Histones and histone modifications. *Curr Biol*, 14, 546-51

- Peudener S., Hery C., Montagnier L. and Tardieu M. (1991) Human microglial cells: characterization in cerebral tissue and in primary culture, and study of their susceptibility to HIV-1 infection. *Ann Neurol*, 29, 152-61.
- Philipsen S. and Suske G. (1999) A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 27, 2991-3000.
- Pierson T., McArthur J. and Siliciano R. F. (2000) Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol*, 18, 665-708.
- Pion M., Jordan A., Biancotto A., Dequiedt F., Gondois-Rey F., Rondeau S., Vigne R., Hejnar J., Verdin E. and Hirsch I. (2003) Transcriptional suppression of in vitro-integrated human immunodeficiency virus type 1 does not correlate with proviral DNA methylation. *J Virol*, 77, 4025-32.
- Poiesz B. J., Ruscetti F. W., Gazdar A. F., Bunn P. A., Minna J. D. and Gallo R. C. (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 7415-9.
- Pomerantz R. J. (2003) HIV: cross-talk and viral reservoirs. *Nature*, 424, 136-7.
- Pope M. and Haase A. T. (2003) Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med*, 9, 847-52.
- Price R. W. and Brew B. J. (1988) The AIDS dementia complex. *J Infect Dis*, 158, 1079-83.
- Przybylski G. K., Dik W. A., Wanzeck J., Grabarczyk P., Majunke S., Martin-Subero J. I., Siebert R., Dölken G., Ludwig W. D., Verhaaf B., van Dongen J. J., Schmidt C. A. and Langerak A. W. (2005) Disruption of the BCL11B gene through inv(14)(q11.2q32.31) results in the expression of BCL11B-TRDC fusion transcripts and is associated with the absence of wild-type BCL11B transcripts in T-ALL. *Leukemia*, 19, 201-8.
- Ptashne M. (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*, 335, 683-9.
- Qiu Y., Krishnan V., Zeng Z., Gilbert D. J., Copeland N. G., Gibson L., Yang-Feng T., Jenkins N. A., Tsai M. J. and Tsai S. Y. (1995) Isolation, characterization, and chromosomal localization of mouse and human COUP-TF I and II genes. *Genomics*, 29, 240-6.
- Quinn J., Fyrberg A. M., Ganster R. W., Schmidt M. C. and Peterson C. L. (1996) DNA-binding properties of the yeast SWI/SNF complex. *Nature*, 379, 844-7.

- Rabbi M. F., Saifuddin M., Gu D. S., Kagnoff M. F. and Roebuck K. A. (1997) U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat contains TRE-like cAMP-responsive elements that bind both AP-1 and CREB/ATF proteins. *Virology*, 233, 235-45.
- Ramchandani S., Bhattacharya S. K., Cervoni N. and Szyf M. (1999) DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6107-12.
- Ramji D. P. and Foka P. (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*, 365, 561-75.
- Raposo G., Moore M., Innes D., Leijendekker R., Leigh-Brown A., Benaroch P. and Geuze H. (2002) Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic*, 3, 718-29.
- Ratner L., Starcich B., Josephs S. F., Hahn B. H., Reddy E. P., Livak K. J., Petteway S. R., Pearson M. L., Haseltine W. A. and Arya S. K. (1985) Polymorphism of the 3' open reading frame of the virus associated with the acquired immune deficiency syndrome, human T-lymphotropic virus type III. *Nucleic Acids Res*, 13, 8219-29.
- Razin A. and Cedar H. (1977) Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 2725-8.
- Razin A. and Riggs A. D. (1980) DNA methylation and gene function. *Science*, 210, 604-10.
- Rea S., Eisenhaber F., O'Carroll D., Strahl B. D., Sun Z. W., Schmid M., Opravil S., Mechtler K., Ponting C. P., Allis C. D. and Jenuwein T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406, 593-9.
- Renjifo B., Chung M., Gilbert P., Mwakagile D., Msamanga G., Fawzi W. and Essex M. (2003) In-utero transmission of quasispecies among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *Virology*, 307, 278-82.
- Richman D. D., (2003) HIV-1 chemotherapy. *Nature*, 410, 995-1001.
- Robertson K. D., Ait-Si-Ali S., Yokochi T., Wade P. A., Jones P. L. and Wolffe A. P. (2000) DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*, 25, 338-42.
- Roebuck K. A. and Saifuddin M. (1999) Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expr*, 8, 67-84.

- Rohr O., Aunis D. and Schaeffer E. (1997) COUP-TF and Sp1 interact and cooperate in the transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in human microglial cells. *J Biol Chem*, 272, 31149-55.
- Rohr O., Schwartz C., Aunis D. and Schaeffer E. (1999) CREB and COUP-TF mediate transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 genome in Jurkat T cells in response to cyclic AMP and dopamine. *J Cell Biochem*, 75, 404-13.
- Romerio F., Gabriel M. N. and Margolis D. M. (1997) Repression of human immunodeficiency virus type 1 through the novel cooperation of human factors YY1 and LSF. *J Virol*, 71, 9375-82.
- Rosen C. A., Terwilliger E., Dayton A., Sodroski J. G. and Haseltine W. A. (1988) Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 2071-5.
- Ross H. L., Nonnemacher M. R., Hogan T. H., Quiterio S. J., Henderson A., McAllister J. J., Krebs F. C. and Wigdahl B. (2001) Interaction between CCAAT/enhancer binding protein and cyclic AMP response element binding protein 1 regulates human immunodeficiency virus type 1 transcription in cells of the monocyte/macrophage lineage. *J Virol*, 75, 1842-56.
- Roth S. Y., Denu J. M. and Allis C. D. (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 70, 81-120.
- Rountree M. R., Bachman K. E. and Baylin S. B. (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*, 25, 269-77.
- Rous P. (1911) A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med*, 13, 397-411.
- Roux P., Alfieri C., Hrimech M., Cohen E. A. and Tanner J. E. (2000) Activation of transcription factors NF-kappaB and NF-IL-6 by human immunodeficiency virus type 1 protein R (Vpr) induces interleukin-8 expression. *J Virol*, 74, 4658-65.
- Rudd M. D., Izban M. G. and Luse D. S. (1994) The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8057-61.
- Russell R. S., Roldan A., Detorio M., Hu J., Wainberg M. A. and Liang C. (2003) Effects of a single amino acid substitution within the p2 region of human immunodeficiency virus type 1 on packaging of spliced viral RNA. *J Virol*, 77, 12986-95.
- Russo F. O., Patel P. C., Ventura A. M. and Pereira C. A. (1999) HIV-1 long terminal repeat modulation by glucocorticoids in monocytic and lymphocytic cell lines. *Virus Res*, 64, 87-94.

- Ryan R. F., Schultz D. C., Ayyanathan K., Singh P. B., Friedman J. R., Fredericks W. J. and Rauscher F. J. (1999) KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Krüppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*, 19, 4366-78.
- Ryseck R. P. and Bravo R. (1991) c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene*, 6, 533-42.
- Ryu H., Lee J., Olofsson B. A., Mwidau A., Dedeoglu A., Escudero M., Flemington E., Azizkhan-Clifford J., Ferrante R. J., Ratan R. R. and Deodoglu A. (2003) Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4281-6.
- Sacktor N., McDermott M. P., Marder K., Schifitto G., Selnes O. A., McArthur J. C., Stern Y., Albert S., Palumbo D., Kieburtz K., De Marcaida J. A., Cohen B. and Epstein L. (2002) HIV-associated cognitive impairment before and after the advent of combination therapy. *J Neurovirol*, 8, 136-42.
- Samson S. L. and Wong N. C. (2002) Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression. *J Mol Endocrinol*, 29, 265-79.
- Santos-Rosa H., Schneider R., Bannister A. J., Sherriff J., Bernstein B. E., Emre N. C., Schreiber S. L., Mellor J. and Kouzarides T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, 419, 407-11.
- Santos-Rosa H. and Caldas C. (2005) Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*, 41, 2381-402.
- Satterwhite E., Sonoki T., Willis T. G., Harder L., Nowak R., Arriola E. L., Liu H., Price H. P., Gesk S.,
- Steinemann D., Schlegelberger B., Oscier D.G., Siebert R., Tucker P. W. and Dyer M. J. (2001) The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood*, 98, 3413-20.
- Sawada S. and Littman D. R. (1991) Identification and characterization of a T-cell-specific enhancer adjacent to the murine CD4 gene. *Mol Cell Biol*, 11, 5506-15.
- Sawaya B. E., Rohr O., Aunis D. and Schaeffer E. (1996) Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, a transcriptional activator of HIV-1 gene expression in human brain cells. *J Biol Chem*, 271, 23572-6.
- Scherdin U., Rhodes K. and Breindl M. (1990) Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *J Virol*, 64, 907-12.

- Schnittman S. M., Psallidopoulos M. C., Lane H. C., Thompson L., Baseler M., Massari F., Fox C. H., Salzman N. P. and Fauci A. S. (1989) The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science*, 245, 305-8.
- Schnitzler G., Sif S. and Kingston R. E. (1998) Human SWI/SNF interconverts a nucleosome between its base state and a stable remodeled state. *Cell*, 94, 17-27.
- Schröder 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.
- Schwartz C., Catez P., Rohr O., Lecestre D., Aunis D. and Schaeffer E. (2000) Functional interactions between C/EBP, Sp1, and COUP-TF regulate human immunodeficiency virus type 1 gene transcription in human brain cells. *J Virol*, 74, 65-73.
- Schwartz O., Maréchal V., Le Gall S., Lemonnier F. and Heard J. M. (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med*, 2, 338-42.
- Schwartz S., Felber B. K., Benko D. M., Fenyö E. M. and Pavlakis G. N. (1990) Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 64, 2519-29.
- Schwer B., North B. J., Frye R. A., Ott M. and Verdin E. (2002) The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol*, 158, 647-57.
- Sementchenko V. I. and Watson D. K. (2000) Ets target genes: past, present and future. *Oncogene*, 19, 6533-48.
- Senawong T., Peterson V. J., Avram D., Shepherd D. M., Frye R. A., Minucci S. and Leid M. (2003) Involvement of the histone deacetylase SIRT1 in chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)-interacting protein 2-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem*, 278, 43041-50.
- Senawong T., Peterson V. J. and Leid M. (2005) BCL11A-dependent recruitment of SIRT1 to a promoter template in mammalian cells results in histone deacetylation and transcriptional repression. *Arch Biochem Biophys*, 434, 316-25.
- Serfling E., Berberich-Siebelt F., Chuvpilo S., Jankevics E., Klein-Hessling S., Twardzik T. and Avots A. (2000) The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1498, 1-18.

- Seth A., Hodge D. R., Thompson D. M., Robinson L., Panayiotakis A., Watson D. K. and Papas T. S. (1993) ETS family proteins activate transcription from HIV-1 long terminal repeat. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 9, 1017-23.
- Seto E., Shi Y. and Shenk T. (1991) YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription in vitro. *Nature*, 354, 241-5.
- Sha M., Ferré-D'Amaré A. R., Burley S. K. and Goss D. J. (1995) Anti-cooperative biphasic equilibrium binding of transcription factor upstream stimulatory factor to its cognate DNA monitored by protein fluorescence changes. *J Biol Chem*, 270, 19325-9.
- Shao W. (1997) Characterization of HMBP-2, a DNA-Binding Protein That Binds to HIV-1 LTR When only One of the Three Sp1 Sites Is Methylated. *J Biomed Sci*, 4, 39-46.
- Shaulian E. and Karin M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, 4, 131-6.
- 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.
- Sheehy A. M., Gaddis N. C. and Malim M. H. (2003) The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med*, 9, 1404-7.
- Sheridan P. L., Mayall T. P., Verdin E. and Jones K. A. (1997) Histone acetyltransferases regulate HIV-1 enhancer activity in vitro. *Genes Dev*, 11, 3327-40.
- Sheridan P. L., Sheline C. T., Cannon K., Voz M. L., Pazin M. J., Kadonaga J. T. and Jones K. A. (1995) Activation of the HIV-1 enhancer by the LEF-1 HMG protein on nucleosome-assembled DNA in vitro. *Genes Dev*, 9, 2090-104.
- Sherman M. P. and Greene W. C. (2002) Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes Infect*, 4, 67-73.
- Sherman P. A. and Fyfe J. A. (1990) Human immunodeficiency virus integration protein expressed in *Escherichia coli* possesses selective DNA cleaving activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 5119-23.
- Shestakova E. A., Mansuroglu Z., Mokrani H., Ghinea N. and Bonnefoy E. (2004) Transcription factor YY1 associates with pericentromeric gamma-satellite DNA in cycling but not in quiescent (G0) cells. *Nucleic Acids Res*, 32, 4390-9.

- Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstine J. R., Cole P. A., Casero R. A. and Shi Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119, 941-53.
- Shilatifard A., Conaway R. C. and Conaway J. W. (2003) The RNA polymerase II elongation complex. *Annu Rev Biochem*, 72, 693-715.
- Shirra M. K. and Hansen U. (1998) LSF and NTF-1 share a conserved DNA recognition motif yet require different oligomerization states to form a stable protein-DNA complex. *J Biol Chem*, 273, 19260-8.
- Sieweke M. H., Tekotte H., Jarosch U. and Graf T. (1998) Cooperative interaction of ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *EMBO J*, 17, 1728-39.
- Simon V. and Ho D. D. (2003) HIV-1 dynamics in vivo : implications for therapy. *Nat Rev Microbiol*, 3, 181-90.
- Simmons A., Aluvihare V. and McMichael A. (2001) Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity*, 14, 763-77.
- Simonsson S. and Gurdon J. (2004) DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Biol*, 6, 984-90.
- Singh M. K. and Pauza C. D. (1992) Extrachromosomal human immunodeficiency virus type 1 sequences are methylated in latently infected U937 cells. *Virology*, 188, 451-8.
- Smale S. T. and Baltimore D. (1989) The "initiator" as a transcription control element. *Cell*, 57, 103-13.
- Smith J. S., Brachmann C. B., Celic I., Kenna M. A., Muhammad S., Starai V. J., Avalos J. L., Escalante-Semerena J. C., Grubmeyer C., Wolberger C. and Boeke J. D. (2000) A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6658-63.
- Spina C. A., Kwoh T. J., Chowder M. Y., Guatelli J. C. and Richman D. D. (1994) The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes. *J Exp Med*, 179, 115-23.
- Starcich B., Ratner L., Josephs S. F., Okamoto T., Gallo R. C. and Wong-Staal F. (1985) Characterization of long terminal repeat sequences of HTLV-III. *Science*, 227, 538-40.
- Steger D. J. and Workman J. L. (1997) Stable co-occupancy of transcription factors and histones at the HIV-1 enhancer. *EMBO J*, 16, 2463-72.

- Stevenson M. (2003) HIV-1 pathogenesis. *Nat Med*, 9, 853-60.
- Stewart M. D., Li J. and Wong J. (2005) Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol*, 25, 2525-38.
- Strahl B. D. and Allis C. D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41-5.
- Sudarsanam P. and Winston F. (2000) The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet*, 16, 345-51.
- Suzuki T., Kimura A., Nagai R. and Horikoshi M. (2000) Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes Cells*, 5, 29-41.
- Takahashi K., Wesselingh S. L., Griffin D. E., McArthur J. C., Johnson R. T. and Glass J. D. (1996) Localization of HIV-1 in human brain using polymerase chain reaction/in situ hybridization and immunocytochemistry. *Ann Neurol*, 39, 705-11.
- Temin H. M. and Mizutani S. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226, 1211-3.
- Tesmer V. M., Rajadhyaksha A., Babin J. and Bina M. (1993) NF-IL6-mediated transcriptional activation of the long terminal repeat of the human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 7298-302.
- Thomas M. J. and Seto E. (1999) Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene*, 236, 197-208.
- Thomson S., Clayton A. L., Hazzalin C. A., Rose S., Barratt M. J. and Mahadevan L. C. (1999) The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *EMBO J*, 18, 4779-93.
- Towers G., Harris J., Lang G., Collins M. K. and Latchman D. S. (1995) Retinoic acid inhibits both the basal activity and phorbol ester-mediated activation of the HIV long terminal repeat promoter. *AIDS*, 9, 129-36.
- Trillo-Pazos G., Diamanturos A., Rislove L., Menza T., Chao W., Belem P., Sadiq S., Morgello S., Sharer L. and Volsky D. J. (2003) Detection of HIV-1 DNA in microglia/macrophages, astrocytes and neurons isolated from brain tissue with HIV-1 encephalitis by laser capture microdissection. *Brain Pathol*, 13, 144-54.
- Tsukiyama T., Daniel C., Tamkun J. and Wu C. (1995) ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. *Cell*, 83, 1021-6.

- Unutmaz D., KewalRamani V. N., Marmon S. and Littman D. R. (1999) Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J Exp Med*, 189, 1735-46.
- Uptain S. M., Kane C. M. and Chamberlin M. J. (1997) Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu Rev Biochem*, 66, 117-72.
- Utlely R. T., Ikeda K., Grant P. A., Côté J., Steger D. J., Eberharter A., John S. and Workman J. L. (1998) Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature*, 394, 498-502.
- Valsamakis A., Zeichner S., Carswell S. and Alwine J. C. (1991) The human immunodeficiency virus type 1 polyadenylation signal: a 3' long terminal repeat element upstream of the AAUAAA necessary for efficient polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 2108-12.
- Van Lint C. (2000) Role of chromatin in HIV-1 transcriptional regulation. *Adv Pharmacol*, 48, 121-160.
- Van Lint C., Amella C. A., Emiliani S., John M., Jie T. and Verdin E. (1997) Transcription factor binding sites downstream of the human immunodeficiency virus type 1 transcription start site are important for virus infectivity. *J Virol*, 71, 6113-27.
- Van Lint C., Emiliani S., Ott M. and Verdin E. (1996) Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *EMBO J*, 15, 1112-20.
- Van Lint C., Ghysdael J., Paras P., Burny A. and Verdin E. (1994) A transcriptional regulatory element is associated with a nuclease-hypersensitive site in the pol gene of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 68, 2632-48.
- van Opijnen T., Kamoschinski J., Jeeninga R. E. and Berkhout B. (2004) The human immunodeficiency virus type 1 promoter contains a CATA box instead of a TATA box for optimal transcription and replication. *J Virol*, 78, 6883-90.
- Van Maele B. and Debyser Z. (2005) HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS Rev*, 7, 26-43.
- Vandel L., Nicolas E., Vaute O., Ferreira R., Ait-Si-Ali S. and Trouche D. (2001) Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol Cell Biol*, 21, 6484-94.
- Varin A., Manna S. K., Quivy V., Decrion A. Z., Van Lint C., Herbein G. and Aggarwal B. B. (2003) Exogenous Nef protein activates NF-kappa B, AP-1, and c-Jun N-terminal kinase and stimulates HIV transcription in promonocytic cells. Role in AIDS pathogenesis. *J Biol Chem*, 278, 2219-27.

- Vaute O., Nicolas E., Vandel L. and Trouche D. (2002) Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Res*, 30, 475-81.
- Vaziri H., Dessain S. K., Ng Eaton E., Imai S. I., Frye R. A., Pandita T. K., Guarente L. and Weinberg R. A. (2001) hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 107, 149-59.
- Veljkovic J. and Hansen U. (2004) Lineage-specific and ubiquitous biological roles of the mammalian transcription factor LSF. *Gene*, 343, 23-40.
- Venkatesan K., McManus H. R., Mello C. C., Smith T. F. and Hansen U. (2003) Functional conservation between members of an ancient duplicated transcription factor family, LSF/Grainyhead. *Nucleic Acids Res*, 31, 4304-16.
- Verdin E. (1991) DNase I-hypersensitive sites are associated with both long terminal repeats and with the intragenic enhancer of integrated human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 65, 6790-9.
- Verdin E., Dequiedt F. and Kasler H. G. (2003) Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet*, 19, 286-93.
- Verdin E., Paras P. and Van Lint C. (1993) Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *EMBO J*, 12, 3249-59.
- Verger A. and Duterque-Coquillaud M. (2002) When Ets transcription factors meet their partners. *Bioessays*, 24, 362-70.
- Veschambre P., Simard P. and Jalinot P. (1995) Evidence for functional interaction between the HIV-1 Tat transactivator and the TATA box binding protein in vivo. *J Mol Biol*, 250, 169-80.
- Vignali M., Hassan A. H., Neely K. E. and Workman J. L. (2000) ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol*, 20, 1899-910.
- Wade P. A., Jones P. L., Vermaak D. and Wolffe A. P. (1999) Purification of a histone deacetylase complex from *Xenopus laevis*: preparation of substrates and assay procedures. *Methods Enzymol*, 304, 715-25.
- Wain-Hobson S., Sonigo P., Danos O., Cole S. and Alizon M. (1985) Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell*, 40, 9-17.
- Wakabayashi Y., Watanabe H., Inoue J., Takeda N., Sakata J., Mishima Y., Hitomi J., Yamamoto T., Utsuyama M., Niwa O., Aizawa S. and Kominami R. (2003) Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. *Nat Immunol*, 4, 533-9.

- Wang L. H., Tsai S. Y., Cook R. G., Beattie W. G., Tsai M. J. and O'Malley B. W. (1989) COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature*, 340, 163-6.
- Wang L., Mukherjee S., Jia F., Narayan O. and Zhao L. J. (1995) Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. *J Biol Chem*, 270, 25564-9.
- Wang Y., Wysocka J., Sayegh J., Lee Y. H., Perlin J. R., Leonelli L., Sonbuchner L. S., McDonald C. H., Cook R. G., Dou Y., Roeder R. G., Clarke S., Stallcup M. R., Allis C. D. and Coonrod S. A. (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination. *Science*, 306, 279-83.
- Wei P., Garber M. E., Fang S. M., Fischer W. H. and Jones K. A. (1998) A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, 92, 451-62.
- Wiegand H. L., Doehle B. P., Bogerd H. P. and Cullen B. R. (2004) A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J*, 23, 2451-8.
- Wieggers K., Rutter G., Kottler H., Tessmer U., Hohenberg H. and Kräusslich H. G. (1998) Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol*, 72, 2846-54.
- Wiley C. A., Achim C. L., Christopherson C., Kidane Y., Kwok S., Masliah E., Mellors J., Radhakrishnan L., Wang G. and Soontornniyomkij V. (1999) HIV mediates a productive infection of the brain. *AIDS*, 13, 2055-9.
- Wilk T., Gowen B. and Fuller S. D. (1999) Actin associates with the nucleocapsid domain of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein. *J Virol*, 73, 1931-40.
- Wilk T., Gross I., Gowen B. E., Rutten T., de Haas F., Welker R., Kräusslich H. G., Boulanger P. and Fuller S. D. (2001) Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 75, 759-71.
- Wilson C. J., Chao D. M., Imbalzano A. N., Schnitzler G. R., Kingston R. E. and Young R. A. (1996) RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell*, 84, 235-44.
- Wolfe A. L., Felock P. J., Hastings J. C., Blau C. U. and Hazuda D. J. (1996) The role of manganese in promoting multimerization and assembly of human immunodeficiency virus type 1 integrase as a catalytically active complex on immobilized long terminal repeat substrates. *J Virol*, 70, 1424-32.

- Wu W., Blumberg B. M., Fay P. J. and Bambara R. A. (1995) Strand transfer mediated by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in vitro is promoted by pausing and results in misincorporation. *J Biol Chem*, 270, 325-32.
- Yamada T., Hitomi Y., Shimizu K., Ohki M. and Oikawa T. (1993) Extinction of T cell receptor alpha-chain gene expression accompanied by loss of the lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF-1) in murine somatic cell hybrids. *Mol Cell Biol*, 13, 1943-50.
- Yamaguchi Y., Inukai N., Narita T., Wada T. and Handa H. (2002) Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol Cell Biol*, 22, 2918-27.
- Yan Q., Moreland R. J., Conaway J. W. and Conaway R. C. (1999) Dual roles for transcription factor IIF in promoter escape by RNA polymerase II. *J Biol Chem*, 274, 35668-75.
- Yang W. M., Inouye C., Zeng Y., Bearss D. and Seto E. (1996) Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 12845-50.
- Yang W. M., Tsai S. C., Wen Y. D., Fejer G. and Seto E. (2002) Functional domains of histone deacetylase-3. *J Biol Chem*, 277, 9447-54.
- Yang X. J. and Seto E. (2003) Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 13, 143-53.
- Yao Y. L., Yang W. M. and Seto E. (2001) Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Mol Cell Biol*, 21, 5979-91.
- Yeung F., Hoberg J. E., Ramsey C. S., Keller M. D., Jones D. R., Frye R. A. and Mayo M. W. (2004) Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*, 23, 2369-80.
- Zack J. A., Arrigo S. J., Weitsman S. R., Go A. S., Haislip A. and Chen I. S. (1990) HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell*, 61, 213-22.
- Zawel L. and Reinberg D. (1995) Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annu Rev Biochem*, 64, 533-61.
- Zennou V., Petit C., Guetard D., Nerhbass U., Montagnier L. and Charneau P. (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell*, 101, 173-85.

Zenzie-Gregory B., Sheridan P., Jones K. A. and Smale S. T. (1993) HIV-1 core promoter lacks a simple initiator element but contains a bipartite activator at the transcription start site. *J Biol Chem*, 268, 15823-32.

Zhang C. L., McKinsey T. A., Chang S., Antos C. L., Hill J. A. and Olson E. N. (2002) Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell*, 110, 479-88.

Zhang H., Yang B., Pomerantz R. J., Zhang C., Arunachalam S. C. and Gao L. (2003) The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*, 424, 94-8.

Zhang Y., Ng H. H., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Bird A. and Reinberg D. (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*, 13, 1924-35.

Zhang Y. and Reinberg D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*, 15, 2343-60.

Zheng Y. H., Irwin D., Kurosu T., Tokunaga K., Sata T. and Peterlin B. M. (2004) Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol*, 78, 6073-6.

Zhou M., Deng L., Lacoste V., Park H. U., Pumfery A., Kashanchi F., Brady J. N. and Kumar A. (2004) Coordination of transcription factor phosphorylation and histone methylation by the P-TEFb kinase during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *J Virol*, 78, 13522-33.

Zlatanova J., Leuba S. H. and van Holde K. (1998) Chromatin fiber structure: morphology, molecular determinants, structural transitions. *Biophys J*, 74, 2554-66.